



HAL
open science

Bases génétiques et fonctionnelles de la durabilité des résistances polygéniques au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez le piment (*Capsicum annuum*)

Julie Quenouille Épouse Lederer Quenouille-Lederer

► To cite this version:

Julie Quenouille Épouse Lederer Quenouille-Lederer. Bases génétiques et fonctionnelles de la durabilité des résistances polygéniques au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez le piment (*Capsicum annuum*). Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2013. Français. NNT : 2013AVIG0650 . tel-00982624

HAL Id: tel-00982624

<https://theses.hal.science/tel-00982624>

Submitted on 24 Apr 2014

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.



Université d'Avignon et
des Pays de Vaucluse



Région Provence-Alpes-Côte d'Azur



INRA PACA
Unités de *Génétique et
d'Amélioration des Fruits et Légumes
et de Pathologie végétale*

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

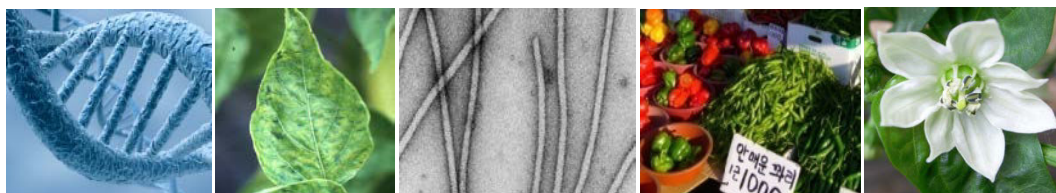
Spécialité : Sciences Agronomiques

présentée et soutenue publiquement par

Julie QUENOUILLE-LEDERER

le 28 février 2013

**Bases génétiques et fonctionnelles de la durabilité de
résistances polygéniques au virus Y de la pomme de terre
(PVY) chez le piment (*Capsicum annuum*)**



JURY

Mme Anne-Marie CHEVRE, Directeur de Recherche, INRA
Mme Jacqui SHYKOFF, Directeur de Recherche, CNRS
M. Jérôme ENJALBERT, Chargé de Recherche, INRA
M. Frédéric MOQUET, Directeur scientifique, Gautier Semences
M. Benoît MOURY, Directeur de Recherche, INRA
M. Alain PALLOIX, Directeur de Recherche, INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse
Co-directeur de Thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein des Unités de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL) et de Pathologie végétale de l'INRA d'Avignon avec le soutien de la région PACA.

Je remercie les deux équipes de direction, Mathilde Causse, Véronique Lefebvre, Cindy Morris, Dominique Andurand et Mireille Jacquemond pour m'avoir accueillie et permis de réaliser ma thèse dans d'excellentes conditions de travail.

Les expérimentations ont été financées par le Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS) et par l'Agence nationale de la Recherche (ANR).

Je remercie les sociétés Gautier Semences, Clause Vegetable Seeds, Vilmorin SA, Rijk Zwaan et Sakata Vegetables Europe pour leur soutien financier.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury: Anne-Marie Chèvre, Jacqui Shykoff, Jérôme Enjalbert et Frédéric Moquet pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Un grand merci à tous les membres de mon comité de thèse et plus particulièrement à mes deux « parrains » de thèse Régine Delourme et Stéphane Blanc. Merci pour vos remarques constructives et vos conseils avisés qui m'ont beaucoup apporté.

Mes plus vifs remerciements sont adressés à mes deux « chefs » Benoit Moury et Alain Palloix qui ont su faire de ces trois années de thèse une expérience inoubliable. Benoit, ta passion pour la science (et surtout pour les virus) et ta vivacité d'esprit ont été pour moi une grande source d'inspiration. Merci pour ta disponibilité, ton sens critique vis-à-vis de mes idées parfois farfelues et pour les relectures et corrections de ce manuscrit. Alain, merci d'avoir partagé avec tant d'enthousiasme ta passion pour la génétique et surtout pour le piment mais aussi tes expériences aux pays des Inuits (entre autres). Un grand merci pour tes corrections et ton grand soutien lors de la rédaction de ce manuscrit. Enfin, merci à vous deux pour nos nombreuses discussions parfois « pimentées » mais toujours très constructives et enrichissantes.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe RDS (Résistance Durable chez les Solanacées). Ghislaine et Bruno, merci pour votre aide technique et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Merci à Anne, Maryse, Alex, Patrick et Nasradin pour leurs conseils en biologie moléculaire et pour leur sympathie. Merci à Véronique pour ses conseils sur la génétique du piment. Melissa, merci pour nos discussions scientifiques ou non, je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse et pour la suite. Toujours côté GAFL, merci à Anne-Marie pour le partage de ses connaissances concernant la diversité du piment. Je tiens tout particulièrement à remercier Pascale, dès le début de ma thèse tu m'as appris à m'organiser, tu as été d'une aide précieuse pour mes nombreux tests ELISA mais aussi pour certaines manip de biologie moléculaire. Un grand merci pour ton soutien et ton amitié. Merci à Marianne, Carole et Jean-Luc pour nos discussions sur les facteurs de traduction. Un merci particulier à Marianne pour ton aide scientifique et technique pour les expériences de VIGS. Merci aussi à Vérane pour son aide technique pour les expériences de VIGS et pour sa bonne humeur. Jean-Paul, merci pour ton aide en bioinformatique et surtout pour l'utilisation de Linux. Merci à l'équipe expérimentale pour avoir pris soin de mes chers piments.

Je remercie très chaleureusement toute l'équipe de Virologie. Vincent, un grand merci pour ton aide lors des tests de résistance mais aussi en biologie moléculaire. Un merci particulier à Fred pour nos discussions scientifiques passionnantes, ton soutien en statistiques mais aussi pour tout le reste. Un grand merci à Josselin pour son aide précieuse lors de ma première année de thèse. Je tiens aussi à remercier Cécile, Mireille et Hervé pour nos discussions scientifiques très enrichissantes. Un clin d'œil particulier à Karine et Greg, merci pour votre aide lors des gros tests ELISA ainsi que pour tous les bons moments passés avec vous. Un grand merci à Patrick, mon fournisseur officiel de sérum ELISA et à Catherine et Pauline pour les moments agréables passés avec vous lors des tests ELISA. Michel, merci pour ton aide lors de tous mes petits « bugs » informatiques mais aussi pour tous les moments passés en ta compagnie. Merci à Isabelle pour m'avoir initiée aux joies de la microscopie. Un grand merci à toute l'équipe des serres, Joël, Michèle, Nathalie, Laurent et Michel pour le soin qu'ils apportent quotidiennement à nos plantes. Merci à Frédéric et Jean-Marc pour les réparations liées à tous les soucis techniques des chambres de cultures ou ... de voiture! Merci à Hélène et Magalie pour la bonne organisation logistique de la patho. Un grand merci au reste des personnes de l'unité pour cette ambiance de travail si agréable et propice au travail de recherche.

Je tiens également à remercier les secrétaires des deux unités. Claudine, Pascale, Claudie, Astrid, Evelyne et Annick, merci pour votre aide dans les tâches administratives. Claudie, merci pour ton aide lors de la mise en page de ce manuscrit.

Un grand merci à Brigitte Mangin de Toulouse pour son aide lors de la détection QTL et surtout sur l'utilisation du logiciel MCQTL.

Merci à Estelle et Ludo, « mes » deux stagiaires, pour votre aide et les bons moments que l'on a passés lors des longues heures de manip.

Un clin d'œil particulier à Elsa, merci pour la formation Latex, ton soutien, ton amitié et ... tes bons petits plats. Bon courage pour la suite de ta thèse.

Un grand merci à Greg et Gustavo, mes deux collègues de bureau. Merci pour nos discussions sérieuses ou un peu moins. Greg, merci pour nos délires.

Merci à toutes les personnes qui ont fait de ces trois années de thèse une expérience formidable aussi bien professionnelle que personnelle. Merci à Elsa, Fred et Benoit pour nos pauses café de l'après-midi. Merci aux actuels et anciens thésards ou stagiaires pour nos pique-niques à la villa et les soirées passées ensemble. Un merci particulier à Caro, Hana, Morgane et Yuko qui, même de loin, m'ont énormément soutenue lors de la rédaction de cette thèse.

Merci à Perennial, génotype de piment aux mille secrets et au PVY de m'avoir permis d'obtenir tous ces résultats.

Je tiens aussi à remercier mes amis et ma famille. Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mon parcours professionnel et sans qui rien n'aurait été possible, à Sandrine et Pierre-Yves, à mes deux grand-mères, à mes beaux-parents qui sont toujours là pour moi et à Margot. Merci à tous pour votre soutien.

Baptiste, on garde toujours le meilleur pour la fin, merci pour ton amour et ton soutien inconditionnel surtout pendant la période de rédaction. Je t'aime et je te dédie cette thèse.

Liste des acronymes et abréviations

Acronymes de virus infectant des végétaux :

BYDV-PAV	<i>Barley yellow dwarf-PAV</i> (genre <i>Luteovirus</i>)
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i> (genre <i>Macluravirus</i>)
BCTV	<i>Beet curly top virus</i> (genre <i>Curtovirus</i>)
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (genre <i>Caulimovirus</i>)
CChMVd	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (genre <i>Polamoviroid</i>)
ChiVMV	<i>Chilli veinal mottle virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i> (genre <i>Cucumovirus</i>)
CNV	<i>Cucumber necrosis virus</i> (genre <i>Tombusvirus</i>)
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i> (genre <i>Hostuviroid</i>)
KYMV	<i>Kennedya yellow mosaic virus</i> (genre <i>Tymovirus</i>)
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
PepVMV	<i>Pepper veinal mottle virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
PRLV	<i>Potato leafroll virus</i> (genre <i>Polerovirus</i>)
PVX	<i>Potato virus X</i> (genre <i>Potexvirus</i>)
PVY	<i>Potato virus Y</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (genre <i>Ilarvirus</i>)
RpRDV	<i>Raspberry ringspot virus</i> (genre <i>Nepovirus</i>)
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i> (genre <i>Sobemovirus</i>)
SBWMV	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i> (genre <i>Furovirus</i>)
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> (genre <i>Tobamovirus</i>)
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i> (genre <i>Tobravirus</i>)
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i> (genre <i>Tobamovirus</i>)
ToCV	<i>Tomato chlorosis virus</i> (genre <i>Crinivirus</i>)
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (genre <i>Tospovirus</i>)
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (genre <i>Tymovirus</i>)
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i> (genre <i>Tritimovirus</i>)
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (genre <i>Potyvirus</i>)

Acronymes de virus infectant des animaux :

FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i> (virus de la fièvre aphteuse)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine (genre <i>Lentivirus</i>)
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i> (genre <i>Vesiculovirus</i>)

Abréviations :

ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AFLP: <i>amplified fragment-length polymorphisms</i>
ANR : Agence Nationale de la Recherche
ARMS-PCR : <i>amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction</i>
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
AUDPC : <i>Area under the disease progress curve</i>
CI : <i>cylindrical inclusion</i>
COS: <i>conserved ortholog set</i>
CP : <i>coat protein</i> (protéine de capsid)

CTPS: Comité Technique Permanent de la Sélection
DAS: *double antibody sandwich*
dCAPS: *derived cleaved amplified polymorphic sequence*
DIECA: *diethyldithiocarbamate*
DO: densité optique
Dpi: *days post inoculation*
eIF(iso)4E: *eukaryotic initiation factor (iso)4E*
eIF4E: *eukaryotic initiation factor 4E* (facteur d'initiation de la traduction 4E)
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ER: extreme resistance
GAFL : génétique et amélioration des fruits et légumes
h²: héritabilité
HC-Pro: *helper-component protease*
HD : haploïde doublée
HR : *hypersensitive reaction or resistance*
iQTLm: *iterative composite interval mapping*
Jai : jours après inoculation
Kb : Kilobase
KO: *knock-out*
MOI : *multiplicity of infection*
MP : *movement protein* (protéine de mouvement)
MQM: multiple QTL mapping
Ne : taille effective de la population
Nia : *first nuclear inclusion*
Nib : *second nuclear inclusion*
nt: nucléotide
ORF: *open reading frame* (cadre ouvert de lecture)
PABP : *poly(A)-binding protein*
pb: paire de bases
PCR: *polymerase chain reaction*
PDS :
PEIFL: Pôle Européen d'Innovation Fruits et Légumes
phytoène désaturase : PDS
poly A: polyadenosine
PTGS : *post transcriptional gene silencing* (extinction post-transcriptionnelle d'un gène)
QTL: *quantitative trait locus*
RB: *resistance breaking*
RC: retrecroisement
RdRp : l'ARN polymérase ARN dépendante
RFLP: restriction fragment length polymorphisms
RISC : *RNA-Induced Silencing complex*
RT: reverse transcription (transcription inverse)
s : intensité de la sélection
SAM : sélection assistée par marqueurs
siARN : petits ARN interférants
SIM: *simple interval mapping*
SNP: *single-nucleotide polymorphism*
SSCP: *single-strand conformation polymorphism*
SSR: *simple sequence repeats*
VA: Viral accumulation
VIGS : *virus induced gene silencing* (extinction d'un gene induite par un virus)
VPg : *virus protein genome-linked*
YW: Yolo Wonder

Table des matières

Remerciements

Liste des acronymes et abréviations

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	1
A. Le contournement des résistances végétales	4
1. Contexte socio-économique	4
2. Enjeux scientifiques	5
3. Scénario du contournement d'une résistance	6
a) La mutation	8
b) La recombinaison	9
c) La sélection	10
d) La dérive génétique	12
e) La migration	13
B. Apports et limites de l'évolution expérimentale dans le contexte de la durabilité des résistances	14
1. Estimation des paramètres de génétique des populations virales	14
a) Taux de mutation	14
b) L'évolution du taux de mutation des virus	15
c) Taux de recombinaison	17
d) Pression de sélection	18
e) Estimation de la dérive génétique	20
2. Analyse des mécanismes d'adaptation aux résistances des plantes	24
a) Mesure de la capacité de contournement d'une résistance qualitative.	24
b) Mesure de la capacité de contournement d'une résistance quantitative	27
c) Identification des déterminants du contournement	29
3. Effets pléiotropiques des mutations de contournement	30
a) Coût de <i>fitness</i> à l'échelle intra-plante	30
b) Coût de <i>fitness</i> lors de la transmission inter-plantes	32
c) Coût de <i>fitness</i> à l'échelle de l'agrosystème	33
4. Limites envisagées	35
a) Représentativité des isolats testés par rapport à la diversité naturelle du virus	35
b) Absence d'infections mixtes	36
c) Méthode d'inoculation	37
d) La fréquence d'apparition de variants virulents en laboratoire est-elle représentative de la fréquence en conditions naturelles ?	38
e) Age des plantes	41
C. Pathogen profile	43
Article: <i>Potato virus Y</i>: a major crop pathogen that provided major insights into the evolution of viral pathogenicity	43
1. <i>Potato virus Y</i> , the type member of the genus <i>Potyvirus</i>	44
a) General description	44
b) Genome organization and protein functions	45
2. What is structuring <i>Potato virus Y</i> diversity ?	49
a) Where, how and when did PVY emerge?	49
b) Host and geography as drivers of PVY diversity	52
c) The emergence of PVY recombinants	54
3. <i>Potato virus Y</i> and its host: Models of pathogenicity evolution in plant viruses	55
a) Eukaryotic initiation factor 4E-mediated resistances and PVY: Evidence of recent and rapid coevolution	55
b) Steady relationships between PVY and dominant resistances	59
c) Insights into the durability of oligo- and polygenic resistances	61
d) PVY infectivity, virulence and fitness: correlated evolution of pathogenicity traits	62
D. Objectifs de la thèse	73

CHAPITRE I : Mécanismes d'action des facteurs génétiques augmentant la durabilité de l'allèle de résistance <i>pvr2</i>³	75
Article : Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown	77
Supplementary table	87
CHAPITRE II : Recherche des facteurs génétiques modulant la fréquence de contournement de <i>pvr2</i>³ par cartographie génétique et relation avec la résistance partielle	89
Article : Host genes can slow down pathogen evolution: Quantitative trait loci controlling the breakdown of a major resistance gene are relevant for durable resistance breeding	91
A. Introduction	92
B. Materials and methods	93
1. Mapping population	93
2. Virus material	93
3. Measure of resistance breakdown frequency	94
4. Measure of quantitative resistance	95
5. Genotyping of molecular markers and linkage map	95
6. Statistical analyses	96
7. QTL analysis by regression interval mapping	97
8. QTL analysis by maximum likelihood interval mapping	97
C. Results	98
1. Characterization of the phenotypic traits	98
2. Mapping QTLs for the quantitative resistance traits	99
3. Mapping QTLs for the frequency of <i>pvr2</i> ³ -resistance breakdown	100
4. Effect of parental alleles on the RB frequency	102
D. Discussion	102
1. The breakdown frequency of a major resistance gene is a heritable trait	102
2. Alleles increasing quantitative resistance are favourable to the durability of major resistance genes.	104
3. Resistance durability as the result of a combination of mechanisms	105
4. A genetic trade-off between large-spectrum resistance and resistance durability that can be solved by breeding strategy	106
E. Supplementary informations	109
F. Acknowledgements	111
G. References	111
CHAPITRE III : Disponibilité des facteurs génétiques favorables à la durabilité du gène de résistance <i>pvr2</i>³ au sein des ressources génétiques du piment	115
Article : Diversified genetic backgrounds shape the durability of a major resistance gene. Analysis of a core collection of pepper resistant to <i>Potato virus Y</i>	117
CHAPITRE IV : Vers la validation fonctionnelle de l'effet du gène <i>pvr6</i> sur la durabilité du gène de résistance <i>pvr2</i>	133
A. Introduction	135
B. Extinction du gène <i>pvr6</i> induite par un virus (VIGS)	135
1. Obtention de <i>Tobacco rattle virus</i> (TRV) recombinants	136
2. Tests préliminaires	137
3. Test de validation fonctionnelle	142

C.	Expression transitoire de l'allèle <i>pvr6</i> ⁺ chez des lignées porteuses de l'allèle <i>pvr6</i>	143
1.	Matériel viral et végétal utilisé	143
2.	Accumulation relative de PVY-eIF(iso)4E et PVY-GFP	144
3.	Efficacité de l'expression transitoire	145
4.	Tests de validation fonctionnelle du gène <i>pvr6</i> par expression transitoire	145
5.	Discussion et perspectives	147
D.	Tableau supplémentaire:	148
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		149
A.	Synthèse des principaux résultats	151
B.	Les mécanismes affectant la durabilité du gène <i>pvr2</i> ³ sont-ils généralisables à d'autres gènes majeurs de résistance?	153
1.	Effet de la résistance quantitative additionnelle apportée par le fonds génétique	154
2.	Complexification des possibilités d'acquisition de la virulence	155
3.	Ralentissement de la sélection des variants les plus adaptés	156
C.	<i>pvr6</i> : un allèle déstabilisateur de la durabilité des résistances contrôlées par eIF4E	159
1.	<i>pvr6</i> : un gène candidat aux QTL RB-3 et VA-3	159
2.	Un modèle fonctionnel expliquant le rôle de <i>pvr6</i> dans la durabilité de <i>pvr2</i> ³	166
3.	Perspectives	169
D.	Avancées pour la sélection de résistances durables	170
1.	Evaluer les risques a posteriori : test direct de la fréquence de contournement	171
2.	Sélectionner pour la durabilité: critère direct du taux de contournement ou indirect via la résistance partielle additionnelle	174
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		177
Résumé		

Synthèse bibliographique

Cette thèse se situe dans le contexte général de la durabilité des résistances des plantes aux agents pathogènes. A l'interface entre l'amélioration des plantes et la phytopathologie, elle a été réalisée au sein des équipes "résistance durable des *Solanacées*" et "virologie" des unités de "génétique et amélioration des fruits et légumes (GAFL)" et de "pathologie végétale" de l'INRA d'Avignon. La durabilité d'une résistance végétale dépend essentiellement de la capacité des pathogènes ciblés à évoluer afin de s'adapter à cette résistance. Les études concernant la durabilité des résistances font donc appel à de nombreux concepts de biologie évolutive.

La synthèse bibliographique de ce manuscrit a pour objectif principal d'introduire les différents concepts de biologie évolutive nécessaires à la compréhension des travaux réalisés durant cette thèse. Celle-ci se décompose en quatre parties. Dans la première partie, nous aborderons le contexte socio-économique et les enjeux scientifiques de l'étude du contournement d'une résistance. La deuxième partie présentera, sans objectif d'exhaustivité, les apports et les limites de l'évolution expérimentale dans le contexte particulier de la durabilité des résistances aux phytovirus. La troisième partie, faisant l'objet d'un "*Pathogen profile*" accepté pour publication dans la revue *Molecular Plant Pathology*, présentera le *Potato virus Y* (PVY) utilisé comme modèle viral durant cette thèse. Cette revue met en évidence que l'étude des interactions plantes/PVY a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de la coévolution hôtes/pathogènes et plus particulièrement sur l'adaptation des pathogènes aux mécanismes de défense de leur hôte. Enfin, cette partie bibliographique introduira la partie expérimentale qui explore les mécanismes et les déterminants génétiques de la durabilité des résistances chez le couple piment (*Capsicum annuum*)-PVY, objet des travaux de recherche que j'ai réalisés durant cette thèse.

A. Le contournement des résistances végétales

1. Contexte socio-économique

Le principal défi de la recherche agronomique actuelle est de fournir des systèmes de production agricole efficaces et durables afin de satisfaire les demandes d'alimentation d'une population humaine et d'une production animale en hausse. Cependant les surfaces cultivables sont limitées et tous les sols possédant un fort potentiel de productivité sont déjà exploités. L'amélioration de la productivité et de la qualité des variétés passe par la nécessité de mieux protéger les plantes et les récoltes. En effet, les pertes de productions végétales dues aux ravageurs et aux maladies sont élevées (environ 30% à l'échelle mondiale, Oerke & Dehne, 2004). Durant les dernières décennies, l'utilisation de pesticides a permis une protection rapide, facile et efficace contre les populations de bioagresseurs des plantes. La France était, en 2008, le premier consommateur européen de pesticides et le 4^{ème} mondial derrière les Etats-Unis, le Brésil et le Japon. Cependant, les effets néfastes de l'utilisation des produits phytosanitaires sur la santé humaine et sur l'environnement ne sont plus à démontrer (Viel & Richardson, 1993; Savary & Teng, 1994; Galanaud et al., 2005).

En lien avec le plan Ecophyto 2018, visant à réduire de 50% l'utilisation des pesticides entre 2008 et 2018, de nombreux travaux de recherche visent à fournir et mettre en place des stratégies de protection des cultures plus respectueuses de l'environnement. La création et l'utilisation de variétés de plantes hôtes résistantes aux bioagresseurs constitue l'une des meilleures alternatives aux produits phytosanitaires de par leur efficacité, leur simplicité d'utilisation par les agriculteurs, leur faible coût et l'absence d'effets indésirables vis-à-vis de l'homme et de l'environnement. Cette stratégie est cependant limitée par la capacité des populations de bioagresseurs ciblés à s'adapter à une résistance nouvellement déployée.

Lorsque l'adaptation des populations pathogènes compromet l'efficacité économique des variétés résistantes, c'est-à-dire lorsque les pathogènes adaptés provoquent des pertes de rendement supérieures au seuil économiquement acceptable par les agriculteurs, les agronomes parlent de **contournement de résistance**. Dans le cas contraire, la résistance est dite **durable** (Johnson, 1984). La durée nécessaire pour observer un contournement de résistance en condition naturelle est très variable

(Parlevliet, 2002; Kang *et al.*, 2005). Par conséquent, de longs et coûteux efforts de sélection peuvent être ruinés en seulement quelques années voire quelques mois comme, par exemple, le gène *Tm-1* de résistance au *Tomato mosaic virus* (ToMV; genre *Tobamovirus*) chez la tomate. Le problème est d'autant plus important que les gènes majeurs de résistance sont rares au sein des ressources génétiques. Il est donc important de les préserver et de les utiliser judicieusement.

2. Enjeux scientifiques

Selon la définition de Johnson (1984), une résistance est dite durable si elle a conservé son efficacité après avoir été exploitée de manière prolongée, sur de grandes surfaces et dans un environnement favorable au développement du pathogène. La durabilité est donc, par définition, une notion établie *a posteriori*, ce qui pose un problème majeur aux sélectionneurs qui ont besoin de critères *a priori* de sélection précoce vu le temps nécessaire à la création de nouvelles variétés.

Depuis les travaux de Johnson (1984), de nombreux programmes de recherche ont été développés pour caractériser les déterminants majeurs de la durabilité d'une résistance afin d'en fournir des critères prédictifs. Dans cette optique, de nombreux efforts de recherche ont permis l'identification de la nature moléculaire des gènes de résistance chez les plantes (Hammond-Kosack & Parker, 2003; Kang *et al.*, 2005; Robaglia & Caranta, 2006). Cependant, même si les **résistances quantitatives**¹ sont considérées comme plus durables que les **résistances qualitatives**² (Lindhout, 2002), aucun lien direct entre la nature d'une résistance et sa durabilité n'a pu être clairement démontré (Lecoq *et al.*, 2004; Moury *et al.*, 2011). Néanmoins, certaines stratégies de sélection variétale telles que le pyramidage de plusieurs gènes majeurs (Pink, 2002;

¹ **Résistances quantitatives** : aussi nommées résistances partielles. Les résistances quantitatives confèrent une résistance partielle vis-à-vis d'un pathogène, c'est-à-dire qu'elles ne bloquent pas entièrement le cycle du pathogène mais réduit sa multiplication et les dégâts qu'il provoque. Du point de vue de l'hérédité, les résistances quantitatives sont souvent polygéniques, c'est-à-dire sous le contrôle de plusieurs gènes à effet quantitatif nommés "QTL" (*quantitative trait loci*). Néanmoins il existe des résistances quantitatives monogéniques (sous le contrôle d'un seul gène).

² **Résistances qualitatives** : aussi nommées résistances totales. Les résistances qualitatives confèrent à la plante une résistance complète vis-à-vis d'un pathogène. La résistance qualitative bloque le pathogène lors des étapes précoces de l'infection et celui-ci ne provoque pas de dégâts. Du point de vue de l'hérédité, ces résistances sont monogéniques dominantes ou récessives. Les gènes conférant la résistance sont appelés "gènes majeurs" de résistance.

McDonald & Linde, 2002) ou encore l'association entre un gène majeur et une résistance quantitative (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012) semblent très prometteuses en terme de durabilité. Les raisons de la meilleure durabilité de ces deux stratégies restent encore à élucider. Au sein d'un agroécosystème, la gestion spatio-temporelle de différentes variétés résistantes est proposée afin de ralentir voire abolir l'adaptation du pathogène comme, par exemple, l'alternance des variétés dans le temps ou dans l'espace (Kiyosawa, 1982; Wolfe, 1985; Mundt *et al.*, 2002; McDonald & Linde, 2002). Cependant, les plus grandes avancées scientifiques dans la compréhension, voire la prédiction de la durabilité des résistances ont été réalisées grâce à l'analyse de la dynamique et de la génétique des populations pathogènes. Ces avancées ont notamment mis en évidence que le potentiel adaptatif de chaque pathogène lui est propre et est un caractère prédictif de la durabilité des résistances qui ciblent ces pathogènes (McDonald & Linde, 2002). Des études théoriques, basées sur les connaissances obtenues en laboratoire, peuvent ensuite permettre d'identifier les déterminants clés de la durabilité d'une résistance et les meilleures stratégies de gestion spatio-temporelle des résistances disponibles. Par exemple, Fabre *et al.* (2009) ont montré que les déterminants majeurs influençant la durabilité d'une résistance végétale contre un virus étaient le taux de mutation du virus, le nombre et la nature des mutations nécessaires au virus pour contourner une résistance ainsi que le coût de *fitness*³ associé à ces mutations. Durant les dernières décennies, notre compréhension des interactions hôte/pathogène a énormément progressée et laisse entrevoir la possibilité de prédire a priori quelle sera la durabilité d'une résistance.

3. Scénario du contournement d'une résistance

Le contournement d'une résistance par un agent pathogène implique différents mécanismes génétiques au sein des populations pathogènes (figure 1). Dans un agro-écosystème où le variant **virulent**⁴ ne préexiste pas, la première étape se situe à l'échelle de la cellule, des tissus ou organes dans laquelle un variant virulent doit **apparaître** via des processus de mutation ou de recombinaison modifiant le facteur

³ **Fitness** : Capacité d'un individu à survivre et à se reproduire.

⁴ **Virulence** : le terme virulence est utilisé, selon la définition des phytopathologistes, pour désigner la composante qualitative binaire du pouvoir pathogène (capacité ou non à infecter un génotype d'hôte porteur d'une résistance donnée).

d'avirulence. La fréquence de ces deux processus dépend des **taux de mutation et de recombinaison**⁵ intrinsèques du pathogène ciblé ainsi que du nombre d'évènements évolutifs nécessaires au contournement de la résistance considérée (Harrison, 2002; McDonald & Linde, 2002). Après son apparition, le variant virulent se retrouve en compétition avec le reste de la population pathogène pour sa multiplication et pour la colonisation de la plante entière : c'est la deuxième étape du scénario. L'aboutissement de cette étape dépend de la *fitness* relative du variant virulent par rapport au reste de la population pathogène. Plus le variant virulent se multiplie dans (sur) la plante où il est apparu, plus il aura de chance de **se disséminer** à des plantes porteuses du gène de résistance considéré : c'est la troisième étape du scénario. Chacune de ces étapes fait intervenir différentes forces évolutives qui façonnent le devenir de la population pathogène. Ces forces évolutives sont la mutation, la recombinaison, la sélection, la dérive génétique et la migration, et chacune laisse des signatures particulières au sein des populations pathogènes (McDonald & Linde, 2002).

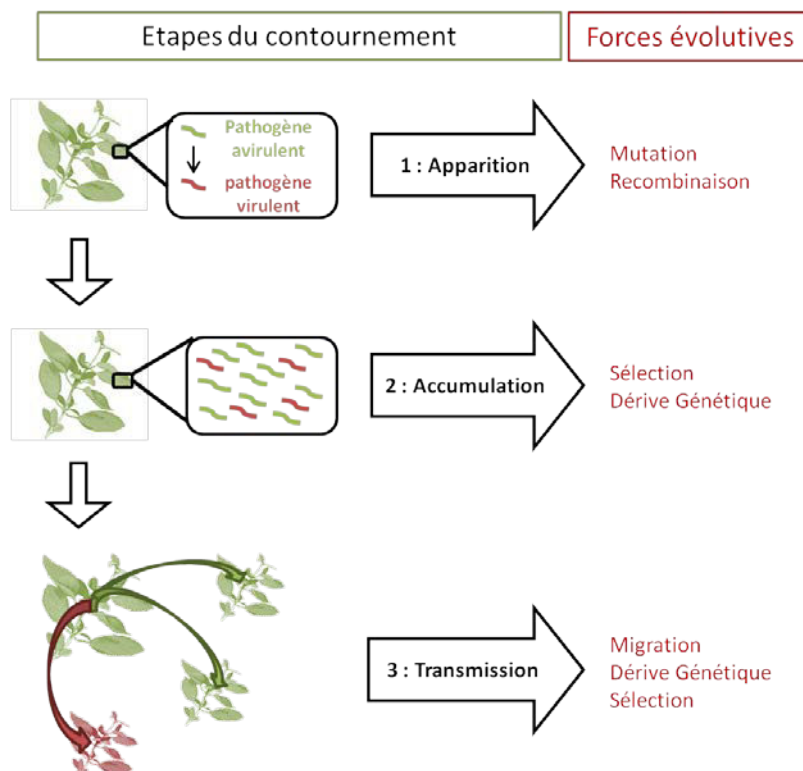


Figure 1. Scénario du contournement d'un gène de résistance chez une plante par un pathogène et des forces évolutives impliquées.

⁵ **taux de mutation et de recombinaison** : nombre de mutations (ou de recombinaisons) par génération et par nucléotide.

a) La mutation

La mutation est une modification dans le génome d'un individu constituant la source principale de diversité génétique au sein des espèces. C'est le mécanisme majeur d'apparition des virulences, en particulier chez les bactéries et les virus, dont la taille importante des populations entraîne un plus grand nombre de mutations (McDonald & Linde, 2002). Le taux de mutation varie selon l'organisme et la région génomique considérée. Les taux les plus faibles sont observés chez les eucaryotes supérieurs (entre 10^{-9} et 10^{-11}) alors que les taux les plus forts sont observés chez les **viroïdes**⁶ (entre 10^{-2} et 10^{-3}) (Figure 2 ; Drake *et al.*, 1998; Drake & Holland, 1999; Gago *et al.*, 2009).

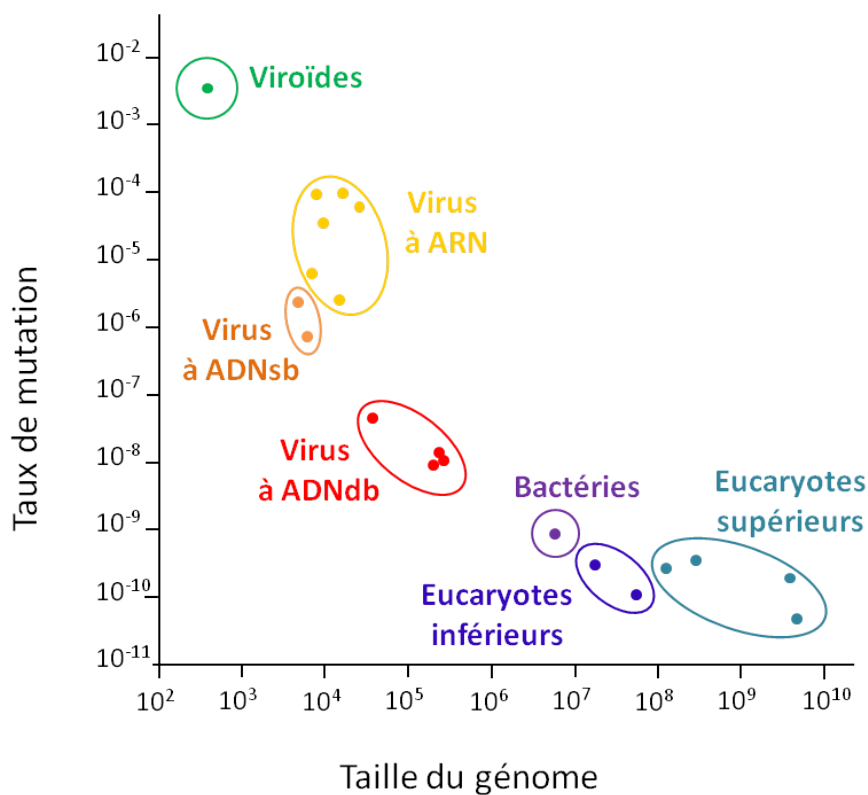


Figure 2: Taux de mutation par réplication et par nucléotide en fonction de la taille du génome pour les différents organismes biologiques. D'après Gago *et al.* (2009).

Le viroïde correspond au *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd). Les virus à ARN sont (de la gauche vers la droite) le *Tobacco mosaic virus*, le *Human rhinovirus*, le *Poliovirus*, le *Vesicular stomatitis virus*, le bactériophage $\Phi 6$ et le *Measles virus*. Les virus à ADN simple brin (ADNsb) sont les bactériophages $\Phi X174$ et m13. Les virus à ADN double brin (ADNdb) le bactériophage λ , l'*Herpes simplex virus* et les bactériophage T2 et T4. La bactérie est *Escherichia coli*. Les eucaryotes inférieurs sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Neurospora crassa*. Les eucaryotes supérieure sont *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* et *Homo sapiens*.

⁶ **viroïde** : particule, plus petite que les virus, composée d'un seul ARN circulaire et sans capsid.

Il existe plusieurs types de mutations : (i) les mutations par substitution correspondant au changement d'un seul nucléotide, (ii) les mutations par insertion et (iii) les mutations par délétion. Chez les champignons et les bactéries, l'acquisition de virulences résulte souvent de la perte du gène d'avirulence par délétion ou par insertion d'un fragment d'ADN qui a pour conséquence l'inactivation du gène d'avirulence (Kearney *et al.*, 1988; Kousik, 1996; Kang *et al.*, 2001; Schürch *et al.*, 2004; Gout *et al.*, 2007).

Par exemple, la virulence de certaines souches de *Leptosphaeria maculans* vis-à-vis du gène de résistance *Rlm1* du colza (*Brassica napus*) est due à une délétion dans le gène d'avirulence *AvrLm1* (Gout *et al.* 2007). Chez les virus, chaque protéine est multifonctionnelle et la perte du facteur d'avirulence entraînerait la perte de fonction(s) indispensable(s). Par conséquent, chez les virus, l'acquisition de virulence se fait essentiellement via des mutations par substitution nucléotidique et souvent un très faible nombre de mutations est suffisant pour le contournement de la résistance (Jenner *et al.*, 2000; Moury *et al.*, 2004; Janzac *et al.*, 2010).

Les mutations par substitutions sont de deux types : (i) les mutations synonymes, qui ne changent pas l'acide aminé lors de la traduction et (ii) les mutations non-synonymes, changeant l'acide aminé. Les mutations par substitutions peuvent aussi être classées en tant que transitions ou transversions. Une transition correspond à la substitution d'une base purique par une autre base purique ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique, alors que les transversions correspondent à la substitution d'une base purique par une base pyrimidique ou inversement. La fréquence des transitions est souvent supérieure à celle des transversions, principalement pour des raisons stériques.

b) La recombinaison

La recombinaison correspond à un échange d'information génétique entre deux génomes différents créant ainsi de nouvelles combinaisons génétiques et, par conséquent, de la diversité au sein de la population. Selon les organismes, la recombinaison se produit de différentes façons : (i) lors de la reproduction sexuée chez les eucaryotes, (ii) grâce à la conjugaison bactérienne chez les procaryotes et (iii) lorsque deux virus infectent simultanément une même cellule. Chez les populations pathogènes,

la recombinaison est reconnue comme un facteur de risque pour le contournement des résistances (McDonald & Linde, 2002). En effet, lorsque plusieurs allèles de virulence sont nécessaires au contournement d'une résistance, un recombinant peut accumuler ces allèles en un seul événement évolutif alors que, par mutation, plusieurs événements successifs seront nécessaires (McDonald & Linde, 2002).

c) La sélection

« Pouvons-nous douter [...] que les individus ayant quelque avantage, aussi léger soit-il, sur les autres, auraient une meilleure chance de survie et de procréer leurs caractères. D'autre part, nous pouvons être sûrs que n'importe quelle variation du moindre degré nuisible serait indéniablement détruite. C'est cette conservation des variations favorables, et le rejet des variations nuisibles, que j'appelle "Sélection Naturelle". Charles Darwin (1859) »

Cette citation illustre bien que la sélection est le mécanisme évolutif permettant d'expliquer l'adaptation des espèces à leur milieu. Cette force favorise l'augmentation (sélection positive) ou la diminution (sélection négative) de la fréquence de certaines mutations en fonction de leur valeur sélective (c'est-à-dire en fonction de leur effet sur la reproduction ou la survie des individus). La sélection peut prendre plusieurs formes (stabilisante, diversifiante ou directionnelle) selon la distribution des valeurs sélectives des différents phénotypes d'un caractère (figure 3).

- La **sélection stabilisante** favorise la fixation des phénotypes moyens par rapport aux phénotypes extrêmes. C'est le cas du poids des mammifères à la naissance, pour lequel deux sélections s'opposent: un poids élevé augmente les chances de survie (meilleur accès aux ressources, meilleure défense) mais il baisse la probabilité de survie de la mère alors qu'un poids faible favorise la survie de la mère mais diminue la probabilité de survie de l'enfant.
- La **sélection diversifiante** favorise la fixation des phénotypes extrêmes par rapport aux phénotypes moyens et se produit souvent dans les habitats hétérogènes. Un exemple est la taille des becs des pinsons ponceau à ventre brun (*Pirenestre ostrinus*). Dans leur habitat naturel, ces oiseaux peuvent se nourrir soit de grosses graines soit de petites. Seuls les oiseaux possédant un gros bec peuvent casser les coquilles dures des grosses graines tandis que les

oiseaux à petit bec sont assez adroits pour se saisir des petites. Les oiseaux avec un bec intermédiaire sont désavantagés car ils ne sont pas capables d'ouvrir les grosses graines et sont trop maladroits pour se saisir des petites (Smith, 1993).

- La **sélection directionnelle** favorise la fixation d'un phénotype extrême par rapport à l'autre souvent suite à un changement d'environnement. Par exemple, l'utilisation du pesticide DDT en Inde a entraîné l'augmentation rapide de la fréquence des moustiques résistants au DDT.

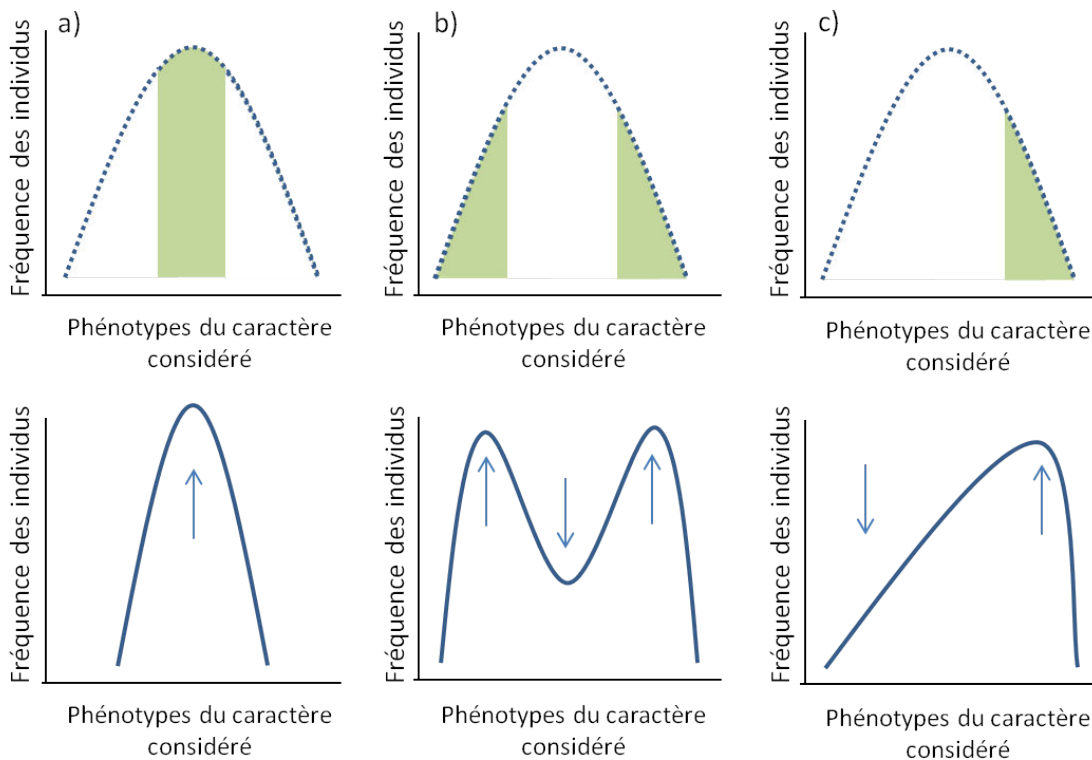


Figure 3 : Les trois types de sélection naturelle

Les graphiques de la partie supérieure représentent la distribution des phénotypes d'un même caractère au sein d'une population (pointillés bleus). La partie verte représente les phénotypes ayant la valeur sélective la plus élevée pour trois environnements différents a), b) et c). Les graphiques de la partie inférieure représentent l'évolution, au sein de ces trois environnements, de la fréquence des différents phénotypes du caractère considéré après l'action (flèche bleue) de la sélection stabilisante (a), de la sélection diversifiante (b) ou de la sélection directionnelle (c).

L'introduction d'une variété résistante dans un paysage agricole peut être considérée comme un changement d'environnement brutal pour le pathogène ciblé et, par conséquent, exerce une pression de sélection directionnelle en faveur des individus virulents capables d'infecter les plantes porteuses de cette résistance. Dans les systèmes agricoles actuels (homogénéité des pressions de sélection et parcelles de grande taille)

l'avantage sélectif des individus virulents est très élevé et la sélection est la force évolutive ayant le plus d'impact sur la structure des populations pathogènes (McDonald & Linde, 2002).

d) La dérive génétique

La dérive génétique correspond à une modification aléatoire de la fréquence des génotypes dans une population de taille limitée (Henry & Gouyon, 1999). Cette notion est très liée à la taille des populations: la dérive génétique sera nulle dans une population de taille infinie et sera très importante dans une population de petite taille. Dans une population de taille finie, la dérive génétique s'oppose à la sélection selon une relation entre **la taille effective de la population (N_e)**⁷ et l'intensité de la sélection (s). Lorsque que le produit N_e*s tend vers 0 ($N_e*s \ll 1$), la population est essentiellement soumise à la dérive génétique. A l'inverse, lorsque le produit N_e*s tend vers l'infini ($N_e*s \gg 1$), la population est essentiellement soumise à la sélection. Dans les cas intermédiaires, où N_e*s est proche de 1 ($N_e*s \approx 1$), les deux forces évolutives agissent de concert sur la population et, malgré la sélection, des allèles favorables peuvent être éliminés par dérive génétique (Ohta, 1992).

Müller (1964) souligne que dans les populations de taille finie, les individus possédant le moins de mutations dans leur génome peuvent être éliminés par le hasard et ceci même s'ils présentent une meilleure *fitness*. Müller (1964) compare alors ce mécanisme à un cliquet qui avance d'un cran (sans retour en arrière possible) à chaque fois que la classe des individus porteurs du plus faible nombre de mutations est éliminée par l'effet du hasard (dérive génétique), entraînant une accumulation de mutations dans la population. Ce processus est fortement dépendant de la taille de la population et du taux de mutation. Ainsi, dans des populations de taille réduite, des mutations délétères peuvent s'accumuler et entraîner, par le processus du « cliquet de Müller », une baisse progressive de la *fitness* de la population et, potentiellement, compromettre la survie de la population.

La dérive génétique a pour conséquence de réduire la variabilité génétique d'une population et potentiellement sa capacité à s'adapter à un nouvel environnement. De

⁷ **La taille efficace de la population (N_e)** : nombre d'individus qui transmettent leurs gènes à la génération suivante.

cette façon, des populations présentant des diminutions régulières de leur taille de population sont moins diversifiées et moins aptes à s'adapter que des populations dont la taille reste continuellement élevée (McDonald & Linde, 2002). Les populations pathogènes sont, au cours de leur cycle de vie, soumises à plusieurs **goulets d'étranglements**⁸ comme, par exemple, lors de la transmission des virus par leur vecteur (Moury *et al.*, 2007). Dans le contexte de la durabilité des résistances, ces forts goulets d'étranglement pourraient entraîner, par dérive génétique, la perte d'une mutation de virulence au sein de la population.

e) La migration

La migration représente les flux de génotypes dans l'espace (Henry & Gouyon, 1999) et participe activement à l'évolution des populations pathogènes (Brown & Hovmøller, 2002). Les migrations permettent l'échange d'individus entre différentes populations séparées géographiquement. Ainsi des mutations conférant un avantage adaptatif (comme, par exemple, la virulence vis-à-vis d'une résistance) peuvent se disperser entre les populations de telle manière que cet avantage sélectif se diffuse parmi les populations pathogènes (Burdon, 1993). Les capacités de dispersion des agents pathogènes sont déterminantes dans ce processus (Thrall & Burdon, 1999). Par ailleurs, l'homme joue un rôle important dans ce processus en dispersant les agents pathogènes bien au-delà de leurs limites naturelles, *via* le commerce et les pratiques culturelles.

⁸ **Goulet d'étranglement** : réduction rapide et massive de la taille de la population.

B. Apports et limites de l'évolution expérimentale dans le contexte de la durabilité des résistances

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'adaptation des populations pathogènes aux résistances variétales implique cinq forces évolutives qui agissent de concert sur la diversité des populations et façonnent leur devenir. La mise en place de stratégies de gestion durables et efficaces des résistances végétales nécessite, par conséquent, une bonne connaissance des capacités adaptatives de la population du pathogène ciblé. Dans cet objectif, l'**évolution expérimentale**⁹ a permis l'acquisition de nombreuses connaissances sur les mécanismes générant de la diversité au sein des populations pathogènes (mutation, recombinaison) ainsi que sur les processus écologiques déterminant les fluctuations des différents génotypes au sein de la population (sélection, dérive génétique). Dans ce type d'études, les virus à ARN constituent, de par leur fort taux de mutation, la petite taille de leur génome et leur temps de génération très court générant rapidement de grandes populations, d'excellents modèles d'étude.

Dans ce chapitre, nous allons voir comment l'évolution expérimentale de phytovirus a permis différentes avancées (fondamentales ou plus appliquées) dans le domaine de la durabilité des résistances végétales.

1. Estimation des paramètres de génétique des populations virales

a) Taux de mutation

La mutation étant la source majeure de diversité au sein des populations, de nombreux projets de recherche ont été mis en place afin de déterminer le taux de mutation de différents organismes (Drake *et al.* 1998). La difficulté majeure dans l'estimation du taux de mutation d'un organisme est de réduire au maximum les biais d'estimations dus au dispositif expérimental. Des biais importants peuvent apparaître quand (i) la partie du génome analysée est trop petite et trop peu représentative du génome de l'organisme étudié, (ii) l'histoire de la population est incertaine (par exemple, l'existence de goulet d'étranglement lors de passages successifs entraînant la

⁹ **Evolution expérimentale** : étude des processus évolutifs survenant dans des populations expérimentales en réponse aux conditions imposées par l'expérimentateur.

perte de certaines mutations par dérive génétique) et (iii) l'effet et l'intensité de la sélection est inconnue et peut faire disparaître les mutations les plus délétères.

Malgré ces différentes sources d'erreurs, une analyse théorique du taux de mutation des virus à ARN, réalisée à partir de l'estimation des fréquences de mutations de neuf virus lytiques à ARN infectant des animaux, donne une estimation similaire, comprise entre 10^{-4} et 10^{-5} mutations par nucléotide et par réplication (Drake & Holland, 1999). Sachant que la taille moyenne du génome d'un virus à ARN est d'environ 10^4 nucléotides, chaque réplication entraîne en moyenne une mutation par génome (Drake & Holland, 1999).

La première estimation non-biaisée du taux de mutation d'un virus à ARN a été réalisée par Malpica *et al.* (2002). Dans cette analyse, des plantes de *Nicotiana tabacum*, transformées avec la protéine de mouvement (MP) du *Tomato mosaic virus* (ToMV), ont été inoculées avec du ToMV puis les différentes mutations accumulées dans le gène MP du virus ont été caractérisées. La protéine MP étant produite par la plante, la copie du gène MP du ToMV agit alors comme un marqueur neutre (non soumis à la sélection) et, par conséquent, toutes les mutations possibles peuvent s'accumuler sans affecter le mouvement du virus. Les résultats de cette étude donnent une estimation du taux de mutation du ToMV égale à $2,34 \times 10^{-5}$ mutations par nucléotide et par réplication correspondant à environ 0,15 mutation par génome, ce qui est près de 7 fois moins que le taux estimé par Drake et Holland (1999). En utilisant la même stratégie, Tromas & Elena (2010) ont estimé le taux de mutation du *Tobacco etch virus* (TEV) entre 10^{-6} et 10^{-5} mutations par nucléotide et par réplication, ce qui est du même ordre que pour le ToMV.

b) L'évolution du taux de mutation des virus

L'évolution du taux de mutation chez les virus pourrait-être expliquée par trois facteurs principaux : (a) les mutations étant majoritairement délétères, une pression de sélection existerait pour réduire le taux de mutation ; (b) les mécanismes de correction de la réplication auraient un coût cinétique ou énergétique ce qui empêcherait leur sélection et (c) l'augmentation du taux de mutation augmenterait les chances de générer des mutations bénéfiques en permettant d'explorer plus largement le paysage adaptatif (Elena & Sanjuán, 2007). Chez les virus à ARN, le fort taux de mutation est la

conséquence des erreurs de réplication causées par l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et de l'absence de système de correction (Guyader & Giblot-Ducray, 2004). Furio *et al.* (2005) ont estimé le taux de mutation et la *fitness* de différents mutants de *Vesicular stomatitis virus* (VSV) possédant une mutation au sein de leur gène RdRp. Dans leur expérience, les mutations réduisant le taux de mutation avaient aussi la particularité de baisser le taux de réplication du virus. La même corrélation a ensuite été montrée pour un autre virus, le *Poliovirus-1*, pour lequel le taux d'accumulation était réduit chez les mutants présentant les taux de mutation les plus faibles (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005). Ces résultats révèlent un trade-off entre la fidélité de la RdRp et le taux de réplication. Le "coût de la fidélité" pourrait alors être trop fort pour des espèces qui ont besoin de se répliquer très rapidement pour pouvoir survivre. C'est le cas des virus à ARN pour lesquels il est nécessaire d'accomplir leur cycle viral le plus rapidement possible afin d'atteindre une taille de population importante avant que les mécanismes de défense de leur hôte se mettent en route (Coffin, 1995). Le coût de la fidélité pourrait alors expliquer pourquoi les RdRp virales n'ont pas de système de correction. De plus, les mutants de *Poliovirus-1* ayant un taux de mutation plus faible se sont montrés moins aptes à infecter les tissus cérébraux des souris. Les auteurs expliquent que ce résultat est certainement dû à une plus faible variabilité dans la population virale qui, par conséquent, a perdu sa capacité à s'adapter à de nouveaux environnements cellulaires (Pfeiffer & Kirkegaard 2005).

L'évolution des populations virales vers un fort taux de mutation présente donc un avantage adaptatif et évolutif évident. Cependant, ces virus ne peuvent pas dépasser une certaine "limite de mutations" à partir de laquelle ces erreurs sont trop nombreuses pour que la population virale soit viable. Ce phénomène, appelé "*error catastrophe*", a été validé expérimentalement par Crotty *et al.* (2001). Ces auteurs ont montré que la **ribavirine**¹⁰ augmente le taux de mutation jusqu'à une limite d'"*error catastrophe*" où les virus générés présentent des coûts de *fitness* trop importants. D'après leurs résultats, une multiplication par 10 du taux de mutation entraîne une baisse de *fitness* de 99,3 %. Des résultats similaires ont été trouvés pour d'autres analogues nucléosidiques et d'autres virus comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Loeb *et al.*, 1999)

¹⁰ La **ribavirine** est un analogue nucléosidique de la guanosine. C'est un antiviral à large spectre.

ou le virus de la fièvre aphteuse (*Foot-and-mouth disease virus*, FMDV) (Sierra *et al.*, 2000).

Le taux de mutation des virus est donc soumis à des pressions de sélection très fortes stabilisant le taux de mutation à son optimum. Toutes ces expériences concernent des virus à ARN infectant les animaux et, à ma connaissance, aucune expérience équivalente n'a été réalisée chez les phytovirus.

c) Taux de recombinaison

Chez les virus, le taux de recombinaison dépend de la fréquence des échanges génétiques entre deux génotypes viraux à l'intérieur d'une cellule et de la fréquence à laquelle l'infection d'une cellule par deux génotypes viraux (co-infection) se produit. Le taux de recombinaison est difficile à estimer car, comme pour l'estimation du taux de mutation, il est nécessaire de découpler l'apparition des recombinaisons et l'action de la sélection par la plante sur ces recombinants. En effet, sous l'action de la sélection, les recombinaisons ayant un effet létal ou très délétère seront très vite éliminées de la population et ne pourront pas être détectées et comptabilisées lors de l'analyse. La seule étude expérimentale non-biaisée évaluant le taux de recombinaison d'un phytovirus à l'échelle de la plante a été réalisée par Froissart *et al.* (2005). Pour s'affranchir de l'effet de la sélection (positive ou négative), Froissart *et al.* ont inséré, par mutagenèse dirigée, des substitutions nucléotidiques neutres (marqueurs neutres) dans le génome du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). La co-infection de plantes (*Brassica rapa*) avec le CaMV "marqué" et le CaMV "natif" a permis à ces auteurs d'estimer le taux de recombinaison du CaMV entre 2×10^{-5} et 4×10^{-5} par cycle de réplication et par nucléotide montrant que la recombinaison est très fréquente chez ce virus.

Cette étude fournit la première estimation du taux de recombinaison entre deux génotypes viraux très proches (>99% d'identité) mais aucune étude expérimentale n'a pour l'instant été réalisée entre des virus plus éloignés génétiquement. Par ailleurs, il a été montré que la fréquence de co-infection d'une cellule par deux génotypes viraux dépend du niveau d'identité génétique des deux virus (Dietrich & Maiss, 2003) et de la *multiplicity of infection*¹¹ (MOI) de l'espèce virale considérée (voir la partie I.B.1.e)). En

¹¹ ***multiplicity of infection***¹¹ : correspond au nombre de génomes viraux participant à l'infection d'une nouvelle cellule.

effet, la colonisation d'une feuille par deux virus très proches se traduit par une séparation spatiale des deux virus alors que la colonisation d'une feuille par deux virus appartenant à des espèces différentes se traduit par une répartition semblable pour les deux virus, avec beaucoup de cellules co-infectées par les deux virus (Dietrich & Maiss, 2003). Il est par conséquent probable que le taux de recombinaison soit dépendant de la proximité génétique des deux génotypes viraux et il serait intéressant de l'évaluer en fonction du pourcentage d'identité entre les génomes viraux co-inoculés.

d) Pression de sélection

Toutes les composantes de l'environnement d'un virus, de la cellule végétale jusqu'à l'environnement écologique dans lequel l'hôte et le vecteur se trouvent, constituent des facteurs de sélection (Guyader & Giblot-Ducray, 2004). La réplication virale, le mouvement de cellule à cellule et la migration systémique sont des étapes clés du cycle infectieux des virus et sollicitent l'intervention de nombreux facteurs de l'hôte. Toutes ces étapes nécessitent un ajustement fonctionnel entre les protéines virales et les protéines végétales, qui constituent des cibles potentielles de sélection.

Le premier niveau de pression de sélection s'exerçant sur les populations virales est associé au maintien de la structure et de la fonction des protéines virales nécessaires au cycle infectieux du virus. Cette sélection, de type stabilisante, tend à maintenir la population virale dans un état optimum au sein d'un environnement donné. Les pressions de sélection s'exerçant sur les protéines virales peuvent être mises en évidence grâce à l'analyse du **ratio dN/dS**¹². La valeur de ce ratio permet d'identifier la pression de sélection s'exerçant sur une protéine ou une position nucléotidique donnée sous l'hypothèse que les mutations synonymes soient neutres sélectivement. Un ratio dN/dS inférieur à 1 met en évidence la fixation plus fréquente de mutations synonymes que de mutations non-synonymes traduisant ainsi une forte pression de sélection négative (ou contrainte sélective) vis-à-vis des mutations non-synonymes, induisant peu de diversité d'acides aminés au sein de la protéine considérée. A l'inverse, un ratio dN/dS supérieur à 1 met en évidence la fixation plus fréquente de mutations non-synonymes que de mutations synonymes illustrant l'action d'une sélection positive s'exerçant sur les mutations non-synonymes ayant pour conséquence une forte diversité

¹² **ratio dN/dS** : ratio entre le taux de substitutions non-synonymes et le taux de substitutions synonymes.

au sein de la protéine et des nucléotides considérés. Ce ratio a été calculé pour les protéines de différents virus et est compris entre 0.013 et 0.308 mettant en évidence les contraintes (sélection négative), parfois très fortes, s'exerçant sur le génome viral (García-Arenal *et al.*, 2001). La forte stabilité génétique observée lorsqu'un virus évolue dans son hôte naturel (hôte pour lequel il est bien adapté) (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991; Moya *et al.*, 1993; Fraile *et al.*, 1996; Koenig & Lennefors, 2000) suggère que c'est l'action de la sélection stabilisante agissant sur le génome viral qui maintient cet état d'équilibre. Le plus bel exemple de stabilité génétique des populations virales provient de l'analyse d'isolats européen et australien de *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) qui a montré seulement 3 à 5% de différences nucléotidiques (majoritairement des mutations synonymes) entre ces deux populations qui ont pourtant divergé depuis près de 14 000 ans (Block *et al.* 1987, Keese *et al.* 1989). Les contraintes structurales et fonctionnelles s'exerçant sur les populations virales tendent donc à une stabilité temporelle et géographique des populations virales et peuvent alors imposer des limites à l'adaptation des populations virales.

Le deuxième niveau de sélection s'exerçant sur les populations pathogènes est imposé par l'hôte. En effet, des différences génomiques et de propriétés pathogènes entre virus de la même espèce peuvent être associées à des adaptations à différentes plantes hôtes. La diversification de populations naturelles a été associée à la sélection par l'hôte pour divers virus ou viroïdes comme le *Kennedya yellow mosaic virus* (Skotnicki *et al.* 1996), le *Hop stunt viroid* (Kofalvi *et al.* 1997) ou encore le *Barley yellow dwarf-PAV* (Mastari *et al.* 1998). La pression de sélection de l'hôte est donc de nature diversificatrice. Kawecki & Ebert (2004) prédisent que l'adaptation locale d'une population à un hôte particulier est généralement associée à un coût de *fitness* pour le niveau d'adaptation à d'autres hôtes. Récemment, Bedhomme *et al.* (2012) ont testé, par évolution expérimentale, l'adaptation du *Tobacco etch virus* (TEV) à quatre espèces d'hôtes différentes appartenant à son spectre d'hôte naturel. Après 15 passages successifs sur la même plante hôte, les auteurs ont mesuré l'infectivité et l'agressivité des différentes populations chez les 4 hôtes. Ils ont observé une plus forte infectivité et une plus grande agressivité des populations virales vis-à-vis de l'hôte sur lequel elles avaient évolué, démontrant une adaptation locale de ces populations (populations spécialistes). Cette adaptation locale est associée à de moins bonnes performances sur

les trois autres hôtes validant les prédictions de Kawecki & Ebert (2004). La forte pression de sélection imposée par l'hôte a aussi été mise en évidence dans de nombreuses études concernant le contournement d'une résistance qui correspond à un changement d'environnement pour le virus (García-Arenal & McDonald, 2003). Nous étudierons ces cas plus en détail dans les paragraphes suivants.

Le troisième niveau de sélection s'exerçant sur les populations virales a lieu lors de la transmission du virus d'un hôte à un autre. La plupart des virus phytopathogènes sont transmis d'une plante à l'autre via un organisme tiers que l'on appelle vecteur. Selon les stratégies de transmission adoptées par le virus étudié, les vecteurs peuvent être des nématodes, des champignons, des insectes ou encore des acariens. Quelle que soit la nature de l'interaction entre le virus et son vecteur, la pression de sélection exercée par les vecteurs sur les populations virales peut être très forte notamment quand le virus se multiplie dans le vecteur. Les interactions virus/vecteur ont été largement étudiées chez les potyvirus qui sont naturellement transmis par puceron selon le mode non persistant. Chez ces virus, il a été observé que le relâchement de la pression de sélection exercée par le puceron, *via* des inoculations manuelles successives, pouvait entraîner la perte de leur transmissibilité par vecteur. Cette perte de transmissibilité a ensuite été associée à des mutations au sein des motifs protéiques impliqués dans l'interaction entre le virus et son vecteur (Atreya *et al.*, 1991; Huet *et al.*, 1994; Blanc *et al.*, 1998). Le même phénomène a été observé chez des virus transmis par puceron selon le mode persistant comme le *Potato leafroll virus* (PRLV) ou encore transmis par champignon comme le *Cucumber necrosis virus* (CNV) (van den Heuvel *et al.*, 1993; Robbins *et al.*, 1997).

e) Estimation de la dérive génétique

Nous avons évoqué dans la partie I.A.3.d) que l'intensité de la dérive génétique dépendait essentiellement de la taille efficace (N_e) de la population virale. Ainsi, l'évaluation de l'impact de la dérive génétique sur l'évolution des populations virales nécessite de s'intéresser à la taille des populations virales et de leurs fluctuations lors des différentes étapes de l'histoire de vie d'un virus. En dépit de leur grande taille de population intra-hôte, les populations virales sont soumises à d'importantes fluctuations

dues aux différents goulets d'étranglement ayant lieu durant leur cycle infectieux (tableau I).

Un des goulets d'étranglement les plus importants a lieu lors de la transmission d'un hôte à un autre et a pour conséquence un type particulier de fluctuation démographique dénommé « effet fondateur ». Un effet fondateur a lieu lorsqu'une nouvelle population se crée à partir d'un nombre très faible de génotypes. Ce goulet d'étranglement peut entraîner une forte dérive génétique. La première estimation expérimentale du nombre de particules virales transmises par un vecteur à une plante hôte a été obtenue grâce à l'étude d'un virus transmis par puceron, le *Potato virus Y* (PVY) (Moury *et al.* 2007). Ces auteurs ont fait acquérir le virus au puceron à partir d'une solution contenant un mélange de deux virus : l'un transmissible et l'autre non. A partir des variations de fréquence d'infection (transmission) observées en fonction des proportions de virus dans l'inoculum initial, un modèle a été développé et a permis d'estimer le nombre de particules virales transmises par un puceron entre 0.5 et 3.2 en moyenne. Des estimations du même ordre de grandeur ont été obtenues pour deux autres études réalisées sur un autre virus transmis par puceron (le *Cucumber mosaic virus*) et sur un virus transmis par contact (le *Tobacco mosaic virus*) (Takeshita *et al.*, 2004; Betancourt *et al.*, 2008). A ma connaissance, aucune estimation du nombre de particules virales transmises par d'autres vecteurs tels que les champignons ou encore les nématodes ne sont disponibles.

Tableau I: Estimations quantitatives des différents goulets d'étranglement agissant sur les populations virales. D'après Gutierrez et al. (2012).

