



HAL
open science

Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole : cas du pathosystème *Choisya ternata*/ *Phytophthora* spp.

Youssef Manasfi

► To cite this version:

Youssef Manasfi. Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole : cas du pathosystème *Choisya ternata*/*Phytophthora* spp.. Biologie végétale. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR082 . tel-01716367

HAL Id: tel-01716367

<https://theses.hal.science/tel-01716367>

Submitted on 23 Feb 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité (ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE - 4200006)

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole : cas du pathosystème *Choisya ternata/Phytophthora* spp.

Présentée et soutenue par
Youssef MANASFI

Thèse soutenue publiquement le (date de soutenance) devant le jury composé de		
M. Marc-Antoine CANNESAN	Chargée de recherche, responsable site Haute-Normandie Astredhor Seine-Manche, Arexhor Seine-Manche	Examineur
M. Éric GALIANA	Directeur de recherche, Biologie moléculaire végétale ; Transcriptomique, Institut Sophia Agrobiotech (UMR Inra 1355, CNRS 7254, UNS), INRA de Nice	Rapporteur
M. Arnaud LANOUE	MCF, Laboratoire Biomolécules et Biotechnologies Végétales(EA 2106), Université François Rabelais de Tours	Examineur
M ^{me} Karine LAVAL	Directrice de la recherche, Laboratoire Agro-écologie des territoires (AGRI'TERR), Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen	Examineur
M ^{me} Valérie LEGUÉ	PR, Laboratoire de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (PIAF- UMR A 547), INRA/Université Clermont-Auvergne	Rapporteur
M. Francois MESNARD	PR, Laboratoire de biologie des plantes et innovation (BIOPI, EA 3900), Université de Picardie Jules Verne	Examineur
M ^{me} Isabelle TRINSOUTROT - GATTIN	Enseignant-chercheur, HDR, Unité Agro-écologie des territoires (AGRI'TERR), Institut Polytechnique UniLaSalle, Rouen	Co-directrice de thèse
M ^{me} Maïté VICRÉ	MCF, HDR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Co-directrice de thèse

Thèse codirigée par - Dr. Maïté VICRE, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie

- **Dr. Isabelle TRINSOUTROT - GATTIN**, Unité Agro-écologie des territoires (AGRI'TERR), UniLaSalle.



Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de thèse. Je remercie M. Éric Galiana, directeur de recherche à Institut Sophia Agrobiotech, INRA de Nice et M^{me} Valerie Legue, professeur à l'université de Blaise Pascal, Clermont-Ferrand. Je remercie également les examinateurs de ma thèse, M. Marc-Antoine Cannesan, chargé de recherche à Astredhore Seine-Manche, M. Arnaud Lanoue, maître de conférence à l'université François Rabelais de Tours, M^{me} Karine Laval, directrice de la recherche à l'Institut Polytechnique UniLaSalle et M. Francois Mesnard, professeur à l'université de Picardie Jules Verne.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358) de l'université de Rouen et l'unité de recherche AGRI'TERR de l'Institut Polytechnique UniLaSalle ainsi qu'à Astredhor Seine-Manche, Arexhor Seine-Manche. Je tiens à remercier la région Normandie, ainsi que le Grand Réseaux Recherche Végétal, Agronomie, Sols, Innovation (GRR VASI) pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté pendant ces trois ans de thèse. Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers l'Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE) et l'Université de Rouen pour le poste d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche (ATER) qu'elles m'ont attribué afin de découvrir l'enseignement et de financer la fin de mes travaux de thèse.

Je remercie infiniment mes directeurs de thèse Docteur Maïté Vicré et Docteur Isabelle Gattin pour m'avoir encadré tout au long de mon travail. Merci à Maïté de m'avoir accueilli pour un premier stage sur les plantes reviviscentes il y a 6 ans. Je tiens à remercier les professeurs Patrice Lerouge et Azeddine Driouich, cofondateurs et co-directeurs du laboratoire Glyco-MEV ainsi que M^{me} Karine Laval directrice de l'unité AGRI'TERR de l'Institut Polytechnique UniLaSalle de m'avoir ouvert les portes de leurs laboratoires.

Je tiens à remercier le Docteur Marc-Antoine Cannesan, Chargé de recherche et responsable de site Haute-Normandie Astredhor Seine-Manche, Arexhor Seine-Manche pour son aide et ses conseils indispensables dans ce projet. Merci encore de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour les discussions à propos du monde de l'horticulture. Encore, un

grand MERCI pour l'équipe de la station expérimentale d'ASTREDHOR Seine-Manche à Saint-Germain-en-Laye, une super équipe.

Je remercie infiniment le Docteur Arnaud Lanoue de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (Laboratoire de Biomolécules et Biotechnologies (EA 2106), Université François Rabelais de Tours) et fait découvrir le monde de la phytochimie.

Je voudrais également remercier le Docteur Agnès Attard, Chargée de recherche de l'Institut Sophia Agrobiotech de l'INRA de Nice d'avoir mis à notre disposition des souches de *Phytophthora* ainsi que pour ses conseils avisés.

Un très grand merci aux Docteurs Emilie Laroche-Ajzenberg pour son apprentissage et son aide en biologie moléculaire. Merci également aux Docteurs Wassila Riah-Anglet, Mélanie Bressan et Marie Laure Follet-Gueye pour leurs conseils et leur participation dans ce projet.

Merci au Docteur Sophie Bernard pour son aide et son soutien tout au long de ma thèse. Sophie tu es notre modèle notamment en ce qui concerne le bon fonctionnement du laboratoire, c'est grâce à toi qu'on y arrive à travailler efficacement. Merci également à Carole Plasson pour son aide technique au laboratoire Glyco-MEV.

Merci au Docteur Isabelle Boulogne pour son aide et pour les discussions scientifiques intéressantes.

Merci au Docteur Eric Nguema-Ona pour sa formation sur le monde des AGPs.

Merci à Lisa Castel pour son aide au laboratoire de l'unité AGRITERR mais aussi sur le terrain.

Merci à tous les doctorants post-doctorants et non permanents du Glyco-Mev et d'AGRITERR.

Merci à tous les permanents du Glyco-MEV et d'AGRITERR pour leur bonne humeur.

Je remercie infiniment Gérald Bellanger.

Merci à tous les amis qui m'ont soutenue pendant ces 4 années de thèse.

Je tiens enfin à remercier ma famille, ma sœur, mon frère et mes parents qui m'ont toujours encouragé.

Préambule

Le chiffre d'affaires du domaine horticole en France est estimé à 1,4 milliards d'euros pour l'année 2015. Plus d'un tiers de ce chiffre d'affaires, soit 500 000 K€ résultent des pépinières dont 63 614 K€ correspondant à « l'activité pépinière » du bassin Seine-Manche (Données FranceAgriMer, 2015). Ces plantes ornementales sont souvent confrontées à des agents pathogènes telluriques occasionnant des maladies, ce qui se traduit par des pertes économiques conséquentes (Rapport du Plan Ecophyto II, 2015). L'oranger du Mexique (*Choisya ternata*) constitue l'une des plantes ornementales les plus vendues par les pépiniéristes (pépinière André Briant Jeunes Plants, communication personnelle). Toutefois, cette plante est sensible à de nombreux pathogènes telluriques, dont les oomycètes du genre *Phytophthora* qui est responsable de maladies occasionnant des dégâts économiques importants (Talbot & Wedgwood, 2009). Les seuls moyens disponibles aujourd'hui pour limiter le développement de la maladie reposent principalement sur les pratiques culturales comme la gestion de l'arrosage, l'utilisation de substrats sains possédant une grande capacité de drainage, ainsi que le recours aux pesticides de synthèse tels que le métalaxyl/méfénoxam et le fosetyl-Al (Staub & Young, 1980; Farih *et al.*, 1981; Talbot & Wedgwood, 2009; Pscheidt, 2015). L'utilisation massive de ces produits a conduit certaines souches de *Phytophthora* à développer une résistance rendant inefficace l'action de ces produits (Parra & Ristaino, 2001; Keinath, 2007). Par ailleurs, ces produits sont toxiques pour l'environnement et pour la santé. Leur utilisation est devenue de plus en plus contrainte par des réglementations, dans le processus d'homologation et les modalités d'utilisation, dont on a lieu de penser qu'elles devraient se durcir (Storck *et al.*, 2017). Pour ces raisons, le développement de nouvelles stratégies agro-écologiques, économiques et durables de lutte contre les phytopathogènes est devenu une nécessité et un défi préoccupant dans les secteurs scientifique, agricole, industriel et politique.

Pour développer de telles stratégies, il faut tout d'abord avoir une bonne compréhension des mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires impliqués dans la défense des plantes contre les pathogènes. Les plantes ont développé une large gamme de molécules capables de la défendre contre ses agresseurs, notamment au niveau racinaire, où elles sont constamment en contact avec des microorganismes (De Coninck *et al.*, 2015). Parmi

ces molécules de défense, des protéoglycanes pariétales, les arabinogalactanes-protéines (AGPs), ont récemment été identifiés comme des acteurs de la défense racinaire (Cannesan *et al.*, 2012). Toutefois, leur rôle précis dans les interactions racines-microorganismes n'est pas encore clairement établi (Nguema-Ona *et al.*, 2013). Les métabolites secondaires (MS) sont aussi connus pour jouer un rôle important dans la défense des plantes (Wink, 2010; Mazid *et al.*, 2011). Parmi ces MS, les alcaloïdes furoquinoliques sont spécialement prometteurs dans le domaine de protection des plantes (Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016). En outre, les plantes ont développé une alliance avec des microorganismes « *biological control agent* (BCA) » capables d'améliorer leur défense (Cameron *et al.*, 2013). Ces trois éléments sont au centre de l'intérêt des scientifiques et des industriels qui cherchent à déposer des brevets afin de commercialiser des molécules ou microorganismes comme moyens de lutte alternatifs (Smith *et al.*, 1991, 1992; Harkrader & Meyer, 2001; Cannesan *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, mon projet de thèse s'est focalisé sur le développement de nouvelles stratégies de lutte alternative concernant le pathosystème *C. ternata/Phytophthora parasitica*. Cette stratégie s'accorde parfaitement avec les plans Ecophyto 2018 et 2025 dont les objectifs sont de réduire l'utilisation des produits chimiques de 50 %, sans avoir d'effets néfastes sur la production aussi bien d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Afin de réaliser ce projet, les compétences scientifiques du laboratoire de Glycobiologie et Matrice extracellulaire végétale (Glyco-MEV) de l'université de Rouen Normandie, spécialisé dans le domaine de la glycobiologie et de la défense racinaire, ont été réunis avec celles de l'unité de recherche Agro-écologie des territoires (AGRI'TERR) de UniLaSalle, spécialisée dans les domaines de l'agronomie et de l'écologie microbienne des sols. Dans le cadre de mon projet de thèse, des analyses portant sur la nature et le rôle des AGPs et des MS de deux cultivars de *C. ternata*, Aztec pearl et Goldfinger ont été réalisées. Les différences dans les structures des AGPs entre les racines des deux cultivars montrent des effets distincts sur *P. parasitica*. Les MS des deux cultivars ont présenté des différences quantitative et qualitative au niveau racinaire, et une capacité différente à inhiber la croissance de l'oomycète. L'utilisation d'agents de biocontrôle *in-situ* a montré que le traitement combiné de deux espèces différentes offre une meilleure potentialité à protéger *C. ternata* contre *P. parasitica*. Les résultats de ce travail de recherche sont présentés dans le chapitre résultats sous forme d'articles soumis, puis discutés globalement.

Table des matières

I. Introduction	1
1. <i>Choisya ternata</i>	1
1.1 Importance économique de l'horticulture et de <i>Choisya ternata</i> en France.....	3
1.2 Les pathogènes et les symptômes de <i>Choisya</i>	5
1.2.1 Les pathogènes foliaires de <i>C. ternata</i>	6
1.2.2 Les pathogènes racinaires de <i>C. ternata</i>	6
1.2.2.A Les champignons.....	7
1.2.2.B Les oomycètes	8
2. <i>Phytophthora parasitica</i>	9
2.1 Classification.....	9
2.2 Cycle de <i>P. parasitica</i>	11
2.3 Les cultures hôtes.....	13
3. Défense de la plante.....	15
3.1 Particularité de la réponse immunitaire racinaire	18
3.2 Arabinogalactane-protéines.....	20
3.2.1 Structure des arabinogalactane-protéines.....	20
3.2.2 Modifications post-traductionnelles des AGPs	22
3.2.3 La distribution des épitopes associés aux AGPs à l'échelle tissulaire	24
3.2.4 Fonctions biologiques des AGPs.....	25
3.3 Métabolites secondaires	29
3.3.1 Les alcaloïdes.....	32
3.3.2 Les alcaloïdes furoquinoliques - les métabolites secondaires majoritaires chez <i>C. ternata</i>	33
4. Moyens de lutte contre les pathogènes telluriques, cas particulier de <i>Phytophthora</i>	36
4.1 Pratiques culturales.....	37

4.1.1 Les fertilisants.....	37
4.1.2 Le drainage et les techniques d'irrigations.....	37
4.1.3 Lutte chimique.....	38
4.1.3.A La désinfection pré-culture	39
4.1.3.B Les produits chimiques utilisés dans la protection des plantes.....	39
4.2 Sélection de plantes saines et/ou résistantes	41
4.3 Contrôle biologique	42
4.3.1 Définition	42
4.3.2 Les mécanismes de contrôle biologique	44
4.3.3 Les agents de contrôle biologique (BCA).....	45
4.3.3.A Les champignons filamenteux.....	45
4.3.3.B Les champignons mycorhiziens (AMF)	46
4.3.3.C Rhizobactéries favorisant la croissance de plantes.....	47
5. Objectifs	49
III. Résultats.....	51
1. Potential role of arabinogalactan proteins and Furocholine alkaloids in the protection of <i>Choisya ternata</i> against <i>Phytophthora parasitica</i>	51
2. Is Biocontrol an alternative solution for <i>Choisya ternata</i> root rot disease caused by <i>Phytophthora parasitica</i> ?.....	97
III. Discussion.....	137
IV. Conclusions et perspectives	153
Références bibliographiques	156
Curriculum vitae	191
Annexes.....	194

Liste de figures

Figure 1 : <i>Choisya ternata</i> classique et les principaux cultivars commercialisés.	2
Figure 2 : La production de <i>Choisya ternata</i> dans la pépinière de André Brillant Jeunes Plantes, site d'Angers.	2
Figure 3 : Répartition géographique de la production des plantes horticoles par bassin.	5
Figure 4 : Arbre phylogénétique des eucaryotes.	10
Figure 5 : Vue d'ensemble des espèces et de clade 1 du genre <i>Phytophthora</i>	11
Figure 6 : Cycle de vie de <i>P. parasitica</i> . La phase végétative (en vert) et la phase sexuée (en rouge).	12
Figure 7 : La formation d'appressorium par <i>Phytophthora parasitica</i> (souche transfectée par GFP) sur les racines de tomate marquées par l'iodure de propidium.	13
Figure 8 : L'interaction et la co-évolution entre la plante et le pathogène.	16
Figure 9 : Structure générale des arabinogalactane-protéines (AGPS).	21
Figure 10 : Les différentes classes des AGPS.	22
Figure 11 : Les trois modèles proposés pour les AGPS.	23
Figure 12 : Immunomarquage des AGPS au niveau de l'apex racinaire de <i>Solanum tuberosum</i>	24
Figure 13 : Rôles possibles des AGPs dans l'interaction racines-microorganismes.	27
Figure 14 : AGPE à l'interface entre <i>Pisum sativum</i> et <i>R. leguminosarum</i>	28
Figure 15 : Marquage des AGPS par JIM 13 au niveau des nodules racinaires dans le cas de symbiose entre et <i>Alnus glutinosa</i> et <i>Frankia</i> souche Cpl1.	28
Figure 16 : Représentation graphique des différentes approches d'analyse des MS, et les compromis entre quantité et qualité.	30
Figure 17 Fonctions écologiques et physiologique des métabolites secondaires.	31
Figure 18 : Exemple de la structure chimique d'un alcaloïde furoquinoliques, le skimmianine..	34
Figure 19 : Les structures des alcaloïdes furoquinoliques trouvées dans les feuilles de <i>C. ternata</i>	34
Figure 20 : L'effet antagoniste de <i>B. amyloliquefaciens</i> souche IBFCBF-1 contre <i>P. capsici</i> ..	48
Figure 21 : Courbe de dissociation de la qPCR sur <i>P. parasitica</i> avec les amorces YPh1F et YPh2R.	147

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les plus grands exportateurs et importateurs de végétaux d'ornement dans le monde en 2016 et leur évolution depuis 2015.....	3
Tableau 2 Évolution de la valeur d'importation et d'exportation de différentes catégories de plantes horticoles entre 2015 et 2016.	4
Tableau 3 : Récapitulatif des métabolites secondaires identifiés chez les plantes supérieures..	29
.....	
Tableau 4 : les différents groupes et sous-groupes des métabolites secondaires et leurs fonctions biologiques.	31
Tableau 5 : Les différents types des alcaloïdes présentant des différences d'origine et de structure	33
Tableau 6 : Les activités de certains alcaloïdes furoquinoliques extraits à partir des plantes appartenant à la famille de Rutaceae.	35
Tableau 7 : Les produits Chimiques utilisés pour la désinfection contre Phytophthora en pré-culture.	39
Tableau 8 : micro-organismes commercialisés comme des BCA.....	43
Tableau 9 : Types et mécanismes d'antagonismes assurant le contrôle biologique.....	44

Liste des abréviations

- ACP : Analyse en Composantes Principales
- AGP : Arabinogalactanes-protéines
- AGPE : *Arabinogalactan protein extensins*
- AMF : *Arbuscular mycorrhizal fungi*
- Ara : Arabinose
- ArMV : *Virus Arabis mosaic*
- BCA : *Biological control agent*
- BSA : *bovine serum albumin*
- DAMP : *Damage-Associated Molecular Pattern*
- DAPG : Diacetylphloroglucinol
- DUF : *Domain of unknown function*
- ET : Éthylène
- ETI : *Effector-Triggered Immunity*
- ETS : *Effector-Triggered Susceptibility*
- FLA : *Fasciclin-like proteins*
- Gal : Galactose
- GalA : Acide galacturonique
- GPI : GlycosylPhosphatidyInositol
- GT : Glycosyltransférases
- HCV : *Hepatitis C virus*
- HRGP : *Hydroxyproline-rich glycoproteins*
- Hyp : Hydroxyproline

IBMA : International Biocontrol Manufacturers Association France

ISR : *Induced Systemic Resistance*

JA : Acide jasmonique

Man : Mannose

MJ : Méthyl-jasmonate

MS : Métabolites secondaires

ns-LTP : *Nonspecific lipid transfer protein*

P4H : Prolyl-4-hydroxylase

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PGPR : *Plant growth-promoting rhizobacteria*

PR : *Pathogenesis-Related proteins*

Pro : Proline

PRR : *Pattern-Recognition Receptors*

PTI : PAMPs triggered immunity

QoI : *Quinone outside inhibitor*

Rha : Rhamnose

RPP1 : *Recognition of Peronospora parasitica*

SA : Acide salicylique

SAR : Straménopiles, Alvéolites et Rhizaria

SAR : *Systemic Acquired Resistance*

SNP : Polymorphismes à nucléotide simple

T4 : *T4 Gene 32 Protein*

Xyl : Xylose

INTRODUCTION

I. Introduction

1. *Choisya ternata*

Choisya ternata (Bonpland), de son nom vernaculaire, oranger du Mexique, est un arbuste appartenant à la famille des Rutacées (Boyd *et al.*, 2007). Cette famille renferme 180 genres et 1300 à 1600 espèces. Les plantes de cette famille, connues pour leur capacité à produire des fruits (agrumiculture), à fournir des huiles essentielles ou encore pour leurs propriétés médicinales, sont également utilisées en tant que plantes ornementales et présentent donc des atouts économiques importants (Luo *et al.*, 2010; Sandjo *et al.*, 2014). Les rutacées sont riches en furanocoumarines, alcaloïdes furoquinoliques, composés phénoliques et terpènes (Ekiert & Kisiel, 1997; Sugeng Riyanto *et al.*, 2001; Peroutka *et al.*, 2007; Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016).

Choisya ternata est une plante endémique des pentes rocheuses du sud des Etats-Unis et du Mexique. Son habitat naturel assure de très bonnes qualités de drainage, ce qui est essentiel pour protéger le système racinaire de cette plante contre les pathogènes telluriques (Talbot & Wedgwood, 2009).

Importée en Grande-Bretagne en 1825 par Aimé Bonpland, *C. ternata* est aujourd'hui utilisée en tant que plante ornementale dans toute l'Europe (Boyd *et al.*, 2007; Valletta *et al.*, 2007; Talbot & Wedgwood, 2009). Le nom *Choisya* a été donné par Bonpland en l'honneur du botaniste Jacques Denys Choisy (www.snhf.org). Cette plante résistante au froid (jusqu'à -15°C) est un arbuste à feuillage persistant, trilobé, vert foncé et brillant. Les fleurs se développent entre mai et juin, de couleur blanche, groupées en bouquets de 7-8 cm de diamètre, très odorantes et mellifères (www.snhf.org). Plusieurs cultivars ont été créés afin d'obtenir une plus grande diversité de morphologie foliaire et florale, et de nuances de couleurs. Les cultivars les plus couramment rencontrés en pépinières sont : Sundance 'Lich', Lisflurry, Lissbird, Londaz, Aztec gold 'Hilgold', Aztec pearl et Goldfingers 'Limo' (Figure 1). En France, ses deux cultivars Aztec pearl et Goldfingers sont parmi les cultivars les plus commercialisés. Le cultivar Aztec pearl a été créé par un croisement entre *C. ternata* et *C.*

dumosa A. Gray var. *arizonica*. Le cultivar Goldfingers est obtenu par un croisement entre *C. ternata* Sundance et *C. arizonica*. (www.andre-briant.fr). Ces plantes sont produites dans des pépinières (Figure 2).



Figure 1 : *Choisya ternata* classique et les principaux cultivars commercialisés. (A) *Choisya ternata* classique, (B) Sundance 'Lich', (C) Lisflurry, (D) Lissbird, (E) Londaz, (F) Aztec gold 'Hilgold', (G) Aztec pearl et (H) Goldfinger 'Limo'. (www.andre-briant.fr).

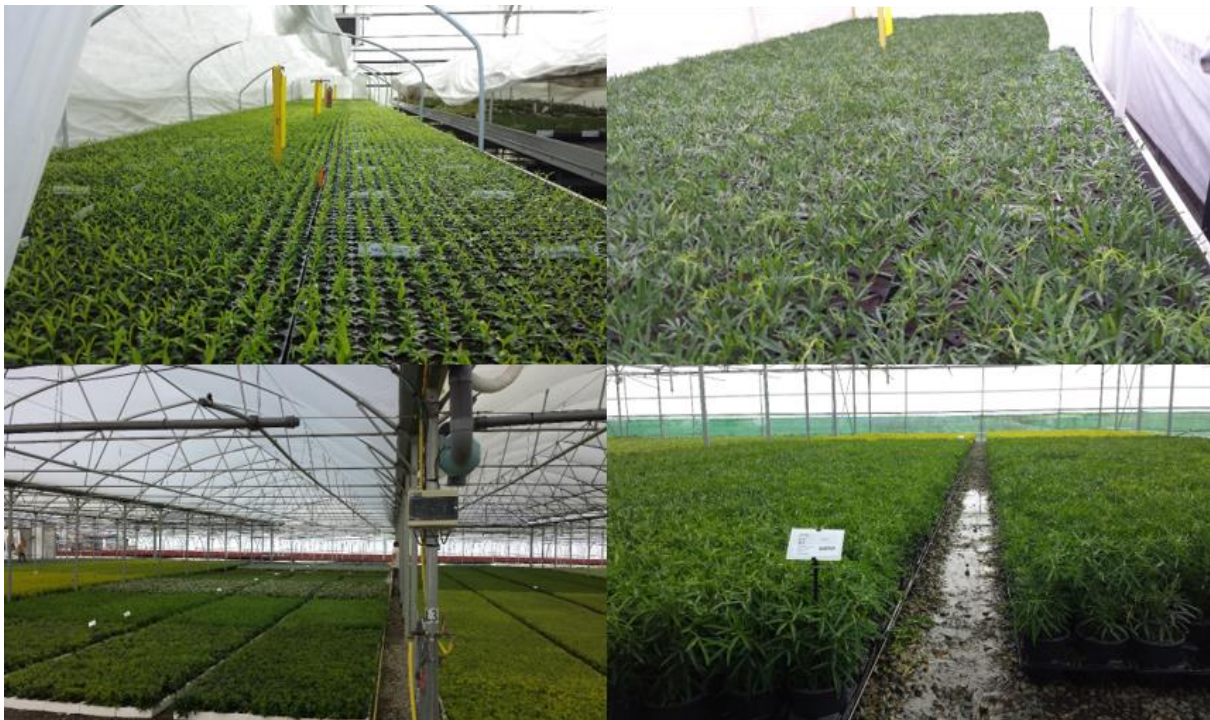


Figure 2 : La production de *C. ternata* dans la pépinière de André Brillant Jeunes Plantes, site d'Angers.

1.1 Importance économique de l'horticulture et de *C. ternata* en France

En 2015, la filière de l'horticulture ornementale (fleurs coupées, plantes en pots, arbustes de massif,...) représentait 3 611 horticulteurs et pépiniéristes en activité en France métropolitaine (hors Corse). Cette filière a réalisé un chiffre d'affaires total de 1 582 millions d'euros HT et a créé 19 289 emplois. Ce secteur économique important est soumis à une forte concurrence intra-européenne (Tableau 1). En 2016, la France a été le 13ème exportateur mondial de végétaux d'ornement avec une somme de 52 millions d'euros, et le 5ème importateur avec une somme de 899 millions d'euros. En comparaison avec l'année 2015, la France a diminué ses exportations de 0,2 % et a augmenté ces importations de 2,8 % (Tableau 1). Les observations sont à nuancer par catégorie de végétaux (plantes d'intérieur, végétaux d'extérieur d'ornement, fleurs coupées fraîches, feuillages coupés frais et bulbes) (Tableau 2). La plus grande augmentation d'importation concerne la catégorie des végétaux d'extérieur d'ornement avec 8,3 % d'augmentation en chiffre d'affaires. Une légère augmentation de l'exportation (0,2 % du chiffre d'affaires) a été observée pour cette catégorie (Bilan annuel 2016 Commerce extérieur français des produits de l'horticulture, FranceAgriMer).

Tableau 1 : Les plus grands exportateurs et importateurs de végétaux d'ornement dans le monde en 2016 et leur évolution depuis 2015. Bilan annuel 2016 du commerce extérieur des produits de l'horticulture ornementale > Edition juin 2017. © FranceAgriMer /

Classement des exportateurs mondiaux en 2016 (en millions d'€)			Evolution/ 2015	Principaux importateurs mondiaux en 2016 (en millions d'€)		Evolution/ 2015
Total des Végétaux d'Ornement						
1 ^{er}	Pays-Bas	6 342	- 0,3 %	Allemagne	2 231	- 1,1 %
2 ^{ème}	Allemagne	732	+ 4,9 %	Pays-Bas	1 418	- 2,1 %
3 ^{ème}	Italie	529	+ 5,7 %	États-Unis	1 209	+ 9 %
4 ^{ème}	Belgique	420	+ 4,2 %	Royaume-Uni	1 070	- 1,6 %
5 ^{ème}	Danemark	402	+ 2,3 %	France	899	+ 2.8 %
13^{ème}	France	56	- 0,2 %			

Tableau 2 Évolution de la valeur d'importation et d'exportation de différentes catégories de plantes horticoles entre 2015 et 2016. Bilan annuel 2016 du commerce extérieur des produits de l'horticulture ornementale > Edition juin 2017. © FranceAgriMer /

Evolution de la valeur de :	Exportations	Importations
	2015/2016	
Total horticulture ornementale	- 0,2 %	+ 2.8 %
Plantes d'intérieur	- 2,6 %	+ 3,4 %
Végétaux d'extérieur d'ornement	+ 0,2 %	+ 8,3 %
Fleurs coupées fraîches	+ 6,1 %	- 0,6 %
Feuillages coupés frais	- 12,9 %	+ 1 %
Bulbes	-1 %	+ 1 %

Au sein du bassin de production Seine-Manche qui regroupe les régions Normandie, Ile-de-France et Haut-de-France, la filière horticole comptait en 2015, 583 entreprises pour une superficie de 2391 ha destinés à la production. Ces entreprises ont réalisé un chiffre d'affaires s'élevant à 200 863 K€ de plantes à usage horticoles, auxquels s'ajoutent 169 814 K€ de chiffre d'affaires lié à la commercialisation de plants maraichers, peupliers ou plantes aquatiques. *C. ternata* est une plante ornementale dont la production se fait dans des pépinières. Dans le bassin Seine-Manche, les pépinières ont réalisé, en 2015, un chiffre d'affaire de 63 614 K€, représentant ainsi 12% du chiffre d'affaire national (533 000 k€) pour cette même production (Figure 3) (Chiffres clés de FranceAgriMer-horticulture ornementale2015).

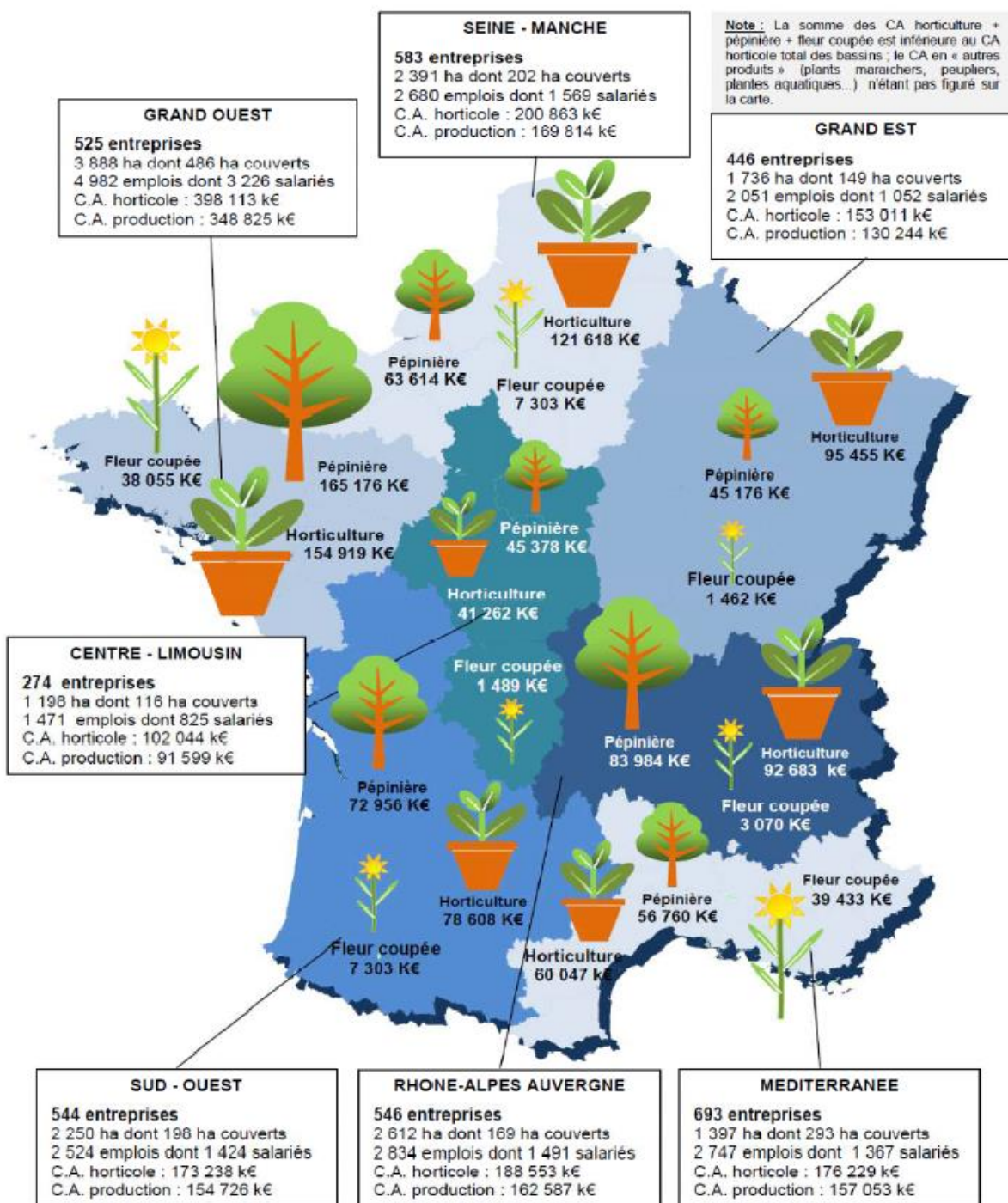


Figure 3 : Répartition géographique de la production des plantes horticoles par bassin. Bilan annuel 2016 du commerce extérieur des produits de l'horticulture ornementale > Edition juin 2017. © FranceAgriMer /

1.2 Les pathogènes et les symptômes chez *C. ternata*

Les cultures horticoles, souvent produites sur des substrats tourbeux, sont soumises à une large variété de pathogènes responsables de pertes de production. Les ravageurs sont responsables du flétrissement des plantes, puis de leur mort. Les pathogènes peuvent être

des macroorganismes (insectes ou nématodes), ou des microorganismes (bactéries, virus, champignons ou encore oomycètes).

1.2.1 Les pathogènes foliaires de *C. ternata*

Un nématode (*Aphelenchoides ritzemabosi*) Schwartz (Aphelenchoididae) impliqué dans l'attaque des feuilles et des bourgeons a été identifié à deux reprises sur des plantes de *Choisya* par (« *Food and Environment Research Agency* » Fera) (Talbot & Wedgwood, 2009). Ces nématodes produisent une décoloration des feuilles, génèrent l'émergence de zones nécrotiques, puis le flétrissement et la mort de la plante. Parfois, les symptômes causés par *A. ritzemabosi* peuvent être attribués à des pathogènes racinaires, dû à la ressemblance des symptômes et à une mauvaise identification du pathogène. Afin de bien identifier le responsable de ces symptômes, les producteurs testent la présence de ces nématodes en mettant les feuilles présentant les symptômes dans l'eau. Si les nématodes sont présents, ils deviennent observables dans l'eau (Talbot & Wedgwood, 2009; Buczacki & Harris, 2014). Les moyens de lutte contre ce bioagresseur incluent des traitements avec des pesticides comme l'abamectine (Chalańska *et al.*, 2017).

Le virus *Arabidopsis mosaic* (ArMV) (Secoviridae) a été isolé à partir de *C. ternata*. Il cause le dépérissement apical des tiges des jeunes *Choisya* dans des pépinières au sud de l'Angleterre. Ce virus a été trouvé dans les feuilles et les racines, et est transmis par des nématodes du sol (Mumford *et al.*, 2002; Talbot & Wedgwood, 2009).

1.2.2 Les pathogènes racinaires de *C. ternata*

L'une des maladies principales touchant *C. ternata* est la pourriture racinaire, apparaissant pendant sa production en pots dans les pépinières. La pourriture racinaire cause le jaunissement et la perte de turgescence des feuilles, le brunissement des racines et finalement la mort de la plante. Cette maladie est provoquée par des pathogènes telluriques capables d'induire des dégâts économiques lourds pour les producteurs. Cette sensibilité à la pourriture racinaire peut être favorisée par des températures élevées et par de mauvaises conditions de drainage des pots par rapport à leur habitat naturel (Talbot & Wedgwood, 2009).

Plusieurs pathogènes telluriques ont été isolés et identifiés à partir de *C. ternata* présentant les symptômes de la pourriture racinaire par Fera. Les pathogènes identifiés sont *Thielaviopsis basicola*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp. et *Phytophthora* spp. (Talbot & Wedgwood, 2009; Veld *et al.*, 2015). Des études précédentes semblent indiquer une prédominance de pathogènes appartenant au genre *Phytophthora*, et plus précisément l'espèce *Phytophthora parasitica* (Talbot & Wedgwood, 2009).

1.2.2.A Les champignons

Thielaviopsis basicola (Berk. & Broome) Ferraris (Ceratocystidaceae) est un champignon tellurique qui présente un large spectre d'hôtes et qui a été retrouvé dans 137 genres végétaux (Geldenhuis *et al.*, 2006). Ce champignon est un pathogène hémibiotrophe capable d'infecter une large gamme de plantes d'intérêt économique telles que l'arachide, les Fabacées du genre *Phaseolus*, la tomate, le tabac, le coton (Geldenhuis *et al.*, 2006; Huang & Kang, 2010), des plantes de pépinières et des plantes ornementales comme *Begonia* sp., *Cyclamen* sp., *Geranium* sp., *Euphorbia pulcherrima* sp., *Viola wittrockiana* et *C. ternata* (Copes & Hendrix, 1996; Daughtrey & Benson, 2005; Talbot & Wedgwood, 2009). Il est capable de résister de nombreuses années (8 à 20 ans) dans les sols non cultivés (Stover, 1950; Hood & Shew, 1997). Des fongicides comme Octave® et Cercobin WG® sont utilisés pour lutter contre ce pathogène (Talbot & Wedgwood, 2009).

Thanatephorus cucumeris (A.B. Frank) Donk (ou *Rhizoctonia solani*) (Ceratobasidiaceae) est un pathogène du sol qui appartient aux basidiomycètes. Ce champignon engendre des dégâts économiques sur de nombreuses espèces de plantes à travers le monde (Cubeta & Vilgalys, 1997). Chez les plantes ornementales, ce pathogène est responsable de la fonte de semis, ainsi que de la décoloration et du dessèchement des plantes adultes. Chez *C. ternata*, *R. solani* a été isolé sur des plants malades conjointement avec le pathogène *Pythium* spp (Talbot & Wedgwood, 2009). La pourriture racinaire causée par ce pathogène augmente quand son milieu de croissance est sec, avec une température entre 17 et 26°C. (Talbot & Wedgwood, 2009). Des fongicides comme Uniform® et EverGol WG® sont utilisés pour lutter contre ce pathogène (Hüberli *et al.*, 2015).

Les champignons du genre *Fusarium* présentent une grande diversité génétique dans le sol (Balmas *et al.*, 2010). Il existe des *Fusarium* non pathogènes, ces souches ne produisant

pas de symptômes chez la plante (Di *et al.*, 2016). Les *Fusarium* pathogènes des plantes sont responsables en grande partie de la baisse de la diversité des plantes dans leurs écosystèmes natifs (LeBlanc *et al.*, 2017). Par exemple, le remplacement des plantes natives par des espèces de plantes invasives peut être favorisé par des micro-organismes de sol comme le *Fusarium* (Mangla & Callaway, 2008). Parmi les *Fusarium* pathogènes de *Choisya*, *F. oxysporum* Schldl. (Nectriaceae) entraîne l'éclaircissement des nervures et le flétrissement accompagné de stries nécrotiques sur les tiges. La présence simultanée de *F. oxysporum* et de *P. ultimum* est souvent observée. Par contre la présence simultanée de *F. oxysporum* et de *Phytophthora* spp sur *C. ternata* a été uniquement constatée en France (Talbot & Wedgwood, 2009). *F. redolens* est également un pathogène fongique identifié sur les racines de *Choisya*. Ce pathogène tellurique a une large gamme de plantes hôtes comme les herbacées et les plantes de pépinières. Il est particulièrement abondant dans les régions tempérées (Talbot & Wedgwood, 2009). Il est responsable chez *Choisya* de la fonte des semis et du flétrissement des plantes adultes. Des fongicides comme Octave® et Cercobin WG® sont appliqués dans le contrôle de *Fusarium* (Talbot & Wedgwood, 2009).

1.2.2.B Les oomycètes

Pythium un genre de la classe des oomycètes comprenant 120 espèces réparties dans différents habitats, la majorité d'entre elles est pathogène des plantes. Ce pathogène présente une virulence aux différents stades de croissance d'une plante. Il est capable d'infecter les graines et les plantules causant la maladie de la fonte de semis. Il s'attaque également aux racines des plantes jeunes ou adultes, sur lesquelles il provoque des lésions nécrotiques au niveau de l'apex racinaire (Martin & Loper, 1999). La présence de *Pythium* spp. sur *Choisya* a déjà été constatée sans qu'il soit possible d'identifier avec précision les différentes espèces présentes (Talbot & Wedgwood, 2009).

Phytophthora est un autre genre de la classe des oomycètes regroupant de nombreux agents pathogène d'espèces végétales (Meng *et al.*, 2014). La « Royal Horticultural Society » (RHS) a identifié plusieurs espèces de *Phytophthora* isolées à partir de *Choisya* malades. Les espèces de *Phytophthora* isolées correspondent à *P. citricola* Sawada, *P. cryptogea* Pethybr. & Laff., *P. cinnamomi* Rands et *P. parasitica* Dastur (Talbot & Wedgwood, 2009). Par ailleurs, la présence simultanée de plusieurs oomycètes (des genres *Phytophthora* et *Pythium*) sur une

même plante de *Choisya* a été rapportée (Talbot & Wedgwood, 2009). *Phytophthora* peut causer en moyenne une perte de 30 % à 80% dans la culture de *C. ternata* (communication interne avec Earl Pépinières Pescheux Thiney). Parmi les *Phytophthora* isolés à partir de *C. ternata*, *P. parasitica* est l'espèce la plus couramment rencontrée, notamment dans le sud-ouest de la France (Talbot & Wedgwood, 2009).

2. *Phytophthora parasitica*

2.1 Classification

P. parasitica (Dastur) est un pathogène tellurique appartenant à la classe des oomycètes. Aujourd'hui, le nom *P. parasitica* est fréquemment utilisé (Attard *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2014; Farr & Rossman, 2017) et correspond à *P. nicotianae* Breda de Haan décrit pour la première fois par Jacob van Breda de Haan en 1896. Les oomycètes représentent une classe de microorganismes eucaryotes présentant des similitudes morphologiques avec les champignons filamenteux. D'un point de vue phylogénétique, les oomycètes appartiennent au supergroupe SAR (Straménopiles, Alvéolites et Rhizaria) et sont proches des diatomées et des algues brunes. Ils appartiennent d'ailleurs tous les trois à la division des straménopiles (Figure 4) (Thines & Kamoun, 2010; Burki, 2014; Meng *et al.*, 2014; Kamoun *et al.*, 2015). Bien que les oomycètes présentent certaines similitudes morphologiques avec les champignons, d'autres caractéristiques peuvent les différencier. En effet, les champignons sont haploïdes, avec des hyphes septés et une paroi cellulaire composée principalement de chitine. Les oomycètes quant à eux sont des organismes diploïdes, avec des hyphes siphonnés, auxotrophes au stérol, et dont la paroi est principalement composée de 1,3- β -glucanes, 1,6- β -glucanes et 1,4- β -glucanes (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2014) et de chitine en plus faible proportion (Lin & Aronson, 1970; Werner *et al.*, 2002). La division des straménopiles dont font partie les oomycètes est caractérisée par la présence de poils sur le flagelle antérieur des spores mobiles (Van de Peer & De Wachter, 1997; Hardham, 2007). Ces différences, structurale et métabolique entre oomycètes et champignons expliquent pourquoi les produits fongicides ciblant respectivement la chitine et la synthèse des stérols, sont inefficaces contre les oomycètes (Hardham, 2007; Meng *et al.*, 2014).

Le groupe des oomycètes incluent des pathogènes biotrophes (tirant leurs nutriments à partir de tissus vivants) comme *Hyaloperonospora parasitica* (Pers.) Constant., des pathogènes nécrotrophes (tirant leurs nutriments de cellules mortes) comme *Phytophthora cinnamomi* et des pathogènes hémibiotrophes (pouvant associer les deux cycles, biotrophe et nécrotrophe) comme *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd. et *P. parasitica* (Meng *et al.*, 2014). Ces oomycètes sont connus pour engendrer des maladies chez de nombreuses plantes. Parmi les dix oomycètes les plus virulents, cinq d'entre

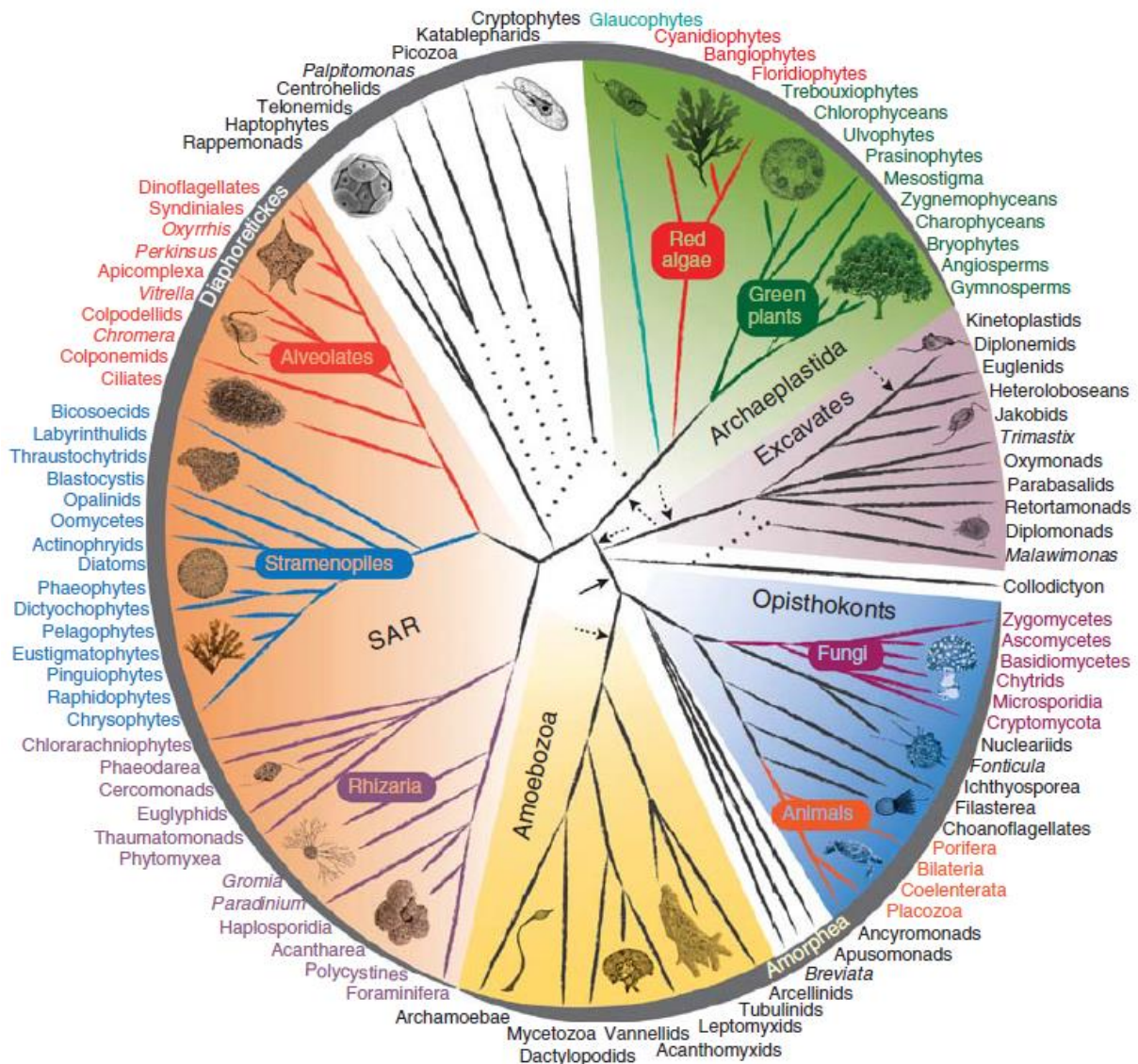


Figure 4 : Arbre phylogénétique des eucaryotes. Les eucaryotes sont classés en deux mégaclasses (diaphoretiques et amorphea) qui incluent cinq supergroupes. Les différentes couleurs représentent les cinq supergroupes des eucaryotes (Amoebozoa, Opisthokonts, Excavates, Archaeplastida et SAR). Les pointiers représentent une incertitude dans le classement. La figure illustre les rangs taxonomiques dans lesquels sont répertoriés les espèces du genre

Phytophthora : super groupe (méga-clade diaphoretiques SAR), division straménopiles) et classe (oomycètes) (Burki, 2014).

eux appartiennent au genre *Phytophthora* avec parmi eux *P. parasitica* (Kamoun *et al.*, 2015). En se basant sur une analyse phylogénétique de 116 espèces de *Phytophthora*, le genre *Phytophthora* est divisé en 10 clades, avec *P. parasitica* classé dans le clade 1. Ce clade contient 3 divisions (a, b et c), mais *P. parasitica* n'appartient à aucune de ces divisions (Figure 5) (Kroon *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2014).

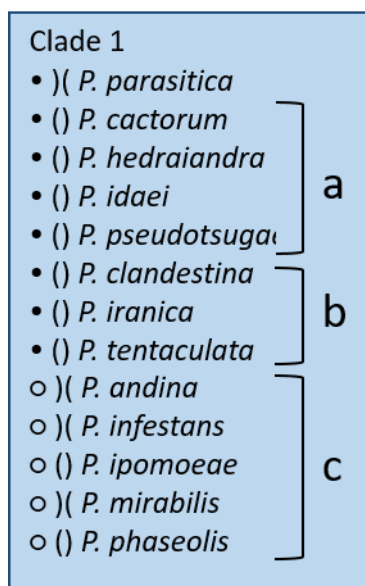


Figure 5 : Vue d'ensemble des espèces et de clade 1 du genre *Phytophthora*. Les symboles de cercles indiquent si le sporangium de cette espèce est avec papille (•), semi-papille (◊). Les espèces hétérothalliques sont marquées comme)(et les espèces homothalliques comme (). Le clade 1 est divisé en sous-clades et les espèces sont organisées par ordre alphabétique dans le clade et les sous-clades. *P. parasitica* n'appartient à aucun sous-clade (Kroon *et al.*, 2012).

2.2 Cycle de *P. parasitica*

Le cycle de *P. parasitica* est composé d'une phase végétative et d'une phase sexuée (Figure 6). La phase végétative produit des sporanges, zoospores et chlamydospores (Hardham, 2007; Meng *et al.*, 2014). Tout d'abord le mycélium donne naissance à des sporanges, qui sont des cellules polynucléaires formées à partir du cytoplasme du mycélium. Ces sporanges sont capables de germer directement pour former des hyphes capables de pénétrer dans les racines, ou bien indirectement par la production de zoospores (Meng *et al.*, 2014). Les facteurs environnementaux comme la lumière et la température sont déterminants dans le « choix » du mode de germination (Hemmes & Hohl, 1969). Les sporanges peuvent rester dans l'état polynucléaire un certain temps, avant l'induction de la formation des zoospores (zoosporogénèse). Ces zoospores ne possèdent pas de paroi, et leur surface externe est une membrane plasmique. Ils arrivent à garder le volume et l'homéostasie cellulaire grâce à un système de pompe permettant d'évacuer l'eau qui entre dans la cellule (Mitchell & Hardham, 1999). Les zoospores sont équipées par deux flagelles attachés au milieu d'une

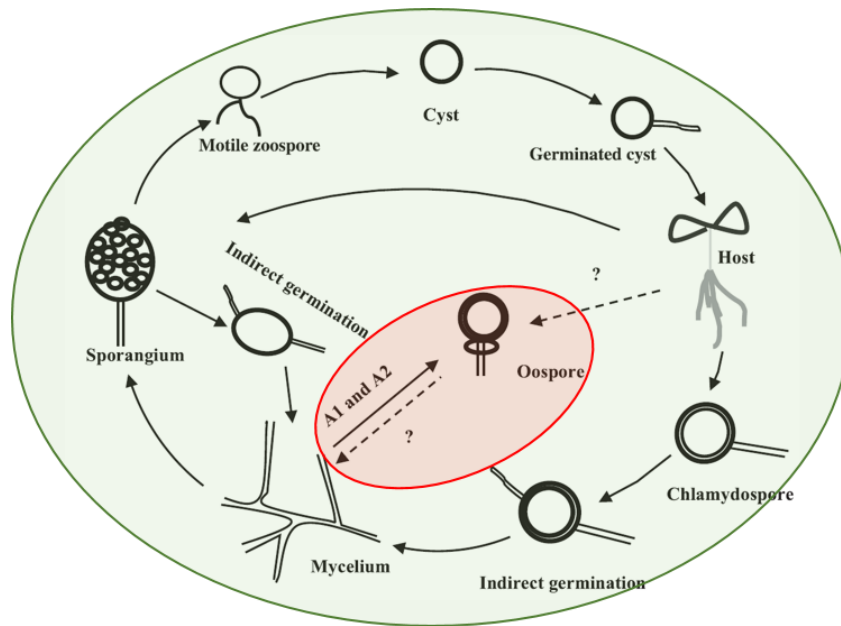


Figure 6 : Cycle de vie de *P. parasitica*. La phase végétative (en vert) et la phase sexuée (en rouge). La phase végétative (en vert) donne des sporanges, puis des zoospores qui s'enkystent à la surface de la plante, puis germent pour pénétrer le tissu. Le mycélium est aussi capable de donner naissance à des chlamydospores qui germent pour donner du mycélium. La phase sexuée (en rouge) nécessite la présence de types sexuels A1 et A2 pour donner les oospores (Meng *et al.*, 2014).

rainure de la surface ventrale. *P. parasitica* appartient à la division des straménopiles (heterokont) car les deux flagelles des zoospores diffèrent dans leurs morphologies externes. Le flagelle antérieur, qui est le plus petit, possède des poils nommés mastigonemes et assure la propulsion. Le flagelle postérieur (ou grand flagelle) ne possède pas de poils, et sa fonction est de changer la direction. Ces zoospores sont capables de localiser leurs cibles grâce au chimiotactisme et sont les agents infectieux majeurs de *P. parasitica* (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Hardham, 2007; Meng *et al.*, 2014). Une fois les zoospores arrivées à la surface des racines, elles s'enkystent, germent et produisent un appressorium pour pénétrer le tissu (Figure 7) (Kebdani *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2014). Quand les conditions environnementales ne sont pas favorables, le mycélium donne naissance à des chlamydospores qui représentent la forme de résistance dans le sol, puisqu'elles peuvent rester viables pendant plusieurs années (Meng *et al.*, 2014). La reproduction sexuée chez *P. parasitica* est importante pour la production des différents génotypes qui permettent au pathogène de s'adapter à des conditions non favorables et de pouvoir infecter des plantes hôtes possédant de nouveaux génotypes résistants (Meng *et al.*, 2014). *P. parasitica* est

hétérothallique, ce qui nécessite la présence de types sexuels A1 et A2 pour que la reproduction sexuelle soit possible (Ko, 1978).

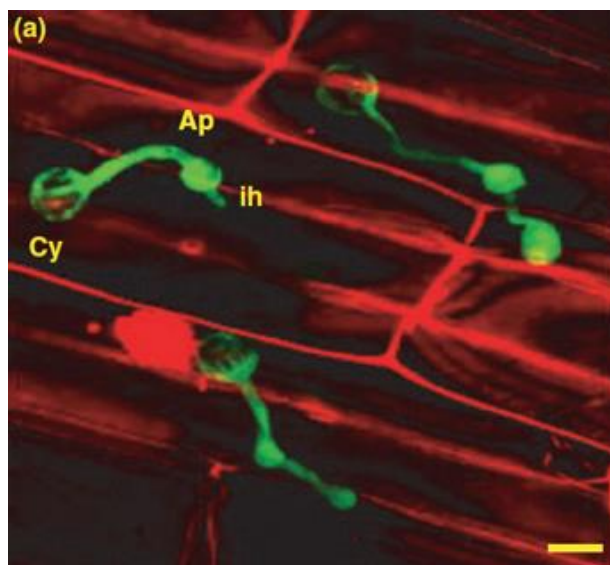


Figure 7 : La formation d'appressorium par *P. parasitica* (souche transfectée par GFP) sur les racines de tomate marquées par l'iodure de propidium. Observation par un microscope confocal à balayage laser 3h après l'inoculation (images en zstack). (Cy) Kyste, (Ap) appressorium, (ih) hyphe. La barre d'échelle représente 10 μm (Kebdani et al., 2010)

2.3 Les cultures hôtes

Les oomycètes du genre *Phytophthora* causent d'importants dégâts écologiques et économiques dans le monde (Erwin & Ribeiro, 1996), avec des pertes annuelles estimées à cinq milliards de dollars (Stokstad, 2006). *P. parasitica* est un pathogène répandu dans le monde entier (Erwin & Ribeiro, 1996). Ce pathogène est initialement connu pour infecter les plants de tabac et de citron (Kamoun et al., 2015). La recherche des plantes hôtes de *P. parasitica* sur le site de « United States Department Of Agriculture » (USDA) montre 90 familles, 255 genres et plus de 900 espèces et variétés d'hôtes possibles (Farr & Rossman, 2017). Ces espèces incluent des plantes herbacées, des plantes vivaces, des arbres fruitiers et des plantes d'horticulture comme *C. ternata* (Kamoun et al., 2015; Farr & Rossman, 2017). Certains isolats de *P. parasitica* sont également capables d'infecter *Arabidopsis thaliana* (Attard et al., 2008, 2010).

Malgré le large spectre d'hôtes pour cette espèce, la plupart des *P. parasitica* isolées ont montré une préférence pour certains hôtes (Erwin & Ribeiro, 1996; Kamoun et al., 2015). Par exemple, les isolats de *P. parasitica* issus de *Citrus* montrent une virulence élevée contre les semis de *Citrus jambhiri* Lush. causant la pourriture du collet et une réduction significative de la masse racinaire. Ceux isolés à partir d'autres plantes ont une virulence plus faible contre *Citrus jambhiri*, qui se caractérise par une réduction moindre de la masse racinaire et l'absence

de pourriture du collet. Cette observation n'est néanmoins pas valable pour toutes les espèces végétales. En effet, les 15 isolats de *P. parasitica* testés sur tomate par Matheron & Matejka (1990) ont montré une virulence élevée causant la mort des plantes testées. Une collection mondiale des isolats de *P. parasitica* a été étudiée pour leur virulence contre le tabac et la tomate. Les isolats produisant de la parasiticéine ont montré une virulence plus forte contre la tomate en comparaison avec le tabac. Par contre, les isolats non producteur parasiticéine ont montré une virulence plus forte contre le tabac (Colas *et al.*, 1998). La parasiticéine est une protéine de 10 KDa appartenant à la famille des élicitines (des éliciteurs protéiques). Cette protéine est perçue par les plantes comme un PAMP (« *Pathogen-Associated Molecular Patterns* »), c'est-à-dire, qui induit la réponse de défense chez les plantes (Ricci *et al.*, 1992). De plus, l'élicitine induit une meilleure réponse de défense chez *Nicotiana* spp. en comparaison avec d'autres plantes (Bonnet *et al.*, 1996). La sécrétion d'élicitine est une caractéristique commune de toutes les espèces de *Phytophthora*, à l'exception de quelques souches de *P. parasitica* isolées exclusivement à partir des plantes de tabac présentant les symptômes de la tige noire (Kamoun *et al.*, 1994). Cette étude a montré que les souches qui ne produisent pas d'élicitine ont été trouvées seulement sur le tabac, et elle a proposé qu'une *forma specialis* (un groupement taxinomique utilisé pour un parasite adapté à un hôte spécifique, quand le classement en sous-espèce ou variété n'est pas approprié) pour le tabac peut exister chez *P. parasitica* (Colas *et al.*, 1998).

Des analyses de polymorphismes à nucléotide simple (SNP) des gènes mitochondriaux et nucléaires ont montré une association spécifique entre l'origine de l'hôte, et les groupements génétiques de *P. parasitica*. Cette association a été observée dans le cas du citron et du tabac. Par exemple, les *P. parasitica* isolés du citron en Italie, Californie, Floride, Syrie, Albani et Philippines ont été regroupés dans le même groupe mitochondrial, et ils partagent au moins 1 allèle nucléaire (Mammella *et al.*, 2013; Kamoun *et al.*, 2015). Cette association n'était pas observée avec les autres plantes, et surtout dans le cas des plantes ornementales en pots produites dans les pépinières. Différentes espèces de plantes sont produites ensemble dans les pépinières, ce qui favorise le croisement des isolats de *Phytophthora* génétiquement différents (Mammella *et al.*, 2013; Kamoun *et al.*, 2015). Des études supplémentaires basées sur le séquençage du génome entier de *P. parasitica* sont

nécessaires pour déterminer si *P. parasitica* possède des races, des pathotypes ou bien des sous-espèces (Kamoun *et al.*, 2015).

3. Défense de la plante

La plante et ses pathogènes sont depuis toujours dans une "course à l'armement". Le résultat final de cette interaction dépend de la capacité de la plante à identifier le pathogène, à activer une réponse de défense efficace et de l'habilité du pathogène à réprimer le système immunitaire de la plante (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2009; Berens *et al.*, 2017). La réponse immunitaire de la plante à une infection par un pathogène est particulièrement bien étudiée au niveau des feuilles. La phase de reconnaissance de l'agent pathogène est cruciale dans le déclenchement de la réponse immunitaire. La plante va détecter des motifs moléculaires agissant comme des signaux d'alerte indiquant une attaque par un micro-organisme pathogène (Boutrot & Zipfel, 2017). Ces molécules très diversifiées sont appelées « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* » (PAMP) ou encore « *Damage-Associated Molecular Pattern* » (DAMP) (Berens *et al.*, 2017). Ces molécules de différentes natures peuvent inclure la flagelline 22 (Chinchilla *et al.*, 2007; Uddin *et al.*, 2017), la chitine (Stampfl *et al.*, 2016), les glycoprotéines (Hückelhoven, 2007; Gust *et al.*, 2007) et les lipopolysaccharides (Zeidler *et al.*, 2004). Leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques de la plante situés sur la membrane plasmique appelés « *Pattern-Recognition Receptors* (PRR) » va initier la réponse immunitaire de type PTI (*PAMPs Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2015; Stampfl *et al.*, 2016; Berens *et al.*, 2017; Uddin *et al.*, 2017). Cette réponse immunitaire se traduit entre autre par la fortification de la paroi cellulaire en synthétisant des composés phénoliques, de la callose et de la lignine (Collinge, 2009; Szatmári *et al.*, 2014). De plus, la plante réagit par l'accumulation de protéines de défenses appelées « *Pathogenesis-Related proteins* » (PR) comme les chitinases et les glucanases qui vont dégrader la paroi cellulaire des champignons et des oomycètes et des métabolites secondaires antimicrobiens comme les phytoalexines (Loon *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2009; Oßwald *et al.*, 2014). La réponse du pathogène à cette réaction de défense de la plante est caractérisée par le déploiement d'effecteurs dans les cellules de la plante afin de réprimer le système immunitaire. Ces effecteurs sont des protéines de virulence capables de mimer ou d'inhiber certaines fonctions cellulaires, et de déclencher le « *Effector-Triggered*

Susceptibility » (ETS). En retour, si la plante et le pathogène ont co-évolué ensemble, la plante va identifier ces effecteurs grâce à des récepteurs spécifiques nommés récepteurs R, ce qui déclenche une réponse immunitaire secondaire appelée « *Effector-Triggered Immunity* » (ETI) (Figure 8) (Chisholm *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2009; Oßwald *et al.*, 2014). Si la plante réussit à identifier le pathogène, déclencher l'ETI et arrêter son développement, l'interaction est dans ce cas incompatible. Cependant, si la plante ne réussit pas à identifier le pathogène et arrêter son développement, l'interaction est compatible (Attard *et al.*, 2010).