	Virus	Hôte	Ne	Références	Vecteur/mode de transmission
Goulet d'étranglement pendant la transmission	PVY	Piment	0,5-3,2	Moury <i>et al.</i> 2007	<i>Myzus persicae</i>
	CMV	Tomate	1,2-2	Betancourt <i>et al.</i> 2008	<i>Aphis gossypii</i>
	TMV	Tabac	1,3-3,3	Sacristán <i>et al.</i> 2011	Contact
	Virus	Hôte	Ne	Références	Organe/Tissu cellulaire
Goulet d'étranglement pendant la colonisation de l'hôte	WSMV	Blé	3-5	French & Strenger, 2003	Talle
	TMV	Tabac	3,1-5,6	Sacristán <i>et al.</i> , 2003	Feuille
	CaMV	Navet	298-484	Monsion <i>et al.</i> , 2008	Feuille
	PVY	Piment	1-4	Fabre <i>et al.</i> , 2012 ^a	Feuille
	TEV	Tabac	1,2-47,9	Zwart <i>et al.</i> , 2011	Feuille
	TEV	Piment	1,1-5,4	Zwart <i>et al.</i> , 2011	Feuille
	CaMV	Navet	8,8-131	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2012	Feuille
	Virus	Hôte	Ne	Références	
MOI (Multiplicity of cellular infection)	TMV	Tabac	1-6	González-Jara <i>et al.</i> , 2009	
	SBWMV	Quinoa	5-6	Miyashita <i>et al.</i> , 2010	
	CaMV	Navet	2-13	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2010	

PVY: Potato virus Y; CMV: *Cucumber mosaic virus*; TMV: *Tobacco mosaic virus*; WSMV: *Wheat streak mosaic virus*; CaMV: *Cauliflower mosaic virus*; TEV: *Tobacco etch virus*; SBWMV: *Soil-borne wheat mosaic virus*.

Une fois dans une cellule, le virus va pouvoir se multiplier et la population virale va rapidement s'agrandir et se diversifier. Elle va, ensuite, être soumise à de nouveaux goulets d'étranglement correspondant à la colonisation de la plante. Le goulet d'étranglement lors de l'infection d'une nouvelle cellule, c'est-à-dire le nombre de génomes viraux rentrant et se multipliant dans cette cellule, est appelé la MOI (*multiplicity of cellular infection*). La première estimation de la MOI d'un virus de plante a été réalisée par Gonzalez-Jara *et al.* (2009). Ils ont estimé entre un et six le nombre de génomes viraux participant à l'infection d'une nouvelle cellule de *Nicotiana benthamiana*. De façon similaire une MOI de cinq à six génomes viraux a été estimée pour le *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) causant l'infection d'une cellule de quinoa (*Chenopodium quinoa*) (Miyashita & Kishino, 2010).

Ces deux études se sont limitées aux premières étapes de l'infection de la plante : au mouvement de cellule-à-cellule (Miyashita & Kishino, 2010) ou à l'analyse de la dynamique d'infection systémique de la première feuille (González-Jara *et al.*, 2009). Ces deux études ne permettent donc pas de savoir si la MOI d'un virus est homogène dans le temps et dans l'espace lors de l'infection d'une plante ou si, à l'inverse, elle est sujette à des fluctuations au cours des différentes étapes de l'infection. La première étude spatio-temporelle de la dynamique de la MOI virale durant toutes les étapes de l'infection (du début de l'invasion systémique à la senescence de la plante hôte) a été réalisée sur le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) par Gutiérrez *et al.* (2010). Leurs résultats montrent de fortes variations de la MOI entre les différents niveaux foliaires durant l'infection, avec des valeurs de MOI faibles en début d'infection (environ égale à 2), augmentant au cours de l'infection jusqu'à atteindre le niveau maximum de 13 pour enfin décroître jusqu'au niveau initial dans les dernières étapes de l'infection (avant la floraison de la plante).

Dans beaucoup d'études, le taille du goulet d'étranglement s'exerçant sur les populations virales lors de la colonisation est assimilée avec la N_e de la population. Cette N_e a été estimée pour différents virus et sa valeur est variable selon les études, pouvant aller de quelques unités de génomes viraux (Sacristán *et al.*, 2003; Zwart *et al.*, 2011; Fabre *et al.*, 2012) à quelques centaines de génomes viraux (Monsion *et al.* 2008). Zwart *et al.* (2011) ont montré que la N_e participant à l'infection systémique d'une nouvelle feuille de tabac était similaire à la N_e dans la feuille inoculée, correspondant au nombre

de foyers d'infection dans la feuille inoculée (variant de 1 à 50 selon la dose de virus dans l'inoculum). Ces résultats révèlent donc que la taille du goulet d'étranglement s'exerçant sur les populations de TEV lors de l'infection d'une plante est majoritairement déterminée par la taille du goulet d'étranglement lors de l'inoculation. En d'autres termes, plus la N_e de la feuille inoculée est grande, plus le nombre de génomes viraux pouvant rejoindre et aller infecter une nouvelle feuille sera grand. Ces résultats suggèrent donc une absence de goulet d'étranglement lors de l'infection systémique et que la N_e participant à l'infection systémique d'une nouvelle feuille est dépendante de la charge virale dans le phloème. Ce résultat a été récemment confirmé par Gutiérrez *et al.* (2012). Dans leur étude, les auteurs ont quantifié, à différents stades de l'infection, la charge virale de CaMV présente dans le phloème de navet (*Brassica rapa*) ainsi que les goulets d'étranglement s'exerçant sur la population. Leurs résultats fournissent la première preuve expérimentale que la charge virale présente dans le phloème conditionne la taille du goulet d'étranglement s'exerçant sur les populations virales durant la colonisation de leur hôte.

2. Analyse des mécanismes d'adaptation aux résistances des plantes

a) Mesure de la capacité de contournement d'une résistance qualitative.

Mesurer la capacité des pathogènes à s'adapter aux résistances végétales constitue un défi dont l'objectif est de prédire si une résistance sera durable ou non. Dans ce paragraphe, nous allons voir les différentes méthodes employées pour générer, en laboratoire, des virus virulents vis-à-vis d'une résistance donnée à partir d'un virus initialement avirulent.

(1) Inoculation directe

L'inoculation directe d'un virus avirulent à une plante porteuse d'un gène majeur de résistance est la méthode la plus utilisée pour générer des mutants virulents vis-à-vis d'une résistance. Dans la majorité des études, l'analyse des résultats s'est limitée à l'analyse du (des) déterminant(s) de virulence du virus virulent comme, par exemple, pour le *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) vis-à-vis du gène de résistance dominant *Tsw* du piment ou encore pour le *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) vis-à-vis du gène de résistance récessif *sbm1* du pois (*Pisum sativum*) (Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007;

Margaria *et al.*, 2007). Dans d'autres études, l'inoculation d'un nombre important de plantes a permis l'étude de la fréquence de contournement de certains gènes de résistance. En 2006, Ayme *et al.* ont montré que l'émergence de PVY virulent vis-à-vis du gène de résistance récessif *pvr2³* se produisait dans 37% des plantes porteuses de cette résistance. Dans une autre étude, la même méthode a permis de montrer que la fréquence de contournement du gène *pvr2³* était fortement dépendante du fonds génétique dans lequel il était introgressé (Palloix *et al.* 2009). En effet, dans cette étude les plantes porteuses de *pvr2³* dans un fonds génétique sensible étaient contournées à 27% (76 plantes/332) alors que les plantes porteuses de *pvr2³* dans un fonds génétique partiellement résistant n'étaient jamais contournées. Toujours dans le même pathosystème, l'inoculation mécanique de différents recombinants de PVY à des plantes porteuses de *pvr2³* a permis de mettre en évidence l'importance du fonds génétique du virus dans sa capacité à contourner le gène *pvr2³* (Montarry *et al.*, 2011). En effet, le recombinant "CI", possédant le génome du clone SON41p dans lequel la région codant la protéine CI (cylindrical inclusion) a été remplacée par celle du clone de PVY LYE84.2 montre une capacité de contournement de l'allèle *pvr2³* six fois supérieure à celle du parent SON41p. L'étude de la séquence des variants virulents vis-à-vis de *pvr2³* de la chimère CI n'ont révélé aucune mutation au niveau de la protéine CI alors que tous les variants virulents possèdent au moins une mutation au sein de leur protéine VPg (viral protein genome-linked), facteur d'avirulence vis-à-vis de *pvr2³*. La protéine CI ne constitue donc pas un deuxième facteur d'avirulence vis-à-vis de *pvr2³* mais possède un rôle indirect dans la capacité du PVY à contourner l'allèle de résistance *pvr2³* (Montarry *et al.*, 2011). Outre l'importance de cette découverte dans la compréhension de la capacité d'évolution d'un virus, la "chimère CI" constitue, de par sa très forte capacité à contourner *pvr2³*, un outil puissant pour nos futures études de l'action du fonds génétique de la plante sur la fréquence de contournement de *pvr2³*. Dans une autre étude, la mesure de la fréquence de contournement de deux allèles du gène *va* (*va⁰* et *va²*), conférant une résistance du tabac au PVY, a montré que l'allèle *va²* était plus fréquemment contourné (11.5%) que l'allèle *va⁰* (0%) (Lacroix *et al.*, 2011).

Pour certains gènes comme, par exemple, le gène de résistance dominant *Pvr4*, conférant une résistance de type **HR**¹³ au PVY chez le piment, aucun mutant virulent n'a pu être généré par inoculation directe même après 3 à 6 passages successifs à partir des lésions locales (Janzac *et al.*, 2009).

(2) Inoculation par greffage

Le greffage d'une plante porteuse d'un gène de résistance sur une plante sensible (ou inversement) est une deuxième méthode possible pour générer des virus virulents vis-à-vis d'une résistance à partir d'un virus avirulent. Le principe de cette méthode consiste à inoculer le virus à un porte-greffe sensible afin qu'il multiplie le virus et produise une source d'inoculum constante, *via* le phloème, au greffon porteur de la résistance à étudier. Dans leur étude, Ayme *et al.* (2006) ont comparé l'incidence de l'inoculation par greffage et de l'inoculation directe sur la fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2*³. Ces auteurs ont montré que la fréquence de contournement de *pvr2*³ était beaucoup plus élevée dans le cas de l'inoculation par greffage (71%) que par inoculation directe (29%). Cette méthode a également permis de générer des virus contournant la résistance conférée par *Pvr4* alors qu'aucun virus virulent n'avait pu être généré par inoculation directe et n'avait jamais été détecté au champ (Janzac *et al.* 2009). L'analyse des virus virulents obtenus grâce à l'inoculation par greffage a ensuite permis l'identification du gène d'avirulence du PVY vis-à-vis de *Pvr4* (Janzac *et al.* 2010). L'inoculation par greffage se pose donc comme une alternative à l'inoculation directe lorsque celle-ci ne permet pas de générer des virus virulents vis-à-vis de la résistance que l'on souhaite étudier.

(3) Inoculation par agroinfiltration

L'agroinoculation constitue la troisième méthode permettant de générer en laboratoire des mutants virulents vis-à-vis d'une résistance à partir d'un virus avirulent. Dans cette méthode, des agrobactéries sont transformées avec un plasmide contenant un clone infectieux du virus à étudier. L'agrobactérie est ensuite inoculée à des plantes porteuses

¹³ **HR**: *Hypersensitive resistance*. Ce type de résistance est caractérisé par l'apparition de nécroses localisées au niveau du site d'infection. Ces nécroses correspondent à la mort cellulaire programmée de certaines cellules ayant pour objectif de séquestrer le virus au niveau du site d'infection afin d'empêcher la progression de l'infection.

d'un gène de résistance dont les cellules infectées vont exprimer le clone viral (transformation transitoire). La plante va ensuite transcrire le clone viral, produisant ainsi des ARN viraux infectieux. Comme dans le cas du greffage, l'objectif de cette méthode est de produire une source d'inoculum constante. L'inoculation par agroinfiltration a été utilisée pour inoculer le *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) à des plantes de pois porteuses du gène *sbm1* (Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007). Dans cette étude, 40 à 60% des plantes porteuses de *sbm1* étaient contournées lorsqu'elles étaient inoculées par agroinfiltration alors que ce gène a une fréquence de contournement très faible lorsque le BYMV est inoculé par inoculation directe. Comme le greffage, l'agroinoculation semble donc une méthode puissante pour générer des virus virulents et peut-être envisagée lorsque l'inoculation directe ne le permet pas.

b) Mesure de la capacité de contournement d'une résistance quantitative

Contrairement au contournement d'une résistance qualitative, impliquant un changement qualitatif (de l'avirulence vers la virulence), le contournement d'une résistance quantitative implique un changement quantitatif chez le pathogène qui doit progressivement augmenter sa *fitness* et/ou son **agressivité**¹⁴ sur l'hôte porteur de la résistance (figure 4). L'évolution des populations pathogènes vis-à-vis des résistances quantitatives étant très différentes de celle observée vis-à-vis d'un gène majeur, on ne parle en général plus de contournement mais d'érosion de la résistance (Watson, 1970). En effet, contrairement au contournement d'un gène majeur qui peut être rapide et total, l'érosion d'une résistance est caractérisée par une adaptation partielle et progressive du pathogène. L'érosion d'une résistance est difficile à observer car la distribution de l'agressivité des individus au sein de la population pathogène peut varier énormément d'année en année ou d'un environnement à un autre du fait des nombreuses interactions génotype/environnement agissant sur les caractères quantitatifs aussi bien du pathogène que de l'hôte (Figure 3, Mc Donald & Linde, 2002). Par conséquent, d'une année sur l'autre, il est très difficile d'associer un décalage de distribution vers une *fitness* accrue à une érosion de la résistance plutôt qu'à des conditions environnementales plus favorables pour le pathogène (McDonald & Linde,

¹⁴ **Agressivité** : composante quantitative du pouvoir pathogène viral représentant la sévérité des symptômes ou l'effet de l'infection sur la fitness de l'hôte.

2002). Lors d'évolution expérimentale, les conditions environnementales peuvent être fixées permettant alors de s'affranchir des effets d'interaction génotype/environnement.

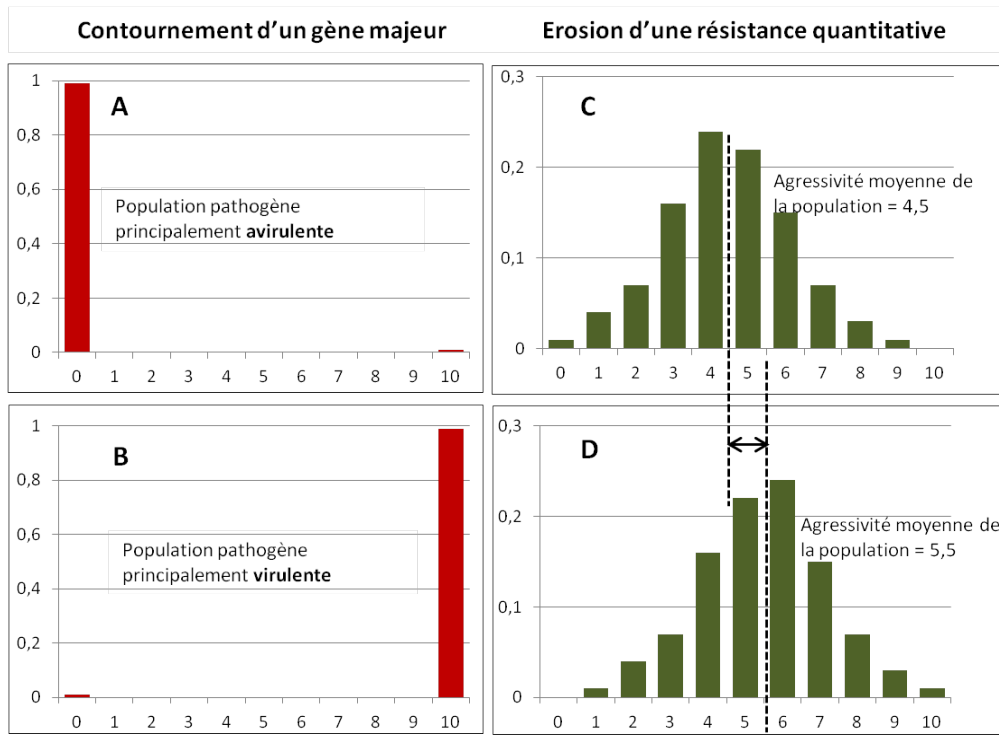


Figure 4: Changements des fréquences des phénotypes au sein de la population pathogène associés au contournement d'un gène majeur de résistance (A et B) et à l'érosion d'une résistance quantitative (C et D). D'après McDonald & Linde (2002).

A et B : Lors du contournement d'un gène majeur de résistance, les changements de pouvoir pathogène concernent la capacité ou non d'infecter les plantes porteuses du gène de résistance. En présence de plantes porteuses du gène de résistance, la population passe rapidement de l'avirulence vers la virulence.

C et D : Lors de l'érosion d'une résistance quantitative, les changements de pouvoir pathogène concernent principalement l'agressivité de la population sur les plantes porteuses de la résistance quantitative. L'adaptation de la population se fait de façon progressive et partielle (la note d'agressivité, 10, est rarement atteinte).

Cette stratégie semble donc idéale pour mettre en évidence des érosions de résistances quantitatives. C'est ainsi que Chain *et al.* (2007) ont montré que la résistance quantitative de deux cultivars d'orge (Zang et TC14) pouvait être érodée par le *Barley yellow dwarf*-PAV (BYDV-PAV) après seulement quelques passages successifs en laboratoire sur ces cultivars. Des expériences d'évolution expérimentale par inoculations successives en laboratoire, mais également en conditions de culture (transmission par puceron sur deux cycles de culture) ont montré l'adaptation progressive du PVY à la résistance quantitative, après contournement de la résistance qualitative chez le piment mettant en évidence la notion de tremplin évolutif (Palloix *et al.*, 2009). Cette

adaptation est apparue plus ou moins rapide selon les conditions d'expérimentation, mais les substitutions responsables du gain d'agressivité se sont révélées semblables, validant ainsi les méthodes. De la même façon, Montarry *et al.* (2012) ont montré que la résistance quantitative du piment était érodée en seulement huit passages successifs. Les auteurs suggèrent même de parler de contournement de la résistance quantitative et non d'érosion car, après les huit passages, les souches évoluées de PVY se multiplient 3 fois plus sur la variété résistante que les souches non évoluées ne se multiplient sur des plantes sensibles (Montarry *et al.*, 2012), suggérant que la résistance est devenue totalement inefficace. Ces trois exemples illustrent que l'évolution expérimentale peut permettre de mettre en évidence des érosions voire des contournements de résistances quantitatives. Ces érosions relativement rapides des résistances quantitatives semblent contredire les théories affirmant que les résistances quantitatives seraient plus durables que les gènes majeurs (Lindhout, 2002). Néanmoins, il n'y a que très peu d'études s'intéressant à l'érosion des résistances quantitatives par des virus et de nombreux efforts de recherche restent à fournir dans ce domaine.

c) Identification des déterminants du contournement

Pour la majorité des résistances aux phytovirus connues, des virus virulents sont disponibles ou peuvent être générés et permettent, par comparaison de séquence avec le virus avirulent, d'identifier les déterminants du contournement. Une fois le déterminant viral identifié, il est ensuite (dans la majorité des études) validé par génétique inverse. Cette méthode a permis l'identification des déterminants de contournement de nombreux gènes de résistance (Harrison, 2002; Moury *et al.*, 2011). Par exemple, c'est de cette façon que Culver & Dawson (1989) ont montré que la CP (protéine de capsid) du TMV était l'éliciteur de HR chez les tabacs porteurs du gène *N'* ou encore que Keller *et al.* (1998) ont montré que la VPg du *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) était le déterminant de contournement du gène *sbm-1* chez le pois. Cette stratégie peut être aussi bien utilisée avec des virus virulents collectés dans la nature qu'avec des virus virulents obtenus par évolution expérimentale (voir la partie I.B.2.a).

L'analyse de virus virulents obtenus par évolution expérimentale présente certains avantages. En effet, les virus virulents obtenus par évolution expérimentale ne diffèrent souvent de la souche initiale que par un faible nombre de mutations. Ainsi, la

comparaison de ces virus virulents avec le virus avirulent initial permet de détecter non seulement le gène impliqué dans le contournement mais aussi, dans la majorité des cas, les mutations responsables du contournement de la résistance. Par exemple, l'analyse de mutants de *Turnip mosaic virus* (TuMV) obtenus par évolution expérimentale a permis non seulement d'identifier la protéine CI comme déterminant de contournement vis-à-vis du gène *TuRBO1* mais aussi d'identifier deux mutations indépendamment responsables du contournement (Jenner *et al.*, 2000). On peut alors se demander dans quelle mesure les déterminants de virulence identifiés par évolution expérimentale en laboratoire sont représentatifs de ceux de souches virulentes ayant évolué naturellement. Dans leur étude, Hajimorad *et al.* (2010) ont cherché à répondre à cette question en comparant des souches évoluées en laboratoire et des souches naturelles. Ils ont pour cela sélectionné, par évolution expérimentale, des mutants de *Soybean mosaic virus* (SMV) virulents vis-à-vis du gène *Rsv1* du soja à partir d'un clone avirulent puis ils ont analysé les mutations impliquées dans le contournement. Les déterminants de contournement identifiés se sont avérés identiques à ceux trouvés par une approche de génomique comparative de souches ayant évolué naturellement. Des résultats similaires ont été obtenus pour les mutations du PVY permettant le contournement des gènes *pot-1* et *pvr2³* de la tomate et du piment, respectivement (Moury *et al.*, 2004, Ayme *et al.*, 2006, 2007). Ces deux études valident ainsi l'intérêt de l'évolution expérimentale pour identifier les déterminants de virulence chez les virus à ARN. A ma connaissance, aucune étude n'a identifié de déterminants liés à l'érosion d'une résistance quantitative.

3. Effets pléiotropiques des mutations de contournement

Il a été montré dans plusieurs cas que l'adaptation d'un pathogène à un environnement spécifique (ici la résistance) s'accompagne d'une perte de *fitness* dans l'environnement d'origine (la plante sensible) car les mutations bénéfiques dans un environnement peuvent être délétères dans un autre.

a) Coût de *fitness* à l'échelle intra-plante

A l'échelle de l'hôte, un coût de *fitness* se traduit par une accumulation virale plus faible et/ou une colonisation de la plante hôte ralentie. Les coûts de *fitness* liés au contournement d'une résistance peuvent alors être appréciés, de façon expérimentale,

en comparant un virus avirulent et un virus virulent chez un génotype sensible de plante. Cette méthode est très utilisée pour les virus de plantes et permet une évaluation précise du coût de *fitness*. En effet, grâce à l'utilisation de clones viraux et de la mutagène dirigée, les virus étudiés ne diffèrent que par la (les) mutation(s) responsable(s) du contournement. Ainsi, les différences de *fitness* peuvent être directement reliées au contournement de la résistance.

Les différences de *fitness* entre deux virus peuvent être évaluées (i) en inoculant indépendamment chacun des virus à des plantes sensibles puis en mesurant l'accumulation des virus dans ces plantes ou (ii) par des expériences de compétition où les différents virus sont co-inoculés aux mêmes plantes et la composition de la population virale dans chacune des plantes est évaluée au cours de l'infection. Dans le dernier type expérience, le virus le plus fréquemment retrouvé dans les plantes sera considéré contre ayant une *fitness* plus élevée que son compétiteur. Jenner *et al.* (2002) ont, de cette façon, évalué le coût de *fitness* associé au contournement du gène *TuRB01* par le *Turnip mosaic virus* (TuMV). Les résultats de la compétition entre le clone de TuMV "v35Tunos", avirulent vis-à-vis de *TuRB01*, et le mutant "v35Tunos β 5570A4G", qui ne diffère du précédent que pour une mutation permettant le contournement de *TuRB01*, montrent que le contournement de la résistance est associé à un coût de *fitness* chez la plante sensible. Dans leur étude Jenner *et al.* (2002), ont également mis en compétition deux isolats naturels CZE-1 et CDN1, contournant *TuRB01* et au moins trois autres gènes de résistance, avec v35Tunos. Leurs résultats montrent que v35Tunos a une *fitness* plus élevée que les deux autres. Le coût de *fitness* associé au contournement de *TuRB01* est plus faible chez l'isolat naturel CZE-1 que chez le mutant v35Tunos β 5570A4G suggérant que ce coût de *fitness* a été, en partie, compensé chez l'isolat CZE-1 (Jenner *et al.* 2002).

De forts coûts de *fitness* liés au contournement d'une résistance ont également été mis en évidence pour d'autres couples virus/gène de résistance comme le ZYMV/*Zym* (Desbiez *et al.*, 2003) ou le PVY/*Pvr4* (Janzac *et al.* 2010). Plus récemment, Montarry *et al.* (2012) ont, pour la première fois, mis en évidence un coût de *fitness* lié à l'adaptation du PVY à une résistance quantitative chez le piment. A l'inverse, certaines mutations au sein de la VPg du PVY associées au contournement du gène *pvr2* du piment ne génèrent pas de coût de *fitness* sur des piments sensibles (Ayme *et al.*, 2007 ;

Fabre *et al.*, 2012). Pour l'instant, de par la lourdeur expérimentale, les mesures de coût de *fitness* lié au contournement des résistances restent cantonnées à un faible nombre d'interactions plante/virus et la variabilité de ces coûts ainsi que leurs conséquences sur l'émergence des populations virales chez les variétés résistantes restent largement à explorer. Il est néanmoins important de noter que les coûts de *fitness* ont été évoqués pour expliquer la durabilité de certains gènes de résistance (Mestre *et al.*, 2003; Janzac *et al.* 2010). De plus, des études théoriques montrent que le coût de *fitness* associé au contournement d'un gène majeur de résistance est l'un des facteurs principaux influençant le risque de contournement d'un gène majeur et la réduction globale des dommages causés par le virus à l'échelle du paysage agricole (Fabre *et al.* 2009,2012b).

b) Coût de fitness lors de la transmission inter-plantes

A l'échelle de la parcelle, un coût de *fitness* se traduit par une baisse de l'efficacité de transmission du virus d'une plante à une autre. Une mutation permettant le contournement d'un gène de résistance peut avoir un coût pour la transmission du virus virulent. Ce type de coût a été mis en évidence pour le pathosystème *Raspberry ringspot virus* (RpRDV)/framboisier (*Rubus idaeus*) et pourrait expliquer la durabilité du gène de résistance *Irr* (Garcia-Arenal & McDonald, 2003). Le gène *Irr* confère au framboisier une résistance au RpRDV qui s'exprime par une immunité à l'inoculation par vecteur et par greffage (Jennings *et al.*, 1964). Des isolats virulents vis-à-vis du gène *Irr* ont été observés parmi les isolats naturels de RpRDV mais ne sont jamais devenus prédominants dans la population malgré la présence du gène *Irr* car les variants virulents sont peu compétitifs en infection mixte par rapport aux isolats avirulents et sont peu transmis par la graine ou par nématode (Hanada & Harrison, 1977 ; Murrant *et al.*, 1968). A l'inverse, une analyse d'isolats naturels de *Lettuce mosaic virus* (LMV) a montré que certains isolats combinaient à la fois la capacité à infecter des laitues porteuses des gènes de résistance *mo1¹* ou *mo1²* et la capacité à être transmis par la graine (Krause-Sakate *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent une absence de coût de la transmission par la graine associé au contournement de *mo1¹* et *mo1²*. Dans une autre étude, des variants de PVY virulents vis-à-vis d'une résistance quantitative du piment, obtenus par évolution expérimentale, ont été testés pour leur capacité à être transmis par puceron (Montarry *et al.*, 2012). Les résultats ne montrent aucun effet du contournement de la

résistance quantitative sur la capacité du PVY à être transmis par puceron (Montarry *et al.*, 2012).

Très peu d'études se sont intéressées à l'impact des mutations de contournement sur la capacité des virus à être transmis de façon naturelle. Ce phénomène présente pourtant un intérêt majeur dans le scénario du contournement d'une résistance. En effet, un variant virulent vis-à-vis d'une résistance présentant un fort coût au niveau de sa transmission ne représentera pas de danger majeur pour la durabilité d'une résistance au niveau du paysage.

c) Coût de *fitness* à l'échelle de l'agrosystème

Une autre approche permettant d'évaluer le coût de *fitness* associé à l'acquisition d'une virulence est d'analyser la dynamique de fréquence du variant virulent dans les populations pathogènes naturelles. L'existence d'un coût de *fitness* associé au déterminant de virulence devrait faire baisser la fréquence de celui-ci dans la population pathogène en l'absence du gène de résistance considéré. Cette méthode d'analyse des coûts de *fitness* intègre non seulement les coûts de *fitness* intra-hôte et de transmission mais aussi la capacité des variants virulents à compenser ces coûts de *fitness* par accumulation progressive de mutations compensatrices.

Cette approche est très utilisée pour les champignons pathogènes et fournit des résultats contrastés en fonction du déterminant de virulence analysé (McDonald *et al.*, 1989; Leach *et al.*, 2001). Une des seules études de ce type chez les virus de plantes a été réalisée par Fraile *et al.* (2011). Ces auteurs ont regardé l'évolution de la fréquence de tobamovirus virulents vis-à-vis du gène L^1 du piment dans des serres de cultures de piment dans le sud-est de l'Espagne de 1984 à 2004 et l'ont mis en relation avec la fréquence du gène de résistance L^1 dans les variétés cultivées. Entre les années 1984 et 1990, la forte fréquence (de l'ordre de 70%) du gène L^1 dans les cultivars de piment a entraîné une sélection très forte des variants virulents vis-à-vis de L^1 dont la fréquence a augmenté d'année en année jusqu'à atteindre 80% de la population virale dans les années 1990. Le gène L^1 étant devenu inefficace, sa fréquence dans les cultivars a progressivement baissé au profit de cultivars sensibles, entraînant une forte baisse de la fréquence du variant virulent et une augmentation de la fréquence du variant avirulent.

Ces résultats révèlent donc un coût de *fitness* lié au contournement du gène L^1 chez les tobamovirus.

Un coût de *fitness* peut également être évalué par une analyse de la structuration de la population pathogène. En effet, si le contournement d'un gène de résistance est associé à un coût de fitness, la population pathogène sera structurée en fonction du génotype de la plante hôte, avec les variants avirulents uniquement chez les plantes sensibles et les variants virulents uniquement sur les plantes résistantes. A l'inverse, si le variant virulent est retrouvé sur les plantes sensibles, ceci illustre que la mutation de virulence n'est pas associée à un coût de fitness chez le pathogène ou que le coût de fitness a été compensé par des mutations additionnelles. Ben Khalifa *et al.* (2009) ont analysé la structuration d'isolats tunisiens de *Potato virus Y* (PVY) collectés sur des plantes de piments porteuses de l'allèle de sensibilité $pvr2^+$ ou de l'allèle de résistance $pvr2^1$ et ont montré que l'allèle de résistance $pvr2^1$ ne contribuait pas à la structuration des populations de PVY. Les variants virulents vis-à-vis de $pvr2^1$ sont retrouvés à la fois chez les plantes sensibles et chez les plantes porteuses du gène $pvr2^1$. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : (i) le contournement de $pvr2^1$ n'engendre pas de coût de fitness chez le PVY ou (ii) le coût de fitness associé au contournement de $pvr2^1$ a été compensé par l'accumulation de mutations compensatrices. Des résultats similaires ont été obtenus par Tentchev *et al.* (2011) dans leur étude sur la structuration des populations de TSWV chez des plantes de piment porteuses ou dépourvues du gène de résistance Tsw.

Malgré le faible nombre d'études testant l'existence d'un coût de fitness par analyse de la diversité naturelle du virus, il existe de nombreuses preuves indirectes concernant les coûts de *fitness* associés au contournement d'une résistance. En effet, pour de nombreux pathosystèmes, un génotype viral virulent vis-à-vis d'un gène de résistance particulier ne devient pas prédominant dans la population alors que ce gène est déployé de façon intensive dans l'agrosystème (Garcia-Arenal & McDonald, 2003). Il est même démontré, en dépit de la très forte capacité d'adaptation des virus, que les résistances aux virus sont souvent durables (Garcia-Arenal & McDonald, 2003). Ce constat révèle un contraste important avec la faible durabilité de la plupart des gènes de résistance déployés contre les champignons ou les bactéries (McDonald & Linde, 2002) et suggère de plus forts coûts de *fitness* associés au contournement de résistances chez

les virus que chez les autres pathogènes de plantes (Sacristán & Fernando García-Arenal, 2008). Cette différence est directement associée à la nature des génomes viraux. En effet, le génome d'un virus est très compact (<15kb), contient très peu de séquences non codantes, possède parfois des cadres de lecture chevauchants et code pour des protéines multifonctionnelles, ce qui impose de fortes pressions de sélection tout le long du génome (Garcia-Arenal *et al.*, 2001, voir la partie I.B.1.d). Par conséquent, malgré leur fort taux de mutation et de recombinaison, la plasticité des génomes viraux peut être très faible et les mutations avoir de forts coûts pour la *fitness* virale. Le coût de *fitness* imposé par la substitution d'un nucléotide dans le génome viral a été étudié pour le *Tobacco etch virus* (TEV) (Carrasco *et al.*, 2007). Dans leur étude, les auteurs ont réalisé, par mutagénèse dirigée, des substitutions nucléotidiques différentes (choisies aléatoirement) dans un clone de TEV puis ils ont comparé la *fitness* de 66 clones porteurs d'une seule mutation par rapport au clone de départ. Leurs résultats ont montré que 77% des mutations présentaient un coût de *fitness* (dont 41% étaient létales) et 23% étaient neutres. Aucune mutation n'était bénéfique.

4. Limites envisagées

Nous avons vu précédemment que l'évolution expérimentale présente de nombreux avantages et constitue un outil puissant pour l'analyse de la durabilité d'une résistance. Néanmoins, cette méthode d'analyse possède également certaines limites. Dans les paragraphes suivants, nous allons évoquer quelles peuvent-être ces limites, leurs conséquences quant à l'interprétation des résultats obtenus par évolution expérimentale et comment elles peuvent être surmontées.

a) Représentativité des isolats testés par rapport à la diversité naturelle du virus

A l'échelle d'une parcelle ou d'un agroécosystème, la diversité d'une espèce virale peut être très élevée (Ben Khalifa *et al.*, 2012 ; Joannon *et al.*, 2010). Une plante pourra donc être infectée par divers génotypes n'ayant pas la même capacité adaptative et, par conséquent, la résistance devra rester efficace vis-à-vis de l'ensemble de la population virale. Au laboratoire, la fréquence de contournement est évaluée avec un nombre limité d'isolats et donc de génotypes viraux. Une des limites de l'évolution expérimentale pourrait donc provenir d'une faible représentativité de l'isolat testé par

rapport à la diversité naturelle du virus. Une des méthodes pour "contrer" cette limite est de générer un certain niveau de diversité au sein de la population virale en faisant des inoculations successives sur un hôte sensible avant l'inoculation des plantes résistantes (Hajimorad *et al.*, 2011). Il est néanmoins probable que la diversité générée reste largement inférieure à la diversité d'une population naturelle présente dans une parcelle. A l'inverse, on peut tester en laboratoire différents isolats collectés et représentatifs de la variabilité à l'échelle souhaitée et aboutir, avec un nombre restreint d'isolats, à une diversité élargie.

b) Absence d'infections mixtes

Dans des conditions de culture au champ, les plantes peuvent être infectées par différents virus de la même espèce ou d'espèces différentes. Ces infections mixtes peuvent ensuite permettre l'apparition et l'émergence de virus recombinants (voir la partie I.A.3.b)). L'absence d'infections mixtes dans les expériences d'évolution expérimentale constitue donc potentiellement une limite de la méthode pour l'évaluation de la durabilité d'une résistance car on ne prend pas en compte les possibilités d'adaptation par recombinaison. Néanmoins, le nombre de cas d'émergence de virus virulents par recombinaison reporté est très faible par rapport au cas d'émergence de virus virulents par mutation (Díaz *et al.*, 2004; Moury *et al.*, 2011b). Cependant, il est possible que des événements secondaires de recombinaison accélèrent la compensation du coût de fitness conférés par une mutation de virulence.

En conditions naturelles, les infections mixtes entre deux virus apparentés ou non sont fréquentes. Les interactions entre virus résultant de ces infections mixtes peuvent s'exprimer de différentes manières allant de l'antagonisme à la synergie (Marchoux, 1987, 1988 ; Syller, 2011). L'effet antagoniste de la pré-infection d'un premier virus sur la capacité d'infection d'un second virus peut s'exprimer de différentes façons : diminution de la taille et du nombre de lésions locales, baisse de l'accumulation virale ou encore prévention (ou réduction) des symptômes (Marchoux, 1988 ; Syller, 2011). En pratique, ce genre d'interaction a été utilisée pour protéger certaines cultures grâce à l'inoculation préventive d'un variant viral faible (variant possédant une faible fitness et n'induisant pas ou peu de symptômes chez la plante hôte) afin de prémunir la plante contre des infections ultérieures (Lecoq & Desbiez, 2012). On peut alors supposer

que ce type d'interaction n'aura pas d'effet néfaste sur la durabilité d'une résistance. A l'inverse, dans le cas d'une synergie entre deux (ou plusieurs) virus, l'intensité des symptômes, la vitesse de multiplication et l'accumulation d'au moins l'un des virus sont souvent augmentées en présence d'un autre virus (Marchoux, 1989 ; Syller, 2011). C'est, par exemple, le cas lors de la co-infection du *Tomato chlorosis virus* (ToCV) et du *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), chez des plantes de tomate sensibles aux deux virus qui résulte en une augmentation de l'accumulation du ToCV (mais pas du TSWV) et une mort rapide des plantes (García-Cano *et al.*, 2006). De façon plus remarquable, la pré-infection avec du ToCV de plantes de tomate porteuses du gène *Sw-5* de résistance au TSWV entraîne la sensibilité de ces plantes au TSWV (García-Cano *et al.*, 2006). Ce type de synergie pourrait alors avoir d'importantes conséquences sur l'efficacité et la durabilité d'une résistance. Les conséquences des infections multiples sont très diverses et imprévisibles (García-Cano *et al.*, 2006 ; Syller, 2011). Il est difficile d'envisager de tester, en laboratoire, toutes les possibilités d'infections mixtes qui pourraient se produire dans la nature mais des tests pourraient être mis en place afin d'évaluer les interactions entre les virus les plus fréquents et/ou les plus dommageables infectant l'espèce végétale étudiée et ainsi étudier l'impact de ces interactions sur l'efficacité et la durabilité d'un gène de résistance.

c) Méthode d'inoculation

Lors des études d'évolution expérimentale, l'inoculation des plantes se fait majoritairement par inoculation mécanique du virus et non par inoculation par son vecteur naturel (lorsque le virus étudié est transmis par vecteur). Par conséquent, dans la majorité des cas, l'étude de la capacité de contournement d'une résistance par un virus donné se limite aux deux premières étapes du contournement d'une résistance (Voir la partie I.A.4.). En effet, les expérimentations par inoculation mécanique ne permettent pas de juger de la capacité d'un virus virulent à se disperser naturellement dans l'agrosystème. De plus, nous avons vu dans la partie I.B.1.d) que l'inoculation mécanique libère la pression de sélection induite par le vecteur. De cette façon, on pourrait voir apparaître des mutations de contournement qui auraient été contre-sélectionnées si le virus avait été transmis par vecteur comme, par exemple, des mutations de contournement localisées dans des déterminants de transmission.

L'inoculation mécanique pourrait alors rompre un éventuel **trade-off**¹⁵ entre virulence et transmission. L'expérimentateur pourrait surestimer la fréquence de contournement d'une résistance et la considérer comme peu durable et d'un faible intérêt pour les sélectionneurs. Néanmoins, une solution serait de mesurer les capacités de transmission naturelle des virus obtenus par évolution expérimentale afin d'évaluer le coût de transmission éventuel associé à chacune des mutations de contournement.

d) La fréquence d'apparition de variants virulents en laboratoire est-elle représentative de la fréquence en conditions naturelles ?

Nous avons vu dans la partie I.B.2.a) que l'évolution expérimentale permet, par différentes méthodes d'inoculation du virus à la plante, de générer des virus virulents vis-à-vis d'une résistance à partir de virus avirulents. Lorsque ces évolutions sont réalisées sur un nombre suffisant de plantes, elles peuvent aussi permettre de mesurer la fréquence à laquelle une résistance est contournée. On peut alors se demander si la fréquence de contournement observée en laboratoire est représentative de la fréquence d'apparition de virus virulents vis-à-vis de cette même résistance en conditions naturelles. Nous ne pouvons pas avoir accès à la fréquence d'apparition des variants virulents en conditions naturelles mais nous connaissons, pour certain couples virus/gène de résistance, la fréquence du variant virulent au sein d'isolats naturels. Contrairement à la fréquence de contournement obtenue en laboratoire, la fréquence des isolats virulents au sein des isolats naturels ne reflète pas seulement la fréquence d'apparition des variants virulents mais aussi leur capacité à envahir la population (fréquence du gène de résistance dans le paysage et *fitness*). Le tableau II et la figure 5 présentent les différents couples gène de résistance/virus pour lesquels les données permettent de comparer ces deux fréquences. Les fréquences ont été classées de 1 à 5 afin de pouvoir évaluer leur corrélation. La corrélation entre "isolats naturels" et "inoculation mécanique" n'est pas significative ($p=0.3$; test de corrélation de Spearman). Néanmoins, on s'aperçoit que, pour six couples sur neuf, la corrélation (points verts sur la figure 5) est très bonne ($\rho_{\text{spearman}}=0.99$, $p<0.001$, test de corrélation de Spearman). Pour ces six points, il semble donc que la fréquence de contournement

¹⁵ **Trade-off** : terme anglais pour désigner un **compromis**, notamment un compromis évolutif.

obtenue en laboratoire reflète parfaitement la durabilité de la résistance en conditions naturelles. A l'inverse, pour les trois autres couples (*pvr2¹*/ PVY, *Tsw*/TSWV et *va⁰*/PVY ; points rouges sur la figure 5) la corrélation n'est pas conservée et pour ces trois couples la fréquence des isolats virulents au sein des isolats naturels est beaucoup plus forte que la fréquence d'apparition des isolats virulents en laboratoire (par inoculation directe).

Tableau II: Relation entre la fréquence d'apparition de variants virulents en laboratoire et en conditions naturelles.

Plante	Gène de résistance	Virus (Genre/espèce)	Classe de fréquence des variants virulents			Références
			Isolats naturels	Inoculation directe	Inoculation par greffage ^(a) ou agrobactérie ^(b)	
Piment	<i>pvr2¹</i>	<i>Potyvirus</i> /PVY	4	2	Non testée	Ayme <i>et al.</i> 2006; Ben Khalifa <i>et al.</i> , 2012; Moury, com. personnelle
	<i>pvr2²</i>	<i>Potyvirus</i> /PVY	1	2	Non testée	
	<i>pvr2³</i>	<i>Potyvirus</i> /PVY	4	4	5	
	<i>Pvr4</i>	<i>Potyvirus</i> /PVY	1	1	4	
	<i>Tsw</i>	<i>Tospovirus</i> /TSWV	4	2	5	
Piment (PM949)	Deux gènes récessifs	<i>Potyvirus</i> /PVY		2	5	Moury <i>et al.</i> , in prep
Pomme de terre	<i>va⁰</i>	<i>Potyvirus</i> /PVY	5	1	Non testée	Lacroix <i>et al.</i> , 2010, 2011; Acosta-Leal & Xiong, 2008
	<i>va²</i>	<i>Potyvirus</i> /PVY	5	4	Non testée	
Pois	<i>sbm1</i>	<i>Potyvirus</i> /BYMV		3	5	Bruun-Rasmussen <i>et al.</i> , 2007
Concombre	<i>zym</i>	<i>Potyvirus</i> /ZYMV	1	1	1	Lecoq & Pitrat, 1984; Mahgoub <i>et al.</i> , 1998; Desbiez <i>et al.</i> , 2002
Courgette	<i>Zym</i>	<i>Potyvirus</i> /ZYMV	4	4	Non testée	Lecoq <i>et al.</i> , 2002

PVY : *Potato virus Y*; TSWV : *Tomato spotted wilt virus*; BYMV : *Bean yellow mosaic virus*; ZYMV : *Zucchini yellow mosaic virus*. Pour les isolats naturels, les fréquences des variants virulents représentent le ratio entre le nombre de variants virulents et le nombre de variants avirulents au sein d'une collection d'isolats naturels. Pour les inoculations mécaniques, par greffage ou par agrobactérie, les fréquences des variants virulents représentent le ratio entre le nombre de plantes résistantes contournées (apparition/sélection du virus virulent pendant le test) et le nombre de plantes testées. Les fréquences des variants virulents ont été classées comme suit: 1 jamais observé, 2 très rare (< 1%), 3 rare (1%< fréquence<10%), 4 fréquent (10%< fréquence<50%), 5 très fréquent (>50%).

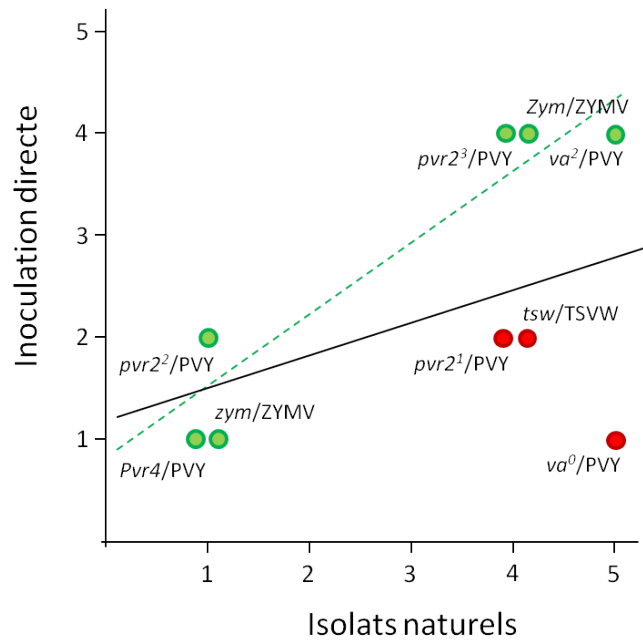


Figure 5: Corrélation entre la fréquence d'apparition de variants virulents en laboratoire et en conditions naturelles.

PVY : *Potato virus Y*; TSWV : *Tomato spotted wilt virus*; BYMV : *Bean yellow mosaic virus*; ZYMV : *Zucchini yellow mosaic virus*. Pour les isolats naturels, les fréquences des variants virulents représentent le ratio entre le nombre de variants virulents et le nombre de variants avirulents au sein d'une collection d'isolats naturels. Pour les inoculations mécaniques, les fréquences des variants virulents représentent le ratio entre le nombre de plantes résistantes contournées (apparition/sélection du virus virulent pendant le test) et le nombre de plantes testées. Les fréquences des variants virulents ont été classées comme suit: 1 jamais observé, 2 très rare (< 1%), 3 rare (1% < fréquence < 10%), 4 fréquent (10% < fréquence < 50%), 5 très fréquent (> 50%). La droite de régression linéaire obtenue avec les neuf couples gène de résistance/virus est représentée en noire. La droite en pointillée vert correspond à la droite de régression linéaire obtenues si les trois couples en rouge sont retirés de l'analyse.

Pour expliquer ce constat, une première hypothèse est que le variant virulent est très avantage dans les conditions naturelles, soit parce qu'il possède une bonne fitness par rapport au virus avirulent, soit à cause d'une forte fréquence du gène de résistance dans la nature ou dans les cultures. Dans ces conditions, malgré une faible fréquence d'apparition, le variant virulent envahit la population pathogène. La deuxième hypothèse est que le gène de résistance a été testé, en laboratoire, dans un fonds génétique différent de celui (ou ceux) au(x)quel(s) il est associé naturellement ou dans les variétés commerciales. En effet, il a été montré par trois études différentes que la fréquence de contournement d'un gène de résistance dépendait du fonds génétique dans lequel il était introgressé (Brun *et al.*, 2010 ; Fournet *et al.*, 2012 ; Palloix *et al.*, 2009). Une troisième hypothèse est qu'il existe des phénomènes de "virulences croisées", c'est-à-dire que la virulence des isolats naturels vis-à-vis du gène de résistance testé a été obtenue grâce à l'acquisition de la virulence vis-à-vis d'un autre gène de

résistance. Cette hypothèse est appuyée par des travaux récents sur deux des trois couples gène de résistance/virus ($pvr2^1$ /PVY et va^0 /PVY). En effet, Lacroix *et al.*, (2011) ont mis en évidence que certains isolats ayant évolué sur des plantes porteuses de va^2 ont également acquis la capacité d'infecter des plantes porteuses de va^0 . Le même constat a été fait pour des isolats évolués chez des plantes porteuses de $pvr2^3$ se retrouvant capables d'infecter des plantes porteuses de $pvr2^1$ (Moury *et al.*, en préparation). De plus, la VPg du PVY est le déterminant de contournement de va et $pvr2$ (quel que soit l'allèle de résistance) et des données récentes montrent que certaines mutations au sein de la VPg du PVY permettraient à la fois le contournement de va^2 et de $pvr2^3$ (Janzac *et al.*, en préparation). On peut donc supposer que les isolats naturels virulents vis-à-vis de va^0 et $pvr2^1$ n'ont pas été sélectionnés par ces deux gènes mais plutôt par va^2 ou $pvr2^3$, respectivement (deux gènes montrant des fréquences de contournement très fortes quelles que soient les conditions). Ces trois hypothèses ne sont pas exclusives et permettent toutes d'expliquer la mauvaise corrélation entre la fréquence d'apparition de virus virulents en laboratoire et au sein des isolats naturels, révélant une limite à l'évaluation de la durabilité d'un gène de résistance par évolution expérimentale. Cette limite n'est pas négligeable car on pourrait évaluer en laboratoire une résistance comme durable alors que différents mécanismes la rendraient finalement très fragile. Il paraît, par conséquent, important de compléter les analyses réalisées en laboratoire par des analyses complémentaires. Pour la première hypothèse, des tests de fitness des variants virulents par rapport aux virus avirulents permettraient d'évaluer le risque d'augmentation en fréquence des variants virulents dans la population. Pour la deuxième hypothèse, le gène de résistance pourrait être testé dans différents fonds génétiques. Enfin, des phénomènes de virulences croisées (troisième hypothèse) pourraient être anticipés en testant une nouvelle résistance contre la collection d'isolats naturels disponibles (collectés sur différentes espèces hôtes) afin de s'assurer que des isolats virulents ne soient pas déjà présents au sein de la variabilité naturelle de l'espèce virale que l'on veut contrôler.

e) Age des plantes

Lors des tests d'évolution expérimentale, les plantes sont généralement inoculées à des stades précoces de leur développement. La raison est principalement

pratique, les jeunes plantes occupant moins d'espace. De plus, elles sont cultivées moins longtemps. Ce choix expérimental pourrait entraîner un biais dans l'évaluation de la durabilité d'une résistance. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une relation positive entre l'expression ou l'intensité de la résistance d'une plante vis-à-vis d'un pathogène et l'âge de la plante au moment de l'inoculation (Duffus & Skoyen, 1977; Smit & Parlevliet, 1990; Moriones *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 1998; Garcia-Ruiz & Murphy, 2001). Dans leur étude, Duffus & Skoyen (1977) ont inoculé, à différentes dates après semis, du *Beet curly top virus* (BCTV) à des plants de betteraves et ont ensuite noté le pourcentage de plantes infectées. Leurs résultats montrent que 95% des plantes inoculées très jeunes (4 semaines après semis) sont infectées contre seulement 37% des plantes inoculées plus tardivement (12 semaines après semis). Cette étude met en évidence que la résistance à l'infection par le BCTV des plants de betterave dépend de l'âge à laquelle la plante est inoculée. De la même façon, il a été montré que l'expression de la résistance du piment au mouvement systémique du *Cucumber mosaic virus* (CMV) dépend du stade de développement de la plante (Garcia-Ruiz & Murphy, 2001). Dans le cas des tests d'évolution vers le contournement d'une résistance, les résistances sont plus facilement contournées lorsque les plantes sont inoculées très jeunes (observation personnelle). Par conséquent, les fréquences de contournement obtenues ainsi seront très certainement surestimées par rapport aux conditions de production en plein champ et cette surestimation devra être prise en compte dans l'évaluation *a priori* de la durabilité d'une résistance. Néanmoins, le plus important est le niveau de corrélation entre la fréquence d'apparition de virus virulents (fréquence de contournement de la résistance) observée en laboratoire et celle observée en conditions naturelles. Nous avons vu dans le chapitre précédent que cette corrélation est plutôt bonne (figure 5).

C. Pathogen profile

Potato virus Y: a major crop pathogen that provided major insights into the evolution of viral pathogenicity

Julie Quenouille^{1,2}, Nikon Vassilakos³ and Benoît Moury¹

¹ INRA, UR407 Pathologie Végétale, F-84140 Montfavet, France

² INRA, UR1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, F-84140 Montfavet, France

³ Laboratory of Virology, Department of Phytopathology, Benaki Phytopathological Institute, S. Delta 8, 145 61 Kifissia, Athens, Greece

Summary

Taxonomy: *Potato virus Y* (PVY) is the type member of the genus *Potyvirus*, in the family Potyviridae.

Virion and genome properties: PVY virions have a filamentous, flexuous form with a length of 730 nm and a diameter of 12 nm. The genomic RNA is single stranded, messenger sense, with a length of 9.7 kb, covalently linked to a viral-encoded protein (VPg) at the 5' end and with a 3' polyadenylated tail. The genome is expressed as a polyprotein of approximately 3062 amino-acid residues, processed by three virus-specific proteases into eleven mature proteins.

Hosts: PVY is distributed worldwide and has a broad host range consisting of cultivated solanaceous species and many solanaceous and non-solanaceous weeds. It is one of the most economically important plant pathogen and causes severe diseases in cultivated hosts like potato, tobacco, tomato and pepper, as well as in ornamental plants.

Transmission: PVY is transmitted from plant to plant by more than 40 aphid species in a non-persistent manner, and, in potato, by planting contaminated seed tubers.

Diversity: Five major clades, named C1, C2, Chile, N and O were described within the PVY species. In the last decades, a strong increase of prevalence of N×O recombinant isolates was observed, worldwide. A correlation was observed between PVY phylogeny and some pathogenicity traits.

Genetic control of PVY: Genetic resistances against PVY have been used widely in breeding programs and deployed in the field. These resistances show a large diversity of spectrum of action, durability and genetic determinism. Notably, recessive and dominant major resistance genes showed highly contrasted patterns of interaction with PVY populations, displaying rapid coevolution or stable relationships, respectively.

1. Potato virus Y, the type member of the genus *Potyvirus*

a) General description

Potato virus Y (PVY) is the type member of the genus *Potyvirus*, which includes some of the most destructive plant viruses (Kerlan 2006; Scholthof *et al.*, 2011), and of the family Potyviridae, a group of single strand RNA viruses. PVY was first associated to a disease causing potato degeneration in the early 1930s (Smith, 1931) and has a rather large natural host range, comprising nine botanical families (Kerlan, 2006). The most economically important hosts are potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana* spp.), tomato (*S. lycopersicum*) and pepper (*Capsicum* spp.) but PVY also infects other cultivated plants, like ornamentals (dahlia, petunia), and numerous weeds.

The principal modes of PVY transmission are by vegetative propagation of infected material, aphid vection and, to a lower extent, by contact. PVY is transmitted by more than 40 aphid species (Edwardson and Christie, 1997; Kerlan, 2006) (family Aphididae) in a non-persistent manner, *i.e.* a few minutes are sufficient for PVY acquisition or inoculation during aphid probing or feeding, and there is no latent period required by the virus to be transmissible after acquisition. *Myzus persicae* is the vector with the highest transmission efficiency and, due to its large geographic distribution, is responsible for a large part of natural spread of PVY, although many other species such as cereal aphids are also involved in epidemics.

PVY is the major viral threat for potato cultivation, affecting both yield and tuber quality, and resulting in up to 80% yield losses (De Bokx and Huttinga, 1981; Van der Zaag, 1987). In addition, PVY control in potato production requires costly certification programs. Symptoms caused by PVY infection on potato depend on virus isolate, host cultivar, environmental conditions and whether they are produced by a primary or a secondary (*i.e.* infection issued from the growth of a plant from an infected tuber) infection (Draper *et al.*, 2002). Symptoms on the aerial part of the plant include leaf mosaic, mottle and crinkling, vein necrosis and necrotic spots, stem and petiole necrosis, leaf drop and, when secondary infections occur, stunting of the plants. Some PVY variants also induce the potato tuber necrotic ringspot disease characterized by superficial annular or arch-shaped necroses, protruding from the tuber skin (Beczner *et al.*, 1984; Kerlan, 2006).

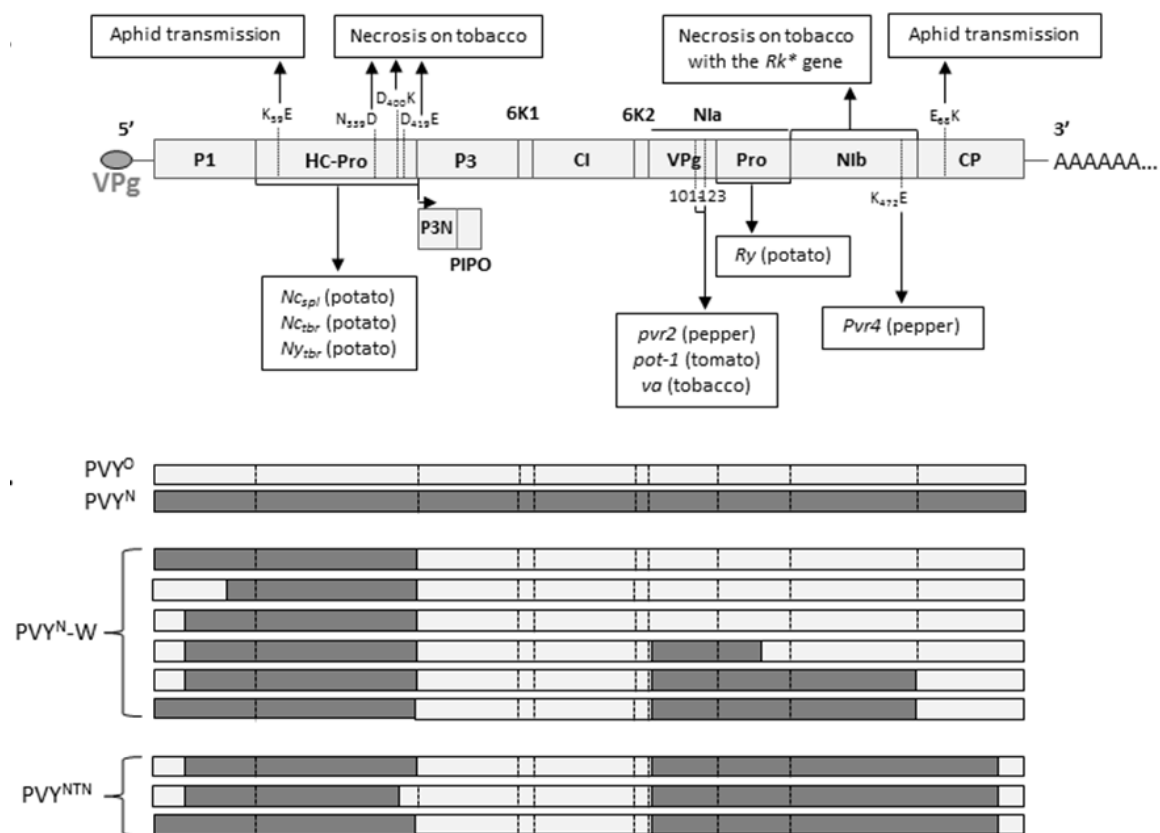
PVY symptoms in tobacco, tomato and pepper often consist of mild mottling, although stunting and necrosis may be observed. Additionally, in tobacco, PVY modifies the chemical composition of cured leaves, especially the nicotine content (Latorre *et al.*, 1984), resulting in high economic losses. In the last decades, tomato and pepper PVY isolates inducing leaf and stem necrosis have been reported in the Mediterranean region (Gebre-Selassie *et al.*, 1985; d'Aquino *et al.*, 1995; Fanigliulio *et al.*, 2005; Mascia *et al.*, 2010). Mixed infection of PVY and *Cucumber mosaic virus* (CMV) also result in severe diseases in tomato crops.

Control strategies are based on breeding for resistance, use of certified potato seeds, and quarantine regulations to prevent spread of nonindigenous isolates. Control of aphid vectors is usually of limited effectiveness, due to the non-persistent mode of transmission. Genetically-engineered resistance has been studied extensively, usually by incorporating partial or entire sequences of the CP, P1 and NIb cistrons into potato or tobacco plants. PVY resistant genetically-engineered cultivars were registered in the USA (Solomon-Blackburn and Barker, 2001). Most recently, potato plants transformed with a chimeric transgene containing PVY CP sequences was evaluated in the field for a period of six years in Argentina. The plants showed null or negligible infection and preserved their agronomical traits and biochemical characteristics (Bravo-Almonacid *et al.*, 2012).

b) Genome organization and protein functions

PVY virions have a filamentous and flexuous form with a helical symmetry, a length of 730-740 nm and a diameter of 12 nm. The genome consists of a messenger sense, single strand RNA of approximately 9.7 kb. It is covalently linked to a single molecule of the viral protein genome-linked (VPg) at the 5' end, and contains a polyadenosine (poly A) tail at the 3' end. The genome contains a single open reading frame (ORF) flanked by untranslated regions, and is expressed as a polyprotein of approximately 3062 amino-acid residues, that is cleaved into 10 mature proteins by three viral proteases (Carrington and Freed, 1990) (Fig. 1). An additional protein is produced from an overlapping ORF after +2 frameshifting of the P3 cistron, as fusion to the amino (N)-terminal part of the P3 (P3N-PIPO) (Dougherty and Carrington, 1988; Chung *et al.*, 2008). Due to the high genome similarities within the genus *Potyvirus*, the functions of PVY proteins have been largely inferred by analogy to other members of the

group. Most of them are multifunctional. The first protein coded by the 5' region of the PVY genome is the P1, the most variable protein among potyviruses. It has a protease domain in the carboxy (C)-terminal region and cleaves itself from the adjacent helper-component protease (HC-Pro) (Verchot *et al.*, 1991). It was shown to bind single- and double-stranded RNA (Brantley and Hunt, 1993; Soumounou and Laliberté, 1994), to be involved in genome amplification (Verchot and Carrington, 1995) and to enhance the suppression of plant defences based on RNA silencing (Pruss *et al.*, 1997; Brigneti *et al.*, 1998).



recombination pattern of PVY^{NTN} and PVY^N-W isolates. **a.** PVY factors and/or mutations involved in resistance breakdown are indicated below the genome scheme. The dominant genes are specified with an upper-case letter and the host is indicated between brackets. Above the genome scheme, PVY determinants of virulence or aphid transmission are notified. **b.** Schematic representation of the different recombination patterns between PVY^O (in clear gray) and PVY^N (in dark gray) clades (modified from Hu *et al.* (2009)). *: The tobacco Rk gene confers a nematode resistance and it (or a very tightly linked gene) induces leaf necrosis upon PVY inoculation.

The next protein, HC-Pro, is involved in aphid transmission (Govier *et al.*, 1977), virus multiplication, cell-to-cell (Rojas *et al.*, 1997) and systemic movements (Sáenz *et al.*, 2002) and symptom intensity (Redondo *et al.*, 2001; Sáenz *et al.*, 2002; Shibolet *et al.*, 2007; Torres-Barcelo *et al.*, 2008; Yambao *et al.*, 2008). Two conserved motifs of HC-Pro, the N-terminal 'KITC' and the C-terminal 'PTK' motifs are required for aphid transmission, with the first being involved in the interaction with the aphid stylet (Blanc *et al.*, 1998) and the latter being a possible binding site for virions (Peng *et al.*, 1998). The Lys to Glu (K59E within the KITC motif) mutation observed in some PVY isolates renders the HC-Pro unable to interact with aphid stylets and abolishes PVY aphid transmissibility (Blanc *et al.*, 1998). It has been suggested that HC-Pro acts as a bridge between the virion coat protein (CP) and an unknown receptor in the aphid stylet (Govier and Kassanis, 1974; Pirone and Blanc, 1996). The C-terminal part of HC-Pro is involved in the suppression of plant defences based on the RNA silencing machinery, by binding to small interfering (si) RNAs (Llave *et al.*, 2000; Brigneti *et al.*, 1998; Shibolet *et al.*, 2007; Varrelmann *et al.*, 2007; Lakatos *et al.*, 2006). This property could account for the general involvement of potyvirus HC-Pro in symptomatology and synergy with co-infecting viruses for symptom severity (Pruss *et al.*, 1997), but also for its roles in virus multiplication and systemic movement (Kasschau and Carrington, 2001). Additional plant defence inhibition properties are also suggested by the fact that PVY HC-Pro interacts with subunits of the 20S proteasome, which is related to the antiviral response (Jin *et al.*, 2007). A recent study has also shown an interaction between PVY HC-Pro and the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and its isoform eIFiso4E of pepper and tobacco, making of HC-Pro a putative partner of the translation initiation complex (Ala-Poikela *et al.*, 2011).

The P3, together with the 6K2 protein, are the two potyviral membrane proteins (Eiamtanasate *et al.*, 2007; Restrepo-Hartwig and Carrington 1994). The P3 contains two hydrophobic domains located at the N- and the C-termini. Several studies have suggested its involvement in virus replication, systemic infection, pathogenicity and movement (Chu *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 2010; Johansen *et al.*, 2001; Merits *et al.*, 1999). A translational frameshift on the P3 cistron leads to the production of P3N-PIPO (Chung *et al.*, 2008), which was shown to be located to plasmodesmata and to participate to the

viral cell-to-cell movement in conjunction with the CI protein (Wei *et al.*, 2010b). The function of the following 6K1 protein is unknown.

The CI (cylindrical or cytoplasmic inclusion) protein forms the laminate cytoplasmic inclusion bodies (pinwheel-shaped) (Edwardson, 1992), typical of potyviral infections. Its involvement in cell-to-cell virus movement has been well established (Carrington *et al.*, 1998; de Cedrón *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2010) while the RNA-binding, RNA helicase and ATPase activities strongly suggest an important role in virus replication (Fernandez *et al.*, 1995, 1997; Merits *et al.*, 1998). The C-terminal part of the CI protein was shown to interact with the plant eIF4E (Tavert-Roudet *et al.*, 2012) and the virus VPg and the CI could therefore be recruited into the translation initiation complex, which is essential for virus multiplication and/or cell-to-cell movement (Abdul-Razzak *et al.*, 2009).

The 6K2 protein is membrane-bound (Restrepo-Hartwig and Carrington 1994) and has been shown to play an essential role in virus replication (Wei and Wang 2008; Wei *et al.*, 2010a) by anchoring the viral replication complex to the endoplasmic reticulum (Schaad *et al.*, 1997).

The NIa (first nuclear inclusion) protein possesses two domains: the VPg and a protease domain which cleaves all proteins at the C-terminal half of the precursor polyprotein (Carrington and Dougherty 1987). The VPg is an intrinsically-disordered protein and its structural flexibility was proposed to be the basis of its capacity to interact physically with many viral and plant proteins (Elena and Rodrigo in press) and its functional diversity (Rantalainen *et al.*, 2011). Binding of PVY VPg with the host eIF4E is a key component of virus multiplication (translation and/or replication) (Deom *et al.*, 1997; Robaglia and Caranta 2006). The VPg is localized in different cellular compartments depending on its combination with the NIa protease and/or the 6K2 protein. The VPg–NIa protease combination is located exclusively in the nucleolus, whereas the 6K2–VPg–NIa protease combination is found within vesicular structures derived from the endoplasmic reticulum (Jiang and Laliberte, 2011). Finally, the VPg alone is linked covalently to the 5' extremity of the viral RNA via a tyrosine residue.

The NIb (second nuclear inclusion) protein is the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) involved in the replication of the viral RNA. Finally, the CP is required for virion assembly, cell-to-cell (Rojas *et al.*, 1997) and systemic movements (Dolja *et al.*,

1995; Andersen and Johansen 1998) and aphid transmission (Atreya *et al.*, 1990; Blanc *et al.*, 1997). The CP is a three-domain protein with variable N- and C-terminal domains exposed on the virion surface and a core region that binds RNA. The highly conserved 'DAG' motif at the N-terminus of the CP is essential for aphid transmissibility (Atreya *et al.*, 1995). The context of the DAG motif can modulate the efficiency of potyvirus aphid transmission (López-Moya *et al.*, 1999). Remarkably, amino acid positions 9, 10 and 11 of the PVY CP, immediately adjacent to the DAG triplet (located at positions 6 to 8), was shown to be subjected to positive selection (Moury and Simon 2011). Hence, variations at these positions could modulate PVY transmission efficiency, as demonstrated for position 9 of *Tobacco etch virus* (TEV) CP (López-Moya *et al.*, 1999). Also, the internal amino acid position 68 of PVY CP was shown to modify quantitatively its aphid transmission efficiency by *Myzus persicae* or *Aphis gossypii* (Moury and Simon 2011). The core region of the CP has an essential role in virus assembly and cell-to-cell movement, suggesting the involvement of virions in cell-to-cell traffic (Rojas *et al.*, 1997). Both the N- and C-terminal regions are not required for assembly but are involved in systemic movement.

2. What is structuring Potato virus Y diversity ?

a) Where, how and when did PVY emerge?

The species *Potato virus Y* belongs to a large clade of 18 potyvirus species sometimes referred to as the "PVY group" or "PVY clade" (Gibbs and Ohshima 2010; Moury and Verdin 2012). It represents one of the four potyvirus groups that infect solanaceous crops, together with the *Tobacco etch virus/Potato virus A* clade, the *Pepper veinal mottle virus/Chilli veinal mottle virus* clade and *Colombian datura virus* (synonymous to *Petunia flower mottle virus*) which does not show any close relationship with other potyviruses (data not shown). Viruses from the PVY clade are mostly present in America and more particularly in South America. Among the 18 species of the clade, 15 are present in America, with 10 of them being present exclusively on this continent. By contrast, only eight species have been described outside the Americas, indicating a significantly higher richness of viruses belonging to this clade in the American continents ($P=0.018$; Fisher exact test). Three species (*Amazon lily mosaic virus*, *Alstroemeria mosaic virus*, *Amaranthus leaf mottle virus*) have been observed only in the Old World

but only sporadically. Moreover, the natural hosts of these three species are originating from South America. It is therefore likely that they are (or were) also present in America but have not been detected due to limited sampling.

There is a significant association between the potyvirus species of the PVY clade that are found outside the American continents and their occurrence in crops propagated by vegetative propagation (Table 1; $P=0.023$, Fisher exact test). These data suggest that America (and more specifically South America) could be the center of origin and diversification of the PVY clade and that a worldwide dispersal of some of its members involved mostly human activities (trade of potato tubers and bulbs or rhizomes of ornamental plants). The same trend is observed for the PVY species. Among the five major clades within PVY species, four (clade C, which includes the two sub-clades C1 and C2, and clades N and O; see below) are infectious in potato and show a worldwide distribution. The fifth (Chilean) clade does not seem to infect potato and was described only in Chile (Sudarsono *et al.*, 1993; Moury, 2010). These data are also in accordance with the fact that Central and South America are centers of origin and diversification for most of the hosts of viruses in the PVY clade, including PVY itself, such as species of the families Solanaceae, Asteraceae (Barreda *et al.*, 2010), and Amaranthaceae (Segundo *et al.*, 2007). These three botanical families also include high numbers of PVY experimental hosts (Edwardson and Christie, 1997; Kerlan 2006), which could be a “genetic reminiscence” of host range and infectivity properties derived from the common ancestor of the PVY clade. Reciprocally, viral species of the PVY clade that are adapted to the Asteraceae are also able to infect species in the family Solanaceae (Dujovny *et al.*, 1998; *Bidens mottle virus* GenBank accession number EF467235). Recent attempts to put a timeframe on the diversification of PVY were unsuccessful (Cuevas *et al.*, 2012) due to a lack of temporal structure in the PVY sequence dataset available, precluding the estimation of divergence times within the phylogenetic tree. Since the initial radiation of the whole *Potyvirus* genus was estimated to have occurred about 6,600 years ago (Gibbs *et al.*, 2008), a period which coincided with the development of agriculture, PVY diversification can be considered as very recent and might have been strongly influenced by human activities.

Table 1: A test of association between geographic distribution and host characteristics among the 18 species of the *Potato virus Y* (PVY) group (Gibbs and Ohshima, 2010). Viruses that infect commercialized plants multiplied vegetatively have a higher chance of being present outside the American continents which contains the putative center of diversification of the group ($P=0.023$ or $P=0.002$ when considering separately the five major PVY clades; Fisher exact tests). The five PVY clades are underlined.

	Present outside the Americas	Absent outside the Americas
Infectious in commercialized plants with vegetative propagation (tubers, bulbs or rhizomes)	<i>Alstroemeria mosaic virus</i>	None reported
	<i>Amazon lily mosaic virus</i>	
	<i>Potato virus V</i>	
	<i>Potato virus Y</i> (PVY):	
	<u>PVY-N</u>	
	<u>PVY-O</u>	
	<u>PVY-C1</u>	
	<u>PVY-C2</u>	
Not infectious in commercialized plants with vegetative propagation	<i>Amaranthus leaf mottle virus</i>	<i>Alternanthera mild mosaic virus</i>
	<i>Bidens mottle virus</i>	<i>Bidens mosaic virus</i>
	<i>Pepper mottle virus</i>	<i>Brugmansia suaveolens mottle virus</i>
	<i>Sunflower chlorotic mottle virus</i>	<i>Ecuadorian rocoto virus</i>
		<i>Pepper severe mosaic virus</i>
		<i>Pepper yellow mosaic virus</i>
		<i>Peru tomato mosaic virus</i>
		<i>Pfaffia mosaic virus</i>
		<i>Verbena virus Y</i>
		<i>Wild potato mosaic virus</i>
	<u>PVY-Chile</u>	

b) Host and geography as drivers of PVY diversity

PVY has been the focus of interest of many agronomists and virologists and its biological and genetic diversities have been explored extensively, allowing to draw a rather exhaustive image of its diversity. Genome analyses revealed five major clades within the PVY species (Fig. 2). The most widespread clades are the C1, N and O groups, while the C2 and Chilean groups are more restricted, either due to their narrower host range or their limited geographical distribution. Recombinant isolates with different genome parts clustering with distinct clades are also widespread.

The first descriptions of PVY infections date back to the 1930s (Cockerham, 1943; Salaman and Le Pelley, 1930; Smith, 1931). PVY clades O and C (without distinguishing sub-clades C1 and C2) were predominant until the 1950s (Rolland *et al.*, 2008). PVY C isolates could be distinguished from O isolates by the hypersensitive reactions (HRs) that they induce in potato cultivars carrying the *Nc* resistance gene. PVY O isolates were a major problem in potato production and they induced severe leaf mosaic symptoms and yield losses in potato cultivars lacking major resistance genes. PVY C isolates were causing less severe diseases in potato, with systemic mosaic or stipple streak symptoms. However, they were, and still are, predominant in other crops such as pepper (mainly the C1 subgroup) where they induce severe mosaic and/or necrotic symptoms and high yield reduction (Gebre Selassie *et al.*, 1985).

PVY N isolates induce severe veinal necrosis symptoms in most tobacco cultivars, whereas PVY O and C isolates usually induce mild mosaic symptoms. PVY N isolates were reported since the 1940s in potato plants in Peru and Bolivia (Nobrega and Silberschmidt, 1944). Such isolates have been described in Europe and the USA since the 1950s (Kahn and Monroe, 1963). Compared to PVY O isolates, they induce less severe symptoms on potato plants, mostly mild mosaic or mottle in leaves. Finally, PVY isolates from the Chilean group were described initially in tobacco plants, where they induced veinal necrosis similar to that induced by N isolates (Sudarsono *et al.*, 1993) and later in pepper (*Capsicum baccatum*) (Moury, 2010). Until now, this clade contains only isolates from Chile. According to phylogeny, the Chilean clade was the first to diverge during PVY evolution (Fig. 2).

Before the development of molecular biology, PVY classification was based on serology and on infectivity and symptomatology on different cultivated hosts. A remarkable

property of PVY diversity is the correlation between the phylogenetic classification and some host range properties (Fig. 2). Examples are infectivity in pepper and potato (isolates of clades C2, N and O are not or poorly infectious in pepper whereas isolates of clades C1 and Chile are nor or poorly infectious in potato; Gebre Selassie *et al.*, 1985; Romero *et al.*, 2001; Fereres *et al.*, 1993; Moury 2010) or interaction with potato resistance genes *Nc* (specific of PVY C isolates) and *Ny* (specific of PVY O isolates). This suggests that relatively few host jumps and few changes in pathogenicity have occurred during PVY history. Moreover, this indicates that only few genetic exchanges occurred between these major clades, since they would have obscured these correlations. Some of the pathogenicity traits, however, do not match with the phylogenetic clustering of PVY isolates, like infectivity towards pepper or tobacco genotypes carrying recessive resistances, interaction with the resistance of the potato cultivar Maris Bard, or symptomatology in tobacco varieties carrying the *Nk* nematode resistance gene.

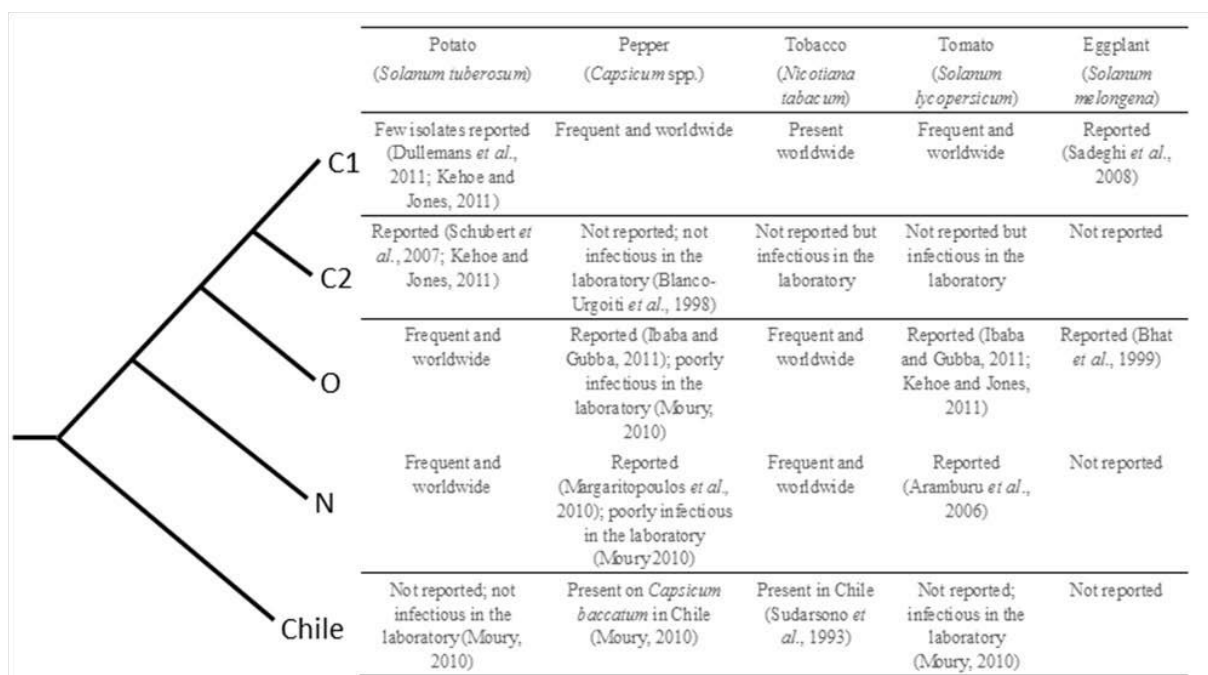


Figure 2: Simplified PVY phylogeny (excluding the recombinant isolates) and infectivity of PVY isolates from the five major clades in crop plants of the family Solanaceae.

Phylogenetic analysis has also revealed an effect of the continental origin on the genetic structuring of PVY populations, mainly for Europe, Japan, South Africa and North America (Cuevas *et al.*, 2012). More particularly, the PVY N group splits into European and North American sub-clades and, though few isolates have been characterized, the

Chilean group seems to be restricted to South America. For potato PVY isolates, the geographical structuring is probably hindered by the international trade of seed tubers and repeated introductions of PVY-infected material (for example, at least five independent introductions have been postulated in Australia; Kehoe and Jones 2011). Evidence of geographical structure could therefore reflect a lower amount of potato material exchange or more efficient quarantine procedure or sanitary control policies.

c) The emergence of PVY recombinants

Since the end of the 1970s, PVY isolates inducing necrotic ringspots in potato tubers were described and shown later to be recombinants, with parts of their genome clustering with PVY O isolates and others with PVY N isolates (Le Romancer *et al.*, 1994). Isolates showing this recombination pattern (grouped as PVY^{NTN}; Fig. 1B) showed a dramatic increase in frequency in European potato crops in the 1990s and 2000s, representing more than 50% of isolates in France and Germany (Rolland *et al.*, 2008). Another recombinant group (PVY^{N-W}; Fig. 1) showed also an increase in prevalence in Europe and Northern America during the years 2000s (Rolland *et al.*, 2008). By contrast, PVY C isolates were no more detected in European or American potato crops, which could be due to the wide distribution of the *Nc* resistance gene in potato cultivars (Cockerham, 1943). The reasons of these spectacular increases in frequency are still unknown. These recombinant isolates possess a clear fitness advantage over non recombinants, because these increases in prevalence occurred independently in different geographic regions, worldwide. They have a clear advantage over PVY O isolates, because they can infect potato cultivars carrying the *Ny* gene, which is present in many cultivars. However, why they outcompete isolates of the N clade remains unexplained. It was shown that the molecular determinants of veinal necrosis in tobacco (cultivar Xanthi) present among PVY N but not among O isolates was conferring a fitness cost in terms of accumulation and competitiveness in Xanthi (Rolland *et al.*, 2009). The recombination events that lead to the PVY^{NTN} group might have compensated this fitness penalty. There is probably no direct link between the recombinant nature of PVY^{NTN} isolates and the tuber necrosis that they induce. Indeed, similar symptoms can be induced by non-recombinant isolates of the N clade (Nie and Singh, 2003; Singh *et al.*, 2008).

Other recombinant PVY isolates, mostly issued from recombination between PVY O and N isolates, have been described but show more limited geographical ranges. Although many different recombination patterns have been observed among PVY isolates, they seem to involve a limited number of independent recombination events. For example, PVY^{NTN} and PVY^{N-W} isolates share three recombination breakpoints and may therefore have common origins (Schubert *et al.*, 2007; Fig. 1).

3. Potato virus Y and its host: Models of pathogenicity evolution in plant viruses

a) Eukaryotic initiation factor 4E-mediated resistances and PVY: Evidence of recent and rapid coevolution

The first cloned natural recessive gene conferring parasite resistance to plants was the *pvr2* gene of pepper (*Capsicum* sp.) which provides PVY resistance (Ruffel *et al.*, 2002). It was also the first cloned PVY resistance gene. *pvr2* encodes an eIF4E, which is involved in the initiation of translation of mRNAs in eukaryotes. eIF4E binds the cap attached to the 5' extremity of mRNAs and initiates the recruitment of a scaffold of plant proteins, ending up with the translation process (Robaglia and Caranta, 2006). In plants, eIF4E belongs to a small gene family (Patrick and Browning 2012). There are three copies of eIF4E and one isoform (eIFiso4E) in the genome of *Arabidopsis thaliana*. Pepper and tomato possess one copy of eIFiso4E and at least two copies of eIF4E (named eIF4E1 and eIF4E2). It has been suggested that, among these copies, one is constitutively expressed and possesses ubiquitous translation functions, while others are more specialized and may also possess functions unrelated to translation (Hernández and Vazquez-Pianzola 2005). Potyviruses have no caps at the 5' end of their genomic RNAs but a viral protein, the VPg. Potyvirus VPgs are able to interact physically with one or the other eIF4E isoforms which suggests that they have hijacked the translation machinery of eukaryotic cells for their own multiplication. Indeed, it was shown that virus VPg and plant mRNAs compete for binding to eIF4E forms (Léonard *et al.*, 2000). In addition, direct binding between eIF4E and potyvirus VPg was demonstrated with yeast two-hybrid experiments (Wittmann *et al.*, 1997) and found to be essential for virus infectivity. Indeed, knock-out eIF4E or eIFiso4E mutants or plants encoding eIF4E versions with point amino acid substitutions that abolished interaction with the VPg are resistant to potyvirus infection (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2002 ; Ruffel *et al.*, 2002). In turn, viruses are able to

counter-adapt to these resistances through VPg mutations that restore interaction with the mutated eIF4E (Charron *et al.*, 2008) or, in some cases, possibly through the use of an eIF4E-independent pathway for their infectivity (Gallois *et al.*, 2010). The PVY VPg was shown to be the resistance-breaking (RB) factor towards pepper *pvr2* resistance alleles and a recessive resistance in the tomato relative *Solanum habrochaites* (the *pot-1* gene, which encodes an eIF4E and is the orthologue of *pvr2*) (Ruffel *et al.*, 2005; Moury *et al.*, 2004) and tobacco (alleles at the *va* locus, which is not cloned yet) (Masuta *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2011). Resistances conferred by eIF4E mutations have variable phenotypic effects. Resistance can restrict virus multiplication at the single cell level, as observed in protoplast experiments (Deom *et al.*, 1997), or impair cell-to-cell movement (Acosta-Leal and Xiong, 2008; Gao *et al.*, 2004) or virus accumulation and symptoms at the systemic level (Nicaise *et al.*, 2003). In pepper, 10 different *pvr2* alleles have been described from a collection of 25 inbred lines (Charron *et al.*, 2008) with the most widespread corresponding to the susceptibility allele *pvr2*⁺. In spite of this relatively high allelic richness, there is overall very limited variability in the *pvr2* sequences. The other nine alleles differ from *pvr2*⁺ by only one to four amino acid substitutions in the encoded eIF4Es. Almost only nonsynonymous substitutions have been observed in the sequence of *pvr2* and most polymorphic positions show signatures of positive selection (Cavatorta *et al.*, 2008). Polymorphism is concentrated in three eIF4E domains, two of them coinciding with the catalytic site (mRNA cap-binding site). Remarkably, all pepper genotypes carrying alleles that differ from *pvr2*⁺ show resistance to PVY. In spite of their high sequence similarity, these resistance alleles show contrasted resistance spectrum and durability. Among the nine *pvr2* alleles conferring PVY resistance, three (*pvr2*¹, *pvr2*² and *pvr2*⁷) conferred also resistance to *Pepper veinal mottle virus* (PepVMV), when combined with the *pvr6*-eIFiso4E gene (Rubio *et al.*, 2009), and one (*pvr2*²) conferred resistance to *Tobacco etch virus* (TEV) (Charron *et al.*, 2008). These three species belong to three distinct clades in the genus *Potyvirus*, showing a large-spectrum in eIF4E-mediated resistances and showing that infection strategies of many potyviruses rely on similar patterns of interaction with eIF4E.

Table 2: Major genes conferring resistance to *Potato virus Y*

Plant species	Resistance gene	Chromosome location	Nature of resistance ^a	Spectrum of resistance	PVY pathogenicity factor	RB mutation and cost associated	References
Pepper	<i>pvr2</i> ¹	P4	Recessive	Medium; some RB isolates	VPg	N ₁₂₁ H, no cost	Kyle and Palloix, 1997; Ruffel <i>et al.</i> , 2002; Moury <i>et al.</i> , 2004 ; Charron <i>et al.</i> , 2008 ; Montarry <i>et al.</i> , 2011; Fabre <i>et al.</i> , 2012
	<i>pvr2</i> ²	P4	Recessive	Large ; very few RB isolates	VPg	N ₁₁₉ D + N ₁₂₁ H, costly	
	<i>pvr2</i> ³	P4	Recessive	Narrow ; many RB isolates	VPg	Many single-nucleotide mutations, no cost	
	<i>pvr2</i> ⁴ to <i>pvr2</i> ⁹	P4	Recessive	Not reported	Not reported	Not reported	
	<i>Pvr4</i>	P10	Dominant (HR/ER)	All clades	Nlb	K ₄₇₂ E, costly	
	QTLs	P1, P6, P9, P10	polygenic	All clades	Not reported	Not reported	Caranta <i>et al.</i> , 1997
Potato	<i>Nc_{spl}</i>	IV	Dominant (HR)	clade C	HC-Pro	Not reported	Moury <i>et al.</i> , 2011
	<i>Nc_{tbr}</i>	Not reported	Dominant (HR)	clade C	HC-Pro	Not reported	Cockerham, 1970; Jones, 1990 ; Moury <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ny_{tbr}</i>	IV	Dominant (HR)	clade O	HC-Pro	Not reported	Celebi-Toprak <i>et al.</i> , 2002; Cockerham 1970; Jones, 1990 ; Moury <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ry_{adg}</i>	XI	Dominant (ER)	All clades	Not reported	Not reported	Hämäläinen <i>et al.</i> , 1997; Ross, 1986
	<i>Ry_{sto}</i>	XII	Dominant (ER)	All clades	Nla-Pro	Not reported	Cockerham, 1943; Mestre <i>et al.</i> , 2000; Song <i>et al.</i> , 2005
Tobacco	<i>va</i> ⁰ to <i>va</i> ²	E	Recessive	All clades	VPg	Not reported	Masuta <i>et al.</i> , 1999; Lacroix <i>et al.</i> , 2011
	<i>va2</i>	Not reported	Recessive	Not reported	Not reported	Not reported	Acosta-Leal and Xiong, 2008
Tomato	<i>pot-1</i>	T3	Recessive	All clades	VPg (R ₁₁₉ H)	Not reported	Parrella <i>et al.</i> , 2002 ; Moury <i>et al.</i> , 2004

^a HR = hypersensitive resistance, ER = extreme resistance

The *pvr2* alleles also differ largely in durability. *pvr2*¹ and *pvr2*² have been deployed in pepper crops worldwide for more than 50 years. Almost no natural PVY isolates able to infect plants with *pvr2*² have been described so far (Moury and Verdin 2012). *pvr2*¹-breaking isolates are more frequent in natural conditions but they tend to be less prevalent than wild-type (*i.e.* non RB) isolates (Luis-Arteaga and Gil-Ortega, 1986). The *pvr2*³ allele is not largely deployed except in traditional cultivars. However, *pvr2*³-breaking isolates are highly prevalent in pepper crops (Ben Khalifa *et al.*, 2012) and can be easily selected in laboratory conditions (Ayme *et al.*, 2006; Montarry *et al.*, 2011). *pvr2*³ is therefore expected to have a very low durability potential. The differences of durability between *pvr2*¹, *pvr2*² and *pvr2*³ have been linked to the number and complexity of mutational pathways in the VPg coding region conferring the RB capacity to PVY (Ayme *et al.* 2007) and to the pleiotropic fitness costs caused by these mutations (Fabre *et al.*, 2012; Ben Khalifa *et al.*, 2009).

The pattern of variation of the VPg of pepper PVY isolates shows striking similarities with that of its *pvr2*-encoded eIF4E ligand among pepper cultivars. Most of the VPg is highly constrained, shows very limited amino acid variation and evolves under significant negative selection (B. Moury, data not shown). By contrast, a small central region (amino acid positions 101 to 123) shows extensive amino acid variation, associated with significant positive selection (Moury *et al.*, 2004). The functional relevance of these amino acid substitutions is further highlighted by the fact that all substitutions involved in the breakdown of the *pvr2* alleles of pepper during laboratory experimental evolution coincide with these positively-selected positions (Ayme *et al.*, 2006). This correlation implies also that the RB events observed in the laboratory are representative of those which occur in natural epidemiological conditions and that experimental evolution can be used, to a certain extent, to evaluate the durability potential of resistances. The eIF4E-VPg pattern of diversity was suggested to be emblematic of the matching allele model of plant-pathogen interactions (by contrast with the gene-for-gene model of interaction; Sacristán and García-Arenal 2008; Ben Khalifa *et al.*, 2012), where each pathogen genotype is adapted to only one (or a very limited number of) resistance allele(s) in the host population and where the RB capacity incurs no fitness cost to the pathogen.

Taken together, (i) the high variability and the positive selection observed at a very small number of amino acid positions of the VPg and eIF4E, (ii) the fact that the rest of these two proteins are highly conserved and/or constrained, (iii) the fact that almost all amino acid variability is linked to gains of functions (resistance of the plant or pathogenicity of the virus) and (iv) the recent emergence of potyviruses provides one of the rare evidence of a recent and rapid coevolution in plant-pathogen interactions.

b) Steady relationships between PVY and dominant resistances

Dominant monogenic resistances to PVY have been characterized in potato and pepper. The pattern of interaction between these resistances and PVY isolates shows a remarkable stability, which contrasts sharply with the rapid diversification observed for recessive resistance alleles and PVY VPg ligands. Two kinds of phenotypic reactions have been distinguished among dominant resistances: extreme resistance (ER) and hypersensitive response (HR). The former includes the *Ry_{sto}* and *Ry_{adg}* genes from the wild potato relatives *S. stoloniferum* and *S. tuberosum* ssp. *andigena*, respectively, and the *Pvr4* gene from pepper. No PVY accumulation can be detected in inoculated organs of plants carrying these ER genes (Jones, 1990; Janzac *et al.*, 2009) and no necrotic lesions typical of a HR can be observed. The ability of *Ry_{sto}* to reduce PVY accumulation at the within-cell level was demonstrated by protoplasts experiments (Barker and Harrison, 1984). Several lines of experimental evidence support links between ER and HR. For the *Pvr4* resistance in pepper, some PVY isolates are able to induce HR-like necrotic lesions in inoculated cotyledons and PVY can be detected in these organs (Janzac *et al.*, 2009). However, none of the isolates was able to induce necrotic lesions nor was detected by ELISA or RT-PCR in *Pvr4* pepper leaves. HR-like reactions also occur in *Pvr4* pepper under high inoculation pressures like in graft inoculations, where the infected susceptible rootstock loads permanently PVY into the resistant scion through the sieve elements (Janzac *et al.*, 2009), and in *Ry_{sto}* potato plants by *Agrobacterium*-mediated expression of the resistance elicitor (Mestre *et al.*, 2000). Therefore, ER and HR seem to be manifestations of the same resistance mechanisms, ER being possibly a HR which is expressed more rapidly and/or with a higher intensity by the plant, which can circumvent more efficiently the virus infection (Bendahmane *et al.*, 1999). Remarkably, *Pvr4* and *Ry* show a large spectrum of action: *Ry* genes are efficient against

all PVY clades and *Pvr4* against all PVY isolates and five additional potyvirus species from the PVY clade. Both are also highly durable since no RB by PVY has been observed in field conditions (for more than 20 years for *Pvr4*). Graft-inoculation of *Pvr4* scions allowed selecting RB PVY isolates in laboratory conditions, which permitted to locate a single-nucleotide RB substitution in the NIb coding region. This mutation induces a high competitiveness cost to PVY in a susceptible pepper genotype (Janzac *et al.*, 2010).

Since no RB isolate was available, the viral factor corresponding to *Ry_{sto}* was identified through transient expression of the PVY proteins in potato leaves. Only the NIa protease was able to induce necrotic HR-like reactions. These reactions were specific of the plants carrying *Ry_{sto}* in a segregating population of potato plants (Mestre *et al.*, 2000). The capacity of the NIa protease to induce the HR-like response was further shown to overlap largely with the amino acid positions involved in the protease activity to the protein (Mestre *et al.*, 2003). This suggests that putative RB mutations in PVY NIa protease would abolish or decrease the protease activity, would alter the maturation of most viral proteins and hence would be extremely costly for the virus. Overall, the high durability of the *Ry* and *Pvr4* ER resistances seem due to the fitness cost rather than to the mutational pathways associated to RB.

Dominant resistances to PVY associated to HRs have been described only in potato or potato relatives in the genus *Solanum*. The *Nc_{tbr}* and *Nc_{spl}* genes, from *S. tuberosum* and *S. sparsipilum*, respectively, confer HR resistance to PVY C (C1 and C2) isolates only, while the *Ny_{tbr}* gene from *S. tuberosum* confer HR resistance to PVY O isolates only. *Nc_{spl}* and *Ny_{tbr}* map to the same region of chromosome IV in the potato genome and could therefore be allelic or belong to the same gene cluster (Moury *et al.*, 2011). The PVY HC-Pro is the viral factor that corresponds to *Nc_{tbr}*, *Nc_{spl}* and *Ny_{tbr}* (Moury *et al.*, 2011) and the HR eliciting regions of *Nc_{spl}* and *Ny_{tbr}* seem to be contiguous in the C-terminal end of the HC-Pro (Moury *et al.*, 2011; Tian and Valkonen, in press). The fact that the specificity of the HR resistances of potato correlates largely with the clustering of PVY clades suggests few, if any, breakdowns of these resistances by accumulation of point mutations along PVY evolution. Instead, breakdown of *Ny_{tbr}* by recombination was suggested for PVY^{NTN} and PVY^{N-W} (Moury *et al.*, 2011).

Consequently, in contrast to recessive resistances, dominant resistances show rather stable patterns of interaction with PVY diversity, since these resistances show (i) no (or

very few) evidence of breakdown, (ii) few allelic variability and (iii) no evidence of positive selection in the corresponding viral factors (HC-Pro, NIa protease and NIb) (Moury *et al.*, 2002; Moury *et al.*, 2006).

c) Insights into the durability of oligo- and polygenic resistances

Combining different resistance genes against the same pathogen in the same plant genotype (gene pyramiding strategy) was proposed to improve the durability of resistances. PVY provided experimental evidence of this concept and insights about the mechanisms involved in this enhanced durability. Acosta-Leal and Xiong (2008) studied tobacco cultivars 'VAM' and 'NC745', both carrying the *va* recessive resistance gene, and observed a rapid selection of RB variants in NC745, but not in VAM for which no RB variants were obtained. The *va* gene confers resistance to PVY cell-to-cell movement. In VAM, a second unlinked recessive gene named *va2* was additionally conferring resistance to within-cell PVY accumulation, as observed in transfected protoplasts. Therefore, the higher durability of VAM resistance was due to a combination of resistances that acted at two different steps of the virus infection cycle.

A similar situation was observed in pepper, where the durability of the *pvr2³* gene could be highly enhanced by the combination with quantitative trait loci (QTLs) that increased the resistance efficiency (Palloix *et al.*, 2009). Several mechanisms seemed to contribute to the higher durability of the polygenic resistance (*pvr2³* + QTLs), including higher efficiency, more complex mutational pathways leading to RB and slower selection of the RB variants (Quenouille *et al.*, in press). Interestingly, by themselves the QTLs had only a small resistance effect, slightly decreasing PVY accumulation at the systemic level and delaying symptom onset and severity. Moreover, the QTLs were not durable by themselves, since eight serial passages in a pepper genotype carrying these QTLs showed a drastic increase in virus accumulation (Montarry *et al.*, 2012). These results suggest that the increase of durability of the polygenic resistance composed of *pvr2³* and QTLs was due to more-than-additive effects of the genetic components.

d) PVY infectivity, virulence and fitness: correlated evolution of pathogenicity traits

Beyond their interaction with particular resistance genes, PVY isolates more generally show large differences in pathogenicity, including virulence, *i.e.* the quantitative level of

damages induced to host plants, and infectivity towards different host species. Variation of these traits has, for long, been the basis of PVY classification (Singh *et al.*, 2008).

Regarding virulence, the most obvious differences reside in the capacity of some PVY isolates to induce necrotic (*versus* mosaic) reactions in their hosts, mainly in tobacco, pepper and potato. Usually, genetic variation for the necrotic phenotype exists also in the host. As mentioned above, PVY N isolates induce veinal necrosis in most tobacco cultivars, like Xanthi. The necrotic phenotype was mostly due to the combination of three amino acid substitutions in the HC-Pro (at positions 339, 400 and 419) (Tribodet *et al.*, 2005; Faurez *et al.*, 2012). The same three substitutions are present in isolates from the Chilean group, which induce also veinal necrosis in tobacco (Moury, 2010). Since the Chilean group was the first to diverge in PVY history, this suggests that tobacco necrosis is an ancestral PVY trait. There is also genetic variation among potato and PVY genotypes for induction of tuber necrosis but the genetic bases of this phenotype have not been determined, neither in PVY nor in the potato host.

Also, major differences in host species adaptation are observed for potato and pepper, whereas few differences in infectivity are observed in tobacco and tomato (both susceptible to most PVY isolates) or *S. melongena* eggplant (resistant to most PVY isolates) (Fig. 2).

Remarkably, several pathogenicity traits are not independently distributed among PVY isolates but strongly associated, suggesting both common evolutionary history and genetic correlation (by linkage or pleiotropy). For example, among the five major PVY clades, a negative correlation exists between the capacities to infect pepper and potato plants. This suggests very limited numbers of host jumps during PVY evolution, followed by secondary specialization onto the new host (Moury, 2010). Similarly, all PVY isolates able to induce potato tuber necrosis belong to group N or N×O recombinant groups that are also able to induce veinal necrosis in the Xanthi tobacco. Because the genetic determinism of most of these traits in PVY is still unknown, we do not know if these correlations are due to linkage or to pleiotropic effects of mutations. By contrast, pleiotropic effects of PVY mutations involved in fitness and/or pathogenicity traits have already been evidenced. Mutations involved in tobacco necrosis at positions 400 and 419 of the HC-Pro confer simultaneously a fitness cost in terms of competitiveness and accumulation in Xanthi (Rolland *et al.*, 2009). Similarly, in the CP

coding region of PVY N isolates, positive selection has been detected at amino acid position 25, indicating that variation at this position might have played an important role in PVY adaptation. Confirming this assumption, mutation of this position was shown to increase significantly PVY competitiveness in tobacco but to decrease competitiveness in potato (Moury and Simon, 2011).

To conclude, the facts that the distinct clades within the PVY species (i) show limited genetic exchanges and (ii) are correlated with adaptation to different host species and/or genotypes are indicative of a speciation in progress. The genetic differentiation into separate clades could be reinforced by host barriers, like those observed between pepper and potato, so that PVY could eventually evolve to form distinct viral species.

Acknowledgments

We thank Pr. Gary Foster for suggesting us to write this Pathogen Profile. Julie Quenouille is supported by INRA and the Région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA). We acknowledge the financial support of the Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS, French Ministry of Agriculture and Fisheries), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Pôle Européen d'Innovation Fruits et Légumes (PEIFL) and the seed companies Gautier Semences, Clause Vegetable Seeds, Vilmorin SA, Rijk Zwaan and Sakata Vegetables Europe.

References

- Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, C., Candresse, T., Le Gall, O. and German-Retana, S.** (2009) Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 109–113.
- Acosta-Leal, R. and Xiong, Z.** (2008) Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco Virgin A Mutant (VAM) to *Potato virus Y*. *Virology* **379**, 275-283.
- Adams M. J., Antoniw J. F. and Fauquet C. M.** (2005) Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch. Virol.* **150**, 459–479.
- Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamäki, M. L. and Valkonen, J. P. T.** (2011) Helper component proteinase of the genus potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J. Virol.* **85**, 6784-6794.
- Andersen, K. and Johansen, I.** (1998) A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* **241**, 304-311.

- Atreya, C., Raccach, B. and Pirone, T.** (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Atreya, P.L., Lopez-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D. and Pirone, T.P.** (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J. Gen. Virol.* **76**, 265-270.
- Aramburu, J., Galipienso, L., Matas, M.** (2006) Characterization of *Potato virus Y* isolates from tomato crops in Northeast Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* **115**, 247-258.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadœuf, J., Palloix, A. and Moury, B.** (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of Potato virus Y confer virulence on the *pvr2³* resistance in pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 557-563.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B.** (2007) Molecular dissection of the *Potato virus Y* VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* **88**, 1594-1601.
- Barker, H. and Harrison, B. D.** (1984) Expression of genes for resistance to *Potato virus Y* in potato plants and protoplasts. *Ann. Appl. Biol.* **105**, 539-545.
- Barreda, V.D., Palazzesi, L., Tellería, MC., Katinas, L., Crisci, J. V., Bremer, K., Passalia, M. G., Corsolini, R., Rodríguez Brizuela, R. and Bechis, F.** (2010) Eocene Patagonia fossils of the daisy family. *Science* **329**, 1621.
- Beczner, L., Horváth, J., Romhányi, I. and Förster, H.** (1984) Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.* **27**, 339-352.
- Ben Khalifa, M., Simon, V., Marrakchi, M., Fakhfakh, H. and Moury, B.** (2009) Contribution of host plant resistance and geographic distance to the structure of *Potato virus Y* (PVY) populations in pepper in Northern Tunisia. *Plant Pathol.* **58**, 763-772.
- Ben Khalifa, M., Simon, V., Fakhfakh, H. and Moury, B.** (2012) Tunisian *Potato virus Y* isolates with unnecessary pathogenicity towards pepper: support for the matching allele model in eIF4E resistance-potyvirus interactions. *Plant Pathol.* **61**, 441-447.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D.C.** (1999) The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-791.
- Bhat, A.I., Varma, A., Pappu, H.R., Rajamannar, M., Jain, R.K. and Praveen, S.** (1999) Characterization of a potyvirus from eggplant (*Solanum melongena*) as a strain of potato virus Y by N-terminal serology and sequence relationships. *Plant Pathol.* **48**, 648-654.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T.P.** (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **79**, 3119-3122.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P.** (1997) A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.
- Blanco-Urgoiti, B., Sanchez, F., Perez de san Roman, C., Dopazo, J. and Ponz, F.** (1998) PVY-C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J. Gen. Virol.* **79**, 2037-2042.
- Brantley, J.D. and Hunt, A.G.** (1993) The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottle virus is an RNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* **74**, 1157-1162.
- Bravo-Almonacid, F., Rudoy V., Welin, B., Segretin, M.E., Bedogni, M.C., Stolowicz, F., Criscuolo, M., Foti, M., Gomez, M., López, M., Serino, G., Cabral, S., Dos Santos, C., Huarte M. and Mentaberry, A.** (2012) Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. *Transgenic Res.* **21**, 967-982.
- Brigneti, G., Garcia-Mas, J. and Baulcombe, D. C.** (1997) Molecular mapping of the *Potato virus Y* resistance gene *Ry_{sto}* in potato. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 198-203.

- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C.** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**, 6739-6746.
- Bhat A. I., Varma A., Pappu H. R., Rajamannar M., Jain R. K. and Praveen S.** (1999) Characterization of a potyvirus from eggplant (*Solanum melongena*) as a strain of potato virus Y by N-terminal serology and sequence relationships. *Plant Pathol.* **48**, 648–654.
- Blanco-Urgoiti, B., Sanchez, F., Perez de san Roman, C., Dopazo, J. and Ponz, F.** (1998) PVY-C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J. Gen. Virol.* **79**, 2037–2042.
- Bukovinszki, A., Goetz, R., Johansen, E., Maiss, E., Balazs, E.** (2007) The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVY strains. *Virus Res.* **127**, 122-125.
- Carrington, J.C. and Dougherty, W.G.** (1987) Small nuclear inclusion protein encoded by plant potyvirus genome is a protease. *J. Virol.* **61**, 2540-2548.
- Carrington, J. C. and Freed, D. D.** (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J. Virol.* **64**, 1590-1597.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad, M.C.** (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**, 393–400.
- Cavatorra, J. R., Savage, A. E., Yeam, I., Gray, S. M. and Jahn, M.M.** (2008) Positive Darwinian selection at single amino acid sites conferring plant virus resistance. *J. Mol. Evol.* **67**, 551-559.
- Celebi-Toprak, F., Slack, S. A. and Jahn, M.M.** (2002) A new gene, *Ny_{tblr}*, for hypersensitivity to *Potato virus Y* from *Solanum tuberosum* maps to chromosome IV. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 669–674.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C.** (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* **54**, 56–68.
- Chu, M., Lopez-Moya, J. J., Llave-Correas, C. and Pirone T. P.** (1997) Two separate regions in the genome of the Tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 472-480.
- Chung, B.Y.W., Miller, W.A., Atkins, J.F. and Firth, A.E.** (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **105**, 5897–5902.
- Cockerham, G.** (1943) The reactions of potato varieties to viruses X, A, B and C. *Ann. Appl. Biol.* **30**, 338-344.
- Cockerham, G.** (1970) Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* **25**, 309–348.
- Cuevas, J.M., Delaunay, A., Visser, J.C., Bellstedt, D.U., Jacquot, E. and Elena, S.F.** (2012) Phylogeography and molecular evolution of *Potato virus Y*. *PLoS One* **7**, e37853.
- Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., and Wang, A.** (2010) The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* **397**, 56-63.
- d'Aquino, L., Dalmay, T., Burgyán, J., Ragozzino, A. and Scala, F.** (1995) Host range and sequence analysis of an isolate of *Potato virus Y* inducing veinal necrosis in pepper. *Plant Dis.* **79**, 1046–1050.
- De Bokx, J.A. and Huttinga, H.** (1981) *Potato virus Y*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 242.
- de Cedron, M. G., Osaba, L., Lopez, L. L. and Garcia, A. J.** (2006) Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* **116**, 136–145.
- Deom, C.M., Murphy, J.F. and Paguio, O.R.** (1997) Resistance to tobacco etch virus in *Capsicum annuum* : inhibition of virus RNA accumulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**, 917–921.
- Dogimont, C., Palloix, A., Daubèze, A. M., Marchoux, G., Gebre Selassie, K. and Pochard, E.** (1996) Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* **88**, 231–239.
- Bouhachem, S.B., Khamassy, N., Glais, L. and Kerlan, C.** (2008) Occurrence in Tunisia of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) caused by variant PVYNTN of *Potato virus Y*. *Plant Pathol.* **57**, 388.

- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. and Carrington, J.C.** (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Dougherty, W.G. and Carrington, J.C.** (1988) Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**, 123-143.
- Draper, M.D., Pasche, J.S. and Gudmestad, N.C.** (2002) Factors influencing PVY development in three potato cultivars. *Am. J. Pot. Res.* **79**, 155-165.
- Dujovny, G., Usugi, T., Shohara, K. and Lenardon, S.L.** (1998) Characterization of a new *Potyvirus* infecting sunflower in Argentina. *Plant Dis.* **82**, 470-474.
- Dujovny, G., Sasaya, T., Koganesawa, H., Usugi, T., Shohara, K. and Lenardon, S. L.** (2000) Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. *Arch. Virol.* **145**, 2249-2258.
- Dullemans, A. M., Cuperus, C., Verbeek, M. and van der Vlugt, R. A. A.** (2011) Complete nucleotide sequence of a potato isolate of strain group C of Potato virus Y from 1938 *Arch. Virol.* **156**, 473-477.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S. and Robaglia, C.** (2002), The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* **32**, 927-934.
- Edwardson, J. R.** (1992) Inclusion bodies. *Arch. Virol. Suppl.* **5**, 25-30.
- Edwardson, J.R. and Christie, R.G.** (1997) Potyviruses. In: *Florida Agricultural Experiment Station Monograph Series 18-II – Viruses Infecting Pepper and Other Solanaceous crops*. Gainesville, FL: University of Florida.
- Eiamtanasate, S., Juricek, M. and Yap, Y.K.** (2007) C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes* **35**, 611-617.
- Elena, S. F. and Rodrigo, G.** Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Curr. Opin. Virol.*, in press, doi: 10.1016/j.coviro.2012.09.004.
- Fabre, F., Montarry, J., Coville, J., Senoussi, R., Simon, V. and Moury, B.** (2012) Modelling the evolutionary dynamics of viruses within their hosts: A case study using high-throughput sequencing. *PLoS Pathog.* **8**, e1002654.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Pacella, R., Harrach, B., Martin, D.P. and Crescenzi, A.** (2005) Characterisation of *Potato virus Y* nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. *Arch. Virol.* **150**, 709-720.
- Faurez, F., Baldwin, T., Tribodet, M., Jacquot E.** (2012) Identification of new *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 948-959.
- Fellers, J. P., Tremblay, D., Handest, M. F. and Lommel, S. A.** (2002) The Potato virus Y (MNR)-N-S Nlb-replicase is the elicitor of a veinal necrosis-hypersensitive response in root knot nematode resistant tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 145-152.
- Fereres, A., Perez, P., Gemenio, C. and Ponz, F.** (1993) Transmission of Spanish pepper-PVY and potato-PVY isolates by aphid (Homoptera, Aphididae) vectors-Epidemiological implications. *Environ. Entomol.* **22**, 1260-1265.
- Fernández, A., Lain, S. and García, J.A.** (1995) RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1327-1332.
- Fernández, A., Guo, H. S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., de Cedrón, M. G. and García, J. A.** (1997) The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4474.
- Gallois, J.-L., Charron, C., Sánchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M.-C., Moretti, A., Ponz, F., Revers F., Caranta C., and German-Retana S.** (2010) Single amino acid changes in the turnip mosaic virus

- viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* **91**:288–293.
- Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C.L., Ellis, N.T.H. and Maule, A.J.** (2004) The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J.* **40**:376–385.
- Gebre Selassie, K., Marchoux, G., Delecalle, B. and Pochard, E.** (1985) Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. *Agronomie* **5**, 621–630.
- Gibbs, A. and Ohshima, K.** (2010) Potyviruses and the digital revolution. *Ann. Rev. Phytopathol.* **48**, 205–223.
- Gibbs, A. J., Ohshima, K., Phillips, M. J. and Gibbs, M. J.** (2008) The prehistory of potyviruses: Their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS One* **3**, e2523.
- Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C.** (2002) Genetic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. *Arch. Virol.* **147**, 363–378.
- Gooding, G. V. and Tolin, S. A.** (1973) Strains of Potato virus Y affecting flue-cured tobacco in the South-eastern United States. *Plant Dis. Rep.* **57**, 200–204.
- Govier, D.A. and Kassanis, B.** (1974) A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology* **61**, 420–426.
- Govier, D. A., Kassanis, B. and Pirone, T. P.** (1977) Partial purification and characterization of *Potato virus Y* helper component. *Virology* **78**, 306–314.
- Hämäläinen, J.H., Watanabe, K.N., Valkonen, J.P.T., Arihara, A., Plaisted, R.L., Pehu, E., Miller, L. and Slack, S.A.** (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 192–197.
- Hernández, G., and Vazquez-Pianzola, P.** (2005) Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech. Dev.* **122**, 865–876.
- Hu, X., Karasev, A.V., Brown, C.J., Lorenzen, J.H.** (2009) Sequence characteristics of *Potato virus Y* recombinants. *J. Gen. Virol.* **90**: 3033–3041.
- Ibaba, J.D. and Gubba A.** (2011) Diversity of *Potato virus Y* isolates infecting solanaceous vegetables in the province of KwaZulu- Natal in the Republic of South Africa. *Crop Protection* **30**:1404–1408.
- Inoue-Nagata, A.K., Oliveira, P.A., Dutra, L.S. and Nagata, T.** (2006) Bidens mosaic virus is a member of the Potato virus Y species. *Virus Genes* **33**, 45–49.
- Janzac, B., Fabre, M.F., Palloix, A. and Moury B.** (2009) Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathol.* **58**: 443–449.
- Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. and Moury, B.** (2010) A point mutation in the polymerase of Potato virus Y confers virulence toward the *Pvr4* resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 823–830.
- Jiang J. and Laliberte J.-F.** (2011) The genome-linked protein VPg of plant viruses —a protein with many partners. *Cur. Opin. Virol.* **1**, 347–354.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C. and Wang, T.** (2007) HC-Pro protein of *Potato Virus Y* can interact with three *Arabidopsis* 20S proteasome subunits *in planta*. *J. Virol.* **81**, 12881–12888.
- Johansen, I.E., Lund, O.S., Hjulsager, C.K. and Laursen, J.** (2001) Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J. Virol.* **75**, 6609–6614.
- Johansen, L.K. and Carrington J.C.** (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **126**, 930 – 938.

- Jones, R.A.C.** (1990) Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol.* **117**, 93–105.
- Kahn, R. P. and Monroe, R. L.** (1963) Detection of the tobacco vein necrosis strain of potato virus Y in *Solanum cardenasii* and *S. andigenum* introduced into the United States. *Phytopathology* **53**, 1356-1359.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71–81.
- Kehoe, M. A. and Jones, R. A. C.** (2011) A proposal to help resolve the disagreement between naming of *Potato virus Y* strain groups defined by resistance phenotypes and those defined by sequencing. *Arch. Virol.* **156**, 2273-2278.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. and Guillet, M.** (1999) Variability of *Potato virus Y* in potato crops in France. *J. Phytopathol.* **147**, 643– 651.
- Kerlan, C.** (2006) *Potato virus Y*. *AAB/CMI Descriptions of Plant Viruses* 414.
- Kyle, M.M. and Palloix, A.** (1997) Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica* **97**, 183-188.
- Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.-L. and Jacquot, E.** (2011) Effect of passage of a *Potato virus Y* isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va*² on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. *Eur. J. Plant Pathol.* **130**, 259–269.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.-P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. and Burgyan, J.** (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**, 2768–2780.
- Latorre, B.A., Flores, V., and Marholz, G.** (1984) Effect of potato virus Y on growth, yield, and chemical composition of flue-cured tobacco in Chile. *Plant Dis.* **68**, 884-886.
- Le Romancer, M., Kerlan, C. and Nedellec, M.** (1994) Biological characterization of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.* **43**, 138-144.
- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. and Carrington, J.C.** (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* **12**: 1046-1051.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J.-F.** (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* **74**, 7730-7737
- Llave, C., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13401–13406.
- López-Moya, J.J., Wang, R.Y. and Pirone, T.P.** (1999) Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J. Gen. Virol.* **80**, 3281–3288.
- Luis-Arteaga, M. and Gil-Ortega, R.** (1986) Biological characterization of PVY as isolated from pepper in Spain. VI Meeting on Capsicum and eggplant, Zaragoza, Spain, October 21–24, 183–188.
- Margaritopoulos J. T., Dovas C. I., Gounaris J., Skouras P. J., Kanavaki O. M., Katis N. I. and Tsitsipis J. A.** (2010) Molecular analysis of the coat protein of *Potato virus Y* isolates in Greece suggests multiple introduction from different genetic pools. *J. Phytopathol.* **158**, 73–80.
- Mascia, T., Finetti-Sialer, M.M., Cillo, F. and Gallitelli, D.** (2010) Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of *Potato virus y* associated with a tomato necrotic disease occurring in Italy. *J. Plant Pathol.* **92**, 131-138.
- Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. and Hataya, T.** (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of *Potato virus Y* correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, **89**, 118-123.
- Merits, A., Guo, D. Y. and Saarma, M.** (1998) VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J. Gen. Virol.* **79**, 3123–3127.

- Merits, A., Guo, D., Jarvekulg, L. and Saarma, M.** (1999) Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replicative complex. *Virology* **263**, 15–22.
- Mestre, P., Brigneti, G. and Baulcombe, D.C.** (2000) An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from potato virus Y. *Plant J.* **23**, 653–661.
- Mestre, P., Brigneti, G., Durrant, M.C. and Baulcombe, D.C.** (2003) Potato virus Y NIa protease activity is not sufficient for elicitation of *Ry*-mediated disease resistance in potato. *Plant J.* **36**, 755–761.
- Montarry, J., Cartier, E., Jacquemond, M., Palloix, A., Moury, B.** (2012) Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *J. Evol. Biol.* **25**, 2242–2252.
- Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V., Moury, B.** (2011) Genetic background matters: a plant–virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 911–920.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E. and Jacquemond, M.** (2002) Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other potyviruses. *J. Gen. Virol.* **83**, 2563–2573.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M.** (2004) Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence towards recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **17**, 322–329.
- Moury, B., Desbiez, C., Jacquemond, M. and Lecoq, H.** (2006) Genetic diversity of plant virus populations: Towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Adv. Virus Res.* **67**, 49–87.
- Moury, B., Caromel, B., Johansen, E., Simon, V., Chauvin, L., Jacquot, E., Kerlan, C. and Lefebvre, V.** (2011) The helper component proteinase cistron of *Potato virus Y* induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **24**, 787–797.
- Moury, B., Simon, V.** (2011) dN/dS-based methods detect positive selection linked to trade-offs between different fitness traits in the coat protein of *Potato virus Y*. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2707–2717.
- Moury, B., Verdin, E.** (2012) Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: A remarkable stasis. *Adv. Virus Res.* **84**, 127–62.
- Moury, B.** (2010) A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 161–168.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and Le Gall, O.** (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiol.* **132**, 1272–1282.
- Nie, X. Z. and Singh, R. P.** (2003) Evolution of North American PVY^{NTN} strain Tu 660 from local PVY^N by mutation rather than recombination. *Vir. Genes* **26**, 39–47.
- Nobrega, N.R. and Silberschmidt, K.** (1944) Sobre una provavel variante do virus « Y » da batatinha que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. *Arq. Inst. Biol.* 307–330.
- Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B.** (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* **183**, 190–199.
- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A. and Caranta, C.** (2002) Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.* **105**, 855–861.
- Patrick, R.M. and Browning, K.S.** (2012) The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: An evolutionary perspective. *Comparative and Functional Genomics* ID287814, 12 pp.
- Peng, Y.-h., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. and Raccach, B.** (1998) Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* **79**, 897–904.

- Pirone, T.P. and Blanc, S.** (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 227-247.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. and Vance, V.B.** (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859–868.
- Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. and Moury, B.** Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Mol. Plant Pathol.* in press, doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00834.x
- Rantalainen, K. I., Eskelin, K., Tompa, P. and Mäkinen, K.** (2011) Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg. *J. Virol.* **85**, 2449-2457.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S. J., Lot, H., Le Gall, O. and Candresse, T.** (2001) Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 804-810.
- Restrepo-Hartwig, M.A. and Carrington, J.C.** (1994) The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J. Virol.* **68**, 2388-2397.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. and Dunez, J.** (1996) Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J. Gen. Virol.* **77**, 1953–1965.
- Robaglia, C. and Caranta, C.** (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* **11**, 40–45.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. and Maule, A.J.** (1998) Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173–181.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. and Lucas, W.J.** (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283–295.
- Rolland, M., Lacroix, C., Blanchard, A., Baldwin, T., Kerlan, C., Jacquot, E.** (2008) *Potato virus Y* (PVY): From its discovery to the latest outbreaks. *Virologie* **12**, 261-273.
- Rolland, M., Kerlan, C. and Jacquot, E.** (2009) The acquisition of molecular determinants involved in *Potato virus Y* necrosis capacity leads to fitness reduction in tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **90**, 244–252.
- Romero, A., Blanco-Urgoiti B., Soto, M., Fereres, A., Ponz, F.** (2001) Characterization of typical pepper isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. *Virus Res.* **79**, 71–80.
- Ross, H.** (1986) Potato breeding—problems and perspectives. *J. Plant Breed.* Suppl 13.
- Rubio, M., Nicolai, M., Caranta, C., Palloix A.** (2009) Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between *pvr2*-eIF4E and *pvr6*-eIF(iso)4E alleles for resistance to pepper vein mottle virus. *J. Gen. Virol.* **90**, 2808-2814.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta C.** (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* **32**, 1067–1075.
- Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L. and Caranta C.** (2005) The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2*-eIF4E gene. *Mol. Gen. Genom.* **274**, 346-353.
- Sacristán, S. and García-Arenal, F.** (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 369–384.
- Sadeghi, M. S., Behjatnia, S. A. A., Masumi, M. and Izadpanah, K.** (2008) Characterisation of a strain of Potato virus Y causing eggplant mosaic in southern Iran. *Austral. Pl. Pathol.* **37**, 79-86.
- Sáenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and García, J.A.** (2002) Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J Virol* **76**, 1922–1931.

- Salaman, R. N. and Le Pelley, R. H.** (1930) Paracrinkle : a potato disease of the virus group. *Proc. R. Soc. Lond.* **106**, 140-75
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. and Carrington, J. C.** (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* **16**, 4049-4059.
- Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. and Foster, G. D.** (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 938-54.
- Schubert, J., Fomitcheva, V., and Sztangret-Wisniewska, J.** (2007) Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J. Virol. Methods* **140**, 66-74.
- Segundo, E., Lesemann, D.E., Martín, G., Carmona, M., Ruiz, L., Cuadrado, I.M., Velasco, L. and Janssen, D.** (2007) *Amaranthus leaf mottle virus*: 3'-end RNA sequence proves classification as distinct virus and reveals affinities within the genus Potyvirus. *Eur. J. Plant Pathol.* **117**, 81–87.
- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V. and Gal-On, A.** (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* **81**, 13135–13148.
- Singh, R. P., Valkonen, J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A. C., Kerlan, C. and Schubert, J.** (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.* **153**, 1-13.
- Smith, K.M.** (1931) Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicator. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **109**, 251-267.
- Solomon-Blackburn, R.M. and Barker, H.** (2001) A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* **86**, 8–16.
- Song, Y.S., Hepting, L., Schweizer, G., Hartl, L., Wenzel, G. and Schwarzfischer, A.** (2005) Mapping of extreme resistance to PVY (*R_{Ysto}*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor. Appl. Genet.* **111**, 879-887.
- Soumounou, Y. and Laliberté, J.-F.** (1994) Nucleic-acid binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **75**, 2567–2573.
- Sudarsono, Woloshuk, S.L., Xiong, Z., Hellmann, G.M., Wernsman, E.A., Weissinger, A.K. and Lommel, S.A.** (1993) Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six *Potato virus Y* (PVY) isolates infecting tobacco. *Arch. Virol.* **132**, 161–170.
- Tavert-Roudet, G., Abdul-Razzak, A., Doublet, B., Walter, J., Delaunay, T., German-Retana, S., Michon, T., Le Gall, O. and Candresse, T.** (2012) The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* **93**, 184–193.
- Tian, Y.-P. and Valkonen, J. P. T.** Genetic determinants of *Potato virus Y* required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene *Ny* in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, in press.
- Torres-Barcelo, C., Martin, S., Daros, J.-A. and Elena, S. F.** (2008) From hypo- to hypersuppression: Effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the tobacco etch potyvirus HC-Pro. *Genetics* **180**, 1039-1049.
- Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. and Jacquot, E.** (2005) Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.* **86**, 2101–2105.
- Van der Zaag, D.E.** (1987) Yield reduction in relation to virus infection. In: de Bokx J.A. and van der Want, J.P.H. (eds) Viruses of potatoes and seed-potato production. Pudoc, Wageningen, pp. 146-150.
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R. and Palkovics, L.** (2007) Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing. *J. Gen. Virol.* **88**, 1005-1015.

- Verchot, J., Koonin, E. V. and Carrington, J. C.** (1991) The 35-KDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a 3rd virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-535.
- Verchot, J., Carrington, J.C.** (1995) Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* **69**, 3668–3674.
- Verchot, J., Herndon, K.L. and Carrington, J.C.** (1992) Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* **190**, 298–306.
- Wei, T. and Wang, A.** (2008) Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J. Virol.* **82**, 12252-12264.
- Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J. Laliberté, J.-F, Hong, J., Nelson, R.S. and Wang, A.** (2010a) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* **84**, 799-809.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C. and Wang, A.** (2010b) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* **6**, e1000962.
- Wittmann, S.H., Chatel, M.G., Fortin, and J.-F. Laliberté.** (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso)4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84–92.
- Yambao, M.L.M., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Takahashi, Y., Nakahara, K.S., and Uyeda, I.** (2008) Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Arch. Virol.* **153**, 105-115.

D. Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans le contexte général de la gestion de la durabilité des résistances végétales aux bioagresseurs. Les études portant sur la durabilité des résistances ont pour objectif principal de proposer aux sélectionneurs et aux agriculteurs des stratégies de développement de variétés efficaces et durables ainsi que des stratégies de déploiement de ces variétés dans l'espace et dans le temps. Pour arriver à cet objectif, il est nécessaire de compléter nos connaissances sur les mécanismes de résistance chez les plantes ainsi que sur les capacités adaptatives des différents pathogènes que l'on souhaite contrôler. Ces connaissances pourront alors être intégrées dans des modèles de gestion des résistances afin de développer de nouvelles stratégies de gestion des résistances adaptées aux besoins des agriculteurs, efficaces et durables. Les objectifs ne sont donc pas seulement de rechercher les résistances qui seraient *a priori* les plus durables mais aussi de préserver la durabilité des résistances dont nous disposons et dont l'efficacité n'est plus à démontrer.

Dans ce contexte, une stratégie très prometteuse pour augmenter la durabilité d'un gène majeur de résistance serait de le combiner à des facteurs génétiques retardant l'évolution du pathogène. L'existence de tels facteurs a été mise en évidence par trois études expérimentales montrant que la durabilité d'un gène majeur de résistance dépendait fortement du fonds génétique dans lequel il était introgressé. En effet, pour ces trois pathosystèmes (plante/virus – oomycète – nématode), l'émergence et/ou la fréquence d'apparition de variants virulents vis-à-vis d'un gène majeur de résistance est augmentée lorsque ce gène est introgressé dans un fonds génétique sensible (résistance qualifiée par la suite de résistance monogénique) et est diminuée (voir abolie) lorsque ce même gène est introgressé dans un fonds génétique partiellement résistant (résistance qualifiée par la suite de résistance polygénique). Toutefois, les facteurs génétiques modulant les fréquences de contournement du gène majeur de résistance ainsi que leurs mécanismes d'action demeurent inconnus.

Identifier et comprendre le fonctionnement de ces facteurs génétiques constitue une première étape essentielle pour proposer aux sélectionneurs des méthodes permettant d'identifier et d'exploiter ces facteurs génétiques. Dans cette optique, le

principal objectif de cette thèse est d'évaluer l'intérêt, pour les généticiens et les sélectionneurs, d'utiliser les résistances polygéniques vis-à-vis des agents pathogènes afin d'en préserver la durabilité à long terme. Dans cette thèse, je me suis intéressée à ces questions dans le cadre particulier de l'interaction piment (*Capsicum annuum*)/*Potato virus Y* (PVY) pour laquelle de nombreux outils (lignées haploïdes doublées de piment, clones viraux de PVY) ainsi que de nombreuses connaissances (déterminants de résistance chez le piment et de pathogénicité chez le PVY) étaient disponibles.

Dans ce contexte, les objectifs de mes travaux de thèse sont :

- Caractériser les mécanismes d'actions impliqués dans la meilleure durabilité de la résistance polygénique par rapport à la résistance monogénique.

- Déterminer par cartographie génétique les facteurs génétiques modulant la fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2*³ chez le piment et les comparer aux facteurs génétiques impliqués dans la résistance partielle.

- Evaluer si les facteurs génétiques affectant la durabilité d'un gène majeur de résistance sont largement répandus parmi les ressources génétiques du piment.

Ces trois objectifs structurent le manuscrit en trois chapitres correspondant à des articles publiés, soumis ou en préparation. Un complément d'information, concernant la validation fonctionnelle d'un gène candidat au QTL majeur affectant la fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2*³, sera apporté dans le chapitre quatre. Pour finir, les principaux résultats ainsi que les perspectives de mon travail seront discutés.