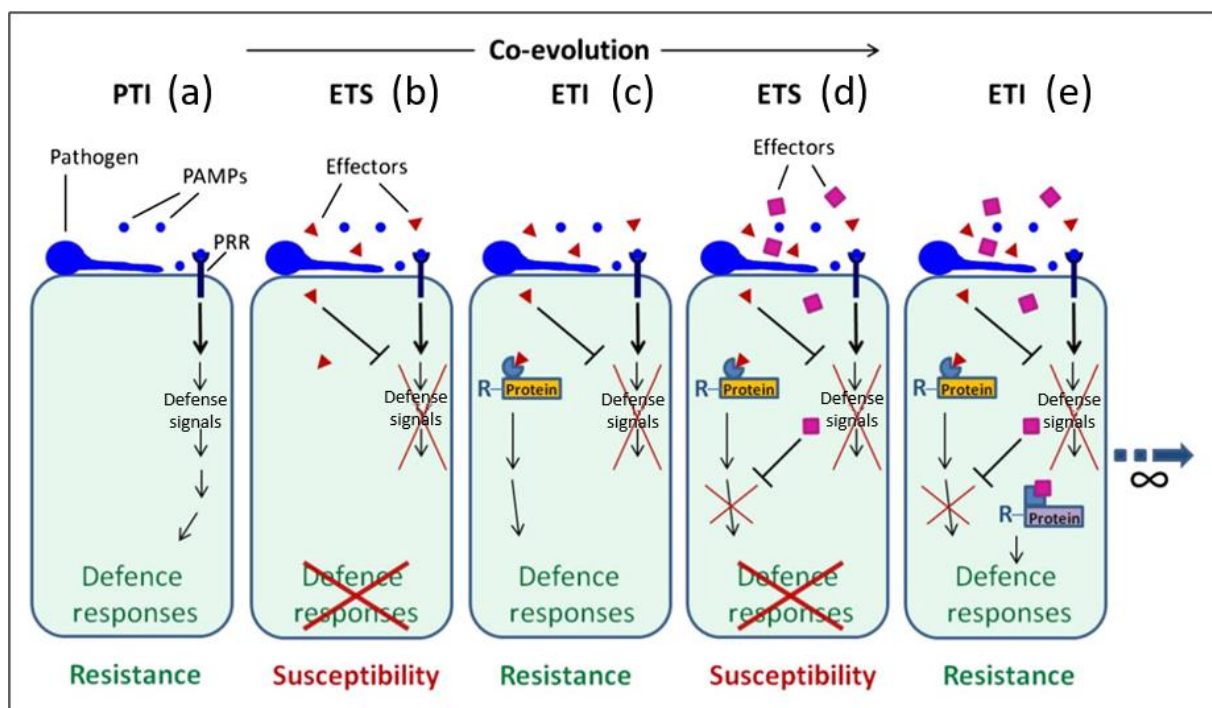


Figure 8 : L'interaction et la co-évolution entre la plante et le pathogène. (a) Quand un pathogène attaque la plante, les PAMP vont activer les PRR chez la plante ce qui résulte en une signalisation de défense et en PTI. (b) Les pathogènes répondent par la sécrétion des effecteurs qui répriment la PTI, résultant en ETS. (c) Les plantes qui ont développé une résistance, vont sécréter des protéines de résistance (R) qui identifient des effecteurs spécifiques, résultant en une réponse immunitaire secondaire, l'ETI. (d) Les pathogènes peuvent changer leurs effecteurs, afin d'éviter l'ETI, résultant en une nouvelle phase d'ETS. (e) La plante peut développer de nouvelles protéines de résistance (R) afin de revenir dans la phase d'ETI. Ce processus peut être répété jusqu'à l'émergence d'un vainqueur (Oßwald *et al.*, 2014).

La réponse immunitaire activée par ETI est particulièrement efficace, cette réponse active la mort cellulaire programmée au niveau du site d'infection, ce qui permet d'isoler le pathogène du reste de la plante (Wit, 1997). L'ETI est particulièrement active contre les pathogènes biotrophes mais pas contre les pathogènes nécrotrophes. Les pathogènes nécrotrophes tirent leurs nutriments à partir des cellules mortes de l'hôte, donc une réponse

immunitaire causant la mort cellulaire programmée favorise le développement de ces pathogènes (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009).

L'activation de ces réponses immunitaires dépend fortement des phytohormones comme l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Berens *et al.*, 2017). Une infection par le pathogène stimule la synthèse par la plante d'un ou de plusieurs types d'hormones selon la nature du pathogène. Une étude sur la réponse immunitaire d'*A. thaliana* (L.) Heynh et *Nicotiana tabacum* L. a montré que les pathogènes biotrophes sont plus sensibles à la réponse immunitaire activée par SA et les pathogènes nécrotrophes ou les insectes herbivores sont plus sensibles à la réponse immunitaire activée par JA et ET (Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009; Attard *et al.*, 2010). Une fois la réponse immunitaire activée au niveau de l'infection, une réponse de défense systémique est déclenchée dans le reste de la plante afin de protéger et de préparer les tissus sains contre une invasion potentielle. La réponse de défense systémique activée par les pathogènes est nommée « *Systemic Acquired Resistance* (SAR) » (Durrant & Dong, 2004). La SAR peut être activée par le PTI et l'ETI. Elle est associée avec une augmentation de SA au niveau de l'infection et souvent dans toute la plante (Mishina & Zeier, 2007). En revanche, JA et ET jouent un rôle dans la régulation de la résistance aux pathogènes, et dans l'activation de la « *Induced Systemic Resistance* » (ISR) (Loon *et al.*, 2006; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Pieterse *et al.*, 2009).

La plante est souvent en interaction avec plusieurs types de pathogènes qui vont déclencher sa réponse immunitaire. L'activation du mécanisme de défense de la plante est coûteuse au niveau énergétique, c'est pourquoi la plante a besoin d'un mécanisme qui lui permette de s'adapter d'une façon efficace aux changements dans son environnement (Walters & Heil, 2007). La communication, entre les voies de signalisation hormonale de SA, JA et ET, offre à la plante un tel mécanisme et lui permet d'adapter ces réponses de défenses selon la nature du pathogène (Bostock, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). Des études sur la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) et *Arabidopsis* ont montré que SA est un antagoniste de la voie de signalisation de JA, et que les voies de signalisation de JA et ET agissent en synergie (Penninckx *et al.*, 1998; Katagiri, 2004). Plusieurs études ont montré l'échange entre la réponse de défense dépendante de SA contre un pathogène biotrophe, et la réponse de défense dépendante de JA contre un pathogène nécrotrophe. Par exemple, chez *Arabidopsis*,

l'activation de la voie de SA par l'oomycète biotrophe *Hyaloperonospora arabidopsidis* a fortement réprimé la défense par la voie de JA activé par des insectes herbivores (Koorneef *et al.*, 2008). De même, l'activation de la voie de SA par *P. syringae* a réprimé la voie de JA, et a rendu les feuilles plus sensibles au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* (Spoel *et al.*, 2003; Pieterse *et al.*, 2009).

3.1 Particularité de la réponse immunitaire racinaire

La plupart des études se focalisant sur le dialogue moléculaire entre la plante et le pathogène ont été réalisées au niveau de la partie aérienne de la plante. La réponse immunitaire au niveau du système racinaire reste peu explorée (Attard *et al.*, 2010; De Coninck *et al.*, 2015). Par ailleurs, les résultats portant sur la réponse immunitaire de la plante contre des pathogènes du sol résultent souvent de l'extrapolation de travaux réalisés au niveau des feuilles (Johansson *et al.*, 2006; Attard *et al.*, 2010). Par exemple, les analyses de l'expression des gènes pour déterminer les événements moléculaires responsables de la sensibilité d'*A. thaliana* à *Verticillium dahliae* ont été réalisées au niveau des feuilles (Johansson *et al.*, 2006). Cependant, il existe de plus en plus de preuves montrant des différences dans les mécanismes de défenses des plantes entre les racines et les feuilles (Hermanns *et al.*, 2003; Schlink, 2010; Attard *et al.*, 2010; De Coninck *et al.*, 2015). Une étude a d'ailleurs montré que la réponse du hêtre à *P. citricola* est différente entre les racines et les feuilles. Dans cette étude, la plupart des gènes activés dans les racines n'avaient pas de fonction connue dans la partie aérienne, ou bien ne correspondaient pas à une séquence dans la base de données des gènes activés dans la partie aérienne (Schlink, 2010). De plus, dans le cas d'*A. thaliana* et *H. arabidopsidis* isolat Noco2, l'expression du gène de résistance RPP1 (*recognition of Peronospora parasitica 1*) n'est pas suffisante pour déclencher l'ETI, contrairement aux feuilles (Hermanns *et al.*, 2003). L'étude de l'infection des racines d'*A. thaliana* par *P. parasitica* a montré une accumulation des transcrits des gènes codant des protéines impliquées dans la biosynthèse de SA et JA, ainsi que l'accumulation de transcrits des gènes impliqués dans la voie de signalisation de SA et JA. Ces résultats montrent que contrairement aux feuilles, où les voies de signalisation de SA et JA ont des effets antagonistes, ces voies ont des effets coopératifs dans les racines (Attard *et al.*, 2010). Ces études montrent que les réactions de défense sont différentes entre les feuilles et les racines, et que

l'extrapolation des découvertes d'un organe à un autre peut amener à des généralisations fausses (Attard *et al.*, 2010).

Ces réactions de défense se déclenchent une fois que le pathogène a pénétré dans les cellules, mais pour y arriver le pathogène doit faire face à des barrières physiques, biologiques et chimiques. La paroi cellulaire joue le rôle de la première ligne de défense contre les pathogènes en constituant une barrière physique. Cette paroi est une structure dynamique qui est remodelée et fortifiée par la réponse immunitaire, suite à une attaque par les pathogènes (Houston *et al.*, 2016). Cette fortification est réalisée à l'aide de la callose et de la lignine. De plus, des études montrent que d'autres constituants de la paroi peuvent jouer un rôle dans la défense de la plante contre ces pathogènes au niveau de la racine. Parmi ces composés, il existe les arabinogalactane-protéines (AGPs), qui sont capables de jouer un rôle dans la répulsion et la neutralisation des pathogènes et un rôle dans l'attraction des micro-organismes bénéfiques pour la plante (Nguema-Ona *et al.*, 2013). Ces micro-organismes attirés par les AGPs peuvent jouer aussi un rôle important dans la défense de la plante, comme la compétition avec les pathogènes et l'activation de la « *Induced Systemic resistance (ISR)* » (Zehnder *et al.*, 2001; Wehner *et al.*, 2010; Naher *et al.*, 2014). Des méthodes de lutttes alternatives utilisent les micro-organismes appelés « *biological control agent (BCA)* » afin de réduire les dégâts causés par le pathogène (Shrestha *et al.*, 2015). Comme les PAMPs chez les pathogènes, les micro-organismes bénéfiques peuvent être détectés par la plante, ce qui lui permet d'activer son système immunitaire, cette activation est légère mais aussi efficace (Van Wees *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009; Zamioudis & Pieterse, 2012). L'ISR déclenchée par les BCA est associée à l'amorçage d'une défense renforcée au lieu d'une activation directe de la défense. L'ISR est capable à son tour de fortifier la paroi et d'induire la production des métabolites secondaires toxiques au pathogène. Ces métabolites sont présents dans la plante avant l'infection, mais leur expression est modulée par la plante suite à une attaque par le pathogène (Bednarek & Osbourn, 2009; Wink, 2010).

Aujourd'hui, beaucoup d'études montrent l'importance de comprendre les mécanismes naturels de défense chez la plante, afin de monter une nouvelle stratégie qui permet de continuer à produire des plantes en bonne santé, et en même temps de diminuer l'utilisation de produits chimiques nocifs pour l'homme et pour l'environnement (Freeman & Beattie, 2008). Le rôle des AGPs, des métabolites secondaires et des micro-organismes

bénéfiques dans la défense de la plante sont les sujets majoritaires étudiés dans ce travail de thèse et seront présentés dans les chapitres suivants.

3.2 Arabinogalactane-protéines

AGPs est un terme utilisé pour décrire une catégorie de protéoglycannes hautement glycosylées par des glycannes O-liés. Ces protéoglycannes ont été détectées dans l'embranchement des angiospermes, des gymnospermes et dans celui des bryophytes et des algues (Showalter, 2001; Hervé *et al.*, 2016).

3.2.1 Structure des arabinogalactane-protéines

Les AGPs sont des molécules pariétales hautement glycosylées appartenant à la famille des « *hydroxyproline-rich glycoproteins* » (HRGP) (Gleeson *et al.*, 1989; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Du fait de leur forte glycosylation, ces molécules sont qualifiées de protéoglycannes. Il existe une très grande complexité des AGPs qui est due à la grande diversité observée dans leurs parties glucidiques et protéiques (Ellis *et al.*, 2010). La partie protéique des AGPs est riche en hydroxyproline/proline (Pro/Hyp), sérine, alanine, thréonine sur lesquelles s'effectuent la O-glycosylation de la partie glycanique (Gleeson *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1994). La partie glycanique constitue 90 à 98 % de la molécule d'AGPs, et est composée principalement de galactose (Gal) et d'arabinose (Ara) avec des résidus de xylose (Xyl), rhamnose (Rha), mannose (Man) et acide glucuronique (GalA) (Gane *et al.*, 1995; Yates *et al.*, 1996; Showalter, 2001; Ellis *et al.*, 2010; Tryfona *et al.*, 2010; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Les résidus d'Ara et de Gal sont liés à certains résidus hydroxyproline. Les chaînes d'arabinogalactanes sont constituées de 1-3- β -Gal, avec des ramifications de 1-6- β -Gal présentant des terminaisons constituées par de l'Ara, Rha, Gal et GalA (Figure 9). Ces chaînes sont nommées arabinogalactanes de type II (Clarke *et al.*, 1979; Showalter, 2001). La caractérisation de la partie glycanique des AGPs chez les bryophytes a montré des caractéristiques structurales uniques comme le 1-2-3 Gal qui n'a jamais été trouvé avant chez les AGPs (Bartels *et al.*, 2017). La majorité des AGPs possède au niveau de leur partie protéique une séquence de sécrétion N-terminal et une séquence hydrophobe en C-terminal résultant de l'ajout d'une ancre GlycosylPhosphatidylinositol (GPI). Celle-ci permet l'ancrage des AGPs à la membrane plasmique (Gleeson *et al.*, 1989; Seifert & Roberts, 2007; Ellis *et al.*, 2010).

La partie protéique des AGPs est synthétisée par plusieurs gènes, qui sont classifiés en 4 groupes : AGPs classiques, AGPs hybrides, AGPs chimériques et AGPs peptides (Figure 10) (Schultz *et al.*, 2000; Ma & Zhao, 2010; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Les AGPs classiques sont caractérisées par un domaine peptide signal, un domaine riche en Pro/Hyp, et un domaine C-terminal. Les AG peptides sont des AGPs classiques plus courtes. Les AGPs hybrides sont des AGPs classique avec des domaines supplémentaires dans leurs parties protéiques, comme le domaine « *fasciclin-like proteins* » (FLA), le domaine « *Lys-rich* », le domaine « *nonspecific lipid transfer protein* » (ns-LTP) et le domaine « *domain of unknown function* » (DUF). Les AGPs chimériques sont souvent dépourvues de domaine C-terminal responsable de l'ancre GPI (Ellis *et al.*, 2010; Nguema-Ona *et al.*, 2012, 2013). Une des caractéristiques des AGPs est de se lier de façon réversible au réactif β -glucosyl Yariv. Cette propriété permet d'extraire les AGPs, en les précipitant à l'aide du réactif β -glucosyl Yariv pour les purifier et les caractériser (Yariv *et al.*, 1962, 1967). Toutefois, il faut noter que toutes les AGPs ne se lient pas au réactif de β -glucosyl Yariv. La partie des AGPs ciblée par le β -glucosyl Yariv a été caractérisée par Kitazawa *et al.*, (2013). Leur étude a montré que le β -glucosyl Yariv se lie avec des chaînes de β -1,3-galactane supérieures à 5 résidus, mais il n'induit pas la précipitation. Une chaîne avec 7 résidus est nécessaire pour induire la liaison de deux β -glucosyl Yariv et le précipiter (Kitazawa *et al.*, 2013).

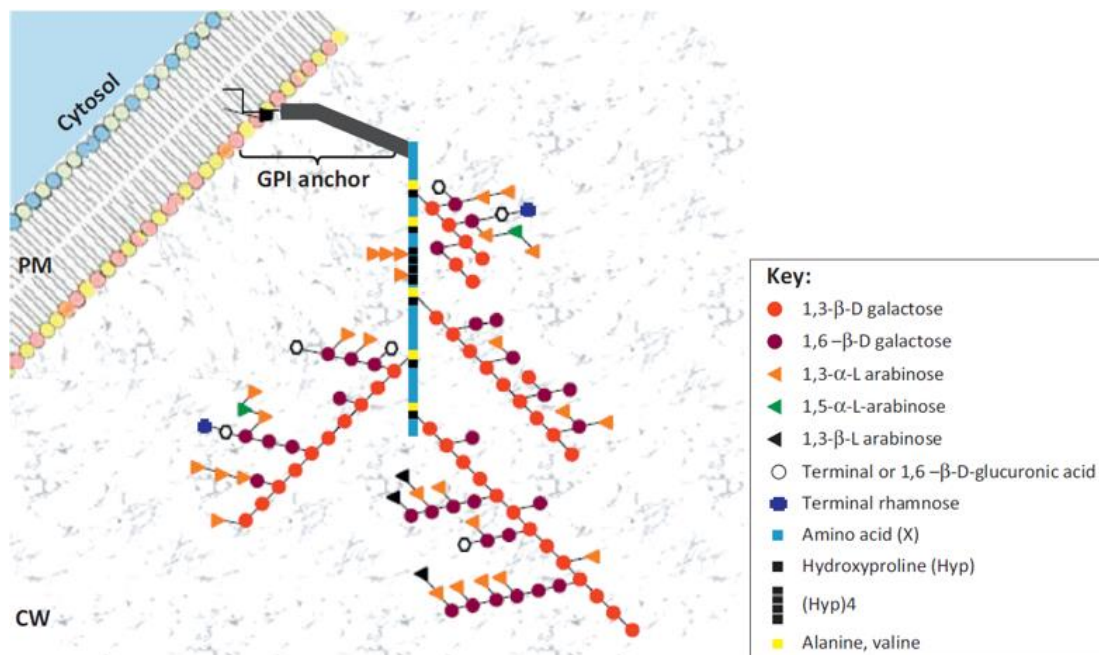


Figure 9 : Structure générale des arabinogalactane-protéines (AGPS). (PM) Membrane plasmique, (CW) Paroi cellulaire et (GPI) GlycosylPhosphatidylInositol (Nguema-Ona *et al.*, 2013).

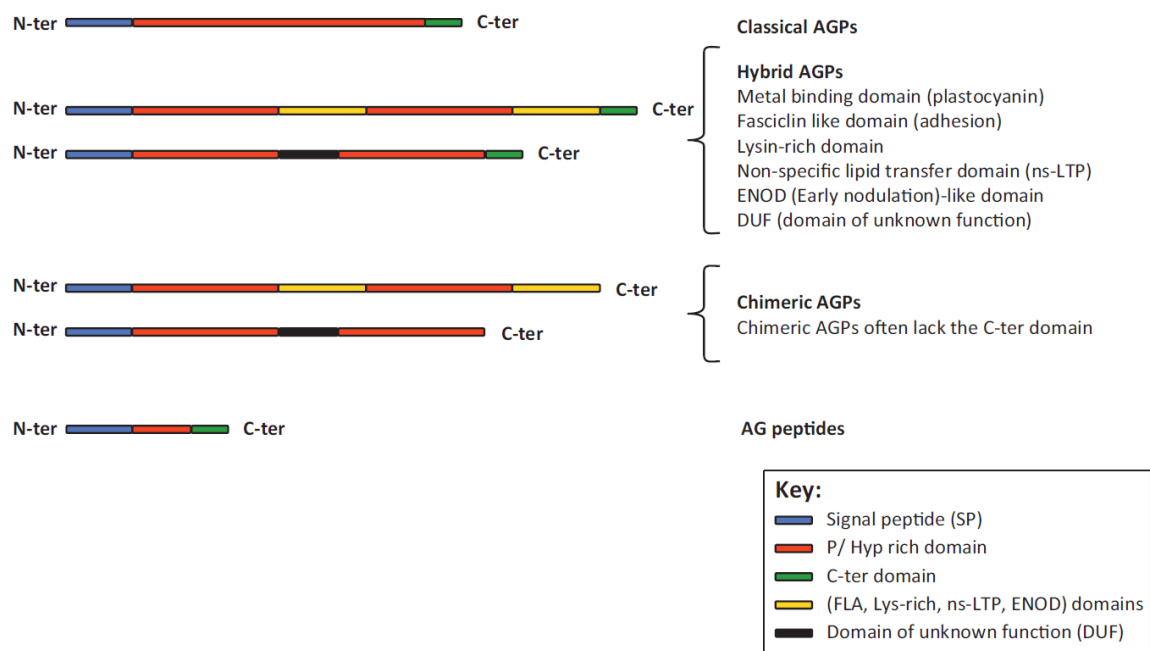


Figure 10 : Les différentes classes des AGPs. La partie protéique des AGPs est synthétisée par plusieurs gènes et ils sont classifiés en 4 groupes : AGPs classiques, AGPs hybrides, AGPs chimériques et AGPs peptides (Nguema-Ona et al., 2013).

3.2.2 Modifications post-traductionnelles des AGPs

Les AGPs subissent trois modifications post-traductionnelles successives consistant en des étapes d'hydroxylation des résidus proline, de glycosylation et l'addition d'une ancre GPI. L'hydroxylation est la première étape nécessitant l'enzyme prolyl-4-hydroxylase (P4Hs) au niveau du réticulum endoplasmique pour former des résidus d'hydroxyproline (Hieta & Myllyharju, 2002; Vlad *et al.*, 2007; Velasquez *et al.*, 2011; Nguema-Ona *et al.*, 2014). Cette enzyme est constituée de deux sous-unités catalytiques α et de deux sous-unités β . L'hydroxylation est nécessaire afin de permettre l'attachement de la partie glycanique des AGPs au niveau des résidus d'Hyp. Seules les prolines qui se trouvent dans des motifs bien précis comme Ala-Pro, Pro-Ala, Pro-Pro, Pro-Val et Ser-Pro subissent cette hydroxylation. Les prolines qui se trouvent dans des motifs incluant Lys-Pro, Tyr-Pro et Phe-Pro ne subissent pas cette hydroxylation (Kieliszewski & Lamport, 1994; Nguema-Ona *et al.*, 2014). Treize P4Hs ont été découvertes dans le génome d'*A. thaliana*, avec une P4H nommée *ATP4H1* induite par un stress mécanique ou par une hypoxie (Vlad *et al.*, 2007; Asif *et al.*, 2009; Velasquez *et al.*, 2011). Une similarité de 37 à 85 % a été montrée pour les polypeptides de P4H, ce qui indique une divergence élevée dans leurs protéines. Cette divergence peut indiquer des différences

dans la spécificité au substrat et dans leur profil d'expression ou distribution intracellulaire (Fragkostefanakis *et al.*, 2014).

La deuxième étape est la glycosylation, qui est réalisée au niveau de l'appareil de Golgi. Il peut y avoir jusqu'à 15 glycosyltransférases (GT) intervenant pendant la glycosylation, afin de synthétiser la partie glycanne des AGPs (Van Hengel *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010; Nguema-Ona *et al.*, 2014). L'initiation de cette étape nécessite l'action d'une GT spécifique qui est la O-Hyp Gal-T. Cette enzyme a pour fonction d'initier la galactosylation des résidus Hyp de la partie protéique des AGPs (Basu *et al.*, 2013, 2015; Nguema-Ona *et al.*, 2014). D'autres enzymes interviennent ensuite, telles que les β -1,3-Gal-T, β -1,6-Gal-T, α -1,3- et α -1,5-arabinosyltransférase (Ara-T), β -glucuronosyltransférase (GlcA-T) et la α -1,2-fucosyltransférase (FuT) (Wu *et al.*, 2010). La conformation de la structure glycanne prend place pendant cette étape et peut être réalisée selon 3 modèles, le modèle « *Wattle blossom* », le modèle « *Wattle blossom* » modifié et le modèle « *Twister hairy rope* » (Figure 11). Le modèle « *Wattle blossom* » possède des arabinogalactanes de forme globulaire comme chez les AGPs de carotte et peut être modifiée avec l'ajout des chaînes d'oligoarabinoside. Le modèle « *Twister hairy rope* » possède des chaînes d'arabinogalactanes

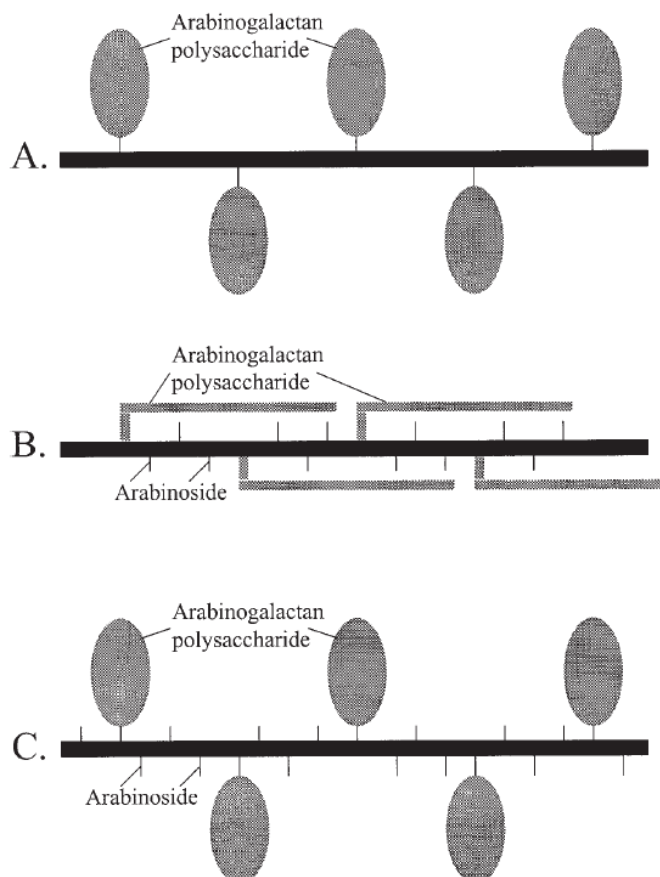


Figure 11: Les trois modèles proposés pour les AGPs. (A) le modèle « *wattle blossom* », (B) le modèle « *twisted hairy rope* » et (C) le modèle modifié de « *wattle blossom* » avec des chaînes d'oligoarabinosides (Showalter, 2001).

plus courtes et repliées de façon parallèle au corps protéique comme les AGPs de la gomme arabique (Fincher *et al.*, 1983; Qi *et al.*, 1991; Showalter, 2001).

La troisième étape se déroule au sein du réticulum endoplasmique et consiste en l'ajout de l'ancre GPI au niveau de l'extrémité C-terminale pour les AGPs classiques. L'ancre GPI permet aux AGPs de se lier à la membrane plasmique. Les AGPs qui possèdent une ancre GPI sont aussi appelées AGPs-GPIs. L'enzyme phospholipase C ou D est capable de couper l'ancre GPI et libérer les AGPs. Cette propriété laisse supposer que les AGPs jouent un rôle dans la signalisation (Schultz *et al.*, 1998; Nguema-Ona *et al.*, 2013).

3.2.3 La distribution des épitopes associés aux AGPs à l'échelle tissulaire

La présence des AGPs peut être localisée à l'échelle tissulaire et cellulaire grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques anti-AGPs et au β -glucosyl Yariv. Les approches immunocytologiques conjointement à la microscopie révèlent que les AGPs sont présentes dans la plupart des organes et tissus végétaux : les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs et les graines. Toutefois, des études récentes soulignent l'abondance des AGPs dans les tissus racinaires (Figure 12) (Showalter, 2001; Vicré *et al.*, 2005; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013; Koroney *et al.*, 2016).

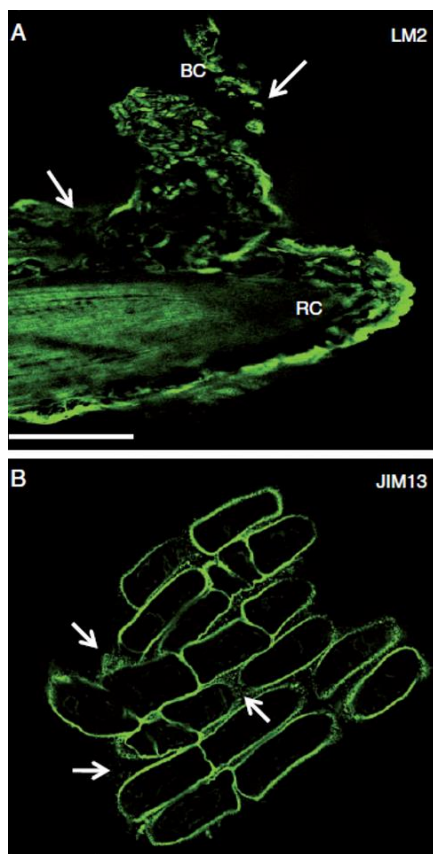


Figure 12 : Immunomarkage des AGPs au niveau de l'apex racinaire de *Solanum tuberosum*. (A) Immunomarkage par des anticorps LM2 (épitope contenant de GalA lié en β) et (B) par des anticorps JIM13 (épitopes contenant de GlcA, GalA et Rha). Le marquage (les flèches) est visible au niveau de la surface racinaire et les cellules bordantes. (RC) apex racinaire et (BC) cellules bordantes. La barre d'échelle représente 100 μ m pour A et 20 μ m pour B (Koroney *et al.*, 2016).

A l'échelle cellulaire, ces AGPs se trouvent localisées dans la zone pariétale adjacente à la membrane plasmique, la paroi et aussi dans les espaces intercellulaires (Knox *et al.*, 1991; Nothnagel, 1997). Ainsi, les AGPs sont en général largement distribuées dans les organes et les tissus, mais les membres d'une même famille d'AGPs peuvent montrer différents degrés de spécificité au niveau des organes, des tissus (Showalter, 2001). Par exemple, les épitopes reconnus par JIM13 ont été trouvés seulement dans les xylèmes et les cellules apparentées aux cellules bordantes de la racine d'*A. thaliana* (Dolan *et al.*, 1995; Vicré *et al.*, 2005). L'expression des AGPs est aussi régulée selon le stade de développement. L'expression des AGPs dans les tomates vertes (non mures) a été plus forte que dans les tomates rouges (mures). Au niveau de la tige, une plus forte expression des AGPs a été détectée dans les entre-nœuds plus jeunes (Li & Showalter, 1996).

3.2.4 Fonctions biologiques des AGPs

Les rôles des AGPs sont multiples et leur fonction est intimement liée à la grande diversité de leur partie glycanique, de leur corps protéique et de leur ancre GPI (Ellis *et al.*, 2010). L'identification de la fonction précise d'un type d'AGPs est rendue difficile pour de multiples raisons. La nature complexe des chaînes glycaniques rend difficile la caractérisation de la partie protéique, empêche l'isolation d'une AGP individuelle, et dans la majorité des cas, empêche leurs détections par des anticorps spécifiques du corps protéique. La nature complexe des glycosylations et le haut degré d'hydroxylation du corps protéique empêche l'expression correcte des protéines glycosylées recombinantes dans des microorganismes afin d'examiner leurs fonctions *in-vitro*. De plus, dans certains cas, la production des mutants ne donne pas de phénotypes (Seifert & Roberts, 2007; Coimbra *et al.*, 2009; Schaefer & Schaefer, 2010; Ellis *et al.*, 2010).

Malgré toutes ces limitations, plusieurs approches ont été développées pour démontrer le rôle des AGPs. Une approche consiste à utiliser le β -glucosyl Yariv (Serpe & Nothnagel, 1994, 1996; Gao & Showalter, 1999; Chapman *et al.*, 2000; Showalter, 2001; Guan & Nothnagel, 2004) ou bien les anticorps qui se lient spécifiquement aux AGPs, afin de perturber leurs fonctions (Knox *et al.*, 1989; Pennell & Roberts, 1990; Schindler *et al.*, 1995; Dolan *et al.*, 1995; Showalter, 2001). Une autre technique consiste à utiliser des approches génétiques pour analyser la fonction des gènes spécifiques des AGPs (van Hengel & Roberts,

2003; Gaspar *et al.*, 2004). Ces approches ont souligné la diversité des rôles des AGPs pour la plante (Seifert & Roberts, 2007). Les AGPs sont impliquées dans la croissance et le développement des plantes pendant l'embryogenèse (Van Hengel *et al.*, 2002), la croissance et le développement des racines (van Hengel & Roberts, 2003; Marzec *et al.*, 2015), les réponses hormonales (Park *et al.*, 2003), l'initiation de la gamétogenèse (Acosta-García & Vielle-Calzada, 2004), la croissance et l'orientation des tubes polliniques (Mollet *et al.*, 2002), la sécrétion (Xu *et al.*, 2008), la signalisation (Schultz *et al.*, 1998), l'expansion cellulaire (Lee *et al.*, 2005), la plasticité de la paroi cellulaire et la résistance au stress salin (Lampont *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2017), la mort cellulaire programmée (Chaves *et al.*, 2002) et la signalisation (Schultz *et al.*, 1998). Différents modes de signalisation ont été proposés pour les AGPs. En effet, les AGPs pourraient agir comme un signal soluble qui interagirait avec un récepteur. Le motif structural qui assure ce rôle est encore inconnu, mais différentes études ont suggéré que la signalisation peut être réalisée avec toute l'AGP ou bien avec des glycanes dérivés de l'AGP (van Hengel & Roberts, 2003; Seifert & Roberts, 2007; Driouich & Baskin, 2008). Un autre mode d'action est proposé pour les AGPs possédant une ancre GPI. Le clivage de l'ancre GPI par les enzymes phospholipases C ou D permet la libération de cette ancre, qui pourrait jouer un rôle dans la signalisation (Schultz *et al.*, 1998).

Des travaux soulignent l'importance des AGPs dans les interactions entre le système racinaire et les micro-organismes (Figure 13) (Vicré *et al.*, 2005; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Les premières études ont mentionné la présence des AGPs à l'interface entre les micro-organismes et la paroi cellulaire des plantes hôtes (Berry *et al.*, 2002; Gaspar *et al.*, 2004; Shailasree *et al.*, 2004; Vicré *et al.*, 2005; Schultz & Harrison, 2008; Tsyganova *et al.*, 2009). Par exemple, dans le cas de la symbiose entre *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. et *Frankia* souche Cpl1, tout au début de l'infection, les épitopes reconnus par l'anticorps JIM13 spécifiques des AGPs ont été trouvés en abondance à la frontière de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire au niveau de la zone d'interaction (Figure 14) (Berry *et al.*, 2002). Des AGPs chimériques nommées « *arabinogalactan protein extensins* » (AGPE) reconnue par les anticorps MAC265, ont été localisées au niveau de la zone d'interaction entre *Pisum sativum* L. et *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Figure 15) (Tsyganova *et al.*, 2009).

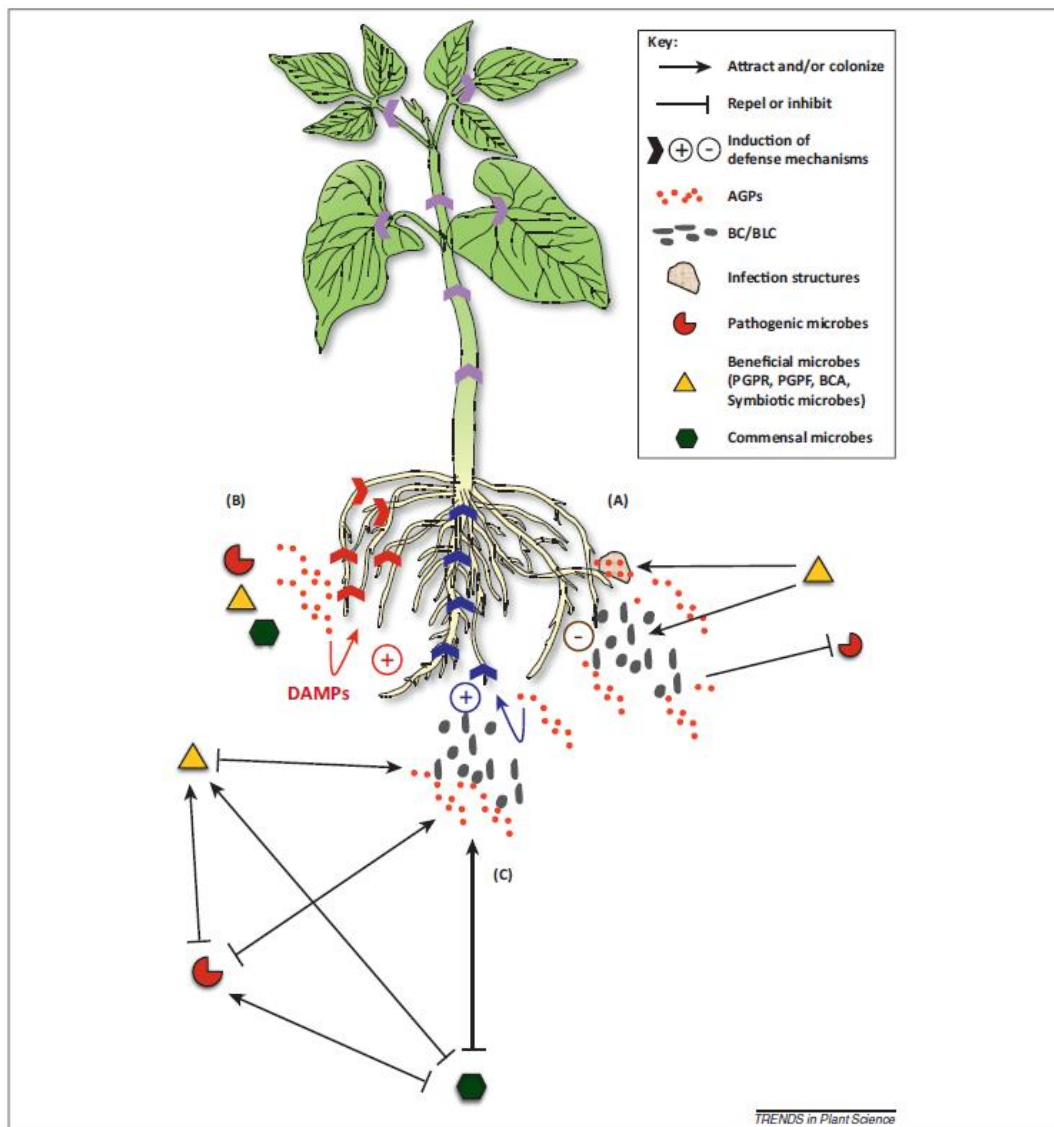


Figure 13 : Rôles possibles des AGPs dans l'interaction racines-microorganismes. (A) les AGPs attirent les microorganismes symbiotiques comme des bactéries et des champignons qui vont infecter les racines et développer des structures infectieuses. Les AGPs se trouvent à l'interface des cellules racinaires et des structures infectieuses pour contrôler la formation de ces structures et promouvoir l'adhérence et la progression des microorganismes dans les racines. Elles sont aussi capables de repousser ou d'inhiber le développement des pathogènes racinaires. (B) Les microorganismes du sol sont capables de dégrader les AGPs racinaires, et de libérer des oligosaccharides ou des glycopeptides comme des « damage associated molecular patterns (DAMPs) qui vont activer à leur tour les mécanismes de défense de la plante (flèches rouge). (C) Les AGPs secrétées peuvent favoriser la colonisation de la rhizosphère par des microorganismes bénéfiques qui sont capables d'activer la défense de la plante comme « induced systemic resistance (ISR) (flèches bleu) ou bien de jouer un rôle antagoniste contre les microorganismes pathogènes. Les flèches violettes indiquent une induction ou modulation possible du mécanisme de défense dans la partie aérienne de la plante. Cette induction est la conséquence du produit de la dégradation des AGPs (B) ou bien par des microorganismes bénéfiques (C). (-) indique la répression du système immunitaire de la plante (A) et (+) sont activation (B et C) (Nguema-Ona et al., 2013).

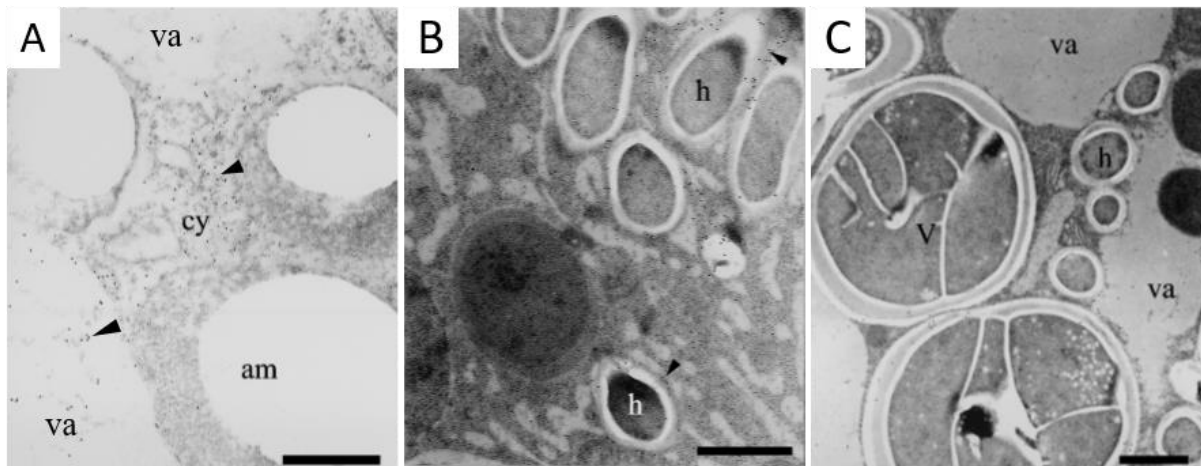


Figure 15 : Marquage des AGPS par JIM 13 au niveau des nodules racinaires dans le cas de symbiose entre et *Alnus glutinosa* et *Frankia* souche Cpl1. (A) Nodules racinaires non infectés. Le marquage (les flèches) est distribué dans le cytoplasme (cy) et la vacuole (v) et absent dans l'amyloplaste. (B) Nodules racinaires au début de l'infection. Le marquage se trouve autour du mycélium et pas de marquage dans le cytoplasme loin du mycélium de *Frankia* (h) de *Frankia*. (c) nodules racinaires matures avec des vésicules de *Frankia* (v). Le marquage est dispersé dans le cytoplasme et au niveau des vacuoles (Berry *et al.*, 2002).

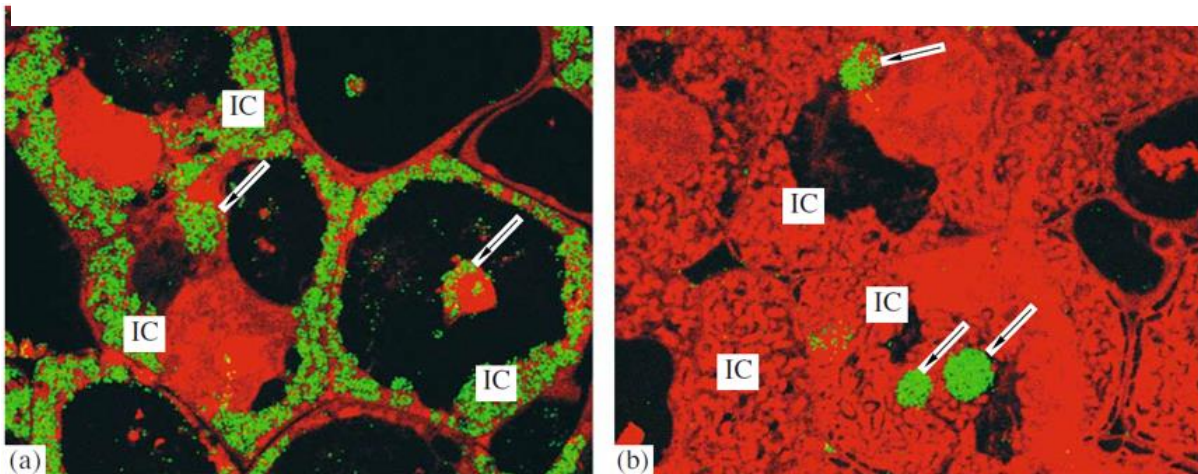


Figure 14 : AGPE a l'interface entre *Pisum sativum* et *R. leguminosarum*. (A) localisation de de *R. leguminosarum* a l'intérieur des cellules de *P. sativum*, suite à un marquage par l'anticorps MAC57 et (B) localisation des AGPE à l'intérieur des cellules de *P. sativum*, suite à un marquage par MAC265 (épitope inconnue). (IC) cellule infectée et les flèches indiquent les zones d'infection. Observation par microscope confocal Obj : $\times 40$.

Plus récemment, des études ont pu démontrer que ces AGPs avaient une fonction dans ces interactions (Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012). Les AGPs peuvent être impliquées à la fois dans l'attraction ou bien la répulsion des microbes du sol, la colonisation de la racine et le développement des structures infectieuses (Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Une fraction purifiée d'AGPs issues de l'apex racinaire et de cellules bordantes de pois a été capable d'attirer par chimiotactisme les zoospores de l'oomycète

Aphanomyces euteiches Drechsler, de les immobiliser en les enkystant, et d'inhiber la germination et la croissance des tubes germinatifs (Cannesan *et al.*, 2012). Ces résultats mettent en évidence pour la première fois le rôle important des AGPs dans l'interaction oomycète-racine et leur implication dans le contrôle de l'infection.

3.3 Métabolites secondaires

Les plantes ont développé un énorme arsenal de molécules chimiques de faible poids moléculaire, nommés métabolites secondaires (MS), capables de détecter des organismes invasifs et de les arrêter avant qu'ils n'induisent des dégâts importants (Freeman & Beattie, 2008). Il existe une très grande diversité de métabolites secondaires (Tableau 3) (Wink, 2010) et leur nombre est estimé à plus que 100 000 (Wink, 1988; Trethewey, 2004). Ces MS ont été isolés et leurs structures déterminées par spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire et par diffraction des rayons X (Eisenreich & Bacher, 2007; Marston, 2007; Wink,

Tableau 3 : Récapitulatif des métabolites secondaires identifiés chez les plantes supérieures. (Wink, 2010).

Type of secondary metabolite	Number ^a
Nitrogen-containing	
Alkaloids	21 000
Non-protein amino acids (NPAAs)	700
Amines	100
Cyanogenic glycosides	60
Glucosinolates	100
Alkamides	150
Lectins, peptides, polypeptides	2000
Without nitrogen	
Monoterpenes (C10) ^b	2500
Sesquiterpenes C15) ^b	5000
Diterpenes (C20) ^b	2500
Triterpenes, steroids, saponins (C30, C27) ^b	5000
Tetraterpenes (C40) ^b	500
Flavonoids, tannins	5000
Phenylpropanoids, lignin, coumarins, lignans	2000
Polyacetylenes, fatty acids, waxes	1500
Polyketides	750
Carbohydrates, organic acids	200

2010). Le nombre de molécules différentes pouvant être produit au sein d'une même espèce a été estimé entre 2500 et 25000. La majorité de ces métabolites se trouve en très faible quantité, et sont souvent négligés dans les analyses phytochimiques (Figure 16) (Trethewey, 2004). Les MS peuvent être divisés en quatre groupes : (1) terpènes, (2) composés phénoliques, (3) métabolites secondaires contenant du soufre et (4) métabolites secondaires

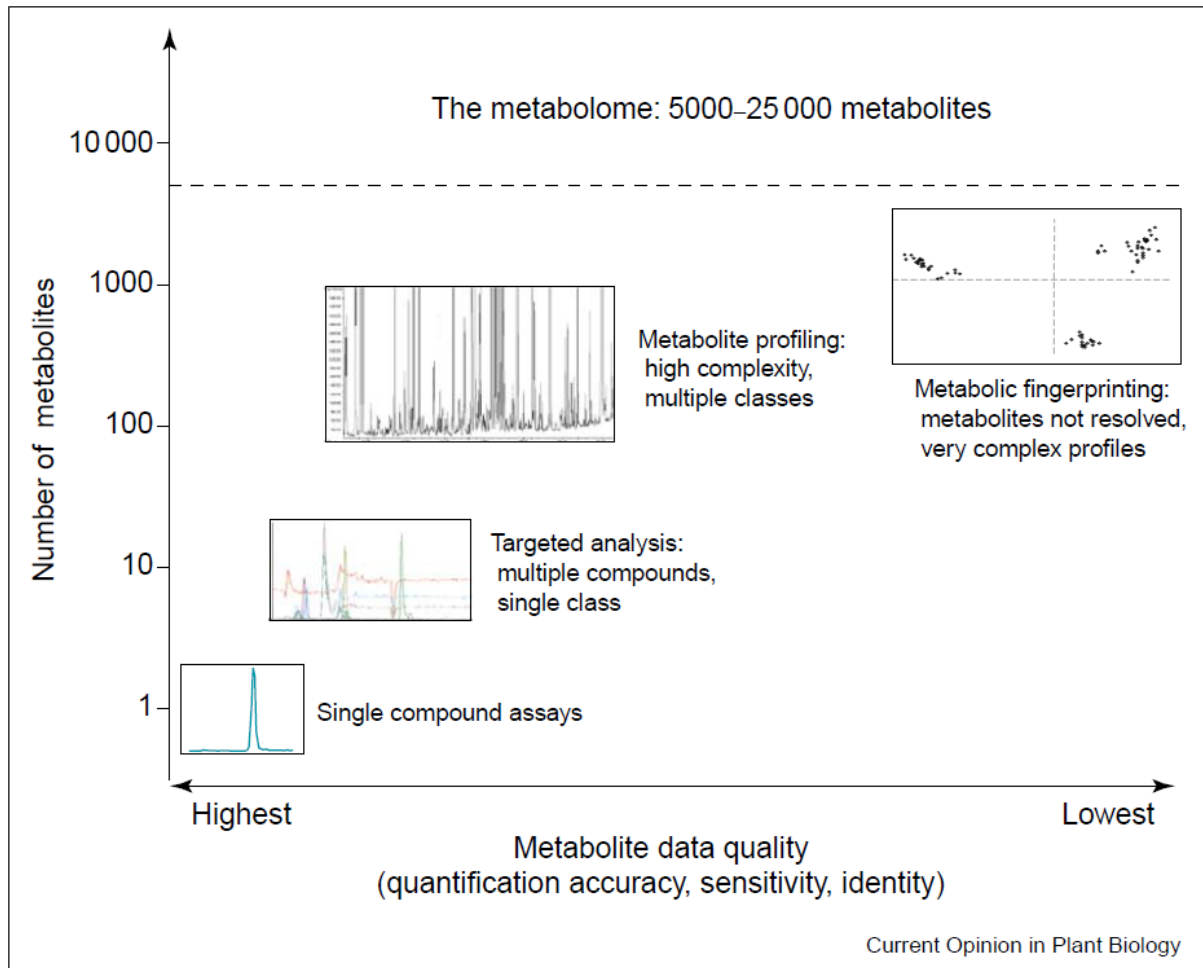


Figure 16 : Représentation graphique des différentes approches d'analyse des MS, et les compromis entre quantité et qualité. L'approche ciblant un composé est la plus sensible et précise. L'approche ciblant une classe des composés permet d'avoir des données de bonne qualité. L'approche de profilage large des métabolites secondaires permet d'analyser une large gamme de classes des MS, mais la qualité des données est plus faible. L'approche la plus générale est le « metabolic finger-printing », cette approche n'est pas très fiable (Trethewey, 2004).

contenant de l'azote (Mazid *et al.*, 2011). Ces différents métabolites secondaires jouent un rôle important dans la défense des plantes, notamment contre les herbivores (Ballhorn *et al.*, 2009), les micro-organismes (González-Coloma *et al.*, 2011), en cas d'activités allélopathiques (Nebo *et al.*, 2014), dans l'attraction des organismes bénéfiques (Sreevidya *et al.*, 2006) et

dans la protection contre les UV (Liu *et al.*, 2017) (Figure 17). Certaines fonctions pour chacun des groupes sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous.

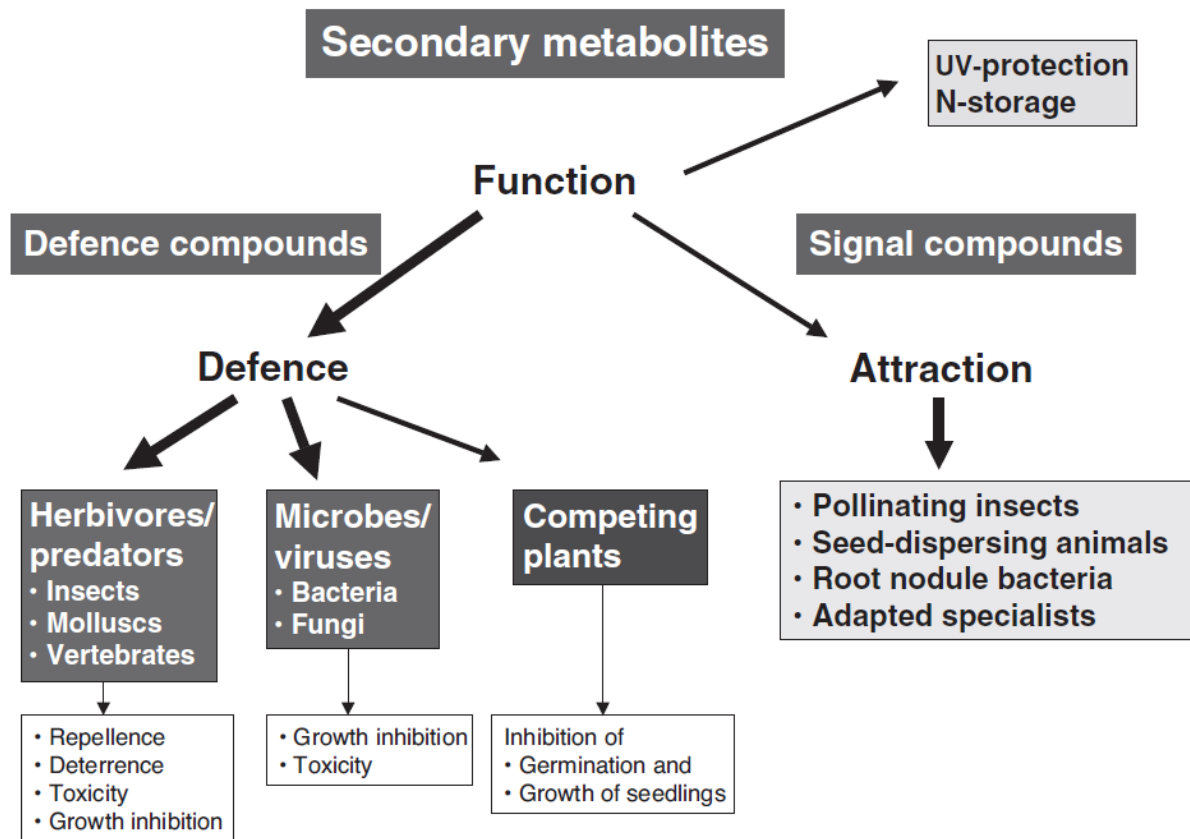


Figure 17 Fonctions écologiques et physiologiques des métabolites secondaires (Wink, 2010).

Tableau 4 : les différents groupes et sous-groupes des métabolites secondaires et leurs fonctions biologiques. Adapté de Mazid *et al.*, (2011)

Les groupes principaux	Les sous-groupes	Fonctions biologiques démontrées
Terpène	Monoterpène	Insecticide (Turlings <i>et al.</i> , 1995)
	Sesquiterpène	Répulsion des insectes et des herbivores (Bleeker <i>et al.</i> , 2012; Alarcon <i>et al.</i> , 2013), protection contre les UV-B (Liu <i>et al.</i> , 2017)
	Diterpène	Insecticide (Vaughan <i>et al.</i> , 2013; Zerbe & Bohlmann, 2015), antifongique (Bultreys <i>et al.</i> , 2009)
	Triterpène	Antibactérien et antifongique (González-Coloma <i>et al.</i> , 2011)
	Polyterpène	Guérison des dommages et protection contre les herbivores (Mazid <i>et al.</i> , 2011)
Composés phénoliques	Coumarine	Antibactérien et antifongique (Brooker <i>et al.</i> , 2008)
	Furano-coumarine	Antifongique (Ali <i>et al.</i> , 2008)

	Lignine	Résistance physique contre herbivore, insecte et micro-organisme (Mazid <i>et al.</i> , 2011)
	Flavonoïdes	Protection contre les UV-B (Lake <i>et al.</i> , 2009)
	Isoflavonoïde	Favorisation de la symbiose (Sreevidya <i>et al.</i> , 2006), anti-oxydant (Posmyk <i>et al.</i> , 2009)
	Tannins	Répulsion des herbivores (Oates <i>et al.</i> , 1980) et antifongique (Mayer, 1986)
Métabolites secondaires contenant du soufre	Glutathion (GSH)	Détoxification des métaux lourds (Choi <i>et al.</i> , 2001), induction de la réponse immunitaire (Edwards <i>et al.</i> , 1991)
	Glucosinolates (GSL)	Antifongique, antibactériens, répulsif, et active la réponse immunitaire des plantes (Radojic Redovnikovic <i>et al.</i> , 2008; Singh, 2017)
	Phytoalexines	Antifongique (Wu & VanEtten, 2004; Cannesan <i>et al.</i> , 2011), la réponse d'hypersensibilité (Hammond-Kosack & Jones, 1996)
	Défensines, thionines et lectines	Antifongique et antibactérien
Métabolites secondaires contenant de l'azote	Alcaloïdes	Défense contre les herbivores, insecticide (Duffey & Stout, 1996), activités allélopathiques (Nebo <i>et al.</i> , 2014) antifongique (Zhao <i>et al.</i> , 1998)
	Glycosides cyanogéniques	Activation de la réponse immunitaire de la plante (Rajniak <i>et al.</i> , 2015), défense contre les herbivores (Ballhorn <i>et al.</i> , 2009)
	Acide aminé non protéinogène	Activation de la défense des plante (Ton <i>et al.</i> , 2005)

Les plantes appartenant à la famille des Rutacées (comme *C. ternata*) sont connues pour accumuler des métabolites secondaires contenant de l'azote tels que les alcaloïdes (Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016).

3.3.1 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont largement répandus chez les plantes. En exemple, citons le cas des angiospermes, dont plus que 20 % des espèces produisent des alcaloïdes (Fattorusso & Tagliatela-Scafati, 2008). Le premier alcaloïde qui a été extrait en 1805 par Friedrich Sertürner est la morphine (Aniszewski, 2015). Plusieurs autres molécules très connues appartiennent également à la classe des alcaloïdes comme la codéine, la cocaïne, la caféine et la nicotine. La majorité des alcaloïdes sont des dérivés des acides aminés comme l'acide aspartique, l'ornithine, la lysine, la tyrosine, la phenylalanine, l'histidine et le tryptophane (Mazid *et al.*, 2011; Aniszewski, 2015). Il existe différentes classifications des alcaloïdes : (1)

une classification biologique, (2) une classification liée à leur relation à la chimie et à la technologie, (3) une classification selon leurs structures chimiques et (4) une classification selon leurs voies de biosynthèse. La classification selon les voies de biosynthèse divise les alcaloïdes en trois types : (I) les alcaloïdes vrais, (II) les proto-alcaloïdes et (III) les pseudo-alcaloïdes. Ces types présentent des différences dans leurs origines et leurs structures chimiques (Tableau 5) (Aniszewski, 2015).

Tableau 5 : Les différents types des alcaloïdes présentant des différences d'origine et de structure

	Dérivé d'acide aminé	Hétérocycle azoté
Alcaloïdes vrais	Oui	Oui
Proto-alcaloïdes	Oui	Non
Pseudo-alcaloïdes	Non	Oui

Les alcaloïdes vrais constituent une large famille de métabolites secondaires caractérisée par des composés hétérocycliques azotés ayant une activité physiologique souvent toxique (activités antibactériennes, antifongiques et antivirales) (Fattorusso & Taglialatela-Scafati, 2008; Aniszewski, 2015). Grâce à leurs activités biologiques, ces MS trouvent des applications dans le domaine pharmaceutique (de Carvalho *et al.*, 2016) et phytosanitaire (Harkrader & Meyer, 2001). Ces alcaloïdes vrais contiennent des composés comme les pyrrolines, les pyrrolizidines, les pyridines et les quinolines (Aniszewski, 2015). La famille des Rutacées (dont fait partie le genre *Choisya*) est réputée pour accumuler des dérivés de la quinoline tels que les alcaloïdes furoquinoliques (Boyd *et al.*, 2007; Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016).