Chapitre I :

Mécanismes d'action des facteurs génétiques augmentant la durabilité de l'allèle de résistance *pvr2³*

Question de recherche: Quels sont les mécanismes d'action des facteurs génétiques impliqués dans la meilleure durabilité de la résistance polygénique (*pvr2³* dans un fonds génétique partiellement résistant) par rapport à la résistance monogénique (*pvr2³* dans un fonds génétique sensible) ?

Stratégie : Tester expérimentalement trois mécanismes hypothétiques :

- (i) L'effet du niveau additionnel de résistance partielle conféré par le fonds génétique.
- (ii) L'augmentation du nombre de mutations nécessaires pour contourner la résistance.
- (iii) Le ralentissement de la sélection des mutants contournant la résistance.

Principaux résultats : Les trois mécanismes ont été validés expérimentalement. Le premier mécanisme explique une grande part de la variation de la fréquence de contournement du gène de résistance *pvr2³* et constitue, par conséquent, un déterminant majeur de la durabilité de la résistance. Le fonds génétique de la plante a également une influence sur le deuxième mécanisme en complexifiant les voies mutationnelles que le virus doit emprunter pour contourner la résistance et sur le troisième mécanisme en ralentissant la sélection des variants viraux les mieux adaptés.

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une publication dans *Molecular Plant Pathology*.(ci-après)

Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown

JULIE QUENOUILLE^{1,2}, JOSSELIN MONTARRY^{1,3}, ALAIN PALLOIX² AND BENOIT MOURY^{1,*}

¹UR407 Pathologie Végétale, INRA, F-84140 Montfavet, France

²UR1052 GAFL, INRA, F-84140 Montfavet, France

³UMR1349 IGEPP, INRA, F-35653 Le Rheu, France

SUMMARY

Genetic resistance provides efficient control of crop diseases, but is limited by pathogen evolution capacities which often result in resistance breakdown. It has been demonstrated recently, in three different pathosystems, that polygenic resistances combining a major-effect gene and quantitative resistance controlled by the genetic background are more durable than monogenic resistances (with the same major gene in a susceptible genetic background), but the underlying mechanisms are unknown. Using the pepper–*Potato virus Y* system, we examined three mechanisms that could account for the greater durability of the polygenic resistances: (i) the additional quantitative resistance conferred by the genetic background; (ii) the increase in the number of mutations required for resistance breakdown; and (iii) the slower selection of adapted resistance-breaking mutants within the viral population. The three mechanisms were experimentally validated. The first explained a large part of the variation in resistance breakdown frequency and is therefore expected to be a major determinant of resistance durability. Quantitative resistance factors also had an influence on the second mechanism by modifying the virus mutational pathways towards resistance breakdown and could also have an influence on the third mechanism by increasing genetic drift effects on the viral population. The relevance of these results for other plant–pathogen systems and their importance in plant breeding are discussed.

INTRODUCTION

Plant breeding for disease resistance has abundantly and successfully exploited single resistance genes with major phenotypic effects. These resistances usually confer efficient protection with low environmental impacts and low production costs. However, the major limit of genetic control is resistance breakdown (RB) resulting from adaptation of the target pathogen. RB usually involves three steps (Moury *et al.*, 2011). The first is the appearance of an adapted mutant in the pathogen population. This mutant further competes with the other genotypes of the patho-

gen population and may accumulate substantially in primary infected plants depending on its competitive ability (step 2). The more competitive the mutant, the higher its probability of transmission to other plants (step 3). RB occurs, sometimes very rapidly after resistance deployment (García-Arenal and McDonald, 2003), when these three steps take place sufficiently frequently and efficiently in pathogen populations. Thus, as major resistance genes have a restricted availability among genetic resources, they should be preserved and used judiciously.

Strategies to increase the durability of genetic resistances have been discussed in several articles (Johnson, 1981; Lindhout, 2002; Parlevliet, 2002; Pink, 2002; Wolfe, 1985) and one of the most interesting is the combination of a major resistance gene with a partially resistant genetic background (quantitative resistance). For a long time hypothesized, the efficiency of this strategy has been validated recently for three highly different plant–pathogen systems. Palloix *et al.* (2009) showed, in the pepper (*Capsicum annum*)–*Potato virus Y* (PVY) system, that a major resistance gene (*pvr2³*), which proved to be very poorly durable when introgressed in a susceptible cultivar, could become highly durable in the laboratory, as well as in field conditions, when introgressed into a partially resistant genetic background. The higher durability of a polygenic resistance, composed of one major gene combined with partial resistance quantitative trait loci (QTLs) in the genetic background, relative to a monogenic resistance, with the same major gene in a susceptible background, was confirmed for a plant–fungus interaction with the oilseed rape (*Brassica napus*)–*Leptosphaeria maculans* system (Brun *et al.*, 2010). Moreover, Fournet *et al.* (2012) showed, for the potato cyst nematode *Globodera pallida*, that the genetic background in which a major resistance factor is introgressed plays an important role in the durability of the resistance. These results are very encouraging for plant breeders, and their extrapolation to other pathosystems will gain from exploring the mechanisms responsible for this enhancement in durability.

Three mechanisms could explain how a quantitative resistance can increase the durability of a major resistance gene.

- The additional quantitative resistance level conferred by the genetic background could reduce the multiplication of the pathogen and its probability to accumulate mutations

*Correspondence: Email: benoit.moury@avignon.inra.fr

responsible for RB (Brun *et al.*, 2010). This 'resistance efficiency' mechanism would act on the first step of RB.

- The number and nature of mutations required by the pathogen for RB also condition the probability of appearance of adapted variants. Indeed, Harrison (2002) proposed that the combination of several genes was more durable because the pathogen requires more mutations to break down the resistance. Moreover, the nature (transition or transversion) and the fitness cost of these mutations are also involved in the capacity of RB pathogens to appear and to accumulate (Ayme *et al.*, 2007; Fabre *et al.*, 2009; Janzac *et al.*, 2010). These mechanisms would act on the first and second steps of RB.
- Finally, the selection pressure exerted by a quantitative resistance on pathogen populations could be lower than that exerted by a major resistance gene, slowing down the emergence of adapted variants, as hypothesized by several authors (Keller *et al.*, 2000; Kliebenstein and Rowe, 2009; Knott, 1988; Palloix *et al.*, 2009). This mechanism would act on the second and third steps of RB.

In order to explain how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown, we tested these three mechanisms using the *C. annuum*–PVY system.

RESULTS

Relationship between the breakdown of the *pvr2³* resistance gene and PVY accumulation

To measure the effect of the first mechanism ('resistance efficiency'), Perennial and a set of 15 doubled haploid (DH) lines carrying the *pvr2³* resistance allele, but segregating for the genetic background, were tested for relationships between the rate of *pvr2³* RB and virus accumulation in plants. The breakdown frequency of *pvr2³* was estimated after inoculation with a recombinant PVY clone, the 'CI chimera' (Montarry *et al.*, 2011). The 'CI chimera' is not infectious *per se* in plants carrying the *pvr2³* gene, i.e. in these plants, mutants of the 'CI chimera' possessing single nonsynonymous substitutions in the viral protein genome-linked (VPg) cistron were detected, but not the 'CI chimera' itself. In addition, these substitutions were shown to determine the breakdown of *pvr2³* (Ayme *et al.*, 2006). The 'CI chimera' showed a particularly high capacity of RB (Montarry *et al.*, 2011). Indeed, 5 weeks after inoculation, the plants in which PVY was detected at the systemic level correspond to RBs (Montarry *et al.*, 2011). Three independent replicates of the test were performed and a high correlation ($0.88 < \rho_{\text{Spearman}} < 0.96$; $P < 0.001$) was observed between them. Among the 16 lines, *pvr2³* breakdown frequency varied from 0% to 100%, with highly significant differences between lines (Fig. 1, Table S2, see Supporting Information). The *pvr2³* breakdown frequency observed with another PVY clone

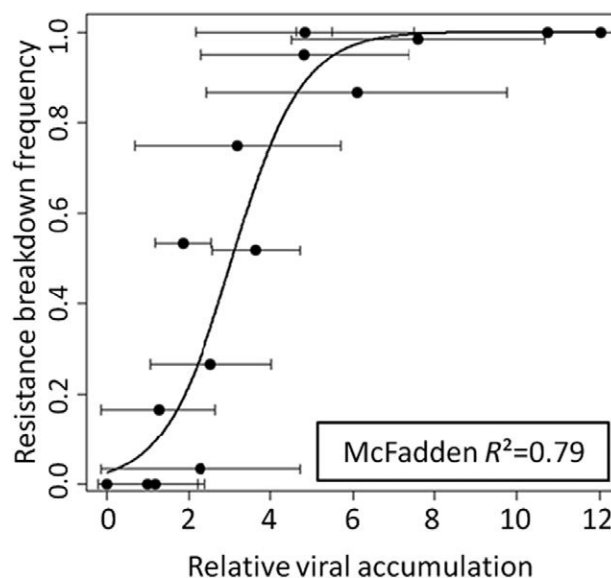


Fig. 1 Relationship between resistance breakdown frequency and viral accumulation among Perennial and 14 doubled haploid (DH) lines issued from the F_1 hybrid between *Capsicum annuum* genotypes Perennial and Yolo Wonder and carrying the *pvr2³* major resistance gene. The evaluation of resistance breakdown frequency was performed with 60 plants inoculated with *Potato virus Y* (PVY) 'CI chimera', and the evaluation of viral accumulation was performed by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) on 10 plants inoculated with a variant of 'CI chimera' breaking down *pvr2³* (mutant 'CI chimera VPg-N'). Black dots correspond to experimental values and bars correspond to the standard deviation for each value. The full line corresponds to the logistic regression model fitted to the data.

(SON41p) in the 16 lines was highly correlated with that observed with the 'CI chimera' ($\rho_{\text{Spearman}} = 0.91$; $P < 0.001$), but eight of the lines showed a very low (<10%) breakdown frequency (data not shown), which decreased the accuracy of correlation analysis between RB and PVY accumulation.

A single mutant of the 'CI chimera', named 'CI chimera VPg-N', was used to measure the virus accumulation at the systemic level in the lines by quantitative double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). The 'CI chimera VPg-N' differs from the 'CI chimera' by a single nucleotide (changing an aspartic acid to an asparagine at position 119 of the VPg), allowing the breakdown of *pvr2³*. This variant permits the elimination of the effect of the *pvr2³* resistance in order to reveal the quantitative resistance caused by the genetic background. For all DH lines, 100% infection was observed after inoculation with 'CI chimera VPg-N', but the virus could not be detected in Perennial by DAS-ELISA. The 'CI chimera' and 'CI chimera VPg-N' are much more aggressive than SON41p. For DH285, all plants died rapidly and no virus accumulation value could be obtained for this plant genotype. For the 14 other lines, significant differences in virus accumulation (Kruskal–Wallis test; $\chi^2 = 87.3$; $P < 0.001$; Table S2), with means in the range 1–12, were observed between DH lines. Two

independent replicates of the virus accumulation test were performed and a high correlation was observed between them ($\rho_{\text{Spearman}} = 0.77$; $P = 0.0019$).

The effect of the factor 'viral accumulation' on the binomial response variable 'number of plants for which *pvr2³* was broken down' was tested with a one-way generalized linear model using a logit link function. It was highly significant ($P < 10^{-5}$) and the model fit was highly satisfactory (McFadden $R^2 = 0.79$; Fig. 1) (McFadden, 1973). Overall, this analysis reveals a strong correlation between viral accumulation and RB frequency across pepper genotypes.

Selection of PVY variants breaking down the polygenic resistance

To evaluate the effect of the second and third mechanisms potentially involved in RB ('number of mutations' and 'selection pressure' mechanisms), we compared two pepper lines: DH285, carrying *pvr2³* and a susceptible genetic background, further named the 'monogenic resistance', and Perennial, carrying *pvr2³* and a partially resistant genetic background, further named the 'polygenic resistance'.

Because direct mechanical inoculation of Perennial (polygenic resistance) with the PVY SON41p clone did not succeed in RB (Palloix *et al.*, 2009), we performed graft inoculations that increase the inoculum pressure, as a permanent inoculum is multiplied in the susceptible Yolo Wonder (YW) rootstock and loaded into the scions of DH285 or Perennial. Six weeks after inoculation, all YW rootstocks showed severe mosaic symptoms and a large proportion of DH285 (monogenic resistance) scions showed a combination of mosaic and necrotic symptoms. By contrast, all Perennial scions were symptom free. DAS-ELISA tests revealed that 72% (23/32) of DH285 scions and 0% (0/91) of Perennial scions were infected. The VPg cistron of PVY populations present in infected DH285 scions was sequenced and each PVY variant carried one nonsynonymous nucleotide substitution in the VPg cistron compared with the initial SON41p inoculum. Four different variants were found and named G, K, N and C according to the amino acid substitutions carried in the VPg: serine to glycine substitution at amino acid position 101, threonine to lysine substitution at position 115, aspartic acid to asparagine substitution at position 119 and serine to cysteine substitution at position 120, respectively. Ayme *et al.* (2006) demonstrated that each of these four substitutions was sufficient for the breakdown of *pvr2³*.

Three months after inoculation, two scions of Perennial showed a single chlorotic lesion on a single leaf. Leaf tissues surrounding the chlorotic lesions in these two symptomatic leaves were used as inoculum for direct mechanical back-inoculation to 20 Perennial plants each, which were demonstrated to be 100% infected at 14 days post-inoculation (dpi). The VPg cistron of PVY populations present in these Perennial plants was sequenced and each PVY variant was shown to carry one distinct pair of nonsynonymous

nucleotide substitutions in the VPg cistron compared with the initial SON41p inoculum. One mutant carried the same substitutions as those present in mutants G and K, and the other mutant carried the same substitutions as those present in mutants K and N. In summary, all of the 23 plants carrying the monogenic resistance were broken down by single VPg mutants, whereas two of two plants carrying the polygenic resistance were broken down by double VPg mutants, a very significant difference (Fisher's exact test, $P = 0.003$). These two pairs of nucleotide substitutions were introduced into the SON41p cDNA clone by directed mutagenesis, producing the two double mutants GK and KN.

Capacity of double and single VPg mutants of PVY to infect plants with the polygenic resistance

In order to explain why only double VPg mutants were successful in breaking down the polygenic resistance in the graft inoculation experiment, we tested the ability of the two double mutants (GK and KN) and of the corresponding single mutants G, K and N to infect, at the systemic level, Perennial plants carrying the polygenic resistance after direct mechanical inoculation with calibrated inocula (Ayme *et al.*, 2006). The capacity to infect Perennial plants varied largely according to the mutant considered. The single mutant K and the two double mutants GK and KN had similar infectivities, with 46% (21/46), 41% (19/46) and 43% (13/30) of systemic infection, respectively. The single mutants G and N were significantly less infectious ($P < 0.001$, Fisher's exact test), with 9% (4/46) and 3% (1/29) of infected plants, respectively. By contrast, all five mutants infected 100% (25 of 25) of DH285 plants carrying the monogenic resistance.

Competitiveness of PVY variants in susceptible and monogenically or polygenically resistant plants

The competitiveness of the two double mutants KN and GK against each of the corresponding single mutants (G, K and N) was evaluated after co-inoculation to susceptible plants (YW), to plants carrying the monogenic resistance (DH285) and to plants carrying the polygenic resistance (Perennial). To compare the competitiveness of the co-inoculated mutants, the ratio of the number of plants in which each mutant was detected singly by derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) analysis was compared with the result expected if the two viruses had equal fitnesses, i.e. a 1:1 ratio identical to the inoculum composition.

In the susceptible YW plants, there was no difference in competitiveness between mutants KN and K, or between KN and N, as the number of plants infected by each mutant was not significantly different from an expected 1:1 ratio (Fig. 2). For competition GK vs. K, the single mutant was significantly more competitive than the double mutant. In contrast, for competition GK vs. G, the double mutant showed a higher competitiveness than the single mutant. In the monogenic resistance (DH285), there was no

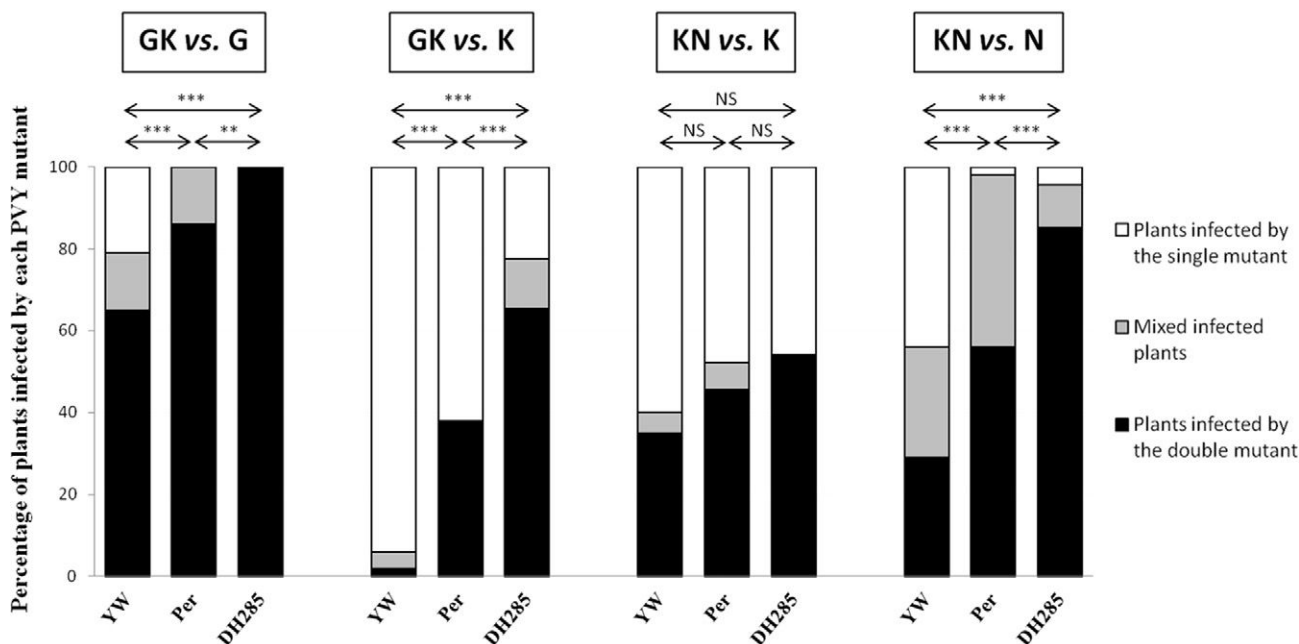


Fig. 2 Competitiveness of double viral protein genome-linked (VPg) mutants of *Potato virus Y* (PVY) SON41p against the two corresponding single mutants in the susceptible pepper genotype (Yolo Wonder, YW) and in pepper genotypes carrying a polygenic (Perennial, Per) or monogenic (DH285) resistance. For each competition, 46–50 plants were inoculated with an inoculum composed of a 1:1 ratio between the two PVY mutants. The percentages of plants infected by single mutant, double mutant or both were assessed by derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) analysis (Table S1, see Supporting Information). Symbols ** and *** within the histogram bars correspond to significantly different distributions between virus competitors (single versus double mutant) within each plant genotype, compared with the inoculum ratio (1:1) at the 1% and 0.1% type I error thresholds (Fisher's exact test). Mixed-infected plants (in grey) were excluded from this analysis. Symbols **, *** presented above the histogram bars correspond to significant differences between plant genotypes for the distributions of plants infected by single mutant, double mutant or mutant mixture at the 1% and 0.1% type I error thresholds (Fisher's exact test). NS, no significant differences ($P > 5\%$).

difference in competitiveness between mutants KN and K. For the other three competition experiments, the double mutants showed a higher competitiveness than the corresponding single mutants (Fig. 2). In the polygenic resistance (Perennial, Per), there was no significant difference in competitiveness between mutants KN and K (as observed in the other two plant genotypes) or between mutants GK and K. For competitions GK vs. G and KN vs. N, the double mutants were significantly more competitive than the single mutants (Fig. 2). Similar statistical results were obtained when taking into account only single-infected plants and when half of the mixed-infected plants were grouped with plants infected by each PVY variant.

The outcome of the competitions was also compared between the monogenic and polygenic resistances. In competition KN vs. K, there was no difference in competitiveness between mutants, either in the polygenic or monogenic resistance. For the other three competitions (i.e. GK vs. G, GK vs. N and KN vs. N), one of the mutants was more competitive than the other in at least one of the two resistant plant genotypes, and we analysed the virus frequencies in each plant population in order to compare the speed of selection of the fittest mutant between the two resistant genotypes. For this, we distinguished between plants in which the

most competitive mutant (the double mutant in all cases) only was detected by dCAPS and the other plants (i.e. those in which both mutants or the single mutant only was detected). Indeed, in mixed-infected plants, selection in favour of one or the other variant had not yet occurred and, for plants in which only the less competitive single mutant was detected, the effect of genetic drift exceeded that of selection. In contrast, for plants in which only the more competitive double mutant was detected, we expected that selection was the major evolutionary force that had acted on the virus population. For all three competitions, these comparisons revealed a significantly higher frequency of the fittest variant among monogenically resistant plants than among polygenically resistant plants (Fig. 2). Similar results were obtained when half of the mixed-infected plants were grouped with plants infected by each variant. Among the susceptible YW plants, the double mutant showed a lower frequency than among the two resistant genotypes, for these three competitions.

DISCUSSION

The durability of major resistance genes has been shown to be highly dependent on the genetic background of the host plant in

virus–plant, fungus–plant and nematode–plant interactions (Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012; Palloix *et al.*, 2009). The present work aimed to highlight how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. We examined three different mechanisms that could be involved: (i) the effect of the additional quantitative resistance level conferred by the genetic background; (ii) the alteration in the number and/or nature of mutations required for RB; and (iii) the speed of selection of adapted RB mutants within the virus population. Here, we were interested mostly in the first two steps of RB (i.e. the infection of resistant plants by a virus variant), and plant to plant dispersion of virus variants was not studied. Nevertheless, the appearance and selection of RB variants are two crucial stages without which the third (dispersion of variants) does not arise.

The strength of the resistance explains most of the variations in *pvr2³* RB

In order to test the effect of the quantitative resistance (conferred by the plant genetic background) on the capacity of PVY to overcome the *pvr2³* gene, we tested Perennial and 15 DH lines carrying *pvr2³*, but segregating for the genetic background. These lines were tested for two different traits: the *pvr2³* RB frequency (with PVY 'CI chimera') and the virus accumulation (with PVY 'CI chimera VPg-N'). In all DH lines carrying *pvr2³*, the observed differences resulted from the effect of genetic factors present in the genetic background. The use of a *pvr2³*-breaking PVY mutant (PVY 'CI chimera VPg-N') to measure virus accumulation enabled us to free ourselves from the effect of *pvr2³*. Indeed, the single amino acid change in 'CI chimera VPg-N' (compared with 'CI chimera') restored the interaction between the VPg protein of the virus and the eIF4E protein of the plant (coded by *pvr2³*), resulting in *pvr2³* breakdown (Charron *et al.*, 2008).

We observed significant differences in viral accumulation and RB frequency between the 15 lines (accumulation data were not available for DH285, Table S2). In addition, the RB frequency was highly correlated with the accumulation of the *pvr2³*-breaking PVY mutant, which depends on the quantitative resistance level caused by the plant genetic background (Fig. 1). A decrease in virus accumulation corresponds to a decrease in virus replication in the plant and, consequently, to a decrease in the probability of appearance of mutations in the virus genome, including the RB mutations. In turn, a lower probability of appearance of RB mutations would decrease the frequency of *pvr2³* breakdown. This mechanism could explain the higher or lower RB frequency between DH lines if *pvr2³* does not confer an extreme resistance and if the RB mutants appear in these lines but not in the inoculum used to inoculate these plants. Accordingly, Montarry *et al.* (2011) provided evidence that a PVY population which does not carry any RB mutation was able to accumulate slightly, even at the systemic level, in plants carrying *pvr2³* resistance. Moreover, the data of

Montarry *et al.* (2011) also suggested that the RB mutants appeared in the *pvr2³* plants and not in the initial inoculum. In polygenically resistant plants (*pvr2³* in a partially resistant genetic background), the quantitative resistance controlled by the genetic background added to the incomplete effect of *pvr2³*, and can be expected to decrease the RB frequency and thus to enhance the durability of resistance.

A more complex mutational pathway is required to break down the *pvr2³* resistance in a polygenic background

Seven single-nucleotide nonsynonymous substitutions in the VPg cistron of SON41p (including those present in mutants G, K and N) allow the breakdown of the monogenic resistance (Ayme *et al.*, 2006; Montarry *et al.*, 2011). In contrast, only two mutants, showing combinations of two of the previous VPg mutations, infected plants carrying the polygenic resistance after graft inoculation with SON41p. We hypothesized that two VPg mutations would need to be combined in SON41p for breakdown of the polygenic resistance. To test this hypothesis further, we measured the capacity of the two double mutants (GK and KN) and the three corresponding single mutants (G, K and N) to infect plants with the monogenic or polygenic resistance. Although mutants K, KN and GK, sharing the mutation corresponding to mutant K, were relatively well adapted to the polygenic resistance with more than 40% of infection, the other two mutants (G and N) had a much lower infectivity (less than 10% of infection). However, these five mutants infected 100% of plants with the monogenic resistance. This suggests that the fitness threshold required by the virus to infect the polygenic resistance is higher than that required to infect the monogenic resistance, which consequently reduces the possibilities of breakdown of the polygenic resistance, as observed for mutants G and N, which were only able to infect efficiently the monogenic resistance.

There were no significant infectivity differences between the K single mutant and the two double mutants GK or KN, questioning why mutant K was not observed in plants carrying the polygenic resistance. The nature of the nucleotide substitution corresponding to these PVY mutants and the relative competitiveness of the double and single mutants provide a plausible explanation. Indeed, mutants G and N required a transition to appear, whereas mutant K required a transversion and, in PVY, transitions are on average five to eight times more frequent than transversions (Ayme *et al.*, 2006). As a consequence, the emergence of mutant N occurred in 70% of plants carrying the monogenic resistance (Montarry *et al.*, 2011), even though it has a lower competitiveness than mutant K. In plants with the polygenic resistance, virus multiplication is reduced and the occurrence of mutations in the virus population is decreased accordingly (i.e. first mechanism). Consequently, compared with the monogenic resistance, a smaller

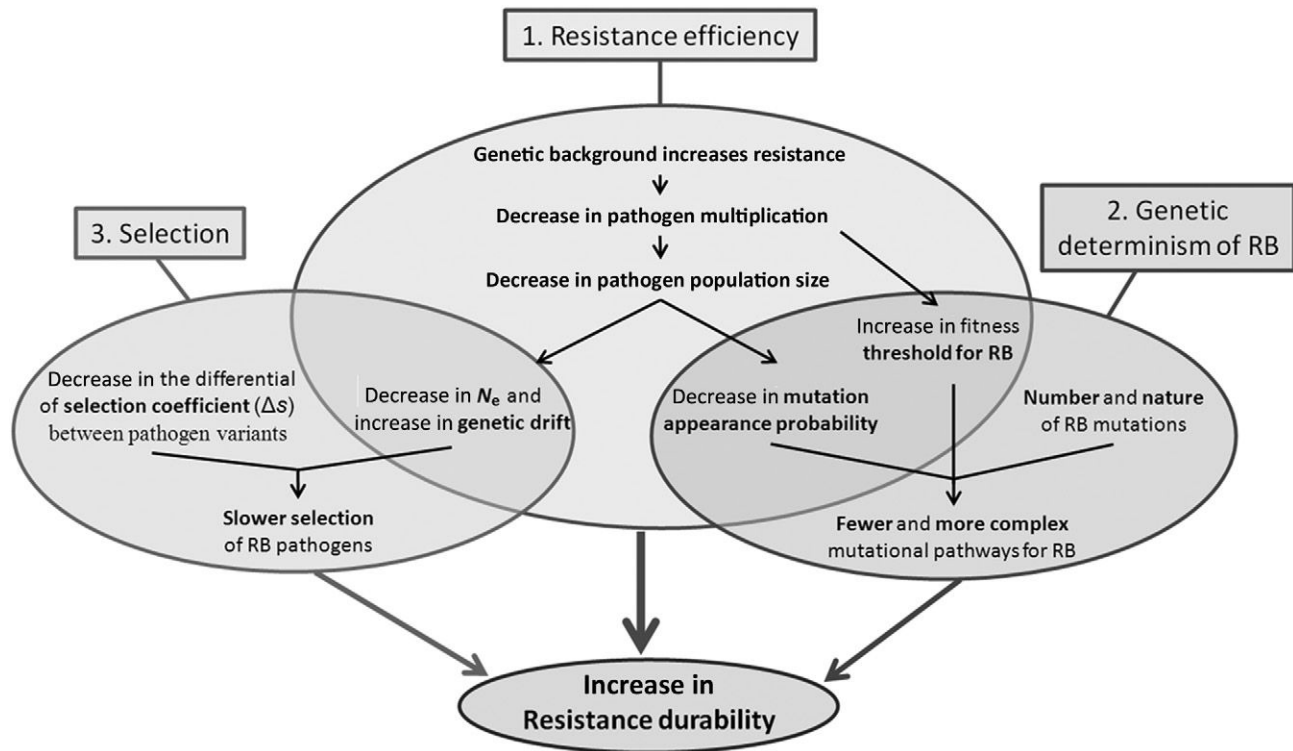


Fig. 3 Effect of the quantitative resistance conferred by the genetic background on the durability of a major resistance gene. The scheme represents the three mechanisms shown to be involved in the higher durability of polygenic relative to monogenic resistances and the hypothetical relationships between these mechanisms. N_e , effective population size; RB, resistance breakdown or resistance breaking; Δs , difference in selection coefficients between pathogen variants.

number of RB mutational events are expected, especially for those involving a transversion, such as mutant K. Then, for the two double mutants GK and KN, the transitions corresponding to mutants G or N probably occurred as a first step. These first mutations conferred a low level of adaptation to the polygenic resistance, which subsequently favoured the appearance of the second, less likely, transversion (that present in mutant K), which conferred a higher level of adaptation to the polygenic resistance and a higher competitiveness (Fig. 2).

To summarize, we have shown that only the fittest RB mutants can infect the polygenic resistance, whereas all RB mutants can infect the monogenic resistance. Thus, in the polygenic resistance, the set of resistance-breaking mutations is reduced. The only way to reconcile all our experimental data and to explain why the K mutant was not observed in the polygenic resistance is to take into account the frequency of appearance of each mutant, which depends on both the nature of the RB mutation (transition or transversion) and the level of host resistance (by reducing virus replication and the mutation probability) (Fig. 3). Taken together, these results indicate that the larger number of mutations observed in the polygenic resistance is the consequence of the genetic determinism of RB, including the effect of RB mutations on virus fitness. Consequently, this mechanism is clearly specific to

the plant genotype–virus genotype interaction considered, and is barely predictable.

In our work, only the mutations in the VPg cistron were considered, but hypothetical mutations in other regions of the viral genome may also affect the adaptation to the polygenic resistance. Such additional mutation(s) were suspected by Palloix *et al.* (2009) in experimental evolution in field conditions, but no evidence of such events occurred in serial inoculations in the laboratory. The occurrence of such additional mutations would also argue in favour of a higher mutational distance to breakdown in a polygenic resistance context.

Selection of adapted RB mutants by the polygenic resistance is slower than by the monogenic resistance

To compare the selection pressure exerted by the monogenic and polygenic resistances, we initially planned to co-inoculate plants with mixtures of PVY variants carrying or not carrying the RB mutations and to further check the composition of the PVY populations. This strategy proved to be inefficient because the PVY variant (SON41p) which did not carry RB mutations was rapidly counter-selected and could not be retrieved from the viral populations in both types of plants (Ayme *et al.*, 2006 and data not

shown). Consequently, we used the double and single VPg mutants which showed smaller differences in competitiveness as tools to quantify the selection pressure exerted by both monogenically and polygenically resistant genotypes. Competition results showed that the fixation of the fittest variant was less frequent in the polygenic than in the monogenic resistance for the three competitions in which the double mutant was more competitive than the single mutant in the monogenic resistance. In the fourth competition (KN vs. K), in which there was no difference in competitiveness between the mutants, we did not observe differences between the host genotypes for the selection of viral mutants (Fig. 2).

These differences in competitiveness between PVY variants in the different plant genotypes could result from differences in infectivity and/or in the following steps of plant colonization by the viruses (virus multiplication, cell-to-cell or systemic movements).

The speed of fixation of the fittest mutants depends on the difference in their selection coefficient from that of other mutants (Δs) and on the action of genetic drift, which is influenced by the effective population size N_e . The effect of genetic drift on the selection of RB mutants could be all the more significant as several articles have shown that N_e can be very small for plant RNA viruses (usually < 10) and that genetic drift could be important in virus evolution (French and Stenger, 2003; Sacristán *et al.*, 2003; Zwart *et al.*, 2011). This is also the case for the infection of susceptible YW pepper plants with PVY (Fabre *et al.*, 2012), and N_e can be expected to be even smaller in more resistant pepper genotypes. The value of the product $N_e \times \Delta s$ determines whether the viral population will be mainly under the influence of selection or of genetic drift (Charlesworth, 2009; Crow and Kimura, 1970; Fraser, 1972), i.e. the greater $N_e \times \Delta s$, the greater the effects of selection. Both N_e and Δs are likely to vary simultaneously between the monogenic and polygenic resistances. The quantitative resistance caused by the plant genetic background reduces PVY accumulation and N_e , potentially increasing genetic drift and therefore weakening the effectiveness of selection. However, it is not presently possible to disentangle the effects of reduced N_e or reduced Δs on the slower fixation of the double mutants in the polygenic resistance. Our results show that a quantitative resistance can reduce the selection pressure exerted by a major resistance gene.

Relationships and hierarchy between the three mechanisms involved in the higher durability of the polygenic resistance

Altogether, these results allow us to estimate the relative contribution of the three mechanisms involved in the higher durability of the polygenic resistance and to suggest a model of the links between them (Fig. 3). We have shown that a large part of the

observed variation in breakdown frequency can be explained by the factor 'viral accumulation', which depends on the quantitative resistance level caused by the genetic background (first mechanism). We assume that this mechanism has a direct effect on the risk of appearance of RB variants, but also on the two other mechanisms involved in resistance durability. Indeed, the combined effect of resistance efficiency and of the number and nature of RB mutations complicates the mutational pathways responsible for RB in the polygenic resistance. Moreover, the selection of adapted RB mutants observed in the polygenic resistance could also be partly compromised by a lower effective population size (N_e) and thus enhanced genetic drift.

The possibility of generalizing the latter mechanism depends on the relative contributions of the genetic drift (N_e) and differential selection coefficient (Δs). Indeed, if Δs is the most important factor, it is certainly specific to the plant–pathogen interaction and cannot be general. In contrast, if N_e is the prime factor, it is a direct consequence of the resistance efficiency conferred by the genetic background (Fig. 3), and is consequently as general as the first mechanism. It will consequently be important to estimate the relative contributions of the genetic drift (N_e) and differential selection coefficient (Δs) to the decrease in selection of adapted PVY variants.

The two effects of the host genetic background on the probability of appearance of RB mutants and on the speed of fixation of these mutants can be expected to apply in many plant–pathogen systems. Indeed, most major resistance genes do not completely abolish the multiplication of pathogens and may be reinforced by genetic factors, further reducing pathogen multiplication (Kang *et al.*, 2005). In contrast, the RB mutation pathways remain specific to molecular interactions between plant resistance factors and pathogen pathogenicity factors.

Quantitative resistance factors are widespread among genetic resources and their introgression into cultivars are easier and easier. Consequently, it seems judicious for breeders to associate major resistance genes with QTLs that reduce pathogen multiplication and decrease the risks of appearance of pathogen RB variants.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant and virus material

All pepper genotypes were *C. annuum* inbred lines. YW (allele *pvr2*⁺) is susceptible to PVY, whereas Perennial carries the *pvr2*³ major resistance allele plus three QTLs conferring partial resistance to PVY (Caranta *et al.*, 1997). The three QTLs of Perennial are involved in symptom expression (area under the disease progress curve, AUDPC) and explain approximately 30% of the phenotypic variation.

Fifteen DH lines issued from the F₁ hybrid (Perennial × YW) were used. All DH lines were confirmed to be homozygous for the *pvr2*³ allele by genotyping with a tetraprimer amplification refractory mutation

system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) marker which targets single-nucleotide polymorphism (SNP) signatures differentiating *pvr2⁺* from *pvr2³* (Rubio *et al.*, 2008). These 15 DH lines were chosen on the basis of their variable ability to select RB PVY variants obtained from a preliminary phenotypic test, as indicated below. The DH line DH285 was chosen to represent the monogenic resistance as it carries the *pvr2³* allele in a susceptible genetic background (susceptibility alleles at the three known QTLs) (Palloix *et al.*, 2009).

The PVY infectious clones and mutants were derived from isolates SON41p and LYE84.2 (Montarry *et al.*, 2011). SON41p infects YW, but is not infectious *per se* in Perennial and DH lines which carry *pvr2³* (Ayme *et al.*, 2006). Five SON41p mutants, named G, K, N, GK and KN according to the amino acid substitutions carried in the VPg cistron, were used in this study. Mutants G, K and N carry single-nucleotide substitutions corresponding to the serine to glycine substitution at amino acid position 101 of VPg, the threonine to lysine substitution at amino acid position 115 of VPg and the aspartic acid to asparagine substitution at amino acid position 119 of VPg, respectively. Each of these three substitutions was shown to be sufficient for the breakdown of *pvr2³* (Ayme *et al.*, 2006; Palloix *et al.*, 2009). Mutants GK and KN carry simultaneously the VPg mutations present in mutants G and K or K and N, respectively. For the evaluation of RB frequencies in Perennial and the 15 DH lines, we used the 'CI chimera', which was obtained by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* between PVY clones SON41p and LYE84.2, and was chosen for its greater ability to break down the *pvr2³* resistance relative to the parental clone SON41p (Montarry *et al.*, 2011), allowing a more precise comparison with PVY accumulation data. The 'CI chimera' is identical to SON41p, except that its CI cistron was substituted by that of LYE84.2. Both PVY clones carry identical VPg cistrons, the virus genome region directly involved in *pvr2³* RB. They were not infectious *per se* in plants carrying *pvr2³*, and they showed the same distributions of RB mutations when inoculated to HD285 plants carrying *pvr2³* (Montarry *et al.*, 2011).

To evaluate the level of quantitative resistance controlled by the plant genetic background, we used a single-nucleotide mutant of the 'CI chimera' carrying the same VPg mutation as that of mutant N (named 'CI chimera VPg-N'), which conferred the breakdown capacity towards the *pvr2³* resistance gene.

Measurement of RB frequency

The breakdown frequency of *pvr2³* was tested in a climate-controlled room after mechanical inoculation of Perennial and the 15 DH lines with the 'CI chimera'. Inoculum was obtained after virus propagation in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi plants. Five grams of Xanthi leaves showing PVY symptoms were crushed in 25 mL of 0.03 M phosphate buffer (pH 7.0) supplemented with 2% (w/v) diethyldithiocarbamate, 400 mg of active charcoal and 400 mg of carborundum. Sixty pepper seedlings with two expanded cotyledons (2–3 weeks after sowing) per genotype were inoculated mechanically on their cotyledons. At 38 dpi, all plants with visible symptoms were considered to be infected by PVY. Plants without symptoms were submitted to virus detection by DAS-ELISA, as described by Legnani *et al.* (1995). In these conditions, every systemic plant infection has been shown previously to result from the occurrence of one RB mutation in the VPg cistron (Montarry *et al.*, 2011). Thus, for each pepper line, the RB frequency was calculated from the ratio of the number

of systemically infected plants to the total number of inoculated plants ($n = 60$). This test was repeated twice.

In addition, 32 DH285 plants and 91 Perennial plants were grafted onto YW susceptible rootstocks and, 1 week later, the rootstocks were inoculated with SON41p. PVY detection in the resistant scions was performed from 6 weeks to 3 months after inoculation by DAS-ELISA, as described by Legnani *et al.* (1995). The sequence of the VPg cistron of PVY populations in ELISA-positive plants was determined as described in Moury *et al.* (2004).

Estimation of viral accumulation

To evaluate the level of quantitative resistance caused by the genetic background, we inoculated mechanically Perennial and the 15 DH lines with PVY 'CI chimera VPg-N', which is infectious towards *pvr2³* resistant plants and therefore reveals the quantitative resistance controlled by the genetic background. The virus accumulation was evaluated at 36 dpi by DAS-ELISA using a dilution range of PVY-infected plant extracts as described in Ayme *et al.* (2006), i.e. relative to a common reference sample incorporated in each ELISA plate. This test was repeated once.

Measurement of virus competitiveness

The relative competitiveness of single and double VPg mutants of SON41p was measured in the monogenically resistant genotype DH285 and in the polygenically resistant genotype Perennial. Four different competition experiments were performed between pairs of viruses including a double mutant and one or the other corresponding single mutant (GK vs. G or K and KN vs. K or N). Inocula were obtained by independent propagation of each virus in *N. tabacum* cv. Xanthi. Crude extracts from infected Xanthi leaves were calibrated by DAS-ELISA (Ayme *et al.*, 2006) and mixed in a 1:1 ratio to mechanically inoculate 50 seedlings per genotype and per competition. Plants were kept in a climatic room and, at 34 dpi, total RNAs were extracted from pools of three leaves from each inoculated plant with the Tri-Reagent kit (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). These RNAs were used as template to amplify the central part of the VPg cistron (from position 5930 to position 6168), and the competitiveness of the PVY variants was analysed using dCAPS analysis, as described in Neff *et al.* (1998). Oligonucleotide primers and restriction endonucleases were used according to the genomic sequences of the PVY mutants to be detected (Table S1, see Supporting Information). Two dCAPS markers were used for each competition experiment, one corresponding to the single mutant and the other to the double mutant. After 2.5% agarose gel electrophoresis, plants were classified into three categories depending on the observation of cleaved or uncleaved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products (presence of one or the other PVY mutant), or both (mixture of the two mutants).

We measured virus competitiveness as the capacity of the virus to become predominant, according to the dCAPS results, in a population of inoculated plants. Therefore, this reflects the result of competitions occurring at all steps of plant infection, from the inoculation process to plant colonization by the virus. Accordingly, virus competitiveness between pairs of variants was tested by comparing the relative proportion of single and double mutants in each plant genotype with that of the initial inoculum ratio (1:1) (Fisher's exact test) omitting mixed-infected plants. Similar

Fisher's exact tests were performed after grouping half of the mixed-infected plants with plants infected by each PVY variant.

We also investigated the dynamics of the competition process between plant genotypes by comparing, using Fisher's exact tests, the proportion of plants infected by the fittest mutant with the proportion of the two other types of plant (mixed-infected and infected by the less competitive mutant). In other words, we compared the proportion of plants in which the selection had acted on the virus population (plants infected by the fittest variant) with the proportion of plants in which selection had not yet occurred (mixed-infected plants) or in which genetic drift effects exceeded selection effects (plants infected by the less competitive variant). All the statistical analyses were performed with R software (<http://www.r-project.org/>).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank V. Simon, G. Nemouchi, B. Savio and P. Mistral for technical assistance. We acknowledge Dr Frédéric Fabre for useful discussions about the present work and for help with statistical analyses. This work was financially supported by the Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS, French Ministry of Agriculture and Fisheries), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Pôle Européen d'Innovation Fruits et Légumes (PEIFL) and the Région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA), with the contribution of the seed companies Gautier Semences, Clause Vegetable Seeds, Vilmorin SA, Rijk Zwaan and Sakata Vegetables Europe.

REFERENCES

- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A. and Moury, B. (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of *Potato virus Y* confer virulence on the *pvr2*³ resistance in pepper. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 557–563.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B. (2007) Molecular dissection of the *Potato virus Y* VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* **88**, 1594–1601.
- Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. and Andrivon, D. (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* **185**, 285–299.
- Caranta, C., Palloix, A., Lefebvre, V. and Daubeze, A.M. (1997) QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: restriction of virus installation in host-cells. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 431–438.
- Charlesworth, B. (2009) Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 195–205.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for coevolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* **54**, 56–68.
- Crow, J.F. and Kimura, M. (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory*. New York: Harper and Row.
- Fabre, F., Bruchou, C., Palloix, A. and Moury, B. (2009) Key determinants of resistance durability to plant viruses: insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Res.* **141**, 140–149.
- Fabre, F., Montarry, J., Coville, J., Senoussi, R., Simon, V. and Moury, B. (2012) Modelling the evolutionary dynamics of viruses within their hosts: a case study using high-throughput sequencing. *PLoS Pathog.* **8**, e1002654.
- Fournet, S., Kerlan, M.C., Renault, L., Dantec, J.P., Rouaux, C. and Montarry, J. (2012) Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathol.* in press. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02617.x.
- Fraser, A.S. (1972) An introduction to population genetic theory. In: *Teratology*, Vol. 5 (Crow, J.F. and Kimura, M., eds), pp. 386–387. New York: Harper and Row.
- French, R. and Stenger, D.C. (2003) Evolution of wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 199–214.
- García-Arenal, F. and McDonald, B.A. (2003) An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*, **93**, 941–952.
- Harrison, B.D. (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica*, **124**, 181–192.
- Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. and Moury, B. (2010) A point mutation in the polymerase of *Potato virus Y* confers virulence toward the Pvr4 resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 823–830.
- Johnson, R. (1981) Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, **71**, 567–568.
- Kang, B.-C., Yeam, I. and Jahn, M. (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 581–621.
- Keller, B., Feuillet, C. and Messmer, M. (2000) Genetics of disease resistance – basic concepts and its application in resistance breeding. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (Slusarenko, A., Fraser, R. and van Loon, K., eds), pp. 101–160. London: Kluwer Academic Publishers.
- Kliebenstein, D.J. and Rowe, H.C. (2009) Anti-rust antitrust. *Science*, **323**, 1301–1302.
- Knott, D.R. (1988) Strategies for the utilization of partial resistance for the control of cereal rust. In: *Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat* (Simmonds, N.W. and Rajaram, S., eds), pp. 48–62. Mexico City: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT).
- Legnani, R., Gerbe-Selassie, K., Nono Womdim, R., Gognalons, P., Moretti, A., Laterrot, H. and Marchoux, G. (1995) Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against *Potato virus Y*. *Euphytica*, **86**, 219–226.
- Lindhout, P. (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 217–226.
- McFadden, D. (1973) Conditional logit analysis of qualitative choice behavior. In: *Frontiers in Econometrics* (Zarembka, P., ed.), pp. 105–142. New York: Academic Press.
- Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V. and Moury, B. (2011) Genetic background matters: a plant–virus gene for gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 911–920.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M. (2004) Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 322–329.
- Moury, B., Fereres, A., García-Arenal, F. and Lecoq, H. (2011) Sustainable management of plant resistance to viruses. In: *Recent Advances in Plant Virology* (Caranta, C., Aranda, M.A., Tepfer, M. and Lopez-Moya, J.J., eds), pp. 219–336. Norfolk: Caister Academic Press.
- Neff, M., Neff, J., Chory, J. and Pepper, A. (1998) dCAPS a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* **14**, 387–392.
- Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B. (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* **183**, 190–199.
- Parlevliet, J.E. (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, **124**, 147–156.
- Pink, D. (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 227–236.
- Rubio, M., Caranta, C. and Palloix, A. (2008) Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the *pvr2*-eIF4E locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome*, **51**, 767–771.
- Sacristán, S., Malpica, J.M., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2003) Estimation of population bottlenecks during systemic movement of tobacco mosaic virus in tobacco plants. *J. Virol.* **77**, 9906–9911.
- Wolfe, M. (1985) The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **23**, 251–273.
- Zwart, M.P., Daròs, J.-A. and Elena, S.F. (2011) One is enough: in vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus. *PLoS Pathog.* **7**, e1002122.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1 Oligonucleotide primers and endonucleases used for derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) detection of *Potato virus Y* (PVY) viral protein genome-linked (VPg) mutants.

Table S2 Frequency of resistance breakdown (RB) by *Potato virus Y* (PVY) 'CI chimera' and concentration of PVY 'CI chimera VPg-N' at 36 days post-inoculation (dpi) for Perennial and 15 doubled haploid (DH) lines issued from the F₁ hybrid (Perennial × Yolo Wonder) and carrying the *pvr2*³ resistance gene.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supplementary table

Table S1: Oligonucleotide primers and endonucleases used for dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) detection of PVY VPg mutants.

Targeted amino acid and position in the VPg	Primer name	Orientation	Sequence (5' to 3')	Associated restriction endonuclease
101 S	DiCAPSVPg101S	Forward	CATTAGGGATATTCAAGAAAGA <u>CTT</u> ^a	<i>DdeI</i>
101 G	DiCAPSVPg101G	Forward	TATGCTGACATTAGGGATAT <u>CCAAG</u> ^a	<i>XcmI</i>
115 T	DiCAPSVPg115T	Forward	GATGGTTGAGGATGACGAAATAGAA <u>T</u> ^a	<i>HinfI</i>
115 K	DiCAPSVPg115K	Reverse	CTCGTGTGACTATCCAAGGCT <u>AGC</u> ^b	<i>AluI</i>
119 D	DiCAPSVPg119D	Reverse	TAAGCATGTATGCTCGTGTGAC <u>GAT</u> ^b	<i>HinfI</i>
119 N	DiCAPSVPg119N	Reverse	TAAGCATGTATGCTCGTGTGAC <u>GAT</u> ^b	<i>MboI</i>

The mismatches creating the specific endonuclease restriction site are underlined. Design of primers and endonucleases was assisted by software dCAPS FINDER 2.0 (Neff *et al.*, 2002).

^a Used in combination with primer Pyro-Rev 5'-TGTCACAAACCTTAAGTGGG-3' for polymerase chain reaction (PCR).

^b Used in combination with primer Pyro-For 5'-ATTCATCCAATTCGTTGATCC-3' for polymerase chain reaction (PCR).

Table S2: Frequency of RB by PVY “CI chimera” and concentration of PVY “CI chimera VPg-N” at 36 dpi (days post inoculation) for Perennial and 15 DH lines issued from the F1 hybrid (Perennial x Yolo Wonder) and carrying the *pvr2*³ resistance gene.

DH line	Percentage of plant infection (resistance breakdown) (n=60) ^y	Mean of PVY concentration relative to line DH217 (n=10) ^z
Perennial	0 ^a	0 ^a
DH217	0 ^a	1 ^b
DH2336	0 ^a	1.19 ^b
DH2245	3 ^a	2.29 ^{bc}
DH2369	17 ^{ab}	1.27 ^b
DH2346	27 ^{bc}	2.54 ^{bc}
DH285	50 ^{cd}	NA
DH2256	52 ^{cd}	3.65 ^c
DH2179	53 ^{cd}	1.87 ^b
DH2228	75 ^{de}	3.19 ^{bc}
DH231	87 ^{ef}	6,10 ^{cd}
DH244	95 ^{ef}	4.82 ^{cd}
DH2328	98 ^f	7.59 ^d
DH2426	100 ^f	10.75 ^d
DH2435	100 ^f	12.03 ^d
DH2437	100 ^f	4.83 ^{cd}

^y Letters represent homogeneous groups identified by Fisher exact tests at the 5% type-I error threshold (corresponding to a 0.000427 threshold after Bonferroni correction).

^z Letters represent homogeneous groups identified by pairwise comparisons using Wilcoxon tests at the 5% type-I error threshold with Benjamini & Yekutieli correction.

NA = Not available.

Chapitre II :

Recherche des facteurs génétiques modulant la fréquence de contournement de *pvr2³* par cartographie génétique et relation avec la résistance partielle

Questions de recherche : Quels sont les facteurs génétiques de la plante affectant la fréquence de contournement de *pvr2³* ? Sont-ce les mêmes que ceux affectant la résistance quantitative ?

Stratégie : Cartographier les facteurs génétiques (ou *quantitative trait loci*, QTL) affectant la fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2³* et les comparer aux QTL affectant la résistance quantitative.

Principaux résultats : La fréquence de contournement de *pvr2³* est un caractère très héritable ($h^2=0.87$). La cartographie de QTL a permis d'identifier quatre QTL, incluant des QTL à effet additif ou épistatique, expliquant 70% de la variation de la fréquence de contournement de *pvr2³* observée (QTL de durabilité). Trois QTL sur les quatre détectés co-localisent avec des QTL affectant la résistance partielle, suggérant que les QTL affectant la résistance partielle ont un effet pléiotropique sur la durabilité de *pvr2³*. De façon surprenante, nos résultats révèlent un compromis évolutif entre la durabilité de *pvr2³* et le spectre d'action de la résistance vis-à-vis de différents *Potyvirus*. Ce compromis peut être résolu par la combinaison d'allèles complémentaires aux différents QTL.

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une publication soumise dans ***New Phytologist***.

Host genes can slow down pathogen evolution: Quantitative trait loci controlling the breakdown of a major resistance gene are relevant for durable resistance breeding

Julie Quenouille^{1,2}, Estelle Paulhiac¹, Benoit Moury² and Alain Palloix¹

¹INRA, UR1052 GAFL, CS 60094, F- 84140 Montfavet Cedex, France.

²INRA, UR407 Pathologie Végétale, CS 60094, F- 84140 Montfavet Cedex, France.

The combination of major resistance genes with quantitative resistance factors is hypothesized as a promising breeding strategy to preserve the durability of resistant cultivar, as recently demonstrated in three different pathosystems.

Using the pepper (*Capsicum annuum*)/Potato virus Y (PVY, genus *Potyvirus*) pathosystem, we aimed at identifying genetic factors directly involved in the breakdown frequency of the major resistance gene *pvr2*³ and at comparing them with genetic factors affecting quantitative resistance.

The resistance breakdown frequency was a highly heritable trait ($h^2=0.87$). Four loci including additive quantitative trait loci (QTLs) and epistatic interactions explained together 70% of the variance of *pvr2*³ breakdown frequency. Three of the four QTLs controlling *pvr2*³ breakdown frequency were also involved in quantitative resistance, suggesting that QTLs controlling quantitative resistance have a pleiotropic effect on the durability of the major resistance gene.

This study provides the first mapping of QTLs directly affecting resistance durability and opens the way for sustainable resistance breeding. Surprisingly, a genetic trade-off was observed between the durability of PVY resistance controlled by *pvr2*³ and the spectrum of the resistance against different potyviruses. This trade-off seemed to have been resolved by the accumulation of minor-effect durability QTLs.

Keywords: resistance durability, quantitative trait locus, resistance breakdown, *Capsicum spp.*, PVY, eukaryotic translation initiation factor 4E, potyviruses, resistance spectrum

A. Introduction

The use of resistant cultivars provides efficient, economical and environmentally friendly crop protection against plant pathogens, and many cultivars carrying major resistance genes successfully protected cultivated crops against their main pathogens. When available in genetic resources, major resistance genes are very attractive for breeding because of their simple inheritance that makes rapid and cheap their introgression through backcrosses to high-yielding but susceptible cultivars, and because they are expected to confer a nearly-complete resistance against the targeted pathogen. These resistances involve a gene-for-gene interaction and are usually race-specific. The widespread deployment of such resistance genes in many elite cultivars imposes a strong selection pressure on the pathogen population leading to the appearance or the increase in frequency of resistance breaking (RB) variants. This adaptation of the target pathogen makes the resistance ineffective, losing its economical interest. In order to preserve the durability of cultivar resistance, management strategies were developed to handle the adaptation of the pathogen populations and limit the appearance of RB variants. When several major resistance genes are available to control a given pathogen species, pyramiding of the distinct genes into a same cultivar, alternation of resistance genes across cultivation cycles or association of cultivars with distinct resistance genes during the same cultivation cycle were proposed (Kiyosawa, 1982; Wolfe, 1985; Mundt *et al.*, 2002; Pink, 2002; McDonald & Linde, 2002).

More recently, another strategy was suggested from experimental data showing that the durability of a major resistance gene was increased when introgressed into a partially resistant cultivar (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012). In these 3 distinct pathosystems (plant-virus/fungus/nematode) the emergence and/or frequency of pathogen variants breaking down the major resistance gene increased when the resistance gene was introgressed into a plant genotype with a susceptible genetic background, but decreased (or was impeded) when it was introgressed into a quantitatively resistant genetic background. This raises the hypothesis that the combination between qualitative and quantitative resistance increases the durability of the qualitative resistance. However, none of these studies demonstrated formally that the increase in durability resulted from the action of quantitative resistance factors,

since the durability of the major resistance was compared between pairs of genotypes with fully different genetic backgrounds. Consequently the decrease in breakdown frequency might be due to any other genes from those genetic backgrounds. Further on, Quenouille *et al.* (2012) showed that the breakdown frequency of the major resistance allele *pvr2³* controlling *Potato virus Y* (PVY) was correlated to the quantitative resistance level in a panel of pepper genotypes carrying *pvr2³* and differing in their genetic background. This suggested that the breakdown frequency of the major allele and the quantitative resistance shared a common genetic basis. When very few major resistance genes are available, this would open the possibility to preserve their durability. Moreover, it would provide tools for breeders to construct resistant cultivars with enhanced durability.

In our study, we (i) examined whether resistance breakdown is a heritable trait, (ii) described the genetic architecture controlling the breakdown frequency of a major resistance gene and (iii) discussed how breeders can exploit these results to preserve the durability of major resistance genes. Using the pepper (*Capsicum annuum*)/*Potato virus Y* (PVY) system, our strategy consisted in (i) detecting QTLs affecting the breakdown frequency of the *pvr2³* major resistance allele, which is a primary component of the resistance durability and (ii) comparative mapping between these QTLs and QTLs affecting the quantitative resistance to PVY.

B. Materials and methods

1. Mapping population

A segregating doubled-haploid (DH) population comprising 350 lines was obtained from the F₁ hybrid between two *Capsicum annuum* inbred lines: 'Perennial' carrying the PVY major resistance allele *pvr2³* in a partially resistant genetic background is an inbred line issued from an Indian landrace and 'Yolo Wonder' carrying the PVY susceptibility allele *pvr2⁺*. All DH lines were genotyped with a tetra-primer ARMS-PCR (amplification refractory mutation system – polymerase chain reaction) marker which targets SNP (single nucleotide polymorphism) signatures differentiating *pvr2⁺* from *pvr2³* (Rubio *et al.*, 2008). For phenotyping, we used the 153 DH lines carrying the *pvr2³* allele but segregating for the genetic background.

2. Virus material

The PVY infectious clone and mutant used for the experiments were derived from isolates SON41p and LYE84.2 (Montarry *et al.*, 2011). For evaluation of RB frequencies, we used a PVY chimera between PVY clones SON41p and LYE84.2. This PVY chimera, named “CI chimera”, differs from SON41p only by the CI cistron, which was replaced by that of LYE84.2. The rest of the genome and more particularly the region directly involved in *pvr2³* RB (the VPg cistron) are strictly identical between the two PVY clones. This “CI chimera” was chosen because of its higher ability to break the *pvr2³* resistance down compared to the parental clones (Montarry *et al.*, 2011). However, although the breakdown capacity of the “CI chimera” was enhanced, it was highly correlated with that of SON41p (Quenouille *et al.*, 2012). The “CI chimera” and SON41p were not infectious *per se* in plants carrying *pvr2³*, i.e. in these plants, mutants of the “CI chimera” possessing single non-synonymous substitutions in the VPg cistron could be detected but not the “CI chimera” itself. In addition, the CI chimera showed the same distributions of RB mutations when inoculated to plants carrying *pvr2³* when compared to SON41p (Montarry *et al.*, 2011). The level of quantitative resistance controlled by the plant genetic background was evaluated using a single-nucleotide mutant of the CI chimera carrying an amino acid substitution at position 119 (aspartic acid to asparagin) of the VPg (named “CI chimera VPg-N”) which conferred the breakdown capacity towards the *pvr2³* resistance gene (Ayme *et al.*, 2006; Palloix *et al.*, 2009). This mutant permits to get rid off the resistance conferred by *pvr2³* and to reveal the quantitative resistance due to the genetic background.

3. Measure of resistance breakdown frequency

The breakdown frequency of *pvr2³* was tested after inoculation of the PVY “CI chimera” to the 153 DH lines carrying the *pvr2³* allele. All along the test, plants were grown in a climate-controlled room at 20-22 °C, 12h light /day. Inoculum was obtained after virus propagation in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi plants. Fifty grams of Xanthi leaves showing PVY symptoms were crushed in 200 mL of 0.03M phosphate buffer (pH 7.0) supplemented with 2% (w:v) diethyldithiocarbamate, 4.5 g of active charcoal and 4.5 g of Carborundum. Thirty pepper seedlings with two expanded cotyledons (2-3 weeks after sowing) per genotype were inoculated mechanically on their cotyledons.

Thirty-eight days post-inoculation (dpi), plants were submitted to virus detection by DAS-ELISA as described by Legnani *et al.* (1995). In these conditions, in each plant infected systemically, the virus population was shown to be composed of one or several VPg mutants carrying a *pvr2³* RB mutation (Montarry *et al.*, 2011). For each pepper line, the RB frequency of *pvr2³* was assessed by the ratio of the number of systemically infected plants over the total number of inoculated plants. Two independent tests of 30 plants per DH line were performed.

4. Measure of quantitative resistance

To evaluate the level of the quantitative resistance due to the genetic background, we assessed two different traits: the area under the disease progress curve (AUDPC) and the virus accumulation. The PVY “CI chimera VPg-N”, which breaks down the *pvr2³* resistance, was mechanically inoculated to 20 plants of each DH lines carrying *pvr2³*. The plants were grown in a climate-controlled room as previously described. The AUDPC assessment combined both intensity of symptoms and latency period: symptom intensity was evaluated, on the 20 plants, in a 3-class scale (1= no symptom, 2 = weak mosaic and 3 = severe mosaic/ necrosis) at 14, 21, 28 and 35 dpi. AUDPC was calculated using the formula:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

where “n” is the number of symptom assessments, “y” the symptom intensity and “t” the time in dpi.

At 36 dpi, the virus accumulation was independently evaluated on 10 individual plants per DH line by semi-quantitative DAS-ELISA, using a dilution range of extracts of PVY infected plants, relatively to a common reference sample incorporated in each ELISA plate, as in Ayme *et al.* (2006).

5. Genotyping of molecular markers and linkage map

The 350 DH progeny was an extension of the former ‘PY’ mapping population (Lefebvre *et al.*, 2002). It was genotyped with 236 molecular markers: 108 single-nucleotide polymorphisms (SNPs, Nicolai *et al.*, 2012), 29 SNPs (Jung *et al.*, 2010), 47 simple sequence repeats (SSRs, Lee *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2007; Minamiyama *et al.*,

2006), 33 amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs, Lefebvre *et al.*, 2002), one single-strand conformation polymorphism (SSCP-PM5, Fazari *et al.*, 2012), two known genes and 16 new markers (supplementary table I) corresponding to previously mapped restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and/or conserved ortholog set (COS II) sequences and designed using the Sol Genomics network (www.solgenomics.net). The two known genes were *pvr2* (the major resistance locus to PVY) genotyped using the tetra-ARMS marker as in (Rubio *et al.*, 2008), and *pvr6* coding for the eIF(iso)4E (eukaryotic initiation factor iso4E) protein genotyped with a new marker targeting a 82 nucleotide deletion differentiating alleles *pvr6*⁺ and *pvr6* (Ruffel *et al.*, 2006) (supplementary data I). The DH progeny was also genotyped for two phenotypic markers, the presence/absence of pungency in the fruits (locus C) and the erected/pendant fruit position (locus *up*).

The genetic linkage map was constructed using the Mapmaker software version 3.0b (Lander *et al.*, 1987) with a LOD score threshold of 3.0, a maximum recombination fraction of 0.3 and distances between markers were calculated using the Kosambi mapping function (Kosambi, 1944). For each linkage group, markers order was verified with the "ripple" command and markers were conserved only if the LOD value was greater than 2.0. Three out of the 236 markers remained unlinked and 33 were deleted because they had no unique placement at LOD 2.0. The resulting map contains 200 markers distributed in 13 linkage groups (LG), which were assigned to the 12 pepper chromosomes through alignment of markers with previous pepper maps (Lefebvre *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009) (supplementary data II). The total length of the map is 2457.7 cM with an average length interval between markers of 12.3 ± 12.4 cM.

6. Statistical analyses

Descriptive statistics were performed with the R software (<http://www.r-project.org/>). For each phenotypic trait, narrow-sense heritability (h^2) was estimated using the formula $h^2 = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_E / n)$, where σ^2_G corresponds to the genotypic variance, σ^2_E to the phenotypic variance and n to the number of replicates.

For AUDPC, mean distributions were close to a normal distribution and we analyzed non-transformed data for QTL detection. Means of virus accumulation (VA) were non-normally distributed. Thus, for QTL detection, these data were log transformed [$\ln(\text{VA}) + 1$] to approximate a normal distribution. Resistance breakdown

frequency was a non-normally distributed trait with an excess of low values, and no transformation was applied.

7. QTL analysis by regression interval mapping

For a non-normal distribution, QTL detection can be performed with a standard regression-based interval mapping approach, which is robust against deviations from normality when the threshold value is calculated by permutations (Rebai, 1997). QTL analyses were performed using iterative composite interval mapping (iQTLm) methods implemented in the MCQTL v.5.2.4 (Jourjon *et al.*, 2005) software. MCQTL performed QTL mapping using a linear regression model and the iQTLm scan method allows finding automatically a multiple QTL model (Charcosset *et al.*, 2001). The QTL significance was determined using the MCQTL test, which is equal to $-\log_{10}$ of the Fisher test Pvalue as described in the MCQTL v.5 reference manual (<http://carlit.toulouse.inra.fr/MCQTL/>). The significance threshold of the MCQTL test was estimated after performing 1000 permutation tests for each trait to reach a genome-wide type-I error rate of 0.05 and 0.1 for QTLs and cofactors, respectively. This resulted in a threshold of 3.4 for [log (VA) +1] and of 3.5 for RB and AUDPC. The cofactor threshold was fixed at 3.2 for the three traits. Cofactors selection was performed by forward selection of markers. The QTL confidence intervals (CI) were defined using a MCQTL test unit fall of 2: i.e. the CIs were calculated using the following formula: $CI = [\max(\text{MCQTL test}) - 2; \max(\text{MCQTL test}) + 2]$. Epistasis between QTLs and the genetic background was tested using the iterative method implemented in MCQTL (threshold of 3.5). The part of phenotypic variation explained by additive and/or epistatic effects of each QTL (R^2 coefficients) and the global R^2 were estimated using the full QTL model in MCQTL.

8. QTL analysis by maximum likelihood interval mapping

For AUDPC and virus accumulation (log (VA) +1), QTL analyses were also performed using multiple QTL mapping (MQM) methods implemented in the R/qtl package of the R (Broman *et al.*, 2003) software. We did not use this method for the RB trait because data were non-normally distributed. MQM is a maximum likelihood-based interval mapping method composed of three steps. First, missing data are “augmented”, i.e. all genotype possibilities are modeled and their probability calculated from neighboring marker information. In the second step, significant markers are detected

with the “mqmscan” function without cofactor, which corresponds to a simple interval mapping (SIM) with a backward elimination. In the last step, QTLs are detected using markers detected in step two as cofactors, which corresponds to a composite interval mapping, and a backward elimination is applied to remove the non-significant cofactors and to establish the final QTL model. Significance LOD thresholds were estimated for each trait, with a genome-wide type-I error rate of 0.05, after performing 1000 permutation tests. The LOD threshold was estimated at 2.6 for the two traits. For each QTL, the CI was defined as a 2-LOD drop-off around the maximum LOD score to obtain approximately a 95% confidence interval (Van Ooijen, 1992). R^2 coefficients were calculated with the “fitqtl” function of R/qtl.

C. Results

1. Characterization of the phenotypic traits

To evaluate the frequency of *pvr2³* resistance breakdown, the “CI Chimera”, which is not infectious *per se* toward *pvr2³* resistant plants, was inoculated to the set of 153 DH carrying *pvr2³*. In these plants, only RB mutants of the “CI Chimera” possessing single non-synonymous substitutions in the factor (VPg) conferring virulence towards the *pvr2³* allele were detected in previous studies (Ayme *et al.*, 2006; Palloix *et al.*, 2009; Montarry *et al.*, 2011.). In our tests, mosaic symptoms appeared in 100% of the susceptible (*pvr2⁺*) control Yolo Wonder 2 weeks after inoculation, but mosaic or necrotic symptoms appeared later (4 to 5 weeks after inoculation) in part of the plants of some DH lines. Thirty-eight days after inoculation (dpi), the ELISA revealed an important phenotypic variability between the 153 DH lines, with frequencies of systemic infection, corresponding to RB frequencies, varying from 0% to 93.2% with a mean (\pm standard deviation) of 14.7% (\pm 23.8). The correlation between the two independent tests was high ($\rho_{\text{pearson}}=0.77$; $p<0.0001$), and a heritability of 0.87 was estimated. The distribution of the trait was strongly skewed towards low values, with 70 DH lines displaying no resistance breakdown and 83 HD lines displaying a RB frequency between 1.7% and 93.2% (figure 1).

The quantitative resistance was assessed using a *pvr2³*-breaking mutant of the “CI Chimera”, the “CI Chimera VPg-N”. This PVY clone differs from the “CI Chimera” by a single nucleotide substitution in the VPg cistron (changing an aspartic acid to an

asparagine at position 119) conferring the capacity to infect *pvr2*³ resistant plants. With this virus, the *pvr2*³ resistant lines displayed symptoms as soon as 14 dpi and 100% of the plants were infected at 35 dpi as attested by DAS-ELISA. Highly significant variations for virus accumulation (VA) and AUDPC were observed between DH lines with a heritability of 0.64 and 0.98, respectively. For statistical and QTL analyses, VA data were log transformed [$\ln(\text{VA}+1)$] to approximate a normal distribution. The $\ln(\text{VA}+1)$ varied from 0 to 1.43 with a mean equal to 0.67 ± 0.35 and AUDPC varied from 29.75 to 63 with a mean equal to 46.6 ± 7.9 (figure 1). Significant correlations ($p < 0.05$) were observed between the three traits with a Pearson's coefficients equal to 0.40, 0.33 and 0.32 for RB/VA, RB/AUDPC and VA/AUDPC, respectively.

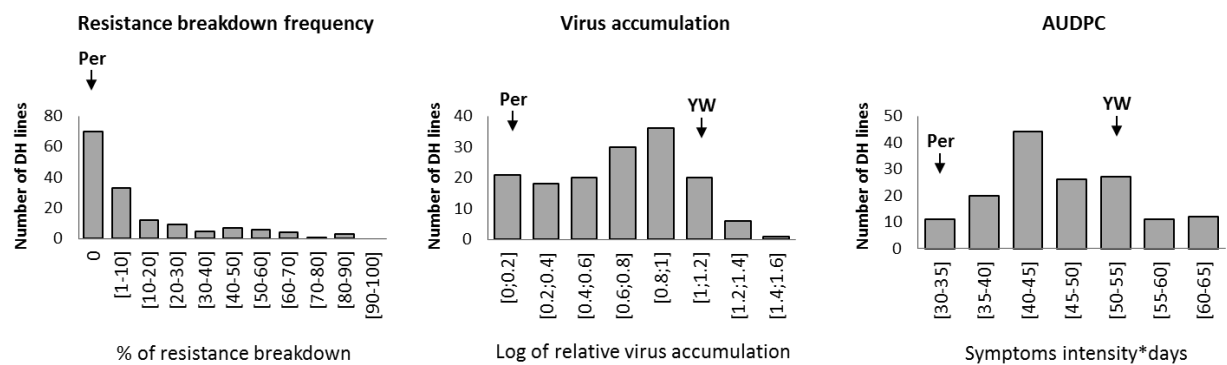


Figure 1: Histograms represent distributions of DH lines into resistance breakdown frequency, virus accumulation and AUDPC classes. Arrows indicate the position of each parent in the phenotypic distribution. Per : Perennial, YW : Yolo Wonder.

2. Mapping QTLs for the quantitative resistance traits

Distributions of the quantitative resistance traits AUDPC and $\log(\text{VA}+1)$ were close to normality. For these two traits, QTL detection was performed using iQTLm and MQM methods.

Two significant QTLs for VA and three for AUDPC were detected by both iQTLm and MQM methods. These QTLs were named VA-3, VA-6, A-1, A-3 and A-9, according to the trait considered and the chromosome location. Hereafter, we will detail only the results from iQTLm because results from both methods are similar. The position, significance and effect of each QTL are detailed in table 1 and figure 2. VA-3 and VA-6 explained 34.5% and 15.7% of the VA variation, respectively. Epistasis tests did not

reveal any interaction between QTLs and the genetic background. The final model combining the effects of the two significant QTLs explained 49.2% of VA phenotypic variation corresponding to 76% of the trait heritability ($h^2=0.64$). A-1, A-3 and A-6 explained from 14.6% to 16% of the AUDPC variation. Epistasis tests did not reveal any interaction between these QTLs and the genetic background. The part of the AUDPC phenotypic variation explained by A-1, A-3 and A-9 was equal to 33.8% corresponding to 34% of the trait heritability and a large part of the variability remained unexplained ($h^2=0.98$).

Table 1 : QTL detected with the iterative QTL mapping (iQTLm) method.

Virus	Trait	QTL	Location ^a	Closest marker	CI ^b	Direction ^c	MCQTL test ^d	Variation explained locus	Variation explained trait	Heritability
<i>QTLs with additive effect :</i>										
Wild-type PVY clone (CI Chimera)	Resistance breakdown	Rb-1	1@87	Gpms_178	42-100	Per	5.2	12.8	68.9	0.87
		Rb-3	3@43.1	Pvr6	41 - 49	YW	17.4	39.8		
		Rb-5	5@57.1	TG437	12-103	Per	3.6	8.6		
<i>QTLs with epistatic effect :</i>										
		eRb-1-3	1@87 - 3@43.1	Gpms_178 / Pvr6			7.4	18.9		
		eRb-3-5	3@43.1 - 5@57.1	Pvr6 / TG437			6.6	16.9		
		eRb-3-6	3@43.1 - 6@188.3	Pvr6 / SNP11391			4.2	10.6		
Mutant PVY clone (CI Chimera VPg-N)	Virus accumulation	<i>QTLs with additive effect :</i>								0.64
		Va-3	3@49.1	SNP23714	35-54	YW	14.6	34.5	43.9	
		Va-6	6@190.3	SNP11391	158 - 202	Per	6.3	15.7		
<i>QTLs with additive effect :</i>										
Mutant PVY clone (CI Chimera VPg-N)	AUDPC	A-1	1@87	Gpms_178	77-99	Per	6.3	16.1	34.1	0.98
		A-3	3@40.8	SNPISO_2	16 - 52	YW	6.2	15.5		
		A-9	9@132	SSCP_MP5	117 - 149	YW	5.9	14.9		

^a QTL location are coded in the following way : Chromosome @ position on the chromosome in cM. For example, the QTL RB-1 is localized on the chromosome 1 at 87 cM (1@87).

^b The confidence interval was defined as a 2-MCQTL test drop-off around the maximum MCQTL test score.

^c Indicates the parent which decreases the value of the trait.

^d The MCQTL test significance threshold was set at $P=0.05$ and is equal to 3.4 for Virus accumulation and 3.5 for resistance breakdown and AUDPC.

3. Mapping QTLs for the frequency of *pvr2*³-resistance breakdown

Because of the skewed distribution of the RB frequency, QTL detection was performed with the standard regression-based interval mapping approach (Haley & Knott, 1992; Rebai, 1997) using the iQTLm (Charcosset *et al.*, 2001) method implemented in MCQTL software (Jourjon *et al.*, 2005). Three significant QTLs, explaining 12.8%, 39.8% and 8.6% of the *pvr2*³ RB frequency variation, were detected on chromosomes 1, 3 and 5, respectively. QTLs were named RB-1, RB-3 and RB-5 according to the trait and the chromosome location. Table 1 and figure 2 detail position,

significance and effect of each QTL. Epistasis tests revealed that RB-3 interacts with three distinct positions in the pepper genome, on chromosomes 1, 5 and 6. The positions on chromosomes 1 and 5 interacting with RB-3 are included in the CIs of RB-1 and RB-5, respectively, suggesting interaction effects between RB-1 and RB-3 and between RB-3 and RB-5 (figure 2). The position on chromosome 6 that interacts with RB-3 did not show any additive effect. The final model combining additive and epistatic effects of the significant QTLs explained 68.9% of the variation of *pvr2³* RB frequency, which corresponds to a great part (79%) of the trait heritability ($h^2=0.87$).

The major QTL affecting the RB frequency of *pvr2³* (RB-3) co-localizes with the major QTLs VA-3 and A-3 affecting VA and AUDPC, respectively. The position on chromosome 6 that interacts with RB-3 was involved in VA. The QTL RB-1 co-localizes with QTL A-1 (figure 2).

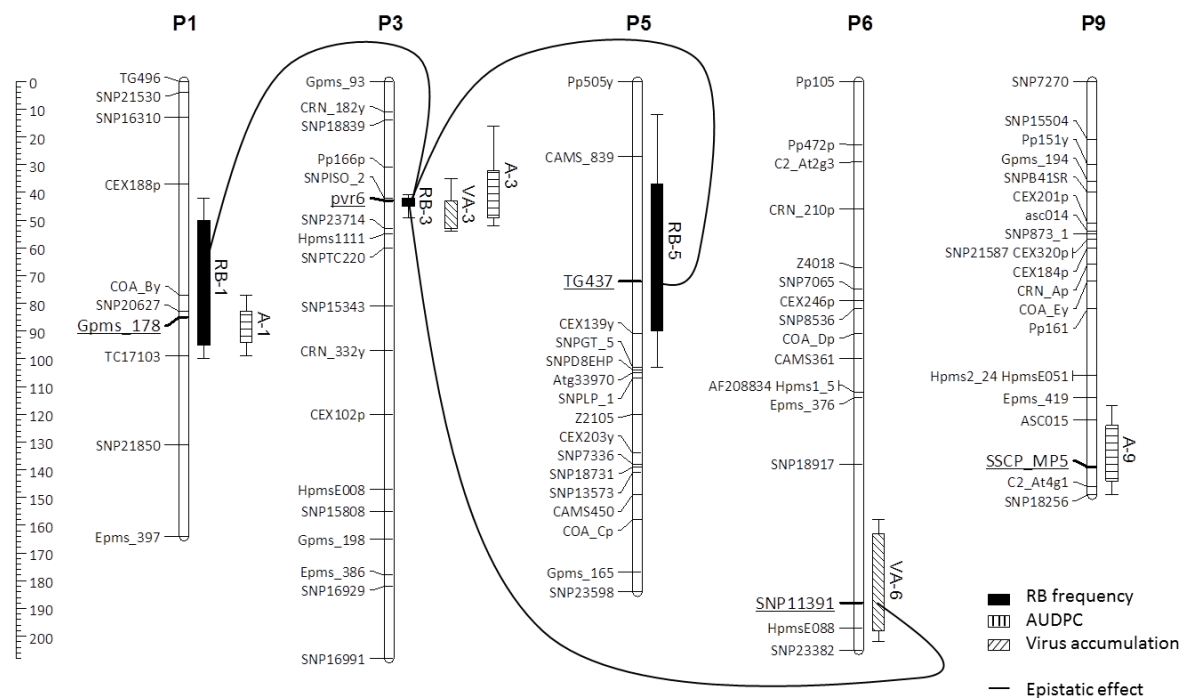


Figure 2: Map positions on Pepper genetic map of the significant quantitative trait loci (QTLs) for *pvr2³* resistance breakdown (RB) frequency, the area under the disease progress curve (AUDPC) and the virus accumulation (VA). On the left the scale indicate map distances calculated by the Kosambi mapping function. For each QTL, the length of the block represents the confidence interval (CI) of the QTL using a MCQTL test unit fall of 1 and the length of the vertical bar represents the CI of the QTL using a MCQTL test unit fall of 2. For each QTL, the closest marker is underline. Lines indicate epistatic effects between loci.

4. Effect of parental alleles on the RB frequency

All genotypes carrying the Yolo Wonder allele at QTL RB-3 showed a very low resistance breakdown frequency with a mean equal to 0.31% whereas, genotype carrying the Perennial allele at QTL RB-3 showed a much higher resistance breakdown frequency with a mean equal to 29.63%. The phenotypic values of the different allele combination between QTL RB-3 and epistatic QTLs are presented in Table 2. For genotypes carrying the Yolo Wonder allele at QTL RB-3, the resistance breakdown frequency was independent to the alleles at the interacting QTLs (mean of resistance breakdown frequency varies between 0.17 and 0.37%). For genotypes carrying the Perennial allele at QTL RB-3, the RB frequency strongly depended on the alleles present at the interacting QTLs. The Yolo Wonder allele present at QTLs RB-1, RB-5 or RB-6 increased the RB frequency when combined with the Perennial allele at QTL RB-3, whereas the Perennial alleles at these QTLs strongly decreased the RB frequency (Table 2). Altogether, the combination of the Perennial alleles at the three epistatic QTLs (RB-1, RB-5 and RB-6) with the Perennial allele at RB-3 decreased the RB frequency from 69.7% to 5.3% (table 2).

Table 2: Effect of QTLs interaction on the resistance breakdown frequency of *pvr2³*.

		Gpms_178 (1@85)		TG437 (5@72.3)		SNP11391 (6@188.3)		Gpms_178, TG437 and SNP11391	
		Yolo Wonder	Perennial	Yolo Wonder	Perennial	Yolo Wonder	Perennial	Yolo Wonder	Perennial
Pvr6 (3@43.1)	Yolo Wonder	0.4% (34)	0.3% (39)	0.2% (39)	0.5% (33)	0.2% (37)	0.4% (39)	0.2% (9)	0.4% (7)
	Perennial	42.0% (37)	15.6% (34)	41.8% (32)	18.0% (31)	36.2% (40)	22.6% (30)	69.7% (7)	5.3% (6)

This table presents the effect of the three significant epistatic interactions between loci and their combination for the resistance breakdown frequency of *pvr2³*. The names and the positions of the markers in interaction are indicated. The numbers correspond to the average of the *pvr2³* resistance breakdown (RB) frequency (in %) for each allelic combination and the number between brackets corresponds to the number of lines belonging to each allelic class.

D. Discussion

1. The breakdown frequency of a major resistance gene is a heritable trait

In this study, we measured the resistance breakdown (RB) frequency of a major resistance gene (*pvr2³*) in a set of pepper DH lines carrying *pvr2³* but segregating for the genetic background. The observed RB frequency directly resulted from the frequency of appearance and accumulation of RB variants in the resistant plants, two steps of the virus evolution toward RB that are considered as major components of the resistance

durability (Moury *et al.*, 2010, Fabre *et al.*, 2009). However, the genetic analysis showed that the RB frequency of *pvr2³* was highly variable between genotypes (from 0% to 93.2%) and highly heritable ($h^2=0.87$) demonstrating the genetic control of this trait. This result is not trivial. Indeed, during the RB processes, several factors could have increased the heterogeneity of results between plants and between experiments and consequently could have decreased the heritability of RB frequency. Among these factors are the stochastic natures of (i) the appearance of RB mutations in PVY genome and (ii) the genetic drift acting on virus during systemic invasion of plants (French & Stenger, 2003; Garcia-Arenal *et al.*, 2001) and (iii) the fact that at least 9 different VPg mutations, with contrasted effects on PVY competitiveness, can be involved in *pvr2³* breakdown (Ayme *et al.*, 2006; Montarry *et al.*, 2011). Our study demonstrated that measuring the resistance breakdown frequency with a reasonable number of plants (60 per genotype) compensates these factors of heterogeneity and is sufficient to allow precise genetic analyses. The genetic background dependency of *pvr2³* durability could be attributed to 4 distinct genetic factors with quantitative effects: one major-QTL (RB-3) and three additional QTLs (RB-1, RB-5 and RB-6) acting additively and/or in interaction with RB-3. The discovery of such genetic factors shows that direct selection for alleles increasing the durability of a major resistance is feasible and opens new ways for durable resistance breeding. Nevertheless, the successful detection of such genetic factors affecting the RB frequency of a major resistance gene depends on the ability to generate RB strains at high frequencies through experimental evolution. For many virus diseases, the experimental conversion of an avirulent virus to an RB variant is rather easy and was commonly used to determine viral determinants of pathogenicity (Ayme *et al.*, 2006; Margaria *et al.*, 2007; Hajimorad *et al.*, 2010; Lacroix *et al.*, 2011). Moreover, the RB frequency of different major resistance genes estimated by experimental evolution is highly correlated with the durability of these genes in the field (Ayme *et al.*, 2006; Janzac *et al.*, 2009; Lacroix *et al.*, 2011, Moury et Verdin, 2012). For example, field observations revealing that *va²*-RB isolates were more frequent than *va⁰*-RB isolates (Verrier & Doroszewska, [2004](#)) were confirmed by results from experimental evolution. (Lacroix *et al.*, 2011). Moreover, the distributions of RB mutations in viral genomes are usually similar in field and laboratory observations (Ayme *et al.*, 2006; Hajimorad *et al.*, 2010; Moury *et al.*, 2004). However, for some resistance genes which proved very

durable in the field, it may be much more difficult to generate RB variants by direct inoculation of avirulent strains. In such cases, alternative protocols imposing strong inoculum pressures like graft-inoculation or inoculation through agroinfiltration, were shown to generate a constant inoculum pressure and to increase the RB frequency (Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007; Janzac *et al.*, 2009). These experimental procedures make it possible to measure the breakdown frequency of major resistance genes in many plant-virus pathosystems. Such experimental evolution protocols provide powerful tools for the genetic improvement of the durability of virus resistance in plants. Considering other pathogens, experimental evolution may not be as much relevant, due to their longer generation time, smaller population size and smaller mutation rate. However, the relationship between RB QTLs and QTLs controlling the level of quantitative resistance may provide alternative selection criteria.

2. Alleles increasing quantitative resistance are favourable to the durability of major resistance genes.

Using the same pepper DH progeny, we performed a QTL analysis of quantitative resistance. To get rid off the *pvr2³* major effect and to reveal the quantitative resistance conferred by the genetic background, we used a *pvr2³*-RB PVY variant (the “CI Chimera VPg-N”) which differs from the PVY variant used for the measurement of *pvr2³* RB frequency by only one single nucleotide substitution. This mutation was shown to restore the interaction between the PVY VPg and the pepper eukaryotic translation initiation factor 4E1 (eIF4E1) encoded by *pvr2³*, causing the breakdown of the *pvr2³*-mediated resistance (Charron *et al.*, 2008). Using this PVY variant, four QTLs affecting virus accumulation and/or symptom expression were detected. These four QTLs were also previously detected for the AUDPC trait with two other PVY strains (Caranta *et al.*, 1997), with identical allele directed effects: resistance-favourable Perennial alleles on chromosomes P1 and P6 (LG3 and LG10 in Caranta *et al.*, 1997) and favourable Yolo Wonder alleles on chromosomes P9 and P3 (LG9 and LG4 in Caranta *et al.*, 1997). Our present results show that three of the four QTLs affecting the RB frequency of *pvr2³* collocate with QTLs affecting quantitative resistance (viral accumulation and/or AUDPC). These collocations may result from genetic linkage between the different traits or from a pleiotropic effect of quantitative resistance factors on the RB frequency of *pvr2³*.

Looking at the effect of parental alleles that colocate on chromosomes P1, P3 and P6, all the alleles that increased the quantitative resistance also decreased the breakdown frequency. Moreover, the QTL on chromosome P3 displayed the major effect on both virus accumulation and RB frequency. This concordance between parental allele effects for the different traits strongly suggests that colocations are due to pleiotropic effects. In a recent study of the different mechanisms that could account for the higher durability of polygenic resistance, Quenouille *et al.* (2012) showed that the additional quantitative resistance carried by the genetic background explained a large part of the variation in RB frequency. This is also consistent with the initial observations, in 3 pathosystems, that the durability of major genes is enhanced in partially resistant cultivars (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012). Dissecting the genetic background into QTLs indicate that breeding for quantitative resistance alleles will enhance the durability of major genes. Such a strategy is achievable for most pathosystems where breaking down variants or experimental evolution tests are not available.

3. Resistance durability as the result of a combination of mechanisms

At the landscape scale, it was proposed a long time ago that diversifying the methods for pathogen control is an efficient strategy to limit the adaptation of the pathogen populations (Kiyosawa, 1982, Mundt *et al.*, 2002; Pink *et al.*, 2002). Our results show that the durability of a major resistance gene is conditioned by several genetic factors with distinct effects. Thus, diversifying resistance mechanisms at the genotype scale can also have a positive effect on durability. Indeed, in accordance with Quenouille *et al.* (2012), our results raise the main impact of viral accumulation on the RB frequency of *pvr2*³, since all QTLs involved in viral accumulation are also involved in the RB frequency of *pvr2*³. Viral accumulation was measured in apical leaves and a decrease of viral accumulation can result from decreases of the efficiency of virus replication, cell-to-cell and/or systemic movement. Combining a major resistance gene with another gene involved in viral accumulation has already proved to enhance resistance durability in the PVY/tobacco system (Acosta-Leal & Xiong, 2008). In their study, Acosta-Leal & Xiong (2008) showed that the RB frequency of the *va* recessive gene which confers a resistance to PVY cell-to-cell movement in tobacco was reduced when *va* was combined with a

second recessive gene (*va2*) conferring resistance to within-cell PVY accumulation. Two additional QTLs affected the RB frequency but had no detectable effect on viral accumulation (RB-1 and RB-5), suggesting distinct modes of action. QTL RB-1 colocalizes with QTL A-1 controlling symptom intensity and dynamics. In plants, a decrease of symptom intensity can result from resistance and/or tolerance mechanism. Here we consider tolerance in the sense of Schafer (1971) in which tolerant plants endure high pathogen loads without severe losses in field. Thus, QTL A-1 can be considered as a tolerance QTL since it reduces the AUDPC but it does not significantly affect viral accumulation. To our knowledge, mechanisms involved in plant tolerance are still unknown but they could also have an effect on the *pvr2*³ RB frequency. Finally, QTL RB-5 did not colocalize with any quantitative resistance QTL, suggesting that a third mechanism, independent of quantitative resistance, affects the *pvr2*³ RB frequency. Quenouille *et al.* (2012) also showed that beside virus accumulation, the plant genetic background can control two additional modes of action: making the mutational pathways for viral resistance breakdown more complex and unlikely and modulating the selection pressure exerted on viral populations. QTLs RB-1 and RB-5 may be candidates for such modes of actions.

4. A genetic trade-off between large-spectrum resistance and resistance durability that can be solved by breeding strategy

Among the 4 additive and/or epistatic QTLs affecting the RB frequency, the alleles from Perennial were shown to decrease the risk of *pvr2*³ breakdown at 3 of these QTLs (RB-1, RB-5 and RB-6), whereas the Perennial allele increased strongly this risk for the major QTL RB-3. This result looks surprising since the *pvr2*³ allele was previously shown to be highly durable in the Perennial landrace (Palloix *et al.*, 2009). It is noteworthy that the peak of QTL RB-3 was localized at the *pvr6* locus which encodes the eIF(iso)4E, an isoform of eIF4E1 encoded by *pvr2*. It was previously shown that the Perennial allele at *pvr6* included a deletion of 82 nucleotides followed by a premature stop codon. The eIF(iso)4E protein encoded by the Perennial *pvr6* allele was therefore non-functional (Ruffel *et al.*, 2006) and can be considered as a natural knock-out allele of *pvr6*⁺. When combined with different *pvr2* alleles, the Perennial *pvr6* allele was shown to enlarge the spectrum of resistance to additional potyviruses, including *Chilli vein*

mottle virus (ChiVMV) & *Pepper veinal mottle virus* (PepVMV) (Caranta *et al.*, 1997; Moury *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2009). Hence, the Perennial allele at the *pvr6*/RB-3 locus contributes to a gain of resistance against PepVMV and ChiVMV but also to a decrease of the durability of the *pvr2³* resistance to PVY. The Perennial inbred line was selected from a landrace issued from farm selection in India, where both PVY and ChiVMV are prevalent in pepper crops and it is highly likely that *pvr2³* and *pvr6* have been selected locally to enlarge the spectrum of resistance against these potyviruses. The colocation between *pvr6* and RB-3 reveals a trade-off between a large resistance spectrum against potyviruses and the durability of the *pvr2³* PVY resistance in the Perennial genotype.

Such a trade-off looks unusual since resistance gene pyramiding and broad-spectrum resistance is often considered favourable to durability (McDonald & Linde, 2002; Kou & Wang, 2010) This trade-off is important since the combination of *pvr2* resistance alleles (particularly *pvr2¹* and *pvr2²* alleles) with *pvr6* is already used in breeding programs to create resistant varieties against a large range of potyviruses (Rubio *et al.*, 2009) and such cultivars may lead to a premature breakdown of *pvr2*-mediated resistance by PVY. More generally, translation initiation factor-mediated virus resistance is widespread (Robaglia & Caranta, 2006) and combination between mutated or knock-out alleles at different genes coding for translation initiation factors is expected to provide a way to breed for large spectrum resistance. In tomato, a recent worked show that the narrow range resistance conferred by a knock-out allele of eIF4E1 was enlarged when combined with a knock-out of eIF4E2, which belongs to the same multigenic family as eIF4E1 and eIF(iso)4E (Mazier *et al.*, 2011). Our study indicates that the combination of resistance genes belonging to the same multigenic family have to be used carefully, since the trade-off observed in pepper between large-spectrum and durability of resistance, may also occur in other plants species.

Our previous observations already showed that introgressing resistance genes from the plant germplasm into new elite cultivars with susceptible genetic backgrounds can endanger the long-term use of these genes as well as provide an evolutionary springboard to the pathogen for resistance breakdown (Palloix *et al.* 2009). Conversely, the result of interest for breeders is that in Perennial, this trade-off was compensated by the selection of favourable alleles at three other loci (RB-1, RB-5 and RB-6) which, independently and/or in interaction with RB-3, decreased the risk of *pvr2³* resistance

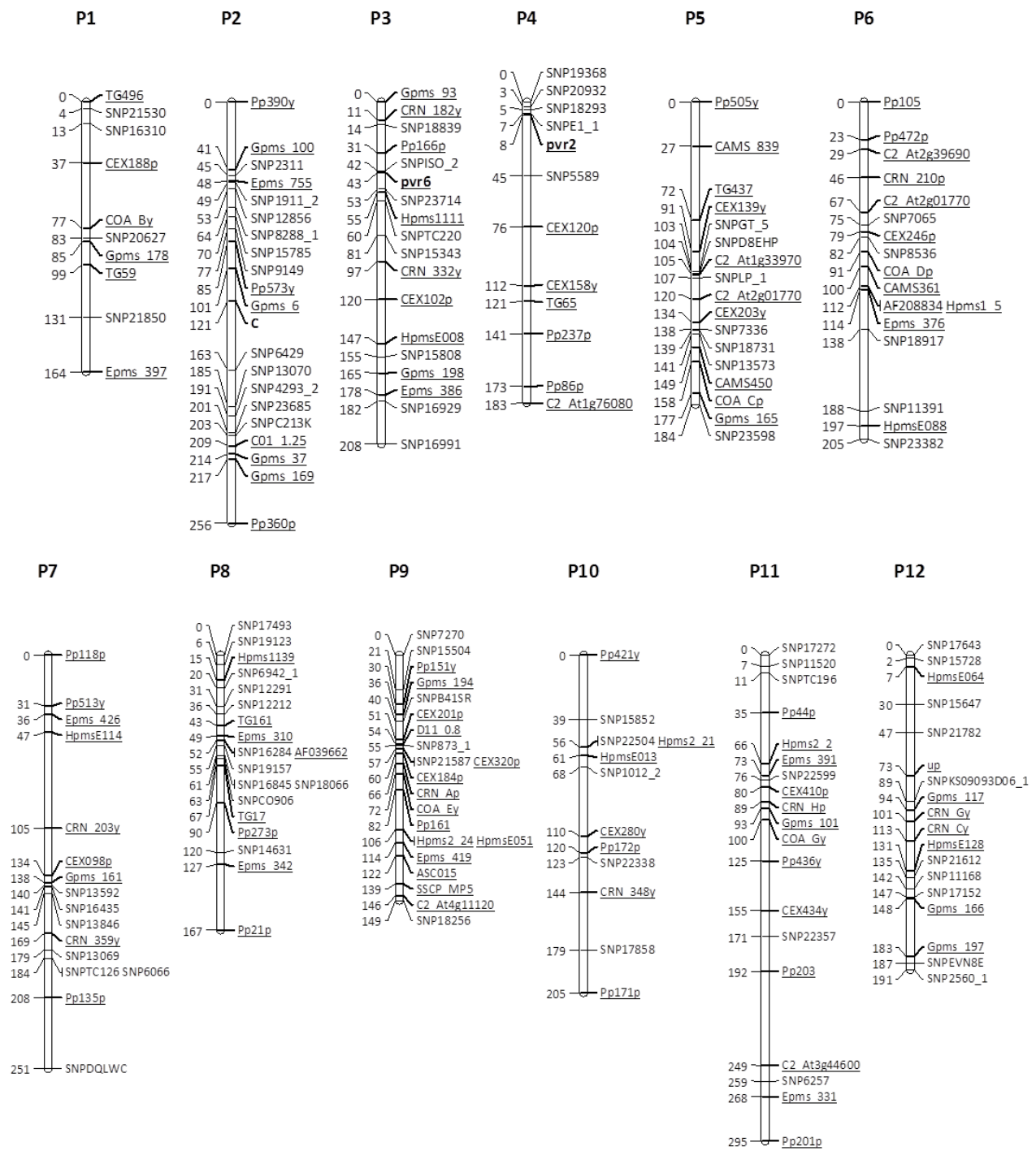
breakdown (table 2). Such a polygenic combination of co-adapted alleles which contribute to increase resistance in efficiency, spectrum and durability was achieved through multigeneration selection by local farmers in field conditions, under selection pressure exerted by the local potyviruses on an heterogeneous plant population. Such a combination makes Perennial pepper cultivar a representative example of a genotype combining qualitative and quantitative resistances for durable and large spectrum resistance.

E. Supplementary informations

Supplementary data 1: new molecular markers used in the pepper map : code, description, primer sequences and marker type.

marker code	description	Primer F ^a	Primer R ^a	marker type	Enzyme	Homologue sequences
TG496	RFLP converted	CAGGTTGTAGCAATTGTTCTAT	AGAGCAAAATGGAGATCCAAAAG	dCAPs	Mse I	GD057120
TG59	RFLP converted	AAGGTAGACTTCATCTCTCACT	TATGTCAGGCCGAAGTGCTTG	dCAPs	Spe I	TC17103
TG65	RFLP converted	TAGTAGTCCACAGAAAGTATCATGGAGCAAGG	AGAAGACATCAGAGCCTGGAAAG	dCAPs	MboII	TC18824
TG17	RFLP converted	CCGTCTTAGCTAGCCAGAATGA	ACGCCGTTTGGCTCACIGC	dCAPs	PstI	TC18489
TG161	RFLP converted	GTGCATGATCTCTTATGTGATCAC	CTATCCCAGACTGATCCCAAC	dCAPs	XcmI	TC18211
TG437	RFLP converted	confidential	confidential	CAPs	HphI	
C01_1.25	RAPD converted	TTCGAGCCAGTACCCTAGAC	TTCGAGCCAGTGCAGTTAA	CAPs	HaeIII	
D11_0.8	RAPD converted	AATACTGCTGAGATGATAAA	ATAAGATGGAAGAGGAGAAG	SCAR		
asc015	AFLP converted	GCTTATCATGGCTAGTAGGG	CGGACCATACTGGGACGATC	SCAR		
C2_At1g76080	COS II	CGAGGTTTAGCCAAAATTGAAAC	CGAGGTTTAGCCAAAATTGAAAC	SCAR		SGN-U204073
C2_At2g39690	COS II	ATGGTCTTGAGTATCCTGAACCT	GCGTTAGGGGTACAATTTCTGT	SCAR		SGN-U205160
C2_At4g11120	COS II	TTATCGTGGGTAAAACGTCCT	AGCAGCAGTTCGAGACGACTT	CAPs	PstI	SGN-U204028
C2_At3g44600	COS II	CTTGATATTTTCATCGGGTCAATC	CCAGAAGTCATAGATTACGCAGGT	CAPs	HaeIII	SGN-U200127
C2_At2g01770	COS II	confidential	confidential	CAPs	MboII	
C2_At1g33970	COS II	confidential	confidential	CAPs	MspI	
C2_At3g25120	COS II	CCTTCTCGGATCGAAAACATT	TTACAAGTCTTGC AACGTGAG	SCAR		
pvr6	Known gene	GGTAGACACGACGGAGGTTTC	ACTAACTGTATCCGCCAATGCT	SCAR		SGN-U200976

^a For the dCAPs markers, the mismatch nucleotide is underlined and indicated in bold.



Supplementary data 2: Genetic map of pepper.

Numbers on the left indicate map distances calculated by the Kosambi mapping function. AFLP markers are coded according to Lefebvre *et al.* (2002). SNP markers are coded according to Jung *et al.* (2010). followed by the parental origin ("p" for Perennial and "y" for Yolo Wonder) (ex: Pp390y) and according to Nicolai *et al.* (2012) preceded by "SNP" (ex: SNP21530). Loci in bold correspond to known genes. Underlined loci indicate markers that were mapped in previous pepper genetic maps (Lefebvre *et al.* 2002; Wu *et al.* 2009) and were used for assignment and orientation of linkage groups into pepper chromosomes.

F. Acknowledgements

The authors thank B. Mangin (INRA-Toulouse) for help in the use of MCQTL software, G. Girardot, P. Mistral, G. Nemouchi, K. Nozeran, B. Savio and V. Simon for technical assistance, A.M. Sage-Palloix for providing the *Capsicum* genetic resources and J-P. Bouchet for bioinformatic assistance. This work was financially supported by the *Comité Technique Permanent de la Sélection* (CTPS, French Ministry of Agriculture and Fisheries), by the ANR (Agence Nationale de la Recherche), and by the Région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA).

G. References

- Acosta-Leal R, Xiong Z. 2008.** Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco 'Virgin A Mutant' (VAM) to *Potato virus Y*. *Virology* **379**: 275–283.
- Ayme V, Souche S, Caranta C, Jacquemond M, Chadoeuf J, Palloix A, Moury B. 2006.** Different mutations in the genome-linked protein vpg of potato virus y confer virulence on the *pvr2*³ resistance in pepper. *MPMI* **19**: 557–563.
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. 2003.** R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**:889-890
- Brun H, Chèvre A-M, Fitt BD, Powers S, Besnard A-L, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M and Andrivon D. 2010.** Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285–299.
- Bruun-Rasmussen M, Møller IS, Tulinius G, Hansen JKR, Lund OS, Johansen IE. 2007.** The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two Potyvirus spp. in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1075–1082.
- Caranta C, Lefebvre V, Palloix A. 1997.** Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *MPMI* **10**: 872–878.
- Charcosset A, Mangin B, Moreau L, Combes L, Jourjon M-F, Gallais A. 2001.** Heterosis in maize investigated using connected RIL populations. Quantitative genetics and breeding methods : the way ahead. Les colloques n°96, INRA Editions, Paris.
- Charron C, Nicolai M, Gallois J, Robaglia C, Moury B, Palloix A, Caranta C. 2008.** Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal* **54**: 56-68.
- Fabre F, Bruchou C, Palloix A, Moury B. 2009.** Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Research* **141**: 140–149.
- Fazari A, Palloix A, Wang LH, Sage-Palloix AM, Djian-Caporalino C. 2012.** The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding* **131**:665-673.

- Fournet S, Kerlan MC, Renault L, Dantec JP, Rouaux C, Montarry J. 2012.** Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathology*: (In press) doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02617.x.
- French R, Stenger DC. 2003.** Evolution of wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 199–214.
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM. 2001.** Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 157–186.
- Hajimorad MR, Wen RH, Eggenberger AL, Hill JH, Maroof MAS. 2010.** Experimental adaptation of an rna virus mimics natural evolution. *Journal of Virology* **85**: 2557–2564.
- Haley, C. S., S. A. Knott. 1992.** A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**: 315–324
- Janzac B, Fabre MF, Palloix A, Moury B. 2009.** Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathology* **58**: 443–449.
- Jourjon MF, Jasson S, Marcel J, Ngom B, Mangin B. 2005.** MCQTL: multi-allelic QTL mapping in multi-cross design. *Bioinformatics* **21**: 128–130.
- Jung J, Park SW, Liu WY, Kang B-C. 2010.** Discovery of single nucleotide polymorphism in Capsicum and SNP markers for cultivar identification. *Euphytica* **175**: 91–107.
- Kiyosawa. 1982.** Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 93–117.
- Kosambi DD. 1944.** The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, **12**(3): 172-175
- Kou Y, Wang S. 2010.** Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 181–185.
- Lacroix C, Glais L, Verrier J-L, Jacquot E. 2011.** Effect of passage of a *Potato virus Y* isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va*² on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. *European Journal of Plant Pathology* **130**: 259–269.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. 1987.** MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174–181.
- Lee JM, Nahm SH, Kim YM, Kim BD. 2004.** Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **108**: 619–627.
- Lefebvre V, Pflieger S, Thabuis A, Caranta C, Blattes A, Chauvet JC, Daubèze AM, Palloix A. 2002.** Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* **45**: 839–854.
- Legnani R, Gerbe-Selassie K, Nono Womdim R, Gognalons P, Moretti A, Laterrot H, Marchoux G. 1995.** Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against *potato virus Y*. *Euphytica* **86**: 219–226.
- Margarita P, Ciuffo M, Pacifico D, Turina M. 2007.** Evidence that the nonstructural protein of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the Tsw gene. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 547–558.

- Mazier M, Flamain F, Nicolai M, Sarnette V, Caranta C. 2011.** Knock-Down of Both eIF4E1 and eIF4E2 Genes Confers Broad-Spectrum Resistance against Potyviruses in Tomato. *PLoS ONE* **6**: e29595.
- McDonald BA, Linde C. 2002.** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349–379.
- Minamiyama Y, Tsuru M, Hirai M. 2006.** An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding* **18**: 157–169.
- Montarry J, Doumayrou J, Simon V, Moury B. 2011.** Genetic background matters: a plant-virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Molecular Plant Pathology* **12**: 911-920.
- Moury B, Morel C, Johansen E, Guilbaud L, Souche S, Ayme V, Caranta C, Palloix A, Jacquemond M. 2004.** Mutations in *Potato virus Y* Genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *MPMI* **17**: 322–329.
- Moury B, Palloix A, Caranta C, Gognalons P, Souche S., Selassie KG, Marchoux G. 2005.** Serological, molecular, and pathotype diversity of Pepper veinal mottle virus and Chili veinal mottle virus. *Phytopathology* **95**: 227–232.
- Moury B, Fabre F, Montarry J, Janzac B, Ayme V, Palloix A. 2010.** L'adaptation des virus de plantes aux résistances variétales. *Virologie* **14**: 227–239.
- Moury B, Verdin E. 2012.** Viruses of Pepper Crops in the Mediterranean Basin: A Remarkable Stasis.
- Mundt C, Cowger C, Garrett K. 2002.** Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* **124**: 245–252.
- Nagy I, Stágel A, Sasvári Z, Röder M, Ganai M. 2007.** Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* **50**: 668–688.
- Nicolai M., Pisani C, Bouchet JP, Vuylsteke M, Palloix A. 2012.** Discovery of a large set of SNP and SSR genetic markers by high-throughput sequencing of pepper (*Capsicum annuum*). *Genetics and Molecular Research* **11**: 2295–2300.
- Palloix A, Ayme V, Moury B. 2009.** Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**: 190–199.
- Pink D. 2002.** Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* **124**: 227–236.
- Quenouille J, Montarry J, Palloix A, Moury B. 2012.** Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular Plant Pathology*: in press. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00834.x
- Rebai A. 1997.** Comparison of methods for regression interval mapping in QTL analysis with non-normal traits. *Genetics Research* **69**: 69–74.
- Robaglia C, Caranta C. 2006.** Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* **11**: 40–45.
- Rubio M, Caranta C, Palloix A. 2008.** Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the *pvr2-eIF4E* locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* **51**: 767–771.
- Rubio M, Nicolai M, Caranta C, Palloix A. 2009.** Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between *pvr2-eIF4E* and *pvr6-eIF(iso)4E* alleles for resistance to pepper veinal mottle virus. *Journal of General Virology* **90**: 2808–2814.

Ruffel S, Gallois J-L, Moury B, Robaglia C, Palloix A, Caranta C. 2006. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol* **87**: 2089–2098.

Schafer JF. 1971. Tolerance to plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 235–252.

Van Ooijen JW. 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor Appl Genet* **84**:803–811

Verrier JL and Doroszewska T. 2004. The “*va*” resistance to PVYN in *Nicotiana tabacum*: an assessment of the frequency of “*va*”breaking PVYN strains based on seven years of field survey on a worldwide basis. In: *Proceedings of the 12th European Association for Potato Research (Virology Section) Meeting 2004, 13–19 June 2004, Rennes, France*.86(Abstract).

Wolfe M. 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 251–273.

Wu F, Eannetta NT, Xu Y, Durrett R, Mazourek M, Jahn MM, Tanksley SD. 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* **118**: 1279–1293.

Chapitre III :

Disponibilité des facteurs génétiques favorables à la durabilité du gène de résistance *pvr2³* au sein des ressources génétiques du piment

Questions de recherche: Les facteurs génétiques affectant la durabilité du gène de résistance *pvr2* sont-ils largement répandus parmi les ressources génétiques de l'espèce *Capsicum annuum* ? La relation entre la fréquence de contournement du gène *pvr2* et le niveau de résistance partielle conféré par le fonds génétique est-elle conservée ?

Stratégie : A l'aide d'une core collection de 20 accessions de piment porteuses des allèles de résistance *pvr2³* ou *pvr2⁴*, nous avons mesuré l'effet de différents fonds génétiques sur la fréquence de contournement de *pvr2^{3/4}* et sur le niveau de résistance partielle.

Principaux résultats : Concernant la fréquence de contournement de *pvr2^{3/4}*, les 20 accessions se divisent en deux groupes avec 18 accessions présentant un faible taux de contournement (<5%) et 2 accessions présentant un fort taux de contournement (40% et 52.5%). Ces résultats montrent que la majorité des fonds génétiques présents dans les ressources génétiques du piment sont favorables à la durabilité de la résistance conférée par *pvr2^{3/4}*. Une forte diversité du niveau de résistance partielle (accumulation virale et intensité des symptômes) conférée par le fonds génétique a été mise en évidence entre les accessions. Nos résultats révèlent une forte relation entre la fréquence de contournement de *pvr2^{3/4}* et l'accumulation du PVY dans les plantes. Enfin, l'analyse de la séquence codant le facteur d'initiation eIF(iso)4E (locus *pvr6*), une isoforme du facteur eIF4E codé par le gène *pvr2*, révèle que la majorité de la variation de la fréquence de contournement du gène *pvr2* pourrait être expliquée par l'allèle présent au locus *pvr6*.

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une "Short communication" en préparation pour soumission à ***Molecular Plant Pathology***.

Diversified genetic backgrounds shape the durability of a major resistance gene. Analysis of a core collection of pepper resistant to *Potato virus Y*.

Julie Quenouille^{1,2}, Ludovic Saint-Felix^{1,2}, Benoit Moury¹ and Alain Palloix²

¹INRA, UR407 Pathologie Végétale, CS 60094, F-84143, Montfavet Cedex, France.

²INRA, UR1052 GAFL, CS 60094, F-84143, Montfavet Cedex, France.

Using resistant cultivars is recognized as an effective and environmental friendly method of crop protection. However, its main limit is the capacity of pathogens to counter-adapt and overcome plant resistances. In this context, many research efforts were deployed to propose strategies to handle adaptation of plant pathogen populations and maintain the durability of resistant cultivars (Kiyosawa, 1982; Wolfe, 1985; Mundt *et al.*, 2002; Pink, 2002; McDonald & Linde, 2002).

In three distinct pathosystems (plant-virus/oomycete/nematode), it was experimentally showed that the durability of a major resistance gene was highly dependent on the genetic background where it was introgressed (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012). In these studies, the resistance breakdown (RB) frequency of the major resistance gene decreased when it was introgressed into a partially resistant cultivar. All these studies suggested that the combination between a major resistance gene and a partially resistant genetic background was a promising strategy to control pathogen evolution and enhance the durability of major resistance genes.

In the plant/virus system, the protective effect of the genetic background on the RB frequency of the *pvr2*³ gene, conferring resistance to *Potato virus Y* (PVY) in pepper (*Capsicum annuum*), was mostly due to the additional level of quantitative resistance acting by reducing the viral accumulation (Quenouille *et al.*, 2012). Recently, we evidenced that the RB frequency of *pvr2*³ was a highly heritable trait (*i.e.* it was mainly under genetic control) and affected by four QTLs (Quenouille *et al.*, submitted). These results, obtained from a progeny between two *Capsicum annuum* lines, opened new ways for sustainable resistance breeding, but little is known on the availability of such QTLs and partially resistant background in pepper genetic resources.

In this context, the aim of our study was to estimate the diversity and availability of genetic backgrounds increasing the durability of the *pvr2*-mediated resistance in pepper genetic resources and to confirm (or to infirm) the relationship with factors affecting quantitative resistance. Our strategy was to select a core-collection of pepper landraces from different origins but carrying two closely related *pvr2* alleles and to measure the resistance breakdown frequencies of the alleles in these pepper accessions on the one hand, and the quantitative resistance controlled by their genetics backgrounds on the other hand.

Selection of the core-collection.

From the pepper (*Capsicum* spp.) germplasm collection maintained at INRA *Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes*, 862 non-redundant accessions were tested for resistance to PVY and 308 (35.7%) were found to be resistant to at least one PVY isolate (Sage-Palloix *et al.*, 2007). From these resistant accessions, a subset of 107 accessions was chosen based on their resistance to one or several PVY strains while maximizing the diversity of their geographic origins. These 107 accessions were further sequenced for the *pvr2* allele and 21 of them carried the *pvr2*³ allele, which was the most frequently observed, and five carried the *pvr2*⁴ allele (Charron *et al.*, 2008; Caranta, personal communication). To further test the durability of the *pvr2* alleles in different genetic backgrounds, we discarded the highly related accessions and selected the accessions which were homozygous for *pvr2*³ (16 accessions) or *pvr2*⁴ (4 accessions), resulting in a set of 20 inbred lines issued from American, African and Asian pepper landraces (figure 1). These two *pvr2* alleles differ only by one amino-acid substitution at position 205 (a glycine for *pvr2*³ and an aspartic acid for *pvr2*⁴) of the encoded eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), showed the same resistance specificity to different PVY isolates and were easily broken down compared to other *pvr2* alleles (Ayme *et al.*, 2007; Charron *et al.*, 2008; Moury, unpublished data). The INRA pepper collection was previously genotyped with 28 simple sequence repeats (SSR) markers (Nicolai *et al.*, in prep) and these SSRs were used to evaluate the genetic diversity among the 20 accessions used in this study. Genetic dissimilarity matrix between pairs of accessions were calculated with the DARwin 5.0.156 software (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006).

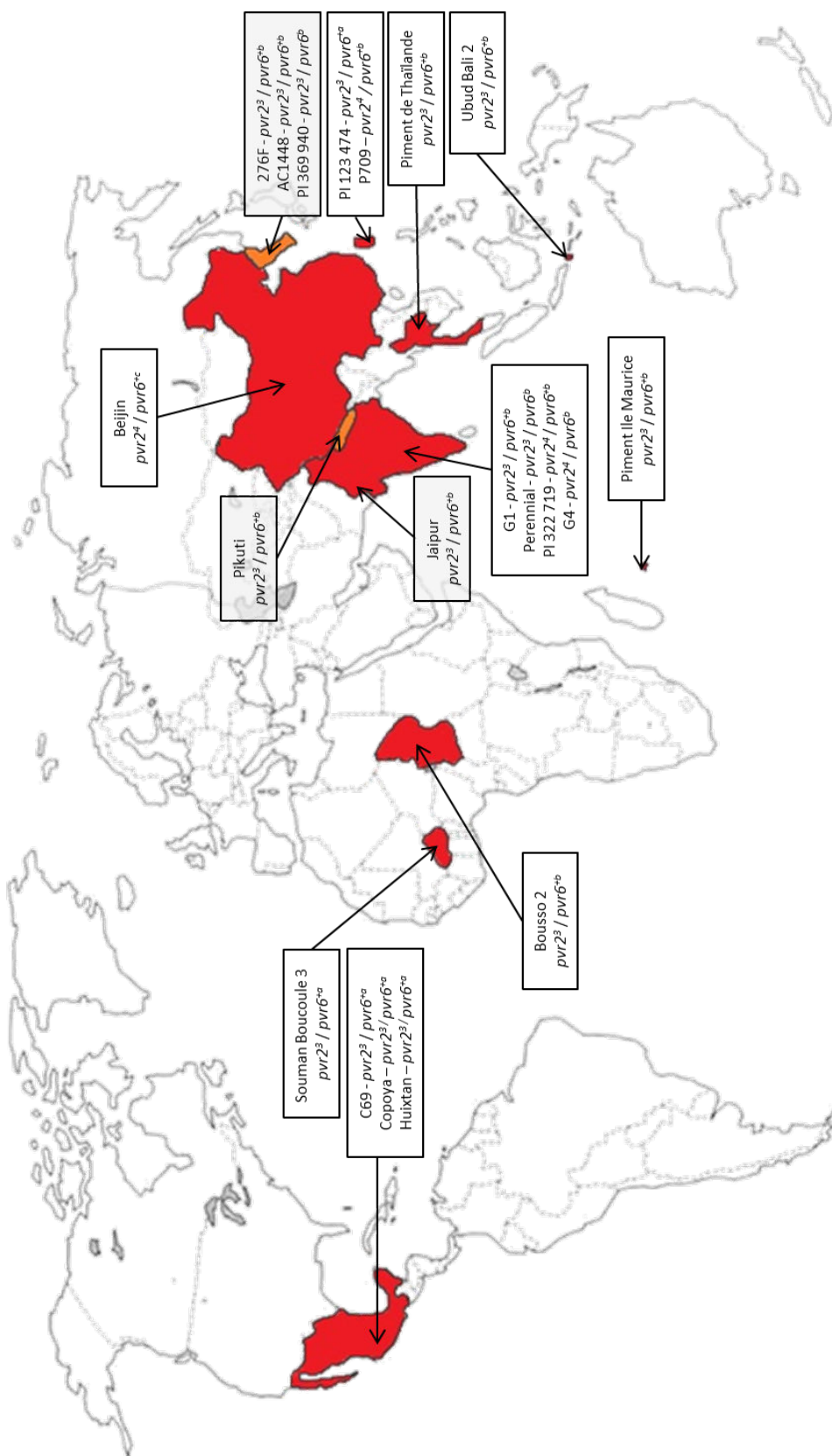


Figure 1: Global distribution of the 20 pepper accessions homozygous for the *pvr2³* or *pvr2⁴* alleles. Alleles of the *pvr2* and *pvr6* genes present in each accession are indicated.

The genetic dissimilarity, i.e. the percentage of different alleles between pairs of accessions, between the 20 accessions varied from 32% to 88.8 % with a mean equal to 62.9 ± 11.7 % (mean \pm standard deviation). This result indicates that, in spite of the choice of accessions based on two *pvr2* alleles among 23 (Charron *et al.*, 2008; Caranta, personal communication), the 20 accessions carried diverse genetic backgrounds. The 20 accessions represented 36.7% of the allelic diversity present in the whole *C. annuum* collection, according to the mean number of alleles per SSR locus (4.6 for the 20 accessions compared to 12.6 for the total *Capsicum annuum* collection)(supplementary data II; Nicolaï *et al.*, in prep).

Breakdown frequency of the *pvr2*^{3/4} resistance in the core collection.

To measure the resistance breakdown frequency (RB frequency) of *pvr2*³ or *pvr2*⁴ (*pvr2*^{3/4}), a recombinant PVY, named “CI chimera”, was inoculated to sixty seedlings with two expanded cotyledons (2-3 week old) per accession and were transferred into a climate-controlled room at 20-22°C and 12h light/day. The CI chimera is not infectious *per se* toward plants carrying *pvr2*^{3/4} resistant allele, i.e. in these plants mutants of the CI chimera possessing single non-synonymous substitutions in the genome-linked viral protein (VPg) cistron could be detected but not the “CI chimera” itself. The susceptible line Yolo Wonder (carrying the *pvr2*⁺ susceptibility allele) was used as a control for CI chimera’s infectivity and DH285 inbred line, issued from the F1 between Yolo Wonder and Perennial (carrying the *pvr2*³ resistance allele), has a high *pvr2*³ RB frequency (Montarry *et al.* 2011) and was used as a control for the RB capacity of the CI chimera. At 14 days post inoculation (dpi), all the Yolo Wonder susceptible plants showed mosaic symptoms and all plants carrying *pvr2*^{3/4} were symptom free. Mosaic or necrotic symptoms appeared progressively along the testing period in part of the plants of some accessions carrying *pvr2*^{3/4}. At 35 dpi, three uninoculated leaves per plants were sampled and used to test the presence of PVY by DAS-ELISA. In the same conditions, each case of systemic infection of plant carrying *pvr2*^{3/4} was previously shown to result from the occurrence of at least one RB mutation in the VPg cistron resulting in *pvr2*^{3/4} RB (Montarry *et al.*, 2011). For each accession, the RB frequency was calculated by the ratio of the number of systemically infected plants over the total number of inoculated plants. In this test, 80% of DH285 plants were broken down, attesting the high capacity of the CI chimera to break the *pvr2* resistance down in the test conditions.

Table I: Frequency of resistance breakdown (RB), viral accumulation (VA) and area under the disease progress curve (AUDPC) for 20 pepper accessions carrying the *pvr2*³ or *pvr2*⁴ allele inoculated with *Potato virus Y*.

Name	<i>pvr2</i> allele	RB frequency (n=60) ^w	VA (n=10) ^x	AUDPC (n=20) ^x	<i>pvr6</i> allele	
					Deletion ^y	SNPs ^z
Piment de Thaïlande	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.001 ^a	55 ^{cd}	No	<i>b</i>
276F	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.006 ^{ab}	85 ^{gh}	No	<i>b</i>
G1	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.010 ^{bc}	78 ^{fg}	No	<i>b</i>
C69	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.063 ^{cde}	54 ^c	No	<i>a</i>
AC 1448	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.103 ^{def}	67 ^{de}	No	<i>b</i>
Piment Ile Maurice	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.166 ^{efg}	72 ^{ef}	No	<i>b</i>
PI 123 474	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.173 ^{efg}	69 ^{de}	No	<i>a</i>
Pikuti	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.202 ^{efg}	43 ^b	No	<i>b</i>
Ubud Bali 2	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.215 ^{bcdefg}	43 ^b	No	<i>b</i>
Copoya	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.250 ^{efgh}	95 ^h	No	<i>a</i>
Bouso 2	<i>pvr2</i> ³	0 ^a	0.269 ^{bcdefgh}	70 ^{de}	No	<i>b</i>
Beijin	<i>pvr2</i> ⁴	0 ^a	0.664 ^{gh}	61 ^{cd}	No	<i>c</i>
P 709	<i>pvr2</i> ⁴	1.6 ^a	0.014 ^{cd}	35 ^a	No	<i>b</i>
Jaipur	<i>pvr2</i> ³	1.6 ^a	0.398 ^{efgh}	88 ^{gh}	No	<i>b</i>
Perennial	<i>pvr2</i> ³	1.6 ^a	0.406 ^{efgh}	41 ^b	Nt 89 to 170	<i>b</i>
Huixtan	<i>pvr2</i> ³	1.6 ^a	0.416 ^{gh}	90 ^h	No	<i>a</i>
Souman Boucoule 3	<i>pvr2</i> ³	3.3 ^a	0.142 ^{efg}	71 ^e	No	<i>a</i>
PI 322 719	<i>pvr2</i> ⁴	5 ^a	1.010 ^{hi}	74 ^{ef}	No	<i>b</i>
PI 369 940	<i>pvr2</i> ³	40 ^b	2.141 ⁱ	74 ^{ef}	Nt 89 to 170	<i>b</i>
G4	<i>pvr2</i> ⁴	52.5 ^b	2.804 ⁱ	75 ^{ef}	Nt 89 to 170	<i>b</i>

^w Letters represent homogeneous groups identified by Fisher exact tests at the 5% type-I error threshold (corresponding to a 0.00027 threshold after Bonferroni correction). RB frequency was evaluated after inoculation with the PVY CI chimera.

^x Letters represent homogeneous groups identified by pairwise comparisons using Wilcoxon tests at the 5% type-I error threshold with Benjamini & Yekutieli correction. RB frequency was evaluated after inoculation with the PVY CI chimera VPg-N.

^y In three accessions a 82 nucleotide (nt) deletion (from nucleotide 89 to 170 of wild-type *pvr6* allele) modified the open reading frame and resulted in a premature stop codon and a truncated nonfunctional protein (Ruffel *et al.* 2006).

^z Letters represent SNP signatures in the eIF(iso)4E open reading frame (ORF) sequences. "a" indicates sequence identical to the *pvr6+* allele of Yolo Wonder described in Ruffel *et al.* (2008), "b" indicates a G→A substitution at position 268, a C→A substitution at position 483 and a C→T substitution at position 537 and "c" indicates a T→C substitution at position 79. Substitutions at position 483 and 537 are synonymous. Substitutions at position 79 and 268 are non synonymous and change a proline to a serine at position 27 and an alanine to a threonine at position 90, respectively.

Among the 20 accessions, the RB frequency of *pvr2*^{3/4} varied from 0% to 52.5%, with highly significant differences between accessions (Pearson Chi² test, P<0.001). The 20 accessions were classified into two groups (pairwise Fisher exact tests at 5% type-I error threshold and Bonferroni correction). For 18 accessions, the *pvr2*^{3/4} resistance was not or rarely broken down (RB frequency <5%) and for the two accessions PI369940 and G4, the *pvr2*^{3/4} resistance was broken down at high frequencies (40 and 52.5%, respectively; Table I). For PI369940 and G4, all infected plants were checked for the presence of RB mutations in the PVY VPg cistron. For these plants, total RNA was extracted and the PVY VPg cistron was amplified by RT-PCR and sequenced according to Moury *et al.* (2004). For four infected plants of PI369940, we failed to sequence the PVY VPg cistron. For the other 20 PI369940 and for 31 G4 infected plants, all VPg sequences obtained differed from the initial VPg sequence of CI chimera by one amino acid substitution. Among the mutations detected, four of them were previously shown to confer resistance-breaking properties (Ayme *et al.*, 2006), four were previously showed to be candidates for resistance-breaking properties (Montarry *et al.* 2011) and one has not been observed before (supplementary data I). Four G4 plants and one PI369940 plant were infected by a mixture of two single VPg mutants. These results confirmed the perfect correspondence between the systemic infection of plants carrying *pvr2*^{3/4} resistance allele after inoculation by CI chimera and the occurrence of RB events. The high RB frequency was not associated with a particular allele at the *pvr2* locus, since PI369940 carries *pvr2*³ whereas G4 carries *pvr2*⁴. Consequently, differences observed between the two former accessions and the 18 others can be attributed to the effect of the plant genetic background. Our results indicated that genetic backgrounds favourable to the durability of *pvr2*-mediated resistances are frequent among the genetic resources of pepper.

Differential selection pressure exerted by the genetic background

In DH285 plants, 67% of cases of RB events were associated to selection of PVY mutants carrying an aspartic acid to an asparagine substitution at position 119 of the VPg (named VPg-N mutation)(Montarry *et al.*, 2011). In our test, we checked the presence of the VPg-N mutation in 25 infected DH285 plants by dCAPS analyses as described in Montarry *et al.* (2011). Our results showed that 64% of RB events of DH285 plants were associated to the presence of VPg-N mutation (table II), which was not significantly different from the percentage obtained by Montarry *et al.* (2011) (Fisher exact test, p=0.16). We compared the

proportions of plants where the VPg-N mutant were observed (including mixed-infected plants) between DH285, G4 and PI369940. For the four VPg sequences lacking for PI369940, the presence of the VPg-N mutant was also assessed by dCAPS analyses and results showed that these RB events were not associated to the selection of this VPg-N mutation. Together with the sequence data, the percentage of RB events associated with the selection of the VPg-N mutation was equal to 39% (17/31) for G4 and 25% (7/24) for PI369940 (table II).

Table II: Frequency of *pvr2*^{3/4} resistance breakdown (RB) events associated with the selection of a PVY mutant carrying an aspartic acid to asparagine substitution at position 119 of the VPg (VPg-N mutation).

Accession	Proportion of VPg-N mutation ^y	Class ^z
PI369940 (<i>pvr2</i> ³ / <i>pvr2</i> ³)	25 (7/24)	a
G4 (<i>pvr2</i> ⁴ / <i>pvr2</i> ⁴)	55 (17/31)	ab
DH285 (<i>pvr2</i> ³ / <i>pvr2</i> ³)	64 (16/25)	b

^y plants infected by a PVY population carrying the VPg-N mutation / total number of PVY infected plantes.

^z classes represent homogeneous groups identified by Fisher exact tests at the 5% type-I error threshold (corresponding to a 0.017 threshold after Bonferroni correction).

Our results revealed significant differences between PI369940 and DH285 ($p=0.012$) but not between PI369940 and G4 ($p=0.037$) or G4 and DH285 ($p=0.17$) (Fisher exact test at the 5% type-I error threshold corresponding to a 0.017 threshold after Bonferroni correction). The proportion of RB events associated with the VPg-N mutation varied according to the plant genotype. This result was not be associated to the *pvr2* allele, since both PI369940 and DH285 carry *pvr2*³ (and differ in the selection of VPg-N mutation), whereas G4 (*pvr2*⁴) and HD285 (*pvr2*³) did not differ in their preferential selection of the VPg-N mutation. Consequently, the difference observed between PI369940 and DH285 can be associated to the genetic background, which selects more or less frequently the VPg-N mutation. This result showed that various plant genetic backgrounds can exert differential selection pressure on RB mutants. This is the second study which evidenced the differential selection effects due to plant genetic factors after the study of Lê Van *et al.* (in press) for the apple / *Venturia inaequalis* pathosystem.

Measure of the quantitative resistance controlled by the genetic background of the pepper accessions.

It was previously shown that a large part of the variation of the RB frequency of *pvr2*³ observed in a segregating progeny could be attributed to the level of quantitative resistance conferred by the genetic background (Quenouille *et al.* in press). To explore this relationship in diversified genetic backgrounds, we tested the level of quantitative resistance conferred by the genetic backgrounds of each of the 20 pepper accessions. A *pvr2*^{3/4}-breaking mutant of the CI chimera, named “CI chimera VPg-N”, was inoculated to 20 plants per accession. The CI chimera VPg-N differed from the CI chimera by only one amino acid substitution (an aspartic acid to an asparagine) at position 119 of the VPg, allowing the breakdown of *pvr2*³ and *pvr2*⁴. The CI chimera VPg-N permits to get rid of the effect of *pvr2*-mediated resistance and to reveal the effect of the genetic background. This RB mutation was selected because it is the most frequently observed (67%) after breakdown of *pvr2*³ resistance by the CI chimera (Montarry *et al.* 2011). Symptoms were assessed every seven days until 35 dpi and for each plant the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated according to (Caranta & Palloix, 1996). At 36 dpi, the virus accumulation (VA) was evaluated independently on 10 plants per accession by semi-quantitative DAS-ELISA according to Ayme *et al.* (2006). Significant variations of VA and AUDPC were observed between accessions ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test) with means of VA varying from 0.001 to 2.804 and means of AUPDC varying from 35 to 95 (table I). Nine and eight groups of VA and AUDPC, respectively, were identified among the 20 peppers accessions (pairwise comparisons using Wilcoxon tests at 5% type-I error threshold after Benjamini & Yekutieli correction), showing a large diversity of the level of quantitative resistance conferred by the accession’s genetic backgrounds. No significant correlation was observed between VA and AUDPC ($p = 0.3$; Spearman correlation test). This lack of correlation between VA and AUDPC (or plant damages) was previously observed for different plant/virus interactions (Sáenz *et al.*, 2000; Pagán *et al.*, 2007; Araya *et al.*, 2011) and reveals different levels of tolerance between the 20 pepper accessions. Here, tolerance is defined as the capacity of the host plant to reduce the effect of viral infection on its fitness (Jeger *et al.*, 2006).