3.3.2 Les alcaloïdes furoquinoliques - les métabolites secondaires majoritaires chez *C. ternata*

La quinoline est un composé chimique formé d'un hétérocycle azoté et d'un benzène (O'Donnell *et al.*, 2006). Des études phytochimiques au niveau des feuilles ont montré que *C. ternata* est riche en alcaloïdes furoquinoliques, composés de l'association d'une quinoline et d'un furane (Figure 18) (Montagu-Bourin *et al.*, 1980; Boyd *et al.*, 2002, 2007; Radulović *et al.*, 2011; de Carvalho *et al.*, 2016; Leitão *et al.*, 2017).

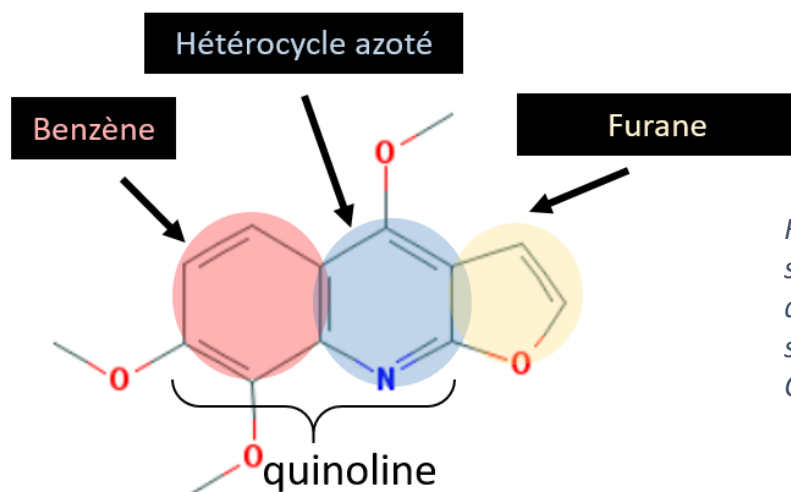


Figure 19: Exemple de la structure chimique d'un alcaloïde furoquinoliques, le skimmianine. (The PubChem Compound Database).

Sept principaux alcaloïdes furoquinoliques ont été découverts dans les feuilles de *Choisya* : (1) skimmianine, (2) kokusaginine, (3) 7-isopentenylxy- γ -fagarine, (4) evoxine, (5) choisynie, (6) platydesminium methosalt et (7) balfourodinium methosalt (Johns *et al.*, 1967; Grundon *et al.*, 1974; Boyd *et al.*, 2002). Boyd *et al.*, (2007) ont isolé à partir des feuilles de *C. ternata*, dix-sept quinolines alcaloïdes incluant plusieurs niveaux d'oxydation dans leur biosynthèse. Les structures des 7 alcaloïdes furoquinoliques sont présentées dans la (Figure 19).

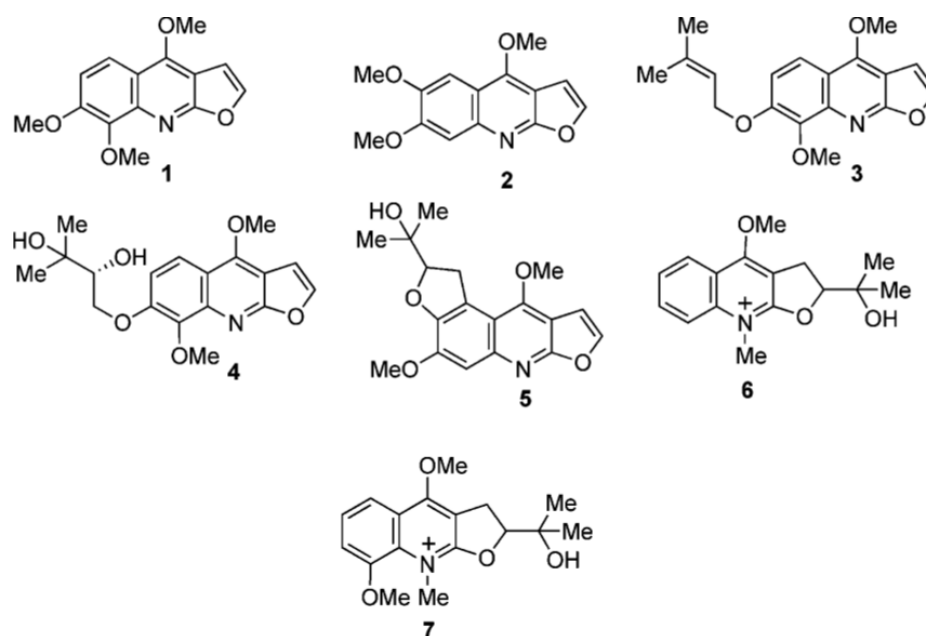


Figure 18 : Les structures des alcaloïdes furoquinoliques trouvées dans les feuilles de *C. ternata*. (1) skimmianine, (2) kokusaginine, (3) isopentenylxy- γ -fagarine, (4) evoxine, (5) choisynie, (6) platydesminium methosalt and (7) balfourodinium methosalt (Boyd *et al.*, 2007).

Les alcaloïdes furoquinoliques possèdent des activités biologiques, ce qui les rend très attractifs dans le domaine pharmacologique et phytosanitaire (Tableau 4) (Radulović *et al.*, 2011; Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016; de Carvalho *et al.*, 2016).

Tableau 6 : Les activités de certains alcaloïdes furoquinoliques extraits à partir des plantes appartenant à la famille de Rutaceae (Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016).

Substances	Source	Activité
Skimmianine	<i>Galipea longiflora</i>	Leishmaniose/
Kokusaginine	<i>Galipea longiflora</i>	Anticholinesteras
Maculine	<i>Esenbeckia leiocarpia</i> & <i>Teclea afzelii</i>	Antiplasmodique
Tecleaverdoornine	<i>Teclea verdoorniana</i>	
γ-Fagarine	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	
Dictamnine	<i>Esenbeckia yaaxhokob</i>	
Flindersiamine	<i>Esenbeckia yaaxhokob</i>	Antibactérien
Pteleatine	<i>Ptelea trifoliata</i>	
Kolbisine	<i>Teclea afzelii</i>	
Dictamnine	<i>Esenbeckia febrifuga</i>	Antifongique
Haplopine	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	
Kolbisine	<i>Teclea afzelii</i>	

Dans le domaine pharmaceutique, plusieurs études ont montré l'importance des alcaloïdes furoquinoliques ainsi que leurs activités antiseptique, antivirale, antibactérienne et antifongique. De plus, des alcaloïdes furoquinoliques extraits à partir des *C. ternata* ont montré des activités antinociceptives (antidouleurs) (Radulović *et al.*, 2011; de Carvalho *et al.*, 2016). Six alcaloïdes furoquinoliques extraits à partir des feuilles de *Ruta angustifolia* Pers. (chalepin, scopoletin, γ-fagarine, kokusaginine, arborinine, and pseudane IX) ont montré des activités antivirales contre l'hépatite C (HCV) dans des cultures cellulaires. De plus, Chalepin et pseudane XI ont montré une plus forte activité contre HCV (concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) 1,7 ± 0,5 et 1,4 ± 0,2 µg/ml) en comparaison avec ribavirin (CI₅₀ 2,8 ± 0,4 µg/ml), le traitement classique utilisé contre ce virus. Ces 2 composés ont été capables de réduire la réplication de l'ARN et la production de protéines virales (Wahyuni *et al.*, 2014). Les 3 alcaloïdes furoquinoliques (skimmianine, γ-fagarine et isohaplopine) extraits à partir de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. ont montré des activités antibactériennes contre plusieurs

bactéries gram positif comme *Bacillus subtilis* et négatif comme *Escherichia coli* (Tavares *et al.*, 2014).

Les alcaloïdes furoquinoliques sont aussi très attractifs pour le domaine phytosanitaire. Ces molécules sont utilisées comme des herbicides (Nebo *et al.*, 2014) et des bactéricides/fongicides (Harkrader & Meyer, 2001). Par exemple, graveoline est un alcaloïde extrait à partir de la partie aérienne et souterraine de *Ruta graveolens* L.. Ce composé a montré des activités phytotoxiques similaires ou meilleures que celles obtenues avec l'herbicide commercial Logran® (Nebo *et al.*, 2014). L'alcaloïde furoquinolique dictamnine extrait à partir des racines de *Dictamnus dasycarpus* Turcz a montré une activité antifongique contre le pathogène *Cladosporium cucumerinum* (Zhao *et al.*, 1998). Le nouvel alcaloïde furoquinolique 5-(1,1-diméthylallyl)-8-hydroxyfuro[2-3-b]quinoline extrait à partir des feuilles de *Ruta chalepensis* L., a montré des activités antifongiques contre *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* et *R. solani* par des tests *in-vitro*. Ce composé a été capable de réduire la sporulation, la germination des spores et la croissance du mycélium de ces pathogènes (Emam *et al.*, 2010).

4. Moyens de lutte contre les pathogènes telluriques, cas particulier de *Phytophthora*

La protection préventive est le meilleur moyen pour contrôler les maladies causées par les pathogènes telluriques dont font partie les oomycètes du genre *Phytophthora*. Ces méthodes de protection consistent à assurer des conditions défavorables pour le développement de *Phytophthora*. Elles regroupent la sélection de plantes saines et/ou résistantes, la stérilisation et la désinfection, le drainage et la gestion de l'irrigation (Matheron & Matejka, 1990; Drenth & Guest, 2004; Schena *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2016; Chaudhary *et al.*, 2016). L'ensemble de ces éléments ayant vocation à limiter le recours aux phytosanitaires de protection des cultures qui ne devraient être utilisés qu'en dernier recours (Drenth & Guest, 2004; Pscheidt, 2015; Graham *et al.*, 2016). L'émergence de l'utilisation d'agents de contrôle biologique est aussi une voie pleine de promesses dans le domaine du contrôle des pathogènes du sol, mais qui reste peu explorée dans la lutte contre *Phytophthora* (Drenth & Guest, 2004; Souto *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005; Lioussanne *et al.*, 2008; Naher *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

4.1 Pratiques culturales

Que ce soit dans le domaine de l'agriculture ou de l'horticulture, de nombreuses opérations culturales sont mises en place pour permettre une production optimale. Ces opérations résultent d'une réflexion approfondie qui intègre notamment la nature du sol ou du substrat. Le choix des interventions culturales (arrosage), ou des intrants (raisonnement de la nutrition et la protection de la culture), sont ainsi apportés afin d'améliorer le rendement de la culture.

4.1.1 Les fertilisants

Le rôle des fertilisants dans le contrôle de *Phytophthora* n'est pas bien établi. Des études montrent que l'utilisation des fertilisants améliore le statut nutritionnel de la plante et par conséquent sa capacité à résister contre *Phytophthora* (Drenth & Guest, 2004; Spann & Schumann, 2013). Messenger *et al.*, (2000) ont montré que le calcium est capable de réduire la taille des sporanges et la motilité des zoospores. Par ailleurs, d'autres études montrent que l'utilisation des fertilisants favorise l'infection des plantes (Drenth & Guest, 2004; Spann & Schumann, 2013). Par exemple, l'utilisation du nitrate d'ammonium a augmenté la sévérité de la maladie du soja provoquée par *Phytophthora megasperma* (Dirks *et al.*, 1980). Effectivement, une alimentation azotée trop riche est favorable à l'expression des maladies. Par exemple, la pénétration du pathogène dans les tissus est favorisée de par l'allongement des cellules possédant une paroi plus fine.

4.1.2 Le drainage et les techniques d'irrigation

Les zoospores, qui constituent les agents infectieux majoritaires de *Phytophthora*, ont particulièrement besoin d'eau pour leur reproduction, leur libération et leur motilité (Chaudhary *et al.*, 2016). Assurer un bon drainage est important pour réduire les maladies provoquées par *Phytophthora* (Drenth & Guest, 2004; DeMoranville *et al.*, 2016; Graham *et al.*, 2016). Au champ, des drainages horizontaux et verticaux sont nécessaires afin d'éliminer l'excès d'eau (Drenth & Guest, 2004). Dans le cas de la production en pot, des substrats capables d'assurer un bon drainage sont utilisés. Ces substrats contiennent du bois ou de l'écorce compostée. L'écorce compostée permet d'augmenter la porosité et le drainage et d'éviter la présence d'eau stagnante dans les pots (Pscheidt, 2015). Il existe de nombreux

substrats qui ont des compositions très variables. Le choix de substrat se fait en fonction de la culture choisie et selon les conditions et méthodes de production du professionnel. Les producteurs de *Choisya* utilisent un substrat contenant de 15 à 50 % d'écorces ou fibres de bois (Talbot & Wedgwood, 2009).

Par ailleurs, la gestion de l'irrigation est essentielle dans le contrôle de *Phytophthora*. Cela implique une gestion très précise de la quantité d'eau apportée, ainsi que des durées et fréquences d'arrosages (Hoitink *et al.*, 2003; Drenth & Guest, 2004; Pscheidt, 2015). Dans les cas où la seule source d'eau est l'irrigation, ce qui est le cas des plantes en serres, plusieurs leviers existent afin d'éviter un sur-arrosage : arrosages moins fréquents, durée d'arrosage plus courte, utilisation d'émetteur d'irrigation, d'embouts de pulvérisations adaptés ou encore de sondes d'irrigation programmables. Selon les besoins des plantes en eau, les producteurs peuvent séparer les plantes qui nécessitent une grande quantité d'eau, de celles qui n'en n'ont pas besoin. Cette séparation permet d'éviter un sur-arrosage des plantes qui nécessitent des quantités d'eau moins importantes (Hoitink *et al.*, 2003; Drenth & Guest, 2004; Pscheidt, 2015; DeMoranville *et al.*, 2016). D'autres moyens existent pour éviter le sur-arrosage, ils consistent à conduire l'eau loin des racines, en soulevant les pots ou en utilisant un sol ou substrat très poreux permettant un bon drainage afin d'éviter la stagnation de l'eau (Drenth & Guest, 2004; Pscheidt, 2015).

Il est par ailleurs indispensable de veiller au bon état sanitaire du système d'irrigation et de l'eau, en particulier dans des systèmes d'irrigation fermés.

4.1.3 Lutte chimique

En horticulture, pour limiter le développement de pathogènes telluriques comme *Phytophthora*, la lutte chimique commence dès l'étape de préparation de la culture. En effet, il convient de s'assurer de la qualité sanitaire des outils, de l'eau, du sol et/ou des substrats avant de réaliser la plantation. Ainsi, deux démarches utilisant des produits chimiques sont mises en œuvre : (1) la désinfection des équipements, de l'eau et du sol et (2) la protection des tissus des plantes ou l'inhibition du développement du pathogène dans les tissus végétaux (Pscheidt, 2015).

4.1.3.A La désinfection pré-culture

Différents types de désinfectants à base de peroxyde d'hydrogène, d'ammonium quaternaire et d'hypochlorite de sodium peuvent être utilisés pour assurer la désinfection des équipements de production. Cette étape est généralement très efficace et permet de limiter considérablement le développement de la maladie. Les résultats semblent directement liés à la durée des traitements désinfectants. Les désinfectants dirigés contre *Phytophthora* ont également des conséquences sur le développement des organismes non cibles qu'ils soient pathogènes ou non. Néanmoins, l'effet de ces traitements est transitoire et ne peut suffire sur la totalité de la culture. Des exemples de ces produits et de leurs modes d'applications sont présentés dans le Tableau 7 (Pscheidt, 2015; Parke, 2015; Govers *et al.*, 2017).

Tableau 7 : Les désinfectants utilisés contre *Phytophthora* en pré-culture (Pscheidt, 2015)

Produit	Mode d'application
Sulfate de cuivre	= Biocides > Eau d'arrosage
Gaz chloré	
Hypochlorite de sodium	
Ozone	
Bromure de méthyle	= Produits phytosanitaires > Sol
Metham-sodium	
Dazomet	

4.1.3.B Les produits chimiques utilisés dans la protection des plantes

Trois groupes de phytosanitaires, capables de pénétrer et se diffuser dans les tissus de la plante, sont utilisés contre *Phytophthora*. Ces 3 groupes sont « *quinone outside inhibitor* » (QoI), phosphonate et phénylamide. Certains de ces produits se diffusent uniquement des racines vers les feuilles, tandis que d'autres se déplacent dans les 2 sens. Ces produits chimiques sont utilisés pour traiter les feuilles (par pulvérisation foliaire), les graines (contre la fonte des semis) ou encore le sol (contre la pourriture racinaire) (Hirooka & Ishii, 2013; Pscheidt, 2015).

Les QoI sont des fongicides systémiques qui agissent contre plusieurs champignons et oomycètes, dont *Phytophthora*. Ils sont utilisés pour contrôler les infections foliaires. Les

mouvements de ce type de fongicides à l'intérieur des tissus des plantes sont limités aux feuilles et aux tiges (Mitani *et al.*, 1998; Hirooka & Ishii, 2013; Pscheidt, 2015).

Le groupe des phosphonates tels que fosetyl-Al et l'acide phosphoreux diffusent dans les deux sens à l'intérieur de la plante. Ces produits sont absorbés par les racines, tiges et feuilles et transportés dans les différents tissus. Une application foliaire ou racinaire peut contrôler la pourriture racinaire causée par *Phytophthora*. Une application foliaire est préférée, puisque ces produits peuvent être rapidement dégradés par les microorganismes du sol (Farih *et al.*, 1981; Afek & Sztejnberg, 1989; Hirooka & Ishii, 2013; Pscheidt, 2015).

Le groupe de phénylamide inclut plusieurs produits tels que le métalaxyl, l'oxadixyl et le méfénoxam (Hu *et al.*, 2008). Ces produits qui diffusent de la racine vers les feuilles peuvent être incorporés dans le sol pour contrôler la pourriture racinaire, ou appliqués au niveau des feuilles pour contrôler des pathogènes foliaires. Ce groupe de produits chimiques est efficace contre les oomycètes tels que *Phytophthora* et *Pythium*. Il inhibe en effet la formation des sporanges et la croissance du mycélium (Staub & Young, 1980; Farih *et al.*, 1981; Davidse *et al.*, 1983; Müller & Gisi, 2011; Hirooka & Ishii, 2013; Pscheidt, 2015).

Les deux groupes phosphonate et phénylamide, par leur mode d'action, peuvent avoir un effet transitoire dans le contrôle de *Phytophthora*. En effet, ces produits ne tuent pas l'oomycète mais ralentissent seulement son développement en empêchant sa croissance dans les tissus de la plante. Dans le cas où la plante est déjà infectée, un retard dans l'apparition des symptômes est observé. Cependant, une fois le produit phytosanitaire dégradé, *Phytophthora* reprendra son développement à l'intérieur de la plante (Staub & Young, 1980; Pscheidt, 2015).

Les produits phytosanitaires les plus utilisés dans la production de *C. ternata* en Angleterre et en France sont Aliette 80WG et Subdue. Aliette 80WG, composé de fosetyl-Al, appartient au groupe de phosphonate ; Subdue contient du métalaxyl et appartient au groupe de phénylamide (Talbot & Wedgwood, 2009; communication interne ASTREDHOR). Le développement de résistance du pathogène *Phytophthora* à ces produits chimiques entraîne une diminution de l'efficacité des traitements (Davidse *et al.*, 1981; Parra & Ristaino, 2001; Keinath, 2007; Hu *et al.*, 2008; Dunn *et al.*, 2010; Larousse & Galiana, 2017). Des *P. capsici* isolés de la région « Capital District » et « Long Island » aux Etats-Unis ont montré une

résistance au méfénoxam (isomère de métalaxyl) (Dunn *et al.*, 2010). Huit *P. capsici* isolés en Caroline du Sud (USA) ont également montré une résistance au méfénoxam. En revanche, des souches sensibles au méfénoxam ont été trouvées dans des sols n'ayant jamais reçu de traitement avec ce produit (Keinath, 2007). Une autre étude montre que *P. capsici* est résistant contre le méfénoxam et le métalaxyl (Parra & Ristaino, 2001). A partir de 95 isolats de *P. parasitica* isolés dans des pépinières à Virginia (USA), 25 isolats étaient résistants au méfénoxam (Hu *et al.*, 2008). La résistance développée contre le méfénoxam ou le métalaxyl est due à leur mode d'action. Le méfénoxam et le métalaxyl contrôle les pathogènes par une inhibition sélective de la synthèse des ARN ribosomiaux en affectant les ARN polymérases (Davidse *et al.*, 1983; Hu *et al.*, 2008).

La dangerosité de ces molécules pour la santé humaine et pour l'environnement couplée au développement de résistances développées par *Phytophthora*, augmentent la nécessité de développer des solutions alternatives permettant de contrôler les oomycètes de ce genre (Gullino & Kuijpers, 1994).

4.2 Sélection de plantes saines et/ou résistantes

La sélection des plantes saines avant culture est importante dans beaucoup de système de production pour éviter une grosse perte de plantes causée par *Phytophthora*. Chez les arbres, des porte-greffes plus résistants à l'oomycète sont développés afin de limiter les dégâts. Par exemple, l'utilisation des porte-greffes d'agrumes, d'avocatier ou encore de pommier ont montré une augmentation de la résistance à respectivement *P. parasitica*, *P. cinnamomi* et *P. cactorum* (Kellam & Coffey, 1985 ; Matheron *et al.*, 1998 ; Carisse & Khanizadeh, 2006). Par ailleurs, des cultivars résistants à *Phytophthora* peuvent aussi être développés pour réduire les dégâts de ce pathogène. En effet, des cultivars de *Rhododendron* ont montré une résistance à *P. cinnamomi* (Krebs & Wilson, 2002) et des cultivars de soja, une résistance à *P. sojae* (Dorrance & Schmitthenner, 2000). Dans le cas de *C. ternata*, moins de perte causée par *Phytophthora* ont été observées avec le cultivar Aztec pearl en comparaison avec le cultivar Goldfinger (communication interne avec André Briant Jeunes Plants).

La combinaison de la sélection de plantes résistantes à l'utilisation de sol, substrat de rempotage et de pots propres et/ou stériles constitue un levier important pour minimiser les risques d'infection par *Phytophthora*. L'émergence d'outils moléculaires capables de

quantifier les pathogènes, dont *Phytophthora* dans le sol et/ou les plantes (Hayden *et al.*, 2004; Ippolito *et al.*, 2004; Schena *et al.*, 2006) constitue une perspective intéressante en matière de lutte préventive contre les pathogènes. Il pourrait en effet être envisageable d'utiliser ces outils pour choisir les substrats et/ou sols les plus sains et les plantes non contaminées avant la mise en place des cultures.

4.3 Contrôle biologique

4.3.1 Définition

Il existe plusieurs définitions du biocontrôle, qui ne sont pas toujours convergentes, ce qui peut engendrer des confusions. Le contrôle biologique ou biocontrôle fait partie des stratégies de lutte alternative à l'utilisation de produits phytosanitaires. Le principe global est de privilégier les mécanismes naturels d'équilibre des populations d'agresseurs plutôt que leur éradication (International Biocontrol Manufacturers Association France, (IBMA)). En se basant sur cette définition les produits de biocontrôle ont été classés en quatre familles : macro-organismes, micro-organismes, médiateurs chimiques et substances naturelles. Cependant, cette définition est considérée comme trop large par certains scientifiques. En effet, ces derniers proposent une définition plus restreinte et considèrent le biocontrôle comme l'utilisation d'organismes vivants pour protéger les plantes. Aussi, ils classent les produits d'origine biologique en biopesticides ou en biofertilisants (Pal & McSpadden Gardener, 2006; Nega, 2014). Cette définition, bien que restreinte, considère l'utilisation des cultivars des plantes résistantes comme du biocontrôle. Enfin, une autre définition décrit le biocontrôle comme l'utilisation des organismes vivants, appelés agents de contrôle biologique « *biological control agent* (BCA) », déjà présents ou introduits, pour contrôler les pathogènes des plantes (Pal & McSpadden Gardener, 2006; Nega, 2014).

Dans le cadre de mon travail de thèse, l'approche de biocontrôle qui a été déployée a été l'introduction de micro-organismes pour limiter le développement de *P. parasitica* dans le substrat et protéger *C. ternata* contre cet oomycète.

Aujourd'hui, il existe plusieurs micro-organismes commercialisés et homologués comme des produits phytosanitaires et des matières fertilisantes de support de culture (Tableau 8). Certains producteurs de *C. ternata* ajoutent un agent de contrôle biologique,

Trichoderma (DCM bio-Fungus et Trianum G), pour assurer une meilleure croissance et pour minimiser la perte causée par les pathogènes. Le domaine du biocontrôle étant en plein essor actuellement, il est probable que de nouvelles solutions alternatives efficaces pour le pathosystème *Choisya-Phytophthora* puissent émerger (Talbot & Wedgwood, 2009).

Tableau 8 : Micro-organismes commercialisés comme des BCA. Produits phytosanitaires (PP) et matières fertilisantes de support de culture (MFSC). (H) horticulture, (P) pépinière, (M) maraîchage, (GC) grandes cultures et (V) vigne (Communication interne - ASTREDHOR SEINE-Manche).

Fournisseur	Nom commercial	Micro-organisme	Homologation	Culture
ANDERMATT BIOCONTROL	RHIZOVITAL 42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	MFSC	M
AGRAUXINE	ESQUIVE WP TRI-SOIL	<i>Trichoderma atroviridae</i> souche I-1237	PP	V, H et P
	Gamme SOLRIZE	<i>Glomus</i> spp.	MFSC	H, P, M et V
BIOVITIS	CERES	<i>Trichoderma harzianum</i> souche B-97 et <i>Pseudomonas fluorescens</i> souche B-177	MFSC	GC
IFTECH	Gamme MYCOR, OZOR et PRALOR	<i>Glomus intraradices</i>	MFSC	H, P et M
ITALPOLLINA SPA	Gamme CONDOR, TIFI	<i>Glomus intraradices</i> et <i>Trichoderma atroviride</i>	MFSC	H, P, M, V et GC
KOPPERT	TRIANUM-P ou TRIAGRO WG	<i>Trichoderma harzianum</i> souche T22	PP	H et M
LALLEMAND PLANT CARE	MYC4000	<i>Glomus intraradices</i>	MFSC	H, P, M et V
	PRESTOP	<i>Gliocladium catenulatum</i> souche J1446	PP	H, P et M
	RHIZOCELL C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	MFSC	H, P et M
VERDERA	MYCOSTOP	<i>Streptomyces</i> spp.	PP	H

4.3.2 Les mécanismes de contrôle biologique

Le principe de contrôle biologique repose sur plusieurs types d'interactions biotiques entre les organismes, visant des effets antagonistes au pathogène. Les effets antagonistes sont divisés en 3 groupes : (1) antagonisme direct, (2) antagonisme direct et indirect et (3) antagonisme indirect. Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés pour assurer ces effets antagonistes (Tableau 9) (Nega, 2014).

Tableau 9 : Types et mécanismes d'antagonismes assurant le contrôle biologique (Pal & McSpadden Gardener, 2006; Nega, 2014).

Type	Mécanisme
Antagonisme direct	Parasitisme/prédation
Antagonisme direct et indirect	Antibiotiques
	Enzymes
Antagonisme Indirect	Compétition
	Induction de la résistance de l'hôte

L'antagonisme direct est la capacité des BCA à tuer ou inhiber le développement du pathogène en agissant directement sur ce dernier. Par exemple, *Trichoderma harzianum* sécrète l'enzyme chitinase afin de parasiter *R. solani* (Sharma & Bhat, 2011). En revanche, l'antagonisme indirect est le résultat de l'action de BCA sur la plante ou bien sur l'environnement. Par exemple, la mycorhization de *Capsicum annum* par des champignons mycorhiziens comme *Glomus mosseae* a induit la production de composés phénoliques et de protéines de défense comme les β -1,3-glucanases dans la plante (Ozgonen *et al.*, 2009).

Les BCA les plus efficaces peuvent mettre en œuvre simultanément un antagonisme direct vis-à-vis du pathogène et un antagonisme indirect en agissant sur la plante. Par exemple, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 sécrète l'antibiotique 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) capable d'avoir une activité directe sur les pathogènes et est aussi capable de déclencher l'ISR chez *A. thaliana* (Iavicoli *et al.*, 2003).

4.3.3 Les agents de contrôle biologique (BCA)

Les BCA sont des solutions alternatives prometteuses pour contrôler les pathogènes du sol comme les oomycètes du genre *Phytophthora*. Parmi ces BCA, il existe des champignons filamenteux dont les « *arbuscular mycorrhizal fungi* » (AMF) (Zheng *et al.*, 2005; Naher *et al.*, 2014) et des bactéries, plus particulièrement des rhizobactéries, qui favorisent la croissance des plantes et nommées « *plant growth-promoting rhizobacteria* » (PGPR) (Zhang *et al.*, 2016).

4.3.3.A Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux sont des organismes capables de jouer le rôle de biocontrôle contre les pathogènes du sol comme *Pythium* spp., et *Phytophthora* spp. (Papavizas, 1985; Smith *et al.*, 1990). Certains de ces BCA sont résistants à de nombreux produits chimiques toxiques comme les herbicides et les fongicides, ce qui les rend particulièrement intéressants dans des stratégies de lutte intégrée contre les pathogènes (utilisation de BCA et de produits chimiques) (Papavizas, 1985; Benitez *et al.*, 2004). Les champignons filamenteux assurent le rôle de biocontrôle par plusieurs mécanismes (Benitez *et al.*, 2004; Naher *et al.*, 2014) comme l'amélioration de la croissance de la plante (Smith *et al.*, 1990; Vinale *et al.*, 2006), la compétition sur les nutriments et l'espace (Hjeljord *et al.*, 2000), le mycoparasitisme (Steyaert *et al.*, 2003) et l'activation du mécanisme de défense de la plante (Naher *et al.*, 2011). Parmi les champignons filamenteux, *Trichoderma* spp. et *Gliocladium* spp. sont de bons candidats pour le contrôle biologique (Papavizas, 1985; Smith *et al.*, 1990).

Des travaux conduits sur le poivron ont mis en évidence l'efficacité de *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum*) utilisé en traitement de semence et traitement des racines sur la nécrose des tiges causée par *P. capsici* (Ahmed *et al.*, 2000). La quantification du *P. capsici* dans la zone nécrotique a montré que le traitement avec *T. harzianum* a permis de réduire la colonisation de cette zone par le pathogène. Seul *P. capsici* était présent sur les zones nécrosées, ce qui indique l'absence de contact direct entre les deux organismes et exclut toute hypothèse d'interaction compétitive entre le pathogène et l'agent de biocontrôle (Ahmed *et al.*, 2000). Dans cette étude, la concentration caulinaire en capsidiol, un métabolite secondaire est plus élevée chez les plantes traitées avec *T. harzianum* comparé aux plantes non traitées

(ou contrôle). Ceci suggère que *T. harzianum* induit la réponse de la défense systémique chez le poivron (Ahmed *et al.*, 2000). *T. harzianum* T39 et ses formulations commerciales (*T. virens* DAR 74290 and Trichodex) ont montré des capacités de biocontrôle contre *Phytophthora erythroseptica*. Les métabolites de *T. viren* DAR 74230 ont inhibé complètement la croissance *in-vitro* de *P. erythroseptica*. L'inoculation de tomates et pommes de terre par ces souches a protégé ces plantes contre cet oomycète (Etebarian *et al.*, 2000). *T. harzianum* a également inhibé la croissance *in-vitro* de *P. parasitica*. Dans ce pathosystème, les observations microscopiques ont montré que l'effet inhibiteur est causé par un contact étroit entre les mycéliums de *T. harzianum* et de *P. parasitica*, aboutissant au gonflement, à l'enroulement et à la lyse des mycéliums de *P. parasitica* (Singh & Islam, 2010). Ainsi, pour un agent de biocontrôle donné, le mécanisme mis en jeu dans la protection de la plante semble être pathosystème dépendant.

Gliricium catenulatum a montré une potentialité de biocontrôle contre le pathogène du sol *Pythium ultimum in-vitro*. En culture, ce même microorganisme s'est révélé efficace contre la fonte des semis pour des cultures de pensées (*Viola tricolor* L., cv. Supremo Early) et de gueules-de-loup (*Antirrhinum majus* L., cv. Madame Orange) (Mcquilken *et al.*, 2001). *G. catenulatum* ainsi que *T. harzianum* utilisés individuellement ou en combinaison, ont été parmi les BCA les plus prometteurs pour protéger les cultures de fraise *Fragaria × ananassa* contre *Phytophthora cactorum* et *Phytophthora fragariae* (Vestberg *et al.*, 2004).

4.3.3.B Les champignons mycorhiziens (AMF)

Les AMF sont capables de coloniser les racines de plus de 80 % d'espèces végétales, et ils sont omniprésents dans les sols agricoles et les écosystèmes naturels. Ces champignons vivent en symbiose (mutualisme) avec des espèces végétales en échangeant les éléments nutritifs minéraux présents dans le sol contre les éléments nutritifs organiques produits par la plante. Des témoins fossiles suggèrent que la relation de symbiose entre les plantes et les AMF a commencé depuis 450 millions d'années. Les AMF ont été souvent le sujet de recherches se focalisant sur les bénéfices nutritionnels (Cameron, 2010; Cameron *et al.*, 2013). La capacité de ces microorganismes à contrôler les maladies causées par les pathogènes du sol a été moins étudiée (Vigo *et al.*, 2000; Wehner *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2013). Pourtant, ces études ont montré l'importance des AMF dans le biocontrôle de plusieurs pathogènes comme

Fusarium spp. (Filion *et al.*, 1999), *Aphanomyces* spp. (Bodker *et al.*, 1998) ou encore *Phytophthora* spp. (Lioussanne *et al.*, 2008). Les mécanismes mis en jeu sont liés à l'interaction compétitive avec le pathogène (Filion *et al.*, 2003), le changement dans l'architecture racinaire (Matsubara *et al.*, 1995; Sukumar *et al.*, 2013), le changement des populations microbiennes rhizosphériques (Siasou *et al.*, 2009) et/ou l'activation des mécanismes de défense systémiques des plantes (Poza *et al.*, 2002).

Parmi les AMF utilisés en biocontrôle, *Glomus intraradices* apparaît comme un agent efficace pour contrôler des pathogènes comme *Fusarium* spp. et *Phytophthora* spp (Filion *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2005; Lioussanne *et al.*, 2008). En effet, les substances solubles secrétées par le mycélium de *G. intraradices* sont capables de réduire la germination de chlamydospores de *F. oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* (Filion *et al.*, 1999). Dans une autre étude, l'inoculation de *G. intraradices* chez le poivron (*Capsicum annuum* L. Chungok) a engendré un double effet en bloquant le dépérissement racinaire causé par *P. capsici* et en modifiant l'expression des enzymes responsables de la lignification (Zheng *et al.*, 2005). Enfin, une étude réalisée sur les exsudats racinaires de tomate (*S. lycopersicum*), dont les racines sont mycorhizées avec *G. intraradices*, suggère que l'exsudat des racines de tomate mycorhizées est plus riche en proline et isocitrate. Cet exsudat joue un rôle dans la protection de la tomate contre *P. parasitica*, notamment en provoquant la répulsion des zoospores de *P. parasitica* (Lioussanne *et al.*, 2008).

4.3.3.C Rhizobactéries favorisant la croissance de plantes

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, encore appelées « *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR) », sont des bactéries capables de stimuler la croissance des plantes (Vessey, 2003) et de protéger les plantes contre des pathogènes du sol (Zehnder *et al.*, 2001). Ces micro-organismes sont capables d'activer l'ISR des plantes (Zehnder *et al.*, 2001). Plusieurs rhizobactéries ont montré une capacité de biocontrôle vis-à-vis des pathogènes du sol, comme *Bacillus mycoides* (Bargabus *et al.*, 2002) et *B. subtilis* (Ashwini & Srividya, 2014).

B. amyloliquefaciens souche IBFCBF-1 a la capacité d'inhiber la croissance de *P. capsici* *in-vitro* (Figure 20). Le traitement de *Capsicum annuum* L. *B. amyloliquefaciens* souche IBFCBF-1 a réduit les dégâts causés par *P. capsici* (*Capsicum annuum* L.) (Zhang *et al.*, 2016). *B.*

amyloliquefaciens souche HK34 a été capable d'induire la résistance systémique chez le ginseng coréen (*Panax ginseng* Meyer) et de le protéger contre *P. cactorum* (Lee et al., 2015).



Figure 20 : L'effet antagoniste de *B. amyloliquefaciens* souche IBFCBF-1 contre *P. capsici* (Zhang et al., 2016).

5. Objectifs

C. ternata est une plante sensible à la pourriture racinaire provoquée par *P. parasitica*; ce qui implique une utilisation massive de produits chimiques pendant sa production au sein des pépinières. Cette plante possède plusieurs cultivars dont deux, Aztec pearl et Goldfinger, qui montrent une sensibilité différente pour la pourriture racinaire, Aztec pearl étant le moins sensible. Peu d'informations sur l'interaction *C. ternata/Phytophthora* sont disponibles dans la littérature. Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été de développer une meilleure connaissance de ce pathosystème. Il s'agissait plus particulièrement (I) de mieux comprendre les mécanismes naturels de défense des plantes, plus précisément le rôle des AGPs et des alcaloïdes dans les interactions entre les racines de *Choisya* et *P. parasitica* et (II) d'évaluer un mode de lutte alternative faisant appel à l'utilisation d'agents de biocontrôle afin de limiter les dégâts provoqués par *P. parasitica*.

I- Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour se défendre contre leurs agresseurs. Parmi ces stratégies, il existe la paroi cellulaire qui constitue une barrière physique et les alcaloïdes qui jouent le rôle d'arme chimique.

1- La paroi cellulaire, dont les AGPs font partie, est la première barrière face aux pathogènes. Des études récentes ont montré que ces AGPs sont impliqués dans l'interaction plante/pathogène, notamment dans le cas des oomycètes. Nos objectifs pour cette partie sont :

- Extraire et caractériser biochimiquement les AGPs dans la partie aérienne et racinaire de deux cultivars Aztec pearl et Goldfinger.
- Réaliser des tests *in-vitro* pour révéler le rôle des AGPs dans l'interaction *C. ternata/P. parasitica*.

2- Des études réalisées sur les feuilles de *C. ternata* classique et Aztec pearl, montrent que *C. ternata* est riche en alcaloïdes furoquinoliques. Pourtant, la partie racinaire n'a jamais été étudiée. De plus, les alcaloïdes étant connus pour leurs activités biologiques, pharmacologiques et antimicrobiennes, nos objectifs pour cette partie sont :

- Extraire, identifier et quantifier les alcaloïdes de deux cultivars au niveau de la partie aérienne et racinaire.

- Analyser l'effet de l'inoculation par *P. parasitica* sur la concentration des alcaloïdes de deux cultivars au niveau racinaire.
- Réaliser des tests *in-vitro* par des alcaloïdes commerciaux et des alcaloïdes extraits à partir de deux cultivars pour montrer leur rôle dans l'interaction *C. ternata*/*P. parasitica*.

II- L'utilisation des BCA comme méthode de lutte alternative est une approche prometteuse pour contrôler les pathogènes telluriques. Une étude réalisée sur *C. ternata* classique a montré que de *T. harzianum* et *Glomus* spp. peuvent potentiellement améliorer le développement racinaire et offrir par conséquent une meilleure protection contre *Phytophthora*. Cette étude se base sur la contamination naturelle de *C. ternata* par *Phytophthora* dans les pépinières et le suivi des symptômes observés pour évaluer l'efficacité des BCA (Deogratias *et al.*, 2011). Aujourd'hui, peu d'études portent sur le pathosystème *C. ternata*/*Phytophthora* et aucune d'entre elles ne s'est intéressée aux effets directs des BCA sur la densité de *Phytophthora* dans le substrat. Ainsi nos objectifs pour cette partie sont :

- Développer un outil moléculaire permettant de détecter et quantifier *Phytophthora* dans le substrat de *C. ternata*.
- Isoler et identifier des espèces de *Phytophthora* pathogène à partir de *C. ternata*.
- Identifier des agents de contrôle biologique capables de réduire le développement de *P. parasitica* dans le substrat et offrir ainsi une meilleure protection à *C. ternata* classique contre ce pathogène.

RÉSULTATS

II. Résultats

Publication N°1: research paper

Arabinogalactan proteins and furoquinoline alkaloids from *Choisya ternata* are involved in root-*Phytophthora parasitica* interactions

Youssef Manasfi, Arnaud Lanoue, Marc-Antoine Cannesan, Wassila Riah, Mélanie Bressan, Azeddine Driouich, Karine Laval, Isabelle Trinsoutrot-Gattin and Maïté Vicré *

Choisya ternata est une plante ornementale d'une valeur économique importante en France. Les producteurs de cette plante souffrent de pertes économiques qui peuvent atteindre 80 % dues à la maladie de la pourriture racinaire. Cette maladie est provoquée majoritairement par des *Phytophthora*, et plus précisément par *Phytophthora parasitica*. Les deux cultivars de *Choisya ternata*, Aztec pearl et Goldfinger montrent une sensibilité différente à la pourriture racinaire engendrée par *Phytophthora*. Dans les pépinières, le cultivar Aztec pearl est moins touché par cette maladie. Des études récentes montrent le rôle des arabinogalactane-protéines (AGPs) dans les interactions plante-pathogène et plus particulièrement avec les oomycètes. En outre, des études ont montré que les alcaloïdes ont des activités biologiques antimicrobiennes.

Nos résultats montrent que les AGPs d'Aztec pearl et Goldfinger sont différents au niveau racinaire. La fraction d'AGPs extraite à partir des racines d'Aztec pearl montre une composition monosaccharidique différente, en comparaison aux fractions extraites à partir des racines de Goldfinger et des feuilles des deux cultivars. En effet, la fraction d'AGPs racinaire d'Aztec pearl possède une population d'AGPs supplémentaire de faible poids moléculaire. De plus, une différence de ratio Ara:Gal a été constatée au niveau de cette fraction. Ce ratio était de 0.3 au niveau de la fraction racinaire d'Aztec pearl et entre 0.52 et 0.59 pour les autres fractions. Par ailleurs, les AGPs racinaires d'Aztec pearl sont dépourvus de l'épitope détecté par l'anticorps JIM13. Afin d'étudier le rôle de ces AGPs dans l'interaction avec le pathogène, des tests de croissance du mycélium de *P. parasitica* ont été réalisés. Une augmentation de la croissance du mycélium de *P. parasitica* a été observée en présence des AGPs extraites à partir de la partie aérienne d'Aztec pearl et les parties aérienne et racinaire de Goldfinger (les trois fractions qui possèdent les mêmes caractéristiques biochimiques). En revanche la fraction d'AGPs extraite à partir des racines d'Aztec pearl n'a

pas provoqué une augmentation de la croissance. Ces résultats suggèrent que *P. parasitica* n'était pas capable de dégrader cette fraction d'AGPs pour l'utiliser comme une source d'énergie. Pendant l'infection de la plante par *P. parasitica*, ces AGPs peuvent freiner la pénétration du pathogène, et par conséquent diminuer la sévérité de la maladie.

Quinze métabolites secondaires (MS) ont été détectés dans les deux cultivars. L'identification de neuf MS montre que les racines de ces cultivars contiennent des alcaloïdes furoquinoliques. L'analyse en composantes principales des alcaloïdes racinaires montre une différence entre les deux cultivars non inoculés. Les alcaloïdes platydesminium, desmethoxychoisyine, unknow 4 et 5 ont été plus concentrés dans les racines d'Aztec pearl. Suite à l'inoculation par des zoospores, cette différence n'est plus détectable, due à la diminution de la concentration ces alcaloïdes dans les racines d'Aztec pearl. L'inoculation par des zoospores et du mycélium de *P. parasitica* a aussi induit le choisyine et dimethylallyl- γ -fagarine respectivement dans les racines d'Aztec pearl. L'activité biologique de ces alcaloïdes a été montré par des tests d'inhibitions de la croissance du mycélium de *P. parasitica*. Les alcaloïdes commerciaux purifiés ont été capable d'inhiber la croissance du mycélium de *P. parasitica*. Par ailleurs, une plus forte inhibition a été détectée suite à des traitements par les alcaloïdes totaux extraits à partir d'Aztec pearl, grâce à l'effet probable de synergie entre les différents MS. Les alcaloïdes totaux de Goldfinger inhiber le développement de *P. parasitica*. Ces résultats montrent le rôle potentiel des alcaloïdes furoquinoliques dans la protection de la plante contre *P. parasitica*.

Ces résultats doivent être complétées par des caractérisation des AGPs dans les racines infectées, et par des études d'immunomarquage afin de mieux comprendre le rôle des AGPs dans l'interaction plante-racine. L'identification des alcaloïdes non identifiés est intéressante afin de tester leur rôle dans l'inhibition de la croissance du mycélium de *P. parasitica*, de plus la réalisation de test d'inhibition de la croissance de *P. parasitica* par l'application simultanée de plusieurs alcaloïdes peut nous permettre de mieux comprendre le rôle de chaque alcaloïde dans l'effet synergique.

Mots clés : Horticulture, pépinière, *Choisya ternata*, Aztec pearl, Gold finger, résistance de la plante, *P. parasitica*, arabinogalactane-proteines, métabolites secondaires, alcaloïdes furoquinoliques.

Arabinogalactan proteins and furoquinoline alkaloids from *Choisya ternata* are involved in root-*Phytophthora parasitica* interactions

Youssef Manasfi¹⁴, Arnaud Lanoue², Marc-Antoine Cannesan³, Wassila Riah⁴, Mélanie Bressan⁴, Azeddine Driouich¹, Karine Laval⁴, Isabelle Trinsoutrot-Gattin⁴ and Maïté Vicroé^{1*}

Youssef Manasfi :

1 : Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Normandie Université, Université de Rouen 76821 Mont Saint Aignan, France.

2 : Laboratoire de Biomolécules et Biotechnologies (EA 2106), Université François Rabelais de Tours, 31 Avenue Monge 37200 TOURS, France.

3 : Astredhor Seine-Manche, 32 rue Alfred Kastler, 76130 Mont Saint Aignan, France.

4 : Laboratoire Agro-écologie des territoires (AGRI'TERR), UniLaSalle, UniLaSalle- Campus de Rouen, 3 rue du Tronquet – CS40118, 76134 Mont Saint Aignan cedex, France.

* Corresponding author

Introduction

Choisya ternata (Rutaceae) known as “Mexican orange” is widely used as an ornamental shrub (Boyd *et al.*, 2007). Root rot disease caused by soil-borne pathogens such as *Phytophthora* spp. is responsible of severe losses affecting up to 80% of *C. ternata* production (Talbot & Wedgwood, 2009; ASTREDHOR personal communication). The two *C. ternata* cultivars Aztec pearl and Goldfinger show different sensibility to these disease, with Goldfinger suffer more of root rot. *Phytophthora* spp. are oomycete that are responsible for many destructive diseases in agricultural and ornamental plants worldwide (Haas *et al.*, 2009; Kroon *et al.*, 2012; Grünwald *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2014; Larousse & Galiana, 2017). Different *Phytophthora* species were isolated from the root systems of *C. ternata* but *P. parasitica* was identified as the major species in infected tissues (Manasfi *et al.*, submitted; Talbot & Wedgwood, 2009). Management of soil-borne diseases caused by *Phytophthora* is difficult to control due to the increasing resistance of *Phytophthora* spp. to fungicides (Parra & Ristaino, 2001; Drenth *et al.*, 2006; Keinath, 2007). The growing awareness on the effect of chemical product on the human health and environment lead to the development of different strategies including cultural practices to improve drainage (Hansen, 2008) and recently the use of biological control agents (BCA) (Gullino & Kuijpers, 1994; Shen *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). Another way to protect plants against pathogens is to take advantage of their natural defense mechanisms. Plants have developed a stunning large array of antimicrobial molecules dedicated to detect invading organisms and stop them before they are able to cause extensive damage (Freeman & Beattie, 2008; Wink, 2010). Understanding these natural defense mechanisms is essential in order to protect plants from pathogens and developing highly disease-resistant plant species or new treatment approaches not invasive to our environment (Freeman & Beattie, 2008).

Plant cell wall is a highly dynamic compartment that acts as a barrier against plant pathogens. Its composition is known to be modified and reinforced in response to microbial attacks (Hückelhoven, 2007; Collinge, 2009; Malinovsky *et al.*, 2014; Miedes *et al.*, 2014; Lionetti & Métraux, 2014; Hamann, 2015; Houston *et al.*, 2016; Engelsdorf *et al.*, 2017; Does *et al.*, 2017). Plant cell wall consists mainly of polysaccharides such as cellulose, hemicelluloses, pectins and glycoproteins including arabinogalactan- proteins (AGP) (Heredia *et al.*, 1995; Keegstra, 2010). In this study we focused on AGP due to their emerging role in

root-oomycetes interactions (Cannesan *et al.*, 2012). AGPs are highly glycosylated proteins members of the hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) superfamily of plant cell wall proteins. They are O-glycosylated molecules with carbohydrate core composed mainly of arabinose and galactose attached to Hyp residues and have a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchors (Showalter, 2001; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Most AGPs have the ability to react with β -glucosyl Yariv reagent (β GlcY), which is used in their extraction and purification (Yariv *et al.*, 1962, 1967). AGPs have been detected in leaves, stems, roots, floral parts and seeds (Fincher *et al.*, 1983; Showalter, 2001) and some of these AGPs could be found in many tissues while others can demonstrate varying degrees of developmental expression specificity at organs level or tissues level (Showalter, 2001). Recent studies highlight that root tissues are enriched in AGP (Vicré *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). AGPs have many biological roles in many physiological plants process as reproductive growth and development, programmed cell death, molecular interactions and signaling (Showalter, 2001; Seifert & Roberts, 2007; Nguema-Ona *et al.*, 2012, 2013). Recently roots AGPs have been emerged as an important player of plant-microbe interactions (PMI) and many study suggested that AGPs play an important role at several stage of PMI such as root colonization, repelling or attraction of soil microbes, and development of infection structures (Gaspar *et al.*, 2004; Vicré *et al.*, 2005; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). Recent evidence highlighted the role of AGP from *Pisum sativum* in the interaction with pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. Theses AGPs was able to attract and inhibit the germination of *A. euteiches* zoospores (Cannesan *et al.*, 2012).

Choisya plants belongs to the *Rutaceae* family, known to produce quinoline derived alkaloid, known as furoquinoline alkaloids (Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016). *C. ternata* classic leaves and Aztec pearl leaves have been studied for their furoquinoline alkaloids content (Johns *et al.*, 1967; Montagu-Bourin *et al.*, 1980; Boyd *et al.*, 2007; Radulović *et al.*, 2011; de Carvalho *et al.*, 2016; Leitão *et al.*, 2017). These studies showed the seven main alkaloid in *C. ternata*: skimmianine, kokusaginine, 7-isopentenyl-oxy-c-fagarine, evoxine, choisyine, platydesminium methosalt and balfourodinium methosalt (Boyd *et al.*, 2007; Leitão *et al.*, 2017). These alkaloids have a strong biological activity that make them attractive to the pharmaceutical and phytosanitary domain (Harkrader & Meyer, 2001; Radulović *et al.*, 2011; Nebo *et al.*, 2014; de Carvalho *et al.*, 2016; Leitão *et al.*, 2017). For example, graveoline an

alkaloid from leaves and roots of *Ruta graveolens* have a better phytotoxicity activity in comparison to the commercial herbicide Logran® (Nebo *et al.*, 2014). The alkaloid 5-(1,1-dimethylallyl)-8-hydroxyfuro[2-3-b]quinoline from the leaves of *Ruta chalepensis* L. showed an antifungal activity against *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* et *Rhizoctonia solani* (Emam *et al.*, 2010a).

To date no information is available on the AGPs composition of the two cultivars Aztec pearl and Goldfinger. Also roots alkaloids composition of these cultivars has never been studied. In this study, we focused on AGP and alkaloids characterization in *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger. In vitro assays were performed to investigate the effects of AGP and alkaloids from *C. ternata* against pathogenic *P. parasitica* INRA-310. Our results show that AGP roots composition and alkaloids roots composition are different between the two cultivars. These differences are also observed in their ability to inhibit the growth of *P. parasitica* mycelium *in vitro*. This study of the two cultivars with different sensibility to root rot enable us to evaluate the role of AGPs and quinoline alkaloids in the protection of *C. ternata* against *P. parasitica*.

Materials and methods

Plant material

Choisya ternata cultivar Aztec pearl and Goldfinger were obtained from André Briant Jeunes Plants nursery. *In-vitro* plants were used for alkaloid extractions and inoculation tests. Plants provided in seedling cells tray 54x31cm (104 cells) were used for AGPs extractions (Figure 1).

***Phytophthora parasitica* maintenance and zoospores production**

P. parasitica INRA-310 was kindly provided by Dr. Agnès ATTARD (Institut Sophia Agrobiotech). *P. parasitica* was maintained on clarified V8 juice 1.5 % w/v agar medium in obscurity at 25°C. V8 was clarified by mixing 1.5 % w/v CaCO₃ with V8 juice and centrifuge for 20 min at 2000 g then, diluted 4 time with deionized water in order to produce zoospores, 5 agar disks of 5 mm containing fresh mycelium were incubated in clarified V8 juice for 1 week in continuous light at 25°C. The grown mycelium was recovered and washed 3x with ultra-pure water and recovered by centrifugation for 10 min at 1700 g and spread on a 1 % w/v agar

medium, then incubated for 4 d in continuous light at 25°C. Afterwards, the culture was incubated for 30 min at 4°C, then 37°C ultra-pure water was added and incubated for 30 min. Finally, the solution containing zoospores is recuperated. To quantify the zoospores, 100 µl of recuperated zoospores solution was vortexed for 1 min and placed on a Nageotte counting chamber (Galiana *et al.*, 2005; Attard *et al.*, 2014).

Arabinogalactan proteins Extraction

The plants were incubated for 3 weeks in long day photoperiod (16h light/8h dark) at 19°C. The soil was gently removed and the roots were soaked in water for 1h. Roots and leaves from 100 plants of *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger were grinded with liquid nitrogen and freeze dried. AGPs were isolated by incubated the grinded freeze dried roots and leaves with the extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2 mM Na₂S₂O₅, 1% v/v Triton X-100) under agitation overnight at 4°C, and centrifuged for 10 min at 14000 g, 4°C. The supernatant was mixed with 5 volumes of 96% ethanol overnight at 4°C, and centrifuged for 10 min at 14000 g, 4°C. The pellets were suspended with 50 mM Tris-HCl, and centrifuged for 10 min at 14000 g, 4°C. The solution was dialyzed against deionized water at 3.5 KDa, then freeze dried. Freeze dried material was dissolved in 1% NaCl and AGPs were precipitated by adding an equal volume of 2 mg.ml⁻¹ β-Glucosyl Yariv reagent (β-GlcY) (Yariv *et al.*, 1962, 1967) and incubated for 48 h at 4°C. The complex AGP- β-GlcY was collected by centrifugation for 90 min at 10000g, RT. To remove the excess of β-GlcY, the pellet was washed three times with 1% NaCl and three times with methanol, and centrifuged for 10 min at 10000g, RT. The pellet is left to dry under a flow hood, and dissolved in dimethyl sulfoxide. 10% w/v of sodium dithionite and ultra-pure water were added until the color becomes clear yellow. Clear yellow solution was desalted with size exclusion chromatography (PD-10 desalting columns) and recovered in Eppendorf tubes of 1.5 mL. Every tube was checked for the presence of AGPs by radial gel diffusion. The tubes containing AGPs were collected and dialyzed against deionized water at 3.5 KDa, then freeze dried. Freeze dried materiel was solubilized in ultra-pure water (Castilleux *et al.*; van Holst & Clarke, 1985; Gane *et al.*, 1995; Ding & Zhu, 1997; Popper, 2011; Cannesan *et al.*, 2012).

AGP detection and quantification

Radial gel diffusion was used to detect the presence of AGPs. A 1% w/v agarose gel containing 0.15 M NaCl, 0.02% (w/v) NaNO₃, 10 µg.mL⁻¹ β-GlcY was prepared. Wells were cut out using 200 µl cut pipette tips and 40 µl of samples were load it into the wells. Different concentrations of gum Arabic were used as standards (0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg.mL⁻¹) and water as negative control. The gel was incubated overnight at 4°C. After incubation, the gel was washed by 1% W/V NaCl to remove excess β-GlcY (Castilleux *et al.*; van Holst & Clarke, 1985, 1986; Popper, 2011; Cannesan *et al.*, 2012).

Rocket electrophoresis was used to estimate the quantity of AGPs. 1% w/v agarose gel containing 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 200 mM glycine, 20 µg.mL⁻¹ β-GlcY was prepared and poured in a gel tray with both ends sealed with tape. Then, the gel is transferred to an Isoelectric focusing electrophoresis system (IEF) platform and wells were cut out using 10 µl cut pipette tips. 7 µl of samples were load it into the wells and gum Arabic were used as standards (0.125, 0.25, 0.5, 1 mg.mL⁻¹) and water as negative control. After this, IEF was ran for 16h at 200 V, 5 mA, 10 W. then, the gel was washed by 1% W/V NaCl to remove excess β-GlcY and the surface of each peak (Formula: Area = (bxh)/2; b: base of the peak and h: height of the peak) was calculated using ImageJ software. The concentration and the surface area of each peak of standard were used to make a calibration range. The AGP samples were quantified using this calibration range (Castilleux *et al.*; van Holst & Clarke, 1985; Ding & Zhu, 1997; Cannesan *et al.*, 2012).

Monosaccharides analysis

The monosaccharide composition of AGPs was analyzed by gas chromatography analysis of trimethylsilyl methylglycoside derivatives with inositol as internal standard. 250 µg of AGPs were first hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid for 2 h at 110°C and evaporated under a flow hood. After evaporation, samples were converted to methylglycosides by treatment with 1 M methanol-HCl (Supelco) overnight at 80°C, and evaporated under a flow hood. Then, the methyl glycosides were washed 3 times in methanol and transformed to trimethylsilyl derivatives by incubation in hexamethyldisilazane:trimethylchlorosilane:pyridine (3:1:9, Supelco) for 20 min at 110°C. After conversion, samples were washed twice with cyclohexane then suspended in 1 mL cyclohexane prior to injection in gas chromatography.

Gas chromatography (Varian CP-3800, Varian) is equipped with a flame ionization detector (FID), and a WCOT fused silica capillary column (length 25 m, i.d. 0.25 mm) with CP-Sil 5-CB as stationary phase and helium as vector gas. The oven temperature program was as follows: 2 min at 120 °C, 10 °C.min⁻¹ to 160 °C, and reach 220 °C by 1.5 °C.min⁻¹ prior to end the run by an increase of 20 °C.min⁻¹ to 280 °C. The obtained chromatographic data were analyzed with GC Star Workstation software (Varian), with surface correction according to response factors established with standard monosaccharides (York *et al.*, 1986; Nguema-Ona *et al.*, 2006).

Sugar linkage analysis

First, 250 µg of AGPs were treated with iodomethane in a suspension of NaOH in dry DMSO in order to achieve permethylation. The resulting derivatives were prepared as described by the glycochemistry core resource of San Diego (<http://glycotech.ucsd.edu/protocols>).

GC-MS experiments were performed using an Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a time-of-flight mass spectrometer JEOL GC-AccuTOF (Tokyo, Japan) and the Mass Center 3.1 data system. Chromatographic separations were acquired using either a (30m, 0.25mm id, 0.25µm film thickness, ZB-5MS, Phenomenex, Torrance, CA, USA) or a (30m, 0.25mm id, 0.25µm film thickness, HP-5MS, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) capillary columns. Helium was used as the carrier gas at a flow-rate of 0.8mL.min⁻¹. The program of the oven temperature was set initially from 100°C (1 min hold time) to 160°C with a 10°C min⁻¹ ramp, then to 220°C with a 2°C min⁻¹ ramp and finally to 280°C with a 15°C min⁻¹ ramp. The final temperature hold time was 5 min (total run: 53 min). The temperature of the injector was 250°C and 260°C for the interface. Agilent 7693A front injector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used in splitless mode to inject 1 µL of samples.

Electron energy of 70 eV, an ionizing current of 300 µA and a voltage detector of 2200V were used to record electron ionization mass spectra. 250°C and 260°C were respectively the temperature of the ion source and interface. The m/z range was 35-650. The instrument mass resolution was 8000 (full width at half maxima (FWHM)) and for internal reference PDMS ion m/z 207 was used. <https://www.ccruc.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html> was used to

determine sugar linkage from the EI-MS fragmentation patterns of partially methylated alditol acetate derivatives.

SDS-PAGE, western blot and agarose gel

20 µg of AGPs samples were freeze dried and solubilized in 20 µL of migration buffer. 5 µL of LSB (10 % v/v, 65.2 mM Tris base pH 8.6, 2 % v/v SDS, 0.005 % w/v Bromophenol blue) was added and incubated for 5 min at 100°C. After this, AGPs samples were analyzed by running on a concentration gel (6.8 % acrylamide bisacrylamide (29:1), 0.12 M Tris base, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.1 % Temed) and a separation gel (8 % acrylamide bisacrylamide (29:1), 0.375 M Tris base, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.04% Temed) for 90 min at 90 V, 10 mA. Afterward, the gel was incubated overnight under agitation with 20 µg.mL⁻¹ β-GlcY. Finally, the gel is incubated in a solution of (50 % v/v methanol, 7.5 % v/v acetic acid) to remove excess β-GlcY (Willats & Knox, 1996; Cannesan *et al.*, 2012).

For western blot analysis, the gel was blotted after migration on a nitrocellulose membrane for 2 h at 10 V, then saturated by incubation under agitation overnight in TBST 0.1 % (20 mM Tris base, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1 % Tween 20). After saturation, the membrane is incubated for 2h with primary antibody (1:5) in TBST 0.1 %, and washed (5 × 5min) with TBST 0.1 %. Then, the blot is incubated for 2 h with secondary antibody (anti-rat IgG peroxidase conjugate 1:3000) in TBST 0.1 %, and washed (5 × 5min) with TBST 0.1 %, (2 × 2min) with TBS. enzyme activity was visualized with 30% hydrogen peroxide (diluted in TBS) and methanol 4-chloronaphthol horseradish peroxidase color reagent. The primary antibodies used were JIM13 and LM2 (obtained from PlantProbes) (Willats & Knox, 1996; Cannesan *et al.*, 2012).

For agarose gel electrophoresis, 25 µg of AGPs mixed with loading buffer with a final concentration of (8 % (v/v) glycerol, 0.5 % (w/v) Bromophenol blue) were run on a 1 % agarose gel containing 90 mM Tris-base (pH 8.3), 90 mM boric acid and 2 mM EDTA, for 50 min at 250 V, 120 mA. After electrophoresis, agarose gel is stained in 10 µg/ml β-GlcY, overnight. Finally, the gel is incubated in 1 % (w/v) NaCl under gentle agitation to remove the excess of β-GlcY and retention factor (Rf) is calculated (van Holst & Clarke, 1985; Ding & Zhu, 1997; Girault *et al.*, 2000; Cannesan *et al.*, 2012).

***In vitro* impact of AGP on zoospores germination**

In vitro zoospore germination assays were performed in 96 wells plate with different AGPs concentrations (0.5, 1 and 2 mg.mL⁻¹) using water as control. AGPs solutions was added to the well followed by 3500 zoospores/well. The total volumes were adjusted to 100 µL. Three replicate wells were included for each condition and the whole test was repeated twice. The germination and the development of mycelium was observed with bright-field microscopy every 24 h for 1 week using a Leica DMI 6000B inverted microscope with 10× objective and images were acquired with a Leica DCF 600C camera. The growth of mycelium was quantified using ImageJ.

Alkaloids extraction for chromatography analysis:

Leaves and Roots were lyophilized and grinded using Mixer Mill (Retsch MM-400, Retsch GmbH, Haan, Germany) for 3 min with a rate of 30 Hz at room temperature. The dry powder (10 mg) was extracted in a solution of methanol (1 mL) with shaking at 1200 rpm for 30 min at ambient temperature and centrifuged at 15,000 g for 5 min. The supernatant was used for HPLC-DAD and UPLC-MS/MS analyses (Lanoue *et al.*, 2010).

Alkaloid extraction for growth inhibition test:

For *in vitro* plants, alkaloids were extracted from 0.2 and 1.25 g of entire *in-vitro* plants (without separating leaves and roots). For potted plants, alkaloids where extracted from 1.25 g of entire plants (without separating leaves and roots), and from 1.25g of separated leaves and roots. The extraction was performed in the same way as explained above. The supernatant was mixed with clarified V8 juice medium for *P. parasitica* INRA-310 growth inhibition test (Lanoue *et al.*, 2010).

High-performance liquid chromatography couplet to diode-array detection (HPLC-DAD)

HPLC-DAD system consisted in a gradient pump (Waters 600 controller, Milford, USA), a cooled autosampler (Waters 717 plus) and a UV-visible photodiode array detector set (Waters 996) to acquire data from 200 to 400 nm. Empower 2 software from Waters was used for instrument control, data acquisition and data processing. Analyses were performed on a 3 µm column (250 x 4 mm, Multospher 120 RP18HP; CS-Service, Langerwehe, Germany) at 24°C. The mobile phase consisted of aqueous phosphoric acid (0.1 % w/v) and acetonitrile pumped

at 0.5 ml min⁻¹ into the HPLC-DAD system. The gradient started at 10 % acetonitrile and increased linearly to 95 % in 75 min, followed by washing and reconditioning of the column. Wavelength detection was set at 254 nm. Relative quantification was performed by correcting peak areas by sample masses. Choisyine, skimmiamine, balfourodinium and platydesminium were previously isolated and purified in our laboratory (Montagu et al., 1981). Absolute quantification of choisyine, skimmiamine, balfourodinium and platydesminium was done using five-point calibration curves (0-100ppm). The compounds annotated choisyine isomer and desmethoxychoisyine have quantified as choisyine equivalent (Lanoue *et al.*, 2010).

Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-MS)

UPLC-MS was performed using an ACQUITY™ Ultra Performance Liquid Chromatography system coupled to a photo diode array detector (PDA) and a Xevo-TQD triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source controlled by Masslynx 4.1 software (Waters, Milford, MA). Analyte separation was achieved by using a Waters Acquity HSS T3 C18 column (150 mm x 2.1 mm, 1.8 µm) with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ at 55°C. The injection volume was 5 µL. The mobile phase consisted of solvent A (0.1 % formic acid in water) and solvent B (0.1 % formic acid in acetonitrile). Chromatographic separation was achieved using a 18-min linear gradient from 10 to 95 % solvent B. MS detection was performed in both positive and negative modes. The capillary voltage was 3,000 V and sample cone voltages were 30 and 60 V. The cone and desolvation gas flow rates were 60 and 800 Lh⁻¹. The source and desolvation temperature was set at 120 °C and 450 °C, respectively (Lanoue *et al.*, 2010).

***P. parasitica* growth inhibition test**

Two agar disks of 12 mm containing fresh *P. parasitica* INRA-310 mycelium were incubated in petri dishes with 10 ml of clarified V8 juice medium (as explained below) supplemented with different alkaloids (choisyine, platydesminium, balfourodinium and skimmiamine) at different concentrations (0.1, 1, 10, 20, 40 and 100 µg/ml), and a chemical product (SUBDUE GOLD) at 0.2 µg/ml as positive. Methanol was used as negative control. After 4 d of incubation at 25°C in the dark, the growing mycelium is collected and placed for 24 h on a Whatman filter paper n°41 in order to be dried and then weighed. Five replicates were included for each condition.

Statistics

Principal Component Analysis (PCA) was performed using SIMCAP+ version 13.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). All variables were mean-centered and unit-variance (UV) scaled prior to PCA. One way ANOVA analysis of variance followed by post-hoc Tukey's test was performed for each metabolite in both hybrids. The same test was used to evaluate the effect of SM on the growth of *P. parasitica*. The Shapiro-Wilk test was used to test the Ara/Gal and germ tubes growth normality, and Brown-Forsythe's test was used to test the variance homoscedasticity. A comparison of Ara/Gal between the different fractions was performed using post-hoc Tukey's test and for and the treatment effect on germ tubes growth were evaluated using Dunnett's test.

Results

Characterization of AGP populations by electrophoresis

Electrophoresis performed on agarose gel revealed that β -GlcY precipitate contained materials with high molecular weight (Rf 0.29) in the two *C. ternata* cultivars and for both leaves and roots. There was no overlapping with the gum Arabic standard (Rf of 0.49). Interestingly material of lower molecular weight (Rf .45) was also detected specifically in *C. ternata* Aztec roots (Figure 2). This data suggests that roots from *C. ternata* Aztec contained different population of AGP as compared to leaves as well as roots and leaves from *C. ternata* Goldfinger.

In order to further investigate AGPs characterization, the β -GlcY precipitated fraction was separated by SDS-PAGE and stained with β -GlcY reagent. The pattern obtained confirmed that AGP composition from *C. ternata* Aztec pearl roots differed from the other fractions. The β -GlcY precipitated fractions from leaves and roots of *C. ternata* Aztec pearl and *C. ternata* Goldfinger revealed a smear of high molecular weight material (higher than 95 KDa). In addition, the β -GlcY precipitated fractions from roots exhibited a wider smear ranging between 170 and 55 KDa. The fractions were blotted and probed with monoclonal antisera against AGPs epitopes. Interestingly, JIM13 did not react with the fraction obtained from *C. ternata* Aztec pearl roots. All other fraction and the gum Arabic standard did react to JIM13

with a smear of a M_r higher than 95 KDa. In contrast, LM2 probing did not show any difference between the samples and no labeling was detected (Figure 3).

Monosaccharide composition and sugar linkage of β -GlcY precipitate obtained from *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger leaves and roots

As roots from the resistant cultivar *C. ternata* Aztec pearl present distinct population of AGP as compared to *C. ternata* Goldfinger their monosaccharide composition was investigated more deeply. Our results showed that arabinose and galactose were the major monosaccharides found in the β -GlcY precipitate from roots and leaves from both *C. ternata* cultivar (Figure 4A). However, the content of arabinose and galactose found in *C. ternata* Aztec pearl differed between both plant organs and cultivars. In *C. ternata* Aztec pearl roots, we observed significantly reduced amounts of arabinose (22 ± 1.3) as compared to *C. ternata* Aztec pearl leaves (33 ± 0.8) and to roots (35 ± 3.8) and leaves (34 ± 1) from *C. ternata* Goldfinger. Galactose amount was higher in *C. ternata* Aztec pearl roots at 73% in comparison with other samples with a value between 60% and 63%. As a consequence, *C. ternata* Aztec pearl roots presented a distinct Ara:Gal ratio (0.30) as compared to Aztec pearl leaves, Goldfinger roots and leaves with a respective value of 0.52, 0.56 and 0.59 (Figure 4B). These data strongly suggest that *C. ternata* Aztec pearl roots present distinct population of AGP. The presence of Rhamnose, Xylose, Mannose and Galacturonic acid was also detected in much lesser amount. Rha was not detected in Aztec pearl roots fraction and Mannose and Galacturonic acid was not detected in Aztec pearl leaves.

To gain more insight on AGP composition, we characterized sugar linkage after methanolysis. The sugar linkage analysis show that all samples have the same type of sugar linkage (Table 1). For galactose the linkages are 3-Gal, 3,6-Gal, 6-Gal and T-Gal. Arabinose linkages are 2-Ara, 3-Ara, 2,5-Ara, 3,5-Ara, 5-Ara and T-Ara. Others sugar linkages were also found as T-Xylose.

AGPs treatment effect on *P. parasitica* mycelium growth

The growth of *P. parasitica* germ tube was observed on three different times (48h, 96h and 144h after treatment) and with 3 different concentrations of APGs obtained from roots and leaves of *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger and compared with the growth observed in water (Figure 5). After 48h of treatment with AGPs at a concentration of 0.5, 1 and 2 mg.ml⁻¹

¹ (Figure 5A), all the samples showed a significant increase in germ tube growth. 96h after treatment with a concentration of 0.5 mg.ml⁻¹, only the treatment with AGPs from *C. ternata* Aztec pearl leaves showed a significant increase in germ tube growth. After increasing the concentration of AGPs treatment to 1 mg.ml⁻¹ a significant increase of germ tubes growth was detected in the case of *C. ternata* Aztec pearl leaves and Goldfinger roots. At the concentration of 2 mg.ml⁻¹ of AGPs treatment, only the treatment with AGPs obtained from *C. ternata* Aztec pearl did not significantly increase the germ tubes growth (Figure 5B). The same was observed after 144h of treatment (Figure 5C).

Alkaloid profile of *C. ternata*

To date, the alkaloid composition of roots from *C. ternata* has never been investigated. To determine the metabolomics profile of *C. ternata* cultivars Aztec pearl and Goldfinger, qualitative analyses in both ESI+ and ESI- were carried out on roots and leaves (Table 2). On a total of 14 compounds, 9 analytes were annotated by comparison with external standard (choisyine, skimmiamine, balfourodinium and platydesminium) or MS and UV spectra data from the literature (Trimethoxyiodoquinolone, kokusaginine, choisyine isomer, Dimethylallyl-γ-fagarine and desmethoxychoisyine) (Montagu *et al.*, 1981; O'Donnell *et al.*, 2006).

The alkaloid composition of roots from *C. ternata* Gold finger and Aztec pearl respectively sensible and tolerant to root rot disease was systematically compared with alkaloids from leaves and from infected plants. The global principal component analysis (PCA) revealed that alkaloid composition was distinct between leaves and roots (Figure 6A). Furthermore, different populations of alkaloids appeared to occur for leaves between the two cultivars Aztec pearl and Goldfinger. The loading plots of the global PCA show biomarkers for each group. The Choisyine strongly accumulated in the Aztec pearl leaves and the skimmiamine in the Goldfinger leaves (Figure 6B). It should be noted that roots were characterized by accumulating significant amounts of alkaloids whose chemical structure remains unknown (Figure 6B). The PCA performed with data arose from roots highlighted different patterns of alkaloids for roots according to *C. ternata* cultivars (Figure 7A). Roots from *C. ternata* Goldfinger present high amounts of skimmiamine, unknown 2 and unknown 3 compounds. Unknown compounds 4 and 5 were mostly found in roots from Aztec Pearl (Figure 7B). Interestingly, alkaloids identified in roots were different according the source of inoculum. The alkaloids composition of Aztec pearl and Goldfinger roots become similar after

artificial inoculation with *P. parasitica* INRA-310 zoospores but remained distinct when roots were inoculated with mycelium (Figure 7A).

Alkaloids in Aztec pearl and Goldfinger roots after inoculation with *P. parasitica*

We focused on alkaloids found to occur in roots (Figure 4). Choisyine and dimethylallyl- γ -fagarine (Figure 8A and 8B) were undetectable in both control roots of Aztec pearl and Goldfinger (without inoculation). Interestingly, choisyine was detected after 3 and 6 d of inoculation with *P. parasitica* zoospores at respectively 1465 and 1706 AU/mg DW in Aztec pearl roots. dimethylallyl- γ -fagarine was detected after 3d of inoculation with *P. parasitica* mycelium at 49990 AU/mg DW.

Desmethoxychoisyine (Figure 8C) was significantly higher in Aztec pearl root (112588 AU/mg DW) in comparison to Goldfinger roots (6511 AU/mg DW) for control plants. After 3 days of inoculation with *P. parasitica* mycelium desmethoxychoisyine decreased in both Aztec pearl roots to 24896 AU/mg DW and Goldfinger at 10123 AU/mg DW. After 6 days of inoculation with mycelium, desmethoxychoisyine return to a similar level of the control roots (90549 AU/mg DW). The inoculation with zoospores for 3 and 6 days significantly reduced desmethoxychoisyine level in Aztec pearl roots to 20923 and 12516 respectively. In the case of Goldfinger, no significant change was detected with 10306 and 4053 AU/mg DW after 3 and 6 days respectively.

Platydesminium (Figure 8D) was detected in the control group with no significant difference between Aztec pearl and Goldfinger roots at 27073 and 22093 AU/mg DW. After 3 d of inoculation with mycelium, the concentration of platydesminium was significantly reduced in Aztec pearl and Goldfinger root to 0 and 7604 AU/mg DW respectively and after 6 d to 6981 and 8331 AU/mg DW. After 3 d of inoculation with zoospores, the concentration of platydesminium was significantly reduced in comparison to control in Aztec pearl and Goldfinger root to 10192 and 3215 AU/mg DW respectively and after 6 d to 0 and 0 AU/mg DW. No significant difference was detected between all the infected groups.

The unknown 4 (Figure 8E) was higher in Aztec pearl roots control in comparison to Goldfinger with 126414 and 29200 AU/mg DW respectively. After inoculation with mycelium, no significant change was observed. The inoculation with zoospores decreased the amount of unknown 4 in Aztec pearl to similar level of Goldfinger. After 3 d these amount was 25607 and

37916 AU/mg DW for Aztec pearl and Goldfinger respectively. 6 d after inoculation, the amount of unknown4 decreased to 4184 and 9411 AU/mg DW.

The unknown 5 (Figure 8F) was significantly higher in Aztec pearl roots control and after 6 d of inoculation with mycelium with 245576 and 249705 AU/mg DW respectively. In all the other groups the unknown5 was detected at levels significantly lower with no significant difference between them. For Goldfinger control group, 3 and 6 d of mycelium and zoospore inoculation the compound unknown 5 was detected between 2000 and 20000 AU/mg /DW. For Aztec pearl after 3 d of inoculation with mycelium and 3 and 6 d of inoculation with zoospores the level of unknown5 was between 10000 and 48000 AU/mg DW.

***In vitro P. parasitica* mycelium growth inhibition with alkaloids**

In vitro assays were performed in order to test the impact of alkaloids on the growth of *P. parasitica*. Four alkaloids detected either in control or infected roots of *C. ternata* were selected for this study. The commercial alkaloids were added separately to the liquid growth medium of *P. parasitica* to test their ability to reduce the growth of the pathogen (Figure 9). The chemical product SUBDUE GOLD (SG) was used as a positive control and methanol as negative control. The negative control indicates the maximum growth capacity of *P. parasitica*. The positive control (SG) at a concentration of 0.2 µg/ml significantly reduced the mycelium growth by 86.3% as compared to the negative control. The four alkaloids were tested at 6 different concentrations (0.1, 1, 10, 20, 40 and 100 µg/ml). Treatment with 0.1 µg/ml only significantly reduce the growth by 6% in the case of platydesminium (P) and with a concentration of 1 µg/ml no significant growth reduce has been detected. At 10 µg/ml, platydesminium and balfourodinium significantly reduced the growth by 13 and 8.4% respectively. Treatment with 20, 40 and 100 µg/ml reduced the growth this all the alkaloids. The treatment at 20 µg/ml significantly reduced the growth of *P. parasitica* by 15.3, 16, 22.4 and 32% with Choisyine (C), platydesminium (P), balfourodinium (B) and skimmiamine (S) respectively. The treatment at 40 µg/ml significantly reduced the growth by 12.9, 38.7, 34.9 and 46.4% with C, P, B and S respectively. Finally, the treatment with 100 µg/ml of alkaloid reduced the growth by 12.4, 26.5, 42 and 52.6% with C, P, B and S respectively.

Total alkaloids where extracted from the two cultivars Aztec pearl and Goldfinger vitroplants in order to compare their growth inhibition capacity (Figure 10A). The results show

that the alkaloids extracted from 0.2 g of Aztec pearl and Goldfinger fresh vitroplants tissue reduced the growth of *P. parasitica* by 11.6 and 2.5% respectively. In contrast, the alkaloids extracted from 1.25 g of Aztec pearl significantly increased the growth inhibition to 19.1% which is not the case for Goldfinger with a growth reduction of 4.3%. In addition, only the alkaloid extracted from 0.2 and 1.25 g of Aztec pearl significantly reduced the growth of the pathogen in comparison with negative control, but still significantly lower than the positive control.

The alkaloid extracted from total plants, from leaves and from roots of potted plants were also tested to compare their growth inhibition capacity (Figure 10B). Alkaloids extracted from Aztec pearl had a significantly higher growth reduction capacity in comparison to alkaloid extracted from Goldfinger. Alkaloids extracted from 1.25 g of Aztec pearl and Goldfinger fresh plants tissue reduced the growth of *P. parasitica* by 51.8 and 0.8% respectively. The alkaloid extracted from 1.25 g of fresh leaves tissue reduced the growth by 66.4 and 1.9% respectively and finally the alkaloid extracted from fresh roots tissue reduced the growth by 48.3 and 0.7% respectively. The growth reduction induced by the alkaloid extracted from Aztec pearl is significant in comparison to the negative control but still significantly lower than the positive control. No fraction of Goldfinger showed a significant reduction in comparison to the negative control.

Discussion

***C. ternata* roots are enriched in AGPs**

Recent data highlighted the importance of AGP in root-microbe interactions (Vicré *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012; Cannesan *et al.*, 2012). However, the molecular mechanisms involved in such interaction remained to be clearly established. Previous studies reported the presence of hydroxyproline in cell-suspension cultures from *C. ternata* suggesting the presence of AGP and/or extensins in this plant (Dirson *et al.*, 1990). To our knowledge no information is available regarding the characterization of AGP in *C. ternata*. The monosaccharide composition of AGP is highly complex and varies according to plant species, plant organs, plant tissues and plant development (Cannesan *et al.*, 2012; Bartels *et al.*, 2017). A comparison of AGP monosaccharide composition was performed between leaves and roots of the two *C. ternata* cultivars Aztec pearl and Goldfinger. The presence of AGPs were found

to occur in leaves and roots of both cultivar of *C. ternata*. Our study show that the estimated AGPs content is higher in Goldfinger than in Aztec pearl. Such difference in the amount of AGPs between the two cultivars is not surprising. Distinct content of hydroxyproline was previously recorded between cell-suspension cultures from two different cultivars of *C. ternata* and four different cultivars of *Phaseolus vulgaris* (Dirson *et al.*, 1990). These data indicated that AGP content is not only species-specific but also varies according to the type of cultivar reinforcing the notion of complexity of these proteoglycans. It is also interesting to note that AGPs were present in higher amount in roots as compared to leaves for both *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger. This result is in accordance with recent findings showing that root tissues are particularly enriched in AGP (Vicré *et al.*, 2005; Cannesan *et al.*, 2012). Furthermore, AGP were also found to be secreted in the rhizosphere suggesting that they play a key role in root-microbe interaction (Nguema-Ona *et al.*, 2013; Koroney *et al.*, 2016).

Monosaccharide composition and sugar linkage analysis

We found that arabinose and galactose were the major monosaccharides of the AGP fraction representing more than 90% of the carbohydrate composition. This is not surprising since these two monosaccharides are essential in AGP carbohydrate moiety (Seifert & Roberts, 2007; Ellis *et al.*, 2010; Cannesan *et al.*, 2012; Nguema-Ona *et al.*, 2013). The Ara:Gal ratio of the three AGP fractions from Aztec pearl leaves, Goldfinger leaves and roots ranged between 0.52 and 0.59. A similar Ara:Gal ratio was previously reported in *Brassica napus* root cap cells (0.62) (Cannesan *et al.*, 2012). However, the Ara:Gal ration of AGP from Aztec pearl roots was reduced to 0.3 which is relatively low as compared to the values reported in the literature. For example, the Ara:Gal ratio was estimated to 0.78 in pea root cap cells and 0.7 in cell cultures and seeds of *Araucaria angustifolia* and in *Picea abies* callus culture (Karácsonyi *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2010; Cannesan *et al.*, 2012). A much higher Ara:Gal ratio of 2.5 was even found in roots tissues of pea (Cannesan *et al.*, 2012). Our findings suggest a particular composition of the carbohydrate moiety of AGP from Aztec pearl roots. In order to gain more information, the sugar linkage analyses of AGP were performed. The results indicate the presence of similar linkages types amongst the different fractions of AGP (Table 3). As a consequence, the difference noticed in the carbohydrate composition of AGP from Aztec pearl roots relies in the abundance and organization of these linkages rather than the presence of different monosaccharide linkages.

An AGP epitope JIM 13 is differentially present in roots *versus* leaves of *C. ternata* Aztec pearl

The separation of AGPs on agarose gel and SDS-PAGE followed by staining with β -GlcY revealed the presence of smears, characteristic of the usual pattern of AGPs separation (Lu *et al.*, 2001). The presence of smears is probably related to the complexity, diversity and heterogeneity of AGPs in size and charge (Serpe & Nothnagel, 1996; Stöhr *et al.*, 1996). AGPs from *C. ternata* Aztec pearl roots were distinct from those extracted from *C. ternata* Aztec pearl leaves and *C. ternata* Gold Fingers. An additional population of AGP was found to occur in *C. ternata* Aztec pearl roots as compared to the others AGP fractions. With agarose gel electrophoresis, a smear of AGPs population with a Rf of 0.29 was detected in all AGPs samples but a second population with a Rf of 0.45 was also detected in the AGPs fraction obtained from *C. ternata* Aztec pearl roots. SDS-PAGE followed by β -GlcY staining also revealed a lower M_r population of AGPs specifically in Aztec pearl roots. Furthermore, the use of JIM13 antibody displayed the presence of a smear with all the samples except the fraction obtained from Aztec pearl roots. This data indicates that AGP from *C. ternata* Aztec pearl roots are different as compared to the others AGP analyzed in this study. The AGP epitope recognized by JIM13 mAb have already been detected in a wide range of root species included *A. thaliana*, *P. sativum* and *B. napus* roots (Vicré *et al.*, 2005; Cannesan *et al.*, 2012). It is thus surprising that JIM13 mAb failed to recognize this epitope in *C. ternata* Aztec pearl roots. Previous studies also revealed that this epitope was detected in abundance at the cell wall interface between the symbiotic interaction between *Alnus Glutinosa* and *Frankia* at the early stage of colonization (Berry *et al.*, 2002). The authors suggested that the JIM13 epitope might be involved in the guidance of the mycelium growth of *Frankia* growth during early stage of root colonization and/or help in the formation of a new plant cell wall at the entrance site (Berry *et al.*, 2002). Furthermore, the JIM13 epitope was also found to be specifically detected in root border-like cells in *A. thaliana* (Vicré *et al.* 2005). Root border-like cells are cells involved in root protection (Plancot *et al.*, 2013). As a consequence, it is tempting to speculate that AGP containing JIM13 epitope could also have a function in root-pathogens interaction.

***In vitro* AGPs treatment affects the growth of *P. parasitica* mycelium**

In vitro assays were performed in order to assess whether AGP from *C. ternata* roots are involved in the interaction with *P. parasitica*. The treatment of *P. parasitica* INRA-310

zoospores with the AGPs extracted from Aztec pearl and Goldfinger leaves and roots showed an impact on the subsequent growth of the mycelium (Figure 10). After 96 h and 144 h of treatment with AGPs, an increase in the mycelium growth occurred for AGP from *C. ternata* Aztec pearl leaves and *C. ternata* Aztec Goldfinger leaves and roots (Figure 10A). Interestingly *in vitro* treatment with AGP from *C. ternata* Aztec pearl roots failed to stimulate the growth of *P. parasitica* mycelium. One hypothesis to explain the increase in mycelium growth in presence of AGPs from Aztec pearl leaves and Goldfinger leaves and roots is that *P. parasitica* used these AGPs as an energy source. The absence of an increased growth after the treatment with AGPs extracted from Aztec pearl roots could be the result of the inability of *P. parasitica* to hydrolyze these AGP fraction to be used as an energy source. Rhizobacteria have the capacity to grow on pea mucilage containing AGP suggesting that these soil-borne microorganisms are able to hydrolyze and metabolize the sugar of the AGP carbohydrate moiety as energy source (Knee *et al.*, 2001). It was shown that different soil-borne microbes such as *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* produce AGP glycan-degrading enzyme as β -1,3-galactanases, β -1,6-galactanases, arabinofuranosidases and β -glucuronidases (Haque *et al.*, 2005; Takata *et al.*, 2010). An effect of AGP from the roots cap of *B. napus* and *P. sativum* was previously reported on the zoospores attraction, induction of encystment and inhibition of germination of *A. euteiches* zoospores (Cannesan *et al.*, 2012). These AGPs showed a structural difference between the two species, and these differences were reflected on their ability to attract *A. euteiches* zoospores. *P. sativum* AGPs attracted *A. euteiches* zoospores more efficiently than *B. napus*.

Metabolomics profile and inoculation effect

The analyses of the SM of *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger show the presence of 15 different alkaloids. Using HPLC-DAD-MS/MS, comparison with data from literature (O'Donnell *et al.*, 2006) and the comparison with purified standard 9 alkaloids (choisyine, skimmiamine, balfourodinium, platydesminium, Trimethoxyiodoquinolone, kokusaginine, choisyine isomer, Dimethylallyl- γ -fagarine and desmethoxychoisyine) of the 15 were identified (Table 1). The identified furoquinoline alkaloids has been previously found by (Boyd

et al., 2007) in the classic *C. ternata* leaves. This show that *C. ternata* Aztec pearl and Goldfinger roots are also riche with alkaloids and suggest some similarity in the nature of alkaloids composition between *C. ternata* classic and her two cultivar. The 6 unidentified alkaloids did not match with any standard in the laboratory or with any other alkaloids in our data base. To identify this alkaloids, a purification and analysis using nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray diffraction are needed (Eisenreich & Bacher, 2007).

The global alkaloid profile was different between the leaves of Aztec pearl and Goldfinger but not in the roots (Figure 2A). Theses profiles did not change after inoculation with *P. parasitica* mycelium and zoospores. The alkaloid profile of roots showed a difference between Aztec peal and Goldfinger in control and mycelium inoculated conditions. After inoculation with *P. parasitica* zoospores both profile become similar. In control conditions the alkaloids platydesminium, desmethoxychoisyine, unknown 4 et 5 were more concentrated in Aztec pearl roots. After inoculation with *P. parasitica* zoospores, these concentrations were reduced to a similar amount in Goldfinger. The reduction in alkaloids concentration could be due to their decomposition or detoxifying by the pathogen. These detoxifying process was observed before with microorganism degrading plants defense chemical to a less active form in order to infect the plant (Bouarab *et al.*, 2002). For example, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* produce tomatinases enzymes capable of degrading alpha-tomatine to a less active form (Ito *et al.*, 2004). *Rhizoctonia leguminosarum* was capable of degrading phytoalexines wyerone of *Vicia faba* (Görge & Werner, 1991) and *Fusarium pseudograminearum* degrade the phytoalexins benzoxazolinone (Kettle *et al.*, 2015). In these case the four alkaloids in our study could participate to the resistance in the early stages of infection, then they get degraded by the pathogen. These four alkaloids explain why the metabolic profile of roots become similar after inoculation with *P. parasitica* zoospores.

The inoculation with *P. parasitica* zoospores and mycelium have induced respectively choisyine and dimethylallyl- γ -fagarine in Aztec pearl roots. In the control condition these two alkaloid were not detected in the roots of Aztec pearl and Goldfinger. The induction of these two alkaloid in the roots suggest their important role in the defense against *P. parasitica*. These two alkaloid could be synthetized de novo or transported from the leaves to the roots. Lanoue *et al.*, (2010) showed the induction of secondary metabolite (t-cinnamic acid) in the roots of *Hordeum vulgare* L. cv. 'Barke' after inoculation with *fusarium graminearum* Schwabe

strain 1095. Nicotine is an alkaloid used in plant defense, this alkaloid is transported from the roots of *Nicotiana tabacum* to the leaves in order to defend the plant (Shitan *et al.*, 2015).

Effect of alkaloids on the growth of *P. parasitica* in a liquid medium

The addition of a single alkaloid or métalaxyl in the growth medium of *P. parasitica* have significantly reduced the growth of the pathogen (Figure 5A). The best mycelium growth inhibition was obtained after treatment with SUBDUE GOLD (métalaxyl). *Phytophthora* genus is capable of developing resistance against métalaxyl (Parra & Ristaino, 2001; Drenth *et al.*, 2006; Keinath, 2007). The inhibition with métalaxyl in our study, show that *P. parasitica* INRA-310 is not resistant to this chemical product. The four tested alkaloid were able to significantly reduce the mycelium growth at 20 µg/ml and 40 µg/ml. These results indicate the possible role of the alkaloids in the protection of *C. ternata* against *P. parasitica*. The role of quinoline derived alkaloids in defense mechanism has been suggested before in different study (Zhao *et al.*, 1998; Harkrader & Meyer, 2001; Emam *et al.*, 2010b; Nebo *et al.*, 2014; Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016). The mycelium growth inhibition with choisyine was significantly lower than the other alkaloids. Macel *et al.*, (2005) show an increase of the insects repulsive capacity of pyrrolizidine alkaloids when they are used in mix, which suggests the synergetic effect of an alkaloid mix. In the case of *C. ternata* and *P. parasitica*, choisyine could increase the efficacy of other alkaloids in inhibiting the growth of *P. parasitica*. growth inhibitions test with a mix of different alkaloids is needed in order to confirm this hypothesis.

From this principal, the total alkaloid extraction of Aztec pearl and Goldfinger were tested to inhibit *P. parasitica* mycelium growth. The total extract of vitroplants reduced significantly the mycelium growth of *P. parasitica*, but these reduction was not more than 20 %. In contrast, total alkaloids extract from potted plants significantly reduce the mycelium growth to more than 65 %. The difference observed between the total alkaloids of vitroplants and potted plants could be due to the difference in their environmental condition before extractions. Actually, vitroplants are present in sterile environment without any biotic and abiotic stress, contrary to potted plant which they are under biotic and abiotic stress. The accumulation and the production of high quantity of alkaloid is induced by biotic and abiotic stress (Zhao *et al.*, 2005; Akula & Ravishankar, 2011; Verma & Shukla, 2015). For example, one of the biggest challenges in alkaloids production in cell culture is the low production yield. One of the solution to increase the production is to induce and abiotic stress or to use elicitors

(Zhao *et al.*, 2005). Treatment with methyl jasmonate increased pyrrolizidine alkaloids production by *Echium rauwolfii* hairy root culture by 100 fold (Abd El-Mawla, 2010) and the production of alkaloids morphine and noscapine by opium poppy (Gurkok *et al.*, 2015). The treatment of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures by UV-C increased the production of terpenoid indole alkaloids (Moon *et al.*, 2017). The elicitation of *Tinospora cordifolia* cell culture by the autoclaved fungus *Piriformospora indica* increased the production of alkaloids jatrorrhizine et palmatine (Kumar *et al.*, 2017). The Goldfinger total alkaloid extract from vitroplants and from bottled plants was not able to inhibit *P. parasitica* mycelium growth. These results show that furoquinoline alkaloids have a biological activity against *P. parasitica*, and the different alkaloids composition of Aztec pearl offer a better protection against *P. parasitica*.

Literature Cited

Abd El-Mawla AMA. 2010. Effect of certain elicitors on production of pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Echium rauwolfii*. *Die Pharmazie* **65**: 224–226.

Adamska-Szewczyk A, Glowniak K, Baj T. 2016. Furochinoline alkaloids in plants from *Rutaceae* family – a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* **29**: 33–38.

Akula R, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1720–1731.

Attard A, Evangelisti E, Kebdani-Minet N, Panabières F, Deleury E, Maggio C, Ponchet M, Gourgues M. 2014. Transcriptome dynamics of *Arabidopsis thaliana* root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics* **15**: 538.

Bartels D, Baumann A, Maeder M, Geske T, Heise EM, von Schwartzberg K, Classen B. 2017. Evolution of plant cell wall: Arabinogalactan-proteins from three moss genera show structural differences compared to seed plants. *Carbohydrate Polymers* **163**: 227–235.

Berry AM, Rasmussen U, Bateman K, Huss-Danell K, Lindwall S, Bergman B. 2002. Arabinogalactan proteins are expressed at the symbiotic interface in root nodules of *Alnus* spp. *New Phytologist* **155**: 469–479.

Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A. 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889–892.

Boyd DR, Sharma ND, Loke PL, Malone JF, McRoberts WC, Hamilton JTG. 2007. Synthesis, structure and stereochemistry of quinoline alkaloids from *Choisya ternata*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**: 2983.

Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vicre-Gibouin M. 2012. Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination. *PLANT PHYSIOLOGY* **159**: 1658–1670.

de Carvalho PR, Ropero DR, Pinheiro MM, Fernandes PD, Boylan F. 2016. Quinoline Alkaloids Isolated from *Choisya Aztec-Pearl* and Their Contribution to the Overall Antinociceptive Activity of This Plant. *PLoS ONE* **11**.

Castilleux R, Ropitiaux M, Manasfi Y, Bernard S, Vicré-Gibouin M, Driouich A. Contributions to arabinogalactan proteins analysis. In: Popper ZA, ed. *The Plant Cell Wall. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Press.

Collinge DB. 2009. Cell wall appositions: the first line of defence. *Journal of Experimental Botany* **60**: 351–352.

Ding L, Zhu JK. 1997. A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* **203**: 289–294.

Dirson R, Grison R, Seris J-L. 1990. Prolyl 4-hydroxylase from in vitro cell cultures. *Journal of plant physiology* **136**: 444–450.

Does DV der, Boutrot F, Engelsdorf T, Rhodes J, McKenna JF, Vernhettes S, Koevoets I, Tintor N, Veerabagu M, Miedes E, et al. 2017. The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. *PLOS Genetics* **13(6)**: e1006832.

Drenth A, Wagels G, Smith B, Sendall B, O'Dwyer C, Irvine G, Irwin JAG. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* **35**: 147.

Eisenreich W, Bacher A. 2007. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry* **68**: 2799–2815.

Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? *Plant Physiology* **153**: 403–419.

Emam A, Eweis M, Elbadry M. 2010a. A new furoquinoline alkaloid with antifungal activity from the leaves of *Ruta chalepensis* L. *Drug Discoveries & Therapeutics* **4**: 399–404.

Engelsdorf T, Gigli-Bisceglia N, Veerabagu M, McKenna JF, Augstein F, Does D van der, Zipfel C, Hamann T. 2017. Pattern-Triggered Immunity And Cell Wall Integrity Maintenance Jointly Modulate Plant Stress Responses. *bioRxiv*: 130013.

Fincher GB, Stone BA, Clarke AE. 1983. Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. *Annual Review of Plant Physiology* **34**: 47–70.

Freeman, Beattie. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*.

Galiana E, Rivière M-P, Pagnotta S, Baudouin E, Panabières F, Gounon P, Boudier L. 2005. Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cellular Microbiology* **7**: 1365–1378.

Gane AM, Craik D, Munro SLA, Howlett GJ, Clarke AE, Bacic A. 1995. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. *Carbohydrate Research* **277**: 67–85.

Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB, Bacic A. 2004. Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. *Plant Physiology* **135**: 2162–2171.

Girault R, His I, Andeme-Onzighi C, Driouich A, Morvan C. 2000. Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres. *Planta* **211**: 256–264.

Görge E, Werner D. 1991. Degradation of wysterone, the phytoalexin of faba beans by *Rhizobium leguminosarum*. *Current Microbiology* **23**: 153–157.

Grünwald NJ, Werres S, Goss EM, Taylor CR, Fieland VJ. 2012. *Phytophthora obscura* sp. nov., a new species of the novel *Phytophthora* subclade 8d. *Plant Pathology* **61**: 610–622.

Gullino ML, Kuijpers LAM. 1994. Social and Political Implications of Managing Plant Diseases with Restricted Fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 559–581.

Gurkok T, Turktas M, Parmaksiz I, Unver T. 2015. Transcriptome Profiling of Alkaloid Biosynthesis in Elicitor Induced Opium Poppy. *Plant Molecular Biology Reporter* **33**: 673–688.

Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393–398.

Hamann T. 2015. The Plant Cell Wall Integrity Maintenance Mechanism—Concepts for Organization and Mode of Action. *Plant and Cell Physiology* **56**: 215–223.

Hansen. 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Env. Res.* **13**: 33–41.

Haque MA, Kotake T, Tsumuraya Y. 2005. Mode of action of beta-glucuronidase from *Aspergillus niger* on the sugar chains of arabinogalactan-protein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**: 2170–2177.

Harkrader RJ, Meyer DL. 2001. Pesticides comprising benzophenanthridine alkaloids.

Heredia A, Jiménez A, Guillén R. 1995. Composition of plant cell walls. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung* **200**: 24–31.

van Holst GJ, Clarke AE. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Analytical Biochemistry* **148**: 446–450.

van Holst G-J, Clarke AE. 1986. Organ-Specific Arabinogalactan-Proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill) Demonstrated by Crossed Electrophoresis. *Plant Physiology* **80**: 786–789.

Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A. 2016. The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science* **7**.

Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101–127.

Ito S, Eto T, Tanaka S, Yamauchi N, Takahara H, Ikeda T. 2004. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS letters* **571**: 31–34.

Johns SR, Lamberton JA, Sioumis AA. 1967. Alkaloids of *Choisya ternata* H.B. & K. (family Rutaceae). The structure of choisyine. *Australian Journal of Chemistry* **20**: 1975–1981.

Karácsonyi Š, Pätoprstý V, Kubačková M. 1998. Structural study on arabinogalactan–proteins from *Picea abies* L. Karst. *Carbohydrate Research* **307**: 271–279.

Keegstra K. 2010. Plant Cell Walls1. *Plant Physiology* **154**: 483–486.

Keinath AP. 2007. Sensitivity of Populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to Mefenoxam, Dimethomorph, Zoxamide, and Cymoxanil. *Plant Disease* **91**: 743–748.

Kettle AJ, Batley J, Benfield AH, Manners JM, Kazan K, Gardiner DM. 2015. Degradation of the benzoxazolinone class of phytoalexins is important for virulence of *Fusarium pseudograminearum* towards wheat. *Molecular Plant Pathology* **16**: 946–962.

Knee EM, Gong F-C, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD. 2001. Root Mucilage from Pea and Its Utilization by Rhizosphere Bacteria as a Sole Carbon Source. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 775–784.

Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Vicré-Gibouin M. 2016. Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**: 797–808.

Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* **102**: 348–364.

Kumar P, Srivastava V, Chaturvedi R, Sundar D, Bisaria VS. 2017. Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from in vitro cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook. F. & Thoms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **130**: 417–426.

Lanoue A, Burlat V, Henkes GJ, Koch I, Schurr U, Röse USR. 2010. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytologist* **185**: 577–588.

Larousse M, Galiana E. 2017. Microbial Partnerships of Pathogenic Oomycetes. *PLOS Pathogens* **13**: e1006028.

Leitão GG, Pereira JPB, Carvalho PR de, Ropero DR, Fernandes PD, Boylan F. 2017. Isolation of quinoline alkaloids from three *Choisya* species by high-speed countercurrent chromatography and the determination of their antioxidant capacity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **27**: 297–301.

Lionetti V, Métraux J-P. 2014. Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Liu Y, Shi J, Feng Y, Yang X, Li X, Shen Q. 2013. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer. *Biology and Fertility of Soils* **49**: 447–464.

Lu H, Chen M, Showalter AM. 2001. Developmental expression and perturbation of arabinogalactan-proteins during seed germination and seedling growth in tomato. *Physiologia Plantarum* **112**: 442–450.

Macel M, Bruinsma M, Dijkstra SM, Ooijendijk T, Niemeyer HM, Klinkhamer PGL. 2005. Differences in Effects of Pyrrolizidine Alkaloids on Five Generalist Insect Herbivore Species. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 1493–1508.

Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**: 178.

Maurer JBB, Bacic A, Pereira-Netto AB, Donatti L, Zawadzki-Baggio SF, Pettolino FA. 2010. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* **71**: 1400–1409.

Meng Y, Zhang Q, Ding W, Shan W. 2014. *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology* **5**: 43–51.

Miedes E, Vanholme R, Boerjan W, Molina A. 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Montagu M, Levillain P, Rideau M, Chénieux JC. 1981. Absorption et fluorescence d'alcaloïdes quaternaires dérivés de la quinoléine: applications analytiques. *Talanta* **28**: 709–716.

Montagu-Bourin M, Rideau M, Levillain P, Chénieux JC. 1980. Spectrofluorométrique. Déterminations de Dihydrofuroquinoline Alcaloïdes in *Choisya ternata* Tissue and Cell Cultures. *Planta Medica* **38**: 50–53.

Moon SH, Mistry B, Kim DH, Pandurangan M. 2017. Antioxidant and anticancer potential of bioactive compounds following UV-C light-induced plant cambium meristematic cell cultures. *Industrial Crops and Products* **109**: 762–772.

Nebo L, Varela RM, Molinillo JMG, Sampaio OM, Severino VGP, Cazal CM, Fernandes MF das G, Fernandes JB, Macías FA. 2014. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the *Rutaceae* and *Meliaceae* families. *Phytochemistry Letters* **8**: 226–232.

Nguema-Ona E, Andème-Onzighi C, Aboughe-Angone S, Bardor M, Ishii T, Lerouge P, Driouich A. 2006. The reb1-1 mutation of *Arabidopsis*. Effect on the structure and localization of galactose-containing cell wall polysaccharides. *Plant Physiology* **140**: 1406–1417.

Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicré-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* **110**: 383–404.

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A. 2013. Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**: 440–449.

O'Donnell F, Ramachandran VN, Smyth WF, Hack CJ, Patton E. 2006. A study of the analytical behaviour of selected synthetic and naturally occurring quinolines using electrospray ionisation ion trap mass spectrometry, liquid chromatography and gas chromatography and the construction of an appropriate database for quinoline characterisation. *Analytica Chimica Acta* **572**: 63–76.

Parra G, Ristaino JB. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease* **85**: 1069–1075.

Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vicre-Gibouin M. 2013. Deciphering the Responses of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* and Flax to Pathogen-Derived Elicitors. *PLANT PHYSIOLOGY* **163**: 1584–1597.

Popper ZA. 2011. Extraction and detection of arabinogalactan proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **715**: 245–254.

Radulović NS, Miltojević AB, McDermott M, Waldren S, Parnell JA, Pinheiro MMG, Fernandes PD, de Sousa Menezes F. 2011. Identification of a new antinociceptive alkaloid isopropyl N-methylantranilate from the essential oil of *Choisya ternata* Kunth. *Journal of Ethnopharmacology* **135**: 610–619.

Seifert GJ, Roberts K. 2007. The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 137–161.

Serpe MD, Nothnagel EA. 1996. Heterogeneity of arabinogalactan-proteins on the plasma membrane of rose cells. *Plant Physiology* **112**: 1261–1271.

Shen S-S, Piao F-Z, Lee BW, Park CS. 2007. Characterization of Antibiotic Substance Produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the Biological Control Activity against Pepper *Phytophthora* Blight. *The Plant Pathology Journal* **23**: 180–186.

Shitan N, Hayashida M, Yazaki K. 2015. Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum*. *Plant Signaling & Behavior* **10**:7, e1035852.

Showalter AM. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1399–1417.

Stöhr C, Snogerup L, Pennell RI, Kjellbom P. 1996. An agarose gel electrophoresis method for the separation of arabinogalactan proteins. *The Plant Journal* **10**: 943–948.

Takata R, Tokita K, Mori S, Shimoda R, Harada N, Ichinose H, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Tsumuraya Y, et al. 2010. Degradation of carbohydrate moieties of arabinogalactan-proteins by glycoside hydrolases from *Neurospora crassa*. *Carbohydrate Research* **345**: 2516–2522.

Talbot D, Wedgwood E. 2009. *Choisya*: surveys of the occurrence of root rotting and potential causes. Horticultural Development Company project HNS 169.

Verma N, Shukla S. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2**: 105–113.

Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology* **138**: 998–1008.

Willats WG, Knox JP. 1996. A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **9**: 919–925.

Wink M. 2010. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. In: Wink M, ed. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 1–19.

Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA. 2012. A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **25**: 250–258.

Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* **105**: 1C–2C.

Yariv J, Rapport MM, Graf L. 1962. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* **85**: 383–388.

York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P. 1986. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. In: *Plant Molecular Biology. Methods in Enzymology*. Academic Press, 3–40.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **23**: 283–333.

Zhao W, Wolfender JL, Hostettmann K, Xu R, Qin G. 1998. Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry* **47**: 7–11.

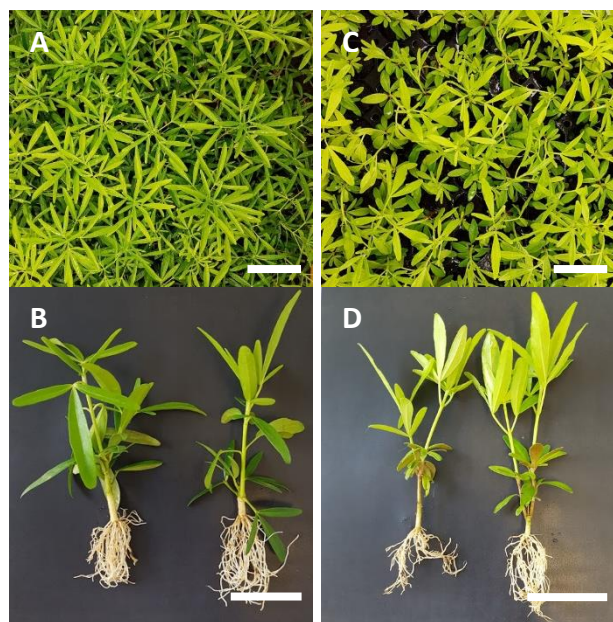


Figure 1: Seedling *C. ternata* plants from André Briant Jeunes Plants nursery used for AGPs extractions. (A) *C. ternata* Aztec Pearl (AP) in seedling cells tray. (B) *C. ternata* Aztec Pearl (AP) after washing the soil off the roots. (C) *C. ternata* Gold Finger (GF) in seedling cells tray. (D) *C. ternata* Gold Finger (GF) after washing the soil off the roots. Seedling cells tray of 54x31cm (104 cells). Bars = 3 cm.

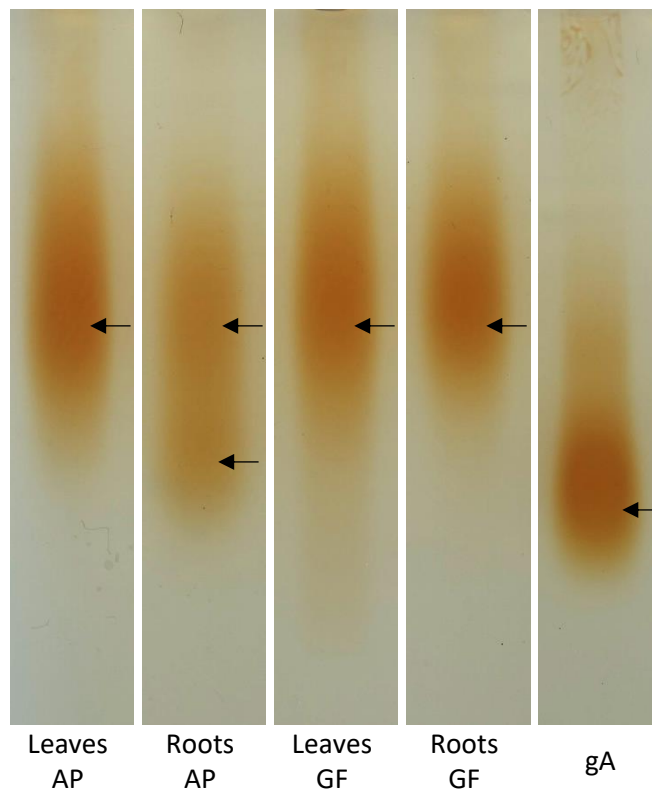


Figure 2 : Characterization of β -GlcY precipitate using electrophoresis methods. Agarose gel electrophoresis reveal the linear profiles of 20 μ g arabinogalactane protein of *Choisya ternata* Aztec pearl (AP), *C. ternata* Gold finger (GF) leaves and roots and of 20 μ g of gum Arabic (gA) after staining with β -GlcY reagent. Black arrows indicate the populations of arabinogalactane proteins.

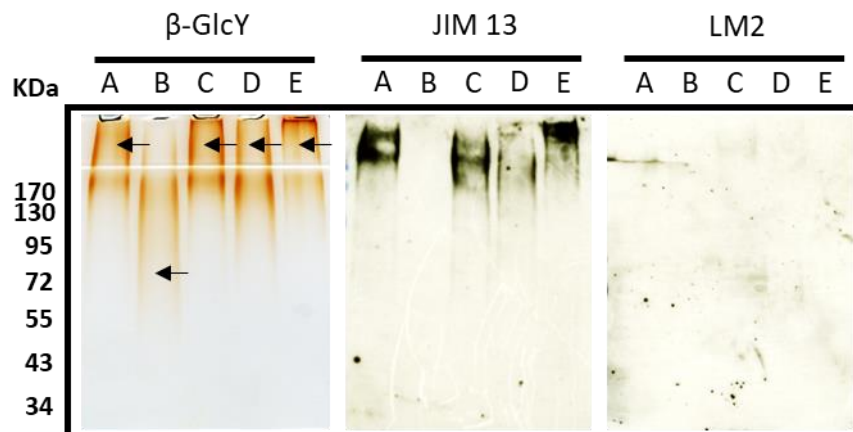


Figure 3 : SDS-PAGE, β -GlcY staining and western blot of β -GlcY precipitate obtained from *C. ternata* Aztec Pearl and Gold Finger leaves and roots. (A) *Choisy ternata* Aztec Pearl leaves, (B) *Choisy ternata* Aztec Pearl roots, (C) *Choisy ternata* Gold Finger leaves, (D) *Choisy ternata* Gold Finger roots and (E) gum Arabic. 25 μ g of each sample were run on SDS-PAGE gel and stained in β -GlcY. An other SDS-PAGE gel were blotted on nitrocellulose membrane and labeled with AGPs antibodies (JIM 13 and LM 2). Molecular mass is indicated in KDa.

A

Sugar	Leaves AP	Roots AP	Leaves GF	Roots GF
mol %				
Ara	33 ± 0.8	22 ± 1.3	34 ± 1	35 ± 3.8
Rha	1 ± 0.1	0	1 ± 0.0	1 ± 0.1
Fuc	0	0	0	0
Xyl	3 ± 0.3	3 ± 0.2	3 ± 0.5	3 ± 0.6
GlcA	0	0	0	0
Man	0	1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Gal	63 ± 0.5	73 ± 0.9	61 ± 0.7	60 ± 3.3
GalA	0	1 ± 1.1	1 ± 0.6	0.4 ± 0.7

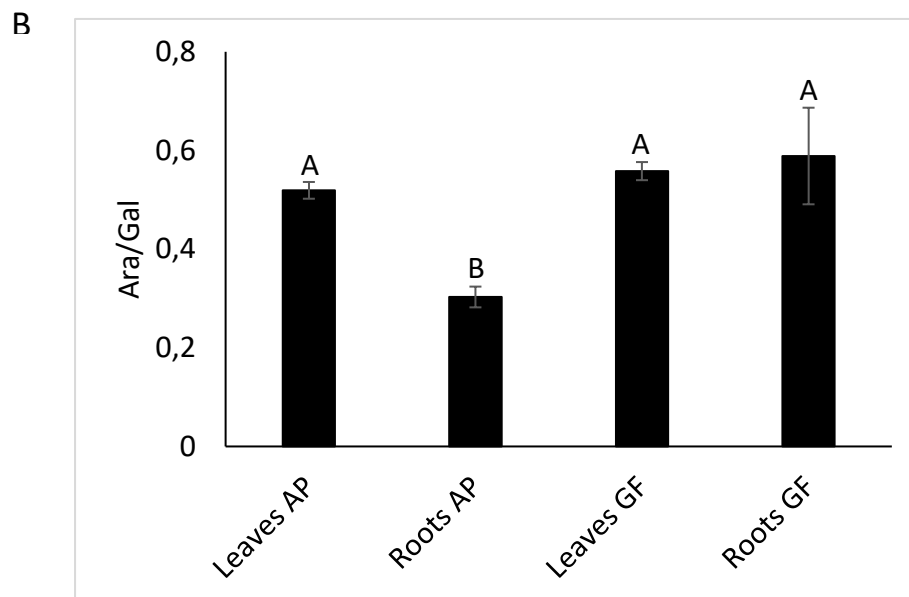


Figure 4 : Monosaccharide composition of β -GlcY precipitate obtained from *Choisya ternata* Aztec pearl and Gold finger leaves and roots (A) and Ara:Gal ration (B). Significance (Tukey post multiple comparison test after ANOVA) $p < 0.05$. Bars plot means \pm SD of three replicates.

Table 1 : Linkage analysis of β -GlcY precipitate obtained from AP and GF (I and II) leaves and roots.

All samples linkages
3,6-Gal
3-Gal
5-Araf
T-Araf
6-Gal
2,5-Araf
3,5-Araf
T-Gal
3-Araf
2-Araf
T-Xyl

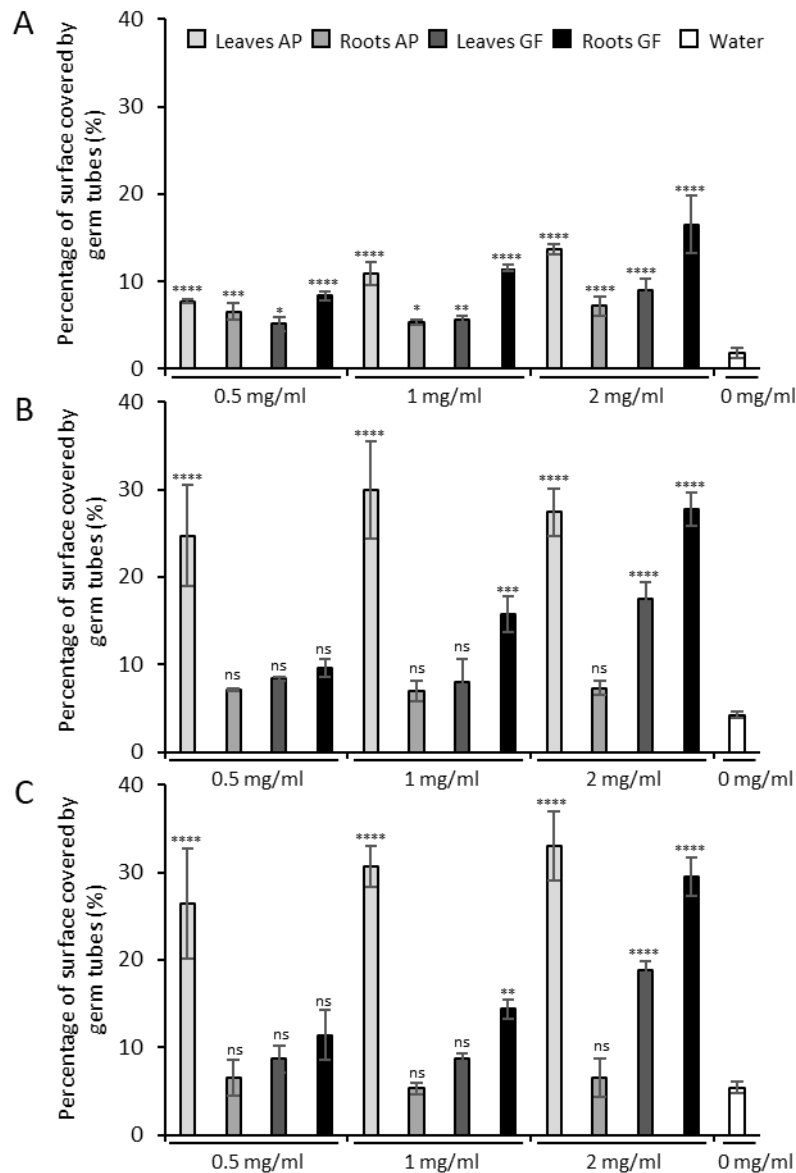


Figure 5 : Quantification of *P. parasitica* germ tubes growth. The percentage indicate the surface covered by germ tubes after treatment with AGPs obtained from *C. ternata* Aztec pearl (AP) and Gold finger (GF) leaves and roots with different concentrations (0.5, 1 and 2 mg/ml). (A) quantification after 48h of treatments, (B) quantification after 96h of treatments and (C) quantification after 144h of treatments. Significance (Dunnett's post multiple comparison test after ANOVA): *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.00005 vs the water control group. Bars plot means \pm SD of three replicates with 3500 zoospores per replicate.

Table 2 : Alkaloid compounds identified by LC-MS-MS in leaves and roots extract of *Choisya ternata* Aztec pearl and Gold finger

Compound name	Retention time (min)	Molecular mass	Mass spectrum (m/z)			λ (max)
			[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	Fragment ions (positive mode)	
Platydesminium	24,9		274		256, 202	217, 237, 295
Balfourodinium	30,3	304	304		286, 232	213, 254, 301, 337
Trimethoxyiodoquinolone	39,2	361	362	384		252, 320
Skimmiamine	39,8	259	260	282	245	210, 250, 321
Choisyine	40,1	329	330	352	256	220, 258, 320
Kokusaginine	40,9	259	260	282	245, 227	251, 322
Choisyine isomer	46,8	329	330	352	258	250, 321
Dimethylallyl- γ -fagarine	56,8	313	314	336	246, 231, 188	251, 321
Unknown6	63,2	327	328	350	302, 256	252, 318
Unknown2	53,7	375	376	398	228, 236	237, 366
Unknown3	54,8	228	229	251	213	224, 265, 347
Unknown4	59,2	242	243	265	201, 189	218, 299
Unknown5	60,8	244	245	267	219, 189	203, 257, 322
Desmethoxychoisyine	73,5	299	300	321	231, 175	205, 258, 322
unknown1	50,3	241	242	264		222, 347

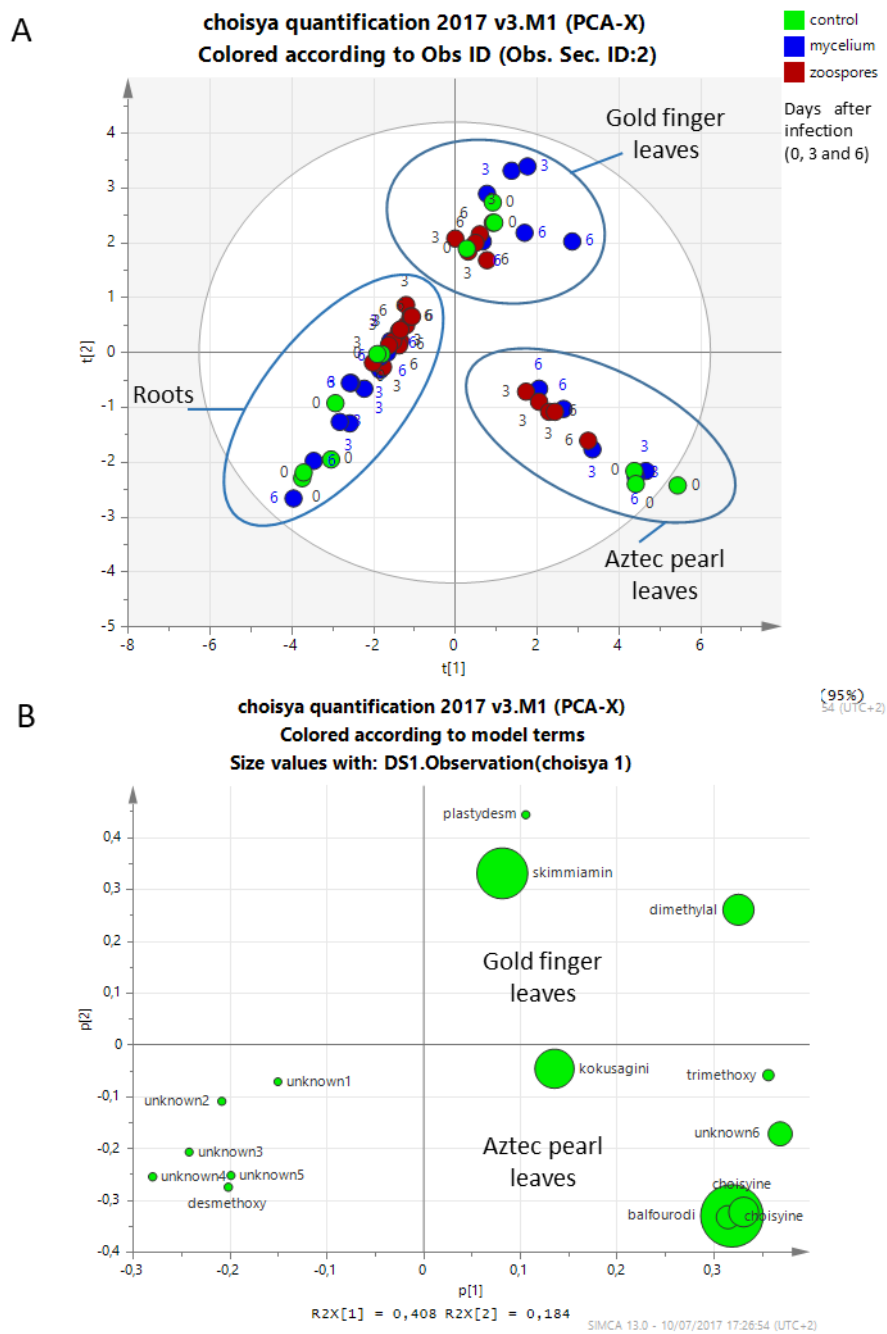


Figure 6 : Global metabolomics profile of *Choisya ternata* cultivars Aztec pearl and Goldfinger. (A) Global PCA plot of *Choisya ternata* Aztec pearl and Goldfinger. (B) Global loading plot of *Choisya ternata* Aztec pearl and Goldfinger.