In order to evaluate how the resistance or tolerance level of the 20 accessions could affect the durability of the *pvr2*-mediated resistance, we looked at the relationship between

VA or AUDPC and the frequency of *pvr2*^{3/4} RB. The effect of the factors 'VA' or 'AUDPC' on the binomial response 'proportion of broken down/non broken down plants for each accession' was tested with a one-way generalized linear model using a logit function, according to Quenouille *et al.* (in press). The factor VA displayed a significant effect ($p < 0.001$, Chi² test) and the model fit was very satisfactory (McFadden $R^2 = 0.84$, Figure 3). The factor AUDPC displayed a significant effect ($p < 0.001$, Chi² test) but the model fit was poorly satisfactory (McFadden $R^2 = 0.05$). These results reveal a high effect of viral accumulation and little effect of AUDPC on the frequency of *pvr2*-mediated resistance. Our study broadens the results obtained by Quenouille *et al.* (in press), extending the relationship between the level of viral accumulation and the frequency of *pvr2*-mediated resistance previously observed in a pepper progeny to a pepper core collection with diversified genetic backgrounds.

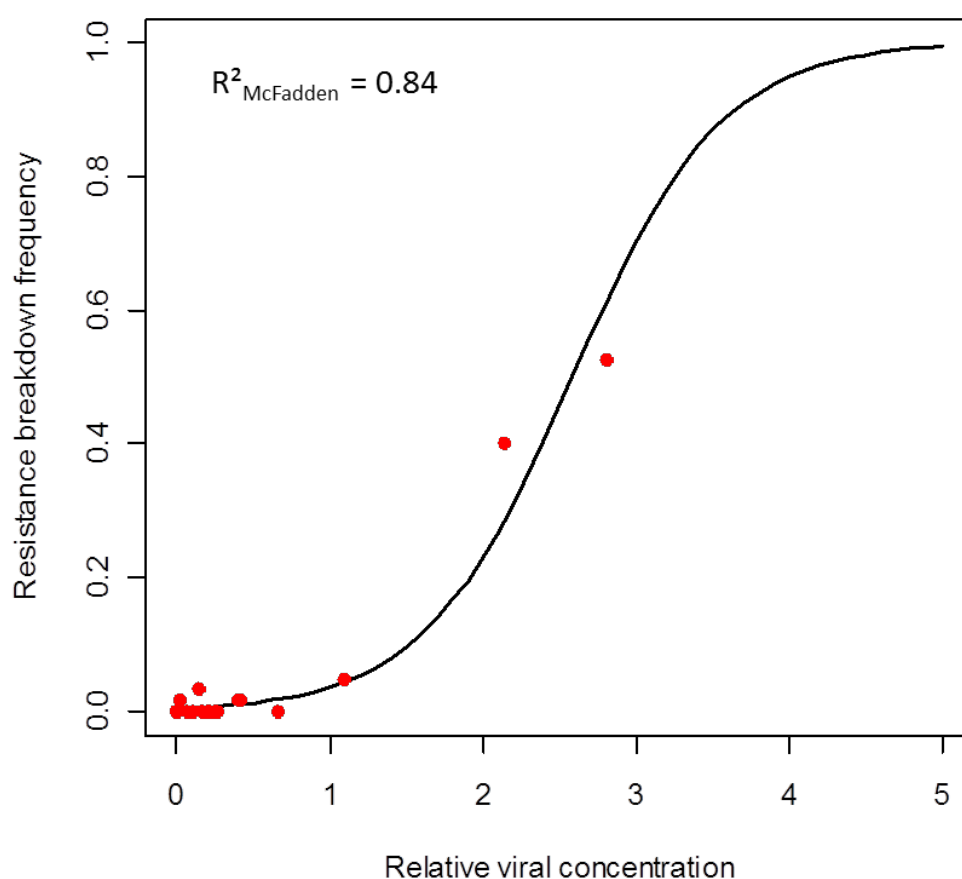


Figure 3: Relationship between the relative viral accumulation and the *pvr2* resistance breakdown frequency in 20 pepper accessions carrying the *pvr2*³ or *pvr2*⁴ alleles (red dots). The black line corresponds to values predicted by the generalized linear model.

Effect of a locus in the pepper genome on *pvr2*^{3/4} RB frequency

Using a DH progeny issued from the F1 between Yolo Wonder and Perennial, we showed that the *pvr6* gene encoding the eukaryotic initiation factor (iso)4E (eIF(iso)4E), an isoform of eIF4E encoded by the *pvr2* gene, co-located with a major QTL ($R^2=0.40$) affecting the *pvr2*³ RB frequency and a major QTL ($R^2=0.35$) affecting viral accumulation (Quenouille *et al.*, submitted). For these two QTLs, the Perennial allele strongly increased the frequency of *pvr2*³ RB and VA. Compared to the Yolo Wonder *pvr6*⁺ allele, Perennial's *pvr6* allele carries a 82 nucleotide deletion (from nucleotide 89 to 170) which modifies the open reading frame (ORF) by insertion of a premature stop codon and results in a truncated, nonfunctional protein (Ruffel *et al.* 2006). To explore if this "natural" knockout (KO) of the *pvr6* allele was present among the 20 pepper accessions, and if it was associated to the observed variations of frequency of *pvr2*^{3/4} RB and VA, we sequenced the eIF(iso)4E ORF of the 20 pepper accessions. Total RNA was extracted from leaves of the 20 accessions and eIF(iso)4E cDNA was amplified and sequenced according to Ruffel *et al.* (2006). The eIF(iso)4E ORF sequences were aligned with the sequences of the two eIF(iso)4E-*pvr6* alleles described in Ruffel *et al.*, (2006), the Yolo Wonder *pvr6*⁺ allele (Genbank : DQ022080) and the Perennial *pvr6* allele (Genbank : DQ022083)(supplementary data III). Alleles of the *pvr6* gene carried by each pepper accession are indicated in Table II. Among the 20 pepper accessions, three carried the same KO *pvr6* allele: Perennial, PI369940 and G4.

Interestingly, the two accessions PI369940 and G4 which showed a significantly higher RB frequency of *pvr2*^{3/4} and the two highest VA values carried the *pvr6* allele. On the opposite, all plants carrying the *pvr6*⁺ allele encoding a functional eIF(iso)4E protein displayed a very low RB frequency and a varying, but lower VA. The *pvr6* allele is also present in the Perennial accession, which showed a very low RB frequency and this could invalidate the relationship between *pvr6* alleles and both RB frequency and VA. However, Quenouille *et al.* (submitted) showed that, in the Perennial genotype, this negative effect was compensated by three other QTLs that decreased the *pvr2*³ RB frequency. Taken together, these results show that the *pvr6* gene is a good candidate to explain the observed variation of *pvr2* RB frequency and functional validation assay of the role of *pvr6* will be necessary. As in a Perennial progeny (Quenouille *et al.*, submitted), the high frequency of *pvr2*^{3/4} RB

observed in G4 and PI369940 could therefore be interpreted as a “destabilizing” effect of the *pvr6* KO allele and this destabilizing effect resulted from an increase of VA.

This study provides the first evaluation of the availability, in plant genetic resources, of genetic backgrounds affecting the durability of a major resistance gene. Among a core-collection of 20 pepper accessions, we observed a high diversity of quantitative resistance levels conferred by the genetic background with highly resistant and tolerant genetic backgrounds or more susceptible backgrounds. In term of durability of the *pvr2*³ and *pvr2*⁴ major resistance alleles, the pepper accessions were divided into two groups: rarely broken down or frequently broken down, the latter group including only two pepper accessions. This result shows that, in pepper genetic resources, the majority of the plant genetic backgrounds are favorable to the durability of the *pvr2*-mediated resistance. The relationship between the *pvr2*^{3/4} RB frequency and the level of quantitative resistance conferred by the genetic background showed that the *pvr2*^{3/4} RB frequency was strongly dependent on this quantitative resistance. These results are in accordance with previous studies showing that the RB frequency of a major gene is reduced when it was introgressed into a partially resistant cultivar (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012). In addition to the RB frequency, the distribution of the different RB mutants depended on the plant accession, suggesting a differential selection effect by the plant genetic background. The analysis of the eIF(iso)4E coding sequence leads us to suggest that the observed variations of RB frequency could be mainly explained by the plant allele at the *pvr6* locus. If our hypothesis is correct, our results showed that the largest part of variation of RB frequency among the 20 pepper accessions was due to the occurrence of a “destabilizing” gene, *pvr6*, rather than to the occurrence of favorable genetic backgrounds. This result indicates that breeding “accidents” could happen when a major resistance gene is introgressed into a new genetic background. However, the high correlation between the frequency of breakdown of a major resistance gene and the viral accumulation suggests that such accidents could be avoided if the major resistance gene is introgressed into a partially resistant cultivar. By contrast, the weak relationship between symptom intensity and the frequency of breakdown of a major resistance gene raises the necessity to use the pathogen accumulation level as quantitative resistance criterion rather than symptom intensity.

Supplementary data:
Supplementary data I: VPg mutations observed in PVY populations infecting G4 (*pvr2*⁴/*pvr2*⁴) or PI369940 (*pvr2*³/*pvr2*³) after inoculation with PVY chimera CI.

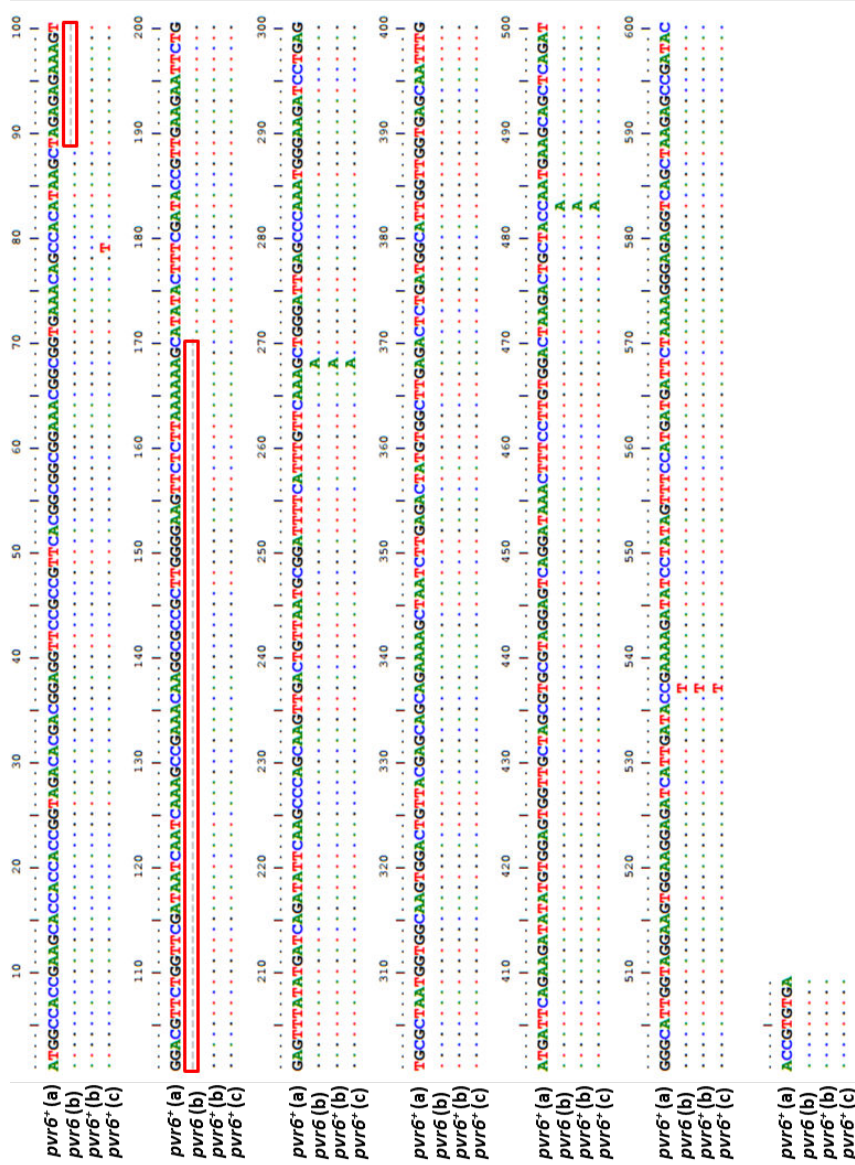
Accession	VPg mutants															
	Known <i>pvr2</i> ³ breaking mutations (Ayme <i>et al.</i> , 2006)				Suspected <i>pvr2</i> ³ breaking mutations (Montarry <i>et al.</i> , 2011)				First reported		Mixed infected				Unknown	Total
	S ₁₀₁ G	T ₁₁₅ K	D ₁₁₉ N	S ₁₂₀ C	D ₁₁₉ E	D ₁₁₉ G	S ₁₂₀ I	T ₁₂₂ K	D ₁₁₉ A	S ₁₀₁ G / D ₁₁₉ N	D ₁₁₉ G	D ₁₁₉ N/ D ₁₁₉ E	D ₁₁₉ N/ S ₁₂₀ C	D ₁₁₉ N/ S ₁₂₀ I		
G4	1	2	12	1	2	6	1	1	0	1	1	1	1	1	0	31
PI369940	1	0	6	2	2	5	2	0	1	0	1	0	0	0	4	24

Supplementary data II: Allele number for simple sequence repeats (SSR) markers .

Marker	chromosome	origin	Allele number ^a (20 accessions carrying <i>pvr2</i> ³ or <i>pvr2</i> ⁴)	Allele number ^b (collection <i>C. annum</i>)
Epms397	P1	Nagy <i>et al.</i> (2007)	7	18
Gpms-178	P1	Nagy <i>et al.</i> (2007)	6	21
Epms-755	P2	Portis <i>et al.</i> (2007)	3	8
Gpms-100	P2	Nagy <i>et al.</i> (2007)	3	8
Gpms169	P2	Nagy <i>et al.</i> (2007)	2	11
Gpms-6	P2	Nagy <i>et al.</i> (2007)	5	25
Epms-386	P3	Nagy <i>et al.</i> (2007)	7	16
Gpms-93	P3	Nagy <i>et al.</i> (2007)	3	17
Hpms1-111	P3	Lee <i>et al.</i> (2004)	4	12
HpmsE008	P3	Yi <i>et al.</i> (2006)	2	5
Gpms-165	P5	Nagy <i>et al.</i> (2007)	11	42
Hpms1-5	P6	Lee <i>et al.</i> (2004)	8	20
HpmsE088	P6	Yi <i>et al.</i> (2006)	3	3
Epms426	P7	Nagy <i>et al.</i> (2007)	7	12
Gpms-161	P7	Nagy <i>et al.</i> (2007)	7	11
Epms-310	P8	Nagy <i>et al.</i> (2007)	5	15
Epms342	P8	Nagy <i>et al.</i> (2007)	6	13
Epms-419	P9	Nagy <i>et al.</i> (2007)	2	7
Hpms2-24	P9	Lee <i>et al.</i> (2004)	3	11
HpmsE051	P9	Yi <i>et al.</i> (2006)	2	5
HpmsE013	P10	Yi <i>et al.</i> (2006)	5	10
Epms-331	P11	Nagy <i>et al.</i> (2007)	10	17
Epms-391	P11	Nagy <i>et al.</i> (2007)	2	6
Gpms-101	P11	Nagy <i>et al.</i> (2007)	2	4
Gpms29	P11	Nagy <i>et al.</i> (2007)	4	8
Gpms-197	P12	Nagy <i>et al.</i> (2007)	7	17
HpmsE064	P12	Yi <i>et al.</i> (2006)	1	4
HpmsE128	P12	Yi <i>et al.</i> (2006)	2	4
Mean allele/marker			4.607142857	12.5

^a Allele number for each SSR marker in the 20 accessions of *Capsicum annum* used in this study.

^b Allele number for each SSR marker in the total collection of 1018 accessions of *Capsicum annum* maintained at INRA *Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes* (Nicolai *et al.*, in prep)



Supplementary data III: Alignment of nucleotide eIF(iso)4E open reading frame from pepper accessions for one of the four alleles.

pvr6 allele were named according to the presence/absence of a 82nt deletion (from nucleotide 89 to 170) : *pvr6* indicates the presence of the deletion and *pvr6+* indicates the absence of the deletion. Letters represents the SNP polymorphisms in the eIF(iso)4E open reading frame (ORF) sequences. “a” indicates sequence identical to the *pvr6+* allele of Yolo Wonder described in Ruffel et al. (2008), “b” indicates a G→A substitution at position 268, a C→A substitution at position 483 and a C→T substitution at position 537 and “c” indicates a T→C substitution at position 79. Pepper accessions homozygous for *pvr6*^{+a} are C69, Copoya, Huixtan, PI 123474 and Souman Boucoule 3. Pepper accessions homozygous for *pvr6*^{+b} are 276F, AC 1448, Bousso 2, G1, Jaipur, P 709, PI 322719, Pikuti, Piment de thaïlande, Piment Ile Maurice and Ubud Bali 2. Pepper accession homozygous for *pvr6*^{+c} is Beijin. Pepper accessions homozygous for the knock-out *pvr6*^o allele are Perennial, G4 and PI 369940.

References:

- Araya, C., Peña, E., Salazar, E., Román, L., Medina, C., Mora, R., Aljaro, A. and Rosales, I.M.** (2011). Symptom severity and viral protein or RNA accumulation in lettuce affected by big-vein disease. *Chilean journal of agricultural research* **71**: 63–72.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury B.** (2007). Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* **88**: 1594–1601.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A. and Moury, B.** (2006). Different Mutations in the Genome-Linked Protein VPg of Potato virus Y Confer Virulence on the *pvr23* Resistance in Pepper. *MPMI* **19**: 557–563.
- Brun, H., Chèvre, A-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. and Andrivon, D.** (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in Brassica napus. *New Phytologist* **185**: 285–299.
- Caranta, C. & Palloix, A.** (1996). Both common and specific genetic factors are involved in polygenic resistance of pepper to several potyviruses. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 15–20.
- Charron, C., Nicolaï, M., Gallois, J., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta C.** (2008). Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal* **54**: 56–68.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, KS. and Robaglia, C.** (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant Journal* **32**: 927–934.
- Fournet, S., Kerlan, MC., Renault, L., Dantec, JP., Rouaux, C. and Montarry, J.** (2012). Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathology*: no–no.
- Jeger, MJ., Seal, SE. and Van den Bosch, F.** (2006). Evolutionary epidemiology of plant virus disease. In: Thresh JM, ed. *Plant Virus Epidemiology*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 163–203.
- Kiyosawa.** (1982) Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 93–117.
- McDonald, BA. & Linde, C.** (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349–379.
- Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V. and Moury B.** (2011). Genetic background matters: a plant–virus gene for gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Molecular Plant Pathology*.
- Mundt, C., Cowger, C. and Garrett, K.** (2002). Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* **124**: 245–252.
- Pagán, I., Alonso-Blanco, C. and García-Arenal, F.** (2007). The relationship of within-host multiplication and virulence in a plant-virus system. *PLoS ONE* **2**: e786.
- Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B.** (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**: 190–199.

Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P.(2006). **DARwin** software <http://darwin.cirad.fr/>

Pink D. (2002). Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* **124**: 227–236.

Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. and Moury B. (2012). Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular Plant Pathology*: n/a–n/a.

Ruffel, S., Gallois, J-L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. and Caranta C. (2006). Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol* **87**: 2089–2098.

Sáenz, P., Cervera, MT., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, JB., Riechmann, JL. and García, JA. (2000). Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *Journal of General Virology* **81**: 557–566.

Sage-Palloix, A.M., Jourdan, F., Phaly, T., Nemouchi, G., Lefebvre, V. and Palloix, A. (2007). Structuring genetic diversity in pepper genetic resources: distribution of horticultural and resistance traits in the inra pepper germplasm. In *Progress in research on Capsicum & Eggplant*. Niemirowicz-Szczytt K. (Ed.), University of Life Sciences Press, Warsaw, Poland, pp.33:42.

Wolfe, M. (1985). The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 251–273.

Chapitre IV :

Vers la validation fonctionnelle de l'effet du gène *pvr6* sur la durabilité du gène de résistance *pvr2*

Question de recherche: Le gène *pvr6* est-il le gène sous-jacent au QTL affectant la fréquence de contournement localisé sur le chromosome 3 (QTL RB-3) ?

Stratégie : Validation fonctionnelle du gène *pvr6* par deux approches expérimentales :

- (i) L'extinction du gène *pvr6* chez des lignées HD de piment porteuses de l'allèle *pvr6*⁺ codant une protéine eIF(iso)4E fonctionnelle.
- (ii) Expression de l'allèle *pvr6*⁺ chez des lignées HD de piment porteuses de l'allèle *pvr6* codant une protéine eIF(iso)4E non-fonctionnelle.

Principaux résultats :

Les résultats obtenus lors des essais de validation fonctionnelle par la méthode du VIGS (virus induced gene silencing) n'ont montré aucun effet de l'extinction du gène *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY chimère CI. Ce résultat résulte soit du fait que *pvr6* n'est pas le gène sous-jacent au QTL RB-3, soit que notre dispositif expérimental n'était pas adapté pour pouvoir détecter l'effet de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY.

Les résultats obtenus par expression transitoire de eIF(iso)4E (codé par l'allèle *pvr6*⁺) par le PVY montre, dans plusieurs tests indépendants, une réduction de la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY-eIF(iso)4E (exprimant eIF(iso)4E) par rapport au PVY-GFP (témoin). L'expression transitoire d'un eIF(iso)4E fonctionnel dans une plante porteuse de l'allèle KO *pvr6* induit donc une baisse de la fréquence de contournement du PVY, ce qui est le résultat attendu si *pvr6* est le gène sous-jacent au QTL RB-3. La différence observée est, cependant, trop faible pour pouvoir valider l'effet du gène *pvr6*.

A. Introduction

Nous avons mis en évidence, dans le chapitre 2, que le pic du QTL majeur de durabilité (QTL RB-3), expliquant 40% de la variabilité de la fréquence de contournement de *pvr2*³, coïncide avec le gène *pvr6* codant pour le facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E, une isoforme du facteur eIF4E codé par le gène *pvr2*. Dans cette étude, l'allèle *pvr6*⁺ codant un eIF(iso)4E fonctionnel est très favorable à la durabilité du gène de résistance *pvr2* (les lignées porteuses de *pvr6*⁺ sont, en moyenne, contournées à 0.3%) alors que l'allèle *pvr6* codant un eIF(iso)4E non-fonctionnel (allèle knock-out naturel) est très défavorable à la durabilité du gène de résistance *pvr2* (les lignées porteuses de *pvr6* sont, en moyenne, contournées à 30%). Dans le chapitre 3, l'analyse de la séquence codant l'eIF(iso)4E chez 20 accessions de piment révèle que les deux seules accessions présentant un taux de contournement du gène *pvr2* élevé (40% et 52,5% contre moins de 5% pour les 18 autres accessions) sont porteuses de l'allèle KO *pvr6*. Tous ces résultats suggèrent un rôle important de *pvr6* dans la durabilité du gène de résistance *pvr2*. Dans ce contexte, l'objectif des expériences présentées dans ce chapitre IV est de valider fonctionnellement l'effet du gène *pvr6* sur la fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2*³. Du fait que la transformation stable du piment par transgénèse n'est actuellement pas utilisable en routine, nous avons mis en place deux stratégies parallèles d'expression transitoire : (i) l'extinction du gène *pvr6* chez des lignées porteuses de l'allèle *pvr6*⁺ et (ii) la complémentation fonctionnelle grâce à l'expression de l'allèle *pvr6*⁺ chez une lignée porteuse de l'allèle KO *pvr6*.

B. Extinction du gène *pvr6* induite par un virus (VIGS)

L'extinction post-transcriptionnelle d'un gène ou PTGS (*post transcriptional gene silencing*) est un phénomène naturel des plantes et des animaux déclenché par la présence de molécules d'ARNdb (ARN double brin)(Pfeffer *et al.*, 2003). La dégradation des ARNdb, par une nucléase de type RNase III appelée Dicer, produit de petits ARN interférants (siARN). Ces siARN vont ensuite servir de guide pour un complexe multi-enzymatique, le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) qui va dégrader tous les ARN messagers ayant une séquence homologue aux siARN (pour plus d'informations sur le PTGS voir Pfeffer *et al.* (2003). Le PTGS est reconnu comme un mécanisme de défense antivirale contre les virus à ARN qui se répliquent *via* un intermédiaire ARNdb. L'induction du PTGS par un virus est

appelé VIGS (Virus induced gene silencing). Grâce à ce phénomène, il est possible d'induire l'inactivation de gènes endogènes à la plante en infectant des plantes avec des virus recombinants dans lesquels une partie de la séquence codante du gène à inactiver a été introduite.

Dans cette étude, nous utiliserons la méthode VIGS afin d'éteindre l'expression du gène *pvr6* chez des lignées *pvr6⁺*. Si *pvr6* est bien le gène sous-jacent au QTL de durabilité RB-3, l'extinction de l'allèle *pvr6⁺* devrait provoquer une augmentation de la fréquence de contournement du gène *pvr2³* par le PVY.

1. Obtention de *Tobacco rattle virus* (TRV) recombinants

Le *Tobacco rattle virus* (TRV) a été utilisé comme vecteur viral pour déclencher le VIGS. Le TRV est un virus à ARN bipartite (ARN1 et ARN2) du genre des *Tobravirus*. Nous avons utilisé les vecteurs pTRV1 et pTRV2 décrits par Liu *et al.* (2002) contenant, respectivement, les ARN 1 et 2 du TRV. Dans la construction pTRV2, deux gènes non essentiels de l'ARN2 ont été remplacés par un site multiple de clonage (MCS) permettant l'insertion de la séquence partielle du gène de la plante que l'on veut éteindre (Liu *et al.*, 2002).

Un plasmide pTRV2-PDS contenant un fragment de 320 paires de bases (pb) du gène phytoène désaturase (PDS) de *Nicotiana benthamiana* était préalablement disponible au laboratoire et a été utilisé comme témoin pour l'efficacité du VIGS (Dibos, 2006). La PDS intervient dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes et son extinction provoque un blanchiment des feuilles, ce qui permet une évaluation directe et rapide de l'efficacité du VIGS en fonction des génotypes de plantes (figure 1). Pour nos expériences, nous avons construit trois nouveaux plasmides : pTRV2-mCherry, pTRV2-eIF(iso)4E-1 et pTRV2-eIF(iso)4E-2. Un fragment de 215pb du gène mCherry (correspondant aux nucléotides 451 à 666) a été amplifié par PCR à partir d'une séquence de synthèse (GenBank AY678264) (Shaner *et al.*, 2004) avec les amorces compatibles Gateway mCherry-F/R (tableau supplémentaire I). Deux fragments de 88pb (nucléotides 1 à 88) et de 299pb (nucléotides 227 à 525) de la séquence codant pour eIF(iso)4E (*pvr6*) ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNc de feuilles de piment (Yolo Wonder) avec les amorces compatibles Gateway eIF(iso)4E-1-F/R et eIF(iso)4E-2-F/R (tableau supplémentaire I). Le clonage des fragments PCR dans le plasmide pTRV2 a été réalisé en utilisant le kit de clonage Gateway® commercialisé par INVITROGEN.



Figure 1: Plante de piment dont l'expression du gène phytoène désaturase (PDS) a été éteint via l'infection avec le TRV-PDS.

Les bactéries pGV2260 d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant les constructions pTRV1 ou pTRV2 sont mises en culture à 28°C jusqu'à atteindre une DO600 (densité optique à 600nm) finale de 1. Les souches bactériennes contenant pTRV1 ou pTRV2 sont ensuite mélangées (ratio 50 :50) puis le mélange est utilisé pour infiltrer de jeunes plantes de *Nicotiana benthamiana*. Les plantes sont maintenues à l'obscurité pendant 72h puis sont placés en chambre de culture avec une photopériode de 14h jour (24°C) et 10h nuit (20°C). Au bout de 10 jours, les feuilles de quatre plantes de tabac (pour chacune des quatre constructions) ont été prélevées, testées pour la présence de TRV par DAS-ELISA et conservées à 4°C selon la méthode de Bos (1969). La conservation des différents TRV recombinants sous forme de tissu végétal infecté déshydraté permet ensuite de régénérer une source d'inoculum de TRV par inoculation mécanique de plantes de *Nicotiana benthamiana* à partir du matériel végétal conservé et ainsi de s'affranchir de l'étape d'agro-infiltration qui est plus longue et nécessite de prendre plus de précautions.

2. Tests préliminaires

Avant l'utilisation de la méthode VIGS pour valider l'effet de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³, plusieurs tests préliminaires ont été mis en place pour : vérifier l'efficacité du VIGS (le gène *pvr6* est-il bien éteint ?), choisir les lignées HD à tester et vérifier que la présence du TRV n'affecte pas la capacité de contournement du PVY.

a) Efficacité du VIGS

Afin de vérifier si nos constructions induisent bien une extinction de l'expression du gène *pvr6*, nous avons inoculé mécaniquement 8 plantes de Yolo Wonder (porteuses de *pvr6⁺*) avec chacune des constructions TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2 et sept plantes avec le TRV-mCherry qui serviront de contrôle de l'expression endogène de *pvr6*. Vingt-huit jours après inoculation (jai), 0.5g de feuilles apicales ont été prélevées, broyées dans 2mL de tampon de broyage et utilisées pour tester la présence du TRV. 200µL de broyat ont ensuite été utilisés pour extraire les ARN totaux en utilisant le kit Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). Ces ARN ont été utilisés pour amplifier l'ARNm d'eIF(iso)4E avec les amorces RT-eIF(iso)4E-F/R (amplifiant les nucléotides 411 à 583) et l'ARNm de l' α -tubuline avec les amorces RT- α -tubuline-R/F (Tableau supplémentaire I). L' α -tubuline est un gène de ménage ayant une expression stable dans les plantes et peut être utilisé comme contrôle pour la quantification d'ARNm (Chang *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent que la quantité d'ARNm d'eIF(iso)4E est plus faible chez les plantes de Yolo Wonder inoculées avec les constructions TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2 que chez les plantes témoin (inoculées avec le TRV-mCherry) (figure 2). Les deux constructions TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2 permettent donc une extinction partielle de l'expression du gène *pvr6* chez un piment porteur de *pvr6⁺* (Yolo Wonder). De plus, la quantité d'ARN d'eIF(iso)4E est plus faible chez les plantes inoculées avec la construction TRV-eIF(iso)4E-2 que celles inoculées avec la construction TRV-eIF(iso)4E-1 (figure 2).

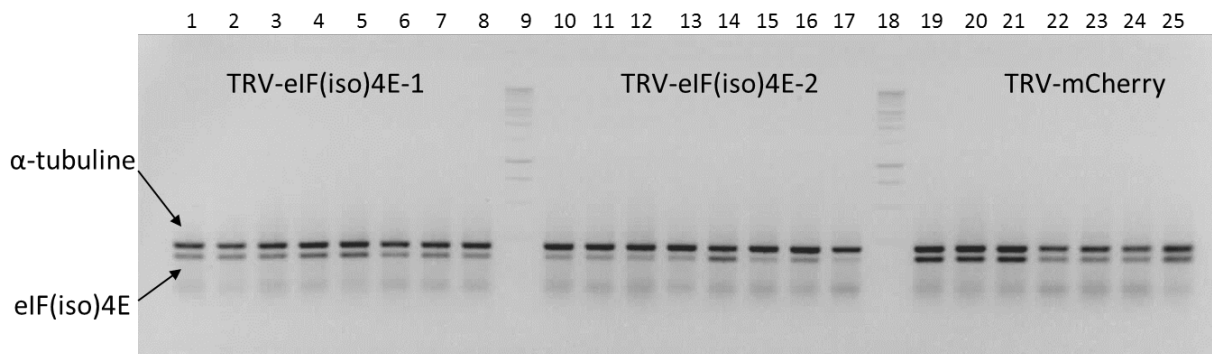


Figure 2: Comparaison de la quantité relative d'ARNm de eIF(iso)4E chez des plantes de Yolo Wonder inoculées avec le TRV-eIF(iso)4E-1, le TRV-eIF(iso)4E-2 ou le TRV-mCherry. La quantité d'ARNm d' α -tubuline est utilisée comme témoin d'extraction et d'amplification par RT-PCR. Colonnes 1 à 8 : 8 plantes indépendantes inoculées avec TRV-eIF(iso)4E-1. Colonnes 10 à 17 : 8 plantes indépendantes inoculées avec TRV-eIF(iso)4E-2. Colonnes 19 à 24: 7 plantes indépendantes inoculées avec TRV-mCherry. Colonnes 9 et 18 : marqueur de taille 100pb.

Dans notre étude, la taille du fragment de la séquence codant eIF(iso)4E est de 88pb dans TRV-eIF(iso)4E-1 et de 299pb dans TRV-eIF(iso)4E-2, ce qui pourrait expliquer la différence d'efficacité du VIGS que nous observons. En effet, Liu *et al.* (2008) ont montré que la taille optimale de l'insert se situait entre 200 et 1300pb pour l'induction du VIGS par le TRV. Les deux constructions seront utilisées pour la suite des tests et permettront de regarder l'impact d'un éventuel effet de la quantité d'eIF(iso)4E sur la fréquence de contournement de *pvr2*³.

b) Choix des lignées haploïdes doublées

Pour le test de validation fonctionnelle de *pvr6*, nous devons choisir la ou les lignées HD qui permettront le mieux de mettre en évidence l'effet de *pvr6*. Un premier choix a été réalisé en choisissant des lignées dont les allèles aux QTL ne diminuent pas la fréquence de contournement de *pvr2*³ (figure 3).

	RB-1	RB-5	RB-6
Yolo Wonder			
Perennial			
HD 2245			
HD 2158			
HD 2234			
HD 2434			
HD 2401			
HD 2330			

Figure 3: Génotype des lignées candidates pour le test de validation fonctionnelle par la méthode VIGS. Pour chaque lignée, l'allèle porté aux QTL de durabilité RB-1, RB-5 et RB-6 est indiqué. Vert : allèle défavorable (augmentant la fréquence de contournement de *pvr2*³). Rouge: allèle favorable (diminuant la fréquence de contournement de *pvr2*³).

Nous avons ensuite testé, à l'aide de la construction TRV-PDS, le taux de plantes pour lesquelles l'expression de la PDS était éteinte (feuilles blanches) ainsi que la cinétique d'apparition de l'extinction chez six lignées HD et les deux parents (Perennial et Yolo Wonder). Pour ce test, 25 plantes par génotype ont été inoculées avec le TRV-PDS préalablement multiplié sur *Nicotiana benthamiana* à partir de l'inoculation d'un tissu végétal infecté déshydraté. La figure 4 présente les résultats obtenus. On remarque que le taux de plantes pour lesquelles l'expression de la PDS était éteinte est beaucoup plus fort chez Yolo Wonder (94%) que chez Perennial (48%) et qu'il existe des variations entre les lignées HD. En termes de cinétique, l'extinction de l'expression de la PDS est beaucoup plus rapide pour certaines lignées que pour d'autres (figure 4). Ces résultats peuvent être dus à la

présence chez Perennial (et certaines lignées HD) de facteurs génétiques de résistance partielle au TRV qui ralentirait l'infection par le TRV et par conséquent le VIGS. Pour nos tests de validation de l'effet de *pvr6*, nous avons choisi les lignées HD pour lesquelles la cinétique du VIGS est la plus rapide et le taux d'extinction de la PDS le plus fort, c'est-à-dire HD2330 et HD2401.

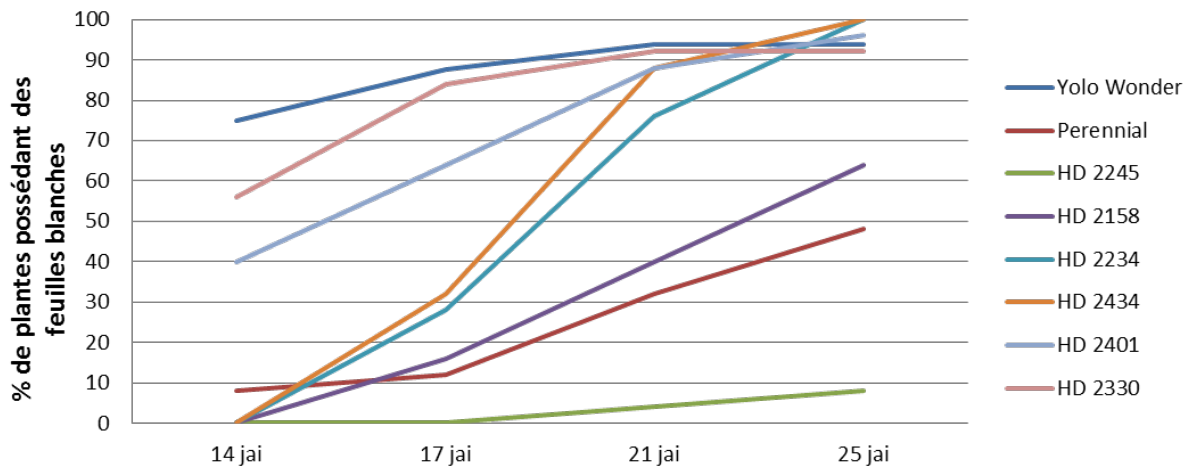


Figure 4: Cinétique et taux d'extinction du gène phytoène désaturase (PDS) évalués par l'apparition de feuilles blanches chez Yolo Wonder, Perennial et six lignées haploïdes doublées issues du croisement entre Yolo Wonder et Perennial.

c) La capacité de contournement du PVY est-elle affectée par la présence du TRV

Pour tester si la présence du TRV influence la capacité de contournement du PVY, nous avons testé la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY en présence et en absence du TRV. Pour ce test, nous avons utilisé la lignée HD2435 qui est porteuse de l'allèle KO *pvr6* et présente une fréquence de contournement de *pvr2*³ de 70% en moyenne (selon les tests réalisés pour la détection de QTL). Cent plantes de HD2435 ont été inoculées par les quatre constructions de TRV (TRV-PDS, TRV-mCherry, TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2) au stade cotylédonaire. Deux semaines après l'inoculation du TRV, toutes ces plantes et 100 plantes témoin (sans TRV) ont été inoculées avec le PVY chimère CI (décrit dans les chapitres précédents). Cinq semaines après l'inoculation du PVY, nous avons prélevé trois feuilles par plantes qui ont été broyées puis utilisées pour tester, indépendamment, la présence du TRV et du PVY dans les plantes. Concernant le TRV, le pourcentage d'infection varie entre 85 et 91% en fonction des constructions. L'objectif étant de regarder l'influence du TRV sur la capacité de contournement du PVY, nous n'avons gardé que les plantes positives pour le TRV

pour le calcul de la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY. La fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY seul (calculée à partir des 100 plantes témoin) est égale à 69% ce qui n'est pas différent de la fréquence de contournement attendue de cette lignée par la chimère CI (70% selon nos tests précédents)(figure 5). Pour les plantes en co-infection avec le TRV la fréquence de contournement de *pvr2*³ varie entre 51.8% et 96.7% selon les lignées (figure 5). La présence du TRV n'empêche donc pas le contournement de *pvr2*³ par le PVY et est même favorable pour les plantes infectées avec les deux constructions témoin TRV-PDS et TRV-mCherry qui montrent des fréquences de contournement significativement plus élevées que le PVY seul, PVY + TRV-eIF(iso)4E-1 et PVY + TRV-eIF(iso)4E-2 (Test exact de Fisher ; $p < 0.001$).

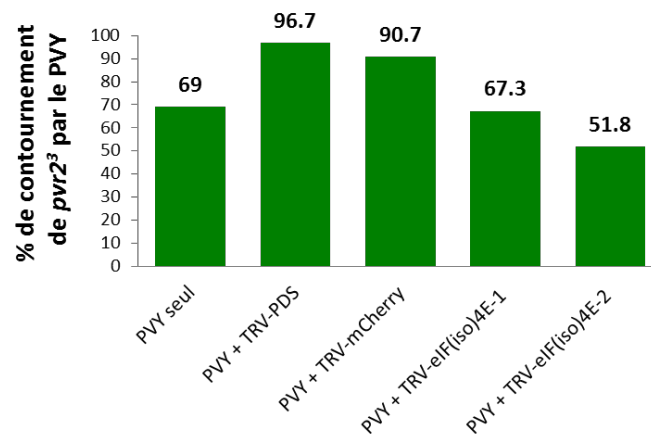


Figure 5: Fréquence de contournement du gène *pvr2*³ par le PVY chimère CI en fonction des différents TRV recombinants.

En comparant les plantes inoculées par TRV-PDS, TRV-mCherry et sans TRV, nos résultats suggèrent que la présence du TRV augmente la capacité de contournement du PVY. Cependant, cet effet du TRV n'est pas retrouvé pour les constructions TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2. La lignée HD2435 porte l'allèle KO *pvr6* codant pour un eIF(iso)4E non-fonctionnel et les constructions TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2 ne devraient donc pas montrer de différences avec les constructions TRV-PDS ou TRV-mCherry chez cette lignée. Ce résultat pourrait être dû à une extinction de l'expression de *pvr2*³ codant pour l'eIF4E par les constructions ciblant eIF(iso)4E, ce qui réduirait la possibilité de contournement de *pvr2*³ par le PVY. Cependant, d'après l'outil informatique « siRNA scan » (<http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm>) permettant d'identifier les cibles « involontaires » du VIGS, aucun siRNA produit par nos constructions n'est prédit comme ciblant l'ARNm de eIF4E (ni aucun autre ARN différent de celui d'eIF4E).

3. Test de validation fonctionnelle

Pour le test de validation fonctionnelle, nous avons testé les lignées HD2330 et HD2401, toutes les deux porteuses de *pvr6*⁺, *pvr2*³ et des allèles de sensibilité aux QTL RB-1 et RB-6. Dans nos tests précédents, la fréquence de contournement de ces deux lignées était de 0%. Si *pvr6* est le gène sous-jacent au QTL RB-3, son extinction devrait provoquer une augmentation de la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY (chimère CI). Dans ce test, nous avons 4 modalités (TRV-eIF(iso)4E-1, TRV-eIF(iso)4E-2, TRV-mCherry et sans TRV) par lignée HD avec 150 plantes inoculées pour chaque modalité. Toutes les plantes (sauf les témoins sans TRV) ont été inoculées avec le TRV au stade cotylédonaire à partir d'un inoculum préalablement multiplié sur *Nicotiana benthamiana* suite à l'inoculation d'un tissu végétal infecté déshydraté. Cinq plantes par géotypes ont été inoculées avec le TRV-PDS afin de suivre la mise en place du VIGS déterminant le moment idéal pour inoculer le PVY. L'inoculation du PVY a été réalisée lorsque les feuilles apicales des plantes inoculées avec le TRV-PDS ont commencées à blanchir (14 jai). Cinq semaines après l'inoculation du PVY, trois feuilles par plante ont été prélevées, broyées et la présence du PVY a été testée en DAS-ELISA. Les résultats n'ont révélé aucun contournement du gène *pvr2*³ par le PVY (0 plantes positives / 1200) quel que soit le géotype ou la modalité. L'extinction du gène *pvr6* chez deux lignées porteuses de l'allèle *pvr6*⁺ n'a pas provoqué la hausse de la fréquence de contournement que nous attendions et ne permet donc pas de valider l'effet de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³. Nous avons alors vérifié la présence du TRV pour 30 plantes des modalités TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2 et les résultats ont montré que 94% des plantes étaient infectées par le TRV. L'échec de la validation fonctionnelle n'est, par conséquent, pas dû à un problème lié à l'infection du TRV. Il est cependant possible que même en présence du TRV, l'extinction du gène *pvr6* n'ait pas eu lieu. Pour vérifier l'extinction du gène *pvr6*, les ARN de 10 plantes par modalité ont été extraits et utilisés pour amplifier l'ADNc de l'eIF(iso)4E et l' α -tubuline. Les résultats montrent que, comme dans le test préliminaire, les deux constructions TRV-eIF(iso)4E-1 et TRV-eIF(iso)4E-2 induisent une extinction partielle de l'expression de *pvr6* et confirment que la construction TRV-eIF(iso)4E-2 est plus efficace que la construction TRV-eIF(iso)4E-1 (figure 6).

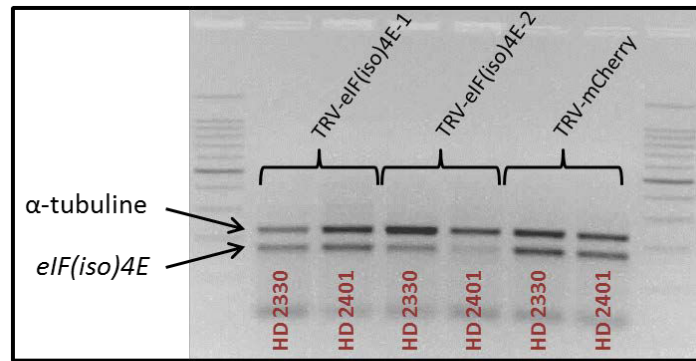


Figure 6: Comparaison de la quantité relative d'ARNm de eIF(iso)4E chez des plantes de HD2330 et HD2401 inoculées avec le TRV-eIF(iso)4E-1, TRV-eIF(iso)4E-2 et TRV-mCherry. La quantité d'ARNm d' α -tubuline est utilisée comme témoin d'extraction et d'amplification par RT-PCR.

Les tests de validation fonctionnelle par la méthode de VIGS n'ont pas permis de valider l'effet de *pvr6*. Cet échec de validation pourrait être dû au fait que *pvr6* ne soit pas le gène sous-jacent au QTL RB-3 mais aussi à de nombreux autres paramètres comme une extinction de *pvr6* qui n'est pas totale et homogène au sein de la plante, des interactions entre le PVY et le TRV ou encore par le fait que le rôle de *pvr6* n'est peut-être pas direct.

C. Expression transitoire de l'allèle *pvr6*⁺ chez des lignées porteuses de l'allèle *pvr6*

Une deuxième méthode permettant de valider l'effet d'un gène est d'exprimer un allèle particulier de ce gène chez des plantes porteuses d'un allèle différent (complémentation fonctionnelle). Cette méthode a été utilisée pour valider le rôle du locus *pvr2* dans la résistance au PVY (Ruffel *et al.*, 2002). Dans leur étude, ces auteurs ont exprimé de façon transitoire, à l'aide d'un *Potato virus X* recombinant, l'eIF4E de Yolo Wonder (codé par l'allèle de sensibilité *pvr2*⁺) chez des génotypes de piment résistants (porteurs des allèles de résistance *pvr2*¹ et *pvr2*²) et ont ainsi restauré la sensibilité de ces génotypes au PVY. Dans notre étude, si *pvr6* est le gène sous-jacent au QTL RB-3, l'expression de l'allèle *pvr6*⁺ chez des lignées porteuses de l'allèle ko *pvr6* devrait induire une baisse de la fréquence de contournement de *pvr2*³.

1. Matériel viral et végétal utilisé

Des clones de PVY recombinants porteurs des ADNc de l'eIF4E codé par *pvr2*⁺ (PVY-eIF4E), de l'eIF(iso)4E codé par *pvr6*⁺ (PVY-eIF(iso)4E) et de la green fluorescent protein (PVY-GFP) étaient déjà disponibles au laboratoire. Ces trois PVY recombinants ont tous été créés à

partir du clone de PVY SON41p capable d'infecter les plantes porteuses de l'allèle de sensibilité *pvr2*⁺ mais pas les plantes porteuses de l'allèle *pvr2*³ (Moury *et al.*, 2004). L'insertion des transgènes (ADNc de l'eIF4E, de l'eIF(iso)4E et de la GFP) a été réalisé par recombinaison homologue chez la levure et le transgène a été inséré entre les régions codant la Nib et la CP.

Pour les tests d'expression transitoire, nous avons utilisé la lignée HD2435 porteuse de l'allèle de résistance *pvr2*³, de l'allèle KO *pvr6* et présentant une fréquence de contournement d'environ 70% (d'après les tests réalisés dans le chapitre 2). Pour tester l'accumulation relative des virus PVY-eIF(iso)4E et PVY-GFP, nous avons utilisé deux lignées sensibles au PVY : Yolo Wonder, porteuse de *pvr6*⁺, et HD2212 porteuse de *pvr6*.

2. Accumulation relative de PVY-eIF(iso)4E et PVY-GFP

L'insertion d'un transgène dans le génome d'un virus peut avoir des effets délétères sur sa fitness du fait de la taille plus importante de son génome (German-Retana *et al.*, 2002). Par conséquent, la fréquence de contournement du PVY-eIF(iso)4E ne pourra être comparée qu'avec un virus possédant un transgène de taille similaire à l'ADNc d'eIF(iso)4E et ayant une *fitness* équivalente. Au laboratoire, nous avons à notre disposition un PVY-GFP dérivant du même clone viral et dont la séquence virale est identique à celle du PVY-eIF(iso)4E. De plus la taille de l'ADNc de la GFP est d'environ 800pb contre environ 600pb pour l'ADNc de l'eIF(iso)4E, ce qui est relativement proche. Pour pouvoir utiliser le virus PVY-GFP comme témoin, nous devons nous assurer que les virus PVY-eIF(iso)4E et PVY-GFP ne présentaient pas de différence de *fitness* qui pourrait fausser nos résultats. Ces deux virus ont été inoculés mécaniquement à 20 plantes de Yolo Wonder et 10 plantes de HD2210 avec des inocula dont la concentration a été préalablement équilibrée par DAS-ELISA quantitatif selon la méthode décrite par Ayme *et al.* (2007). Un mois après inoculation, 0.5g de feuille a été broyé dans 2mL de tampon de broyage et utilisé pour mesurer la concentration de virus dans les plantes par DAS-ELISA quantitatif. Concernant l'infectivité des deux virus, 90% des plantes de Yolo Wonder ont été infectées par le virus PVY-eIF(iso)4E contre 55% par le virus PVY-GFP. De la même façon, 80% des plantes de HD2212 ont été infectées par le virus PVY-eIF(iso)4E contre 55% par le virus PVY-GFP (tableau I). Le virus PVY-eIF(iso)4E semble donc plus infectieux que le virus PVY-GFP mais la différence observée n'est pas significative ($p=0.08$, Test exact de Fisher). En ne tenant compte que des plantes infectées, aucune

différence d'accumulation virale n'a été observée entre PVY-eIF(iso)4E et PVY-GFP, ceci chez les deux génotypes testés (données supplémentaires I). Il existe donc peu de différence de *fitness* entre les deux virus et cette différence tend à favoriser PVY-eIF(iso)4E ce qui, dans nos tests, pourrait masquer l'effet recherché.

Tableau I: Taux d'infection et accumulation virale de deux PVY recombinants: PVY-GFP et PVY-eIF(iso)4E chez deux lignées de piments sensibles à ces virus: Yolo Wonder (porteur de *pvr6*⁺) et HD2210 (porteur de *pvr6*).

Génotype de plante	Yolo Wonder (<i>pvr6</i> ⁺)		HD2212 (<i>pvr6</i>)	
	PVY-GFP	PVY-eIF(iso)4E	PVY-GFP	PVY-eIF(iso)4E
% de plantes infectées	90	55	80	50
Accumulation virale	0.834	0.633	0.735	0.794

Le PVY-GFP possède l'ADNc codant de la *green fluorescent protein* (GFP) dans son génome. Le PVY-eIF(iso)4E possède l'ADNc codant de le facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E (codé par l'allèle *pvr6*⁺) dans son génome.

3. Efficacité de l'expression transitoire

Pour tester la capacité du PVY à produire la protéine codée par son transgène dans des plantes porteuses de l'allèle de résistance *pvr2*³, nous avons inoculé le virus PVY-eIF4E à des plantes de HD2435. Dans ce test, si le PVY-eIF4E est capable de produire l'eIF4E de Yolo Wonder, il pourra alors l'utiliser pour réaliser son cycle infectieux et ainsi devenir capable d'infecter des plantes résistantes porteuses de *pvr2*³ (HD2435). Pour faciliter l'infection par le PVY, nous avons réalisé des inoculations par greffage. Vingt plantes de HD2435 ont été greffées sur des porte-greffes de Yolo Wonder. Le PVY-eIF4E, préalablement multiplié sur *Nicotiana benthamiana*, a été inoculé au porte-greffe sensible Yolo Wonder. Deux semaines après inoculation, trois feuilles des greffons de HD2435 ont été prélevées et testées en DAS-ELISA pour détecter la présence du PVY. Les résultats indiquent que 80% des greffons de HD2435 étaient infectés par le PVY. La rapidité et le taux d'infection très forts suggèrent que le PVY est capable d'exprimer l'eIF4E de Yolo Wonder.

4. Tests de validation fonctionnelle du gène *pvr6* par expression transitoire

a) Inoculation directe

Les 150 plantes de HD2435 ont été inoculées avec les inocula des deux virus dont la concentration a été préalablement calibrée par DAS-ELISA quantitatif. Cinq semaines après inoculation, trois feuilles par plantes ont été prélevées, broyées dans du tampon de broyage

et testées en DAS-ELISA pour la présence du PVY. Ce test a été répété deux fois indépendamment.

Quel que soit le test, nos résultats révèlent que les deux virus PVY-eIF(iso)4E et PVY-GFP possèdent une capacité de contournement de *pvr2*³ très faible (figure 7) ce qui est certainement le résultat du coût de *fitness* imposé par la présence d'un transgène dans leur génome. Malgré les faibles fréquences de contournement observées, les résultats du premier test révèlent une fréquence de contournement du PVY-eIF(iso)4E (0%) significativement plus faible que celle du PVY-GFP (5.3%)($p=0.003$, test exact de Fisher), résultat attendu si *pvr6* est le gène sous-jacent au QTL RB-3. Cependant cette différence n'a pas été détectée lors du deuxième test dans lequel les deux virus ont présenté des fréquences de contournement similaires (figure 7). Afin de vérifier que les PVY ayant contourné le gène *pvr2*³ n'avaient pas délété leur transgène, les ARN totaux des quatre plantes positives lors du deuxième test (3 plantes infectées par le PVY-eIF(iso)4E et 1 plante infectée par PVY-GFP) ont été extraits en utilisant le kit Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). Ces ARN ont été utilisés pour amplifier par RT-PCR la région du génome du PVY où le transgène a été inséré. Les résultats montrent que le virus PVY-GFP et les trois virus PVY-eIF(iso)4E ont bien gardé leur transgène (données non montrées). Ces résultats nous ont alors amené à tester la fréquence de contournement de ces deux virus par la méthode d'inoculation par greffage qui permet d'augmenter fortement la fréquence de contournement de l'allèle *pvr2*³ (voir la partie I.B.2.a) de l'introduction).

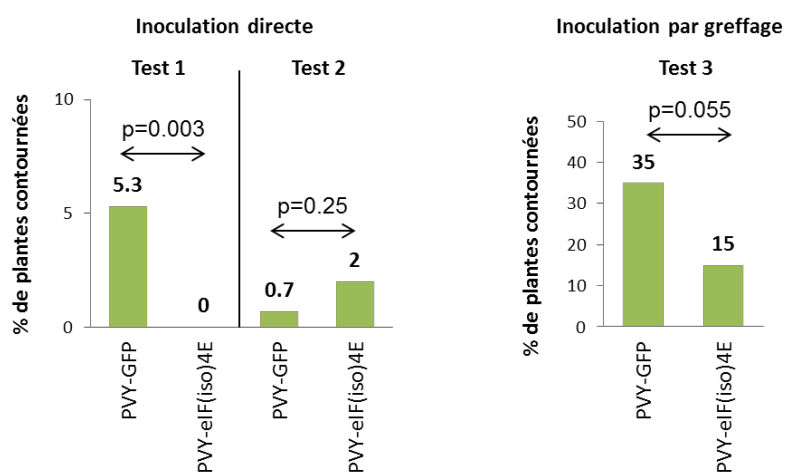


Figure 7: Fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2*³ porté par la lignée haploïde doublée HD2435 (porteuse de l'allèle *pvr6*) par le PVY-GFP et le PVY-eIF(iso)4E après inoculation du PVY par deux méthodes différentes: inoculation directe et inoculation par greffage. Dans les tests 1 et 2, chaque virus a été inoculé à 150 plantes de HD2435. Pour le test 3, 62 plantes de HD2435 ont été greffées sur des plantes de Yolo Wonder (porteuses de l'allèle de sensibilité *pvr2*³). Les virus PVY-GFP et PVY-eIF(iso)4E ont été inoculés à 23 et 39 porte-greffes, respectivement.

b) Inoculation par greffage

Dans ce test, 100 plantes de HD2435 ont été greffées sur des plantes de Yolo Wonder et 62 plantes greffées ont survécu. Trente-neuf porte-greffes ont été inoculés par le virus PVY-eIF(iso)4E et 23 porte-greffes par le virus PVY-GFP. Cinq semaines après inoculation, trois feuilles ont été prélevées sur les greffons résistants (HD2435), broyées dans du tampon de broyage et testées en DAS-ELISA pour la présence du PVY.

Les résultats du test ELISA indiquent que le PVY-GFP a été détecté sur 8 greffons (sur 23) alors que le PVY-eIF(iso)4E n'a été détecté que sur 6 greffons (sur 39). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par inoculation directe et montrent que la fréquence de contournement de *pvr2*³ par le PVY-eIF(iso)4E (15%) est inférieure à celle du PVY-GFP. Cette différence n'est cependant pas significative ($p=0.055$; test exact de Fisher). Les ARN totaux de tous les greffons positifs ont été extraits et utilisés pour amplifier par RT-PCR la région du génome du PVY où le transgène a été inséré (comme décrit précédemment). Les résultats montrent que tous les PVY retrouvés dans les greffons contournés ont gardé leur transgène.

5. Discussion et perspectives

Quelle que soit la méthode d'inoculation utilisée, nos résultats montrent globalement que la fréquence de contournement du PVY-eIF(iso)4E est inférieure à celle du virus PVY-GFP. Ces deux virus ont exactement le même génome viral (et surtout la même VPg) et ne diffèrent que par leur transgène. La plus faible fréquence de contournement du PVY-eIF(iso)4E résulte donc de l'expression transitoire de l'eIF(iso)4E par le PVY, ce qui est le résultat attendu si *pvr6* est le gène sous-jacent au QTL RB-3. Cependant, la différence observée n'est pas significative et ne nous permet pas de valider de façon définitive l'effet du gène *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³.

Il est important de noter que notre protocole expérimental présente certaines limites. Il est probable que, dans nos tests, l'effet sur la fréquence de contournement de *pvr2*³ de l'expression d'un eIF(iso)4E fonctionnel chez une lignée porteuse de l'allèle KO *pvr6* (HD2435) soit partiellement masqué par une *fitness* un peu plus élevée du PVY-eIF(iso)4E par rapport au PVY-GFP. En effet, nos tests d'infectivité des deux virus montrent que le PVY-GFP est moins infectieux que le PVY-eIF(iso)4E, ce qui a pu réduire la capacité de contournement du PVY-GFP et par conséquent réduire la différence de fréquence de contournement entre les deux virus. Une deuxième limite de notre protocole réside dans l'utilisation du PVY lui-

même pour induire l'expression transitoire de l'eIF(iso)4E. Nous avons choisi de procéder ainsi car les PVY recombinants étaient déjà disponibles au laboratoire et l'expression de l'eIF(iso)4E par le PVY lui-même permettait de s'affranchir de l'utilisation d'un autre virus (comme le PVX) et donc de s'affranchir d'éventuelles interactions entre les deux virus. Cependant, même si le PVY-eIF4E est capable d'exprimer son transgène dans une plante porteuse de *pvr2*³, il est probable que le niveau d'expression du transgène soit plus faible que s'il était exprimé par un second virus capable d'infecter de façon systémique les plantes porteuses de *pvr2*³.

Malgré les limites techniques de notre protocole, les résultats obtenus sont très encourageants quant à la possibilité de valider fonctionnellement le rôle de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³. Depuis le début de nos tests de validation fonctionnelle, une équipe du GAFL a réalisé des transformations stables de piment, ouvrant ainsi la possibilité de mettre en place des essais de validation fonctionnelle de *pvr6* par cette méthode. La transformation stable permettra alors de s'affranchir des deux limites techniques citées précédemment.

D. Tableau supplémentaire:

Tableau supplémentaire I : noms et séquences des amorces utilisées dans le chapitre IV.

Nom de l'amorce	Séquence
mCherry-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATCAGAGCGAATGTATCCTG -3'
mCherry-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCACGTTTCATATTGTTCAACG -3'
eIF(iso)4E-1-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCCACCGAAGCACCACCACC-3'
eIF(iso)4E-1-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTTATGTGGCTGTTTCACCGC-3'
eIF(iso)4E-2-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAGCAAGTTGACTGTTAATGC-3'
eIF(iso)4E-2-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCTTCCACTTCTACCAATG-3'
RT-eIF(iso)4E-F	5'-AGATATATGTGGAGTGGTTGCT-3'
RT-eIF(iso)4E-R	5'-ACCTCTCCCTTTAGAAATCATC-3'
RT- α -tubuline-F	5'-TTGCCCGTGGACATTATACA-3'
RT- α -tubuline-R	5'-TTGAAACCTGTGGTGATGGA-3'

Les séquences en gras correspondent aux adaptateurs attB1 (pour les amorces F) et attB2 (pour les amorces R) nécessaires pour le clonage Gateway.

Discussion générale et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif principal de comprendre comment le fonds génétique de la plante pouvait influencer la durabilité d'un gène majeur de résistance. Au cours des différents chapitres de cette thèse, nous avons cartographié les facteurs génétiques modulant les fréquences de contournement de l'allèle *pvr2*³ conférant au piment (*Capsicum annuum*) une résistance récessive au *Potato virus Y* (PVY) et avons mis en évidence les mécanismes d'action de ces facteurs génétiques. Nos résultats indiquent qu'un gain génétique important sur la durabilité de la résistance peut être attendu de la construction de génotypes combinant un gène majeur peu durable avec des QTLs à effets faibles.

A. Synthèse des principaux résultats

Dans le chapitre I, nous avons examiné les différents mécanismes pouvant expliquer la meilleure durabilité de la résistance polygénique (*pvr2*³ dans un fonds génétique partiellement résistant) portée par Perennial par rapport à la résistance monogénique (*pvr2*³ dans un fonds génétique sensible) portée par la lignée haploïde doublée (HD) 285. En se basant sur des hypothèses formulées dans la littérature, nous avons envisagé trois mécanismes possibles pouvant expliquer la meilleure durabilité de la résistance polygénique: (i) le niveau additionnel de résistance partielle apporté par le fonds génétique, (ii) l'augmentation du nombre de mutations nécessaires pour le contournement de la résistance et (iii) une sélection ralentie des variants viraux les mieux adaptés. Nous avons expérimentalement démontré qu'une large partie des variations de fréquence de contournement observées entre 15 lignées HD porteuses de *pvr2*³ pouvait être expliquée par des niveaux de résistance partielle (accumulation virale) variables entre ces mêmes lignées, validant ainsi le premier mécanisme. Ce mécanisme a un rôle très important car il est directement impliqué dans la probabilité d'apparition des variants virulents mais aussi dans les deux autres mécanismes. En effet, le deuxième mécanisme que nous avons mis en évidence montre que les voies mutationnelles permettant le contournement de la résistance polygénique par le PVY sont plus complexes et moins nombreuses que pour le contournement de la résistance monogénique. Enfin, nous avons validé le troisième mécanisme en montrant que la sélection des variants viraux les mieux adaptés était ralentie chez la résistance polygénique par rapport à la résistance monogénique.

Dans le chapitre II, nous avons cartographié, dans le génome du piment, 4 QTL affectant la fréquence de contournement de *pvr2*³ (appelés QTL de "durabilité"), 2 QTL affectant l'accumulation virale et 3 QTL affectant l'intensité et la dynamique des symptômes (*Area Under the Disease Progress Curve*, AUDPC). Nos résultats montrent que la fréquence de contournement de *pvr2*³ est affectée par divers mécanismes. En effet, 2 des 4 QTL de durabilité, dont le QTL majeur expliquant 40% de la variabilité phénotypique observée ($R^2=0.40$), co-localisent avec les 2 QTL d'accumulation virale, ce qui confirme le rôle important de la résistance partielle conférée par le fonds génétique sur la fréquence de contournement de *pvr2*³. Le troisième QTL de durabilité co-localise avec un QTL de tolérance (affecte l'AUDPC mais pas l'accumulation virale) et le quatrième n'a pas de rôle détecté ni pour la résistance partielle, ni pour la tolérance et suggère l'existence d'un autre mode d'action. Un résultat marquant de cette étude est la co-localisation entre les QTL majeurs de durabilité et de résistance partielle (appelés RB-3 et VA-3 dans le chapitre II) et le gène *pvr6* codant pour une isoforme (eIF(iso)4E) de la protéine eIF4E (elle-même codée par le gène *pvr2*). L'allèle *pvr6* porté par Perennial possède une délétion de 82 nucléotides dans l'exon 2 conduisant à l'apparition prématurée d'un codon stop lors de la traduction qui produit alors une protéine non-fonctionnelle (Ruffel *et al.*, 2006), l'allèle *pvr6* porté par Perennial est donc un allèle Knock-out (KO) naturel. Cet allèle est présent chez toutes les lignées HD ayant une fréquence de contournement de *pvr2*³ supérieure à 5%. A l'inverse, l'allèle *pvr6*⁺ de Yolo Wonder, codant pour une protéine eIF(iso)4E fonctionnelle, semble très favorable à la durabilité de *pvr2*³.