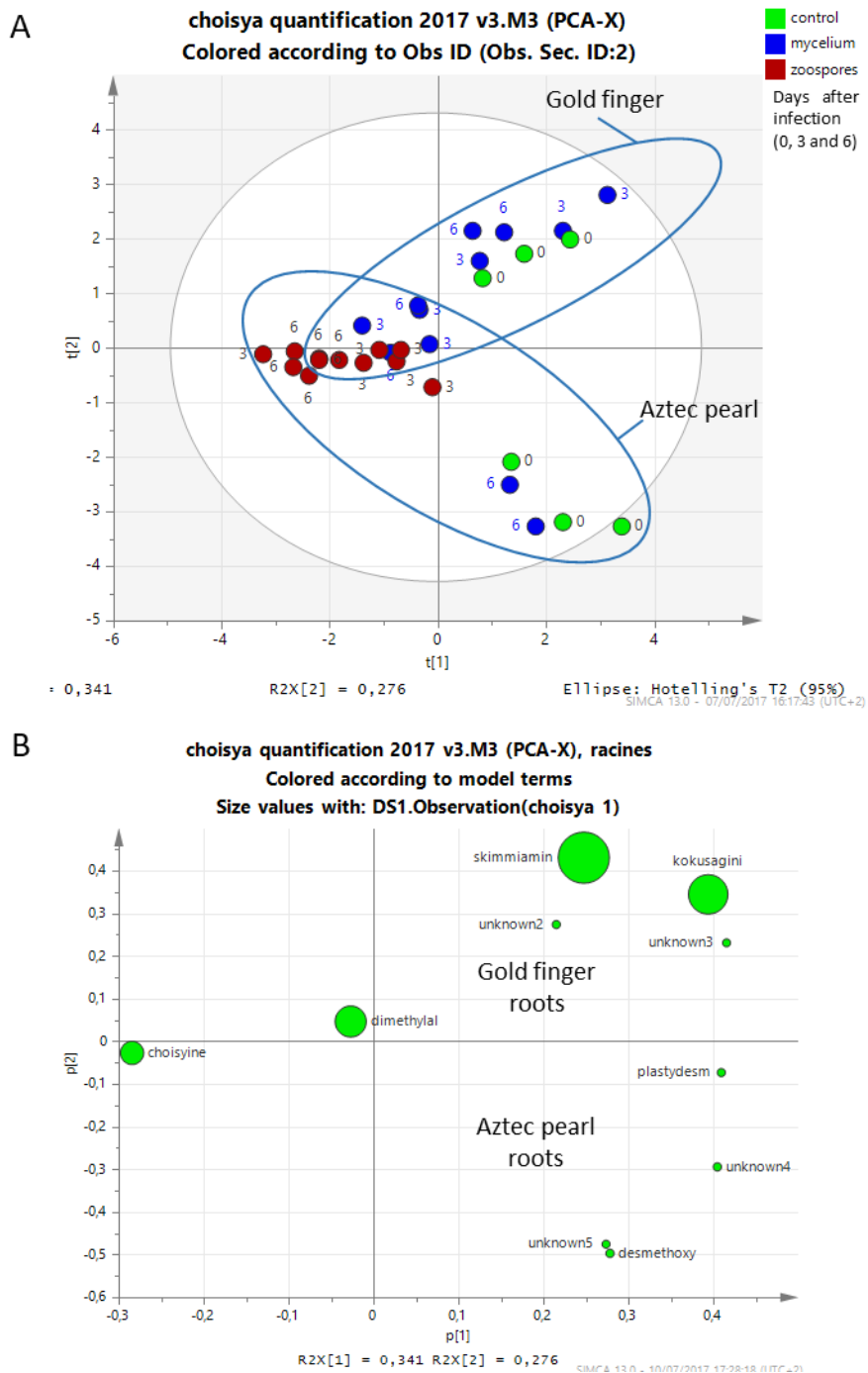


Figure 7 : Roots metabolomics profile of *Choisya ternata* cultivars Aztec pearl and Goldfinger. (A) PCA plot of *Choisya ternata* Aztec pearl and Goldfinger roots. (B) Loading plot of *Choisya ternata* Aztec pearl and Gold finger roots.

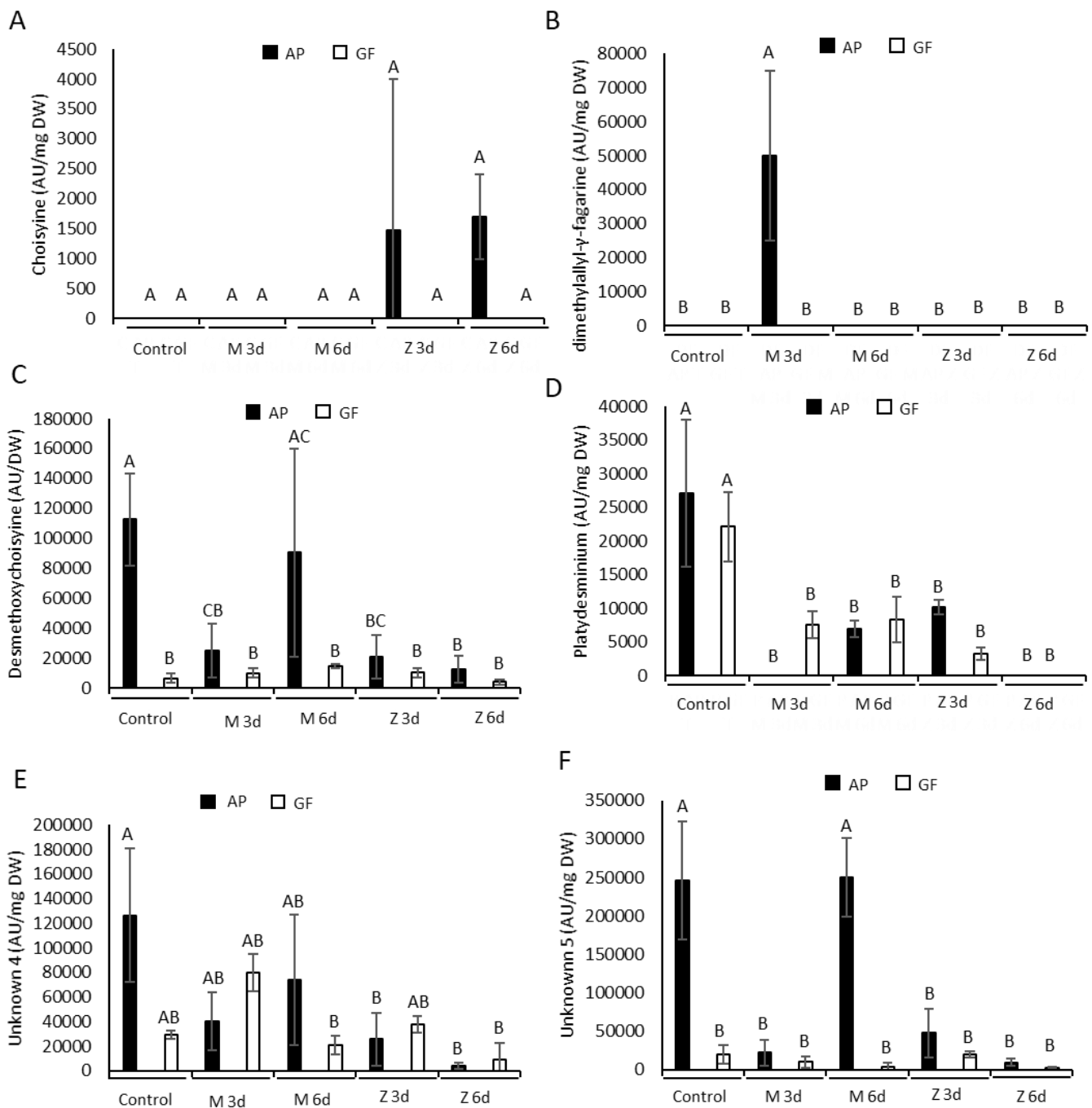


Figure 8 : Quantification of 4 alkaloids in the roots of the two cultivar Aztec pearl (AP) and Goldfinger (GF) in control condition (no infection), after 3 and 6 days of infection with mycelium (M) and zoospores (Z). (A) Choisyine, (B) Dimethylallyl-γ-fagarine, (C) Desmethoxychoisyine, (D) Platydesminium, (E) Unknown 4 and (F) Unknown 5. Significance (Tukey post multiple comparison test after ANOVA) $p < 0.05$. Bars plot means \pm SD of three replicates.

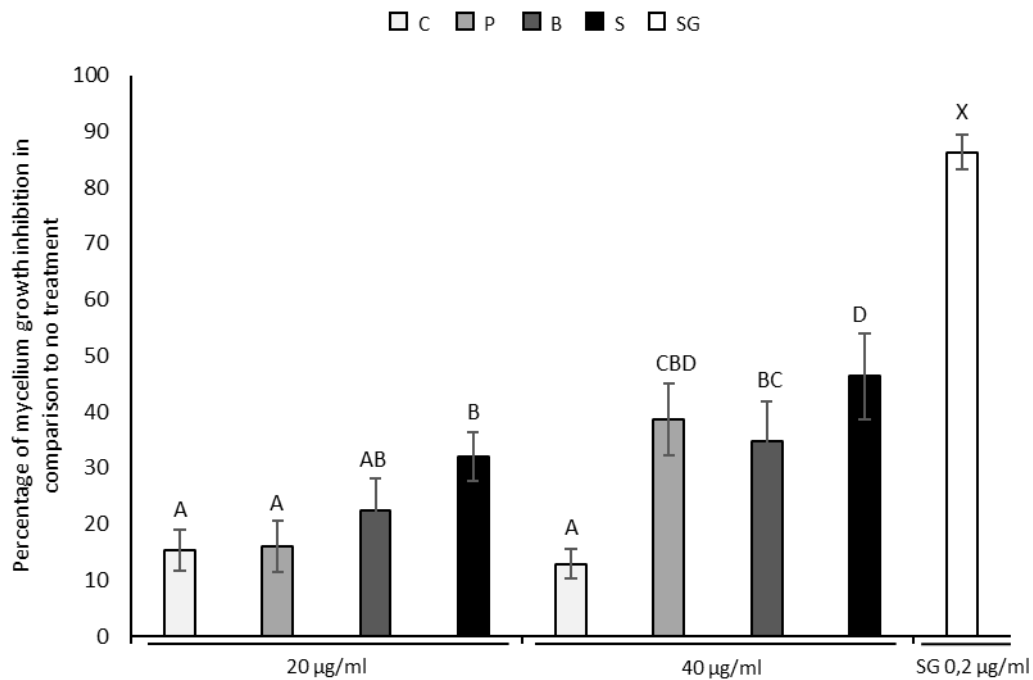


Figure 9 : Quantification of *P. parasitica* mycelium growth inhibition. The percentage indicate the mycelium growth inhibition after treatment with chemical product (SG : SUBDUE GOLD) at 0,2 µg/ml and different alkaloids (C : Choisyine, P : Platydesminium, B : Balfourodinium and S : Skimmiamine) at 20 and 40 µg/ml in comparison to no treatment. Significance for A (Tukey post multiple comparison test after ANOVA) $p < 0.05$. Bars plot means \pm SD of five replicates.

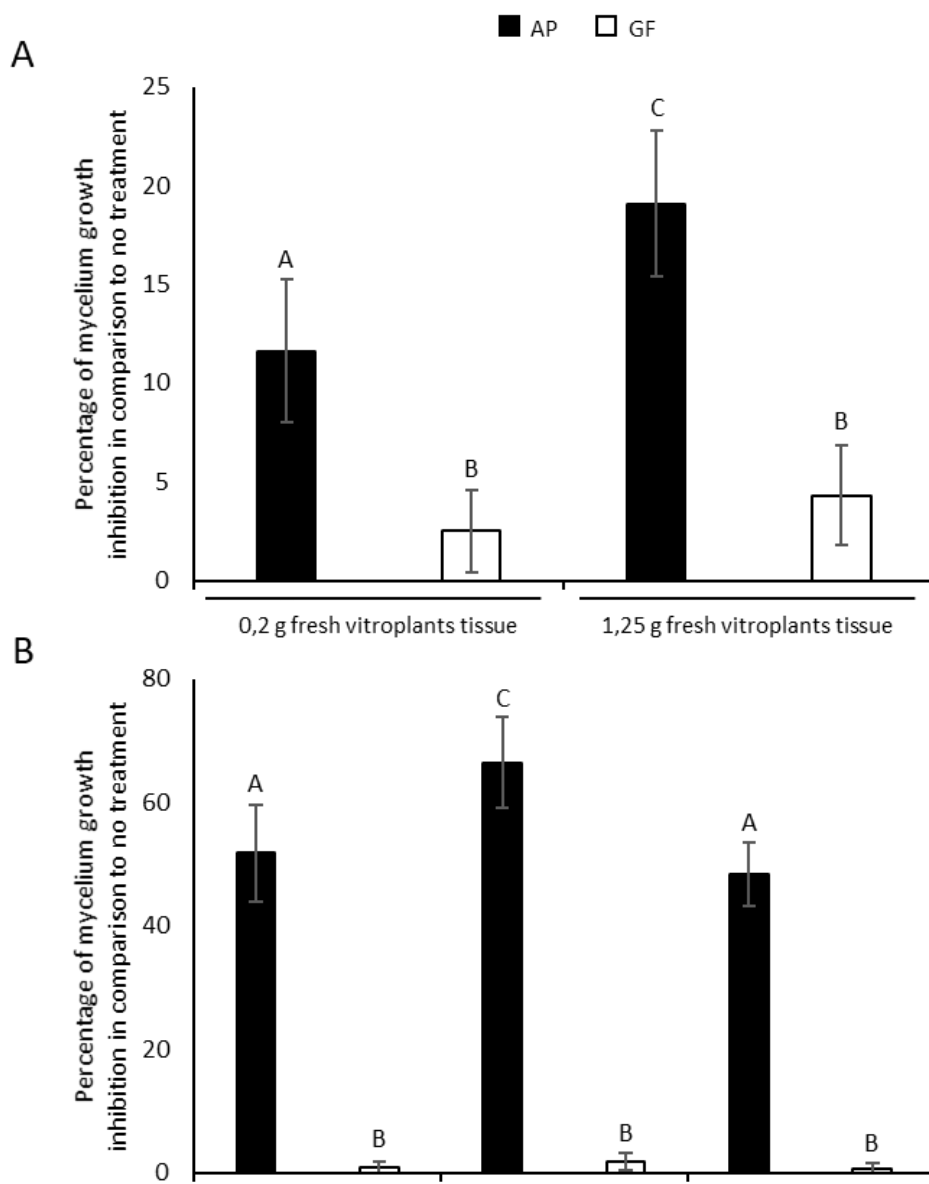


Figure 10 : Quantification of *P. parasitica* mycelium growth inhibition. The percentage indicate the mycelium growth inhibition after different treatment with total alkaloids extracted from 0,2 g and 1,25 g of *C. ternata* Aztec pearl (AP) and Gold finger (GF) fresh tissues. Significance (Tukey post multiple comparison test after ANOVA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.00005$. Bars plot means \pm SD of five replicates.

Publication N°2: research paper

Is Biocontrol an alternative solution for *Choisya ternata* root rot disease caused by *Phytophthora parasitica*?

Youssef Manasfi, Marc-Antoine Cannesan, Wassila Riah, Mélanie Bressan, Karine Laval, Azeddine Driouich, Maïté Vicré and Isabelle Trinsoutrot-Gattin*

Submitted to *Plant Disease Journal* le 28 Juillet 2017

Choisya ternata est une plante ornementale largement vendue en France. L'infection de *C. ternata* par *Phytophthora parasitica* peut engendrer des pertes économiques importantes dues à la maladie de la pourriture racinaire. Les oomycètes du genre *Phytophthora* sont capables de développer une résistance contre les produits chimiques, de plus ces produits ont un impact négatif sur l'environnement et la santé. Ainsi il s'avère nécessaire de développer de nouveaux moyens de protection contre l'infection par *P. parasitica* permettant de préserver l'environnement et la santé humaine. Parmi les traitements durables et écologiques, l'utilisation d'agents de contrôle biologique s'avère être une solution prometteuse. Cette étude a pour objectif d'étudier l'effet d'agents de contrôle biologique dans la protection racinaire de *C. ternata* contre *P. parasitica*. Pour cette étude, quatre espèces différentes d'agents biologiques utilisés en pépinière et qui ont montré une capacité à protéger des plantes contre des *Phytophthora* ont été sélectionnés. Ces espèces sont, *Glomus intraradices*, *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma atroviridae* et *Bacillus amyloliquefaciens* qui ont été apportés par des traitements individuels et des traitements combinés.

Des plantes de *C. ternata* en pot ont été inoculées par du mycélium de *P. parasitica*. L'évaluation de ces traitements est réalisée par un suivi des symptômes apparaissant au cours du temps sur la plante. Par ailleurs, afin de quantifier la présence du pathogène dans le substrat, des outils moléculaires ont été développés. Pour cela nous avons décidé d'utiliser les amorces spécifiques au genre *Phytophthora* YPh1F et YPh2R ciblant le gène *ypt1* pour développer une PCR quantitative en temps réel afin de quantifier et de suivre le développement de *P. parasitica* dans le substrat. *ypt1* code des protéines qui jouent un rôle dans le transport vésiculaire au niveau du réticulum endoplasmique. Cette approche nous permet de détecter et quantifier différentes espèces de *Phytophthora* dans le substrat.

Nos résultats montrent que les traitements combinés de *G. intraradices* associé à *G. catenulatum*, et de *G. intraradices* associé à *T. atroviridae* permettent de réduire la sévérité des symptômes de *C. ternata*, ainsi que le développement de *P. parasitica* dans le substrat. Un autre traitement combiné par *G. catenulatum* et *B. amyloliquefaciens* a augmenté la sévérité des symptômes de *C. ternata* et le développement de *P. parasitica* dans le substrat. Aucun traitement individuel n'a montré un effet significatif sur le pathogène. Le niveau d'inhibition plus élevé des traitements combinés montre l'avantage de cette stratégie. Ces résultats doivent être complétés par des tests de protection par un traitement combiné de trois et/ou quatre agents de biocontrôle.

Mots clés : horticulture, pépinière, *Choisya ternata*, oomycète, *Phytophthora parasitica*, lutte alternatif, agents de contrôle biologique, qPCR, *ypt1*, détection de pathogène, pratique culturelle, la gestion des maladies.

Les réponses de reviewers

Manuscript ID PDIS-07-17-1119-RE entitled "Is Biocontrol an alternative solution for *Choisya ternata* root rot disease caused by *Phytophthora parasitica*?", which you submitted to Plant Disease, has been reviewed. The comments from reviewers are included at the bottom of this letter.

In view of the criticisms of the reviewers, I must reject the manuscript for publication in Plant Disease at this time. However, a new manuscript may be submitted that takes into consideration these comments.

I want to apologize for the delay in returning the review. One of the reviewers and myself were disrupted by hurricane Irma, and impacted our schedules for nearly two weeks.

Overall, both reviewers and myself believe this work is publishable. However, to publish in Plant Disease experiments must be replicated at least once. You performed only one trial; this is a fatal flaw in your manuscript. If you chose to consider publishing this work in Plant Disease, you will need to repeat the experiment. Realize that BC experiments will often need multiple trials due to the variability in results. It is not only important that experiments are replicated, but results among repeated trials should closely match. In addition to the need to replicate your experiments, there are numerous other aspects that will at some point need to be addressed. R1 provides a good start to some of the questioning that you will need to address in any future submission. Thus, if in the future you plan to resubmit to PD, you may want to address these criticisms now.

Please note that resubmitting your manuscript does not guarantee eventual acceptance and that your resubmission will be subject to re-review by the reviewers before a decision is rendered.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of your manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer.

Once you have revised your manuscript, go to <https://mc.manuscriptcentral.com/plantdisease> and log in to your Author Center. Click on "Manuscripts with Decisions," and then click on "Create a Resubmission" located next to the manuscript number. Then, follow the steps for resubmitting your manuscript.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Plant Disease, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision within a reasonable amount of time, we will consider your paper as a new submission.

I look forward to a resubmission.

Sincerely,

Dr. William Turechek

Senior Editor, Plant Disease

william.turechek@ars.usda.gov

Reviewers' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

Plant Disease manuscript PD-07-17-1119-RE

Is Biocontrol an alternative solution....by *P. parasitica*? By Manasfi et al.

Overall the manuscript reports interesting work using biocontrol agents (BCA). I am not sure if the title appropriately reflect the experiments done by the authors. Mefenoxam (Subdue Gold) was the best treatment in the trials they conducted. The BCA treatments and various combinations did not seem very effective in managing root rot. Hence my question about the title.

Why not use the common name "Mexican orange" in the title and in the text. that would make it easier to read.

The authors have conducted numerous experiments to confirm the levels of *P. parasitica* in the growing media and this is good. I realize such experiments may be hard to conduct and take time. But the field experiments need to be repeated over two to three seasons to be sure of the results of the various treatments. Especially since they are BCA treatments. For the second season, the authors could have reduced the number of treatments based on results of their first trial and repeated their experiments. That is choose your best and most effective treatments and redo the experiment. Plant Disease does not accept manuscripts with simply one season of data from field experiments.

In addition no statistical analysis of data was performed for graph in Figure 4, to really say which treatment worked the best. It may be a better idea to present this data as a table with appropriate statistical analysis (e.g. PROC GLIMMIX).

The manuscript was too long and not in the appropriate style for Plant Disease. It seemed like the sections were arranged for some other journal (e.g. Crop protection). Please consult the author guidelines and a recent manuscript from Plant Disease for appropriate style.

For someone not very familiar with all pathogen names it may be a good idea to indicate what each biocontrol agent you tested is. That is bacterial or fungal. I realize Bacillus is bacterial BCA, but some people may not know off hand.

Why were a combination of three BCA not tested? Or a combination of all 4 not tested? Just a thought.

Other comments and suggestions:

Page 1, Line 19. In the text at some places it says you tested five BCA and in the abstract it says 4? Please check.

Page 2, line 23: Please consider using the word development or growth instead of evolution. The pathogen is not evolving it is growing or developing in the substrate. (It may be evolving, but that is not being proven in this manuscript).

The abstract should be re-written. There should be a concluding line to synthesize the results of your work.

Page 2, Line 42: Please cite reference. There are too many places in the manuscript that need references. Please check carefully.

Page 3, Line 48: Please cite appropriate reference.

Page 7, line 133: Phytophthora cultures were maintained. Use the word maintained instead of performed.

Page 10, Line 206: It should be Subdue Gold instead of "Dold" Pl. check spelling.

Page 10, line 206: It says 5 BCA treatments. Abstract and rest of text says 4. Please check carefully.

Page 10, Line 212: Why use mefenoxam, when resistance to this chemical is prevalent widely for many Phytophthora's?? Did you evaluate your strain of *P. parasitica* in the lab using plate assay to test for sensitivity to mefenoxam?

Page 11, Line 226: The experiment was performed only once. This experiment should be repeated at least once more for the results to be published.

Page 20, Line 407: Spelling of oomycete...it says oocyte

Page 36, line 747: The reference Talbot and Wedgewood seems to be incomplete. This has been referred to extensively throughout the manuscript. Please check and complete the reference. Is this a book? Add HNS169, total Pages 44 etc. for completing the reference.

Page 38, Table 1,: ...and application methods. The information in the table can easily be written up.

Page 39, Table 2. The information in table 2 can be easily written up in the material and methods. Please delete table 2. Plus it is not easy to refer back to table 2 all the time when looking at the results in the figures.

Page 40, Legend for figure 1. What does the 120 P. parasitica mean? Please explain.

Page 41, Figure 2. Figure 2 is not necessary. This information was provided in the text. Please remove figure 2.

Page 42, Figure 3. Why not plot the lines for P. parasitica detection in the substrate and directly from mycelium and provide R values as well or correlation coefficients.

Page 43, figure 4. This is the key figure for this manuscript. Please consider putting this information in a table form. The figure is very confusing and there is no statistical analysis to help the reader figure out which treatments were significantly different from one another. What is the difference between T1 and Ti1. This was not clearly explained. Please include this information in your figure legend. What does the I stand for??

Based on this figure, only mefenoxam seemed to work. But even then some plants were infected. Plus is the result for mefenoxam significantly different from Ai and Bi? This is not clear. None of the BCA treatments from Ci to Hi seem to be effective, and hence my question about the title.

I am assuming I means inoculated with P. parasitica. This should be indicated in the legend.

Page 44, Figure 5. Please explain what do the small i mean? Inoculated?? Was T2i treated with mefenoxam and then inoculated or inoculated and then treated?? Again this is all based on one season of data. The trails need to be repeated.

Reviewer: 2

Comments to the Author

The manuscript describes experiments evaluating biological control agents to reduce disease severity of Phytophthora on C. ternata. Although the experiments were quite extensive, it does not appear that the experiments involving the biocontrol assays on plants were repeated. If this is the case, that the inoculation trial or other experiments, were not repeated, this paper is not suitable for publication. If I have read the manuscript and interpreted it in error, then I would be willing to do a more thorough, objective, and expedited review of the paper.

Plant Disease



Is Biocontrol an alternative solution for *Choisya ternata* root rot disease caused by *Phytophthora parasitica*?

Journal:	<i>Plant Disease</i>
Manuscript ID	PDIS-07-17-1119-RE
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	28-Jul-2017
Complete List of Authors:	Manasfi, Youssef; UniLaSalle, ; Universite de Rouen, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale Cannesan, Marc-Antoine; ASTREDHOR Seine-Manche, 32 rue Alfred Kastler, 76130 Mont Saint Aignan, France Riah, Wassila; UniLaSalle Bressan, Mélanie; UniLaSalle 3 rue du Tronquet Laval, Karine; UniLaSalle 3 rue du Tronquet Driouich, Azeddine; Université de Rouen, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale Vicré-Gibouin, Maïté; Université de Rouen, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale Trinsoutrot-Gattin, Isabelle; UniLaSalle, 3 rue du Tronquet
Keywords:	Oomycetes < Causal Agent, woody ornamentals < Ornamentals < Crop Type, Disease management < Subject Areas, Pathogen detection < Subject Areas, Pathogen diversity < Subject Areas, Yield loss and economic impacts < Subject Areas, Techniques < Subject Areas, cultural and biological practices < Disease management < Subject Areas

SCHOLARONE™
Manuscripts

Is Biocontrol an alternative solution for *Choisya ternata* root rot disease caused by *Phytophthora parasitica*?

Youssef Manasfi, Marc-Antoine Cannesan, Wassila Riah, Mélanie Bressan, Karine Laval, Azeddine Driouich, Maïté Vicré and Isabelle Trinsoutrot-Gattin *

* Corresponding author: Isabelle Trinsoutrot-Gattin (isabelle.gattin@unilasalle.fr)

First, third, fourth, fifth, and last authors: UniLaSalle, 3 rue du Tronquet 76130 Mont Saint Aignan, France; first, sixth and seventh authors: Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale, EA4358, SFR FED 4277 "Normandie Végétal", Université de Rouen Normandie, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France; second author: ASTREDHOR Seine-Manche, 32 rue Alfred Kastler, 76130 Mont Saint Aignan, France

Abstract: *Phytophthora parasitica* infection of *Choisya ternata* can cause important economic losses due to root rot disease. Chemical control of *Phytophthora* spp. is less effective due to the development of resistance. Furthermore, increasing environmental awareness requires more environmentally friendly and sustainable solutions. Biological control agents (BCAs) offer a promising solution to reduce disease severity. This research focused on testing the potential benefit of 4 different BCA species, *Glomus intraradices*, *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma atroviridae* and *Bacillus amyloliquefaciens*, for protecting *C. ternata* against *P. parasitica* after individual and combined treatment. The effect of the treatment was observed by monitoring *C. ternata* symptoms. Real-time PCR targeting the *ypt1* gene was also developed to evaluate *P. parasitica* evolution in the substrate. Significant reductions of plant symptoms and *P. parasitica* development were observed with the combined treatments of *G. intraradices* with *G. catenulatum* and *G. intraradices* with *T. atroviridae*. Another combined treatment with *G. catenulatum* and *B. amyloliquefaciens* increased the pathogen density and severity. If BCA use was not compatible, an increase in pathogen activity was observed. No individual treatments had a significant effect on the pathogen. The higher inhibition activity of the combined treatments shows the advantage of this strategy.

1. Introduction

Choisya ternata (Mexican orange) is an average shrub that occurs naturally on the rocky slopes of the USA and Mexico (Talbot and Wedgwood 2009) and is also widely used as an ornamental and landscape plant for decorative purposes. The production of this plant in nursery pots makes it more sensitive to root rot caused by soil microorganisms, such as *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., and *Fusarium* spp., among others, with *Phytophthora* spp. dominating the pathogen species isolated by the Food and Environment Research Agency (Fera) plant clinic. These soil-borne pathogens lead to a loss of *Choisya* vigor and marketability, resulting in heavy economic losses up to 80 % in some cases for horticulturists (Astredhor internal communication; Talbot and Wedgwood 2009). Different *Phytophthora* species have been isolated and identified from *Choisya* by the plant clinic of the Royal Horticultural Society (RHS). This species includes *Phytophthora citricola*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica*. Additionally, the presence of more than one pathogen on a single plant has been reported at ADAS, such as *Phytophthora* spp. and *Pythium* spp. (Talbot and Wedgwood 2009). In 2000, a case of *Choisya* root rot caused by *Phytophthora* was reported by the Istituto Regionale per la Floricoltura in San Remo, Italy. Subsequently, different *Phytophthora* species were isolated from the root systems of pots used to grow ornamental plants in Southern and Northern Italy, including *P. parasitica* from *C. ternata*. In 2005 in the Lorraine region (east of France), *P. parasitica* was isolated from *C. ternata* roots. The Experimental Station for Plants and Flowers (GIE) in southwest France identified *Phytophthora* as the primary pathogen in *Choisya* affected by root rot with *P. parasitica* as the major species (Talbot and Wedgwood 2009).

Phytophthora is an oomycete that is responsible for many destructive diseases in plants worldwide (Larousse and Galiana 2017). More than 100 species of *Phytophthora* have been identified, and their number is still increasing (Kroon et al. 2012; Meng et al. 2014). This species is responsible for numerous agricultural and ornamental disasters (Grünwald et al. 2012; Haas et al. 2009; Larousse and Galiana 2017). The Rutaceae family is one victim of *Phytophthora*. For example, *P. parasitica*, a soil-borne pathogen, causes serious root rot damage in Citrus, Mexican orange and orchards in nurseries throughout the world (Benfradj et al. 2016; Boava et al. 2011; Vernière et al. 2004). Most *Phytophthora* diseases are soil-borne and difficult to control. Different strategies are used to control the disease (Drenth et al. 2006),

such as cultural practices to provide good drainage (Hansen 2008) and fungicides (Parra and Ristaino 2001). However, oomycetes, including *Phytophthora*, increasingly develop resistance to chemical products, making the products ineffective (Davidse et al. 1981; Keinath 2007; Parra and Ristaino 2001; Larousse and Galiana 2017). Furthermore, the growing awareness of the adverse effects of pesticides on human health and the need to protect the environment have led to an increase in legislative constraints to reduce their use (Gullino and Kuijpers 1994), such as the Ecophyto French national plan. Taken together, these factors increase the need to develop alternative solutions for pathogen management.

Biological control agents (BCAs) are promising and sustainable alternative solutions for the management of soil diseases (Li et al. 2012; Liu et al. 2013; Shen et al. 2007). Different groups of organisms have been found to exhibit antagonistic activity against pathogens. One group that shows particular potential comprises the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). These micro-organisms are capable of colonizing more than 80 % of plant species and are naturally present in the soil. In addition to their ability to control pathogens, AMF offer other benefits, including enhanced nutrition and drought tolerance (Cameron et al. 2013; Vigo, Norman, and Hooker 2000). AMF may have different mechanisms for biocontrol, such as improving the nutrient status of the plant (Karagiannidis et al. 2002; Wehner et al. 2010), competitive interactions with pathogens (Filion et al. 2003; Wehner et al. 2010), anatomical and architectural changes in the root system (Matsubara et al. 1995; Wehner et al. 2010), microbial community changes in the rhizosphere (Larsen et al. 2003; Wehner et al. 2010), activation of plant defense mechanisms (Pozo et al. 2009; Wehner et al. 2010) and induction of systemic resistance (Cameron et al. 2013). The AMF *Glomus intraradices* was found to reduce disease severity in pea caused by *Aphanomyces euteiches* (Bodker et al. 1998) and root mortality in pepper plant caused by *Phytophthora capsici* (Zheng et al. 2005). The crude extract of the growth medium of *G. intraradices* significantly reduces conidial germination of *Fusarium oxysporum* (Filion et al. 1999), and the exudates from tomato roots colonized by *G. intraradices* provoke the repulsion of *P. parasitica* (Lioussanne et al. 2008). Species of *Trichoderma* and *Gliocladium* are filamentous fungi belonging to the subdivision of Deuteromycetes. These microorganisms display resistance to many toxic compounds, including herbicides, fungicides and phenolic compounds, making it possible to use them as a complementary treatment with pesticides (Benitez et al. 2004; Naher et al. 2014; Smith et al.

1990). These species have been shown to provide different levels of biological control against different soil-borne plant pathogens, including oomycetes, such as *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. (Naher et al. 2014; Smith et al. 1990). *Trichoderma* species can act by competing for nutrients and space (Benitez et al. 2004), plant growth enhancement (Harman et al. 2004b), activation of plant defense mechanisms (Harman et al. 2004a, b; Vinale et al. 2008), and mycoparasitism (Steyaert et al. 2003; Vinale et al. 2008). *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. are able to reduce the damage caused by *Phytophthora cactorum* in apple plants (Smith et al. 1990). Other organisms, such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), also offer promising potential for controlling pathogens due to their ability to colonize the rhizosphere, promoting plant growth and inducing systemic resistance (ISR) (Lee et al. 2015; Zhang et al. 2016). PGPR can activate different plant defense mechanisms, such as the oxidative burst, reinforcement of the cell wall, accumulation of secondary metabolites and activation of defense-related enzymes (Conrath et al. 2006; Lee et al. 2015). *Bacillus amyloliquefaciens* is a PGPR with an interesting potential as a BCA. Different strains of *B. amyloliquefaciens* have shown antifungal activity against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Souto et al. 2004), effectively induced resistance against *Phytophthora cactorum* in *Panax ginseng* plants (Lee et al., 2014) and inhibited *Phytophthora capsici* growth (Zhang et al. 2016).

The aim of this study was to investigate the efficiency of different BCAs for limiting the development of *P. parasitica* and protecting *C. ternata* against root rot. To our knowledge, no study has explored the use of BCAs to protect *C. ternata* nursery cultures from this pathogen. An experiment close to production conditions with artificial inoculation of the pathogen and BCA application on *Choisya* plants was designed to monitor disease spread and evaluate the intensity of symptoms. A real-time PCR assay targeting the ras-related protein gene (*ypt1*) (Chen and Roxby 1996; Schena and Cooke 2006; Schena et al. 2006) was developed in parallel to evaluate the impact of BCA application on the *Phytophthora* density in the cultivation substrate of *Choisya*.

2. Materials and methods

2.1 Identification of *Phytophthora* spp. pathogens of *C. ternata*

2.1.1 Isolation of *Phytophthora* from *C. ternata* roots

C. ternata plants presenting characteristic *Phytophthora* symptoms were collected from the experimental station (Astredhor stations in the French region Ile de France). The isolation protocol was adapted from the protocol described by (Drenth and Sendall 2004). Briefly, roots were collected from infected plants and washed with tap water to eliminate all substrate. The roots were then incubated for 6 days at 25°C in Petri dishes containing 10 ml sterile deionized water and 3 flower petals from white *Dianthus caryophyllus* buds (white carnation buds). Translucent petals infected with *Phytophthora* were transferred and incubated for 6 days at 25°C on 1.7 % (w/v) cornmeal Agar (CMA) medium supplemented with 100 mg.L⁻¹ pimaricin, 50 mg.L⁻¹ polymyxin B and 50 mg.L⁻¹ ampicillin. *Phytophthora* mycelia were then transferred to new 1.7 % (w/v) CMA medium. The final step was repeated twice to eliminate any possible contamination.

2.1.2 *Phytophthora* strain maintenance

Phytophthora spp. cultures were performed as described by Attard et al. 2014 and Galiana et al. 2005. *Phytophthora* spp. was maintained on clarified V8 juice agar at 25°C in the dark. V8 juice was first clarified by mixing it with 15 % (w/v) CaCO₃ and centrifuged at 2000 g for 10 min. Next, the supernatant was diluted 4 times, followed by the addition of 1.5 % (w/v) agar and autoclaving. *Phytophthora* was transferred onto new medium every 4 to 6 weeks. For *Phytophthora* DNA extraction, 5 small agar plugs from clarified V8 subcultures were placed in a Petri dish of liquid clarified V8 juice and incubated at 25°C under continuous light for 1 week. The developed mycelium was then collected, cut, washed with sterile deionized water and stored at -20°C until use.

2.1.3 *Phytophthora* DNA extraction and quantification

Total DNA was extracted from 50 mg of the *Phytophthora* mycelium using the PowerPlant DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, 121 Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instruction with one modification during the homogenization step. This step was performed twice using the FastPrep instrument at 6.5 m/s for 30 s. The DNA

concentration were assayed by fluorimetry using the Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit (Picogreen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA solutions were then stored at -20°C until use.

2.1.4 Molecular identification of *Phytophthora* strains isolated from infected plants.

Phytophthora species were identified using the ITS region, which was considered a barcode not only for fungi but also oomycetes (Bellemain et al. 2010). Extracted DNA from each of the isolated strains was amplified using the universal PCR primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). PCR was performed in a 50- μ l volume containing 2 ng. μ l⁻¹ of DNA, 1X of master mix GoTaq green (Promega), and 10 μ M of primers ITS1 and ITS4 in the Gene amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems). The cycling protocol was 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. Successful amplification was confirmed by electrophoresis on a 1 % (w/v) agarose gel stained with 0.1 μ g/ml ethidium bromide. The 600-bp PCR product was sequenced by Genoscreen, Lille, France. Finally, the sequences were blasted against NCBI to identify *Phytophthora* species.

2. Molecular tools for *Phytophthora* spp. quantification

2.2.1 Primer specificity to *Phytophthora*

Genus-specific primers were chosen from the available published literature to quantify all the detected species of *Phytophthora* in a single PCR run. The PCR primers were YPh1F (5'-CGACCATKGGTGTGGACTTT-3') and YPh2R (5'-ACGTTCTCMCAGGCGTATCT-3'), which generate an amplicon of 450 bp. These primers target the single-copy gene *ypt1*, which encodes a protein involved in vesicle transport between endoplasmic reticulum compartments (Chen and Roxby 1996), and they show high specificity for the genus *Phytophthora* (Schena et al. 2006).

2.2.2 Real-time PCR assay of *P. parasitica* isolate DNA

Real-time PCR was tested and optimized to obtain a 90 % minimum efficiency using a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche, Basel, Switzerland). The reaction conditions were optimized, such as the annealing temperature of the primers and the DNA concentration. Different concentrations of the following two PCR additives were tested: bovine serum albumin (BSA) (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) and the T4

bacteriophage Gene 32 product (T4 gp 32) (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Real-time PCR amplification was performed in a 25- μ l reaction volume containing 4 ng of isolate DNA; 1 and 5 μ m of each primer; 0.5, 1, 1.25, and 1.5 mg/ml BSA or 10, 15, and 20 ng/ml T4; 1X Absolute PCR SYBR Green Mix from ThermoScientific or 1X LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master mix (Roche, Basel, Switzerland); and 3 mM, 3.5 mM, and 4 mM MgCl₂. The PCR cycling conditions were 95°C for 15 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s, 58, 60 or 61°C for 45 s and 72°C for 30 s. A final melting curve step was performed by heating the samples to 95°C, cooling to 61°C and slowly heating to 97°C, increasing the temperature by 1.1°C every 10 s with continuous measurement of fluorescence at 520 nm. The DNA standard curves were obtained from 10-fold dilutions of DNA from *P. parasitica* INRA-310 obtained from the Institute Sophia Agrobiotech, Nice, France. The PCR efficiency and DNA concentrations were determined using the Roche second derivative maximum method. Real-time PCR reactions for the standard curve were repeated at least three times, and PCR assays always included a negative control (no DNA).

2.2.3 Optimization of the real-time PCR assay for the substrate matrix

The presence of other components co-extracted from the substrate may affect the PCR efficiency and quantification of the *ypt1* copy number per gram of substrate. To quantify *P. parasitica* in the substrate matrix, we used the real-time PCR protocol with the highest efficiency for the *P. parasitica* isolate DNA. Ten-fold serial dilutions of *P. parasitica* isolate DNA was mixed with DNA extracted from substrate matrix without *Phytophthora*. Quantitative PCR amplification with and without the addition of substrate DNA was performed in the same PCR microplate. The *YPT1* copy number was compared between mixed and pure *P. parasitica* isolate DNA. The DNA standard curves were obtained as described above.

2.3 Assay of different BCAs against *Phytophthora* root rot in *C. ternata*.

2.3.1 Plant materials

C. ternata in 0.4-L pots were obtained from the André Briant Jeunes plants nursery. Plants were re-potted in 4 L SUB21 SOPARCO pots with substrate composed of 30 % Irish blond peat F1, 40% Irish blond peat F2, 15 % hortifiber M, 15 % medium coconut fiber, 1.2 kg.m⁻³ PgMix 14-16-18 and 5 kg.m⁻³ Hi END fertilizer. The pots were covered with a jute disk and irrigated with water at pH 6 using micro-sprinklers.

2.3.2 Treatment modules

Tested treatments of *C. ternata* against *P. parasitica* included a chemical treatment with commercial product (SUBDUE DOLD) and biological treatment with 5 different BCAs. The application of each species or strain is described in table 1. One negative control and 9 different modules were chosen, and their composition is described in table 2. The chemical treatment module contained mefenoxam, and the biological treatment modules contained 1 or 2 BCAs as described in table 2.

2.3.3 Preparation of the *P. parasitica* inoculum and artificial inoculation of substrate

The rice grain inoculum was prepared as described by (Holmes and Benson 1994; Loyd et al. 2014). Twenty-five grams of rice grain and 18 ml of deionized water were placed in flasks and autoclaved twice. Next, three 7-mm-diameter disks of freshly developed *P. parasitica* INRA-310 mycelium growing on a 1.7 % (w/v) CMA were placed in each flask. The flasks were incubated at 25°C in the dark and shaken twice every day for 1 week. The inoculum consisted of 120 1-week old rice grains, which were artificially inoculated in each substrate pot. Three 5-cm-deep holes were created in the substrate for each pot, and the *Phytophthora* inoculum was divided into the holes. Non-colonized sterile rice grains were used for the negative control. The inoculum concentration was chosen based on preliminary experiments (data not shown).

2.3.4 Symptom notation

Symptoms of *C. ternata* were classified into 3 different categories (Figure 1): healthy plants were noted as (h), plants with moderate symptoms (fading leaf colors, more or less yellowish) were noted as (s) and dead plants or plants with intense symptoms (bronze-colored leaves and loss of turgidity, leading generally to plant death) were noted as (d).

2.3.5 Bioassay in the experimental station

Thirty *C. ternata* in 0.4-L pots for each module (300 plants in total) were received from the André Briant Jeunes plants nursery at the experimental station (Saint germain en Laye, France). The plants were repotted and treated as explained in Table 2. Every module was randomly divided to two groups (I and II) of 15 plants, each separated by a buffer zone (Figure 2). After one month, all the plants in group I were artificially inoculated as described above,

and all the plants in group II were maintained as a control. One month after artificial inoculation, the symptoms of all plants were noted according the scale described above (Figure 1). In parallel, 3 plants for every module in group I were randomly selected to quantify the development of *P. parasitica* in the substrate using the developed real-time PCR assay.

2.3.6 Substrate sampling

The substrate of each selected plants was sampled, homogenized and sieved to a particle size of 2 mm. Three 0.4 g samples from each pot were then collected in 2-ml Eppendorf tubes and treated with liquid nitrogen prior to storage at -80°C until use.

2.3.7 DNA extraction from substrate samples and quantification of the *Phytophthora* density by real-time PCR

Total substrate DNA was extracted from 0.4 g of moist substrate using the Fast DNA spin Kit for Soil (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) according to manufacturer's instructions with some modifications. First, centrifugation was performed for 20 min, and a facultative incubation was performed for the DSE step. After extraction, the DNA concentration was assessed by fluorimetry using the Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit (Picogreen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The DNA extracts were stored at -20°C until use. *Ypt1* copy numbers per gram of dry substrate were estimated for each sample using the real-time PCR conditions as determined above. Several DNA optimal concentrations for the real-time PCR assay were tested, and a concentration of 2 ng.μL⁻¹ was finally chosen. DNA standard curves were obtained from 10-fold serial dilutions of *P. parasitica* INRA-310 DNA and were performed in triplicate for each run.

2.4 Data analyses

The second derivative maximum method developed by (Rasmussen 2001) was used to calculate C_q values for each PCR reaction. Construction of the calibration curve that related a known quantity of *P. parasitica* DNA to C_q allowed us to determine the *P. parasitica ypt1* copy number. Amplification efficiencies (ε) were calculated from the slope (s) of the standard curve using $\epsilon = (10^{-1/s} - 1)$. The Shapiro-Wilk test was used to test the *P. parasitica ypt1* copy number normality, and Brown-Forsythe's test was used to test the variance homoscedasticity. A comparison of the *P. parasitica ypt1* copies number quantified between all tested treatments

was performed using the parametric Dunnett's test. Pearson's rho correlation was used to describe the link between the pathogen and observed symptoms in plants. All tests were performed with GraphPad PRISM 7, and the statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Identification of strains isolated from infected plants

Based on the NCBI GenBank blast results for the amplified ITS sequences, two different isolated *Phytophthora* species were identified. The most dominant species retrieved from infected plants originating from the region Ile-de-France was *P. parasitica*. The second identified species was *Phytophthora tropicalis*. Other pathogens were also found, such as *Pythium spinosum* and *Pythium intermedium*.

3.2 Development of the *Phytophthora* real-time PCR assay

3.2.1 YPh1F/YPh2R primer sensitivity and real-time PCR assay using pure *P. parasitica* DNA

The YPh1F/YPh2R PCR primers are specific for the *Phytophthora* genus according to Schena et al. 2006. The best results were obtained with a reaction mixture and amplification conditions adapted from Schena et al. 2006 and optimized. The optimized reaction mixture consisted of a 25- μ l total volume, 4 ng of isolate DNA, 1 μ M of each primer, 0.5 mg/ml BSA and 1X Absolute PCR SYBR Green Mix from ThermoScientific. The chosen amplification conditions were as follows: 95°C for 15 min, 50 cycles at 95°C for 15 s, 61°C for 45 s and 72°C for 30 s, followed by a melting curve generated by heating the samples to 95°C, cooling to 61°C and slowly heating to 97°C. The melting curve indicates the presence of two amplicons when using DNA from *P. parasitica*, a principal amplicon with a T_m of 86°C and a second amplicon at 83°C. Different modifications of the reaction mixture and amplification conditions did not reduce or prevent the second amplification. This second amplicon did not appear when *P. tropicalis* was amplified under the same conditions. This conditions allowed us to achieve an efficiency that consistently exceeded 90 % over six orders of magnitude of *P. parasitica* DNA concentrations with a linear relationship between the log of the DNA concentration and the C_q value with a coefficient of determination $R^2 = 0.9993$ and $P < 10^{-6}$. Using these conditions, the lowest *P. parasitica* DNA concentration that was accurately and reproducibly detected by PCR was 130 fg. μ L⁻¹, i.e., 260 fg of DNA. These real-time PCR conditions were selected to test the substrate.

3.2.2 Optimization and validation of the real-time PCR assay for DNA extracted from substrates

To validate the optimal real-time PCR conditions for accurate quantification of *P. parasitica* in *Choisya* substrate, 10-fold serial dilutions of *P. parasitica* DNA and 10-fold serial dilutions of *P. parasitica* DNA mixed with substrate matrix DNA without *Phytophthora* were quantified. The *Ypt1* copy numbers measured in each dilution of *P. parasitica* strain INRA-310 DNA were compared to those measured for the 10-fold serial dilutions of *P. parasitica* DNA (used for the following artificial inoculation) mixed with DNA extracted from substrate. The final chosen PCR conditions were those for whom no differences was observed between these 2 measured *ypt1* copy numbers (Figure 3).

The final optimized real-time PCR reaction mixture consisted of the following (final volume of 25 μL): 4 ng of isolated DNA, 1 μM of each primer (YPh1F and YPh2R), 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, 1X LightCycler[®] 480 DNA SYBR Green I Master mix (Roche, Basel, Switzerland). The optimal amplification protocol consisted of an initial denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s, 61°C for 45 s and 72°C for 30 s. After the final amplification cycle, the melting curve profiles were obtained by heating the samples to 95°C, cooling to 61°C and slowly heating to 97°C, increasing the temperature by 1.1°C every 10 s with continuous measurement of fluorescence at 520 nm. Using this real-time PCR protocol, the efficiency consistently exceeded 88 % over six orders of magnitude of *P. parasitica* DNA concentrations. This protocol was highly reproducible between sample replicates and users.

3.3 Efficiency of different BCAs against *Phytophthora* root rot in *C. ternata*

3.3.1 Symptom observation

Disease symptoms appeared only on plants with artificial inoculation of *P. parasitica*. These symptoms were more or less severe depending on the tested treatments (Figure 4). In the case of no treatment T1i, 33 % of the plants were healthy (h), 50 % (s) and 17 % (d) (dead plant). Chemical treatment T2i was the most effective treatment capable of reducing symptoms, with 67 % healthy plants (h), 33 % (s) and 0 % plant death (d). Treatment modules Ci, Di, Ei, Fi and Gi were not able to reduce the symptom severity. Furthermore, treatment module Hi led to 60 % dead plants (d) and less than 10 % healthy plants (h). The biological treatments Ai and Bi successfully reduced symptoms. These two modules showed fewer

symptoms than the no treatment module (T1i) with 42 % and 33 % healthy plants (h), 50 % and 67 % (s) and 8 % and 0 % dead plants (d), respectively. The BCA-treated plants that were not inoculated with *Phytophthora* showed no disease symptom and exhibited similar plant growth compared to the untreated plants (data not shown).

3.3.2 Effects of the tested treatments on pathogen density in the substrate

Quantification of the *P. parasitica* density in the plant substrate for all *Phytophthora* inoculated modalities was performed using the previously developed real-time PCR assay. The density of the quantified *ypt1* was different depending on the treatment (Figure 5). In the T1i control, the pathogen density was 8.2×10^5 *ypt1* copy numbers g^{-1} dry substrate. The lowest *ypt1* copy numbers g^{-1} dry substrate were observed for T2i, for which the *Phytophthora* density was significantly reduced to 1.91×10^5 *ypt1* copy numbers g^{-1} dry substrate. The pathogen density for treatments Ci, Di, Ei, Fi and Gi (respectively, 7.06×10^5 , 7.83×10^5 , 7.89×10^5 , 6.16×10^5 and 6.48×10^5) was not significantly different from T1i. Treatment Hi showed a significant increase in the density of *Phytophthora* in the substrate with 1.33×10^6 *ypt1* copy numbers g^{-1} dry substrate. Modules Ai and Bi led to a significant reduction of pathogen development in the substrate compared to T1i with, respectively, 3.68×10^5 and 3.06×10^5 *ypt1* copy numbers g^{-1} dry substrate.

3.3.3 Correlation between symptom observation and pathogen density

The symptom severity and *ypt1* copy number g^{-1} dry substrate varied widely between the different modules. To understand the potential link between the *Phytophthora* density in the substrate and the symptom severity, correlation tests were performed considering all modalities (Figure 6). A high and significant correlation ($\rho=0.78$, with a p-value <0.05) between *ypt1* copy number g^{-1} dry substrate and *C. ternata* death (d) was highlighted.

4. Discussion

4.1 Pathogenic *Phytophthora* species of *C. ternata*

In this study, *P. parasitica* and *P. tropicalis* were isolated from the roots of infected *C. ternata*. *P. parasitica* has a wide host range of more than 900 ornamental plants, agricultural plants and trees (Farr and Rossman 2017), and it is already known to infect *C. ternata* cultures, leading to large economic losses (Talbot and Wedgwood 2009; Farr and Rossman 2017). Other

Phytophthora spp.,. Such as *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. cinnamomi* and *P. citrophthora*, were also previously isolated from *C. ternata* in 2008 by the RHS (Talbot and Wedgwood 2009). However, the method used to identify the different isolated strain was not precisely described. Furthermore, morphological differentiation within the genus *Phytophthora* requires substantial experience of the manipulator and is a labor-intensive process (Drenth et al. 2006). This identification technique remains difficult and may lead to some confusion between *Phytophthora* species because of interspecific overlaps and the intraspecific plasticity of diagnostic characteristics (Kong et al. 2004). The second species isolated herein on *C. ternata* was *P. tropicalis*. This species has been reported in the Pacific islands, north America and Europe (Farr and Rossman 2017), and before 2001 it was identified as *Phytophthora capsici*. Therefore, its full geographic distribution is unclear (Aragaki and Uchida 2001; Zhang et al. 2004; Farr and Rossman 2017). The host range of *P. tropicalis* contains more than 30 plants (Farr and Rossman 2017), such as *Atharanthus roseus* (Hao, Richardson, and Hong 2010), *Cuphea ignea* (Cacciola et al. 2006), *Cyclamen persicum* (Gerlach and Schubert 2001), and *Rhododendron* spp. (Galli et al. 2013; Hong et al. 2006). To our knowledge, this is the first report of the isolation of *P. tropicalis* from *C. ternata* roots. This species could originate from other exotic plants by cross-contamination in the station. It would be interesting to evaluate *P. tropicalis* infection, colonization and virulence on *C. ternata* in comparison to the more classically described pathogens on this plant with *P. parasitica*. Other oomycetes detected on *C. ternata* belonged to the *Pythium* genus, such as *P. spinosum* and *P. Intermedium*. The isolation technique utilized the oomycete target, which explained why different oomycete genera could be isolated with *Phytophthora*. RHS also isolated *P. ultimum* from *C. ternata*, but in our study this species was not found. RHS reports that both pathogens could be found on the same plants and could cause root rot as a pathogenic consortium. The similar symptoms induced by these pathogens make it difficult for horticulturists to identify the pathogen species (Talbot and Wedgwood 2009), and thus accurate microbial identification is essential for pathogen inspection and survey (Kong et al. 2004). A larger sample of symptomatic plants could be assessed in the future by horticulturists and nurserymen to constitute a broader strain voucher.

4.2 Real-time PCR assay validation

Our results showed that different species of *Phytophthora* can be pathogenic to *C. ternata* as previously described (Talbot and Wedgwood 2009). This observation highlights the importance of a diagnostic tool capable of the simultaneous detection of different *Phytophthora* species in a single run. Here, genus-specific PCR primers (YPh1F and YPh2R) were used. These primers target the single-copy gene *ypt1* and show a high specificity to the genus *Phytophthora* (Schena et al. 2006). However, *P. parasitica* and *P. tropicalis* were not in the list of the tested 35 *Phytophthora* species. Here, a positive amplification was observed for these two species, with an efficiency exceeding 90 %. A second amplicon with a T_m close to the targeted amplicon described by Schena et al. 2006 was observed for *P. parasitica* isolated from *C. ternata* and *P. parasitica* INRA-310 strain but not for *P. tropicalis*. Because the authors did not test the *P. parasitica* strain, this second amplicon was not reported. The cause of the second amplicon could be due to the amplification of a similar DNA sequence elsewhere in the *P. parasitica* genome linked to the use of degenerate primers. It can also be hypothesized that *P. parasitica* may present 2 different alleles for the *ypt1* gene, although no such report could be found in the literature. The intensity of the second amplicon was only minor in comparison to the targeted amplicon. Due to their acceptable specificity and good efficiency, these PCR primers (YPh1F and YPh2R) were selected to evaluate the density of *Phytophthora* in *Choisya* substrate. The developed SYBR Green PCR assay allowed us to quantify as few as 3 pg of *Phytophthora* isolate DNA. This threshold is close to the 10 pg observed by Schena et al. 2006 when targeting the *ypt1* gene. A higher threshold can be expected when targeting multi-copy genes (Hayden et al. 2004; Ippolito et al. 2004; Schena and Cooke 2006); however, the *ypt1* gene is a single-copy gene (Chen and Roxby 1996). In the present analysis, none of the tested PCR conditions with primers targeting multi-copy genes led to an acceptable PCR efficiency.

4.3 Specific techniques for *Phytophthora* inoculation

To produce a sufficient quantity of *Phytophthora* inoculum for the experiment, different techniques were explored (data not shown). The use of zoospores to inoculate the plants was considered in the case of small-scale test in the laboratory. However, production of a sufficient inoculum and its transport to the experimental station without affecting the viability of the zoospores was impossible. Another possibility was to use *Phytophthora*

oospores. Oospores are produced by oocyte sexual reproduction. *P. parasitica* is a heterothallic organism that requires two compatible mating types, A1 and A2, for oospore production (Ko 1978; Meng et al. 2014). However, this method of reproduction is very slow and generally insufficient. The method chosen for *Phytophthora* inoculum production on rice grains, as described by Holmes and Benson 1994; Loyd et al. 2014, is a known, very effective and rapid technique to produce a sufficient inoculum for the artificial contamination of plants in the experimental station.

4.4 Validation of the real-time PCR method in the substrate matrix

The ability to detect and quantify the density of *Phytophthora* species in the substrate is of major importance, for example, to evaluate substrate contamination prior to use or to monitor horticultural facilities and plant production. The real-time PCR assay can also be used as a diagnostic approach to evaluate the capacity of some BCAs to reduce *Phytophthora* development in the plant substrate.

However, use of the real-time PCR technique to evaluate the concentration of *Phytophthora* in total DNA extracted from the substrate could lead to an underestimation of the pathogen density, and possibly even false negative results. Total DNA samples extracted from substrate can be contaminated by many enzyme inhibitors, such as humic acids, tannins and lignin-associated compounds (Cullen and Hirsch 1998; Bridge and Spooner 2001; Matheson et al. 2010), which can inhibit PCR amplification. Using an adapted method to extract substrate DNA is the first essential step to reduce this contamination. In the present study, the Fast DNA spin Kit for Soil (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) was used to isolate PCR-ready genomic DNA directly from the substrate, providing high-quality DNA in sufficient quantities. The real-time PCR assay is also a more robust technique in the face of such contamination in comparison to classic PCR (Mumford et al. 2006). To validate the experimental conditions used for real-time PCR in the substrate, prior assessment of the accurate quantification of the targeted gene is essential. Here, we used the approach of mixing the *Phytophthora*-free substrate DNA extract with 10-fold serial dilutions of *Phytophthora* isolate DNA extract, and then compared the quantification results to the same 10-fold serial dilutions of *Phytophthora* isolate DNA.

For the final chosen PCR conditions, the amplification and efficiency of the real-time PCR assay were not affected by the presence of co-extracted substrate contaminants. The method was thus validated for use in further analyses.

4.5 Efficiency of the tested BCAs against *Phytophthora*

The severity of the observed *Phytophthora* symptoms on *C. ternata* and the density in the substrate were significantly correlated. *Phytophthora* detection and quantification in the substrate were indicative of the disease severity on the plants. This link has now been further studied and defined as a possible predictor for monitoring plant production.

The survival rate of *C. ternata* was found herein to be treatment-dependent. All the tested solutions (chemical or biological) have been previously commercialized to limit the impact of *Phytophthora* in the ornamental industry. Some studies have demonstrated the possible great potential of using BCAs to limit *Phytophthora* development (Mcquilken, Gemmell, and Lahdenperä 2001; Brunner et al. 2005; Zheng et al. 2005). In the present study, chemical treatment remained the optimal technique to achieve the best survival rate. However, this treatment is not a sustainable option due to the increasing resistance of *Phytophthora* to this chemical and environmental concerns necessitating a reduction of the use of fungicides (Gullino and Kuijpers 1994). The second best survival rate observed with biological treatment modules was observed for the combined treatments with mycorrhiza and a filamentous fungus: *G. catenulatum* with *G. intraradices* (Ai) and *G. intraradices* with *T. atroviridae* (Bi). Other studies have demonstrated the advantage of combining biological treatments, and their use is increasingly being considered (Roberts et al. 2005; Thilagavathi et al. 2007; Chemeltorit et al. 2017). This approach aims to use the potential synergistic effects of organisms, which is essential for BCA treatment, to assure an effective and efficient impact (Spadaro and Gullino 2005). To our knowledge, no other study has reported the capacity of these two combined treatments to reduce the development of *P. parasitica* in substrate and to protect *C. ternata* against this pathogen. Other studies have demonstrated that the combination of fungi and bacterial species, respectively, *Trichoderma hamatum* and *Pseudomonas aeruginosa*, is able to significantly reduce the incidence of *P. capsici* disease in chili pepper seedlings (Chemeltorit et al. 2017). In our study in contrast, the combined use of bacteria and fungi in module Ci (*B. amyloliquefaciens* and *G. intraradices*) showed no significant reduction. The effect of the combined application of BCA can greatly vary (Xu et al.

2011) according to the host plant (Schisler et al. 1997). Indeed, the added bacteria may be unable to survive in the rhizosphere due to various factors, such as acclimatization to the local environment and competition with native strains. These difficulties are more prevalent when the bacterial strain used is derived from a commercial origin and is not native to the rhizosphere of *C. ternata* (Lee et al. 2015). Concerning the combined application of module Hi (*G. catenulatum* and *B. amyloliquefaciens*), this treatment increased disease severity. In our analysis, the activity of the BCA could be affected by possible competition between the added microorganisms. It is possible that *B. amyloliquefaciens* and *G. catenulatum* participated in a competitive interaction that allowed the development of *P. parasitica*. (Bora et al. 2004) showed that the combined application of *Pseudomonas putida* strains 30 and 180 resulted in lower suppression of *F. oxysporum f. sp. melonis* in comparison to treatment with only strain 30. (Guetsky et al. 2001) showed that the improved efficacy of the combined treatment is maximized when microorganisms have different modes of action. Finally, the 4 treatment modules (D, E, F and G) containing each only one species of BCA did not significantly reduce disease symptoms. In the case of *C. ternata*, the protection capacity of BCA appeared to be improved for the chosen combination of BCAs, probably because of a synergic effect between the microorganisms. However, this synergistic protection seems to be BCA species-dependent.

5. Conclusion

C. ternata cultures are sensitive to *Phytophthora* infection. *P. parasitica* is one of the major *C. ternata* pathogens in France. However, *P. tropicalis* was reported, herein, for the first time on infected *Choisya*. Culture losses due to this pathogen can inflict serious economic damage to plant nurseries. Chemical treatment remains the most effective and used approach to limit the damage caused by *Phytophthora* on *C. ternata* cultures. However, the desire to reduce the use of fungicides and increasing resistance of *Phytophthora* to these products highlight the necessity of identifying alternative and sustainable solutions. The most promising approach is the use of BCA to limit the development of pathogens in the substrate. In this study, a validated real-time PCR assay for *Phytophthora* detection and quantification in a substrate was successfully used to monitor the development of *Phytophthora* after BCA addition during *C. ternata* cultivation. Application of different combined treatments of *G. catenulatum* and *G. intraradices* or *G. intraradices* and *T. atroviridae* showed an interesting

decrease in disease symptoms and pathogen development, similar to those observed with chemical treatment. This increased effect of BCA could be explained by the potential synergistic effects of the organisms. However, other combined BCAs can, conversely, increase the development of *P. parasitica* due to potential competition between the BCAs. Finally, other BCA treatments had no effect on the pathogen. The use of biological solutions is very promising. More research is needed to understand the underlying mechanisms of action and to optimize conditions for their competitive development in the rhizosphere for their effective use as a replacement for chemical treatment.

Acknowledgments

We thank SFR Normandie Végétal, Astredhor Seine Manche and their experimental station at Saint Germain En Laye for the technical monitoring, Agnès Attard from Institut Sophia Agrobiotech for providing the *P. parasitica* INRA-310 strain, the region of Normandy for the doctoral grant and all the people who actively contributed to this work.

Literature Cited

Aragaki, M., and Uchida, J. Y. 2001. Morphological Distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia*. 93:137–145.

Attard, A., Evangelisti, E., Kebdani-Minet, N., Panabières, F., Deleury, E., Maggio, C., et al. 2014. Transcriptome dynamics of *Arabidopsis thaliana* root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*. 15:538.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., and Kausarud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol*. 10:189.

Benfradj, N., Metoui, N., and Boughalleb-M'Hamdi, N. 2016. Screening for tolerance of different citrus rootstocks against zoospores of *Phytophthora nicotianae* in infested soil. *J. Phytopathol. Pest Manag*. 3:63–75.

Benitez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., and Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol*. 7:249–260.

Boava, L. P., Cristofani-Yaly, M., Mafra, V. S., Kubo, K., Kishi, L. T., Takita, M. A., et al. 2011. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*. 12:39.

Bodker, L., Kjøller, R., and Rosendahl, S. 1998. Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza*. 8:169–174.

Bora, T., Özaktan, H., Göre, E., and Aslan, E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Phytopathol*. 152:471–475.

Bridge, P., and Spooner, B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil*. 232:147–154.

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., et al. 2005. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both

Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3959–3965.

Cacciola, S. O., Spica, D., Cooke, D. E. L., Raudino, F., and di San Lio, G. M. 2006. Wilt and Collapse of *Cuphea ignea* Caused by *Phytophthora tropicalis* in Italy. *Plant Dis.* 90:680–680.

Cameron, D. D., Neal, A. L., van Wees, S. C. M., and Ton, J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci.* 18:539–545.

Chemeltorit, P. P., Mutaqin, K. H., and Widodo, W. 2017. Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. *Eur. J. Plant Pathol.* 147:157–166.

Chen, Y., and Roxby, R. 1996. Characterization of a *Phytophthora infestans* gene involved in vesicle transport. *Gene.* 181:89–94.

Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., et al. 2006. Priming: Getting Ready for Battle. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19:1062–1071.

Cullen, D. W., and Hirsch, P. R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* 30:983–993.

Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J., and Wal, D. van der. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Neth. J. Plant Pathol.* 87:65–68.

Drenth, A., and Sendall, B. 2004. Isolation of *Phytophthora* from Infected Plant Tissue and Soil, and Principles of Species Identification. Canberra, A.C.T.: Australian Centre for International Agricultural Research.

Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G., et al. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australas. Plant Pathol.* 35:147.

Farr, D.F., and Rossman, A.Y. 2017. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved July 4, 2017, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

Filion, M., St-Arnaud, M., and Fortin, J. A. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytol.* 141:525–533.

Filion, M., St-Arnaud, M., and Jabaji-Hare, S. H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in Mycorrhizal Bean Plants and Surrounding Mycorrhizosphere Soil Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Direct Isolations on Selective Media. *Phytopathology.* 93:229–235.

Galiana, E., Rivière, M.-P., Pagnotta, S., Baudouin, E., Panabières, F., Gounon, P., et al. 2005. Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cell. Microbiol.* 7:1365–1378.

Galli, M., Haegi, A., Vitale, S., Belisario, A., and Luongo, L. 2013. First Report of *Phytophthora tropicalis* on *Rhododendron* in Italy. *Plant Dis.* 97:1385–1385.

Gerlach, W. W. P., and Schubert, R. 2001. A New Wilt of Cyclamen Caused by *Phytophthora tropicalis* in Germany and the Netherlands. *Plant Dis.* 85:334–334.

Grünwald, N. J., Werres, S., Goss, E. M., Taylor, C. R., and Fieland, V. J. 2012. *Phytophthora obscura* sp. nov., a new species of the novel *Phytophthora* subclade 8d. *Plant Pathol.* 61:610–622.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinooor, A. 2001. Combining Biocontrol Agents to Reduce the Variability of Biological Control. *Phytopathology.* 91:621–627.

Gullino, M. L., and Kuijpers, L. A. M. 1994. Social and Political Implications of Managing Plant Diseases with Restricted Fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:559–581.

Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature.* 461:393–398.

Hansen. 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. *Boreal Env Res.* 13:33–41.

Hao, W., Richardson, P. A., and Hong, C. X. 2010. Foliar Blight of Annual Vinca (*Catharanthus roseus*) Caused by *Phytophthora tropicalis* in Virginia. *Plant Dis.* 94:274–274.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004b. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43–56.

Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., and Chen, J. 2004a. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology.* 94:147–153.

Hayden, K. J., Rizzo, D., Tse, J., and Garbelotto, M. 2004. Detection and Quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forests Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology.* 94:1075–1083.

Holmes, K. A., and Benson, D. M. 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. *Plant Dis.* 78:193-199.

Hong, C. X., Richardson, P. A., Kong, P., Jeffers, S. N., and Oak, S. W. 2006. *Phytophthora tropicalis* Isolated from Diseased Leaves of *Pieris japonica* and *Rhododendron catawbiense* and Found in Irrigation Water and Soil in Virginia. *Plant Dis.* 90:525–525.

Ippolito, A., Schena, L., Nigro, F., Ligorio, V. S., and Yaseen, T. 2004. Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthorain* citrus roots and soil. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:833–843.

Karagiannidis, N., Bletsos, F., and Stavropoulos, N. 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Sci. Hortic.* 94:145–156.

Keinath, A. P. 2007. Sensitivity of Populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to Mefenoxam, Dimethomorph, Zoxamide, and Cymoxanil. *Plant Dis.* 91:743–748.

Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *Microbiology.* 107:15–18.

Kong, P., Hong, C. x., Tooley, P. w., Ivors, K., Garbelotto, M., and Richardson, P. a. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. Lett. Appl. Microbiol. 38:433–439.

Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., de Cock, A. W. A. M., and Govers, F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. Phytopathology. 102:348–364.

Larousse, M., and Galiana, E. 2017. Microbial Partnerships of Pathogenic Oomycetes. PLOS Pathog. 13:e1006028.

Larsen, J., Ravnskov, S., and Jakobsen, I. 2003. Combined effect of an arbuscular mycorrhizal fungus and a biocontrol bacterium against *Pythium ultimum* in soil. Folia Geobot. 38:145–154.

Lee, B. D., Dutta, S., Ryu, H., Yoo, S.-J., Suh, D.-S., and Park, K. 2015. Induction of systemic resistance in *Panax ginseng* against *Phytophthora cactorum* by native *Bacillus amyloliquefaciens* HK34. J. Ginseng Res. 39:213–220.

Li, S.-B., Fang, M., Zhou, R.-C., and Huang, J. 2012. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* – Induced blight of Anthurium. Biol. Control. 63:9–16.

Lioussanne, L., Jolicoeur, M., and St-Arnaud, M. 2008. Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. Soil Biol. Biochem. 40:2217–2224.

Liu, Y., Shi, J., Feng, Y., Yang, X., Li, X., and Shen, Q. 2013. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer. Biol. Fertil. Soils. 49:447–464.

Loyd, A. L., Benson, D. M., and Ivors, K. L. 2014. *Phytophthora* Populations in Nursery Irrigation Water in Relationship to Pathogenicity and Infection Frequency of *Rhododendron* and *Pieris*. Plant Dis. 98:1213–1220.

Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., and Lehto, R. 2010. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. Open Enzyme Inhib. J. 3:38-45.

- Matsubara, Y., Tamura, H., and Harada, T. 1995. Growth Enhancement and *Verticillium* Wilt Control by Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungus Inoculation in Eggplant. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 64:555–561.
- Mcquilken, Gemmell, and Lahdenperä. 2001. *Gliocladium catenulatum* as a Potential Biological Control Agent of Damping-off in Bedding Plants. *J. Phytopathol.* 149:171–178.
- Meng, Y., Zhang, Q., Ding, W., and Shan, W. 2014. *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology.* 5:43–51.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., and Barker, I. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *Eur. J. Plant Pathol.* 116:1–19.
- Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., and Hossain, K. 2014. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pak. J. Bot.* 46:1489–1493.
- Parra, G., and Ristaino, J. B. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight of bell pepper. *Plant Dis.* 85:1069–1075.
- Pozo, M. J., Verhage, A., García-Andrade, J., García, J. M., and Azcón-Aguilar, C. 2009. Priming Plant Defence Against Pathogens by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact*, eds. Concepción Azcón-Aguilar, Jose Miguel Barea, Silvio Gianinazzi, and Vivienne Gianinazzi-Pearson. Springer Berlin Heidelberg, p. 123–135.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler. In *Rapid Cycle Real-Time PCR*, eds. Prof Dr med Stefan Meuer, Prof Dr Carl Wittwer, and Dr Kan-Ichi Nakagawara. Springer Berlin Heidelberg, p. 21–34.
- Roberts, D. P., Lohrke, S. M., Meyer, S. L. F., Buyer, J. S., Bowers, J. H., Jacyn Baker, C., et al. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Prot.* 24:141–155.
- Schena, L., and Cooke, D. E. L. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *J. Microbiol. Methods.* 67:70–85.

Schena, L., Hughes, K. J. D., and Cooke, D. E. L. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Mol. Plant Pathol.* 7:365–379.

Schisler, D. A., Slininger, P. J., and Bothast, R. J. 1997. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *Phytopathology.* 87:177–183.

Shen, S.-S., Piao, F.-Z., Lee, B. W., Gyeongsang N. U and Park, C. S. 2007. Characterization of Antibiotic Substance Produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the Biological Control Activity against Pepper Phytophthora Blight. *Plant Pathol. J.* 23:180-186

Smith, V. L., Wilcox, W. F., and Harman, G. E. 1990. Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathol.*

Souto, G. i., Correa, O. s., Montecchia, M. s., Kerber, N. l., Pucheu, N. l., Bachur, M., et al. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J. Appl. Microbiol.* 97:1247–1256.

Spadaro, D., and Gullino, M. L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24:601–613.

Steyaert, J. M., Ridgway, H. J., Elad, Y., and Stewart, A. 2003. Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 31:281–291.

Talbot, D., and Wedgwood, E. 2009. *Choisya*: surveys of the occurrence of root rotting and potential causes. Horticultural Development Company.

Thilagavathi, R., Saravanakumar, D., Ragupathi, N., and Samiyappan, R. 2007. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathol. Mediterr.* 46:157–167.

- Vernière, C., Cohen, S., Raffanel, B., Dubois, A., Venard, P., and Panabières, F. 2004. Variability in Pathogenicity among *Phytophthora* spp. Isolated from Citrus in Corsica. *J. Phytopathol.* 152:476–483.
- Vigo, C., Norman, J. R., and Hooker, J. E. 2000. Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathol.* 49:509–514.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40:1–10.
- Wehner, J., Antunes, P. M., Powell, J. R., Mazukatow, J., and Rillig, M. C. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia.* 53:197–201.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego: Academic press: Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ., p. 315–322.
- Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., and Jeger, M. J. 2011. A numerical study of combined use of two biocontrol agents with different biocontrol mechanisms in controlling foliar pathogens. *Phytopathology.* 101:1032–1044.
- Zhang, M., Li, J., Shen, A., Tan, S., Yan, Z., Yu, Y., et al. 2016. Isolation and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with Potential for Biological Control of Phytophthora Blight and Growth Promotion of Pepper. *J. Phytopathol.* 164:1012–1021.
- Zhang, Z. G., Zhang, J. Y., Zheng, X. B., Yang, Y. W., and Ko, W. H. 2004. Molecular Distinctions Between *Phytophthora capsici* and *Ph. tropicalis* Based on ITS Sequences of Ribosomal DNA. *J. Phytopathol.* 152:358–364.
- Zheng, H., Cui, C., Zhang, Y., Wang, D., Jing, Y., and Kim, K. Y. 2005. Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B:778–786.

Table 1. Biological control agent composition, applications, doses and ways of applications.

Composition	Applications			Doses	Application methods
	Re-potting (R)	(R) +15 days	(R) + 30 days		
Mefenoxam	X		X	20 L.ha ⁻¹	Irrigation
<i>G. catenulatum</i>					
J1446, 320g/Kg : 2.10 ⁸ UFC/g	X		X	0.2 g.L ⁻¹	Irrigation
<i>G. Intraradices</i> strain 1, 4000 spores/g	X			0.04 g.L ⁻¹	Incorporation
<i>G. Intraradices</i> strain 2	X			4 g.L ⁻¹	Incorporation
<i>T. atroviridae</i>	X			3 g.L ⁻¹	Incorporation
<i>B. amyloliquefaciens</i> IT45, >109 UFC/g	X	X	X	0.15 g.L ⁻¹	Irrigation

Table 2. Composition of each treatment module.

Codes	Descriptions
T1	No treatment
T2	mefenoxam
A	<i>G. catenulatum</i> and <i>G. intraradices</i> strain 1
B	<i>T. atroviridae</i> and <i>G. intraradices</i> strain 2
C	<i>B. amyloliquefaciens</i> and <i>G. intraradices</i>
D	<i>G. Intraradices</i> strain 2
E	<i>T. atroviridae</i>
F	<i>B. amyloliquefaciens</i>
G	<i>G. intraradices</i> strain 1
H	<i>G. catenulatum</i> and <i>B. amyloliquefaciens</i>

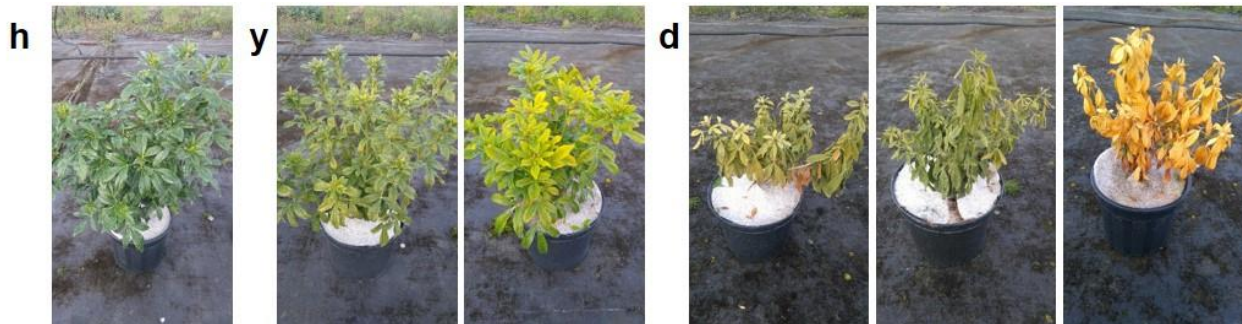


Fig. 1. Symptoms severity observed after 1 month of inoculation with 120 *P. parasitica*. (h) healthy plant with no stress symptoms, (s) stressed plant with yellowish leaves and (d) dead plant.

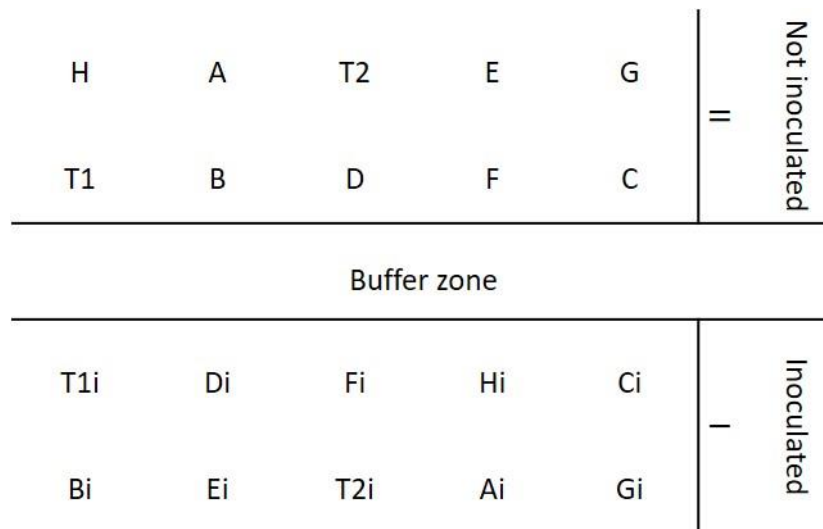


Fig. 2. The dispositions of different modules in the experimental station. The north face upward.

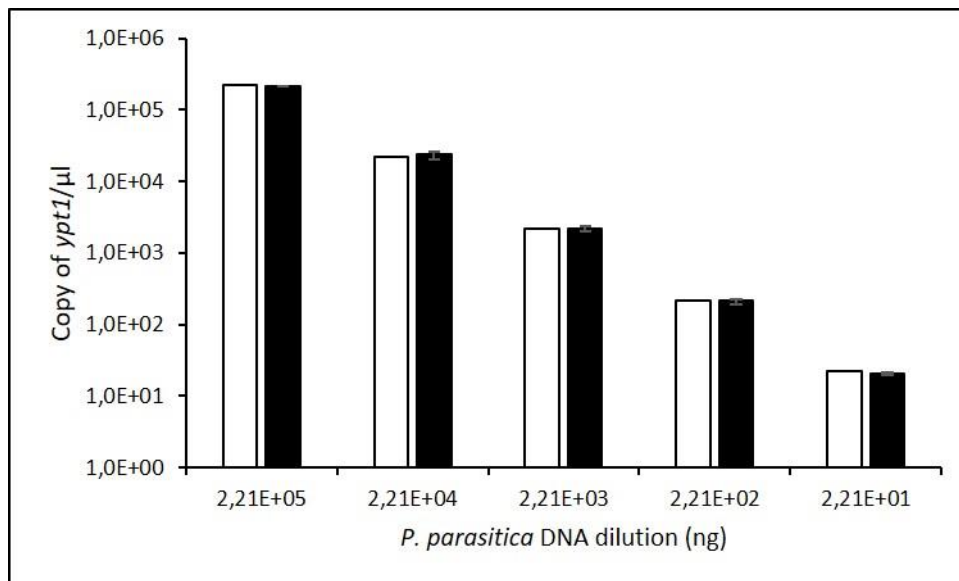


Fig. 3. Quantification of *P. parasitica* in substrate using qPCR to target the gene *Ypt1*. White columns indicate the number of *ypt1* copy's in the pure *P. parasitica* DNA and black columns the number of *ypt1* copy's in the mix *P. parasite* and substrate DNA.

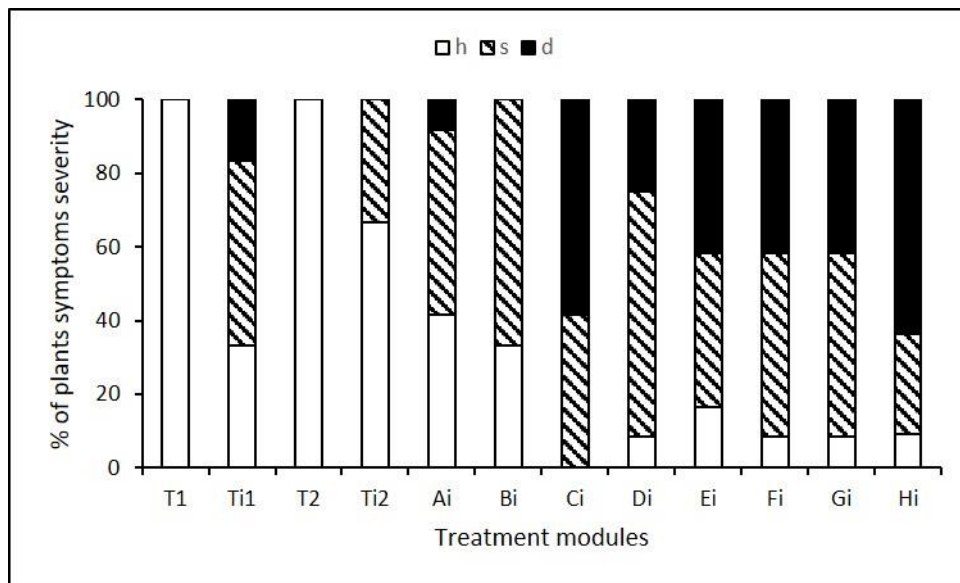


Fig. 4. Percentage of symptoms severity with each treatments modules after 1 month of inoculation. (h) healthy plants, (s) stressed plants and (d) dead plants

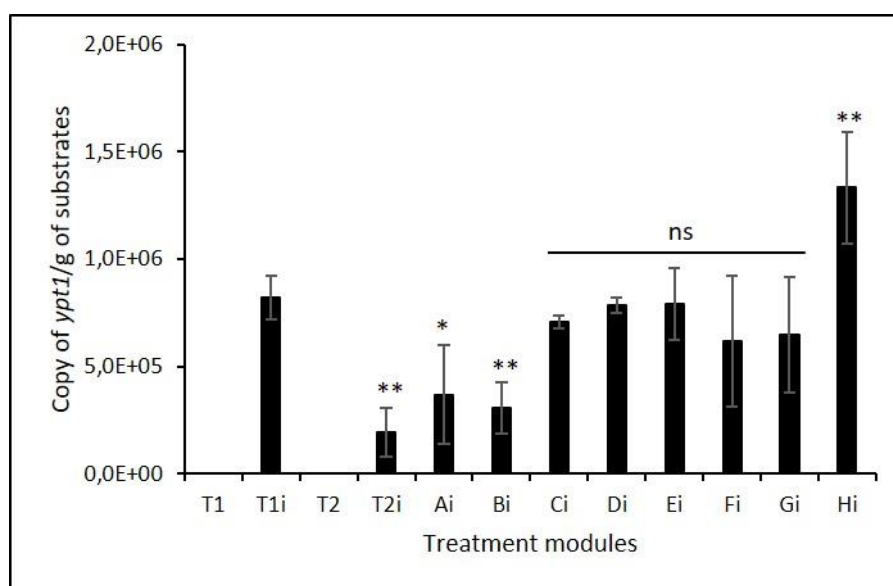


Fig. 5. Quantification of *P. parasitica* development in the substrate with different treatment modules by quantification of *Ypt1* gene. Significance (Dunnett's post multiple comparison test after ANOVA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, vs the no treated (T1i) control group. Bars plot means \pm SD of three replicates.

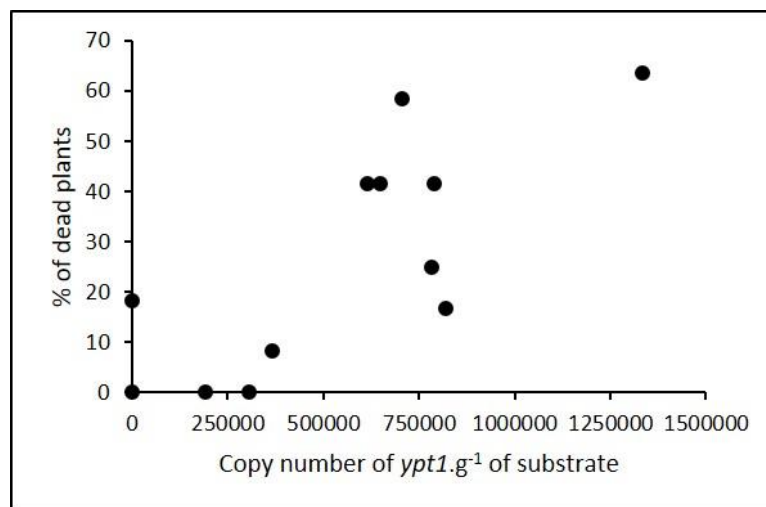


Fig. 6. Correlation between *C. ternata ypt1* copy number in 1 g of substrate and the percentage of dead plants. Pearson's correlation was used to determine the link between ypt1 copy number and plants death.

DISCUSSION

III. Discussion

Identification des oomycètes pathogènes de *C. ternata*

L'isolement d'oomycètes sur des plants de *C. ternata* issus de pépinières situées en Ile-de-France, Aquitaine et Normandie, et présentant les symptômes de la pourriture racinaire, a confirmé la présence des genres *Pythium* et *Phytophthora* sur les racines. Par rapport aux travaux rapportés en 2009 (Horticultural Development Company, 2009), les résultats acquis dans le cadre de ce travail ont permis de mettre en évidence la présence d'autres espèces de *Pythium* et *Phytophthora*. En effet, en 2009, la présence de *Pythium ultimum*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora cinnamomi*, *P. citrophthora* et *Phytophthora parasitica* a été mentionnée. Nos résultats ont montré la présence de *Pythium spinosum*, et de *Pythium intermedium*, de *P. parasitica* et de *Phytophthora tropicalis*. La découverte de nouveaux pathogènes de *C. ternata* renforce l'idée d'une grande diversité de pathogènes capables d'infecter cette plante, ce qui en fait un hôte vulnérable et difficile à défendre.

Les approches conventionnelles utilisées pour identifier les espèces se fondent sur des observations microscopiques et des caractérisations morphologiques des spores et les mycéliums (Drenth *et al.*, 2006). Les ressemblances morphologiques existant entre les espèces peuvent induire des biais et nécessitent des approches complémentaires pour confirmer l'identification (Kong *et al.*, 2004). Dans notre étude, l'identification des espèces a été réalisée par l'amplification et le séquençage de la région ITS des ADNr. Cette région est considérée comme un élément clé de l'identification des espèces de champignons et d'oomycètes. Cette technique permet de différencier les espèces d'une façon sûre et fiable (Bailey *et al.*, 2002; Bellemain *et al.*, 2010).

Le fait de trouver *P. parasitica* dans notre étude et dans le rapport de 2009 indique que cette espèce semble être l'un des pathogènes les plus présents chez *C. ternata*. Des résultats similaires ont été trouvés dans le sud-ouest de la France, où la station expérimentale (GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest-Astredhor) a identifié *P. parasitica* comme l'espèce pathogène dominante chez les *C. ternata* touchés par la pourriture racinaire (Talbot & Wedgwood, 2009). La présence de cette espèce dans plusieurs études est due à sa distribution large au niveau mondial (Erwin & Ribeiro, 1996). L'espèce *P. tropicalis* est identifiée pour la

III. Discussion

première fois sur *C. ternata*. Cette espèce a précédemment été identifiée dans les îles pacifiques, l'Amérique du nord et l'Europe (www.phytophthoradb.org). Les espèces *P. tropicalis* et *P. capsici* n'étaient pas distinguées jusqu'à l'étude de Aragaki & Uchida, (2001) qui a permis de les différencier. La distribution géographique de *P. tropicalis* est par conséquent floue. Les espèces hôtes de ce pathogène incluent 12 familles et 14 genres. Parmi ces hôtes figurent des plantes de la famille des Rutacées comme *Citrus* spp. en Inde (Jung *et al.*, 2017) et des plantes ornementales comme *Cyclamen persicum* en Allemagne et les Pays-Bas (Gerlach & Schubert, 2001) et *Rhododendron* spp. en Italie et en Virginie (Hong *et al.*, 2006; Galli *et al.*, 2013). De plus *P. tropicalis* a été trouvé au niveau des pépinières dans l'eau recyclée en Californie (Jung *et al.*, 2017). D'après les données de la littérature (Farr & Rossman, 2017; phytophthoradb), il apparaît donc que c'est la première fois que *P. tropicalis* est identifiée en France et sur *C. ternata*.

L'identification de *P. tropicalis* sur les plantes infectées provenant d'Ile de France paraît surprenante. L'origine de *P. tropicalis* trouvée sur *C. ternata* en France, peut-être due à d'autres plantes ornementales exotiques contaminées par *P. tropicalis* comme *Rhododendron* spp. importées en pépinière ou bien l'utilisation de l'eau d'arrosage contaminée. Cette constatation confirme l'idée proposée par Drenth *et al.*, (2006), qui souligne l'importance d'une technique fiable, rapide et économique permettant la détection et l'identification des espèces pathogènes dans la plante ou dans le substrat, afin de limiter le transfert des *Phytophthora* à partir des pépinières vers les vergers et les champs. Ce type d'outil permettrait en outre de mieux identifier les flux contribuant à la dissémination mondiale d'espèces dans un objectif de mieux la contrôler. Par exemple, des espèces comme *Phytophthora alni* et *Phytophthora megakarya* ont une distribution géographique limitée au niveau mondial. Des mesures de quarantaine sont importantes afin de limiter le transfert de ces pathogènes dans des nouveaux écosystèmes et zones géographiques. L'introduction d'une nouvelle espèce pathogène peut engendrer des dégâts catastrophiques au niveau de l'écosystème. L'introduction de *P. cinnamomi* en Australie en 1920 a causé la destruction totale de centaines de milliers d'hectares de forêt d'*Eucalyptus marginata* (Erwin & Ribeiro, 1996). Plus récemment, au début du 21ème siècle, la mort subite du chêne en Amérique du Nord par l'introduction probable de *Phytophthora ramorum* est devenue un problème écologique important avec des milliers d'hectares de forêt de chênes disparus (Jung *et al.*, 2000; Rizzo &

Garbelotto, 2003). Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la virulence de *P. tropicalis* vis-à-vis de *C. ternata* est nécessaire afin d'identifier l'ampleur de la menace ou des dégâts que pourrait causer cette espèce dans les pépinières.

Rôle des AGPs et des alcaloïdes furoquinoliques dans l'interaction plante-pathogène

Des données précédentes ont révélé des niveaux de résistance différents vis-à-vis des maladies pour les deux cultivars Aztec pearl et Goldfinger très commercialisés en France. Dans les pépinières, le cultivar Aztec pearl est moins touché par la pourriture racinaire, comparé au cultivar Goldfinger (communication interne ASTREDHOR et la pépinière André Briant Jeunes Plants).

La paroi cellulaire est la première barrière de protection des plantes contre les pathogènes. Des études récentes ont souligné l'importance des arabinogalactane-protéines, composants de la paroi végétale, dans les interactions plantes-microorganismes (Nguema-Ona *et al.*, 2013). Plus particulièrement, les AGPs issues de cellules bordantes racinaires de pois interfèrent *in-vitro* avec le chimiotactisme, l'enkystement et la germination de l'oomycète *A. euteiches* (Cannesan *et al.*, 2012).

Aucune information n'est disponible sur la composition en AGPs chez *C. ternata*. L'analyse de la composition en monosaccharides a montré que la partie glycanique des AGPs est formée de plus de 90 % d'Ara et de Gal dans toutes les fractions. Cette composition de la partie glycanique n'est pas surprenante, puisque beaucoup d'études décrivent ces deux sucres comme les sucres majoritaires des AGPs (Showalter, 2001; Ellis *et al.*, 2010; Tryfona *et al.*, 2010). Les analyses biochimiques des AGPs extraites à partir des deux cultivars Aztec pearl et Goldfinger, ont montré des caractéristiques uniques au niveau des AGPs racinaires d'Aztec pearl. En effet, la fraction racinaire de ce cultivar possède une population supplémentaire d'AGPs de faible poids moléculaire par rapport au cultivar Goldfinger et aux AGPs issues des fractions foliaires. De plus, une différence au niveau du ratio Ara:Gal a été constatée au niveau des AGPs racinaires d'Aztec pearl. Ce ratio était de 0.3 pour les AGPs racinaires d'Aztec pearl, et entre 0.52 et 0.59 pour les autres fractions. Des différences dans la composition chimique des AGPs ont été observées entre espèces différentes (Nguema-Ona *et al.*, 2014). Par exemple, le ratio Ara:Gal est de 1.7 dans les xylèmes de *Pinus radiata* (Putoczki *et al.*, 2007) et

III. Discussion

de 0.7 dans les graines et la culture cellulaire d'*Araucaria angustifolia* (Maurer *et al.*, 2010). Cannesan *et al.* (2012) ont montré que les AGPs d'apex racinaires et des cellules bordantes étaient différentes entre le pois (*Pisum sativum*) et le colza (*Brassica napus*). Ce ratio était de 0.78 pour *P. sativum* et de 0.62 pour *B. napus*.

Par ailleurs, les AGPs racinaires d'Aztec pearl sont dépourvues de l'épitope détecté par l'anticorps JIM13. Les épitopes reconnus par l'anticorps JIM13 ont été détectés dans les racines de plusieurs espèces, comme *A. thaliana*, *P. sativum* et *B. napus* (Vicré *et al.*, 2005; Cannesan *et al.*, 2012). Ainsi, l'absence de marquage par JIM13 dans les racines d'Aztec pearl s'avère surprenante. D'autres études ont montré la présence en abondance de cet épitope à l'interface de la paroi cellulaire dans l'interaction symbiotique entre *A. glutinosa* et *Frankia* au début de l'infection (Berry *et al.*, 2002). Les auteurs ont suggéré que l'épitope JIM13 peut être impliqué dans l'orientation de la croissance du mycélium de *Frankia* au début de l'infection et/ou participe à la formation d'une nouvelle paroi cellulaire au niveau du site de pénétration (Berry *et al.*, 2002). De plus l'épitope de JIM13 a été identifié au niveau des cellules apparentées aux cellules bordantes chez *A. thaliana* (Vicré *et al.*, 2005). Les cellules apparentées aux cellules bordantes sont aussi impliquées dans la protection des racines (Plancot *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données suggère que l'épitope JIM13 joue un rôle dans l'interaction racine-pathogène.

Des tests *in vitro* réalisés à partir d'AGPs extraites de l'apex racinaire et des cellules bordantes de pois et de colza ont montré leur implication dans le contrôle du chimiotactisme des zoospores de l'oomycète pathogène *Aphanomyces euteiches*. Les AGPs des deux espèces sont capables d'attirer *in vitro* les zoospores par chimiotactisme, d'induire leur enkystement, puis d'inhiber la germination des kystes de cet oomycète. Toutefois, les AGPs extraites des apex de pois montrent une plus grande capacité dans l'attraction de ces zoospores et dans l'inhibition de germination des kystes. Ces résultats montrent que des différences dans la composition chimique des AGPs peuvent avoir un lien sur leurs fonctions biologiques. Ces différences chimiques ont été observées au niveau de la partie glycanique des AGPs. Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que des différences dans la structure des AGPs jouent un rôle dans l'interaction avec *P. parasitica*.

Nous avons voulu vérifier si les AGPs extraites des deux cultivars de *C. ternata* présentaient les mêmes propriétés d'inhibition vis-à-vis d'oomycètes pathogènes pour cette

III. Discussion

plante. Des tests *in vitro* ont été réalisés avec l'oomycète *P. parasitica*. Pour la réalisation de ces travaux, nous avons établi une collaboration avec le Dr. Agnès Attard (Institut Sophia Agrobiotech, Unité Mixte de Recherche 1355 Université Nice Sophia Antipolis), qui est spécialisée dans l'étude de l'infection des racines d'*Arabidopsis thaliana* par *P. parasitica*. Le Dr. A. Attard nous a orienté sur le choix de la souche INRA-310 de *P. parasitica* pour la réalisation de tests *in vitro* permettant d'étudier le rôle des AGPs dans les interactions avec ce pathogène. Nos résultats avec les extraits d'AGPs issues de *C. ternata* n'ont pas permis de reproduire les mêmes effets significatifs sur le chimiotactisme des zoospores de *P. parasitica* que ceux obtenus par Cannesan *et al.*, (2012) avec *Aphanomyces* en réponse aux AGPs du pois. L'effet des AGPs extraites de *C. ternata* a également été testé sur la croissance du mycélium, après germination des zoospores de *P. parasitica*. Une augmentation du développement du mycélium a été observée en présence des fractions extraites à partir de la partie aérienne d'Aztec pearl et les parties aérienne et racinaire de Goldfinger. Il faut noter que les trois populations stimulant la croissance du mycélium sont celles présentant les mêmes caractéristiques biochimiques. En revanche, cette augmentation de croissance n'est pas observée en présence de traitements avec la fraction des AGPs racinaires d'Aztec pearl. Ces AGPs sont caractérisés par la présence d'une deuxième population de poids moléculaire plus faible, l'absence de marquage par JIM13 et le ratio Ara:Gal de 0,3 non observable pour les autres AGPs de *C. ternata*. Ainsi, une corrélation peut être observée entre une population d'AGPs et sa fonction vis-à-vis de *P. parasitica*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces AGPs peuvent être dégradées par *P. parasitica*, et utilisées comme source de nutriments et d'énergie. Des études précédentes ont montré que des rhizobactéries sont capables de se développer en utilisant le mucilage de pois comme source de nutriments (Knee *et al.*, 2001). La composition monosaccharidique de ce mucilage indique une grande richesse en AGPs, ce qui amène les auteurs à suggérer que ces bactéries sont capables d'hydrolyser la partie glycanique des AGPs, et de l'utiliser comme une source de carbone (Knee *et al.*, 2001). De plus, d'autres études ont montré que des micro-organismes pathogènes du sol comme *F. oxysporum*, *Aspergillus niger* et *Neurospora crassa* possèdent des enzymes capables de dégrader la partie glycanique des AGPs, telles que les β -1,3-galactanases, les β -1,6-galactanases, les arabinofuranosidases et les β -glucuronidases (Haque *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2007; Takata *et al.*, 2010). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les AGPs

racinaires d'Aztec pearl ne peuvent être dégradées par *P. parasitica*, et par conséquent pas utilisées comme source de nutriments.

Les MS et plus particulièrement les alcaloïdes sont aussi impliqués dans la défense des plantes. Les Rutacées sont riches en alcaloïdes furoquinoliques (Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016), de plus des études réalisées sur les feuilles de *C. ternata* ont montré la présence de ces alcaloïdes (Johns *et al.*, 1967; Montagu-Bourin *et al.*, 1980; Boyd *et al.*, 2007; de Carvalho *et al.*, 2016; Leitão *et al.*, 2017). Par contre, aucune information n'est disponible sur la teneur en alcaloïdes furoquinoliques dans les racines des cultivars Aztec pearl et Goldfinger.

L'analyse des alcaloïdes de *C. ternata*, Aztec pearl et Goldfinger (feuilles et racines, en condition témoin et en condition infectée) par HPLC-DAD, a montré la présence de 15 alcaloïdes accumulés dans les feuilles et les racines. Neuf alcaloïdes furoquinoliques ont été identifiés suite à des analyses complémentaires par UPLC-DAD-MS/MS par comparaison avec des standards purs disponibles au laboratoire et les données de la littérature (O'Donnell *et al.*, 2006). Nos résultats au niveau des feuilles sont en concordance avec les données disponibles dans la littérature (Boyd *et al.*, 2007). Au niveau des racines, notre étude révèle que la partie racinaire contient également des alcaloïdes furoquinoliques, donnée nouvelle puisqu'il n'existe pas d'information sur la caractérisation racinaire en alcaloïde chez cette plante. Les alcaloïdes identifiés dans les feuilles de *C. ternata* classiques sont similaires à ceux identifiés dans notre étude chez les deux cultivars tolérants et résistants à la maladie. De façon intéressante, six composés ont été détectés dans les feuilles et les racines d'Aztec pearl et Goldfinger sans qu'ils aient pu être identifiés. Une caractérisation fine nécessitant leurs purifications et des analyses en résonance magnétique nucléaire pourraient être envisagées dans un autre projet afin d'identifier leurs structures (Eisenreich & Bacher, 2007).

Il est intéressant de noter que des différences ont été relevées dans la composition en alcaloïdes entre les cultivars sensibles et résistants. L'ACP réalisée au niveau des racines (Page 93), permet de distinguer les deux cultivars en conditions non inoculées. L'inoculation avec le mycélium de *P. parasitica* n'induit pas des modifications au niveau de l'ACP. En revanche, suite à l'inoculation par les zoospores de *P. parasitica*, il n'est plus possible de distinguer ces cultivars, les compositions en alcaloïdes deviennent similaires. En condition non inoculée, les alcaloïdes platydesminium, desmethoxychoisyine, unknow 4 et 5 ont été plus concentrés chez Aztec pearl. Suite à l'inoculation par les zoospores de *P. parasitica*, la quantité de ces

III. Discussion

alcaloïdes furoquinoliques a été réduite et devenue similaire à celle de Goldfinger. La diminution de la concentration de ces composés, peut être due au désarmement chimique réalisé par le pathogène. En fait, le pathogène est en capacité de dégrader/détoxifier certains alcaloïdes dans des formes moins réactives afin d'infecter la plante (Bouarab *et al.*, 2002). Par exemple, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, est capable de sécréter des enzymes nommés tomatinases, afin de dégrader le alpha-tomatine en glycon tomatidine et tetrasaccharide lycotetraose qui sont moins actifs dans la défense de la plante (Ito *et al.*, 2004). *R. leguminosarum* est capable de métaboliser le phytoalexine wyerone de *Vicia faba* en hydroxyester wyerol (Görge & Werner, 1991). *Fusarium pseudograminearum* est capable de dégrader la classe de phytoalexine benzoxazolinone (Kettle *et al.*, 2015). Ainsi, ces composés pourraient participer à la résistance des racines dans les stades précoces de l'infection, puis être dégradés par le pathogènes. Cette hypothèse expliquerait pourquoi les profils métaboliques racinaires des deux cultivars non infectés sont différents, et que suite à l'infection par les zoospores, il n'est plus possible de les discriminer.

L'inoculation de zoospores ou de mycélium de *P. parasitica* avec les racines d'Aztec pearl induit l'accumulation de choisyine ou de diméthylallyl- γ -fagarine. Dans les conditions non inoculées, ces deux alcaloïdes n'étaient pas détectés dans les racines d'Aztec pearl et de Goldfinger. L'induction de ces deux alcaloïdes dans les racines suggère leur rôle important dans la tolérance à l'infection. Ces deux alcaloïdes peuvent être synthétisés *de-novo* au niveau de la racine, ou transportés au niveau des racines à partir des feuilles, ou les deux (les deux alcaloïdes ont été détectés dans les feuilles d'Aztec pearl dans la condition non inoculée; ces données ne sont pas illustrées). Une étude a montré la synthèse *de-novo* d'un métabolite secondaire (l'acide cinnamique) au niveau des racines de l'orge (*Hordeum vulgare* L. cv. 'Barke') après l'inoculation avec *Fusarium graminearum* Schwabe strain 1095 (Lanoue *et al.*, 2010). La nicotine est un alcaloïde utilisé dans la défense de la plante. Cet alcaloïde est produit au niveau des racines de *N. tabacum* puis transporté au niveau des feuilles pour défendre la plante contre les herbivores (Shitan *et al.*, 2015).

Les alcaloïdes furoquinoliques possèdent de fortes activités biologiques intéressantes (Adamska-Szewczyk *et al.*, 2016) pour le domaine pharmaceutique (Radulović *et al.*, 2011; Wahyuni *et al.*, 2014; de Carvalho *et al.*, 2016) et le domaine phytosanitaire (Zhao *et al.*, 1998; Harkrader & Meyer, 2001; Emam *et al.*, 2010; Nebo *et al.*, 2014). Afin de tester la capacité des

III. Discussion

alcaloïdes furoquinoliques à protéger la plante contre *P. parasitica*, des tests *in-vitro* d'inhibition de la croissance de mycélium ont été réalisés. Quatre alcaloïdes (choisyine, platydesminium, balfourodinium et skimmianine) disponibles sous forme de produits purs, ainsi que la référence en matière de phytosanitaire, le mefenoxam (capable d'inhiber le développement de *Phytophthora*) ont été testés. Le plus fort taux d'inhibition de la croissance du mycélium a été observé avec le traitement au mefenoxam. Ce résultat montre que la souche de *P. parasitica* INRA-310 n'a pas développé de résistance contre ce produit. Tous les alcaloïdes ont réduit significativement la croissance du mycélium de *P. parasitica* en culture liquide à partir d'une concentration de 20 µg/ml. Les meilleurs taux d'inhibition ont été observés avec platydesminium, balfourodinium et skimmianine. En revanche, la choisyine a montré un taux d'inhibition plus faible. Une étude a montré une augmentation dans l'effet répulsif des alcaloïdes de type pyrrolizidine contre des insectes quand ils sont utilisés en mélange, ce qui suggère l'effet synergique de ce mélange. (Macel *et al.*, 2005). Dans le cas de *C. ternata* et *P. parasitica*, nous pouvons émettre l'hypothèse que la choisyine augmente l'efficacité d'inhibition des autres alcaloïdes dans le développement de *P. parasitica*. Des tests d'inhibitions avec des traitements simultanés par plusieurs alcaloïdes seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

En partant de ce principe, il était intéressant de tester la capacité de l'extrait total des alcaloïdes d'Aztec pearl et de Goldfinger à inhiber la croissance du mycélium de *P. parasitica* *in-vitro*. Ce test a été réalisé par des extraits de plantes cultivées en terre ou *in vitro*. Les extraits de vitro-plants d'Aztec pearl ont provoqué une inhibition significative de la croissance de *P. parasitica*. Toutefois, l'inhibition observée n'est que de 20 %. En revanche, l'extrait d'Aztec pearl cultivé en terre a réduit significativement (plus que 65 %) la croissance de *P. parasitica*. Cette différence peut être expliquée par l'impact des conditions environnementales de croissance de la plante avant l'extraction des alcaloïdes. En fait, les vitro-plants se trouvent dans un milieu stérile sans stress biotique et abiotique, contrairement aux plantes en terre qui sont soumises à des stress biotiques et en contact continu avec plusieurs agresseurs. L'accumulation des alcaloïdes dans les plantes est souvent induite par le stress biotique et abiotique (Zhao *et al.*, 2005; Akula & Ravishankar, 2011; Verma & Shukla, 2015). Par exemple, un des problèmes majeurs de la production des alcaloïdes par des cultures cellulaires est le faible rendement de production. Une des approches pour augmenter le

rendement, est d'engendrer des stress abiotiques et biotiques *via* l'utilisation d'éliciteurs (Zhao *et al.*, 2005). La production des alcaloïdes de type pyrrolizidines par *Echium rauwolfii* en culture « *hairy root* », a été augmentée de 100 fois suite à une élicitation par le méthyl-jasmonate (MJ) (Abd El-Mawla, 2010). Le traitement par méthyl-jasmonate a aussi augmenté la production des alcaloïdes (morphine and noscapine) dans le pavot à opium (Gurkok *et al.*, 2015). Le traitement des cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don par des UV-C a augmenté la production des alcaloïdes terpénoïdes indoliques (Moon *et al.*, 2017). L'élicitation de la culture cellulaire de *Tinospora cordifolia* par le mycélium autoclavé du champignon *Piriformospora indica*, a augmenté 4 fois la production des deux alcaloïdes, jatrorrhizine et palmatine (Kumar *et al.*, 2017). L'extrait de Goldfinger n'avait pas un effet significatif sur la croissance de *P. parasitica* dans les deux conditions. Ces résultats montrent la capacité des alcaloïdes furoquinoliques à réduire le développement de *P. parasitica*, et que la composition différente d'Aztec pearl en alcaloïdes peut offrir une meilleure protection contre *P. parasitica*.

L'étude des deux cultivars, Aztec pearl et Goldfinger, nous a permis d'évaluer les rôles respectifs des AGPs et les MS de type alcaloïdes furoquinoliques. Les résultats obtenus montrent l'importance de ces deux types de composés chimiques dans la résistance de la plante à la maladie causée par *P. parasitica*. Ces résultats doivent pouvoir être valorisés pour le développement et la sélection de nouveaux cultivars. En effet, la sélection de nouveaux cultivars résistants au pathogène est une partie de la stratégie à déployer pour réduire les dégâts causés par les pathogènes, tout en respectant les engagements de limitation de recours aux intrants phytosanitaires. Elle est notamment complémentaire de la mise en œuvre de bonnes pratiques culturales.

Pratiques culturales et lutte préventive dans le cas du pathosystème *C. ternata*/*P. parasitica*

Le respect des bonnes pratiques de culture, s'il n'est pas toujours suffisant, est un préliminaire indispensable pour espérer produire des plantes en bonne santé. L'utilisation de substrats sains fait partie des techniques culturales majeures permettant de limiter les dégâts engendrés par *P. parasitica*. Néanmoins, l'ubiquité de cet organisme pathogène et la non spécificité des espèces de *Phytophthora* capables d'infecter *C. ternata*, nécessitent d'utiliser

III. Discussion

des outils performants pour évaluer l'état sanitaire des substrats de culture. Dans ce contexte, l'outil moléculaire, comme souligné par Drenth *et al.*, (2006), présente un potentiel important.

L'extraction, la quantification et l'amplification de l'ADN extrait du sol ou du substrat, notamment à l'aide de la PCR quantitative en temps réel (qPCR), est aujourd'hui largement utilisé comme outil de diagnostic de l'état sanitaire d'un support de culture (Ippolito *et al.*, 2004; Bressan *et al.*, 2016). Dans cette étude, une grande diversité d'espèces de *Phytophthora* a été identifiée sur *C. ternata*, ces résultats rejoignent ceux de Talbot & Wedgwood (2009). Cette diversité d'espèces a orienté le choix de la quantification des *Phytophthora* par la mise en place d'une qPCR spécifique au genre *Phytophthora*. Pour cela, des amorces ont été sélectionnées à partir de la littérature puis testées. Pour être valide, une PCR quantitative en temps réel doit avoir une efficacité d'au moins 90 %. Cette efficacité peut être compromise par des inhibiteurs de PCR comme les acides humiques dans le cas du sol. Pour obtenir cette efficacité, il est nécessaire d'optimiser la qPCR en faisant varier différents paramètres comme la concentration de la « bovine serum albumin (BSA) », la « T4 Gene 32 Protein (T4) », les amorces ou encore le magnésium. En plus d'une efficacité optimum, il est important d'avoir une bonne spécificité des amorces. En effet, seul le fragment cible doit être amplifié. Cette spécificité est analysée par une courbe de fusion ou dissociation. La spécificité peut être modifiée en changeant la température d'hybridation des amorces, le temps de cette phase d'hybridation ou encore en ajoutant de la T4. Dans cette étude deux couples d'amorces spécifiques au niveau du genre ont été testés : le premier couple (5.8-1R et 18Ph2F) cible la région ITS de l'opéron de l'ADNr, et le deuxième couple (YPh1F et YPh2R) cible le gène *ypt1* qui code des protéines ras-like.

Le couple d'amorces 18Ph2F et 5.8-1R a été testé selon le protocole de Scibetta *et al.* (2012). Les résultats n'ont pas permis l'obtention d'une efficacité d'amplification suffisante sur *P. parasitica* et *P. tropicalis* en souches pures (ces données ne sont pas illustrées). Le second couple d'amorces YPh1F et YPh2R ciblant le gène *ypt1* a été adapté à partir de Schena *et al.* (2006). Ces auteurs avaient testé ces amorces avec 35 espèces différentes de *Phytophthora*. Cependant ces tests n'incluaient pas *P. parasitica* et *P. tropicalis*. Ce couple d'amorces a permis une amplification du gène *ypt1* pour ces deux espèces, avec une efficacité supérieure à 90 % en culture pure.

III. Discussion

Par ailleurs, les résultats d'amplification de *P. parasitica* avec le couple d'amorces YPh1F et YPh2R a donné deux amplicons (Figure 21). Le premier est l'amplicon de 450 pb

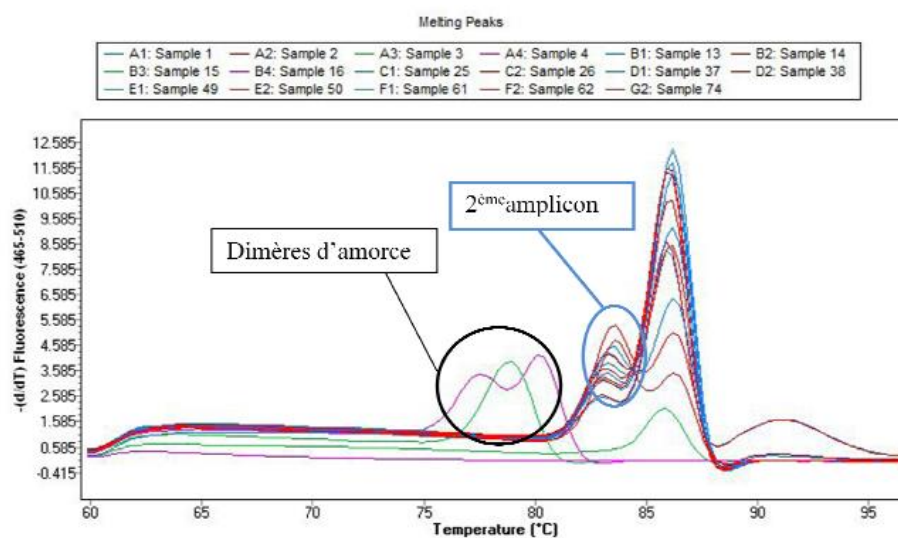


Figure 21 : Courbe de dissociation de la qPCR sur *P. parasitica* avec les amorces YPh1F et YPh2R

caractérisé par (Schena *et al.*, 2006), le second amplicon possède un « *Primer Melting Temperature* (TM) » proche de l'amplicon majeur. En effet, la courbe de dissociation a montré la présence d'un deuxième produit PCR très proche du gène cible. Ce deuxième amplicon a été observé avec *P. parasitica* INRA-310 et *P. parasitica* isolé à partir de *C. ternata*, mais pas avec *P. tropicalis*. Schena *et al.*, (2006) avaient utilisé les amorces ciblant le gène *ypt1* en qPCR. Ces auteurs n'avaient pas de deuxième fragment amplifié, cependant ils n'avaient pas travaillé sur *Phytophthora parasitica*. Ces résultats peuvent être expliqués par deux hypothèses, la première réside dans l'utilisation d'amorces dégénérées qui peuvent provoquer l'amplification d'une séquence d'ADN similaire dans le génome de *P. parasitica*. La seconde est que *P. parasitica* possède deux allèles différents pour le gène *ypt1*. Cependant, il ne semble pas exister dans la littérature une explication à cette double amplification. Cette deuxième amplification reste malgré tout mineure au regard de l'intensité de l'amplicon majoritaire et surtout elle n'est vue que chez *P. parasitica*. L'ensemble de ces résultats en fait un bon candidat à l'élaboration d'un outil d'identification et de quantification des *Phytophthora* spp. présents dans le substrat des plantes.

La qPCR offre beaucoup d'avantages dans la détection et la quantification de pathogènes dans le sol ou le substrat. Cependant, cette technique doit faire face à deux défis : (1) l'efficacité de la lyse cellulaire pour libérer l'ADN en fonction des espèces et des sols et (2)

le choix des techniques d'extraction et de purification des ADN, destinées à s'affranchir des inhibiteurs de la PCR (Prosser, 2002). Ainsi, l'efficacité de détection et quantification des différents microorganismes par qPCR peut varier selon la méthode d'extraction (Martin-Laurent *et al.*, 2001). En effet, en PCR des inhibitions d'amplification peuvent être observées, celles-ci sont le plus souvent la conséquence d'une inhibition de l'ADN polymérase par les acides humiques (Matheson *et al.*, 2010). Dans notre étude, le « *Fast DNA spin Kit for Soil* (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) » a été utilisé afin d'extraire l'ADN total de substrat, tout en se débarrassant des inhibiteurs. Afin de valider notre protocole de quantification de *Phytophthora* dans le substrat, l'ADN total du substrat, exempt de *Phytophthora*, a été inoculé avec une quantité connue d'ADN de *Phytophthora* pur. Puis, cette quantité ajoutée a été recherchée par qPCR. Les résultats montrent que notre protocole d'amplification en qPCR ne perd pas en efficacité malgré la présence de l'ADN total du substrat.

Cet outil de biologie moléculaire pourrait permettre à terme aux pépiniéristes de tester la qualité sanitaire des substrats par la quantification de *Phytophthora* présent dans ces substrats. En effet, cet outil rapide, fiable et quantitatif pourrait éviter aux pépiniéristes l'utilisation de substrats contaminés pouvant induire des pertes économiques importantes. À terme, cet outil peut également être utilisé pour évaluer l'impact des pratiques culturales (fertilisation, irrigation, utilisation de produits phytosanitaires ou d'agents de biocontrôle) sur la dynamique des populations de *Phytophthora*, et ainsi permettre une évaluation de la performance de ces différentes pratiques qui peuvent être envisagées pour limiter le développement de la maladie sur *Choisya*.

Les BCA dans le contrôle de *P. parasitica* et la protection de la culture de *C. ternata*

Les BCA sont un moyen de lutte alternatif qui permet de protéger les cultures contre leurs pathogènes. Dans le cadre de nos travaux, nous avons choisi 4 espèces de BCA, utilisés en pépinière et qui ont montré une capacité à protéger des plantes contre des *Phytophthora* : *G. intraradices*, *G. catenulatum*, *T. atroviridae* et *B. amyloliquefaciens*, et testé leur efficacité pour la protection de *C. ternata* classique contre *P. parasitica*. Les inoculations artificielles par *P. parasitica* ont été réalisées dans la station expérimentale d'ASTREDHOR Seine-Manche à Saint-Germain-en-Laye. Afin de produire une quantité suffisante d'inoculum de *P. parasitica*,

III. Discussion

plusieurs techniques ont été envisagées (ces données ne sont pas illustrées). L'utilisation des zoospores était possible dans le cas d'un test à petite échelle au sein d'un laboratoire. Cependant, leur production en quantité suffisante pour un test à grande échelle, et le transport des zoospores au niveau de la station sans affecter leur viabilité sont techniquement très compliqués voire impossible actuellement. Les oospores constituent un bon candidat d'inoculum, mais *P. parasitica* est une espèce hétérothallique qui nécessite l'utilisation de deux types sexuels A1 et A2 pour que la production des oospores soit possible (Ko, 1978; Meng *et al.*, 2014). La méthode choisie dans notre étude pour la production d'inoculum, est la méthode décrite par Holmes & Benson (1994) et Loyd *et al.* (2014). Cette technique consiste à cultiver les *P. parasitica* sur des grains de riz, qui seront par la suite introduits dans le substrat de *C. ternata*. La culture sur grain de riz offre l'avantage de produire de l'inoculum de *Phytophthora* en grande quantité, et de faciliter le transport vers la station d'expérimentation.

L'évaluation de l'efficacité des agents de biocontrôle passe par (1) l'observation des symptômes des *C. ternata* et (2) la quantification de la densité de *P. parasitica* dans le substrat. Ces travaux ont d'ailleurs montré l'existence d'une relation entre l'apparition des symptômes sur la plante et la densité du pathogène. En effet, une corrélation significative a été observée entre les symptômes de *C. ternata* et la densité de *P. parasitica* présente dans le substrat. Ce lien permet d'identifier potentiellement le seuil à partir duquel la densité de *P. parasitica* présente dans le sol peut engendrer des dégâts dans la culture de *C. ternata*. L'existence d'un lien entre la quantité de pathogène présent dans le substrat ou le sol, et la sévérité des symptômes observés sur la plante n'est pas toujours facile à mettre en œuvre. Sauvage *et al.* (2007) ont mis en évidence une corrélation entre la quantité d'un oomycète, *A. euteiches* présent dans le sol et la sévérité des symptômes observés sur la plante. Ces observations ont également été faites pour d'autres pathogènes tels que *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Herdina *et al.*, 1997). Afin de confirmer la corrélation observée entre symptômes et densité dans le cas du pathosystème *C. ternata/P. parasitica*, il serait nécessaire de reconduire ces expérimentations. En effet, l'existence de cette relation est loin d'être toujours observée, notamment dans la mesure où le potentiel infectieux d'un sol est non seulement lié à la présence et la quantité du (ou des) pathogène(s) mais aussi à des facteurs biotiques (consortium microbien) et abiotiques (facteurs environnementaux) de ce sol (Sauvage *et al.*, 2007; Basallote-Ureba *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016; Kanaan *et al.*, 2017).