Le chapitre III de la thèse avait pour objectif de vérifier si les fonds génétiques favorables à la durabilité d'un gène majeur de résistance étaient diversifiés et répandus au sein des ressources génétiques du piment. Nous avons montré que la corrélation entre la fréquence de contournement des allèles *pvr2*³ ou *pvr2*⁴ et la résistance quantitative apportée par le fonds génétique de la plante était conservée au sein d'une collection de 20 accessions de piment représentant 37% de la diversité génétique de l'espèce *Capsicum annuum* disponible dans la collection (1018 accessions). Les résultats obtenus lors de la détection de QTL nous ont amenés à regarder la diversité nucléotidique de la séquence codante de l'eIF(iso)4E chez ces 20 accessions. Nous avons alors montré que les deux seules accessions présentant un taux de contournement

supérieur à 5% présentent aussi les deux plus fortes valeurs de concentration virale et portent l'allèle *pvr6*. Ces résultats renforcent l'hypothèse que le gène *pvr6* serait le gène sous-jacent aux QTL RB-3 et VA-3 sans pour autant le valider formellement.

Dans le chapitre IV, nous avons réalisé des tests de validation fonctionnelle de l'effet du gène *pvr6* sur la fréquence de contournement de l'allèle de résistance *pvr2³*. L'extinction de l'expression du gène *pvr6* chez des plantes porteuses de *pvr2³* et *pvr6⁺* par la méthode d'extinction de gène induite par un virus (ou VIGS : *Virus-induced gene silencing*) n'a pas montré d'effet de l'extinction de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2³* par le PVY chimère CI. A l'inverse, l'expression transitoire de eIF(iso)4E (codée par l'allèle *pvr6⁺*) par le PVY-eIF(iso)4E montre, dans plusieurs tests indépendants, une réduction de la fréquence de contournement de *pvr2³* par le PVY-eIF(iso)4E (exprimant eIF(iso)4E) par rapport au PVY-GFP (témoin). L'expression transitoire d'un eIF(iso)4E fonctionnel dans une plante porteuse de l'allèle KO *pvr6* semble induire une baisse de la fréquence de contournement de *pvr2³* par le PVY, ce qui est le résultat attendu si *pvr6* est le gène sous-jacent au QTL RB-3. La différence observée est, cependant, trop faible pour pouvoir valider l'effet du gène *pvr6*.

B. Les mécanismes affectant la durabilité du gène *pvr2³* sont-ils généralisables à d'autres gènes majeurs de résistance?

La dépendance de la fréquence de contournement d'un gène majeur vis-à-vis du fonds génétique devient un postulat générique depuis qu'elle a été démontrée expérimentalement pour trois systèmes hôte/pathogène très différents : PVY/piment, Phoma (*Leptosphaeria maculans*)/colza et nématode (*Globodera pallida*)/pomme de terre (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2012). Durant ma thèse, l'analyse approfondie de l'effet du fonds génétique sur la durabilité du gène *pvr2³* de résistance du piment au PVY a permis de cartographier les facteurs génétiques impliqués ainsi que d'explorer leurs mécanismes d'actions. Dans cette partie, nous discuterons de la potentielle généralisation, à d'autres pathosystèmes, des mécanismes mis en évidence pour le pathosystème PVY/piment.

1. Effet de la résistance quantitative additionnelle apportée par le fonds génétique

Dans le chapitre I, nous avons démontré qu'une large partie des variations de fréquence de contournement observées parmi 15 lignées HD porteuses de *pvr2³* pouvait être expliquée par des niveaux de résistance partielle (accumulation virale) variables entre ces mêmes lignées. Les mêmes expériences réalisées sur une core-collection de 20 accessions de piment, ont confirmé cette relation (Chapitre III). Enfin, la cartographie comparée des facteurs génétiques affectant la fréquence de contournement de *pvr2³* (QTL de durabilité) et de ceux affectant l'accumulation virale a permis de montrer que les deux QTLs contrôlant l'accumulation virale identifiés co-localisent avec deux des quatre QTL de durabilité, dont un QTL majeur expliquant 40% et 35% de la variabilité observée pour ces deux caractères (Chapitre II). L'ensemble de mes résultats révèle donc un effet très fort de la résistance quantitative additionnelle apportée par le fonds génétique sur la durabilité des allèles *pvr2³* et *pvr2⁴*.

Durant les tests réalisés, l'accumulation virale a été mesurée de manière globale : collecte de plusieurs feuilles à un temps donné. Par conséquent, la baisse de l'accumulation virale observée chez certains génotypes de piment peut être le résultat de la présence de facteurs génétiques affectant la multiplication virale, le mouvement de cellule à cellule et/ou le mouvement systémique du virus. Dans tous les cas, la résistance partielle entraîne une diminution du nombre de génomes viraux générés et donc de la probabilité d'apparition, dans ce génome, des mutations permettant le contournement. Cette hypothèse n'est valable que si la résistance conférée par *pvr2³* n'est pas totale et que dans les plantes porteuses de *pvr2³* une multiplication du virus soit possible. Certains résultats expérimentaux de notre équipe vont dans ce sens. En effet, des analyses de séquençage haut débit ont permis de montrer que, dans la majorité des cas de contournement, les mutants virulents sélectionnés par des plantes porteuses de *pvr2³* n'étaient pas présents dans l'inoculum de départ, suggérant que le PVY serait capable de se multiplier suffisamment pour acquérir, dans la plante résistante, les mutations responsables du contournement (Montarry *et al.*, 2011). De plus, dans de rares cas (<1%), une population virale en majorité avirulente a pu être détectée, au niveau systémique, chez des plantes porteuses de *pvr2³* (Montarry *et al.*, 2011).

Pour d'autres systèmes plante/virus, il a été observé que des variants virulents peuvent facilement être générés et/ou sélectionnés dans des plantes résistantes dans lesquelles le virus peut s'accumuler localement avant d'être bloqué par des mécanismes de résistance au mouvement de cellule à cellule et/ou au mouvement systémique (Hebrard, 2006; Andrade *et al.*, 2007; Acosta-Leal & Xiong, 2008). D'après nos résultats, on peut envisager que la fréquence de contournement de ces gènes de résistance puisse, par le même mécanisme que pour *pvr2³*, être diminuée s'ils sont introgressés dans des fonds génétiques partiellement résistants. Des résultats obtenus par Acosta-Leal & Xiong (2008) vont dans ce sens et montrent que la fréquence de contournement du gène *va*, conférant une résistance récessive au mouvement de cellule à cellule du PVY, est fortement diminuée (voir abolie) lorsque *va* est associé à un autre gène de résistance récessif (*va2*) agissant, au niveau cellulaire, sur l'accumulation virale du PVY.

D'un point de vue plus général, de nombreux gènes de résistance des plantes aux pathogènes ont des mécanismes liés au mouvement du pathogène et permettent une multiplication locale du pathogène. C'est notamment le cas des gènes de résistance basés sur des réponses de type hypersensibilité (HR). Ce type de résistance est très répandu dans les interactions plante/pathogène et est fréquemment contourné (Niks & Rubiales, 2002; Parlevliet, 2002; Lecoq *et al.*, 2004). A l'inverse, les résistances ne permettant aucune multiplication du pathogène, sont généralement très durables. C'est, par exemple, le cas du gène *Mlo* de résistance de l'orge à *Blumeria graminis* ou du gène *Rx-1* de résistance de la pomme de terre au *Potato virus X* (Jørgensen, 1992; Lecoq *et al.*, 2004). La différence de durabilité entre ces deux types de résistance pourrait alors être en partie expliquée par la capacité ou non du pathogène à se multiplier localement chez les plantes porteuses d'une résistance (Lecoq *et al.*, 2004).

Partant de ces constats, il est probable que la durabilité des gènes de résistance de type HR et de toute résistance ne bloquant pas totalement la multiplication du pathogène, puisse être augmentée en les associant à des fonds génétiques réduisant la multiplication du pathogène.

2. Complexification des possibilités d'acquisition de la virulence

Nous avons montré dans le chapitre I, que la meilleure durabilité de Perennial s'explique, en partie, par des possibilités d'acquisition de la virulence par le PVY réduites

et plus complexes. En effet, trois mutants virulents sur les cinq testés montrent des niveaux d'infectivité de Perennial relativement fort (environ 40%) alors que les deux autres ne sont que très peu infectieux (<10%). Ces cinq mutants étant capables d'infecter 100% des plantes de HD285, nous pouvons en déduire que l'allèle de résistance *pvr2*³ est efficacement contourné et que les différences observées sont dues au fonds génétique de Perennial. La complexité des voies mutationnelles (nombre et nature des mutations) nécessaires au contournement d'une résistance est admise comme un facteur clé et générique des risques de contournement (Harrison, 2002; Fabre *et al.*, 2009). Notre étude démontre, pour la première fois, le rôle du fonds génétique sur ce processus pour l'interaction piment/PVY mais cet effet pourrait être spécifique de cette interaction plante/pathogène dans la mesure où les variants présentant la plus forte *fitness* sont aussi les moins probables (voir la discussion du chapitre I).

3. Ralentissement de la sélection des variants les plus adaptés

Dans le chapitre I, nous avons mis en évidence que la sélection des variants virulents les mieux adaptés (les doubles mutants KN et GK) était ralentie chez Perennial par rapport à HD285. De façon générale, la vitesse de sélection, au sein d'une population, d'un génotype par rapport aux autres dépend du rapport entre la force de la sélection (s) exercée par la plante et de la taille efficace de la population (N_e). La N_e déterminant la force de la dérive s'opposant à la sélection, plus la N_e est faible et plus la population sera soumise à des effets de dérive génétique. Concernant la vitesse de sélection, plus le produit $s \times N_e$ est grand, plus rapide est la sélection.

Le résultat que nous avons observé peut donc se traduire par un rapport $s \times N_e$ plus faible chez Perennial que chez HD285 et s'expliquer soit par l'existence d'un différentiel de sélection entre ces deux génotypes (force de sélection plus forte chez HD285 que chez Perennial) soit par une augmentation de la dérive génétique chez Perennial par rapport à HD285. Même si notre dispositif expérimental ne nous permet pas de trancher entre ces deux hypothèses, nos résultats mettent en évidence que n'importe quel facteur génétique réduisant la valeur du rapport $s \times N_e$ pourrait ralentir la sélection des génotypes les mieux adaptés à la résistance et par conséquent augmenter la durabilité de cette résistance.

Les gènes majeurs de résistance sont connus pour exercer de fortes pressions de sélection sur les populations pathogènes entraînant une augmentation de la fréquence, parfois très rapide, des variants virulents et donc le contournement de la résistance. L'existence de facteurs génétiques permettant de réduire la pression de sélection exercée par l'hôte pourrait s'avérer très intéressant pour la durabilité des résistances. A ma connaissance, la seule étude mettant en évidence des pressions de sélection différentielles entre différents QTLs de résistance a été réalisée sur le pathosystème *Venturia inaequalis*/Pommier (Lê Van *et al.*, *in press*). Dans leur étude, ces auteurs ont montré qu'après inoculation par un mélange de souches, certains QTLs sélectionnaient préférentiellement certaines souches alors que d'autres n'exerçaient pas de sélection différentielle de certaines souches par rapport à d'autres. Cette étude suggère donc que des QTL peuvent exercer des pressions différentes vis-à-vis de la population pathogène. Il est alors probable que l'association entre des facteurs génétiques exerçant des pressions de sélection différentielles se contrarient et que la sélection d'un variant par rapport à un autre soit ralentie. Cependant aucune étude n'a mis en évidence des facteurs génétiques réduisant la force de sélection exercée par un gène majeur (diminuant la valeur de s), qui pourrait expliquer la sélection ralentie des variants les mieux adaptés observée chez Perennial par rapport à HD285.

Concernant la N_e , nous avons vu en introduction que les populations virales sont soumises à différents goulets d'étranglement pouvant entraîner des phénomènes de dérive génétique. Dans nos tests, la population virale pourrait être soumise à la dérive génétique lors de l'inoculation mécanique des plantes et/ou lors de la colonisation de la plante. Zwart *et al.* (2011) ont montré que la N_e lors de l'inoculation mécanique dépendait du nombre de foyers d'infection qui, lui-même, varie selon la dose de virus dans l'inoculum. Dans nos tests, la concentration de l'inoculum était la même pour toutes les plantes et ne pourrait donc pas être à l'origine de différences entre Perennial et HD285. Cependant, le nombre de foyers d'infections pourrait varier entre Perennial et HD285 *via* la présence de facteurs génétiques affectant ce caractère. Ce type de facteurs a déjà été mis en évidence par Caranta *et al.* (1997). Dans leur étude, ces auteurs ont cartographié, chez 94 lignées HD issues de la F1 entre Perennial et Yolo Wonder, des QTL affectant le nombre de foyers d'infection lors de l'inoculation mécanique du CMV sur des jeunes feuilles de piment. En diminuant le nombre de foyers d'infection, ces QTL

diminuent également la N_e de la population virale dans la feuille inoculée. Par conséquent, les résultats de Caranta *et al.* (1997) montrent que des facteurs diminuant le rapport $N_e \times s$ existent, en association avec un gène majeur de résistance, ils pourraient alors permettre de ralentir la sélection de variants virulents. Mes résultats de cartographie des QTL de durabilité révèlent un QTL sur le chromosome 5 (RB-5) qui ne co-localise avec aucun QTL affectant la résistance partielle, suggérant l'existence d'un autre mécanisme. Ce QTL pourrait alors affecter le nombre de foyers d'infection lors de l'inoculation mécanique. La comparaison entre les QTL détectés par Caranta *et al.* (1997) et les QTL de durabilité n'a révélé aucune co-localisation, ne validant pas cette hypothèse. Cependant, les QTL détectés par Caranta *et al.* (1997) affectent le nombre de foyers d'infection du CMV et non celui du PVY. Il serait intéressant de voir si, de la même façon que pour le CMV, il existe au sein des lignées HD des facteurs génétiques affectant le nombre de foyers d'infection du PVY et si oui, s'ils co-localisent avec des QTLs de durabilité ou avec les QTL détectés avec le CMV. De plus, il serait également intéressant, si ces facteurs génétiques existent, de vérifier s'ils affectent également le nombre de foyers d'infection du virus lorsque celui-ci est transmis par son vecteur naturel (le puceron pour le PVY et le CMV).

Lors de l'infection systémique de la plante, la N_e de la population virale est aussi susceptible de varier entre deux génotypes de plante. Gutiérrez *et al.* (2012) ont montré expérimentalement, pour le CaMV, que la charge virale présente dans le phloème d'une plante conditionne la taille du goulet d'étranglement s'exerçant sur les populations virales lors de l'infection systémique. La valeur du N_e lors de la colonisation de la plante est donc dépendante de la taille totale de la population virale. Par conséquent, n'importe quel facteur génétique affectant l'accumulation virale dans la plante est susceptible de diminuer la N_e lors de la colonisation d'un nouvel organe et donc d'augmenter la dérive génétique s'exerçant sur la population virale. La résistance quantitative de la plante aurait donc à la fois un rôle dans la probabilité d'apparition des variants virulents (voir la partie VI.B.1.) mais aussi un rôle en ralentissant leur sélection une fois ceux-ci apparus.

C. *pvr6* : un allèle déstabilisateur de la durabilité des résistances contrôlées par eIF4E

1. *pvr6* : un gène candidat aux QTL RB-3 et VA-3

a) *pvr6* appartient à la même famille multigénique que *pvr2*³

Chez le piment, les facteurs d'initiation de la traduction de type 4E (eIF4E) appartiennent à une petite famille multigénique dans laquelle deux gènes codant pour des protéines eIF4E (eIF4E1 et eIF4E2) et un gène codant pour la protéine eIF(iso)4E ont été identifiés. Les gènes *pvr2* et *pvr6* codant, respectivement, pour les facteurs eIF4E1 et eIF(iso)4E sont clonés et cartographiés dans le génome du piment. Le gène codant pour eIF4E2 est cloné mais n'est pour l'instant pas cartographié. Au locus *pvr2*, les lignées HD utilisées pendant ma thèse ségrégent pour l'allèle *pvr2*⁺ de sensibilité et l'allèle *pvr2*³ de résistance au PVY. Au locus *pvr6*, les lignées ségrégent pour l'allèle *pvr6*⁺ codant un eIF(iso)4E fonctionnel et pour l'allèle *pvr6* codant un eIF(iso)4E non-fonctionnel (allèle knock-out naturel). La séquence codant pour eIF4E2 n'a révélé aucun polymorphisme chez les parents des lignées HD : Yolo Wonder et Perennial. De façon intéressante, mes résultats de cartographie montrent que le gène *pvr6* co-localise avec les QTL RB-3 et VA-3, expliquant, respectivement 40% de la variation de fréquence de contournement et 35% de la variation d'accumulation virale chez les lignées porteuses de *pvr2*³.

Chez les eucaryotes, le complexe eIF4E fait partie d'un complexe nommé eIF4F composé de eIF4A, eIF4E et eIF4G (Gingras *et al.*, 1999). Chez les plantes, le facteur eIF4A, bien que présent, n'a pas été identifié dans le complexe eIF4F. Lors de l'initiation de la traduction, ce complexe se lie à la coiffe des ARNm *via* le facteur eIF4E alors que le facteur eIF4G sert d'échafaudage pour la mise en place des autres protéines composant le complexe d'initiation de la traduction, incluant eIF3 et la PABP (*poly(A)-binding protein*)(figure 1). Les plantes possèdent une deuxième forme de complexe eIF4F (eIF(iso)4F) composé des facteurs eIF4(iso)4E et eIF(iso)4G. Ces deux complexes sont exprimés différemment selon les organes de la plante (Rodriguez *et al.*, 1998). Le facteur eIF4E est exprimé dans tous les organes sauf dans certains tissus racinaires. A l'inverse, eIF(iso)4E est surtout exprimé dans les fleurs et les tissus en développement comme les méristèmes (Rodriguez *et al.*, 1998). Ces différences d'expression suggèrent que ces deux complexes auraient des fonctions différentes. En effet, même si ces deux

complexes permettent d'initier la traduction des ARNm, des différences d'affinité vis-à-vis de certains types d'ARNm ont été identifiées entre les complexes eIF4F et eIF(iso)4F (Gallie & Browning, 2001). Le complexe eIF4F permet une traduction plus efficace des ARN possédant une structure secondaire au voisinage de la coiffe et de ceux possédant plusieurs cadres de lecture (Gallie & Browning, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, des mutants KO d'eIF4E ou eIF(iso)4E ne présentent aucune différence morphologique ou développementale par rapport au génotype sauvage, suggérant une redondance fonctionnelle entre ces deux facteurs (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005a). Chez les mutants KO d'eIF(iso)4E, la concentration de la protéine eIF4E est plus élevée que chez le type sauvage, mettant en évidence l'existence de mécanismes cellulaires régulant l'expression post-transcriptionnelle d'eIF4E afin de compenser l'absence d'eIF(iso)4E (Duprat *et al.*, 2002).

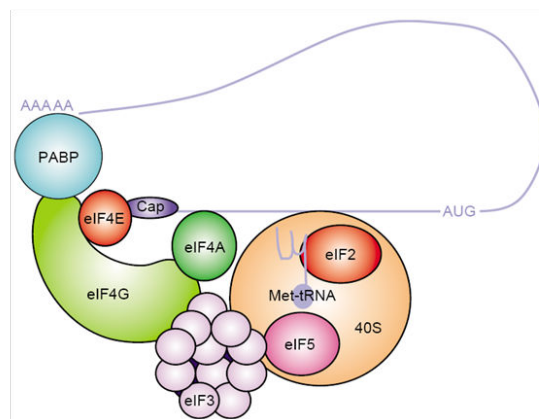


Figure 1: Le complexe d'initiation de la traduction des ARN messagers dans les cellules eucaryotes (figure de Robaglia et Caranta, 2006).

PABP : Poly(A)Binding Protein; eIF : eukaryotic Initiation Factor; Cap: coiffe des ARN messagers; 40S: Sous unité ribosomique 40S, AUG: codon d'initiation de la traduction.

La première étude identifiant le rôle des protéines eIF4E dans le cycle des *Potyvirus* a été réalisée par Wittmann *et al.* (1997) qui ont montré, par interaction double hybride chez la levure, que la VPg du *Turnip mosaic virus* (TuMV) interagissait avec l'eIF4E d'*A. thaliana*. Il a ensuite été montré que les mutants artificiels KO d'eIF(iso)4E chez *A. thaliana* présentent une résistance totale à trois *Potyvirus* : le TuMV, le *Tobacco etch virus* (TEV) et le *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Duprat *et al.*, 2002). Le rôle d'eIF4E dans la résistance naturelle aux *Potyvirus* a été mis en évidence pour la première fois grâce au clonage du gène récessif de résistance *pvr2* chez le piment (Ruffel *et al.*, 2002). Par la suite, de nombreuses études ont montré l'implication de gènes codant

pour la protéine eIF4E mais aussi eIF(iso)4E, eIF4G et eIF(iso)4G dans la résistance aux *Potyvirus* et à d'autres genres de virus à ARN comme les *Sobemovirus* ou les *Waikavirus* chez différentes familles de plantes cultivées (Tableau I). Le recrutement des différentes isoformes d'eIF4E pour l'accomplissement du cycle viral dépend du virus considéré même au sein du genre *Potyvirus* : certains virus utilisent préférentiellement l'une des isoformes eIF4E ou eIF(iso)4E, d'autres peuvent interagir avec plusieurs isoformes (Robaglia & Caranta, 2006). Par exemple, les mutants KO d'eIF(iso)4E d'*A. thaliana* sont résistants au TuMV, LMV, TEV et le *Plum pox virus* (PPV) mais sensibles au *Clover yellow vein virus* (CIYVV), alors que les mutants KO d'eIF4E1 sont résistants au CIYVV mais pas au TuMV (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005b; Decroocq *et al.*, 2006). La préférence des virus pour l'une ou l'autre des isoformes d'eIF4E varie selon la plante hôte. Le TEV et le LMV utilisent l'eIF(iso)4E chez *A. thaliana* (Lellis *et al.*, 2002 ; Duprat *et al.*, 2002) mais l'eIF4E chez le piment, la tomate ou la laitue (Ruffel *et al.*, 2002, 2005; Nicaise *et al.*, 2003). Certains virus peuvent utiliser plusieurs isoformes. C'est le cas du TuMV qui peut utiliser indépendamment l'eIF4E ou l'eIF(iso)4E de *Brassica rapa* dans des mutants d'*A. thaliana* KO pour eIF(iso)4E (Jenner *et al.*, 2010). De plus, des mutations au sein des deux isoformes eIF4E et eIF(iso)4E sont nécessaires au piment pour la résistance au *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) et *Pepper veinal mottle virus* (PepVMV) (Ruffel *et al.*, 2006), démontrant que ces virus sont capables d'utiliser l'une ou l'autre de ces deux isoformes d'eIF4E.

Tableau I: Gènes de résistance clonés codant pour des facteurs d'initiation de la traduction.

Plantes	gène/Locus	Protéine	Espèce virale ciblée	Références
<i>Lactuca sativa</i>	<i>mo1</i>	eIF4E	LMV	Nicaise <i>et al.</i> 2003
<i>Cucumis melo</i>	<i>nsv</i>	eIF4E	MNSV	Nieto <i>et al.</i> 2006
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>pot-1</i>	eIF4E	PVY / TEV	Ruffel <i>et al.</i> 2005
<i>Capsicum annuum</i>	<i>pvr2</i>	eIF4E	PVY / TEV	Ruffel <i>et al.</i> 2005
	<i>pvr6 + pvr2</i>	eIF(iso)4E/eIF4E	PVY / TEV / PepVMV / ChiVMV	Ruffel <i>et al.</i> 2006; Hwang <i>et al.</i> 2009
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>rym4</i>	eIF4E	BaYMV/ BaMMV	Kanyuka <i>et al.</i> , 2005; Stein <i>et al.</i> , 2005
	<i>rym5</i>	eIF4E		
	<i>rym6</i>	eIF4E		
<i>Pisum sativum</i>	<i>sbm1</i>	eIF4E	PSbMV	Gao <i>et al.</i> 2004
	<i>wlv</i>	allele de sbm1	BYMV	Bruun-rasmussen <i>et al.</i> 2007
	<i>cyv2</i>		CIYVV	Andrade <i>et al.</i> 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>cum1</i>	eIF4E	CIYVV/CMV	Sato <i>et al.</i> 2005; Yoshii <i>et al.</i> 2004
	<i>E6</i>	eIF(iso)4E	LMV/PPV/TuMV	Duprat <i>et al.</i> 2002; Decroocq <i>et al.</i> 2006
	<i>lsp1</i>	eIF(iso)4E	TuMV/TEV	Lellis <i>et al.</i> 2002
<i>Oryza sativa</i>	<i>tsv1</i>	eIF(iso)4G	RTSV	Albar <i>et al.</i> 2006
	<i>rymv-1</i>	eIF4G	RYMV	Lee <i>et al.</i> 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>cum2</i>	eIF4G	TCV/CMV	Yoshii <i>et al.</i> 2004

Les relations étroites existantes entre eIF4E (codé par le gène *pvr2*) et eIF(iso)4E (codé par le gène *pvr6*) au sein de la plante, leur implication individuelle ou en association dans la résistance à certains virus ainsi que la co-localisation entre *pvr6* et les deux QTL RB-3 et VA-3 suggèrent que *pvr6*-eIF(iso)4E pourrait être le facteur sous-jacent à ces deux QTL.

b) Epistasie entre *pvr2* et le QTL VA-3

Dans le chapitre 2, les résultats de la détection de QTL réalisée chez les 153 lignées HD porteuses de l'allèle de résistance *pvr2*³ ont été présentés. Durant ma thèse, j'ai également réalisé une analyse des QTL correspondant à la résistance quantitative (accumulation virale et AUDPC) chez 155 lignées HD issues de la même descendance, mais porteuses de l'allèle *pvr2*^{*} de sensibilité. Le virus "chimère CI", précédemment utilisé pour évaluer la fréquence de contournement de *pvr2*³, a été inoculé à 20 plantes par lignée et l'intensité des symptômes ainsi que l'accumulation virale ont été évaluées comme décrit dans la partie "Matériel et méthodes" de l'article 3. Les valeurs moyennes de ces deux caractères varient de façon significative entre les lignées ($p < 0.001$, test de Kruskal-Wallis) et ont des héritabilités (h^2) de 0.64 et 0.48 pour l'accumulation virale et les symptômes, respectivement. La détection de QTL a été réalisée avec la méthode iQTLm implémentée dans le logiciel MCQTL ainsi que MQM dans RQTL, comme pour l'article 3. Les QTL détectés sont présentés dans le tableau II et sur la figure 2.

Tableau II : QTL détectés chez les lignées porteuses de *pvr2*^{*} avec la méthode iQTLm implémentée dans MCQTL.

Virus	Caractère	QTL ^a	Localisation ^b	Intervalle de confiance	Allèle favorable ^c	Test MCQTL ^d	Variation expliquée locus	Variation expliquée caractère	Héritabilité	
Clone de PVY (Chimère CI)	Accumulation virale	QTL à effet additif:					29.2	64		
		Va-6b	6@169.9	155-190.5	Per	5.4	13.1			
		Va-9b	9@134	123-142	Per	4.9	11.9			
	AUDPC	QTL à effet épistatique:								
		eVa-8-9b	8@28.1-9@134		YW-YW=Per-Per	4.5	11.0			
		QTL à effet additif:						46	48	
		A-1b	1@76.8	64-94	Per	7.0	17.4			
A-6b	6@183.9	160-193	Per	6.4	15.8					
A-9b	9@114	108-149	YW	6.35	15.8					
A-11b	11@257	217-263	Per	4.0	9.6					
Mutant de PVY (Chimère CI VPg-N)	Accumulation virale	QTL à effet additif:					7.4	55		
		Va-6c ^h	6@185.9	160-198.5	Per	3.2	7.4			
	AUDPC	QTL à effet additif:					15.3	65		
		A-1c ^h	1@117	85-160	Per	3.15	7.4			
		A-11c	11@99.6	94.6-178	Per	4.2	10			

^aIndique que le QTL n'est significatif qu'au seuil $p=0.1$.

^bLa localisation des QTL est indiquée de la façon suivante: chromosome@position en cM.

^cIndique l'allèle parental réduisant la valeur du caractère mesuré.

^dCorrespond à une chute de la valeur du test MCQTL de 1. Le seuil du test MCQTL est de 3.5 pour $p=0.05$ et de 3.1 pour $p=0.01$, pour chacun des caractères.

Concernant l'accumulation virale dans les plantes, nous avons détecté deux QTL additifs sur les chromosomes 6 et 9, nommés VA-6b et VA-9b en référence à la nomenclature utilisée dans le chapitre II ("VA" pour "*viral accumulation*", le chiffre désignant le chromosome porteur du QTL et le "b" indiquant qu'il a été détecté chez les lignées porteuses de *pvr2*⁺ avec la chimère CI). L'étude d'interaction entre les QTL et le reste du fonds génétique a révélé que le QTL VA-9b interagissait avec un QTL localisé sur le chromosome 8 nommé VA-8b. L'ensemble de ces trois QTL explique 29.2% de la variation phénotypique observée soit 45.6% (0.292/h²) de la variation génétique. Concernant l'AUDPC, nous avons détecté quatre QTL additifs sur les chromosomes 1, 6, 9 et 11, nommés A-1b, A-6b, A-9b et A-11b, respectivement. L'étude d'interaction entre les QTL et le reste du fonds génétique n'a révélé aucune interaction. L'ensemble des QTL explique 46% de la variation phénotypique observée, soit 96% de la variation génétique.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec les lignées porteuses de *pvr2*³, suite à l'inoculation de ces lignées avec la chimère CI VPg-N (différant de la chimère CI par une seule substitution nucléotidique permettant le contournement de *pvr2*³), nous remarquons que tous les QTLs détectés avec les lignées porteuses de *pvr2*³ ont également été détectés avec les lignées porteuses de *pvr2*⁺, à l'exception des QTL majeurs VA-3 et A-3 (figure 2). L'absence de détection du QTL VA-3 ne peut pas s'expliquer par un manque de puissance lors de la détection des QTL car pour l'accumulation virale nous détectons toujours le QTL VA-6 qui a un effet beaucoup moins fort que le QTL VA-3 chez les lignées *pvr2*³ ($R^2=0.34$ pour VA-3 contre $R^2=0.16$ pour VA-6) ainsi que A1 pour l'AUDPC. L'absence d'effet détectable sur l'accumulation virale et l'AUDPC du locus VA-3 (A-3) indique l'existence d'une interaction fonctionnelle soit entre le QTL VA-3 (A-3) et la souche virale utilisée : VA-3 (A-3) aurait un effet sur l'accumulation virale de la chimère CI VPg-N mais pas sur la chimère CI, soit entre le QTL VA-3 (A-3) et le gène *pvr2* : VA-3 (A-3) n'aurait un effet sur l'accumulation du PVY qu'en présence de l'allèle *pvr2*³.

Pour trancher entre ces deux hypothèses, nous avons testé le niveau de résistance quantitative des lignées porteuses de *pvr2*⁺ vis-à-vis de la chimère CI VPg-N précédemment utilisée sur les lignées *pvr2*³. De cette façon, si nous détectons les QTL VA-3 et VA-6, nous validons l'interaction fonctionnelle entre le QTL VA-3 et la souche virale alors que si nous ne détectons que le QTL VA-6 et pas le QTL VA-3, nous validons

l'interaction fonctionnelle entre le QTL VA-3 et le gène *pvr2*. Les résultats QTL obtenus sont présentés dans le tableau II. A nouveau, le QTL VA-6 (et A-1) est détecté, mais aucun signal n'apparaît dans l'intervalle porteur de VA-3 (ni A-3). Ce résultat valide l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre le QTL VA-3 et le gène *pvr2* : l'effet sur l'accumulation virale du QTL VA-3 ne s'exprime qu'en présence de l'allèle de résistance *pvr2*³. Considérant que ce QTL coïncide avec le polymorphisme de délétion du gène *pvr6* (*eIF(iso)4E*), cette épistasie pourrait résulter d'une interaction fonctionnelle entre les isoformes *eIF4E1* (*pvr2*) et *eIF(iso)4E* (*pvr6*).

Les interactions épistatiques entre QTL de résistance à des pathogènes sont fréquentes (Lefebvre et Palloix, 1996, Caranta *et al.*, 1997; Pressoir *et al.*, 1998; Chaim *et al.*, 2001; Calenge *et al.*, 2005; Vandemark *et al.*, 2008) et peuvent impliquer divers mécanismes, comme la redondance fonctionnelle ou l'interaction physique entre les produits des gènes épistatiques. (Lehner, 2011). Chez le riz, une épistasie entre deux QTLs (QTL1 et QTL12) de résistance au *Rice yellow mottle virus* (RYMV) a été mise en évidence par Pressoir *et al.* (1998). Dans ce système, le QTL1 n'est détecté qu'en présence de l'allèle de sensibilité au QTL12. Dans une autre étude, Boissard *et al.* (2007) ont cartographié les gènes appartenant aux familles eIF4E et eIF4G dans le génome du riz et ont montré que les QTL1 et 12 co-localisent, respectivement, avec un gène codant un eIF4E et un gène codant un eIF4G-like. Chez *Brassica rapa*, deux gènes confèrent ensemble une résistance au TuMV (Rusholme *et al.*, 2007). Le premier gène *retr01* est épistatique au second gène *ConTR01* : les plantes ne sont résistantes que si elles sont homozygotes pour *retr01* et possèdent au moins une copie du gène *ConTR01*. La cartographie de ces gènes montrent que *retr01* co-localise avec un des trois loci codant eIF(iso)4E alors que *ConTR01* co-localise avec un des trois loci codant eIF4E et un des trois loci codant eIF(iso)4E (Rusholme *et al.* 2007). Sans preuve formelle, ces deux études mettent en évidence que deux gènes codant des facteurs d'initiation de la traduction peuvent avoir un effet épistatique sur la résistance partielle du riz au RYMV ou la résistance de *Brassica rapa* au TuMV.

L'existence d'une interaction entre le QTL VA-3 et *pvr2* est donc parfaitement compatible avec la possibilité que *pvr6* soit le gène sous-jacent au QTL VA-3.

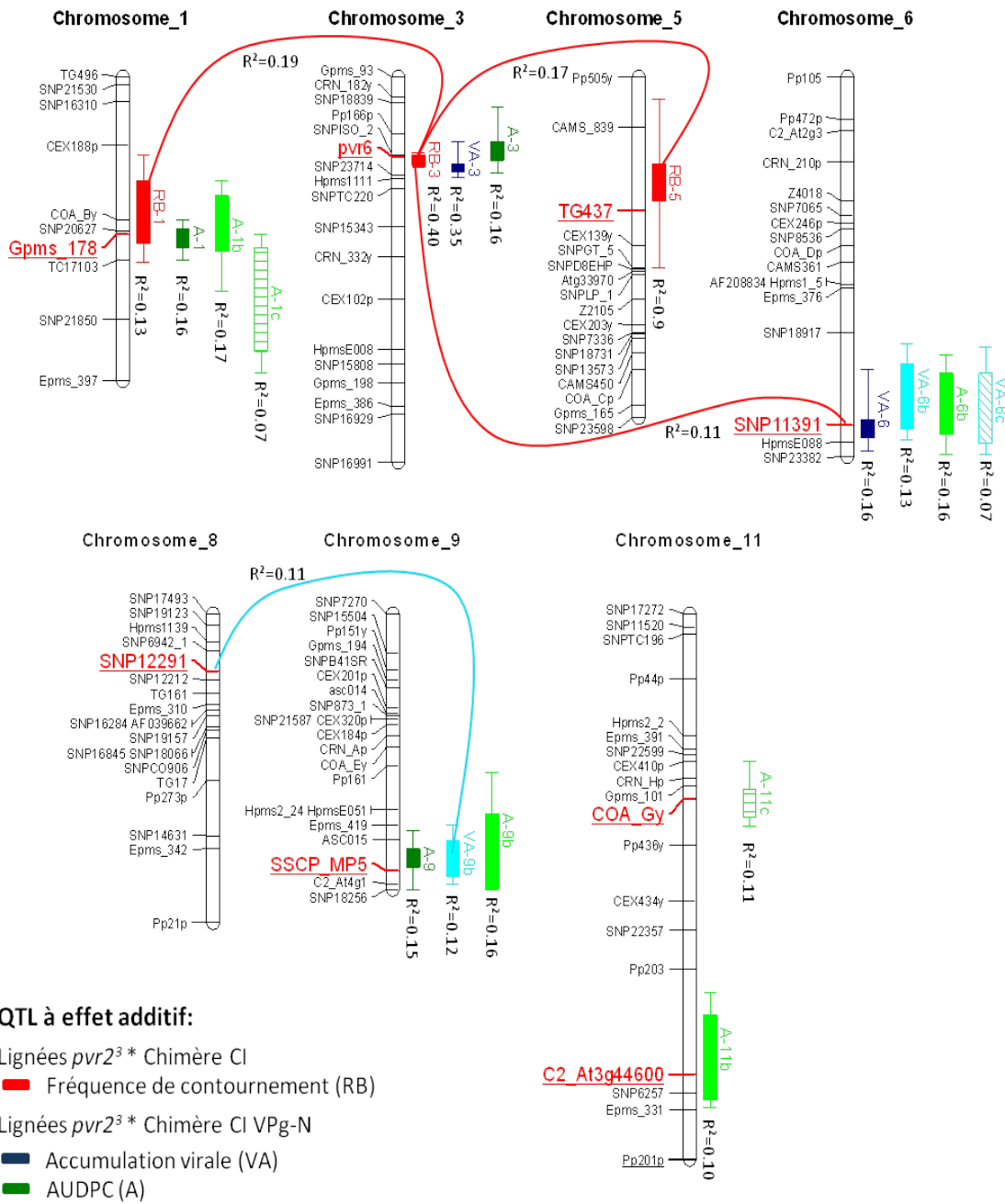


Figure 2: Localisation sur la carte génétique du piment des QTL (*quantitative trait loci*) de fréquence de contournement de *pvr2*³ (RB), d'accumulation virale (VA) et d'AUDPC (*Area under the disease progress curve*) détectés chez 153 lignées porteuses de *pvr2*³ ou chez 155 lignées *pvr2*⁺ après inoculation des virus chimère CI ou chimère CI VPg-N (voir légende).

2. Un modèle fonctionnel expliquant le rôle de *pvr6* dans la durabilité de *pvr2³*

L'ensemble de mes résultats de thèse suggère fortement que la présence d'un allèle non-fonctionnel au niveau du gène *pvr6* augmente la fréquence de contournement du gène *pvr2³*. Au regard de nos connaissances sur le fonctionnement des eIF4E et de leur régulation, une hypothèse mécanistique peut être proposée pour comprendre le rôle de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2³*.

L'étude *in vitro* des sites de fixation à l'eIF4E de la coiffe des ARNm et de la VPg des *Potyvirus* a montré que malgré le chevauchement partiel de leurs sites de fixation (Yeam *et al.*, 2007), la coiffe et la VPg pouvaient se lier simultanément à l'eIF4E (Michon *et al.*, 2006). Cependant, la fixation de l'une des deux molécules diminue fortement l'affinité d'eIF4E pour l'autre protéine (Michon *et al.* 2006). De plus, d'autres études ont montré qu'il existait une compétition entre la coiffe des ARNm et la VPg pour la fixation à eIF4E ou eIF(iso)4E (Khan *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2008). Des analyses de traduction *in vitro* ont mis en évidence que la traduction des ARN coiffés était inhibée en présence de la VPg (Khan *et al.* 2008) et, fait important, l'inhibition peut être levée lorsque la quantité d'eIF4E disponible n'est plus limitante.

D'après ces résultats, chez une plante sensible (dans notre cas une plante porteuse de l'allèle de sensibilité *pvr2⁺*) la compétition pour l'accès à eIF4E entre la VPg du virus et la coiffe des ARNm est en faveur de la VPg du virus. Le cycle viral peut donc s'accomplir et la plante est infectée (figure 3 a.).

A l'inverse, dans une plante porteuse de l'allèle de résistance *pvr2³*, l'affinité entre la VPg du virus et l'eIF4E est fortement diminuée et la compétition entre la VPg du virus et la coiffe des ARNm est alors en faveur des ARNm : le cycle viral est bloqué et la plante est résistante (figure 3 c.). La baisse d'affinité entre la VPg d'un virus avirulent et l'eIF4E codé par l'allèle *pvr2³* est très forte et se traduit par une absence d'interaction *in vitro* entre les deux protéines (Charron *et al.*, 2008).

Prenons maintenant le cas d'une plante porteuse de l'allèle *pvr2³* et de l'allèle KO *pvr6*. Il a été montré chez *Arabidopsis thaliana*, que l'absence de protéine eIF(iso)4E induisait une augmentation de la concentration d'eIF4E (Duprat *et al.*, 2002).

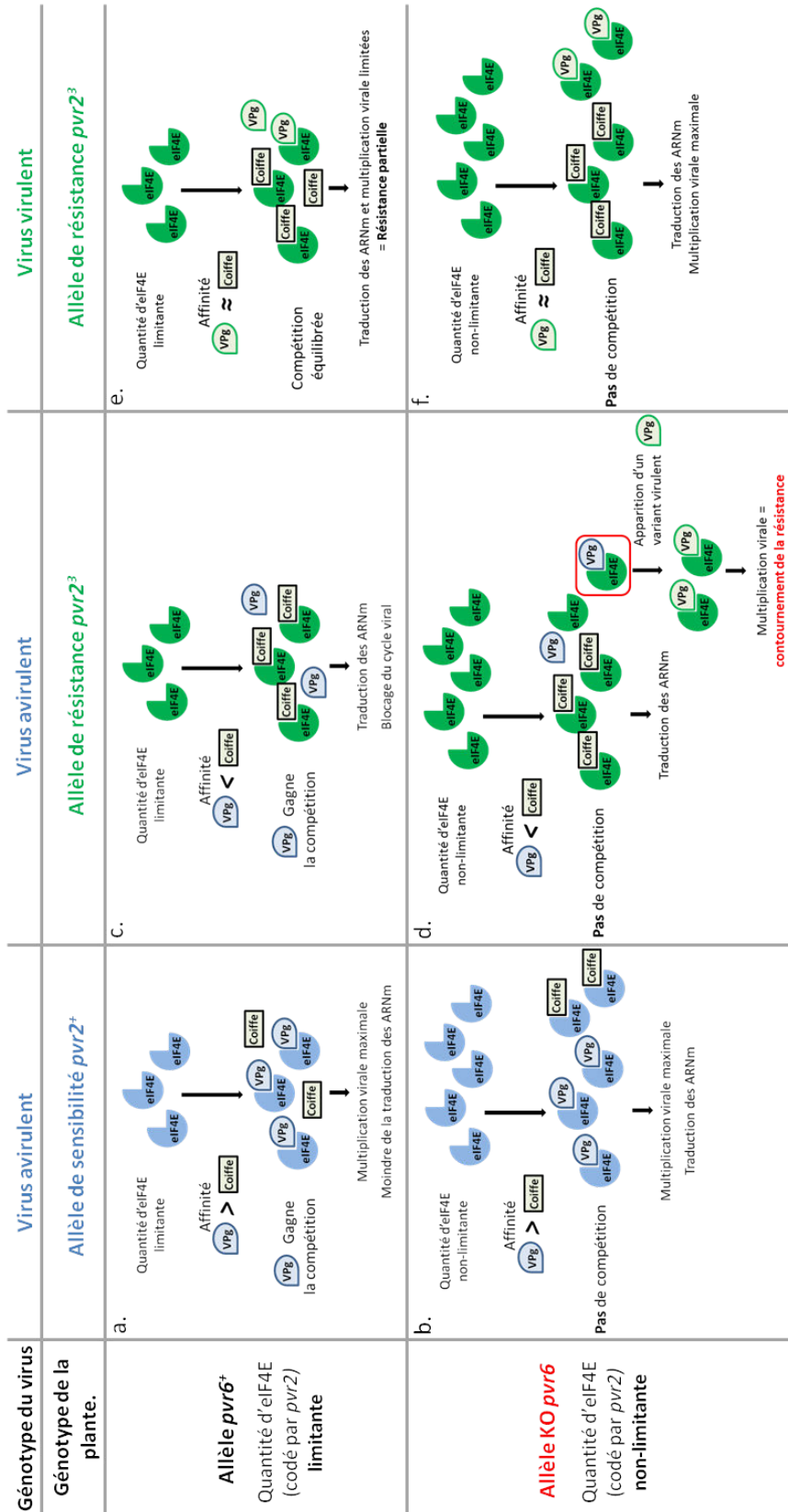


Figure 3: Hypothèse mécanistique du rôle de *pvr6* sur le contournement de la résistance conférée par *pvr2*³.

a. Cas d'une plante porteuse de l'allèle de sensibilité *pvr2*⁺ et de *pvr6*⁺ : La VPg du virus a une très bonne affinité avec l'eIF4E, la compétition contre la coiffe des ARNm est en sa faveur. L'eIF4E est limite pour les ARNm mais pas pour la VPg du virus : la multiplication virale est à son maximum. **b.** Cas d'une plante porteuse de l'allèle de sensibilité *pvr2*⁺ et de *pvr6*⁻ : l'absence eIF(iso)4E entraîne une surexpression de eIF4E. La quantité d'eIF4E n'est plus limitante pour les ARNm, l'augmentation de concentration d'eIF4E ne change pas la multiplication virale qui était déjà à son maximum. **c.** Cas d'une plante porteuse de l'allèle de résistance *pvr2*³ et de *pvr6*⁺ inoculée avec un virus avirulent. La VPg du virus n'a que très peu d'affinité avec l'eIF4E, la compétition contre la coiffe des ARNm est en faveur des ARNm. La multiplication virale est bloquée : la plante est résistante et la résistance n'est pas contournée. **d.** Cas d'une plante porteuse de l'allèle de résistance *pvr2*³ et de *pvr6*⁻ inoculée avec un virus avirulent : l'absence eIF(iso)4E entraîne une surexpression de eIF4E. La quantité d'eIF4E n'est plus limitante. Des interactions peu compatibles entre eIF4E et la VPg peuvent avoir lieu permettant une faible multiplication virale suffisante pour acquérir une mutation de contournement. Une fois apparu, le mutant virulent est beaucoup plus compétitif et se multiplie : la résistance est contournée. **e.** Cas d'une plante porteuse de l'allèle de résistance *pvr2*³ et de *pvr6*⁺ inoculée avec un virus virulent : l'affinité du mutant virulent pour l'eIF4E n'est pas maximale. La quantité de eIF4E est limitante pour les ARNm et la VPg. Le cycle viral est ralenti, la plante est partiellement résistante. **f.** Cas d'une plante porteuse de l'allèle de résistance *pvr2*³ et de *pvr6*⁻ inoculée avec un virus virulent : l'absence eIF(iso)4E entraîne une surexpression de eIF4E. La quantité d'eIF4E n'est plus limitante. La multiplication virale est maximale.

Si le même phénomène se produit chez le piment, la concentration en eIF4E (produit du gène de résistance *pvr2*³) des génotypes de piment porteurs de l'allèle KO *pvr6* serait plus élevée que chez les génotypes porteurs d'un allèle fonctionnel *pvr6*⁺. Dans les plantes porteuses de l'allèle KO *pvr6*, la quantité d'eIF4E ne serait plus limitante, la compétition avec la coiffe des ARNm serait donc faible, permettant une interaction (même de faible affinité donc potentiellement moins efficace) entre la VPg et eIF4E. Le virus pourrait alors se multiplier suffisamment pour ensuite acquérir une des mutations de la VPg lui permettant d'augmenter son affinité avec eIF4E puis de se multiplier et d'envahir la plante: la résistance conférée par *pvr2*³ est alors contournée (figure 3 d.).

Cette hypothèse permet aussi d'expliquer le rôle potentiel de *pvr6* dans l'accumulation virale (suggéré par la co-localisation avec le QTL VA-3) ainsi que son effet conditionnel à la présence de *pvr2*³. Lors du test de la résistance partielle conférée par le fonds génétique, les plantes porteuses de *pvr2*³ ont été inoculées avec un variant de PVY virulent possédant la mutation 119N dans sa VPg. Malgré une meilleure affinité entre l'eIF4E codée par *pvr2*³ et la VPg du virus virulent qu'avec la VPg du virus avirulent, on peut supposer que cette restauration d'affinité ne soit pas complète et qu'elle soit toujours plus faible que celle des ARN coiffés. Dans les plantes porteuses de *pvr6*⁺, la quantité d'eIF4E étant limitante, la compétition entre la VPg et la coiffe des ARNm est forte. Le virus peut alors accomplir son cycle viral mais sa multiplication est limitée par la disponibilité de l'eIF4E : la plante est partiellement résistante (figure 3 e.) et un effet allélique diminuant l'accumulation du virus apparaît au QTL du locus *pvr6*⁺. Par contre, chez les plantes porteuses de *pvr6*, la quantité d'eIF4E n'est plus limitante et le virus peut se multiplier de façon maximale: la plante est sensible (figure 3 f.) et l'allèle *pvr6* apparaît comme un QTL favorisant la multiplication virale. A l'inverse, on peut supposer que l'affinité de la VPg pour l'eIF4E codé par l'allèle de sensibilité *pvr2*⁺ soit très élevée et que la compétition entre les ARN coiffés et la VPg pour l'accès à eIF4E soit en faveur de la VPg comme cela a été montré pour le TEV (Khan *et al.* 2008). Dans ce contexte, la quantité d'eIF4E est limitante pour la traduction des ARN coiffés mais pas pour celle du virus. Ainsi, une augmentation de l'expression d'eIF4E dans les plantes *pvr2*⁺ n'aura pas d'effet sur la multiplication virale (figure 3 b.). En conséquence, les allèles *pvr6*⁺/*pvr6*

n'auront pas d'effet différentiel sur l'accumulation virale chez les plantes porteuses de *pvr2⁺*.

3. Perspectives

a) Validation fonctionnelle de l'implication de *pvr6-eIF(iso)4E* dans la fréquence de contournement de *pvr2³*

Durant la dernière année de ma thèse, j'ai essayé de valider le rôle de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2³* (chapitre IV). La difficulté d'obtenir des plantes de piment transgéniques nous a orientés vers deux autres méthodes. La première était d'éteindre l'expression du gène *pvr6* chez des plantes porteuses de *pvr2³* et *pvr6⁺* par la méthode d'extinction de gène induite par un virus (ou VIGS : *Virus-induced gene silencing*). L'extinction de *pvr6* était alors supposée augmenter la fréquence de contournement de *pvr2³*. La deuxième méthode consistait à réaliser un test de complémentation fonctionnelle visant à exprimer le gène *pvr6⁺* chez des plantes porteuses de *pvr2³* et *pvr6*. Les essais de complémentation ont été réalisés par expression du gène *pvr6⁺* en utilisant un clone de PVY possédant la séquence codante pour eIF(iso)4E dans son génome (nommé PVY-eIF(iso)4E). L'expression de *pvr6⁺* devait alors diminuer la fréquence de contournement de *pvr2³*. Les essais de validation fonctionnelle du gène *pvr6* n'ont pas permis de valider l'effet de ce gène sur la fréquence de contournement de *pvr2³*. Plusieurs verrous techniques, évoqués précédemment, pourraient être responsables de cet échec.

Très récemment, des transformations stables de piment ont été réalisées à l'UR GAFL, ouvrant ainsi la possibilité de mettre en place d'autres essais de validation fonctionnelle de *pvr6*. La transformation stable va permettre de s'affranchir des problèmes rencontrés lors de nos essais de validation par expression transitoire (chapitre IV). Ainsi, l'effet d'une expression ou d'une extinction de *pvr6* stable et homogène dans la plante pourra être testé sur la fréquence de contournement de la résistance.

b) Effet de *pvr6* sur la fréquence de contournement des autres allèles de *pvr2*

Au sein des ressources génétiques du piment, 23 allèles de résistance différents au locus *pvr2* ont été caractérisés (de *pvr2¹* à *pvr2²³*, Charron *et al.*, 2008, Caranta,

données non publiées). Il serait intéressant de regarder si la présence de l'allèle KO au locus *pvr6* affecte de la même façon la fréquence de contournement des différents allèles de *pvr2*. Nous avons montré, par analyse d'une collection de piment porteurs des allèles *pvr2*³ ou *pvr2*⁴, que l'effet potentiel de *pvr6* sur la fréquence de contournement de *pvr2*³ pouvait être étendu à l'allèle *pvr2*⁴. Par conséquent, il est possible que *pvr6* affecte aussi la durabilité des autres allèles au locus *pvr2*.

Cette analyse est surtout cruciale pour les allèles *pvr2*¹, *pvr2*² et *pvr2*⁷. En effet, la combinaison de chacun de ces allèles avec l'allèle KO au locus *pvr6* confère la résistance au PepVMV et au ChiVMV (Ruffel *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2009), deux potyvirus majeurs du piment en Afrique et en Asie, et ces résistances sont en cours d'exploitation en sélection. Au vu des résultats obtenus sur les allèles *pvr2*³ et *pvr2*⁴, il apparaît important de vérifier si la combinaison de *pvr6* avec les autres allèles au locus *pvr2* augmente aussi les risques de contournement de ces allèles par le PVY.

D. Avancées pour la sélection de résistances durables

La sélection variétale pour les résistances aux maladies nécessite très fréquemment d'introgresser des allèles de résistance à partir de variétés exotiques voire d'espèces apparentées (parents donneurs) dans des cultivars ou parents élites à hautes performances agronomiques (parents receveurs) et/ou d'introgresser ces allèles dans différents types variétaux d'une même espèce. Les performances agronomiques du futur cultivar : caractères de productivité, de qualité, d'adaptation à l'environnement sont sous contrôle polygénique et l'introggression des allèles de résistance est souvent accompagnée d'un changement drastique du fonds génétique. Dans un objectif de durabilité des résistances, il apparaît donc souhaitable d'évaluer les risques de contournement de ces allèles de résistance qui pourraient être augmentés par cette sélection afin de prévoir ces risques et, éventuellement, de mettre en place des stratégies de déploiement de ces résistances, voire d'intégrer la durabilité comme un critère additionnel dans le schéma de sélection créatrice. Les résultats obtenus dans ma thèse peuvent contribuer à ces stratégies.

1. Evaluer les risques a posteriori : test direct de la fréquence de contournement

L'introgession d'un nouveau gène majeur de résistance dans une variété à haute performance agronomique s'accompagne d'un changement drastique du fonds génétique de ce gène. Ce changement de fonds génétique peut avoir de grandes conséquences sur l'efficacité de ce gène. Par exemple, le gène *Zym* conférant une résistance totale au *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) chez la courge ne confère plus qu'une tolérance après avoir été introgressé chez la courgette. Mes résultats de thèse montrent que ce changement de fonds génétique peut aussi avoir un effet très fort sur la durabilité du gène de résistance introgressé.

Suite à mes travaux, des tests directs de la fréquence de contournement (en laboratoire) peuvent être envisagés afin d'évaluer si (et à quel point) l'introgession d'un gène majeur de résistance dans une nouvelle variété a augmenté les risques de contournement. L'objectif de ces tests serait de comparer la fréquence de contournement de la ou des nouvelles variétés entre elles et avec celle du parent donneur de résistance. En fonction des résultats obtenus, d'éventuelles stratégies de déploiement pourraient être envisagées.

La fréquence de contournement de la nouvelle variété pourrait être testée par différentes méthodes. Par inoculation directe du virus avirulent sur un lot (relativement important, >50 plantes) de plantes homogènes génétiquement (issue de l'autofécondation du génotype à tester) ou sur des plantes multipliées par greffage. Lorsqu'il est envisageable, le greffage présente un double intérêt : il ne nécessite pas de phase d'autofécondation et, si le porte-greffe est sensible au virus testé, il augmente les fréquences de contournement, ce qui permet de réduire le nombre de plantes (greffons) à tester (voir la partie I.B.2.a) de l'introduction). Ces tests sont applicables dans le cas de résistances aux virus. En effet, les virus évoluent très rapidement et des variants virulents sont facilement générés. A l'inverse, ils semblent plus difficilement applicables pour des pathogènes dont le temps d'évolution est plus long (champignons, nématodes, ...). Pour ces pathogènes l'évaluation des fréquences de contournement au champ, lors des tests finaux d'évaluation des variétés, pourrait être une alternative.

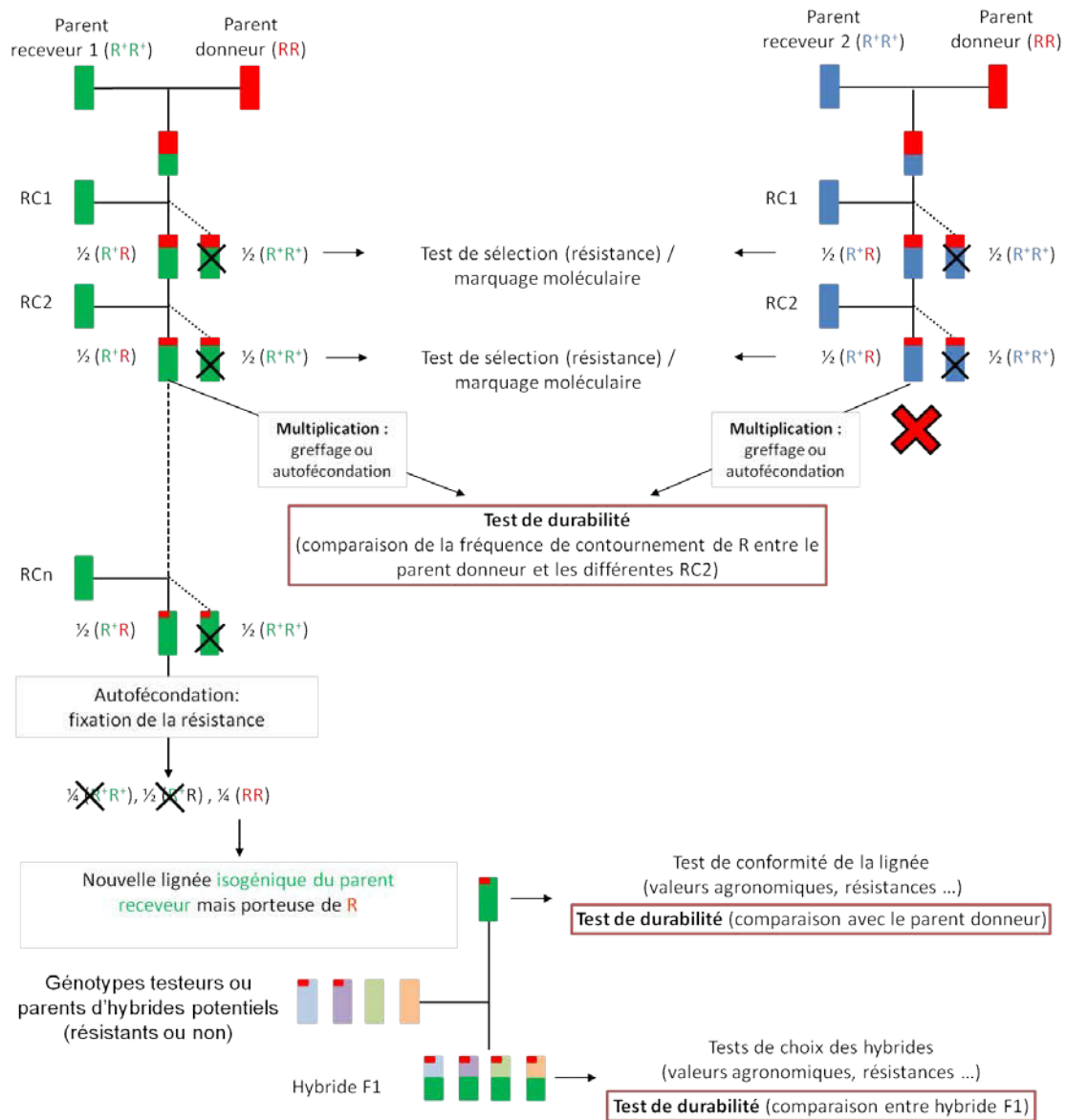


Figure 4: Intégration des tests d'évaluation de la fréquence de contournement d'un gène majeur de résistance dans un schéma de sélection de type rétrocroisement (RC). Ce schéma représente la sélection d'un gène de résistance dominant. Lorsque le gène de résistance est introgressé dans plusieurs variétés receveuses candidates, un test de la fréquence de contournement du gène majeur R peut-être réalisé. Dans ce schéma, le fond génétique du parent receveur 2 (bleu) est moins favorable à la durabilité du gène R que celui du parent receveur 1 (vert): le schéma de sélection ne continue que pour le parent receveur 1. La fréquence de contournement du gène R chez la lignée isogénique finale peut être comparée à celle chez le parent donneur lors des tests de conformité de la lignée. Enfin, la fréquence de contournement du gène R pourrait devenir un nouveau critère lors du choix des parents d'hybrides potentiels.

La méthode de sélection la plus utilisée lorsque l'on souhaite introgresser un gène majeur de résistance dans une ou plusieurs variétés de bonne valeur agronomique est le rétrocroisement (RC) (figure 4). Son principe est de remplacer les allèles défavorables du parent donneur de résistance par ceux (favorables) du parent receveur et de ne garder que le gène de résistance. A chaque cycle de rétrocroisement et en l'absence de sélection, le fonds génétique du parent donneur est statistiquement réduit de moitié. Dans un schéma de sélection de type rétrocroisement, des tests de sélection (dans notre cas des tests de résistance et/ou de marquage moléculaire) sont réalisés après chaque cycle de rétrocroisement, permettant de ne sélectionner que les plantes porteuses du gène de résistance. Dans le cas d'un gène de résistance récessif, une génération d'autofécondation des descendants est nécessaire à chaque cycle avant de pouvoir réaliser les tests de résistance. Dans le cas de la sélection assistée par marqueurs (SAM) les tests de résistance peuvent être supprimés ainsi que la génération d'autofécondation et remplacés par le marquage de l'allèle de résistance hétérozygote chez les descendants.

Dans ce type de schéma de sélection, il paraît envisageable d'intégrer des tests de fréquence de contournement du gène de résistance à différents niveaux (figure 4) :

- en cours de sélection, dès le deuxième ou troisième cycle de rétrocroisement, les descendants en ségrégation possèdent statistiquement 87,5% à 93,75% du fonds génétique du parent receveur. Aussi, une évaluation de la fréquence de contournement informera si le fonds génétique est défavorable ou non à la durabilité en comparaison avec le parent donneur. Cette évaluation peut-être pratiquée après multiplication par greffage ou sur les descendants issus d'autofécondation. Dans ce dernier cas, si la résistance est dominante, un deuxième cycle d'autofécondation sera nécessaire afin de sélectionner les descendances homozygotes résistantes. Le sélectionneur pourra alors rapidement connaître le risque de contournement lors de l'introgression dans différents fonds génétiques et poursuivre avec les fonds génétiques les plus favorables.
- lors de l'évaluation finale des lignées introgressées afin de vérifier si la fréquence de contournement du gène de résistance n'est pas plus forte chez les lignées introgressées que chez le parent donneur. Si c'est le cas, des stratégies de

déploiement ou des itinéraires techniques appropriés à cette variété devront être mis en place.

- lors du choix des combinaisons hybrides : Parmi les variétés commerciales modernes, beaucoup sont des variétés hybrides F1. Pour ce type de variété, la lignée homozygote issue du schéma de rétrocroisement est testée pour sa valeur en croisement avec des lignées « testeurs » ou avec d'autres lignées parentales, résistantes ou non, pour de nombreux critères agronomiques et de résistances aux pathogènes. Nos tests de fréquence de contournement du gène majeur de résistance pourraient alors faire l'objet d'un nouveau critère de choix des hybrides à commercialiser, en favorisant les hybrides pour lesquels le fonds génétique déstabilise le moins (voire stabilise) la durabilité du gène de résistance introgressé.

2. Sélectionner pour la durabilité: critère direct du taux de contournement ou indirect via la résistance partielle additionnelle

L'objectif de la sélection pour la durabilité serait d'améliorer la durabilité d'un gène de résistance qui est peu durable *a priori* (comme par exemple *pvr2*³) ou ciblant un pathogène possédant une forte capacité d'adaptation (McDonald & Linde, 2002). Mes résultats de thèse permettent aussi d'envisager la sélection pour la durabilité d'un gène majeur de résistance. En effet, mes travaux montrent que la fréquence de contournement d'un gène majeur de résistance est un caractère très héritable ($h^2=0.87$), ce qui rend possible son utilisation comme critère de sélection. De plus, la co-localisation de la majorité (3/4) des QTL affectant ce caractère avec des QTL affectant la résistance partielle, permet d'envisager une sélection indirecte pour la durabilité *via* la sélection pour la résistance quantitative.