III. Discussion

Le taux de survie des plantes de *C. ternata* inoculés avec *P. parasitica* s'est révélé dépendant de la nature du traitement. Dans cette étude, le meilleur taux de survie a été obtenu par le traitement chimique. En revanche, les produits phytosanitaires ne sont pas une solution durable, du fait du développement de résistances par plusieurs espèces de *Phytophthora* (Parra & Ristaino, 2001; Dunn *et al.*, 2010), incluant *P. parasitica* (Timmer *et al.*, 1998; Lamour *et al.*, 2003). De plus, ces produits sont nocifs pour l'environnement et la santé. Ces effets nocifs sont à l'origine de lois plus strictes et de plans (Ecophyto I et II) afin de réduire leur utilisation (Gullino & Kuijpers, 1994). L'utilisation des BCA comme moyen de lutte alternatif est une solution prometteuse dans le contrôle des pathogènes du sol. Plusieurs études ont montré l'efficacité des espèces de BCA dans le contrôle du développement de *Phytophthora* et dans la protection des plantes (Vestberg *et al.*, 2004; Lioussanne *et al.*, 2008; Singh & Islam, 2010; Lee *et al.*, 2015). Dans notre étude, les traitements qui impliquent des BCA ont montré des résultats encourageants. En effet, les résultats de traitements biologiques les plus probants ont été obtenus pour deux modules de traitements (Ai et Bi). Ces deux modules combinent l'utilisation simultanée de deux champignons chacun, le premier est un champignon mycorhizien et le second est un champignon filamentueux (non mycorhizien). Ils sont constitués de *G. intraradices* et *G. catenulatum* pour (Ai) et de *G. intraradices* et *T. atroviridae* pour (Bi). Plusieurs études réalisées sur d'autres pathosystèmes ont montré l'avantage d'un traitement biologique combiné (Roberts *et al.*, 2005; Thilagavathi *et al.*, 2007; Chemeltorit *et al.*, 2017). Cette approche offre plusieurs avantages, notamment en ce qui concerne l'effet synergique potentiel entre microorganismes, ce qui est essentiel pour assurer une bonne efficacité du traitement biologique (Spadaro & Gullino, 2005). Selon la littérature, c'est la première fois qu'il a été démontré que la combinaison de ces deux traitements permet de limiter le développement de *P. parasitica* dans le substrat et de protéger *C. ternata*.

Une étude a démontré la capacité de traitement combiné d'un champignon (*Trichoderma hamatum*) et d'une bactérie (*Pseudomonas aeruginosa*) à protéger les semis de piment d'ornement (*Capsicum annuum*) contre *P. capsici* (Chemeltorit *et al.*, 2017). Dans notre étude, le traitement (Ci) combinant un champignon (*G. intraradices*) et une bactérie (*B. amyloliquefaciens*) n'a pas montré une réduction significative de *P. parasitica*. L'effet de traitement combinant des BCA varie selon la plante hôte, l'espèce de BCA et l'espèce

III. Discussion

pathogène (Schisler *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2011). Ces observations peuvent être expliquées par le fait que ces bactéries apportées dans le substrat n'aient pas la capacité de s'adapter dans la rhizosphère à cause notamment de la compétition avec les souches natives (Lee *et al.*, 2015). Ces problèmes sont plus fréquents quand les souches bactériennes utilisées ne sont pas natives de la rhizosphère de la plante hôte (Lee *et al.*, 2015). L'application d'un traitement combiné peut avoir des conséquences négatives, comme le cas du traitement Hi (*G. catenulatum* et *B. amyloliquefaciens*) de notre étude. Ce traitement a réduit le taux de survie des plantes de *C. ternata* inoculés par *P. parasitica*. Cette diminution de survie peut être causée par une interaction compétitive entre les deux espèces de BCA, permettant au *P. parasitica* de se développer. L'efficacité d'un traitement combiné est optimisée quand les BCA appliqués ont des modes d'action différents (Guetsky *et al.*, 2002). Dans ce contexte Bora *et al.*, (2004) ont montré une diminution dans le contrôle de *F. oxysporum f. sp. Melonis* suite à un traitement impliquant deux souches de *Pseudomonas putida*, *P. putida* souche 30 et souche 180, par comparaison à un traitement individuel avec la souche 30 uniquement. Finalement, nos travaux ont montré que les traitements utilisant un agent de contrôle biologique seul n'ont pas réduit ou augmenté significativement le développement de *P. parasitica*. En effet, le traitement biologique ayant eu un double effet efficace sur le développement du pathogène et la protection des plantes, est obtenu dans le cas du traitement combinant le champignon mycorhizien et le champignon filamenteux. Ces observations sont sans doute liées aux effets de synergie entre ces deux microorganismes.

Les résultats de ces travaux mettent en évidence les approches potentielles pouvant être déployées pour limiter les dégâts causés par *P. parasitica* aux cultures de *C. ternata*. Elles impliquent le développement de cultivars plus résistants, la mise en place de pratiques culturales préventives et le traitement par des BCA. Ces travaux montrent aussi le potentiel important des molécules impliquées dans les mécanismes de défense de la plante, telles que les AGPs et les MS qui ont montré leur rôle potentiel dans la protection de *C. ternata* contre *P. parasitica*. Le potentiel des cultivars de *Choisya* à produire ou non ces deux types de molécules est une piste sérieuse pour la sélection de nouveaux cultivars plus résistants au pathogène. Par ailleurs, la mise en œuvre de l'outil qPCR, peut permettre le contrôle de la qualité sanitaire des substrats par la détection et la quantification de la densité de *Phytophthora* avant la mise en culture de *C. ternata*. Enfin, l'utilisation des BCA comme moyen

III. Discussion

de traitement alternatif a montré des résultats prometteurs dans le contrôle du développement de *P. parasitica* dans le substrat, et par la réduction des symptômes observés sur *C. ternata*. Il est vraisemblable de penser que l'application combinée de ces trois approches dans les cultures de *C. ternata* pourrait limiter d'une manière significative les dégâts causés par *P. parasitica* tout en réduisant l'utilisation de pesticides.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV. Conclusions et perspectives

Les résultats de ces travaux offrent plusieurs possibilités pour lutter efficacement contre *P. parasitica* et limiter ainsi les dégâts causés par ce pathogène aux cultures de *C. ternata*. Ces approches de lutttes alternatives reposent sur une démarche préventive impliquant (1) le développement de cultivars plus résistants, (2) l'utilisation de bonnes pratiques pour la mise en place de la culture et (3) le traitement par des BCA. La sélection de nouveaux cultivars plus résistants au pathogène pourrait reposer sur la capacité des plantes à produire les AGPs et MS identifiés dans le cadre de ce travail. Le développement de l'outil moléculaire pour quantifier spécifiquement le pathogène dans le substrat peut permettre de contrôler la qualité sanitaire du substrat et accompagner le développement de bonnes pratiques de mise en culture. Enfin, l'utilisation des BCA comme moyen de lutte alternatif a montré des résultats prometteurs dans le contrôle du développement de *P. parasitica* dans le substrat, et dans la réduction des symptômes observés sur *C. ternata*.

Cette étude nous a permis d'identifier *P. parasitica* comme l'espèce pathogène majeure de *C. ternata* et la présence de *P. tropicalis* en France et chez *C. ternata* pour la première fois. Dans l'objectif de déterminer les risques et les pertes potentielles qui peuvent être induits par *P. tropicalis* aux producteurs de *C. ternata* en France, des tests d'inoculations artificielles sont nécessaires pour déterminer le degré de virulence de ce pathogène.

La caractérisation biochimique des AGPs de deux cultivars Aztec pearl et Goldfinger a montré une différence au niveau racinaire. Les AGPs racinaires d'Aztec pearl ont présenté des différences dans la composition en monosaccharide, notamment par la présence d'une population de faible poids moléculaire, l'absence d'épitope JIM13 et le ratio Ara:Gal plus petit. Le test *in-vitro* de croissance de *P. parasitica* avec les AGPs issues de deux cultivars montre l'effet de la différence structurale sur l'interaction AGPs-pathogène. En effet, contrairement aux AGPs issues de Goldfinger et les AGPs issues des feuilles d'Aztec pearl, les AGPs racinaires de la variété Aztec pearl n'ont pas stimulé la croissance du mycélium de *P. parasitica*. Ces analyses devraient être complétées par des tests d'immunomarquages des AGPs dans les racines, ainsi que pendant l'infection, afin de montrer si c'est AGPs se trouvent à l'interface entre la plante et son pathogène. De plus, l'extraction et la caractérisation des AGPs de deux

cultivars dans la condition infectée sont aussi intéressantes pour déterminer si l'infection induit un changement dans la quantité ou la structure des AGPs.

La caractérisation des alcaloïdes d'Aztec pearl et de Goldfinger a montré que les racines des deux cultivars contiennent des alcaloïdes furoquinoliques, ainsi qu'en alcaloïdes non identifiés. La composition en alcaloïdes est différente entre les racines de deux cultivars, et une teneur plus élevée est observée dans les racines d'Aztec pearl. L'inoculation des racines par les zoospores et le mycelium de *P. parasitica* induit respectivement la synthèse de choisyine et de dimethylallyl- γ -fagarine uniquement dans les racines d'Aztec pearl. Les tests d'inhibition de la croissance du mycélium de *P. parasitica* par des alcaloïdes commerciaux, montre la capacité de ces alcaloïdes à inhiber la croissance du mycélium de *P. parasitica*. L'application exogène d'alcaloïdes totaux extraits des deux cultivars, indique que seulement les alcaloïdes extraits d'Aztec pearl feuille et/ou racines sont capables d'inhiber la croissance de mycélium de *P. parasitica*. Cette inhibition est plus importante que celle observée avec les tests réalisés avec un seul alcaloïde. Cette augmentation d'efficacité peut être due à l'effet synergique de différents alcaloïdes. Afin de montrer cet effet, des tests d'inhibition en appliquant plusieurs alcaloïdes ensembles sont nécessaires. L'isolement des alcaloïdes non identifiés et l'identification de leurs structures est importante afin de tester les effets de ces alcaloïdes sur le développement de *P. parasitica*.

Le développement de la PCR quantitative en temps réel a montré l'efficacité de cette technique à détecter et quantifier la présence de *Phytophthora* dans le sol. Cette technique à terme pourra permettre aux producteurs de vérifier l'état sanitaire de leurs substrats avant de les utiliser pour la culture de *C. ternata*. Cette technique prophylactique est déjà disponible pour d'autres systèmes tel que la recherche de *V. dahliae* dans le sol agricole utilisé pour le lin (Bressan *et al.*, 2016). De plus, cette technique nous a permis d'évaluer l'efficacité des BCA dans le contrôle du développement de *P. parasitica* dans le substrat de *C. ternata*. Les essais du contrôle biologique de *P. parasitica* dans les cultures de *C. ternata* ont montré l'efficacité d'un traitement combiné. Les deux traitements *G. intraradices* avec *G. catenulatum* et *G. intraradices* avec *T. atroviridae* ont été capables de réduire la densité de *P. parasitica* dans le substrat, ainsi que les symptômes de *C. ternata*. Afin d'améliorer le contrôle de *P. parasitica* et la protection de *C. ternata*, des tests incluant des traitements combinés de trois ou quatre BCA peuvent être envisagés dans le futur.

Les résultats de ces travaux offrent plusieurs possibilités pour lutter efficacement contre *P. parasitica* et limiter ainsi les dégâts causés par ce pathogène aux cultures de *C. ternata*. Ces approches de lutttes alternatives reposent sur une démarche préventive impliquant (1) le développement de cultivars plus résistants, (2) l'utilisation de bonnes pratiques pour la mise en place de la culture et (3) le traitement par des BCA. La sélection de nouveaux cultivars plus résistants au pathogène pourrait reposer sur la capacité des plantes à produire les AGPs et MS identifiés dans le cadre de ce travail. Le développement de l'outil moléculaire pour quantifier spécifiquement le pathogène dans le substrat peut permettre de contrôler la qualité sanitaire du substrat et accompagner le développement de bonnes pratiques de mise en culture. Enfin, l'utilisation des BCA comme moyen de lutte alternatif a montré des résultats prometteurs dans le contrôle du développement de *P. parasitica* dans le substrat et dans la réduction des symptômes observés chez *C. ternata*.

La combinaison de ces trois approches dans les cultures de *C. ternata* pourrait vraisemblablement limiter les dégâts causés par *P. parasitica*. Ainsi, elles peuvent être considérées comme une introduction à un nouveau moyen de lutte alternatif à l'utilisation des pesticides.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

Abd El-Mawla AMA. 2010. Effect of certain elicitors on production of pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Echium rauwolfii*. *Die Pharmazie* **65**: 224–226.

Acosta-García G, Vielle-Calzada J-P. 2004. A Classical Arabinogalactan Protein Is Essential for the Initiation of Female Gametogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2614–2628.

Adamska-Szewczyk A, Glowiniak K, Baj T. 2016. Furochinoline alkaloids in plants from *Rutaceae* family – a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* **29**: 33–38.

Afek U, Szejnberg A. 1989. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus of *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* **79**: 736–739.

Ahmed AS, Sánchez CP, Candela ME. 2000. Evaluation of Induction of Systemic Resistance in Pepper Plants (*Capsicum Annuum*) to *Phytophthora capsici* Using *Trichoderma harzianum* and its Relation with Capsidiol Accumulation. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 817–824.

Akula R, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1720–1731.

Alarcon J, Lamilla C, Cespedes CL. 2013. Insecticidal activity of sesquiterpenes skeleton synthesized by the conventional Robinson annulations reaction on *Drosophila melanogaster*. *Industrial Crops and Products* **42**: 268–272.

Ali ST, Mahmooduzzafar null, Abdin MZ, Iqbal M. 2008. Ontogenetic changes in foliar features and psoralen content of *Psoralea corylifolia* Linn. exposed to SO₂ stress. *Journal of Environmental Biology* **29**: 661–668.

Aniszewski T. 2015. Chapter 1 - Definition, typology, and occurrence of alkaloids. In: *Alkaloids* (Second Edition). Boston: Elsevier, 1–97.

Aragaki M, Uchida JY. 2001. Morphological Distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia* **93**: 137–145.

- Ashwini N, Srividya S. 2014.** Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech* **4**: 127–136.
- Asif MH, Trivedi PK, Misra P, Nath P. 2009.** Prolyl-4-hydroxylase (AtP4H1) mediates and mimics low oxygen response in *Arabidopsis thaliana*. *Functional & Integrative Genomics* **9**: 525–535.
- Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, Keller H. 2010.** The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *The New Phytologist* **187**: 449–460.
- Attard A, Gourgues M, Galiana E, Panabières F, Ponchet M, Keller H. 2008.** Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology* **165**: 83–94.
- Bailey AM, Mitchell DJ, Manjunath KL, Nolasco G, Niblett CL. 2002.** Identification to the species level of the plant pathogens *Phytophthora* and *Pythium* by using unique sequences of the ITS1 region of ribosomal DNA as capture probes for PCR ELISA. *FEMS Microbiology Letters* **207**: 153–158.
- Ballhorn DJ, Kautz S, Heil M, Hegeman AD. 2009.** Cyanogenesis of Wild Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) Is an Efficient Direct Defence in Nature. *PLOS ONE* **4**: e5450.
- Balmas V, Migheli Q, Scherm B, Garau P, O'Donnell K, Ceccherelli G, Kang S, Geiser DM. 2010.** Multilocus phylogenetics show high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). *Mycologia* **102**: 803–812.
- Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE, Jacobsen BJ. 2002.** Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 289–298.
- Bartels D, Baumann A, Maeder M, Geske T, Heise EM, von Schwartzberg K, Classen B. 2017.** Evolution of plant cell wall: Arabinogalactan-proteins from three moss genera show structural differences compared to seed plants. *Carbohydrate Polymers* **163**: 227–235.

Basallote-Ureba MJ, Vela-Delgado MD, Capote N, Melero-Vara JM, López-Herrera CJ, Prados-Ligero AM, Talavera-Rubia MF. 2016. Control of Fusarium wilt of carnation using organic amendments combined with soil solarization, and report of associated *Fusarium* species in southern Spain. *Crop Protection* **89**: 184–192.

Basu D, Liang Y, Liu X, Himmeldirk K, Faik A, Kieliszewski M, Held M, Showalter AM. 2013. Functional identification of a hydroxyproline-o-galactosyltransferase specific for arabinogalactan protein biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 10132–10143.

Basu D, Tian L, Wang W, Bobbs S, Herock H, Travers A, Showalter AM. 2015. A small multigene hydroxyproline-O-galactosyltransferase family functions in arabinogalactan-protein glycosylation, growth and development in *Arabidopsis*. *BMC plant biology* **15**: 295.

Bednarek P, Osbourn A. 2009. Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. *Science* **324**: 746–748.

Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H avar. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology* **10**: 189.

Benitez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* **7**: 249–260.

Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K. 2017. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* **55**: 401–425.

Berry AM, Rasmussen U, Bateman K, Huss-Danell K, Lindwall S, Bergman B. 2002. Arabinogalactan proteins are expressed at the symbiotic interface in root nodules of *Alnus* spp. *New Phytologist* **155**: 469–479.

Bleeker PM, Mirabella R, Diergaarde PJ, VanDoorn A, Tissier A, Kant MR, Prins M, de Vos M, Haring MA, Schuurink RC. 2012. Improved herbivore resistance in cultivated tomato with the

sesquiterpene biosynthetic pathway from a wild relative. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 20124–20129.

Bodker L, Kjøller R, Rosendahl S. 1998. Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza* **8**: 169–174.

Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Pierre Blein J, Ricci P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 181–192.

Bora T, Özaktan H, Göre E, Aslan E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology* **152**: 471–475.

Bostock RM. 2005. Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the Line Between Cost and Benefit. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 545–580.

Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A. 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889–892.

Boutrot F, Zipfel C. 2017. Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **55**: 257–286.

Boyd DR, Sharma ND, Loke PL, Malone JF, McRoberts WC, Hamilton JTG. 2002. Absolute configuration assignment and enantiopurity determination of chiral alkaloids and coumarins derived from O- and C-prenyl epoxides. *Chemical Communications (Cambridge, England)*: 3070–3071.

Boyd DR, Sharma ND, Loke PL, Malone JF, McRoberts WC, Hamilton JTG. 2007. Synthesis, structure and stereochemistry of quinoline alkaloids from *Choisya ternata*. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**: 2983.

Bressan M, Blum A, Castel L, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K, Gangneux C. 2016. Assessment of *Verticillium flax inoculum* in agroecosystem soils using real-time PCR assay. *Applied Soil Ecology* **108**: 176–186.

Brooker N, Windorski J, Bluml E. 2008. Halogenated coumarin derivatives as novel seed protectants. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **73**: 81–89.

Buczacki S, Harris K. 2014. *Pests, Diseases and Disorders of Garden Plants: 4th Edition*. London: William Collins.

Bultreys A, Trombik T, Drozak A, Boutry M. 2009. Nicotiana plumbaginifolia plants silenced for the ATP-binding cassette transporter gene NpPDR1 show increased susceptibility to a group of fungal and oomycete pathogens. *Molecular Plant Pathology* **10**: 651–663.

Burki F. 2014. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**: a016147.

Cameron DD. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro)ecosystem engineers. *Plant and Soil* **333**: 1–5.

Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM, Ton J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science* **18**: 539–545.

Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vire-Gibouin M. 2012. Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and Brassica napus on Aphanomyces euteiches Zoospore Chemotaxis and Germination. *PLANT PHYSIOLOGY* **159**: 1658–1670.

Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vire-Gibouin M. 2011. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic Aphanomyces euteiches. *Annals of Botany* **108**: 459–469.

Carisse O, Khanizadeh S. 2006. Relative resistance of newly released apple rootstocks to Phytophthora cactorum. *Canadian Journal of Plant Science* **86**: 199–204.

de Carvalho PR, Ropero DR, Pinheiro MM, Fernandes PD, Boylan F. 2016. Quinoline Alkaloids Isolated from Choisya Aztec-Pearl and Their Contribution to the Overall Antinociceptive Activity of This Plant. *PLoS One* **11**: e0164998.

- Chaćańska A, Bogumiń A, Łabanowski G. 2017.** Management of foliar nematode *Aphelenchoides ritzemabosi* on *Anemone hepahensis* using plant extracts and pesticides. *Journal of Plant Diseases and Protection* **124**: 437–443.
- Chapman A, Blervacq A-S, Vasseur J, Hilbert J-L. 2000.** Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* **211**: 305–314.
- Chaudhary S, Kusakabe A, Melgar JC. 2016.** Phytophthora infection in flooded citrus trees reduces root hydraulic conductance more than under non-flooded condition. *Scientia Horticulturae* **202**: 107–110.
- Chaves I, Regalado AP, Chen M, Ricardo CP, Showalter AM. 2002.** Programmed cell death induced by (β -d-galactosyl)₃ Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* **116**: 548–553.
- Chemeltorit PP, Mutaqin KH, Widodo W. 2017.** Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. *European Journal of Plant Pathology* **147**: 157–166.
- Chen CG, Pu ZY, Moritz RL, Simpson RJ, Bacic A, Clarke AE, Mau SL. 1994.** Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 10305–10309.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T. 2007.** A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006.** Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803–814.
- Choi Y-E, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H. 2001.** Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* **213**: 45–50.

Clarke AE, Anderson RL, Stone BA. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* **18**: 521–540.

Coimbra S, Costa M, Jones B, Mendes MA, Pereira LG. 2009. Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3133–3142.

Colas V, Lacourt I, Ricci P, Vanlerberghe-Masutti F, Poupet A, Panabières F. 1998. Diversity of Virulence in *Phytophthora parasitica* on Tobacco, as Reflected by Nuclear RFLPs. *Phytopathology* **88**: 205–212.

Collinge DB. 2009. Cell wall appositions: the first line of defence. *Journal of Experimental Botany* **60**: 351–352.

Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. 2015. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 541–563.

Copes WE, Hendrix FF. 1996. Influence of NO₃/NH₄ ratio, N, K, and pH on root rot of *Viola X wittrockiana* caused by *Thielaviopsis basicola*. *Plant disease (USA)*.

Cubeta MA, Vilgalys R. 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology* **87**: 480–484.

Daughtrey ML, Benson DM. 2005. Principles of Plant Health Management for Ornamental Plants. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 141–169.

Davidse LC, Hofman AE, Velthuis GCM. 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Experimental Mycology* **7**: 344–361.

Davidse LC, Looijen D, Turkensteen LJ, Wal D van der. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **87**: 65–68.

De Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BPA, Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science* **20**: 91–101.

DeMoranville CJ, Kennedy C, Jeranyama P, Sandler HA, Saalau Rojas E. 2016. Tile Drain Best Management Practices.

Deogratias JM, Iffat L, Naon Y le. 2011. Antagonistic agents of pathogenic fungi in the soil in an ornamental nursery. *4ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures. Evolution des cadres réglementaires européen et français. Nouveaux moyens et stratégies Innovantes, Nouveau Siècle, Lille, France, 8-10 mars 2011*: 638–648.

Di X, Takken FLW, Tintor N. 2016. How Phytohormones Shape Interactions between Plants and the Soil-Borne Fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science* **7**: 170

Dirks VA, Anderson TR, Bolton EF. 1980. Effect of Fertilizer and Drain Location on Incidence of *Phytophthora* Rot in Soybeans. *Canadian Journal of Plant Pathology* **2**: 179–183.

Dolan L, Linstead P, Roberts K. 1995. An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root. *Protoplasma* **189**: 149–155.

Dorrance AE, Schmitthenner AF. 2000. New Sources of Resistance to *Phytophthora sojae* in the Soybean Plant Introductions. *Plant Disease* **84**: 1303–1308.

Drenth A, Guest DI. 2004. 7.1 Principles of *Phytophthora* Disease Management. *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*: 154.

Drenth A, Wagels G, Smith B, Sendall B, O'Dwyer C, Irvine G, Irwin JAG. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* **35**: 147.

Driouich A, Baskin TI. 2008. Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalactan proteins and cortical microtubules. *American Journal of Botany* **95**: 1491–1497.

Duffey SS, Stout MJ. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**: 3–37.

Dunn AR, Milgroom MG, Meitz JC, McLeod A, Fry WE, McGrath MT, Dillard HR, Smart CD. 2010. Population Structure and Resistance to Mefenoxam of *Phytophthora capsici* in New York State. *Plant Disease* **94**: 1461–1468.

Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185–209.

Edwards R, Blount JW, Dixon RA. 1991. Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* **184**: 403–409.

Eisenreich W, Bacher A. 2007. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry* **68**: 2799–2815.

Ekiert H, Kisiel W. 1997. Coumarins and alkaloids in shoot culture of *Ruta graveolens* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **66**: 329–332.

Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? *Plant Physiology* **153**: 403–419.

Emam A, Eweis M, Elbadry M. 2010. A new furoquinoline alkaloid with antifungal activity from the leaves of *Ruta chalepensis* L. *Drug Discoveries & Therapeutics* **4**: 399–404.

Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *Phytophthora diseases worldwide*.

Etebarian HR, Scott ES, Wicks TJ. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as Potential Biological Control Agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 329–337.

Farih A, Menge JA, Tsao PH, Ohr HD. 1981. Metalaxyl and fosite aluminium for control of *Phytophthora gummosis* and root rot on citrus. *Plant Diseases* **65**: 654–657.

Farr D., Rossman A. 2017. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>.

Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O. 2008. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology*. John Wiley & Sons.

Filion M, St-Arnaud M, Fortin JA. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New phytologist* **141**: 525–533.

Filion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in Mycorrhizal Bean Plants and Surrounding Mycorrhizosphere Soil Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Direct Isolations on Selective Media. *Phytopathology* **93**: 229–235.

Fincher GB, Stone BA, Clarke AE. 1983. Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. *Annual Review of Plant Physiology* **34**: 47–70.

Fragkostefanakis S, Sedeek KEM, Raad M, Zaki MS, Kalaitzis P. 2014. Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Molecular Biology* **85**: 459–471.

Freeman, Beattie. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*.

Galli M, Haegi A, Vitale S, Belisario A, Luongo L. 2013. First Report of *Phytophthora tropicalis* on Rhododendron in Italy. *Plant Disease* **97**: 1385–1385.

Gane AM, Craik D, Munro SLA, Howlett GJ, Clarke AE, Bacic A. 1995. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. *Carbohydrate Research* **277**: 67–85.

Gao M, Showalter AM. 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal* **19**: 321–331.

Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB, Bacic A. 2004. Characterization of the Arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiology* **135**: 2162–2171.

- Geldenhuis MM, Roux J, Cilliers AJ, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2006.** Clonality in South African isolates and evidence for a European origin of the root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Mycological Research* **110**: 306–311.
- Gerlach WWP, Schubert R. 2001.** A New Wilt of *Cyclamen* Caused by *Phytophthora tropicalis* in Germany and the Netherlands. *Plant Disease* **85**: 334–334.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Gleeson PA, McNamara M, Wettenhall REH, Stone BA, Fincher GB. 1989.** Characterization of the hydroxyproline-rich protein core of an arabinogalactan-protein secreted from suspension-cultured *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) endosperm cells. *Biochemical Journal* **264**: 857–862.
- González-Coloma A, López-Balboa C, Santana O, Reina M, Fraga BM. 2011.** Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry Reviews* **10**: 245–260.
- Görge E, Werner D. 1991.** Degradation of wyerone, the phytoalexin of faba beans by *Rhizobium leguminosarum*. *Current Microbiology* **23**: 153–157.
- Govers LL, Zee EM van der, Meffert JP, Rijswijk PCJ van, Veld WAM in 't, Heusinkveld JHT, Heide T van der. 2017.** Copper treatment during storage reduces *Phytophthora* and *Halophytophthora* infection of *Zostera marina* seeds used for restoration. *Scientific Reports* **7**: srep43172.
- Graham JH, Dewdney MM, Timmer LW. 2016.** *Phytophthora* foot rot and root rot. *Florida Citrus Pest Management Guide*. (<http://edis.ifas.ufl.edu>): 150–56.
- Grundon MF, Harrison DM, Spyropoulos CG. 1974.** Biosynthesis of the furoquinoline alkaloids, skimmianine, evoxine, and choisyine: mechanism of formation of the furan ring. The timing of aromatic hydroxylation and of methylation. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **0**: 51–52.
- Guan Y, Nothnagel EA. 2004.** Binding of Arabinogalactan Proteins by Yariv Phenylglycoside Triggers Wound-Like Responses in *Arabidopsis* Cell Cultures. *Plant Physiology* **135**: 1346–1366.

- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A. 2002.** Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* **92**: 976–985.
- Gullino ML, Kuijpers LAM. 1994.** Social and Political Implications of Managing Plant Diseases with Restricted Fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 559–581.
- Gurkok T, Turktas M, Parmaksiz I, Unver T. 2015.** Transcriptome Profiling of Alkaloid Biosynthesis in Elicitor Induced Opium Poppy. *Plant Molecular Biology Reporter* **33**: 673–688.
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, et al. 2007.** Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 32338–32348.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD. 1996.** Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**: 1773–1791.
- Haque MA, Kotake T, Tsumuraya Y. 2005.** Mode of Action of β -Glucuronidase from *Aspergillus niger* on the Sugar Chains of Arabinogalactan-Protein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**: 2170–2177.
- Hardham AR. 2007.** Cell biology of plant–oomycete interactions. *Cellular Microbiology* **9**: 31–39.
- Harkrader RJ, Meyer DL. 2001.** Pesticides comprising benzophenanthridine alkaloids.
- Hayden KJ, Rizzo D, Tse J, Garbelotto M. 2004.** Detection and Quantification of *Phytophthora ramorum* from California Forests Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology* **94**: 1075–1083.
- Hemmes DE, Hohl HR. 1969.** Ultrastructural Changes in Directly Germinating Sporangia of *Phytophthora parasitica*. *American Journal of Botany* **56**: 300–313.

van Hengel AJ, Roberts K. 2003. AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **36**: 256–270.

Herdina, Ophel-Keller K, Roget D, Harvey P. 1997. Comparison Between a DNA-Based Assay and a Soil Bioassay in Quantifying the Amount of *Gaeumannomyces Graminis* Var. *Tritici* in Soil. In: *Developments in Plant Pathology. Diagnosis and Identification of Plant Pathogens.* Springer, Dordrecht, 503–505.

Hermanns M, Slusarenko AJ, Schlaich NL. 2003. Organ-Specificity in a Plant Disease Is Determined Independently of R Gene Signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 752–759.

Hervé C, Siméon A, Jam M, Cassin A, Johnson KL, Salmeán AA, Willats WGT, Doblin MS, Bacic A, Kloareg B. 2016. Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *New Phytologist* **209**: 1428–1441.

Hieta R, Myllyharju J. 2002. Cloning and characterization of a low molecular weight prolyl 4-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*. Effective hydroxylation of proline-rich, collagen-like, and hypoxia-inducible transcription factor alpha-like peptides. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 23965–23971.

Hirooka T, Ishii H. 2013. Chemical control of plant diseases. *Journal of General Plant Pathology* **79**: 390–401.

Hjeljord LG, Stensvand A, Tronsmo A. 2000. Effect of Temperature and Nutrient Stress on the Capacity of Commercial *Trichoderma* Products to Control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in Greenhouse Strawberries. *Biological Control* **19**: 149–160.

Hoitink HAJ, Nameth ST, Locke JC. 2003. Control of *Phytophthora* and Other Major Diseases of Ericaceous Plants. *Ornamental plants : annual reports and research reviews 2002 / edited by James A. Chatfield...[et al].*

- Holmes KA, Benson DM. 1994.** Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. *Plant Disease* **78**: 193–199.
- Hong CX, Richardson PA, Kong P, Jeffers SN, Oak SW. 2006.** *Phytophthora tropicalis* Isolated from Diseased Leaves of *Pieris japonica* and *Rhododendron catawbiense* and Found in Irrigation Water and Soil in Virginia. *Plant Disease* **90**: 525–525.
- Hood ME, Shew HD. 1997.** Reassessment of the Role of Saprophytic Activity in the Ecology of *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* **87**: 1214–1219.
- Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A. 2016.** The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Hu JH, Hong CX, Stromberg EL, Moorman GW. 2008.** Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* **57**: 728–736.
- Huang J, Kang Z. 2010.** Detection of *Thielaviopsis basicola* in soil with real-time quantitative PCR assays. *Microbiological Research* **165**: 411–417.
- Hüberli D, Connor M, MacLeod B, Battaglia R, Forsyth L, Parkin B, Klein T, Clarke M, Robertson G, Correll R. 2015.** *Rhizoctonia solani* AG8: New breakthroughs in control and management.
- Hückelhoven R. 2007.** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101–127.
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P. 2003.** Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* in Response to Root Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 851–858.
- Ippolito A, Schena L, Nigro F, Ligorio VS, Yaseen T. 2004.** Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthorain* citrus roots and soil. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 833–843.

- Ito S, Eto T, Tanaka S, Yamauchi N, Takahara H, Ikeda T. 2004.** Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS letters* **571**: 31–34.
- Johansson A, Staal J, Dixelius C. 2006.** Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **19**: 958–969.
- Johns SR, Lamberton JA, Sioumis AA. 1967.** Alkaloids of *Choisya ternata* H.B. & K. (family *Rutaceae*). The structure of choisyine. *Australian Journal of Chemistry* **20**: 1975–1981.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jung T, Blaschke H, Oßwald W. 2000.** Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* **49**: 706–718.
- Jung T, Horta Jung M, Cacciola SO, Cech T, Bakonyi J, Seress D, Mosca S, Schena L, Seddaiu S, Pane A, et al. 2017.** Multiple new cryptic pathogenic *Phytophthora* species from *Fagaceae* forests in Austria, Italy and Portugal. *IMA Fungus* **8**: 219–244.
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, et al. 2015.** The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **16**: 413–434.
- Kamoun S, Young M, Förster H, Coffey MD, Tyler BM. 1994.** Potential Role of Elicitins in the Interaction between *Phytophthora* Species and Tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1593–1598.
- Kanaan H, Medina S, Raviv M. 2017.** The Effects of Soil Solarization and Compost on Soil Suppressiveness against *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Melonis*. *Compost Science & Utilization* **25**: 206–210.
- Katagiri F. 2004.** A global view of defense gene expression regulation – a highly interconnected signaling network. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 506–511.

- Kebdani N, Pieuchot L, Deleury E, Panabières F, Le Berre J-Y, Gourgues M. 2010.** Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. *New Phytologist* **185**: 248–257.
- Keinath AP. 2007.** Sensitivity of Populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to Mefenoxam, Dimethomorph, Zoxamide, and Cymoxanil. *Plant Disease* **91**: 743–748.
- Kellam MK, Coffey MD. 1985.** Quantitative comparison of the resistance to *Phytophthora* root rot in three avocado rootstocks. *Phytopathology (USA)*.
- Kettle AJ, Batley J, Benfield AH, Manners JM, Kazan K, Gardiner DM. 2015.** Degradation of the benzoxazolinone class of phytoalexins is important for virulence of *Fusarium pseudograminearum* towards wheat. *Molecular Plant Pathology* **16**: 946–962.
- Kieliszewski MJ, Lampert DTA. 1994.** Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *The Plant Journal* **5**: 157–172.
- Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, et al. 2013.** β -Galactosyl Yariv Reagent Binds to the β -1,3-Galactan of Arabinogalactan Proteins. *Plant Physiology* **161**: 1117–1126.
- Knee EM, Gong F-C, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort AJ, Bauer WD. 2001.** Root Mucilage from Pea and Its Utilization by Rhizosphere Bacteria as a Sole Carbon Source. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 775–784.
- Knox JP, Day S, Roberts K. 1989.** A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development* **106**: 47–56.
- Knox J., Linstead P., Cooper JP C, Roberts K. 1991.** Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *The Plant Journal* **1**: 317–326.
- Ko WH. 1978.** Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *Microbiology* **107**: 15–18.

- Kong P, Hong C x., Tooley P w., Ivors K, Garbelotto M, Richardson P a. 2004.** Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. *Letters in Applied Microbiology* **38**: 433–439.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Otter FCD, Loon LCV, Pieterse CMJ. 2008.** Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *Plant Physiology* **147**: 1358–1368.
- Koroney AS, Plasson C, Pawlak B, Sidikou R, Driouich A, Menu-Bouaouiche L, Viché-Gibouin M. 2016.** Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* **118**: 797–808.
- Krebs SL, Wilson MD. 2002.** Resistance to *Phytophthora* Root Rot in Contemporary *Rhododendron* Cultivars. *HortScience* **37**: 790–792.
- Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F. 2012.** The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* **102**: 348–364.
- Kumar P, Srivastava V, Chaturvedi R, Sundar D, Bisaria VS. 2017.** Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from in vitro cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook. F. & Thoms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **130**: 417–426.
- Lake JA, Field KJ, Davey MP, Beerling DJ, Lomax BH. 2009.** Metabolomic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. *Plant, Cell & Environment* **32**: 1377–1389.
- Lamour KH, Daughtrey ML, Benson DM, Hwang J, Hausbeck MK. 2003.** Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) Diseases Affecting Floriculture Crops. *Plant Disease* **87**: 854–858.
- Lamport DTA, Kieliszewski MJ, Showalter AM. 2006.** Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *The New Phytologist* **169**: 479–492.

- Lanoue A, Burlat V, Henkes GJ, Koch I, Schurr U, Röse USR. 2010.** De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytologist* **185**: 577–588.
- Larousse M, Galiana E. 2017.** Microbial Partnerships of Pathogenic Oomycetes. *PLOS Pathogens* **13**: e1006028.
- Latijnhouwers M, de Wit PJGM, Govers F. 2003.** Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* **11**: 462–469.
- LeBlanc N, Kinkel L, Kistler HC. 2017.** Plant diversity and plant identity influence *Fusarium* communities in soil. *Mycologia* **109**: 128–139.
- Lee BD, Dutta S, Ryu H, Yoo S-J, Suh D-S, Park K. 2015.** Induction of systemic resistance in *Panax ginseng* against *Phytophthora cactorum* by native *Bacillus amyloliquefaciens* HK34. *Journal of Ginseng Research* **39**: 213–220.
- Lee KJD, Sakata Y, Mau S-L, Pettolino F, Bacic A, Quatrano RS, Knight CD, Knox JP. 2005.** Arabinogalactan Proteins Are Required for Apical Cell Extension in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* **17**: 3051–3065.
- Leitão GG, Pereira JPB, Carvalho PR de, Ropero DR, Fernandes PD, Boylan F. 2017.** Isolation of quinoline alkaloids from three *Choisya* species by high-speed countercurrent chromatography and the determination of their antioxidant capacity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **27**: 297–301.
- Li S, Showalter AM. 1996.** Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein. *Plant Molecular Biology* **32**: 641–652.
- Liang Y, Faik A, Kieliszewski M, Tan L, Xu W-L, Showalter AM. 2010.** Identification and Characterization of in Vitro Galactosyltransferase Activities Involved in Arabinogalactan-Protein Glycosylation in Tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 632–642.
- Lin CC, Aronson JM. 1970.** Chitin and cellulose in the cell walls of the oomycete, *Apodachlya* sp. *Archiv für Mikrobiologie* **72**: 111–114.

- Lioussanne L, Jolicoeur M, St-Arnaud M. 2008.** Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2217–2224.
- Liu H, Cao X, Liu X, Xin R, Wang J, Gao J, Wu B, Gao L, Xu C, Zhang B, et al. 2017.** UV-B irradiation differentially regulates terpene synthases and terpene content of peach. *Plant, Cell & Environment* **40**: 2261–2275.
- Loon LC van, Rep M, Pieterse CMJ. 2006.** Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162.
- Loyd AL, Benson DM, Ivors KL. 2014.** *Phytophthora* Populations in Nursery Irrigation Water in Relationship to Pathogenicity and Infection Frequency of *Rhododendron* and *Pieris*. *Plant Disease* **98**: 1213–1220.
- Luo K, Chen S, Chen K, Song J, Yao H, Ma X, Zhu Y, Pang X, Yu H, Li X, et al. 2010.** Assessment of candidate plant DNA barcodes using the *Rutaceae* family. *Science China. Life Sciences* **53**: 701–708.
- Ma H, Zhao J. 2010.** Genome-wide identification, classification, and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **61**: 2647–2668.
- Macel M, Bruinsma M, Dijkstra SM, Ooijendijk T, Niemeyer HM, Klinkhamer PGL. 2005.** Differences in Effects of Pyrrolizidine Alkaloids on Five Generalist Insect Herbivore Species. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 1493–1508.
- Mammella MA, Martin FN, Cacciola SO, Coffey MD, Faedda R, Schena L. 2013.** Analyses of the population structure in a global collection of *Phytophthora nicotianae* isolates inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Phytopathology* **103**: 610–622.
- Mangla S, Callaway RM. 2008.** Exotic invasive plant accumulates native soil pathogens which inhibit native plants. *Journal of Ecology* **96**: 58–67.

- Marston A. 2007.** Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* **68**: 2786–2798.
- Martin FN, Loper JE. 1999.** Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* spp.: Ecology, Epidemiology, and Prospects for Biological Control. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 111–181.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G. 2001.** DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2354–2359.
- Marzec M, Szarejko I, Melzer M. 2015.** Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1245–1257.
- Matheron ME, Matejka JC. 1990.** Differential virulence of *Phytophthora parasitica* recovered from citrus and other plants to rough lemon and tomato. *Plant Disease* **74**: 138–140.
- Matheron ME, Wright GC, Porchas M. 1998.** Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and Nursery Characteristics of Several *Citrus* Rootstocks. *Plant Disease* **82**: 1217–1225.
- Matheson CD, Gurney C, Esau N, Lehto R. 2010.** Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal* **3**: 38–45.
- Matsubara Y, Tamura H, Harada T. 1995.** Growth Enhancement and *Verticillium* Wilt Control by Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungus Inoculation in Eggplant. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **64**: 555–561.
- Maurer JBB, Bacic A, Pereira-Netto AB, Donatti L, Zawadzki-Baggio SF, Pettolino FA. 2010.** Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* **71**: 1400–1409.
- Mayer AM. 1986.** Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* **26**: 11–20.
- Mazid M, Khan T, Mohammad F. 2011.** Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* **3**: 232–249.

- Mcquilken, Gemmell, Lahdenperä. 2001.** *Gliocladium catenulatum* as a Potential Biological Control Agent of Damping-off in Bedding Plants. *Journal of Phytopathology* **149**: 171–178.
- Meng Y, Zhang Q, Ding W, Shan W. 2014.** *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology* **5**: 43–51.
- Messenger BJ, Menge JA, Pond E. 2000.** Effects of Gypsum on Zoospores and Sporangia of *Phytophthora cinnamomi* in Field Soil. *Plant Disease* **84**: 617–621.
- Mishina TE, Zeier J. 2007.** Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **50**: 500–513.
- Mitani S, Araki S, Matsuo N, Camblin P (Ishihara SK. 1998.** IKF-916 - a novel systemic fungicide for the control of oomycete plant diseases.
- Mitchell HJ, Hardham AR. 1999.** Characterisation of the water expulsion vacuole in *Phytophthora nicotianae* zoospores. *Protoplasma* **206**: 118–130.
- Mollet J-C, Kim S, Jauh G-Y, Lord EM. 2002.** Arabinogalactan proteins, pollen tube growth, and the reversible effects of Yariv phenylglycoside. *Protoplasma* **219**: 89–98.
- Montagu-Bourin M, Rideau M, Levillain P, Chénieux JC. 1980.** Spectrofluorometric Determinations of Dihydrofuroquinoline Alkaloids in *Choisya ternata* Tissue and Cell Cultures. *Planta Medica* **38**: 50–53.
- Moon SH, Mistry B, Kim DH, Pandurangan M. 2017.** Antioxidant and anticancer potential of bioactive compounds following UV-C light-induced plant cambium meristematic cell cultures. *Industrial Crops and Products* **109**: 762–772.
- Müller U, Gisi U. 2011.** Newest Aspects of Nucleic Acid Synthesis Inhibitors: Metalaxyl-M. In: Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel thias, eds. *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 901–908.
- Mumford RA, Blockley AL, Jarvis B, Wright DM. 2002.** Isolation of *Arabidopsis mosaic virus* from Mexican orange blossom (*Choisya ternata*) in the UK. *Plant Pathology* **51**: 395–395.

Naher L, Ho C-L, Tan SG, Yusuf UK, Abdullah F. 2011. Cloning of transcripts encoding chitinases from *Elaeis guineensis* Jacq. and their expression profiles in response to fungal infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **76**: 96–103.

Naher L, Yusuf UK, Ismail A, Hossain K. 2014. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. *Pakistan Journal of Botany* **46**: 1489–1493.

Nebo L, Varela RM, Molinillo JMG, Sampaio OM, Severino VGP, Cazal CM, Fernandes MF das G, Fernandes JB, Macías FA. 2014. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the *Rutaceae* and *Meliaceae* families. *Phytochemistry Letters* **8**: 226–232.

Nega A. 2014. Review on concepts in biological control of plant pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **4**: 33–54.

Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicré-Gibouin M, Mollet J-C, Driouich A. 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* **110**: 383–404.

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Cannesan M-A, Driouich A. 2013. Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science* **18**: 440–449.

Nguema-Ona E, Vicré-Gibouin M, Gotté M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, Driouich A. 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Nothnagel EA. 1997. Proteoglycans and Related Components in Plant Cells. *International Review of Cytology* **174**: 195–291.

Oates JF, Waterman PG, Choo GM. 1980. Food selection by the South Indian leaf-monkey, *Presbytis johnii*, in relation to leaf chemistry. *Oecologia* **45**: 45–56.

O'Donnell F, Ramachandran VN, Smyth WF, Hack CJ, Patton E. 2006. A study of the analytical behaviour of selected synthetic and naturally occurring quinolines using electrospray ionisation ion trap mass spectrometry, liquid chromatography and gas chromatography and

the construction of an appropriate database for quinoline characterisation. *Analytica Chimica Acta* **572**: 63–76.

Olmos E, García De La Garma J, Gomez-Jimenez MC, Fernandez-Garcia N. 2017. Arabinogalactan Proteins Are Involved in Salt-Adaptation and Vesicle Trafficking in Tobacco by-2 Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Oßwald W, Fleischmann F, Rigling D, Coelho AC, Cravador A, Diez J, Dalio RJ, Horta Jung M, Pfanz H, Robin C, et al. 2014. Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**: 169–190.

Ozgonen H, Yardimci N, Kilic HC. 2009. Induction of phenolic compounds and pathogenesis-related proteins by mycorrhizal fungal inoculations against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper. *Pakistan journal of biological sciences: PJS* **12**: 1181–1187.

Pal KK, McSpadden Gardener B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*.

Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology* **23**: 23–54.

Park MH, Suzuki Y, Chono M, Knox JP, Yamaguchi I. 2003. CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiology* **131**: 1450–1459.

Parke J. 2015. Treating Irrigation Water to Eliminate Water Molds. *Pacific Northwest Pest Management Handbooks*.

Parra G, Ristaino JB. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease* **85**: 1069–1075.

Pennell RI, Roberts K. 1990. Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature* **344**: 547–549.

- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF. 1998.** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: 2103–2113.
- Peroutka R, Schulzová V, Botek P, Hajšlová J. 2007.** Analysis of furanocoumarins in vegetables (*Apiaceae*) and citrus fruits (*Rutaceae*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 2152–2163.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308–316.
- Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye M-L, Leprince J, Gattin I, Souc C, Driouich A, Vire-Gibouin M. 2013.** Deciphering the Responses of Root Border-Like Cells of *Arabidopsis* and Flax to Pathogen-Derived Elicitors. *PLANT PHYSIOLOGY* **163**: 1584–1597.
- Posmyk MM, Kontek R, Janas KM. 2009.** Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 596–602.
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393–398.
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2002.** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 525–534.
- Prosser JI. 2002.** Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil* **244**: 9–17.
- Pscheidt JW. 2015.** Diagnosis and Control of *Phytophthora* Diseases. *Pacific Northwest Plant Disease Management, Oregon State University*.
- Putoczki TL, Pettolino F, Griffin MDW, Möller R, Gerrard JA, Bacic A, Jackson SL. 2007.** Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins. *Planta* **226**: 1131.

Qi W, Fong C, Lamport DT. 1991. Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope : a new model based on o-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology* **96**: 848–855.

Radojčić Redovniković I, Glivetić T, Delonga K, Vorkapić-Furac J. 2008. Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum Biologorum* **110**: 297–309.

Radulović NS, Miltojević AB, McDermott M, Waldren S, Parnell JA, Pinheiro MMG, Fernandes PD, de Sousa Menezes F. 2011. Identification of a new antinociceptive alkaloid isopropyl N-methylantranilate from the essential oil of *Choisya ternata* Kunth. *Journal of Ethnopharmacology* **135**: 610–619.

Rajniak J, Barco B, Clay NK, Sattely ES. 2015. A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defense. *Nature* **525**: 376–379.

Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Venard P, Mouton-Perronnet F, Bruneteau M. 1992. Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology* **41**: 298–307.

Rizzo DM, Garbelotto M. 2003. Sudden oak death: endangering California and Oregon forest ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**: 197–204.

Roberts DP, Lohrke SM, Meyer SLF, Buyer JS, Bowers JH, Jacyn Baker C, Li W, de Souza JT, Lewis JA, Chung S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection* **24**: 141–155.

Sakamoto T, Taniguchi Y, Suzuki S, Ihara H, Kawasaki H. 2007. Characterization of *Fusarium oxysporum* β -1,6-Galactanase, an Enzyme That Hydrolyzes Larch Wood Arabinogalactan. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3109–3112.

Sandjo LP, Kuete V, Tchangna RS, Efferth T, Ngadjui BT. 2014. Cytotoxic Benzophenanthridine and Furoquinoline Alkaloids from *Zanthoxylum buesgenii* (Rutaceae). *Chemistry Central Journal* **8**: 61.

- Sauvage H, Moussart A, Bois F, Tivoli B, Barray S, Laval K. 2007.** Development of a molecular method to detect and quantify *Aphanomyces euteiches* in soil. *FEMS microbiology letters* **273**: 64–69.
- Schaefer L, Schaefer RM. 2010.** Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and Tissue Research* **339**: 237.
- Schena L, Hughes KJD, Cooke DEL. 2006.** Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* **7**: 365–379.
- Schindler T, Bergfeld R, Schopfer P. 1995.** Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *The Plant Journal* **7**: 25–36.
- Schisler DA, Slininger PJ, Bothast RJ. 1997.** Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *Phytopathology* **87**: 177–183.
- Schlink K. 2010.** Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between *Fagus sylvatica* and *Phytophthora citricola*. *Functional & Integrative Genomics* **10**: 253–264.
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A. 1998.** GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* **3**: 426–431.
- Schultz CJ, Harrison MJ. 2008.** Novel plant and fungal AGP-like proteins in the *Medicago truncatula*–*Glomus intraradices* arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **18**: 403.
- Schultz CJ, Johnson KL, Currie G, Bacic A. 2000.** The Classical Arabinogalactan Protein Gene Family of *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **12**: 1751–1767.
- Scibetta S, Schena L, Chimento A, Cacciola SO, Cooke DEL. 2012.** A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* **88**: 356–368.

Seifert GJ, Roberts K. 2007. The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 137–161.

Serpe MD, Nothnagel EA. 1994. Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* **193**: 542–550.

Serpe MD, Nothnagel EA. 1996. Heterogeneity of arabinogalactan-proteins on the plasma membrane of rose cells. *Plant Physiology* **112**: 1261–1271.

Shailasree S, Kini KR, Deepak S, Kumudini BS, Shetty HS. 2004. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in pearl millet seedlings in response to *Sclerospora graminicola* infection. *Plant Science* **167**: 1227–1234.

Sharma R, Bhat S. 2011. Molecular cloning of endochitinase 33 (ECH33) gene from *Trichoderma harzanium*. *African Journal of Biotechnology* **10**: 12156–12163.

Shitan N, Hayashida M, Yazaki K. 2015. Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum*. *Plant Signaling & Behavior* **10**.

Showalter AM. 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1399–1417.

Shrestha A, Park SH, Shrestha B, Kim K, Chae JC, Lee KJ. 2015. Biological Control of Oomycetous Plant Pathogens: A Review. *Nepal Journal of Science and Technology* **15**: 157–166.

Siasou E, Standing D, Killham K, Johnson D. 2009. Mycorrhizal fungi increase biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1341–1343.

Singh A. 2017. Glucosinolates and Plant Defense. In: Mérillon J-M, Ramawat KG, eds. Reference Series in Phytochemistry. Glucosinolates. Springer International Publishing, 237–246.

Singh A, Islam MN. 2010. In vitro evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. *Int. J. Expt. Agric* **1**: 20–25.

Smith VL, Wilcox WF, Harman GE. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* **80**: 880-885

Smith VL, Wilcox WF, Harman GE. 1991. *Biological control of phytophthora by trichoderma*. Google Patents.

Smith VL, Wilcox WF, Harman GE. 1992. *Biological control of phytophthora by Gliocladium*. Google Patents.

Souto G i., Correa O s., Montecchia M s., Kerber N I., Pucheu N I., Bachur M, García A f. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 1247–1256.

Spadaro D, Gullino ML. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* **24**: 601–613.

Spann TMS and AW, Schumann AW. 2013. Mineral Nutrition Contributes to Plant Disease and Pest Resistance, HS1181.

Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Pelt JAV, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Brown R, Kazan K, et al. 2003. NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell Online* **15**: 760–770.

Sreevidya VS, Srinivasa Rao C, Sullia SB, Ladha JK, Reddy PM. 2006. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1957–1969.

Stampfl H, Fritz M, Santo SD, Jonak C. 2016. The GSK3/Shaggy-Like Kinase ASK α Contributes to Pattern-Triggered Immunity. *Plant Physiology* **171**: 1366–1377.

- Staub TH, Young TR. 1980.** Fungitoxicity of metalaxyl against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* **70**: 797–801.
- Steyaert JM, Ridgway HJ, Elad Y, Stewart A. 2003.** Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **31**: 281–291.
- Stokstad E. 2006.** Genetics. Genomes highlight plant pathogens' powerful arsenal. *Science (New York, N.Y.)* **313**: 1217.
- Storck V, Karpouzias DG, Martin-Laurent F. 2017.** Towards a better pesticide policy for the European Union. *Science of The Total Environment* **575**: 1027–1033.
- Stover RH. 1950.** The Black Root rot Disease of Tobacco: I. Studies on the Causal Organism *Thielaviopsis Basicola*. *Canadian Journal of Research* **28c**: 445–470.
- Sugeng Riyanto M, Sukari A, Rahmani M, Ee GC, Taufiq-Yap YH, Aimi N, Kitajima M. 2001.** Alkaloids from *Aegle marmelos* (*Rutaceae*). *Malaysian Journal of Analytical Sciences* **7**: 463–465.
- Sukumar P, Legué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC. 2013.** Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment* **36**: 909–919.
- Szatmári Á, Zvara Á, Móricz ÁM, Besenyi E, Szabó E, Ott PG, Puskás LG, Bozsó Z. 2014.** Pattern Triggered Immunity (PTI) in Tobacco: Isolation of Activated Genes Suggests Role of the Phenylpropanoid Pathway in Inhibition of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* **9**.
- Takata R, Tokita K, Mori S, Shimoda R, Harada N, Ichinose H, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Tsumuraya Y, et al. 2010.** Degradation of carbohydrate moieties of arabinogalactan-proteins by glycoside hydrolases from *Neurospora crassa*. *Carbohydrate Research* **345**: 2516–2522.
- Talbot D, Wedgwood E. 2009.** *Choisya*: surveys of the occurrence of root rotting and potential causes. Horticultural Development Company project HNS 169.

Tavares L de C, Zanon G, Weber AD, Neto AT, Mostardeiro CP, Da Cruz IBM, Oliveira RM, Ilha V, Dalcol II, Morel AF. 2014. Structure-Activity Relationship of Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* Having Antimicrobial Activity. *PLoS ONE* **9**.

Thilagavathi R, Saravanakumar D, Ragupathi N, Samiyappan R. 2007. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathologia Mediterranea* **46**: 157–167.

Thines M, Kamoun S. 2010. Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 427–433.

Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* **13**: 63–68.

Timmer LW, Graham JH, Zitko SE. 1998. Metalaxyl-Resistant Isolates of *Phytophthora nicotianae*: Occurrence, Sensitivity, and Competitive Parasitic Ability on Citrus. *Plant Disease* **82**: 254–261.

Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder MN, Métraux J-P, Mauch-Mani B. 2005. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 987–999.

Trethewey RN. 2004. Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 196–201.

Tryfona T, Liang H-C, Kotake T, Kaneko S, Marsh J, Ichinose H, Lovegrove A, Tsumuraya Y, Shewry PR, Stephens E, et al. 2010. Carbohydrate structural analysis of wheat flour arabinogalactan protein. *Carbohydrate Research* **345**: 2648–2656.

Tsyganova AV, Tsyganov VE, Findlay KC, Borisov AY, Tikhonovich IA, Brewin NJ. 2009. Distribution of legume arabinogalactan protein-extensin (AGPE) glycoproteins in symbiotically defective pea mutants with abnormal infection threads. *Cell and Tissue Biology* **3**: 93–102.

Turlings TC, Loughrin JH, McCall PJ, Röse US, Lewis WJ, Tumlinson JH. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4169–4174.

- Uddin MN, Akhter S, Chakraborty R, Baek JH, Cha J-Y, Park SJ, Kang H, Kim W-Y, Lee SY, Mackey D, et al. 2017.** SDE5, a putative RNA export protein, participates in plant innate immunity through a flagellin-dependent signaling pathway in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* **7**.
- Valletta A, Santamaria AR, Pasqua G. 2007.** CPT accumulation in the fruit and during early phases of plant development in *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae). *Natural Product Research* **21**: 1248–1255.
- Van de Peer Y, De Wachter R. 1997.** Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *Journal of Molecular Evolution* **45**: 619–630.
- Van Hengel AJ, Van Kammen A, De Vries SC. 2002.** A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* **114**: 637–644.
- Van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ. 2008.** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 443–448.
- Vaughan MM, Wang Q, Webster FX, Kiemle D, Hong YJ, Tantillo DJ, Coates RM, Wray AT, Askew W, O'Donnell C, et al. 2013.** Formation of the Unusual Semivolatile Diterpene Rhizathalene by the *Arabidopsis* Class I Terpene Synthase TPS08 in the Root Stele Is Involved in Defense against Belowground Herbivory. *The Plant Cell Online* **25**: 1108–1125.
- Velasquez SM, Ricardi MM, Dorosz JG, Fernandez PV, Nadra AD, Pol-Fachin L, Egelund J, Gille S, Harholt J, Ciancia M, et al. 2011.** O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science (New York, N.Y.)* **332**: 1401–1403.
- Veld WAM in 't, Rosendahl KCHM, Rijswijk PCJ van, Meffert JP, Westenberg M, Vossenbergt BT LH van de, Denton G, Kuik FAJ van. 2015.** *Phytophthora terminalis* sp. nov. and *Phytophthora occultans* sp. nov., two invasive pathogens of ornamental plants in Europe. *Mycologia* **107**: 54–65.

- Verma N, Shukla S. 2015.** Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2**: 105–113.
- Vessey JK. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571–586.
- Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos N, Weekers F, Kevers C, Thonart P, et al. 2004.** Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology* **27**: 243–258.
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005.** Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology* **138**: 998–1008.
- Vigo C, Norman JR, Hooker JE. 2000.** Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology* **49**: 509–514.
- Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti E I., Lorito M, Sivasithamparam K. 2006.** Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 143–148.
- Vlad F, Spano T, Vlad D, Bou Daher F, Ouelhadj A, Kalaitzis P. 2007.** *Arabidopsis* prolyl 4-hydroxylases are differentially expressed in response to hypoxia, anoxia and mechanical wounding. *Physiologia Plantarum* **130**: 471–483.
- Wahyuni TS, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. 2014.** Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. *Fitoterapia* **99**: 276–283.
- Walters D, Heil M. 2007.** Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**: 3–17.

- Wang Y, Meng Y, Zhang M, Tong X, Wang Q, Sun Y, Quan J, Govers F, Shan W. 2011.** Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and identification of variation in host specificity. *Molecular Plant Pathology* **12**: 187–201.
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC. 2010.** Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia* **53**: 197–201.
- Werner S, Steiner U, Becher R, Kortekamp A, Zyprian E, Deising HB. 2002.** Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS microbiology letters* **208**: 169–173.
- Wink M. 1988.** Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* **75**: 225–233.
- Wink M. 2010.** Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. In: Wink M, ed. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 1–19.
- Wit PJGMD. 1997.** Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science* **2**: 452–458.
- Wu Q, VanEtten HD. 2004.** Introduction of Plant and Fungal Genes into Pea (*Pisum sativum* L.) Hairy Roots Reduces Their Ability to Produce Pisatin and Affects Their Response to a Fungal Pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 798–804.
- Wu Y, Williams M, Bernard S, Driouich A, Showalter AM, Faik A. 2010.** Functional Identification of Two Nonredundant Arabidopsis $\alpha(1,2)$ Fucosyltransferases Specific to Arabinogalactan Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 13638–13645.
- www.phytophthoradb.org.** Phytophthora Database.
- Xie F, Williams A, Edwards A, Downie JA. 2012.** A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **25**: 250–258.

- Xu X-M, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ. 2011.** A numerical study of combined use of two biocontrol agents with different biocontrol mechanisms in controlling foliar pathogens. *Phytopathology* **101**: 1032–1044.
- Xu J, Tan L, Lampert DTA, Showalter AM, Kieliszewski MJ. 2008.** The O-Hyp glycosylation code in tobacco and *Arabidopsis* and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. *Phytochemistry* **69**: 1631–1640.
- Yao Y, Xue Z, Hong C, Zhu F, Chen X, Wang W, Cai Z, Huang N, Yang X. 2016.** Efficiency of different solarization-based ecological soil treatments on the control of *Fusarium* wilt and their impacts on the soil microbial community. *Applied Soil Ecology* **108**: 341–351.
- Yariv J, Lis H, Katchalski E. 1967.** Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* **105**: 1C–2C.
- Yariv J, Rapport MM, Graf L. 1962.** The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* **85**: 383–388.
- Yates EA, Valdor J-F, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP. 1996.** Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6**: 131–139.
- Zamioudis C, Pieterse CMJ. 2012.** Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **25**: 139–150.
- Zehnder GW, Murphy JF, Sikora EJ, Kloepper JW. 2001.** Application of Rhizobacteria for Induced Resistance. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 39–50.
- Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. 2004.** Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15811–15816.
- Zerbe P, Bohlmann J. 2015.** Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. *Trends in Biotechnology* **33**: 419–428.

Zhang M, Li J, Shen A, Tan S, Yan Z, Yu Y, Xue Z, Tan T, Zeng L. 2016. Isolation and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with Potential for Biological Control of *Phytophthora* Blight and Growth Promotion of Pepper. *Journal of Phytopathology* **164**: 1012–1021.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **23**: 283–333.

Zhao W, Wolfender JL, Hostettmann K, Xu R, Qin G. 1998. Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry* **47**: 7–11.

Zheng H, Cui C, Zhang Y, Wang D, Jing Y, Kim KY. 2005. Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* **6B**: 778–786.