La sélection directe sur la fréquence de contournement est sans doute la meilleure stratégie car elle permet de sélectionner des facteurs génétiques ayant des mécanismes d'action différents. Dans ce cas, les tests de sélection seront les mêmes que ceux décrits dans le chapitre précédant. Cependant, la sélection directe n'est envisageable que pour les résistances ciblant des pathogènes qui sont capables d'évoluer rapidement lors de tests en laboratoire (ou sous serre) et donc principalement pour des résistances ciblant des virus. Pour les autres pathogènes, une sélection

indirecte *via* la sélection pour la résistance partielle peut être réalisée et deux stratégies peuvent être envisagées. Si des souches virulentes vis-à-vis du pathogène sont disponibles, on peut sélectionner dans un même schéma pour le gène majeur de résistance (inoculation avec une souche avirulente) puis pour la résistance quantitative (inoculation avec une souche virulente). Si aucune souche virulente n'est disponible, il faudra alors sélectionner séparément le fonds génétique pour la résistance partielle puis utiliser ces géotypes partiellement résistants comme parents receveurs lors de l'introggression du gène majeur de résistance. Quelle que soit la stratégie, la sélection indirecte sera plus coûteuse en temps et en tests de résistance. Elle pourrait être simplifiée grâce à la sélection par marqueurs qui permettrait une sélection simultanée de la résistance majeure et du fonds génétique (QTLs de résistance partielle), même en l'absence de souche virulente.

Durant ma thèse, l'analyse du pathosystème PVY/piment a fourni de nombreuses informations quant à l'action du fonds génétique sur la durabilité d'un gène majeur de résistance. Le rôle majeur du niveau de résistance partielle conféré par le fonds génétique de la plante ouvre des pistes pour envisager la gestion de la durabilité des résistances dès la création de nouvelles variétés. D'un point de vue plus fondamental, la mise en évidence du rôle du fonds génétique de la plante sur la vitesse de sélection des variants virulents vis-à-vis d'une résistance ouvre des perspectives novatrices concernant la recherche de facteurs génétiques exerçant des pressions de sélection différentielles ou affectant l'intensité de la dérive génétique s'exerçant sur des populations pathogènes.

Références Bibliographiques

A

- Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, C., Candresse, T., Le Gall, O. and German-Retana, S.** (2009) Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic *potyvirus*. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 109–113.
- Acosta-Leal, R. and Xiong, Z.** (2008) Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco Virgin A Mutant (VAM) to *Potato virus Y*. *Virology* **379**, 275-283.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F. and Fauquet, C. M.** (2005) Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.* **150**, 459–479.
- Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamäki, M. L. and Valkonen, J. P. T.** (2011) Helper component proteinase of the genus *potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J. Virol.* **85**, 6784-6794.
- Albar, L., Bangratz-Reyser, M., Hébrard, E., Ndjiondjop, M-N, Jones, M and Ghesquière, A.** (2006) Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *The Plant Journal* **47**: 417–426.
- Andersen, K. and Johansen, I.** (1998) A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic *potyvirus* modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* **241**, 304-311.
- Andrade, M, Abe, Y, Nakahara, KS and Uyeda, I.** (2009) The *cyv-2* resistance to *Clover yellow vein virus* in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 241–249.
- Andrade, M, Sato, M and Uyeda, I.** (2007) Two resistance modes to *Clover yellow vein virus* in pea characterized by a green fluorescent protein-tagged virus. *Phytopathology* **97**: 544–550.
- Aramburu, J., Galipienso, L. and Matas, M.** (2006) Characterization of *Potato virus Y* isolates from tomato crops in Northeast Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* **115**, 247-258.
- Araya, C, Peña, E, Salazar, E., Román, L, Medina, C., Mora, R., Aljaro, A. and Rosales, I.M.** (2011). Symptom severity and viral protein or RNA accumulation in lettuce affected by big-vein disease. *Chilean journal of agricultural research* **71**: 63–72.
- Atreya, C., Raccah, B. and Pirone, T.** (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a *potyvirus*. *Virology* **178**, 161-165.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D. and Pirone, T.P.** (1991) Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 7887–7891.
- Atreya, P.L., Lopez-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D. and Pirone, T.P.** (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in *potyvirus* transmission by aphids. *J. Gen. Virol.* **76**, 265-270.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A., Moury, B.** (2006) Different Mutations in the Genome-Linked Protein VPg of *Potato virus Y* Confer Virulence on the *pvr23* Resistance in Pepper. *Mol. Plant–Microbe Interact* **19**: 557–563.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B.** (2007) Molecular dissection of the *Potato virus Y* VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* **88**, 1594-1601.

B

- Barker, H. and Harrison, B. D.** (1984) Expression of genes for resistance to *Potato virus Y* in potato plants and protoplasts. *Ann. Appl. Biol.* **105**, 539-545.
- Barreda, V.D., Palazzesi, L., Tellería, MC., Katinas, L., Crisci, J. V., Bremer, K., Passalia, M. G., Corsolini, R., Rodríguez Brizuela, R. and Bechis, F.** (2010) Eocene Patagonia fossils of the daisy family. *Science* **329**, 1621.

- Beczner, L., Horváth, J., Romhányi, I. and Förster, H.** (1984) Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.* **27**, 339–352.
- Bedhomme, S., Lafforgue, G. and Elena Santiago, F.** (2012) Multihost Experimental Evolution of a Plant RNA Virus Reveals Local Adaptation and Host-Specific Mutations. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1481–1492.
- Ben Khalifa, M., Simon, V., Marrakchi, M., Fakhfakh, H. and Moury, B.** (2009) Contribution of host plant resistance and geographic distance to the structure of *Potato virus Y* (PVY) populations in pepper in Northern Tunisia. *Plant Pathol.* **58**, 763–772.
- Ben Khalifa, M., Simon, V., Fakhfakh, H. and Moury, B.** (2012) Tunisian *Potato virus Y* isolates with unnecessary pathogenicity towards pepper: support for the matching allele model in eIF4E resistance–*potyvirus* interactions. *Plant Pathol.* **61**, 441–447.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D.C.** (1999) The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-791.
- Betancourt, M., Fereres, A., Fraile, A. and García-Arenal F.** (2008) Estimation of the Effective Number of Founders That Initiate an Infection after Aphid Transmission of a Multipartite Plant Virus. *Journal of Virology* **82**: 12416–12421.
- Bhat, A.I., Varma, A., Pappu, H.R., Rajamannar, M., Jain, R.K. and Praveen, S.** (1999) Characterization of a *potyvirus* from eggplant (*Solanum melongena*) as a strain of *Potato virus Y* by N-terminal serology and sequence relationships. *Plant Pathol.* **48**, 648-654.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P.** (1997) A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a *potyvirus*. *Virology* **231**, 141–147.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T.P.** (1998) Mutations in the *potyvirus* helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **79**, 3119–3122.
- Blanco-Urgoiti, B., Sanchez, F., Perez de san Roman, C., Dopazo, J. and Ponz, F.** (1998) PVY-C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J. Gen. Virol.* **79**, 2037–2042.
- Block, J., McKenzie, A., Guy, P. and Gibbs, A.** (1987) Nucleotide sequence comparisons of turnip *yellow mosaic virus* isolates from Australia and Europe. *Arch. Virol.* **97**:283–95
- Boisnard, A., Albar, L., Thiéméle, D., Rondeau, M. and Ghesquière, A.** (2007) Evaluation of genes from eIF4E and eIF4G multigenic families as potential candidates for partial resistance QTLs to *Rice yellow mottle virus* in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **116**: 53–62.
- Bos, L.** (1969) Experience with a collection of plant viruses in leaf material stored over calcium chloride and a discussion of literature on virus preservation. *Meded Fac Landbouwwet Gent* **34** : 875–887
- Bouhachem, S.B., Khamassy, N., Glais, L. and Kerlan, C.** (2008) Occurrence in Tunisia of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) caused by variant PVYNTN of *Potato virus Y*. *Plant Pathol.* **57**, 388.
- Brantley, J.D. and Hunt, A.G.** (1993) The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the *potyvirus* tobacco vein mottle virus is an RNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* **74**, 1157–1162.
- Bravo-Almonacid, F., Rudoy V., Welin, B., Segretin, M.E., Bedogni, M.C., Stolicz, F., Criscuolo, M., Foti, M., Gomez, M., López, M., Serino, G., Cabral, S., Dos Santos, C., Huarte M. and Mentaberry, A.** (2012) Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. *Transgenic Res.* **21**, 967–982.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, S. and Churchill, G.A.** (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**:889-890
- Brun, H., Chèvre, A-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. and Andrivon D.** (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**, 285-299.
- Brigneti, G., Garcia-Mas, J. and Baulcombe, D. C.** (1997) Molecular mapping of the *Potato virus Y* resistance gene *Ry_{sto}* in potato. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 198–203.

- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. and Baulcombe, D.C.** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**, 6739-6746.
- Brown, J.K.M. and Hovmøller, M.S.** (2002). Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science* **297**: 537–541.
- Brun, H., Chèvre, A.M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. and Andrivon, D.** (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285–299.
- Bruun-Rasmussen, M., Møller, I.S., Tulinius, G., Hansen, J.K.R., Lund, O.S. and Johansen, I.E.** (2007) The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two *Potyvirus* spp. in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1075–1082.
- Bukovinszki, A., Goetz, R., Johansen, E., Maiss, E., Balazs, E.** (2007) The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVY strains. *Virus Res.* **127**, 122-125.
- Burdon, J.** (1993) The Structure of Pathogen Populations in Natural Plant-Communities. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 305–323.

C

- Calenge, F., Drouet, D., Denancé, C., Van de Weg, W.E., Brisset, M.N., Paulin, J.P. and Durel, C.E.** (2005) Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 128–135.
- Caranta, C. and Palloix, A.** (1996). Both common and specific genetic factors are involved in polygenic resistance of pepper to several *potyviruses*. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 15–20.
- Caranta, C., Lefebvre, V. and Palloix, A.** (1997) Polygenic resistance of pepper to *potyviruses* consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Mol. Plant-Microbe Interact* **10**: 872–878.
- Caranta, C., Palloix, A., Lefebvre, V. and Daubeze, A.M.** (1997). QTLs for a component of partial resistance to *cucumber mosaic virus* in pepper: restriction of virus installation in host-cells. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 431–438.
- Carrasco, P., Daròs, J.A., Agudelo-Romero, P. and Elena, S.F.** (2007). A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of *tobacco etch virus* in competition experiments. *Journal of Virological Methods* **139**: 181–188.
- Carrington, J.C. and Dougherty, W.G.** (1987) Small nuclear inclusion protein encoded by plant *potyvirus* genome is a protease. *J. Virol.* **61**, 2540-2548.
- Carrington, J. C. and Freed, D. D.** (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant *potyvirus* 5' nontranslated region. *J. Virol.* **64**, 1590-1597.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad, M.C.** (1998) Genetic evidence for an essential role for *potyvirus* CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**, 393–400.
- Cavatorta, J. R., Savage, A. E., Yeam, I., Gray, S. M. and Jahn, M.M.** (2008) Positive Darwinian selection at single amino acid sites conferring plant virus resistance. *J. Mol. Evol.* **67**, 551-559.
- Celebi-Toprak, F., Slack, S. A. and Jahn, M.M.** (2002) A new gene, *Ny_{tblr}*, for hypersensitivity to *Potato virus Y* from *Solanum tuberosum* maps to chromosome IV. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 669–674.
- Chaim, A.B., Grube, R.C., Lapidot, M., Jahn, M. and Paran, I.** (2001). Identification of quantitative trait loci associated with resistance to *cucumber mosaic virus* in *Capsicum annuum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **102**: 1213–1220.
- Chain, F., Riault, G., Trottet, M. and Jacquot, E.** (2007) Evaluation of the durability of the *Barley yellow dwarf virus*-resistant Zhong ZH and TC14 wheat lines. *European journal of plant pathology* **117**: 35–43.

- Chang, E., Shi, S., Liu, J., Cheng, T., Xue., L., Yang, X., Yang., W., Lan, Q. and Jiang, Z.** (2012) Selection of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies in *Platycladus orientalis* (*Cupressaceae*) Using Real-Time PCR. *PLoS ONE* **7**.
- Charlesworth, B.** (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet* **10**, 195-205.
- Charcosset, A., Mangin, B., Moreau, L., Combes, L., Jourjon, M.-F. and Gallais A.** (2001) Heterosis in maize investigated using connected RIL populations. Quantitative genetics and breeding methods : the way ahead. *Les colloques n°96, INRA Editions, Paris*.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C.** (2008). Natural variation and functional analyses provide evidence for coevolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal*, **54**, 56-68.
- Chu, M., Lopez-Moya, J. J., Llave-Correas, C. and Pirone T. P.** (1997) Two separate regions in the genome of the Tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 472-480.
- Chung, B.Y.W., Miller, W.A., Atkins, J.F. and Firth, A.E.** (2008) An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **105**, 5897–5902.
- Cockerham, G.** (1943) The reactions of potato varieties to viruses X, A, B and C. *Ann. Appl. Biol.* **30**, 338-344.
- Cockerham, G.** (1970) Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* **25**, 309–348.
- Coffin J.** (1995). Hiv Population-Dynamics in-Vivo - Implications for Genetic-Variation, Pathogenesis, and Therapy. *Science* **267**: 483–489.
- Crotty, S., Cameron, C.E. and Andino, R.** (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 6895–6900.
- Crow, J.F. and Kimura, M.** (1970). An introduction to Population Genetics Theory. ISBN-10: 1932846123
- Cuevas, J.M., Delaunay, A., Visser, J.C., Bellstedt, D.U., Jacquot, E. and Elena, S.F.** (2012) Phylogeography and molecular evolution of *Potato virus Y*. *PLoS One* **7**, e37853.
- Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., and Wang, A.** (2010) The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* **397**, 56-63.
- Culver, J. and Dawson, W.** (1989). *Tobacco Mosaic-Virus* Coat Protein - an Elicitor of the Hypersensitive Reaction but Not Required for the Development of Mosaic Symptoms in *Nicotiana-Sylvestris*. *Virology* **173**: 755–758.

D

- D'Aquino, L., Dalmay, T., Burgyán, J., Ragozzino, A. and Scala, F.** (1995) Host range and sequence analysis of an isolate of *Potato virus Y* inducing veinal necrosis in pepper. *Plant Dis.* **79**, 1046–1050.
- De Bokx, J.A. and Huttinga, H.** (1981) *Potato virus Y*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 242.
- De Cedrón, M. G., Osaba, L., Lopez, L. L. and García, A. J.** (2006) Genetic analysis of the function of the *plum pox virus* CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* **116**, 136–145.
- Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J.M., Lansac, M., Eyquard, J.P., García, J.A., Candresse, T., Le Gall, O. and Revers, F.** (2006) Multiple Resistance Traits Control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 541–549.
- Deom, C.M., Murphy, J.F. and Paguio, O.R.** (1997) Resistance to *tobacco etch virus* in *Capsicum annuum* : inhibition of virus RNA accumulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**, 917–921.
- Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H.** (2003). Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology* **93**: 1478–1484.

- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H.** (2002) Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) with special reference to Caribbean islands. *Virus Research* **85**: 5–16.
- Díaz, J.A., Nieto, C., Moriones, E., Truniger, V. and Aranda, M. A.** (2004). Molecular characterization of a *Melon necrotic spot virus* strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular plant-microbe interactions* **17**: 668–675.
- Dibos, C.** (2006) Etude de l'interaction piment/*Phytophthora capsici*, Analyse cytologique et inactivation génétique par des virus recombinant (VIGS) ; *stage Master 2 agrosociences-UAPV/gafl-INRA Avignon*.
- Dietrich, C. and Maiss, E.** (2003) Fluorescent labelling reveals spatial separation of *potyvirus* populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology* **84**: 2871–2876.
- Dogimont, C., Palloix, A., Daubèze, A. M., Marchoux, G., Gebre Selassie, K. and Pochard, E.** (1996) Genetic analysis of broad spectrum resistance to *potyviruses* using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* **88**, 231–239.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A. and Carrington, J.C.** (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Dougherty, W.G. and Carrington, J.C.** (1988) Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**, 123–143.
- Drake John, W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. and Crow J.F.** (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* **148**: 1667–1686.
- Drake, J. W., Holland, J.J.** (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 13910–13913.
- Draper, M.D., Pasche, J.S. and Gudmestad, N.C.** (2002) Factors influencing PVY development in three potato cultivars. *Am. J. Pot. Res.* **79**, 155–165.
- Duffus, J.E. and Skoyen, IO.** (1977). Relationship of age of plants and resistance to a severe isolate of the *beet curly top virus*. *Phytopathology* **67**: 151–154.
- Dujovny, G., Usugi, T., Shohara, K. and Lenardon, S.L.** (1998) Characterization of a new *Potyvirus* infecting sunflower in Argentina. *Plant Dis.* **82**, 470–474.
- Dujovny, G., Sasaya, T., Koganesawa, H., Usugi, T., Shohara, K. and Lenardon, S. L.** (2000) Molecular characterization of a new *potyvirus* infecting sunflower. *Arch. Virol.* **145**, 2249–2258.
- Dullemans, A. M., Cuperus, C., Verbeek, M. and van der Vlugt, R. A. A.** (2011) Complete nucleotide sequence of a potato isolate of strain group C of *Potato virus Y* from 1938 *Arch. Virol.* **156**, 473-477.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S. and Robaglia, C.** (2002), The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to *potyviruses*. *Plant J.* **32**, 927–934.

E

- Edwardson, J. R.** (1992) Inclusion bodies. *Arch. Virol. Suppl.* **5**, 25–30.
- Edwardson, J.R. and Christie, R.G.** (1997) *Potyviruses*. In: *Florida Agricultural Experiment Station Monograph Series 18-II – Viruses Infecting Pepper and Other Solanaceous crops*. Gainesville, FL: University of Florida.
- Eiamtanasate, S., Juricek, M. and Yap, Y.K.** (2007) C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes* **35**, 611-617.
- Elena, S. F. and Sanjuán R.** (2007) Virus Evolution: Insights from an Experimental Approach. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**: 27–52.
- Elena, S. F. and Rodrigo, G.** (2012) Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Curr. Opin. Virol.*, in press, doi: 10.1016/j.coviro.2012.09.004.

F

- Fabre, F., Bruchou, C., Palloix, A. and Moury, B.** (2009). Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Research* **141**, 140-149.
- Fabre, F., Montarry, J., Coville, J., Senoussi, R., Simon, V. and Moury B.** (2012). Modelling the Evolutionary Dynamics of Viruses within Their Hosts: A Case Study Using High-Throughput Sequencing (PD Nagy, Ed.). *PLoS Pathogens* **8**, e1002654.
- Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L. and Moury, B.** (2012b) Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist* **193**: 1064–1075.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Pacella, R., Harrach, B., Martin, D.P. and Crescenzi, A.** (2005) Characterisation of *Potato virus Y* nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. *Arch. Virol.* **150**, 709–720.
- Faurez, F., Baldwin, T., Tribodet, M., Jacquot E.** (2012) Identification of new *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 948-959.
- Fazari, A., Palloix, A., Wang, L.H., Sage-Palloix, A.M. and Djian-Caporalino, C.** (2012) The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding* **131**:665-673.
- Fellers, J. P., Tremblay, D., Handest, M. F. and Lommel, S. A.** (2002) The *Potato virus Y* (MNR)-N-S NIb-replicase is the elicitor of a veinal necrosis-hypersensitive response in root knot nematode resistant tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **3**, 145-152.
- Fereres, A., Perez, P., Gemeno, C. and Ponz, F.** (1993) Transmission of Spanish pepper-PVY and potato-PVY isolates by aphid (Homoptera, Aphididae) vectors-Epidemiological implications. *Environ. Entomol.* **22**, 1260-1265.
- Fernández, A., Lain, S. and García, J.A.** (1995) RNA helicase activity of the plum pox *potyvirus* CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1327–1332.
- Fernández, A., Guo, H. S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., de Cedrón, M. G. and García, J. A.** (1997) The motif V of plum pox *potyvirus* CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4474.
- Fournet, S., Kerlan, M.C., Renault, L., Dantec, J.P., Rouaux, C. and Montarry J.** (2012). Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathology* Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02617.x.
- Fraile, A., Malpica, J.M., Aranda, M. A., Rodríguez-Cerezo, E. and Garcia-Arenal, F.** (1996) Genetic Diversity in *Tobacco Mild Green Mosaic Tobamovirus* Infecting the Wild Plant *Nicotiana glauca*. *Virology* **223**: 148–155.
- Fraile A., Pagán I, Anastasio G, Sáez E and García-Arenal F.** (2011) Rapid genetic diversification and high fitness penalties associated with pathogenicity evolution in a plant virus. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 1425.
- Fraser, AS.** (1972) An introduction to population genetic theory. By J. F. Crow and M. Kimura. Harper and Row, New York. 656 pp. 1970. *Teratology* **5**, 386-387.
- French, R., Stenger, D.C.** (2003). Evolution Of Wheat Streak Mosaic Virus: Dynamics of Population Growth Within Plants May Explain Limited Variation. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 199–214.
- Froissart, R., Roze, D., Uzest, M., Galibert, L., Blanc, S. and Michalakakis, Y.** (2005) Recombination Every Day: Abundant Recombination in a Virus during a Single Multi-Cellular Host Infection. *PLoS Biol* **3**: e89.
- Furio, V., Moya, A. and Sanjuan, R.** (2005) The cost of replication fidelity in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10233–10237.

G

- Gago, S., Elena, S. F., Flores, R., Sanjuán, R.** (2009) Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science* **323**: 1308–1308.
- Galanaud, J.-P., Elbaz, A., Clavel, J., Vidal, J.-S., Corréze, J.-R., Alpérovitch, A. and Tzourio, C.** (2005) Cigarette smoking and Parkinson's disease: A case-control study in a population characterized by a high prevalence of pesticide exposure. *Movement Disorders* **20**: 181–189.
- Gallie, D.R. and Browning, K.S.** (2001) eIF4G Functionally Differs from eIFiso4G in Promoting Internal Initiation, Cap-independent Translation, and Translation of Structured mRNAs. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36951–36960.
- Gallois, J.-L., Charron, C., Sánchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M.-C., Moretti, A., Ponz, F., Revers F., Caranta C., and German-Retana S.** (2010) Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* **91**:288–293.
- Gandon S.** 2004. Evolution of multihost parasites. *Evolution* **58**: 455–469.
- Gao, Z., Johansen, E., Evers, S., Thomas, C.L., Ellis, N.T.H. and Maule, A.J.** (2004) The *potyvirus* recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J.* **40**:376–385.
- García-Arenal F., Fraile A. and Malpica J.M.** (2001) Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 157–186.
- García-Arenal, F. and McDonald, B. A.** (2003) An Analysis of the Durability of Resistance to Plant Viruses. *Phytopathology* **93**: 941–952.
- García-Cano, E., Resende, R.O., Fernández-Muñoz, R. and Moriones, E.** (2006) Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* **96**: 1263–1269.
- García-Ruiz H. and Murphy, J.F.** 2001. Age-related Resistance in Bell Pepper to *Cucumber mosaic virus*. *Annals of applied biology* **139**: 307–317.
- Gebre Selassie, K., Marchoux, G., Delecolle, B. and Pochard, E.** (1985) Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et clas-sification en pathotypes. *Agronomie* **5**, 621–630.
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R.-P. and Le Gall, O.** (2000) Effects of Green Fluorescent Protein or β -Glucuronidase Tagging on the Accumulation and Pathogenicity of a Resistance-Breaking *Lettuce mosaic virus* Isolate in Susceptible and Resistant Lettuce Cultivars. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 316–324.
- Gibbs, A. & Ohshima, K.** (2010) *Potyvirus*es and the digital revolution. *Ann. Rev. Phytopathol.* **48**, 205-223.
- Gibbs, A. J., Ohshima, K., Phillips, M. J. and Gibbs, M. J.** (2008) The prehistory of *potyvirus*es: Their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS One* **3**, e2523.
- Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C.** (2002) Genetic variability in Potato *potyvirus* Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. *Arch. Virol.* **147**, 363–378.
- González-Jara, P., Fraile, A., Canto, T. and García-Arenal, F.** (2009) The multiplicity of infection of a plant virus varies during colonization of its eukaryotic host. *Journal of virology* **83**: 7487–7494.
- Gooding, G. V. and Tolin, S. A.** (1973) Strains of *Potato virus Y* affecting flue-cured tobacco in the South-eastern United States. *Plant Dis. Rep.* **57**, 200–204.
- Gout, L., Kuhn, M.L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., Moreno-Rico, O., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T.** (2007) Genome structure impacts molecular evolution at the AvrLm1 avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology* **9**: 2978–2992.

- Govier, D.A. and Kassanis, B.** (1974) A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire *Potato virus Y* from purified preparations. *Virology* **61**, 420-426.
- Govier, D. A., Kassanis, B. and Pirone, T. P.** (1977) Partial purification and characterization of *Potato virus Y* helper component. *Virology* **78**, 306-314.
- Gingras, A.-C., Raught, B. and Sonenberg, N.** (1999) eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 913–963.
- Gutiérrez, S., Yvon, M., Thébaud, G, Monsion, B, Michalakakis, Y., Blanc, S.** (2010). Dynamics of the multiplicity of cellular infection in a plant virus. *PLoS pathogens* **6**: e1001113.
- Gutiérrez, S., Yvon, M., Pirolles, E., Garzo, E., Fereres, A., Michalakakis, Y. and Blanc S.** (2012). Circulating Virus Load Determines the Size of Bottlenecks in Viral Populations Progressing within a Host (Santiago F. Elena, Ed.). *PLoS Pathogens* **8**: e1003009.
- Guyader, S. and Giblot-Ducray D.** (2004). L'évolution des virus à ARN : rôles de la sélection et de la dérive génétique. *Virologie* **8**:187-198.

H

- Hajimorad, M.R., Wen, R.-H., Eggenberger, A.L., Hill J.H. and Maroof M.A.S.** (2010) Experimental Adaptation of an RNA Virus Mimics Natural Evolution. *Journal of Virology* **85**: 2557–2564.
- Haley, C. S. and Knott S. A.** (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**: 315–324
- Hämäläinen, J.H., Watanabe, K.N., Valkonen, J.P.T., Arihara, A., Plaisted, R.L., Pehu, E., Miller, L. and Slack, S.A.** (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to *Potato virus Y*. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 192-197.
- Hammond-Kosack, K.E. and Parker J.E.** (2003) Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177–193.
- Hanada, K., and Harrison, B. D.** (1977) Effects of virus genotype and temperature on seed transmission of nepoviruses. *Ann. Appl. Biol.* **85**:79-92.
- Harrison, B.D.** (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* **124**, 181-192.
- Hebrard E.** (2006) Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *Journal of General Virology* **87**: 1369–1373.
- Henry J.P. and Gouyon P.H.** (1999) Précis de génétique des populations. Dunod, Paris. 180 p.
- Hernández, G., and Vazquez-Pianzola, P.** (2005) Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech. Dev.* **122**, 865-876.
- Van den Heuvel JF, Verbeek M, Peters D.** (1993) The Relationship Between Aphid-Transmissibility of *Potato Leafroll Virus* and Surface Epitopes of the Viral Capsid. *Phytopathology* **83**: 1125.
- Hu, X., Karasev, A.V., Brown, C.J., Lorenzen, J.H.** (2009) Sequence characteristics of *Potato virus Y* recombinants. *J. Gen. Virol.* **90**: 3033–3041.
- Huet, H., Gal-On A., Meir E., Lecoq H., Raccach, B.** (1994) Mutations in the helper component protease gene of *zucchini yellow mosaic virus* affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology* **75**: 1407–1414.
- Hwang, J., Li, J., Liu, W.-Y., An, S.-J., Cho, H., Her, N.H., Yeam, I., Kim, D. and Kang, B.-C.** (2009) Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to *Chilli vein mottle virus* in pepper. *Molecules and Cells* **27**: 329–336.

I

- Ibaba, J.D. and Gubba, A.** (2011) Diversity of *Potato virus Y* isolates infecting *solanaceous* vegetables in the province of KwaZulu- Natal in the Republic of South Africa. *Crop Protection* **30**:1404-1408.
- Inoue-Nagata, A.K., Oliveira, P.A., Dutra, L.S. and Nagata, T.** (2006) *Bidens mosaic virus* is a member of the *Potato virus Y* species. *Virus Genes* **33**, 45–49.

J

- Janzac, B., Fabre, M.F., Palloix, A. and Moury, B.** (2009) Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against *potyviruses*, and selection for virulent variants. *Plant Pathol.* **58**: 443–449.
- Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A. and Moury, B.** (2009) Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular plant pathology* **10**: 599–610.
- Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. and Moury, B.** (2010) A point mutation in the polymerase of *Potato virus Y* confers virulence toward the *Pvr4* resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 823–830.
- Jeger, M.J., Seal, S.E. and Van den Bosch, F.** (2006) Evolutionary epidemiology of plant virus disease. *Advances in Virus Research* **67**: 163–203
- Jenner, C.E., Sanchez, F., Nettleship, S.B., Foster, G.D., Ponz, F. and Walsh J.A.** (2000) The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1102–1108.
- Jenner C.E., Wang X., Ponz, F., Walsh, J.A.** (2002) A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Research* **86**: 1–6.
- Jenner, C.E., Nellist, C.F., Barker, G.C. and Walsh J.A,** (2010) *Turnip mosaic virus* (TuMV) is able to use alleles of both eIF4E and eIF (iso) 4E from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*. *Molecular plant-microbe interactions* **23**: 1498–1505.
- Jennings, D.L.** (1964) Studies on the inheritance in the red raspberry of immunities from three nematode-borne viruses. *Genetica* **35**:152- 164.
- Jiang, J. and Laliberte, J.-F.** (2011) The genome-linked protein VPg of plant viruses - a protein with many partners. *Cur. Opin. Virol.* **1**, 347–354.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C. and Wang, T.** (2007) HC-Pro protein of *Potato virus Y* can interact with three *Arabidopsis* 20S proteasome subunits *in planta*. *J. Virol.* **81**, 12881–12888.
- Johansen, I.E., Lund, O.S., Hjulsager, C.K. and Laursen, J.** (2001) Recessive resistance in *Pisum sativum* and *potyvirus* pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J. Virol.* **75**, 6609-6614.
- Johansen, L.K. and Carrington, J.C.** (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **126**, 930 –938.
- Johnson, R.** (1981) Durable Resistance: Definition of genetic control and Attainment in Plant Breeding. *Phytopathology* **71**, 567-568.
- Johnson R.** (1984). A Critical Analysis of Durable Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**: 309–330.
- Jones, R.A.C.** (1990) Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with *potyviruses* in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol.* **117**, 93–105.
- Jørgensen, I.H.** (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**: 141–152.
- Jourjon, M.F., Jasson, S., Marcel, J., Ngom, B. and Mangin, B.** (2005) MCQTL: multi-allelic QTL mapping in multi-cross design. *Bioinformatics* **21**: 128–130.
- Jung, J., Park, S.W., Liu, W.Y. and Kang, B.-C.** (2010) Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification. *Euphytica* **175**: 91–107.

K

- Kahn, R.P. and Monroe, R. L.** (1963) Detection of the tobacco vein necrosis strain of *Potato virus Y* in *Solanum cardenasii* and *S. andigenum* introduced into the United States. *Phytopathology* **53**, 1356-1359.
- Kang, B.-C., Yeam, I. and Jahn, M.** (2005) Genetics of Plant Virus Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 581-621.
- Kang, S., Lebrun, M.H., Farrall, L. and Valent, B.** (2001) Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 671–674.
- Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D.G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R. and Adams, M.J.** (2005) Evidence that the recessive *bymovirus* resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Molecular Plant Pathology* **6**: 449–458.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71–81.
- Kawecki, T.J. and Ebert, D.** (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**: 1225–1241.
- Kearney, B., Ronald, P.C., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J.** (1988) Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. *Nature* **332**: 541–543.
- Keese, P., McKenzie, A. and Gibbs, A.J.** (1989) Nucleotide sequence of the genome of an Australian isolate of *turnip yellow mosaic tymovirus*. *Virology* **172**:536–46
- Kehoe, M.A. and Jones, R.A.C.** (2011) A proposal to help resolve the disagreement between naming of *Potato virus Y* strain groups defined by resistance phenotypes and those defined by sequencing. *Arch. Virol.* **156**, 2273-2278.
- Keller, B., Feuillet, C., Messmer, M.** (2000). Genetics of Disease Resistance – Basic concepts and its application in resistance breeding. In: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases, A. Slusarenko, R. Fraser and K. van Loon (eds) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp. 101-160
- Keller, K.E., Johansen, E., Martin, R.R. and Hampton R.O.** (1998). *Potyvirus* genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular plant-microbe interactions* **11**: 124–130.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L. and Guillet, M.** (1999) Variability of *Potato virus Y* in potato crops in France. *J. Phytopathol.* **147**, 643– 651.
- Kerlan, C.** (2006) *Potato virus Y*. *AAB/CMI Descriptions of Plant Viruses* 414.
- Khan, M.A., Miyoshi, H., Gallie, D.R. and Goss, D.J.** (2008) *Potyvirus* Genome-linked Protein, VPg, Directly Affects Wheat Germ in Vitro Translation. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 1340 –1349.
- Kiyosawa, S.** (1982) Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 93–117.
- Kliebenstein, D.J. and Rowe, H.C.** (2009) Anti-Rust Antitrust. *Science* **323**: 1301–1302.
- Knott, D.R.** (1988). Strategies for the utilization of partial resistance for the control of cereal rust. In: Simmonds NW, Rajaram S, editors. *Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat*. Mexico: CIMMYT. p.48-62.
- Koenig, R. and Lennefors, B.L.** (2000) Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of virology* **145**: 1561–1570.
- Kosambi, D.D.** (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, **12**(3): 172-175
- Kou, Y. and Wang, S.** (2010) Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 181–185.
- Kousik, C.** (1999) Race Shift in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Within a Season in Field-Grown Pepper. *Phytopathology* **86**: 952.

- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H. and Zerbini, F.M.** (2002) Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* **92**: 563–572.
- Kyle, M.M. and Palloix, A.** (1997) Proposed revision of nomenclature for *potyvirus* resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica* **97**, 183-188.

L

- Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J.-L. and Jacquot, E.** (2010) Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene *va*. *Plant Pathology* **59**: 1133–1143.
- Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.-L. and Jacquot, E.** (2011) Effect of passage of a *Potato virus Y* isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va*² on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 259–269.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. and Newburg, L.** (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174–181.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.-P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. and Burgyn, J.** (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**, 2768–2780.
- Latorre, B.A., Flores, V., and Marholz, G.** (1984) Effect of *Potato virus Y* on growth, yield, and chemical composition of flue-cured tobacco in Chile. *Plant Dis.* **68**, 884-886.
- Leach, J.E., Vera Cruz C.M., Bai, J. and Leung, H.** (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 187–224.
- Lecoq, H., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Girard, M. and Pitrat M.** (2002) Durability of *Zucchini yellow mosaic virus* resistances in cucurbits. In "*Cucurbitaceae 2002*" (D.N.Maynard, ed.), pp. 294-300. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Lecoq, H., Moury, B., Desbiez, C., Palloix, A. and Pitrat, M.** (2004) Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Research* **100**: 31–39.
- Lecoq, H. and Pitrat M.** (1984) Strains of *Zucchini Yellow Mosaic-Virus* in Muskmelon (*cucumis-Melo L.*). *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **111**: 165–173.
- Lecoq, H. and Desbiez, C.** (2012) Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region: An Ever-Changing Picture. In *Adv. virus res.* **84**: 67–126.
- Lee, J.M., Nahm, S.H., Kim, Y.M. and Kim, B.D.** (2004) Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **108**: 619–627.
- Lee, J.H., Muhsin, M., Atienza, G.A., Kwak, D.Y., Kim, S.M., De Leon, T.B., Angeles, E.R., Coloquio, E., Kondoh, H., Satoh, K., Cabunagan, R.C., Cabauatan, P.Q., Kikuchi, S., Leung, H. and Choi, I.R.** (2010) Single Nucleotide Polymorphisms in a Gene for Translation Initiation Factor (eIF4G) of Rice (*Oryza sativa*) Associated with Resistance to Rice tungro spherical virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 29–38.
- Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvet, J.C., Daubèze, A.M. and Palloix, A.** (2002) Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* **45**: 839–854.
- Legnani, R., Gerbe-Selassie, K., Nono Womdim, R., Gognalons, P., Moretti, A., Laterrot, H. and Marchoux, G.** (1995) Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against *Potato virus Y*. *Euphytica* **86**, 219-226.
- Lehner B.** (2011) Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends in Genetics* **27**: 323–331.

- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. and Carrington, J.C.** (2002) Loss-of-Susceptibility Mutants of *Arabidopsis thaliana* Reveal an Essential Role for eIF(iso)4E during *Potyvirus* Infection. *Current Biology* **12**: 1046–1051.
- Le Romancer, M., Kerlan, C. and Nedellec, M.** (1994) Biological characterization of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.* **43**, 138-144.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J.-F.** (2000) Complex formation between *potyvirus* VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* **74**, 7730-7737
- Lindhout, P.** (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* **124**, 217–226.
- Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* **31**: 777–786.
- Liu, E., Page, J.E.** (2008) Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using *tobacco rattle virus*. *Plant Methods* **4**: 5.
- Llave, C., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13401–13406.
- Loeb, L.A., Essigmann, J.M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K.D. and Mullins, J.I.** (1999) Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 1492–1497.
- López-Moya, J.J., Wang, R.Y. and Pirone, T.P.** (1999) Context of the coat protein DAG motif affects *potyvirus* transmissibility by aphids. *J. Gen. Virol.* **80**, 3281–3288.
- Luis-Arteaga, M. and Gil-Ortega, R.** (1986) Biological characterization of PVY as isolated from pepper in Spain. VI Meeting on Capsicum and eggplant, Zaragoza, Spain, October 21–24, 183–188.

M

- Mahgoub, H.A., Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Dafalla, G. and Lecoq, H.,** (1998) Biological and serological variability of zucchini yellow mosaic virus in Sudan. *J. Phytopathol.* **146**,333–337.
- Malpica, J.M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C.I., Drake, J.W. and García-Arenal F.** (2002) The Rate and Character of Spontaneous Mutation in an RNA Virus. *Genetics* **162**: 1505–1511.
- Marchoux G.** (1987) Interactions entre virus chez un hôte commun. I. Interférences négatives, antagonisme, prémunition, résistance induite. *Agronomie* **7**: 149–162.
- Marchoux G.** (1988) Interactions entre virus ou entre virus et leurs satellites chez un hôte commun. II. Interférences positives : synergie, complémentation, assistance. *Agronomie* **8**: 471–490.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D. and Turina, M.** (2007) Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the Tsw gene. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 547–558.
- Margaritopoulos, J.T., Dovas, C.I., Gounaris, J., Skouras, P.J., Kanavaki, O.M., Katis, N.I. and Tsitsipis J. A.** (2010) Molecular analysis of the coat protein of *Potato virus Y* isolates in Greece suggests multiple introduction from different genetic pools. *J. Phytopathol.* **158**, 73–80.
- Mascia, T., Finetti-Sialer, M.M., Cillo, F. and Gallitelli, D.** (2010) Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of *Potato virus Y* associated with a tomato necrotic disease occurring in Italy. *J. Plant Pathol.* **92**, 131-138.
- Mastari, J., Lapiere, H., Dessens, J.T.** (1998) Asymmetrical distribution of barley yellow dwarf virus PAV variants between host plant species. *Phytopathology* **88**: 818–821.
- Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. and Hataya, T.** (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of *Potato virus Y* correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, **89**, 118-123.

- Mazier, M., Flamain, F., Nicolaï, M., Sarnette, V. and Caranta, C.** (2011) Knock-Down of Both eIF4E1 and eIF4E2 Genes Confers Broad-Spectrum Resistance against *Potyvirus*es in Tomato. *PLoS ONE* **6**: e29595.
- McDonald, B.A., McDermott, J.M., Goodwin, S.B., Allard, R.W.** (1989) The population biology of
- McDonald, B.A. and Linde, C.** (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349–379.
- McFadden, D.** (1973) Conditional logit analysis of qualitative choice behavior. P. Zarembka, ed., *Frontiers in econometrics*, New York : Academic Press.
- Mestre, P., Brigneti, G., Durrant, M.C. and Baulcombe, D.C.** (2003) *Potato virus Y* NIa protease activity is not sufficient for elicitation of Ry-mediated disease resistance in potato. *The Plant Journal* **36**: 755–761.
- Merits, A., Guo, D. Y. and Saarma, M.** (1998) VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A *potyvirus* bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J. Gen. Virol.* **79**, 3123–3127.
- Merits, A., Guo, D., Jarvekulg, L. and Saarma, M.** (1999) Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A *potyvirus*-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replicative complex. *Virology* **263**, 15–22.
- Mestre, P., Brigneti, G. and Baulcombe, D.C.** (2000) An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from *Potato virus Y*. *Plant J.* **23**, 653–661.
- Mestre, P., Brigneti, G., Durrant, M.C. and Baulcombe, D.C.** (2003) *Potato virus Y* NIa protease activity is not sufficient for elicitation of *Ry*-mediated disease resistance in potato. *Plant J.* **36**, 755–761.
- Michon T, Estevez Y, Walter J, German-Retana S, Gall O.** 2006. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS Journal* **273**: 1312–1322.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M. and Hirai, M.** (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding* **18**: 157–169.
- Miyashita, S. and Kishino, H.** (2010) Estimation of the Size of Genetic Bottlenecks in Cell-to-Cell Movement of Soil-Borne Wheat Mosaic Virus and the Possible Role of the Bottlenecks in Speeding Up Selection of Variations in trans-Acting Genes or Elements. *Journal of Virology* **84**: 1828–1837.
- Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K. and Natsuaki, T.** (2008) Turnip mosaic virus VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits in vitro translation. *Biochimie* **90**: 1427–1434.
- Monsion, B., Froissart, R., Michalak, Y. and Blanc, S.** (2008) Large Bottleneck Size in *Cauliflower Mosaic Virus* Populations during Host Plant Colonization. *PLoS Pathog* **4**: e1000174.
- Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V. and Moury, B.** (2011) Genetic background matters: a plant–virus gene for gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Molecular Plant Pathology* **12**, 911–920.
- Montarry, J., Cartier, E., Jacquemond, M., Palloix, A. and Moury, B.** (2012) Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *J. Evol. Biol.* **25**, 2242–2252.
- Moriones, E., Aramburu, J., Riudavets, J., Arno, J. and Lavina, A.** (1998) Effect of plant age at time of infection by *tomato spotted wilt tospovirus* on the yield of field-grown tomato. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 295–300.
- Moury, B., Palloix, A., Selassie K.G. and Marchoux, G.** (1997) Hypersensitive resistance to *tomato spotted wilt virus* in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica* **94**: 45–52.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E. and Jacquemond, M.** (2002) Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other *potyviruses*. *J. Gen. Virol.* **83**, 2563–2573.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M.** (2004) Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence towards recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **17**, 322–329.
- Moury, B., Palloix, A., Caranta, C., Gognalons, P., Souche, S., Selassie, K.G. and Marchoux, G.** (2005) Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. *Phytopathology* **95**: 227–232.

- Moury, B., Desbiez, C., Jacquemond, M. and Lecoq, H.** (2006) Genetic diversity of plant virus populations: Towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Adv. Virus Res.* **67**, 49-87.
- Moury, B., Fabre, F. and Senoussi, R.** (2007) Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 17891–17896.
- Moury, B., Fabre, F., Montarry, J., Janzac, B., Ayme, V. and Palloix, A.** (2010) L'adaptation des virus de plantes aux résistances variétales. *Virologie* **14**: 227–239.
- Moury, B.** (2010) A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 161–168.
- Moury, B., Fereres, A., García-Arenal, F. and Lecoq, H.** (2011) Sustainable Management of Plant Resistance to viruses. Recent advances in Plant Virology. 219-236.
- Moury, B., Caromel, B., Johansen, E., Simon, V., Chauvin, L., Jacquot, E., Kerlan, C. and Lefebvre, V.** (2011) The helper component proteinase cistron of *Potato virus Y* induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **24**, 787–797.
- Moury, B. and Simon, V.** (2011) dN/dS-based methods detect positive selection linked to trade-offs between different fitness traits in the coat protein of *Potato virus Y*. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2707–2717.
- Moury, B. and Verdin, E.** (2012) Viruses of pepper crops in the Mediterranean basin: A remarkable stasis. *Adv. Virus Res.* **84**, 127-62.
- Moya, A., Rodriguez-Cerezo, E. and García-Arenal, F.** (1993) Genetic structure of natural populations of the plant RNA virus *tobacco mild green mosaic virus*. *Molecular biology and evolution* **10**: 449–449.
- Müller, H. J.** (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* **1**, p 2-9.
- Mundt, C., Cowger, C. and Garrett, K.** (2002) Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* **124**: 245–252.
- Murant, A. F., Taylor, C. E. and Chambers, J.** (1968) Properties, relationships and transmission of a strain of *raspberry ringspot virus* infecting raspberry cultivars immune to the common Scottish strain. *Ann. Appl. Biol.* **61**:175-186.

N

- Nagy, I., Stágel, A., Sasvári, Z., Röder, M. and Ganai M.** 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* **50**: 668–688.
- Neff, M., Neff, J., Chory, J. and Pepper, A.** (1998) dCAPS a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal* **14**, 387-392.
- Neff, M., Turk, E. and Kalishman, M.** (2002) Web-based Primer Design for Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Trends in Genetics* **18**, 613-615.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and Le Gall, O.** (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the *potyvirus Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiol.* **132**, 1272-1282.
- Nicolaï, M., Pisani, C., Bouchet, J.P., Vuylsteke, M. and Palloix A.** (2012) Discovery of a large set of SNP and SSR genetic markers by high-throughput sequencing of pepper (*Capsicum annuum*). *Genetics and Molecular Research* **11**: 2295–2300.
- Nie, X. Z. and Singh, R. P.** (2003) Evolution of North American PVY^{NTN} strain Tu 660 from local PVY^N by mutation rather than recombination. *Vir. Genes* **26**, 39-47.
- Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., Puigdomènech, P., Pitrat, M., Caboche, M., Dogimont, C., Garcia-Mas, J., Aranda, M.A. and Bendahmane, A.** (2006) An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* **48**: 452–462.

- Niks, R.E. and Rubiales, D.** (2002) Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* **124**: 201–216.
- Nobrega, N.R. and Silberschmidt, K.** (1944) Sobre una provavel variante do virus « Y » da batatinha que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. *Arq. Inst. Biol.* 307-330.

O

- Oerke, E.C. and Dehne, H.W.** (2004) Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* **23**: 275–285.
- Ohta, T.** (1992) The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **23**, 263-286.

P

- Pagán, I., Alonso-Blanco, C. and García-Arenal, F.** (2007). The relationship of within-host multiplication and virulence in a plant-virus system. *PLoS ONE* **2**: e786.
- Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B.** (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* **183**, 190–199.
- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A. and Caranta, C.** (2002) Recessive resistance genes against *potyviruses* are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.* **105**, 855-861.
- Parlevliet, J. E.** (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* **124**: 147–156.
- Patrick, R.M. and Browning, K.S.** (2012) The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: An evolutionary perspective. *Comparative and Functional Genomics* ID287814, 12 pp.
- Peng, Y.-h., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. and Raccah, B.** (1998) Mutations in the HC-Pro gene of *zucchini yellow mosaic potyvirus*: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* **79**, 897-904.
- Perrier, X. and Jacquemoud-Collet, J.P.** (2006) DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>
- Pfeiffer, J.K. and Kirkegaard, K.** (2005) Increased fidelity reduces *poliovirus* fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* **1**: e11.
- Pfeffer, S., Richards, K., and Jonard, G.** (2003) L'extinction de gènes chez les plantes révèle un mécanisme de défense antiviral surmonté par les phytovirus. *Virologie* **7**: 353–366.
- Pink, D.** (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* **124**: 227–236.
- Pirone, T.P. and Blanc, S.** (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 227-247.
- Pressoir, G., Albar, L., Ahmadi, N., Rimbault, I., Lorieux, M., Fargette, D. and Ghesquière, A.** (1998) Genetic basis and mapping of the resistance to *rice yellow mottle virus*. II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 1155–1161.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. and Vance, V.B.** (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859–868.

Q

- Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. and Moury, B.** (2012) Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular Plant Pathology*: in press. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00834.x

R

- Rantalainen, K. I., Eskelin, K., Tompa, P. and Makinen, K.** (2011) Structural flexibility allows the functional diversity of *potyvirus* genome-linked protein VPg. *J. Virol.* **85**, 2449-2457.
- Rebaï, A.** (1997) Comparison of methods for regression interval mapping in QTL analysis with non-normal traits. *Genetics Research* **69**: 69–74.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S. J., Lot, H., Le Gall, O. and Candresse, T.** (2001) Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 804-810.
- Restrepo-Hartwig, M.A. and Carrington, J.C.** (1994) The *tobacco etch potyvirus* 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J. Virol.* **68**, 2388-2397.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. and Dunez, J.** (1996) Frequent occurrence of recombinant *potyvirus* isolates. *J. Gen. Virol.* **77**, 1953–1965.
- Robaglia, C. and Caranta, C.** (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* **11**, 40–45.
- Robbins, M.A., Reade, R.D. and Rochon, D.M.** (1997) A *cucumber necrosis virus* variant deficient in fungal transmissibility contains an altered coat protein shell domain. *Virology* **234**: 138–146.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. and Maule, A.J.** (1998) Ultrastructural and temporal observations of the *potyvirus* cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173–181.
- Rodríguez-Cerezo, E., Elena, S.F., Moya, A. and García-Arenal, F.** (1991) High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus *tobacco mild green mosaic virus*. *Journal of molecular evolution* **32**: 328–332.
- Rodriguez, C.M., Freire M.A., Camilleri, C. and Robaglia, C.** (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *The Plant Journal* **13**: 465–473.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. and Lucas, W.J.** (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as *potyvirus* cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283–295.
- Rolland, M., Lacroix, C., Blanchard, A., Baldwin, T., Kerlan, C. and Jacquot, E.** (2008) *Potato virus Y* (PVY): From its discovery to the latest outbreaks. *Virologie* **12**, 261-273.
- Rolland, M., Kerlan, C. and Jacquot, E.** (2009) The acquisition of molecular determinants involved in *Potato virus Y* necrosis capacity leads to fitness reduction in tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **90**, 244–252.
- Romero, A., Blanco-Urgoiti, B., Soto, M., Fereres, A. and Ponz, F.** (2001) Characterization of typical pepper isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. *Virus Res.* **79**, 71–80.
- Ross, H.** (1986) Potato breeding—problems and perspectives. *J. Plant Breed. Suppl* 13.
- Rubio, M., Caranta, C. and Palloix, A.** (2008). Functional markers for selection of *potyvirus* resistance alleles at the *pvr2-eIF4E* locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* **51**, 767-771.
- Rubio, M., Nicolaï, M., Caranta, C. and Palloix A.** (2009) Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between *pvr2-eIF4E* and *pvr6-eIF(iso)4E* alleles for resistance to pepper vein mottle virus. *J. Gen. Virol.* **90**, 2808-2814.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta C.** (2002) A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* **32**, 1067–1075.
- Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L. and Caranta C.** (2005) The recessive *potyvirus* resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol. Gen. Genom.* **274**, 346-353.
- Ruffel, S., Gallois, J-L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. and Caranta C.** (2006). Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent *pepper vein mottle virus* infection of pepper. *J Gen Virol* **87**: 2089–2098.

Rusholme, R.L., Higgins, E.E., Walsh, J.A. and Lydiate, D.J. (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *Journal of General Virology* **88**: 3177–3186.

S

- Sacristán, S., Malpica, J.M., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2003) Estimation of Population Bottlenecks during Systemic Movement of *Tobacco Mosaic Virus* in Tobacco Plants. *Journal of Virology* **77**, 9906–9911.
- Sacristán, S. and García-Arenal, F. (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 369–384.
- Sacristán, S., Díaz, M., Fraile, A. and García-Arenal, F. (2011) Contact Transmission of *Tobacco Mosaic Virus*: a Quantitative Analysis of Parameters Relevant for Virus Evolution. *Journal of Virology* **85**: 4974–4981.
- Sadeghi, M.S., Behjatnia, S.A.A., Masumi, M. and Izadpanah, K. (2008) Characterisation of a strain of *Potato virus Y* causing eggplant mosaic in southern Iran. *Austral. Pl. Pathol.* **37**, 79-86.
- Sáenz, P., Cervera, M.T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.B., Riechmann, J.L. and García, J.A. (2000) Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+ 6K1. *Journal of General Virology* **81**: 557–566.
- Sáenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and García, J.A. (2002) Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of *potyviruses*. *J Virol* **76**, 1922–1931.
- Sage-Palloy, A.M., Jourdan, F., Phaly, T., Nemouchi, G., Lefebvre, V. and Palloy, A. (2007). Structuring genetic diversity in pepper genetic resources: distribution of horticultural and resistance traits in the inra pepper germplasm. In Progress in research on *Capsicum* & Eggplant. Niemirowicz-Szczytt K. (Ed.), University of Life Sciences Press, Warsaw, Poland, pp.33:42.
- Salaman, R.N. and Le Pelley, R. H. (1930) Paracrinkle : a potato disease of the virus group. *Proc. R. Soc. Lond.* **106**, 140-75
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. and Uyeda, I. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *potyviruses*. *FEBS Letters* **579**: 1167–1171.
- Savary, S. and Teng, P. (1994) Crop Protection for a Sustainable Agriculture. *Recherche* **25**: 1322–1329.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E. and Carrington, J.C. (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* **16**, 4049-4059.
- Schafer J.F. (1971) Tolerance to plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 235–252.
- Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. and Foster, G. D. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 938-54.
- Schubert, J., Fomitcheva, V., and Sztangret-Wisniewska, J. (2007) Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J. Virol. Methods* **140**, 66-74.
- Schürch, S., Linde, C.C., Knogge, W., Jackson, L.F. and McDonald, B.A. (2004) Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene NIP1. *Molecular plant-microbe interactions* **17**: 1114–1125.
- Segundo, E., Lesemann, D.E., Martín, G., Carmona, M., Ruiz, L., Cuadrado, I.M., Velasco, L. and Janssen, D. (2007) *Amaranthus leaf mottle virus*: 3'-end RNA sequence proves classification as distinct virus and reveals affinities within the genus *Potyvirus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **117**, 81–87.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A. E. and Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**: 1567–1572.
- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V. and Gal-On, A. (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* **81**, 13135–13148.

- Sierra, S., Dávila, M., Lowenstein, P.R. and Domingo, E.** (2000) Response of Foot-and-Mouth Disease Virus to Increased Mutagenesis: Influence of Viral Load and Fitness in Loss of Infectivity. *Journal of Virology* **74**: 8316–8323.
- Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C., Kerlan, C. and Schubert, J.** (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.* **153**, 1-13.
- Skotnicki, M.L., Mackenzie, A.M. and Gibbs, A.J.** (1996) Genetic variation in populations of *kennedya yellow mosaic tymovirus*. *Arch. Virol.* **141**:99–110
- Smit, G. and Parlevliet, J.E.** (1990) Mature plant resistance of barley to barley leaf rust, another type of resistance. *Euphytica* **50**: 159–162.
- Smith, K.M.** (1931) Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicator. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **109**, 251-267.
- Smith, T.B.** (1993) Disruptive selection and the genetic basis of bill size polymorphism in the African finch *Pyrenestes*. *Nature* **1993**, 363:618-620.
- Soler, S., Díez, M.J. and Nuez, F.** (1998) Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant disease* **82**: 1199–1204.
- Solomon-Blackburn, R.M. and Barker, H.** (2001) A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* **86**, 8–16.
- Song, Y.S., Hepting, L., Schweizer, G., Hartl, L., Wenzel, G. and Schwarzfischer, A.** (2005) Mapping of extreme resistance to PVY (*Ry_{sto}*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor. Appl. Genet.* **111**, 879-887.
- Soumounou, Y. and Laliberté, J.-F.** (1994) Nucleic-acid binding properties of the P1 protein of turnip mosaic *potyvirus* produced in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **75**, 2567–2573.
- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., Ordon, F. and Graner, A.** (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive *Bymovirus* resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant Journal* **42**: 912–922.
- Sudarsono, Woloshuk, S.L., Xiong, Z., Hellmann, G.M., Wernsman, E.A., Weissinger, A.K. and Lommel, S.A.** (1993) Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six *Potato virus Y* (PVY) isolates infecting tobacco. *Arch. Virol.* **132**, 161–170.
- Syller, J.** (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* **13**: 204–216.

T

- Takeshita, M., Shigemune, N., Kikuhara, K., Furuya, N. and Takanami, Y.** (2004) Spatial analysis for exclusive interactions between subgroups I and II of *Cucumber mosaic virus* in cowpea. *Virology* **328**: 45–51.
- Tavert-Roudet, G., Abdul-Razzak, A., Doublet, B., Walter, J., Delaunay, T., German-Retana, S., Michon, T., Le Gall, O. and Candresse, T.** (2012) The C terminus of *lettuce mosaic potyvirus* cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* **93**, 184–193.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J.M. and Moury, B.** (2011) Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* **92**: 961–973.
- Thrall, P.H. and Burdon, J.J.** (1999) The spatial scale of pathogen dispersal: Consequences for disease dynamics and persistence. *Evolutionary Ecology Research* **1**: 681–701.
- Tian, Y.-P. and Valkonen, J.P.T.** (2012) Genetic determinants of *Potato virus Y* required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene *Ny* in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, in press.

- Torres-Barcelo, C., Martin, S., Daros, J.-A. and Elena, S. F.** (2008) From hypo- to hypersuppression: Effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the tobacco etch *potyvirus* HC-Pro. *Genetics* **180**, 1039-1049.
- Tomas, N. and Elena Santiago F.** (2010) The Rate and Spectrum of Spontaneous Mutations in a Plant RNA Virus. *Genetics* **185**: 983–989.
- Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. and Jacquot, E.** (2005) Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.* **86**, 2101–2105.

V

- Vandemark, G.J., Fourie, D. and Miklas, P.N.** (2008) Genotyping with real-time PCR reveals recessive epistasis between independent QTL conferring resistance to common bacterial blight in dry bean. *Theoretical and Applied Genetics* **117**: 513–522.
- Van der Zaag, D.E.** (1987) Yield reduction in relation to virus infection. In: de Bokx J.A. and van der Want, J.P.H. (eds) *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Pudoc, Wageningen, pp. 146-150.
- Van Ooijen J.W.** (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor Appl Genet* **84**:803–811
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R. and Palkovics, L.** (2007) Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the *plum pox virus* helper component proteinase suppressor of gene silencing. *J. Gen. Virol.* **88**, 1005-1015.
- Verchot, J., Koonin, E. V. and Carrington, J. C.** (1991) The 35-KDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a 3rd virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-535.
- Verchot, J., Herndon, K.L. and Carrington, J.C.** (1992) Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* **190**, 298–306.
- Verchot, J. and Carrington, J.C.** (1995) Evidence that the *potyvirus* P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* **69**, 3668–3674.
- Verrier, J.L. and Doroszewska T.** (2004) The “va” resistance to PVYN in *Nicotiana tabacum*: an assessment of the frequency of “va”-breaking PVYN strains based on seven years of field survey on a worldwide basis. In: *Proceedings of the 12th European Association for Potato Research (Virology Section) Meeting 2004, 13–19 June 2004, Rennes, France*.86(Abstract).
- Viel, J. and Richardson, S.** (1993) Lymphoma, Multiple-Myeloma and Leukemia Among French Farmers in Relation. *Social Science & Medicine* **37**: 771–777.

W

- Watson, I.A.** (1970) Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **8**: 209-230.
- Wei, T. and Wang, A.** (2008) Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant *potyvirus* replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J. Virol.* **82**, 12252-12264.
- Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J. Laliberté, J.-F, Hong, J., Nelson, R.S. and Wang, A.** (2010) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant *potyvirus* replication. *J. Virol.* **84**, 799-809.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C. and Wang, A.** (2010) Formation of complexes at plasmodesmata for *potyvirus* intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* **6**, e1000962.

- Wittmann, S.H., Chatel, M.G., Fortin, and J.-F. Laliberté.** (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic *potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso)4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84–92.
- Wolfe, M.** (1985) The Current Status And Prospects Of Multiline Cultivars And Variety Mixtures For Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 251–273.
- Wu, F., Eannetta, N.T., Xu, Y., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, M.M. and Tanksley, S.D.** (2009) A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* **118**: 1279–1293.

Y

- Yambao, M.L.M., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Takahashi, Y., Nakahara, K.S., and Uyeda, I.** (2008) Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Arch. Virol.* **153**, 105-115.
- Yeam, I., Cavatorta, J.R., Ripoll, D.R., Kang, B.-C. and Jahn, M.M.** (2007) Functional Dissection of Naturally Occurring Amino Acid Substitutions in eIF4E That Confers Recessive *Potyvirus* Resistance in Plants. *The Plant Cell Online* **19**: 2913–2928.
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. and Ishikawa, M.** (2004) The *Arabidopsis Cucumovirus* Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *Journal of Virology* **78**: 6102–6111.

Z

- Zwart, M.P., Daròs, J.-A. and Elena S.F.** (2011) One Is Enough: In Vivo Effective Population Size Is Dose-Dependent for a Plant RNA Virus. *PLoS Pathog* **7**: e1002122.

Bases génétiques et fonctionnelles de la durabilité de résistances polygéniques au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez le piment (*Capsicum annuum*).

Julie Quenouille

Les résistances génétiques permettent une lutte efficace contre les maladies des plantes cultivées mais sont limitées par les capacités d'évolution des bioagresseurs ciblés. Chez le piment, le fonds génétique peut améliorer la durabilité de la résistance au PVY conférée par le gène majeur *pvr2³*. L'objectif de ma thèse était de caractériser les facteurs génétiques de l'hôte conditionnant la durabilité du gène majeur en répondant aux questions suivantes : (i) Quels sont leurs actions sur l'évolution des populations virales ? (ii) Correspondent-ils aux QTL (*quantitative trait loci*) de résistance partielle ? (iii) Sont-ils répandus au sein des ressources génétiques du piment ? Différentes expérimentations incluant des tests de résistances, d'évolution expérimentale et de compétition entre différents variants viraux, ont montré que les facteurs du fonds génétique augmentant la durabilité de *pvr2³* agissaient en : (i) diminuant la concentration virale dans la plante, (ii) en réduisant les probabilités de mutations du PVY vers le contournement du gène *pvr2³* et (iii) en ralentissant la sélection des variants viraux contournants. La détection de QTL et la cartographie des facteurs génétiques affectant la fréquence de contournement de *pvr2³* (QTL de durabilité) a mis en évidence quatre régions du génome du piment qui, par des effets additifs ou épistatiques, expliquent 70% de la variabilité phénotypique observée. La cartographie comparée montre que trois des quatre QTL de durabilité co-localisent avec des QTL affectant la résistance partielle, suggérant que les QTL de résistance partielle ont un effet pléiotropique sur la durabilité d'un gène majeur de résistance. L'étude d'une collection de 20 accessions de piment, porteuses de *pvr2³* ou *pvr2⁴* (allèle très proche de *pvr2³*) dans des fonds génétiques variés, a montré que les fonds génétiques favorables à la durabilité de ces allèles de résistance sont fréquents dans les ressources génétiques du piment. Ces résultats mettent en évidence que la durabilité d'un gène majeur de résistance peut-être fortement augmentée lorsqu'il est associé à des facteurs génétiques réduisant la multiplication du pathogène. De plus, la fréquence de contournement du gène majeur s'est révélée être un caractère très héritable ($h^2=0.87$) et la détection de QTL affectant ce caractère est possible. La sélection directe pour de tels QTL est donc envisageable et ouvre de nouvelles perspectives pour préserver la durabilité des gènes majeurs de résistance utilisés en sélection variétale.

Mots clés : durabilité des résistances, évolution virale, *quantitative trait locus* (QTL), facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E), *Potyvirus*.

Genetic and functional bases of the durability of polygenic resistance to *Potato virus Y* (PVY) in pepper (*Capsicum annuum*).

Julie Quenouille

Genetic resistances provide an efficient control of crop diseases but are limited by pathogen adaptation. In pepper, the durability of the *pvr2³* allele, conferring resistance to *Potato virus Y* (PVY), was demonstrated to depend on the plant genetic background. The aim of my PhD thesis was to characterize the host genetic factors affecting the durability of the major resistance gene *pvr2³* and to answer to the following question s: (i) What is their action on the evolution of the viral population? (ii) Is there identity between the QTLs (*quantitative trait loci*) controlling the partial resistance and the QTLs affecting the durability of *pvr2³*? (iii) Are these genetic factors widespread among the genetic resources of pepper? Various experiments including resistance testing, experimental evolution and competition between various PVY variants, enabled to show that the genetic factors affecting the durability of *pvr2³* acted in: (i) decreasing the viral accumulation, (ii) decreasing the probability of acquisition of resistance breaking (RB) mutations by PVY and (iii) slowing down the selection of RB variants. QTL detection and mapping of genetic factors affecting the frequency of *pvr2³* RB showed that four loci acting additively and in epistatic interactions explained together 70% of the variance of *pvr2³* breakdown frequency. Comparative mapping between these QTLs and QTLs affecting partial resistance showed that three of the four QTLs controlling the frequency of *pvr2³* RB are also involved in quantitative resistance, suggesting that QTLs for quantitative resistance have a pleiotropic effect on the durability of the major resistance gene. Analysis of a collection of 20 pepper accessions, carrying *pvr2³* or *pvr2⁴* (allele closely related to *pvr2³*) in various genetic backgrounds, showed that genetic backgrounds favorable to the durability of the *pvr2*-mediated resistance are widespread in the genetic resources of pepper. These results highlight that the durability of a major resistance gene can be strongly increased when associated with genetic factors decreasing the pathogen multiplication. Moreover, the frequency of a major gene RB is a highly heritable trait and QTLs detection for this trait is achievable. The direct selection for such QTLs opens new prospects to preserve the durability of major resistance genes used by breeders.

Key words: resistance durability, viral evolution, quantitative trait locus (QTL), eukaryotic translation initiation factor 4E, *Potyvirus*.