CURRICULUM VITAE

Curriculum vitae

Youssef MANASFI

☎: 06.50.06.41.93

✉: youssef.manasfi@gmail.com

5 rue du Roi, 76000 Rouen

Doctorant en Biologie Cellulaire Végétale

Situation Actuelle

Depuis septembre 2017 : **Doctorant au sein du laboratoire Glyco-MEV** (Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale UPRES EA 4358)-**Université de Rouen** et **AGRI'TERR** (Agro-écologie des territoires)-UniLaSalle, sous la direction du Dr M. Vicié-Gibouin et du Dr I. Gattin.

Sujet : Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole : cas du pathosystème *Choisya ternata* / *Phytophthora spp.*

Domaines de compétences

Techniques d'imagerie

Préparations d'échantillons pour analyses microscopiques : Préparations chimiques.

Microscopie Optique et Confocale à Balayage Laser : Colorations histochimiques et immunocytochimiques des composés pariétaux.

Techniques de biologie moléculaire

Extraction et dosage d'ADN : Bioanalyseurs, et gel d'agarose / Conception d'amorces, RT-PCR, PCR et qPCR.

Techniques de biochimie

Extraction et analyse des composés pariétales (glycoprotéines et sucres) : chromatographie en phase gazeuse (GC), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), dosage colorimétrique (spectrométrie), électrophorèse (roquette, deux dimension et SDS-PAGE), coloration au rouge ponceau/au bleu de coomassie/au nitrate d'argent/au β -glucosyl Yariv, Western blot et Slot blot.

Extraction et analyse des métabolites secondaire : LC-US-ESI-MS

Fabrication des produits chimiques : Fabrication du β -glucosyl Yariv.

Microbiologie

Identification des pathogènes : Isolement de *Phytophthora* à partir des plantes malades et identification/quantification des espèces par des approches moléculaires.

Entretien des souches : production des zoospores de *Phytophthora*.

Manipulation de *Phytophthora* : tests d'infection racinaire *in-vitro* et en terre, tests d'enkystement et de germination et tests de chimiotactisme.

Autres compétences

Valorisations scientifiques : Communications orales lors de congrès.

Encadrement des étudiants en L2, L3 (1 mois), M1 (4 mois).

Langues : Arabe, Français et Anglais.

Activités de recherche

2016-Octobre 2017 : ATER à l'université de Rouen et au sein du laboratoire GlycoMEV (Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale UPRES EA 4358).

2013 : Stage Master 2 Recherche à l'Université de Rouen-Laboratoire Glyco-MEV

Sujet : Caractérisation des arabinogalactane-protéines chez la plante reviviscente : *Craterostigma plantagineum*. Dr M Vicré-Gibouin.

2012 : Stage Master 1 Recherche à l'Université de Rouen-Laboratoire Glyco-MEV

Sujet : Caractérisation des arabinogalactane-protéines chez la plante reviviscente : *Craterostigma plantagineum*. Dr M Vicré-Gibouin. (1 mois) au sein du laboratoire « l'institut de biologie moléculaire et biotechnologie des plantes » (IMBIO) à l'université de Bonn ; Directeur : Pr. Doroteya Bartlett.

2010 : Stage Master 1 recherche à l'Université Libanaise, Liban

Sujet : Evaluation de la qualité des eaux de la mare d'Ammik et du cours d'eau «Le Ghozaeil» par l'autoécologie des algues et des macrophytes. Pr. K. Slim.

2010 : Stage L3 (1 mois) d'initiation à l'analyse médicale de l'hôpital de Rafic Al-Hariri - Liban.

Sujet : (Tests d'Hématologie ; Parasitologie ; Bactériologie ; Virologie).

Activités d'enseignement

2016 - 2017 : A.T.E.R en Biologie Cellulaire Végétale – Université de Rouen.

Encadrement : 1 L3 (1 mois), 1 M1 (2 mois).

Cursus universitaire

2013-Présent : Doctorat en Biologie cellulaire végétale - Université de Rouen, France.

2012 : Master recherche en biologie cellulaire, parcours Biosciences, Sciences du Végétal-Ecoproduction et Biovalorisation (mention Bien) à l'Université de Rouen, France.

2010-2011 : Master 1^{ère} année en Sciences Agronomiques : Parcours Sciences et Technologies Végétales à

L'université Libanaise, Liban.

2009-2010 : Master recherche 1^{ère} année en Biologie : Parcours Biologie Végétale et Environnement (mention Bien) à l'Université Libanaise, Liban.

2006-2009 : Licence en Biologie (mention Assez Bien) à l'Université Libanaise, Liban.

Formations

- Proposées par l'EdNBISE

2014 : Communiquer en anglais : Niveau 1 - Université de Rouen.

04 Nov 2014 : Monter et mener un projet de recherche - Université de Rouen

- Autres

Jan 2012 : Formation à la microscopie confocale - Université de Rouen - PRIMACEN.

Référents

Dr. VICRÉ Maïté

maite.vicre@univ-rouen.fr

Dr. TRINSOUTROT-GATTIN

Isabelle.GATTIN@unilasalle.fr

Valorisations scientifiques

Publications internationales

Youssef Manasfi, Marc-Antoine Cannesan, Wassila Riah, Mélanie Bressan, Karine Laval, Azeddine Driouich, Maïté Vicré and Isabelle Trinsoutrot-Gattin*. Is Biocontrol an alternative solution for *Choisya ternata* root rot disease caused by *Phytophthora parasitica*? (Submitted to Plant Disease Journal le 28 Juillet 2017).

Youssef Manasfi, Arnaud Lanoue, Marc-Antoine Cannesan, Azeddine Driouich, Karine Laval, Isabelle Trinsoutrot-Gattin and Maïté Vicré*. Arabinogalactan proteins and furoquinoline alkaloids from *Choisya ternata* are involved in root-*Phytophthora parasitica* interactions (en cours de préparation).

Castilleux R, Ropitiaux M, Manasfi Y, Bernard S, Vicré-Gibouin M, Driouich A. (Accepté)
Contributions to arabinogalactan proteins analysis. In: Popper ZA, ed. The Plant Cell Wall. Methods in Molecular Biology. New York: Springer Press.

B. Plancot, M. Ropitiaux, C. Plasson, Y. Manasfi, A. Driouich, M. Vicré, M-L. Follet-Gueye, A. Iyer-Pascuzzi, I. Boulogne*. Involvement of oligogalacturonides in root-pathogen interactions in the *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pathosystem (en cours de préparation).

Communications Orales

Driouich A., Koroney A-S., Gotté M., Manasfi Y., Follet-Gueye M-L., M.Vicré Gibouin and Hawes M. Role of Root Border Cells and Secretions in plant defence. Conference of the IOBC. Integrated Protection of Stored Products Zagreb, Croatia. June 28th-July 1st, 2015.

Manasfi Y. Lutte contre les pathogènes telluriques en contexte horticole : cas du système *Choisya ternata*/*Phytophthora* spp. 7ième Journée scientifique du GRR-VASI, Biotropica. Lery Poses, France. May 22th 2015.

Présentation de mon sujet de thèse : Journée partenariale Arexhor Seine Manche, Mont-Saint-Aignan, France (23 Juin 2014).

ANNEXES

Annexes

Publication N°3: book chapter

Contributions to arabinogalactan proteins analysis

Romain Castilleux, Marc Ropitiaux, Youssef Manasfi, Sophie Bernard, Maïté Vicré-Gibouin, Azeddine Driouich*

Les arabinogalactane-protéines (AGPs) sont des protéoglycannes impliqués dans beaucoup de processus de développements. Au niveau racinaires, les AGPs sont présentes dans la paroi des cellules racinaires, dans les cellule bordante/cellules apparentées aux cellules bordantes et dans le mucilage. Les techniques de détection, localisation et quantification sont essentielle afin de découvrir la diversité structurale ainsi que les rôles des AGPs. Ce chapitre présente en détails des méthodes d'immunocytochimie utilisant des anticorps monoclonaux adaptées pour les racines et des analyses biochimique utilisant le β -D-glucosyl Yariv pour caractériser les AGPs.

Mots clés : Arabinogalactane-protéines, Paroi cellulaire, β -D-glucosyl Yariv, Electrophorèse, Immunocytochimie, Anticorps monoclonaux, Racines.

Contributions to arabinogalactan proteins analysis

Romain Castilleux, Marc Ropitiaux, Youssef Manasfi, Sophie Bernard, Maité Vicré-Gibouin, Azeddine Driouich

Abstract

Arabinogalactan proteins (AGPs) are important plant proteoglycans involved in many development processes. In roots, AGPs occur in the cell wall of root cells and root cap derived-cells as well as in the secreted mucilage. Detection, localization and quantification techniques are therefore essential to unravel the AGPs diversity of structures and functions. This chapter details root-adapted immunocytochemical methods using monoclonal antibodies, and a collection of biochemical analysis protocols using β -D-glucosyl Yariv reagent for comprehensive AGPs characterization.

Key-words: Arabinogalactan proteins, Cell wall, β -D-glucosyl Yariv, Electrophoresis, Immunocytochemistry, Monoclonal antibodies, Root.

1. Introduction

Arabinogalactan proteins (AGPs) are widespread proteoglycans in plants, present in all organs such as leaves, stems and roots (1). They are specifically found in the cell wall, the plasma membrane and secretions. The binding to the plasma membrane is mediated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (2, 3). AGPs are classified as hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) due to their particular structure with a protein core rich in hydroxyproline residues that are *O*-glycosylated (4). The *O*-glycan moiety is mostly composed of D-galactose linked in β -1,3 and β -1,6, and L-arabinose linked in α -1,3, α -1,5 and β -1,3. Other monosaccharides such as L-rhamnose, L-fucose, D-xylose or D-glucuronic acid can also be present on AGP glycans as “minor” sugars (4–6).

However, the composition and the structure of AGPs are diverse, which may explain the strong heterogeneity of their biological functions. AGPs have been shown to be important for many aspects of plant survival and development, including cell growth and morphology, pollen tube guidance, somatic embryogenesis and root development (6, 7). Recent studies have demonstrated that AGPs are essential in the interaction between roots and soil-borne microorganisms (8–10). AGPs are indeed required for both root colonization by beneficial microbes such as *Rhizobium sp.* and root protection against pathogens by either repelling or trapping them (8–11). This implies that AGPs are not only present within the cell wall but also in the root mucilage (9, 12, 13). The mucilage is mainly secreted by root cap cells and root cap-derived cells, namely border cells (BCs) or border-like cells (BLCs) depending on the plant species (8, 14).

The immunocytochemistry approach is a very useful technique to unravel the presence of AGP epitopes within root tissues using monoclonal antibodies. A large set of anti-AGP antibodies including LM2 (15, 16), LM14 (17), JIM4 (16, 18, 19), JIM8, JIM13, JIM14, JIM15, JIM16 (16, 20) and MAC207 (16, 21) are commercially available. The exact nature of the recognized epitopes is not always clearly identified. However, the LM2 antibody is known to recognize a β -linked glucuronic acid epitope whereas JIM4, JIM13 and MAC207 are believed to bind to a

GlcA β (1 \rightarrow 3)GalA α (1 \rightarrow 2)Rha motif. These antibodies are valuable and highly useful tools to investigate the diversity of AGPs structure, function and location.

It is worth noting that immunodetection is limited by the requirement of an unmasked epitope and the likelihood that some AGPs in a given sample would not be recognized by any of these antibodies. A complementary approach to immunolocalization and cell imaging is therefore needed to characterize in more details AGPs. This can be achieved by using the β -D-glucosyl Yariv reagent (β -D-GlcY) that enables purification of AGPs, as well as their biochemical analyses using electrophoresis techniques (e.g. Rocket or Cross electrophoresis) and others (e.g. radial gel diffusion) (9, 22–27). β -D-GlcY is widely used as a probe that binds and precipitates β -1,3-galactan-containing AGPs (28–31).

In order to detect, localize and extract AGPs, immunocytochemical and biochemical methods have been already described in the previous book edition (27, 32). Nevertheless, significant improvements have been made since then, either for routine experiments or for specific purposes. In the present chapter, we describe new protocols for AGPs immunolocalization specifically dedicated to root tissues, root border cells and root mucilage. As a matter of fact, root BCs and/or root BLCs and mucilage can be easily lost during “classical” immunolabeling procedure, and it is important to have them preserved during manipulations. Moreover, a purification step has been added to the AGPs extraction and a supplemental analysis tool has been set up.

Therefore, two methods to immunolocalize AGP epitopes are presented here in this chapter. The first one is adapted for very thin roots releasing several files of root BLCs as it occurs in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The second method is more appropriate for plants with a thicker root releasing isolated BCs and an abundant mucilage such as in the leguminous species, e.g. *Pisum sativum*. Finally, AGPs extraction and purification procedures as well as analysis techniques, such as Rocket electrophoresis and radial gel diffusion, are also presented.

2. Materials

2.1 Immunolabeling of « thin » root tips with BLCs (e.g. *Arabidopsis thaliana*)

1. Plant material.
2. Scalpel and tweezers.
3. Superfrost diagnostic slides 10-wells 8 mm (Zuzi, ref: 30503101).
4. Micropipette.
5. 200 μ L pipette tips.
6. Gloves.
7. Flow hood.
8. Stock solution paraformaldehyde (PFA) 16% (EMS, ref: 15710). Storage at -20°C .
9. Phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 M : NaCl 137 mM, KCl 47 mM, KH_2PO_4 1.5 mM and $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})_{12}$ 7 mM (pH 7.2). Autoclave before storage at $+4^{\circ}\text{C}$ (see **Note 1**).
10. Refrigerator.
12. Bovine serum albumine (BSA; AURION, ref: 900.011) for blocking non-specific binding sites. Storage at $+4^{\circ}\text{C}$.
13. Tween 20 (SIGMA, ref: P1379).
14. Primary monoclonal antibody (PlantProbes, www.plantprobes.net/). Storage at $+4^{\circ}\text{C}$.
15. A wet chamber for maintaining air humidity (**Fig. 1.**, see **Note 2**).
16. Secondary antibody: Anti-rat IgG coupled with FITC (Fluorescein isothiocyanate; SIGMA, ref: F6258). Storage at $+4^{\circ}\text{C}$.

17. Coverslip (Menzel-Glaser; 24 x 60 mm # 1).
18. Nail polish (EMS, ref: 72180).

2.2 Immunolabeling of “thick” root tips with BCs and mucilage (e.g. *Pisum sativum*)

1. Plant material.
2. Ultrathin tweezers.
3. Microscope slides 18-wells-Poly-L-Lysine sterile (IBIDI, ref: 81824).
4. Micropipette.
5. 200 μ L pipette tips.
6. Gloves.
7. Flow hood.
8. Stock solution paraformaldehyde (PFA) 16% (EMS, ref: 15710). Storage in -20°C .
9. PIPES (Alfa Aesar, ref: A16090).
10. CaCl_2 .
11. Phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 M : NaCl 137 mM, KCl 47 mM, KH_2PO_4 1.5 mM and $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})_{12}$ 7 mM (pH 7.2) (see **Note 1**).
12. Refrigerator.
13. Bovine serum albumine (BSA; AURION, ref: 900.011) for blocking non-specific binding sites. Storage at $+4^{\circ}\text{C}$.
14. Primary monoclonal antibody (PlantProbes www.plantprobes.net/). Storage at $+4^{\circ}\text{C}$.
15. A wet chamber for maintaining air humidity (**Fig. 1**, see **Note 2**).
16. Secondary antibody: Anti-rat IgG coupled with TRITC (Tetramethylrhodamine; SIGMA, ref: T5778). Storage at -20°C .
17. Citifluor (Agar scientific, ref: AF2 R1320).

2.3 AGPs extraction

1. Plant material.
2. Liquid nitrogen.
3. Mortar and pestle.
4. Freeze-dryer.
5. Gloves.
6. Extraction buffer: 50 mM Tris-base (adjust pH 8 with HCl), 10 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}(\text{H}_2\text{O})_2$, 2 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 1% Triton X-100 (see **Notes 14,15**).
7. Corning tube 50 mL.
8. Refrigerator.
9. Rotating shaker.
10. Centrifuge.
11. Ethanol 96%.
12. 50 mM Tris-base (adjust pH 8 with HCl).
13. Dialysis tubing 3.5 kDa.
14. Freezer -20°C .
15. 1% NaCl.

2.4 Purification of AGPs

1. 2 mL Eppendorf tubes.
2. Gloves.

3. 2 mg/mL β -D-Glucosyl Yariv reagent (β -D-GlcY).
4. Refrigerator.
5. 1% (w/v) NaCl.
6. 100% methanol.
7. Flow hood.
8. 100% dimethylsulfoxide (DMSO).
9. Sodium hydrosulfite.
10. Vortex.
11. Ultra pure water.
12. PD-10 Desalting Columns containing 8.3 mL of Sephadex™ G-25 Medium from GE Healthcare (**Fig. 6A**).
13. 1.5 mL Eppendorf tubes.
14. Radial gel diffusion (protocol described in methods, paragraph 3.4).

2.5 Radial gel diffusion :AGPs detection / semi-quantification

1. Radial gel diffusion : 1% (w/v) agarose gel containing 0.15 M NaCl, 0.02% (w/v) NaNO₃, 10 μ g/mL β -D-GlcY (see **Note 16**).
2. Weighing scale.
3. Square Petri dish 120 mm \times 120 mm.
4. Micropipette.
5. 200 μ L cut pipette tips.
6. Gum Arabic (Gum Acacia, Fisher scientific, ref : G/1050/53).
7. 1% (w/v) NaCl.
8. Refrigerator.
9. Wet chamber as in **Fig.1**.
10. Shaker platform.

2.6 Rocket electrophoresis: AGPs quantification

1. Rocket gel : 1% (w/v) agarose gel containing 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine, 20 μ g/mL β -D-GlcY (see **Note 16**).
2. Gel tray 18x15 cm (see **Note 17**).
3. Tape (width 2 cm).
4. 10 μ L pipette tips.
5. 10 μ L cut pipette tips.
6. Gum Arabic (Gum Acacia, Fisher scientific, ref: G/1050/53).
7. 1% (w/v) NaCl.
8. Running buffer 1: 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine (see **Note 16**).
9. Isoelectric focusing electrophoresis system (IEF).
10. Shaker platform.

2.7 Agarose gel electrophoresis: detection of AGP sub-populations

1. Agarose gel : 1% (w/v) agarose gel containing 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na₂EDTA(H₂O)₂ (see **Note 16**).
2. Gel tray 18x15 cm and the comb (see **Note 17**).
3. Tape (width 2 cm).
4. Loading buffer: 32% (v/v) glycerol, 2% (w/v) Bromophenol blue.

5. Vortex.
6. Agarose gel electrophoresis system.
7. Running buffer 2: 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na₂EDTA(H₂O)₂ (see **Note 16**).
8. β-D-GlcY (see **Note 18**).
9. 1% (w/v) NaCl.
10. Shaker platform.

2.8 2D electrophoresis: characterization of AGP sub-populations and quantification

1. Agarose gel : 1% (w/v) agarose gel containing 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na₂EDTA(H₂O)₂ (see **Note 16**).
2. Gel tray 18x15 cm and the comb (see **Note 17**).
3. Tape (width 2 cm).
4. Loading buffer: 32% (v/v) glycerol, 2% (w/v) Bromophenol blue.
5. Vortex.
6. Agarose gel electrophoresis system.
7. Running buffer 2: 90 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 90 mM boric acid, 2 mM Na₂EDTA(H₂O)₂ (see **Note 16**).
8. Scalpel.
9. Rocket gel : 1% (w/v) agarose gel containing 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine, 20 μg/mL β-D-GlcY (see **Note 18**).
10. Running buffer 1: 25 mM Tris-base (adjust pH 8.3 with HCl), 200 mM glycine.
11. Isoelectric focusing electrophoresis system (IEF).
12. 1% (w/v) NaCl.
13. Shaker Platform.

3. Methods

3.1 Immunolabeling of « thin » root tips with BLCs (e.g. *Arabidopsis thaliana*)

This protocol allows to have a general view of the root apex and provides an optimal preservation of BLCs organization at the root tip (see **Note 3**). This method has been adapted from (**33**).

- 1) Cut root tips using a scalpel (**Fig. 2A.**), place them onto a 10 wells superfrost diagnostic slide (**Fig. 2B.**) and fix them by adding 20 μ L of 4% PFA (Paraformaldehyde) (**Fig. 2C.**) for 30 to 40 minutes at room temperature (RT). The liquid is removed gently by placing the pipette tip at the top of the root to limit the loss of BLCs (**Fig. 2D**, see **Note 4**).
- 2) Wash briefly at RT with PBS 1X (see **Note 5**).
- 3) Incubate for 30 to 45 minutes at RT with 3% (w/v) BSA diluted in PBS 1X (see **Note 6**).
- 4) Wash briefly at RT with PBS 1X and then with PBS 1X + 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST) (see **Note 7**).
- 5) Incubate overnight (O/N) with primary antibody at +4°C in a wet chamber. Primary antibody is diluted at 1:5 with PBST (see **Note 8**).
- 6) Wash twice briefly at RT with PBST.
- 7) Incubate 2 hours at RT in darkness with the secondary antibody diluted at 1:30 in PBST, in a wet chamber. The second antibody is an Anti-rat IgG coupled with FITC (see **Notes 9,10**).
- 8) Wash briefly 3 times at RT with PBST.
- 9) Cover the slide with a coverslip and fix with nail polish.
- 10) Observe with a confocal laser-scanning microscope (Excitation : 488 nm ; Emission : 500-535 nm). Results are shown in **Fig. 3**.

3.2 Immunolabeling of “thick” root tips with BCs and mucilage preservation (e.g. *Pisum sativum*)

The immunolabeling of “thick” root tips protocol provides a good preservation of BCs and mucilage despite several washing steps (see **Note 11**). This method has been adapted from (**9**).

- 1) Cut root tips using ultrathin tweezers (**Fig. 4A.**), place it onto a sterile 18-wells microscope slide Poly-L-Lysine (**Fig. 4B.**), and fix with 20 μ L of 4% PFA diluted in 50 mM PIPES, pH 7 and 1 mM CaCl₂ (**Fig. 4C.**) for 40 minutes at RT. The liquid is gently removed by placing the pipette tip at the top of the root to limit the loss of BCs (**Fig. 4D**, see **Note 4**).
- 2) Wash 10 minutes 4 times at RT with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA (see **Notes 5,6**).
- 3) Incubate O/N with the primary antibody at +4°C in a wet chamber. Primary antibody is diluted at 1:5 with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA (see **Note 8**).
- 4) Wash 10 minutes 4 times at RT with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA.
- 5) Incubate 2 hours at +25°C in darkness with the secondary antibody diluted at 1:50 in PBS 1X containing 1% (w/v) BSA in a wet chamber. The second antibody is an Anti-rat IgG coupled with TRITC (see **Notes 9, 10**).
- 6) Wash 10 minutes 4 times at RT with PBS 1X containing 1% (w/v) BSA.
- 7) Finally wash at RT with PBS 1X for 10 minutes.
- 8) Add a drop of Citifluor (see **Notes 12,13**).

- 9) Observe with a confocal laser-scanning microscope (Excitation : 550 nm ; Emission : 560-600 nm). Results are shown in **Fig. 5**.

3.3 Extraction of AGPs

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 23, 25, 27**).

- 1) Grind 10 g of plant material with liquid nitrogen using a mortar and a pestle.
- 2) Freeze the ground material then freeze-dry it (see **Note 19**).
- 3) Mix 1 g of the freeze-dried material with 40 mL of extraction buffer in 50 mL corning tube and incubate at +4°C O/N under agitation (see **Note 20**).
- 4) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 5) Recover the supernatant and add 5 volumes of 96% ethanol.
- 6) Incubate at +4°C O/N to precipitate high molecular weight molecules.
- 7) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 8) Carefully remove the supernatant and suspend the pellet in 40 mL of 50 mM Tris-base (adjust pH 8 with HCl).
- 9) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 10) Collect the supernatant and resuspend the pellet in 20 mL of 50 mM Tris-base previously adjusted to pH 8 with HCl.
- 11) Centrifuge for 10 minutes at +4°C, 14000×g.
- 12) Collect the supernatant and pool it with the one collected step 10.
- 13) Put the pooled supernatant under dialysis at 3.5 kDa.
- 14) After dialysis, freeze and freeze-dry the solution.
- 15) Dissolve the freeze-dried sample in 1 mL of 1% (w/v) NaCl (see **Note 21**).

3.4 Purification of AGPs

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 24**).

Because of their structural heterogeneity, binding of AGPs to β -D-GlcY can vary depending on the sub-populations present in the sample, and therefore impacts purification quality.

- 1) Precipitate the AGPs in 2 mL Eppendorf tube by adding an equal volume of 2 mg/mL β -D-GlcY to the solubilized AGPs solution (see **Note 18**).
- 2) Incubate at +4°C for 48 hours.
- 3) Centrifuge for 90 minutes at RT, 10000×g.
- 4) Recover the pellet containing β -D-GlcY /AGPs complex.
- 5) Add 1 mL of 1% (w/v) NaCl to the pellet and vortex.
- 6) Centrifuge for 10 minutes at RT, 10000×g.
- 7) Discard the supernatant and repeat the steps 5 and 6 twice.
- 8) Add 1 mL of pure methanol to the pellet and vortex (see **Note 22**).
- 9) Centrifuge for 10 minutes at RT, 10000×g.
- 10) Discard the supernatant and repeat the steps 8 and 9 twice.
- 11) Dry the pellet under a flow hood.
- 12) Dissolve the pellet by adding 500 μ L of pure DMSO and vortex (see **Note 23**).
- 13) Add 10% to 30% (w/v) sodium hydrosulfite and vortex. Then, add ultra-pure water until the color becomes clear yellow (see **Note 24**).
- 14) Desalt the clear yellow solution with a size exclusion chromatography (PD-10 desalting columns). Recover the drops of the eluted solution in a set of 10 Eppendorf tubes of 1.5 mL (**Fig. 6B**).

- 15) Check for the presence of AGPs in each tube by radial gel diffusion (described below in Methods, paragraph 3.5).
- 16) Collect the solutions from the tubes that contain AGPs and gather them in a 15 mL corning tube.
- 17) Freeze-dry the sample.
- 18) Dissolve in 0.5 mL 1% (w/v) NaCl (see **Note 25**). Store AGPs-containing solution at -20°C until use.

3.5 Radial gel diffusion for rapid AGPs detection

This method has been adapted from previous published protocols (9, 22, 23, 27).

- 1) Prepare 100 mL of radial gel diffusion. After heating, keep the gel under agitation and add 10 µg/mL β-D-GlcY. Then, pour it in a square Petri dish (see **Notes 16, 18, 26**).
- 2) Cut out wells in the gel using 200 µL cut pipette tips (**Fig. 7A**).
- 3) Load into the wells 40 µL of gum Arabic of different concentrations as standards (e.g., 0.125 mg/L, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL). As a negative control, load 1% (w/v) NaCl.
- 4) Load 40 µL of the sample.
- 5) Incubate the gel in a wet chamber at +4°C, O/N.
- 6) The presence of AGPs is indicated by the appearance of a red halo around the wells due to the interaction with the β-D-GlcY. If the AGPs are not detected, concentrate the sample and load it again (get back to step 4).
- 7) Incubate the gel in 1% (w/v) NaCl under gentle agitation onto shaker platform to remove the excess of β-D-GlcY. Results are shown **Fig. 7B-G** (see **Note 27**).

3.6 Rocket electrophoresis for AGPs quantification

This method has been adapted from previously published protocols (9, 23, 25).

- 1) Prepare 60 mL of rocket gel (see **Notes 16, 18**).
- 2) Pour the rocket gel into the gel tray with both ends sealed with tape and without the comb installed (see **Note 30**).
- 3) Carefully transfer the rocket gel from the gel tray to the IEF platform.
- 4) Load the IEF wells with the running buffer 1 and install the filter paper salt bridges (see **Note 28**).
- 5) Cut out wells in the rocket gel using 10 µL cut pipette tips.
- 6) Load into the wells 7 µL of gum Arabic at different concentrations as standards (0.125 mg/L, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL). As a negative control, load 7 µL of 1% (w/v) NaCl.
- 7) Load 7 µL of AGPs sample.
- 8) Run the IEF electrophoresis for 16h at 200 V, 5 mA, 10 W.
- 9) Red precipitation triangle-shaped lines are formed due to the interaction between the β-D-GlcY and AGPs.
- 10) Incubate the rocket gel in 1% (w/v) NaCl under a gentle agitation to remove the excess β-D-GlcY. Results are shown **Fig. 8A** (see **Note 27**).
- 11) Calculate the surface area of each peak (Formula : Area = (bxh)/2; b : base of the peak and h : height of the peak), as detailed in **Fig. 8B**.
- 12) Associate the calculated surface area of each peak to the standard concentration to make a calibration range.

13) Quantify the sample using the calibration range (see **Note 29**).

3.7 Agarose gel electrophoresis : detection of AGP sub-populations

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 23, 25, 26**).

- 1) Prepare 200 mL of agarose gel (see **Note 16**).
- 2) Pour the agarose gel into a gel tray with both ends sealed with tape and the comb installed (see **Note 30**).
- 3) Solubilize 10 to 25 µg of AGPs samples in 30 µL of 1% (w/v) NaCl. Then, add 10 µL of loading buffer and vortex.
- 4) Take off the tape once the agarose gel is polymerized.
- 5) Put the gel tray with the agarose gel inside into the electrophoresis tank and add the running buffer 2.
- 6) Load the samples into the wells and run the agarose gel electrophoresis at 250 V, 120 mA for 50 minutes, or until the dye front move 8 cm. If 8 cm is not enough to separate the different AGP sub-populations, let migrating for a longer distance.
- 7) After electrophoresis, stain the gel in 10 µg β-D-GlcY, O/N (see **Note 18**).
- 8) A red precipitation smear is formed due to binding of AGPs by the β-D-GlcY.
- 9) Incubate the agarose gel in 1% (w/v) NaCl under gentle agitation to remove the excess of β-D-GlcY. Results are shown **Fig. 9A** (see **Note 27**).
- 10) Calculate the retention factor (Rf): $Rf = Ds/Dd$ (**Fig. 9B**, see **Note 31**).

3.8 2D electrophoresis: characterization of AGP sub-populations and quantification

This method has been adapted from previously published protocols (**9, 23, 25**).

The technical steps for 2D electrophoresis are detailed in **Fig. 10**.

- 1) Prepare an agarose gel as described above (see paragraph 3.7, steps 1-6).
- 2) After agarose gel electrophoresis, cut the lanes of AGPs migration (AGP-containing strips of gel) with a scalpel.
- 3) Put them in a gel tray with both ends sealed with a tape (see **Note 30**).
- 4) Prepare a rocket gel as described above (see paragraph 3.6, step 1) and pour it into the gel tray around the cut strips.
- 5) When the rocket gel is casted around the strips, carefully transfer it from the gel tray to the IEF platform.
- 6) Load the IEF wells with the running buffer 1 and install the salt bridges (see **Note 28**).
- 7) Run the IEF electrophoresis for 16 hours at 200 V, 5 mA, 10 W.
- 8) A red precipitation area is formed due to binding of AGPs to β-D-GlcY.
- 9) Incubate the gel in 1% (w/v) NaCl under gentle agitation onto shaker platform to remove the excess of β-D-GlcY (**Fig. 11**, see **Note 27**).
- 10) Calculate the retention factor (Rf) $Rf = Ds/Dd$ (**Fig. 11**, see **Note 31**).
- 11) Calculate the relative percentage area of each population: $RA = (As/At) \times 100$ (**Fig. 11**, see **Note 32**).

4. Notes

- 1) The PBS solution is autoclaved and stored at +4°C. Before each use, this solution is filtered through a 0.2 µm filter tip.
- 2) The wet chamber fits one or two slides.
- 3) Thin roots are slightly pressed between the slide and the coverslip offering an overall view of root cap and associated BLCs.
- 4) The solution is prepared from a 16% stock solution PFA diluted in PBS 1X. This step has to be undertaken under a flow hood due to PFA toxicity.
- 5) Washes are performed by removing the liquid with a pipette and then adding 20 µL of PBS 1X.
- 6) BSA is used for blocking non-specific binding sites. This solution is freshly prepared.
- 7) Tween 20 is used to permeabilize the membrane and help the penetration of the antibody.
- 8) Concentration of primary antibody should be adapted to each plant specimen.
- 9) Secondary antibody can be used at lower concentration down to 1:50.
- 10) Other fluorochromes can be used.
- 11) The absence of the coverslip prevents crushing of thick root tips and disturbance during observation due to instable coverslip.
- 12) Citifluor limits fluorescent photobleaching and increases the resolution for microscopical observation.
- 13) Once citifluor has been added, slides can be stored in a wet chamber in the dark at +4°C for 1 week without any labeling loss.
- 14) The extraction buffer is to be kept under agitation for at least 2 hours for a complete dissolution of the Triton X-100.
- 15) The extraction buffer and the Tris-base are toxic. Gloves are required during preparation.
- 16) The gel and the running buffer are toxic. Gloves are required.
- 17) Pour the gel gently into the gel tray without creating bubbles.
- 18) β-D-GlcY is toxic. Gloves are required.
- 19) The extraction can be performed on a fresh grinded materials.
- 20) The extraction buffer volume depends on the nature of the sample. Add extraction buffer until the sample is totally dissolved in the solution.
- 21) Residues may be present in the solution at this stage prior to purification of AGPs using β-D-GlcY.
- 22) Methanol is toxic and volatile. Use it under a flow hood and wear gloves.
- 23) The pellet should be totally dissolved. If vortexing is not enough, use a micro spatula to help dissolving the pellet.
- 24) Start with 10% (w/v) sodium hydrosulfite then add ultra-pure water until the color becomes clear yellow. If the 2 mL Eppendorf tube is full and the color remains red, add more sodium hydrosulfite to a maximum of 30% (w/v). If the color is still not clear yellow, use a bigger tube and add ultra-pure water until the color becomes clear yellow.
- 25) If the viscosity of AGPs solution is high, add more 1% (w/v) NaCl.
- 26) The plate containing the gel can be stored at +4°C.
- 27) Change the 1% (w/v) NaCl solution every 5 hours until all the excess of β-D-GlcY is removed.
- 28) The filter paper salt bridges (Whatman 17CHR, GE Healthcare Life Science, ref : 3017-915) must be properly soaked in the running buffer before installation.
- 29) To be able to quantify the sample, the resulting peak of the sample has to be in the calibration range. If not, dilute or concentrate the sample.
- 30) The tape must be properly installed by pressing it hard on the edges to avoid any leak.

- 31) Measure the migration distance of the sample (Ds) and of the dye front (Dd). The Rf of each sub-population can be calculated as follows : $Rf = Ds/Dd$.
- 32) Measure the area of each sub-population using ImageJ or another appropriate software. The relative percentage area (RA) of each sub-population can be calculated as follows:
 $RA_s = [As/(At)] \times 100$; As : area of one sub-population; At : sum of all sub-populations areas.

4. Acknowledgment

The authors are grateful to La Région de Haute Normandie and le Grand Réseau de Recherche-Végétal, Agronomie, Sol et Innovation, l'Université de Rouen and Le Fonds Européen FEDER for financial support. Fluorescence images were obtained on PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, Faculty of Sciences, University of Rouen, 76821 Mont Saint Aignan.

A.D. is very grateful to all former students who have contributed in 'AGP biology' work over the years, in his laboratory.

5. References

1. G.B. Fincher, B.A. Stone, and A.E. Clarke (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function, *Annual Review of Plant Physiology*. 34, 47–70.
2. J.J. Youl, A. Bacic, and D. Oxley (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95, 7921–7926.
3. J. Svetek, M.P. Yadav, and E.A. Nothnagel (1999) Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins, *Journal of biological chemistry*. 274, 14724–14733.
4. E. Nguema-Ona, M. Vicié-Gibouin, M. Gotté, et al. (2014) Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function, *Frontiers in Plant Science*. 5, 499.
5. A.M. Showalter (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 58, 1399–1417.
6. G.J. Seifert and K. Roberts (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins, *Annual Review of Plant Biology*. 58, 137–161.
7. M. Ellis, J. Egelund, C.J. Schultz, et al. (2010) Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface?, *Plant Physiology*. 153, 403–419.
8. M. Vicié, C. Santaella, S. Blanchet, et al. (2005) Root Border-Like Cells of Arabidopsis. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria, *Plant Physiology*. 138, 998–1008.
9. M.A. Cannesan, C. Durand, C. Burel, et al. (2012) Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination, *Plant Physiology*. 159, 1658–1670.
10. E. Nguema-Ona, M. Vicié-Gibouin, M.-A. Cannesan, et al. (2013) Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions, *Trends in Plant Science*. 18, 440–449.
11. A. Driouich, M.-L. Follet-Gueye, M. Vicié-Gibouin, et al. (2013) Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense, *Current Opinion in Plant Biology*. 16, 489–495.
12. E.M. Knee, F.-C. Gong, M. Gao, et al. (2001) Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source, *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 775–784.

13. A.S. Koroney, C. Plasson, B. Pawlak, et al. (2016) Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*, *Annals of Botany*. mcw128.
14. C. Durand, M. Vicre-Gibouin, M.L. Follet-Gueye, et al. (2009) The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of Arabidopsis Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan, *Plant Physiology*. 150, 1411–1421.
15. M. Smallwood, E.A. Yates, W. Willats, et al. (1996) Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot, *Planta*. 198, 452–459.
16. E.A. Yates, J.-F. Valdor, S.M. Haslam, et al. (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies, *Glycobiology*. 6, 131–139.
17. I. Moller, S.E. Marcus, A. Haeger, et al. (2008) High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles, *Glycoconjugate Journal*. 25, 37–48.
18. J.P. Knox, S. Day, and K. Roberts (1989) A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L., *Development*. 106, 47–56.
19. N.J. Stacey, K. Roberts, and J.P. Knox (1990) Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L., *Planta*. 180, 285–292.
20. J.P. Knox, P.J. Linstead, J. Peart, et al. (1991) Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation, *The Plant Journal*. 1, 317–326.
21. R.I. Pennell, J.P. Knox, G.N. Scofield, et al. (1989) A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants., *The Journal of cell biology*. 108, 1967–1977.
22. G.-J. Van Holst and A.E. Clarke (1986) Organ-Specific Arabinogalactan-Proteins of *Lycopersicon peruvianum*(Mill) Demonstrated by Crossed Electrophoresis, *Plant Physiology*. 80, 786–789.
23. G.-J. Van Holst and A.E. Clarke (1985) Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion, *Analytical Biochemistry*. 148, 446–450.
24. A.M. Gane, D. Craik, S.L.A. Munro, et al. (1995) Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*, *Carbohydrate Research*. 277, 67–85.
25. L. Ding and J.-K. Zhu (1997) A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion, *Planta*. 203, 289–294.
26. R. Girault, I. His, C. Andeme-Onzighi, et al. (2000) Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres, *Planta*. 211, 256–264.
27. Z.A. Popper (2011) Extraction and Detection of Arabinogalactan Proteins, In: Popper, Z.A. (ed.) *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols*, pp. 245–254 Humana Press, Totowa, NJ.
28. J. Yariv, H. Lis, and E. Katchalski (1967) Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes., *Biochemical Journal*. 105, 1C.
29. W.G.T. Willats and J.P. Knox (1996) A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*., *The Plant Journal*. 9, 919–925.
30. K. Kitazawa, T. Tryfona, Y. Yoshimi, et al. (2013) β -Galactosyl Yariv Reagent Binds to the -1,3-Galactan of Arabinogalactan Proteins, *Plant Physiology*. 161, 1117–1126.

31. B.S. Paulsen, D.J. Craik, D.E. Dunstan, et al. (2014) The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum arabic arabinogalactanprotein, *Carbohydrate Polymers*. 106, 460–468.
32. C. Hervé, S.E. Marcus, and J.P. Knox (2011) Monoclonal Antibodies, Carbohydrate-Binding Modules, and the Detection of Polysaccharides in Plant Cell Walls, In: Popper, Z.A. (ed.) *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols*, pp. 103–113 Humana Press, Totowa, NJ.
33. B. Plancot, C. Santaella, R. Jaber, et al. (2013) Deciphering the Responses of Root Border-Like Cells of Arabidopsis and Flax to Pathogen-Derived Elicitors, *Plant Physiology*. 163, 1584–1597.



Fig. 1. Wet chamber (a square Petri dish containing wet filter paper to keep air humidity).

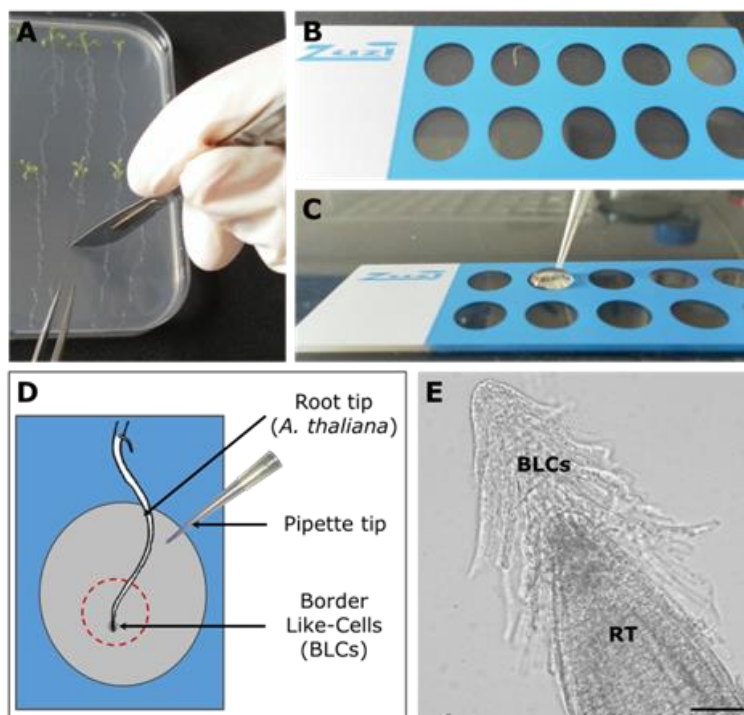


Fig. 2. Technical dissection and preparation of *A. thaliana* root tips for optimal BLCs preservation during immunofluorescence labeling. (A) Root tip is cut with a scalpel and collected softly with tweezers. (B) Root tip is placed in the center of the well and (C) 20 μ L of PFA are gently added (30-40min fixation). (D) PFA is very gently and slowly removed from the well using a pipette to avoid disruption of BLCs. (E) An image of a collected *A. thaliana* root tip and associated BLCs.

BLCs : Border-Like Cells ; RT : Root tip. Scale bar in E = 50 μ m.

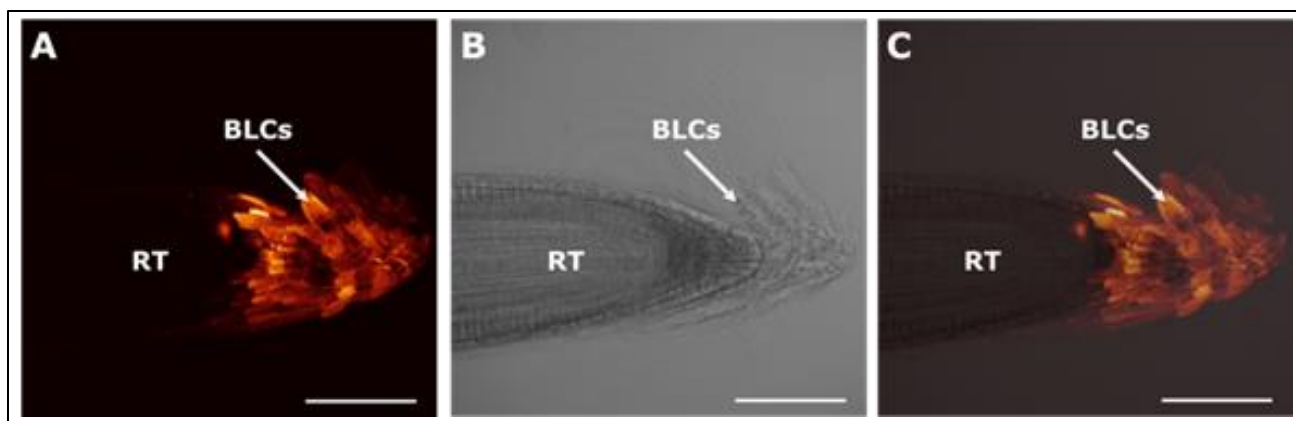


Fig. 3. Immunostaining of epitopes associated with AGPs on root tip and BLCs of *Arabidopsis thaliana* using the monoclonal antibody JIM13. **A, B** and **C**: Immunofluorescence images. Observations are made with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP2 ($\lambda_{\text{excitation}}$: 488 nm; $\lambda_{\text{emission}}$: 500 – 535 nm). **(A)** Maximum intensity Z-projection of several focal planes taken in fluorescence. **(B)** Bright-field microscopy. **(C)** Overlay reconstruction. Note that labeling with JIM13 is associated with the root cap and BLCs. BLCs : Border-like cells ; RT : Root tip ; Scale bars = 100 μm

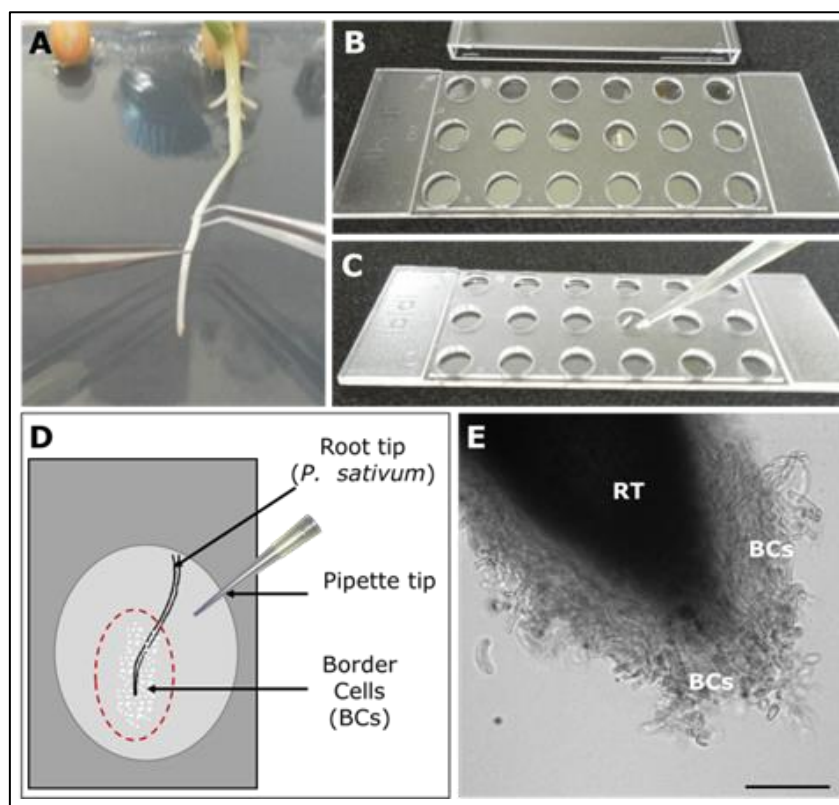


Fig. 4. Technical dissection and preparation of *Pisum sativum* root tip for optimal BCs preservation during immunofluorescence labeling. **(A)** Root tip is cut and collected with two tweezers. **(B)** Root tip is placed in the center of the well and **(C)** 20 μL of PFA are gently added. **(D)** PFA is very gently and slowly removed from the well using a pipette to avoid disruption of BCs. **(E)** An image of a collected *P. sativum* root tip and associated BCs. BCs : Border Cells ; RT : Root tip. Scale bar in E = 200 μm .

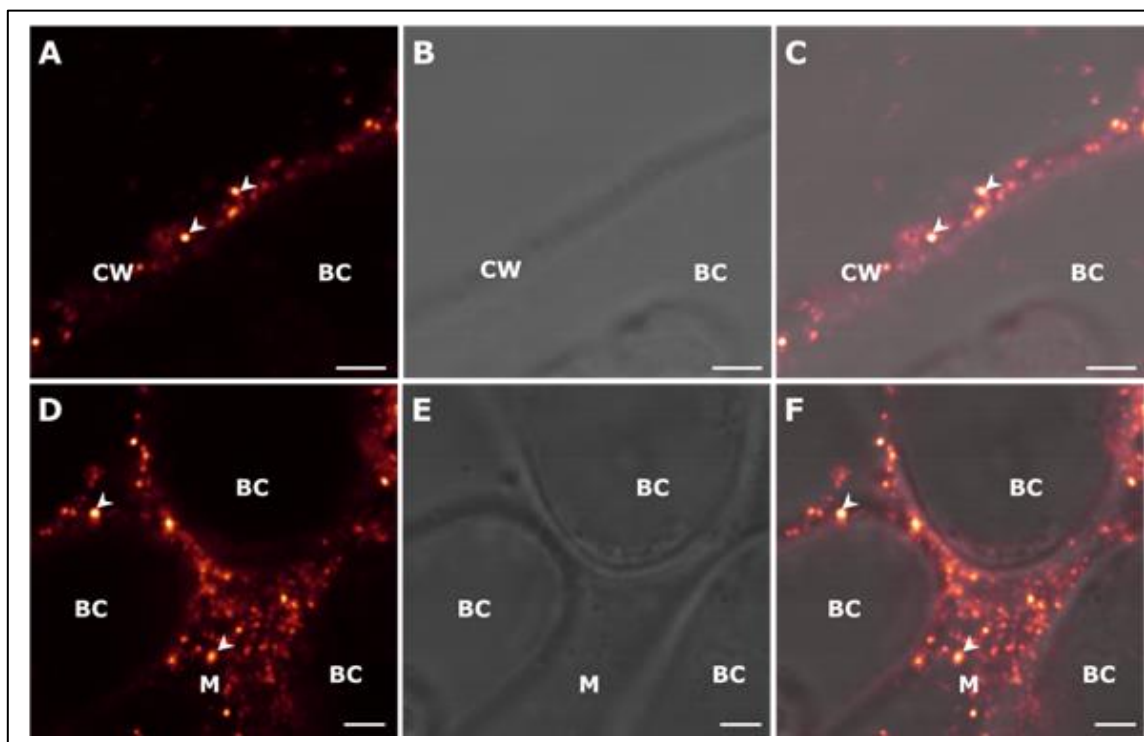


Fig. 5. Immunostaining of AGP epitopes at the surface of BCs and mucilage of *Pisum sativum* with the monoclonal antibody JIM13. A punctate staining (arrowheads) is observed (A-C) over the cell wall of BCs and (D-F) over the mucilage surrounding BCs. A, B, C, D, E and F: Immunofluorescence images. Observations are made with an inverted confocal laser scanning microscope Leica SP5 ($\lambda_{\text{excitation}}$: 550 nm; $\lambda_{\text{emission}}$: 560 – 600 nm). (A, D) Fluorescence. (B, E) Bright-field microscopy. (C, F) Overlay reconstitution. BC : Border cell ; CW : Cell wall ; M : Mucilage ; Scale bars = 2.5 μm .

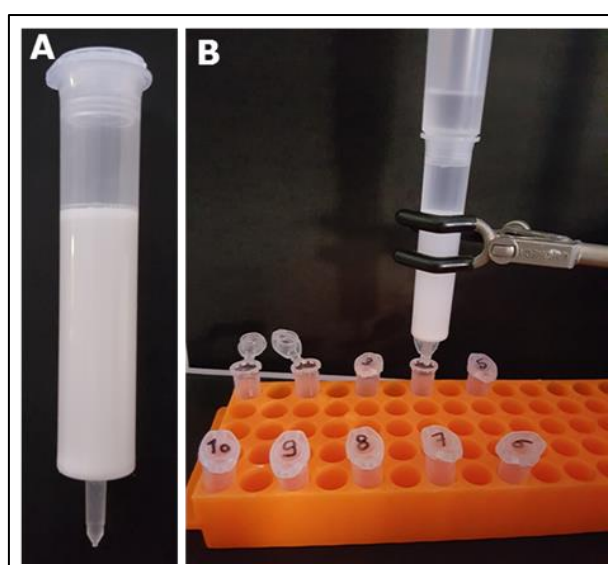


Fig. 6. (A) PD-10 column. (B) Desalting the AGPs solution using a PD-10 column and recovering the eluted solution in a set of 10 Eppendorf tubes 1.5 mL.

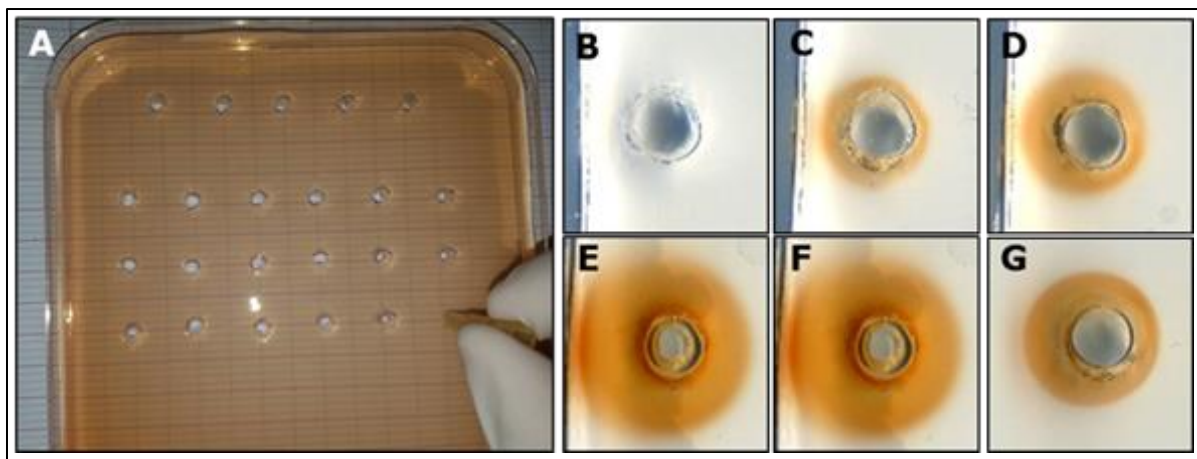


Fig. 7. Radial gel diffusion assay. (A) Cutting wells into the gel. (B) 40 μ L loading of 1% (w/v) NaCl. (C, D, E and F) 40 μ L loadings of 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL of gum Arabic. (G) 40 μ L loading of AGP-containing samples.

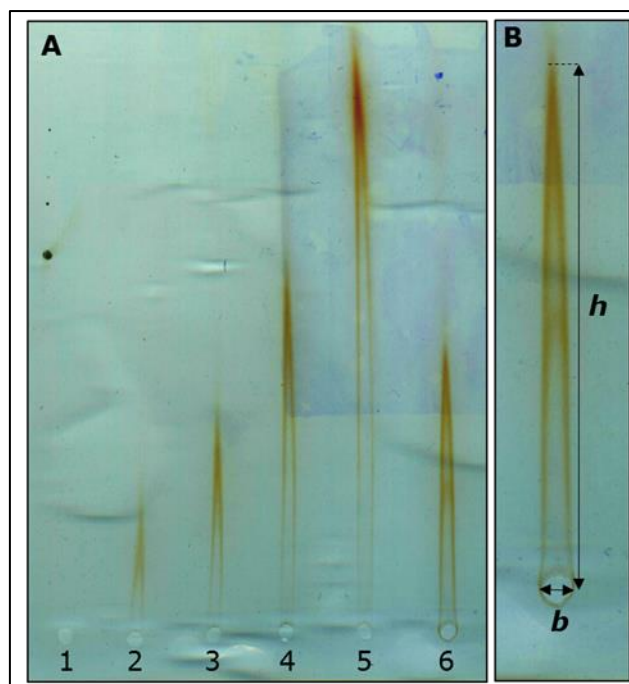


Fig. 8. (A) Rocket gel electrophoresis. (1) 7 μ L loading of 1% (w/v) NaCl. (2, 3, 4 and 5) 7 μ L loadings of 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL of gum Arabic. (6) 7 μ L loading of AGP-containing samples. (B) Peak area measurement (h , b , height and base of the peak).

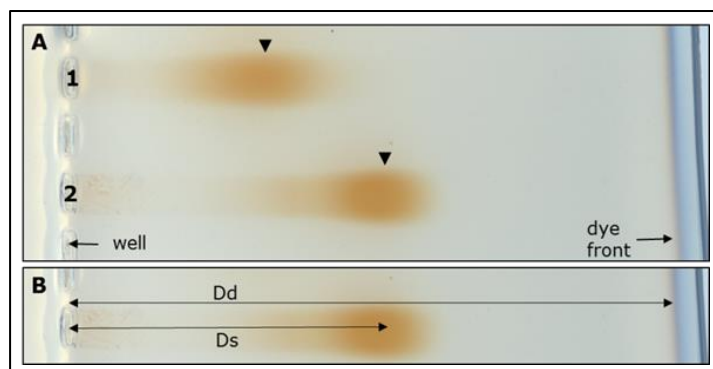


Fig. 9. (A) Agarose gel. Linear arabinogalactan proteins profiles revealed by agarose gel electrophoresis followed by staining with β -D-GlcY. The two samples (1 and 2) present different AGP sub-populations indicated by black arrows with different R_f values. (B) Measurement of the migration distance of the sample and the dye front to calculate the retention factor : $R_f = D_s/D_d$.

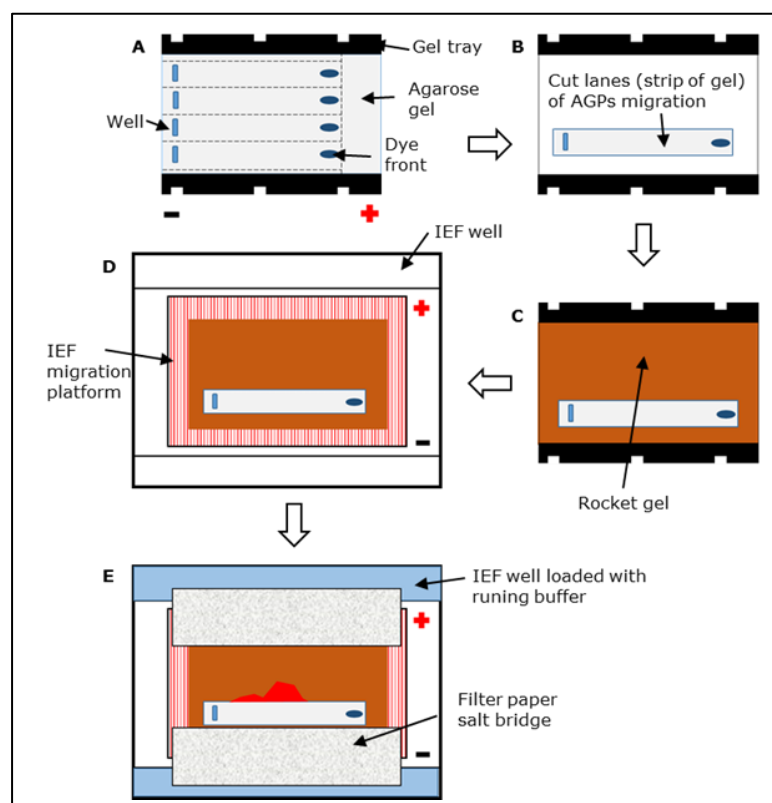


Fig. 10. Technical steps for 2D electrophoresis. (A) AGP samples are loaded on an agarose gel and left to migrate across the gel. (B) The AGP migration lane (strip of gel) is cut and placed in a gel tray (cut strips are indicated by dashed lines in A). (C) A rocket electrophoresis gel (containing β -D-GlcY) is poured into the gel tray, around the cut strip. (D) After polymerization, the gel is transferred into the IEF migration platform. (E) Load the IEF wells with running buffer 1, install the salt bridges and run the IEF electrophoresis. Red-colored precipitation areas are formed (binding of AGPs to β -D-GlcY).

+ and - : electrodes

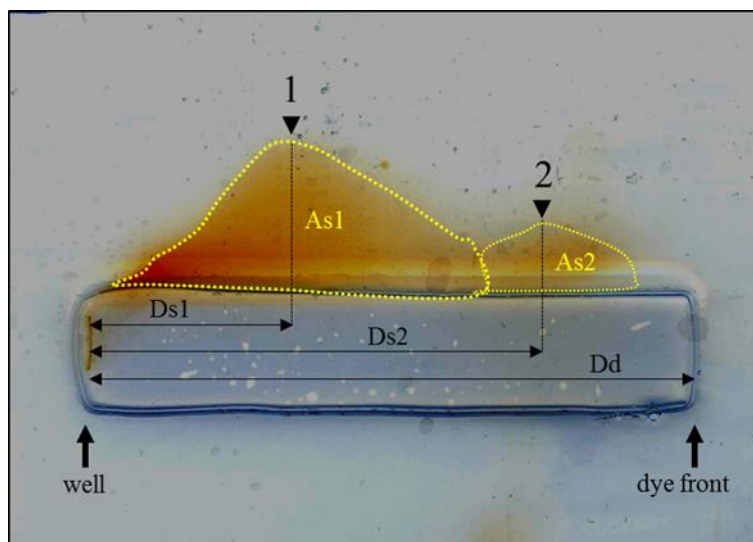


Fig. 11. Cross electrophoresis. Two dimensions profile of arabinogalactan proteins as revealed by cross electrophoresis. Two different sub-populations of AGPs (1 and 2) are indicated by black arrows.

Ds : migration distance of the sample; Dd: migration distance of the dye front.

The surface area of each sub-population is indicated by the yellow dashed line (As1 and As2).

Publication N°4: research paper**Involvement of oligogalacturonides in root-pathogen interactions in the *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pathosystem.**

B. Plancot, M. Ropitiaux, C. Plasson, Y. Manasfi, A. Driouich, M. Vicré, M-L. Follet-Gueye, A. Iyer-Pascuzzi, I. Boulogne*

Contexte et objectif :

Les maladies des plantes provoquées par les bactéries représentent un enjeu économique important. De plus, les mesures de contrôles actuellement utilisées sont inefficaces, induisent des résistances et des dégâts environnementaux irréversibles. Il est donc nécessaire d'étudier les interactions plantes-phytopathogènes, afin de trouver des méthodes de lutte alternative capables de contrôler ces pathogènes.

Bien que les racines jouent un rôle important dans les interactions plantes-sol-microorganismes, il existe peu d'études investiguant le rôle des racines dans ces relations. De plus, à ce jour, l'implication de glycomolécules, telles que les polysaccharides et les arabinogalactan-proteins (AGP), dans ces interactions plantes-bactéries pathogènes reste mal connue. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer les relations entre les produits racinaires et les bactéries en utilisant le pathosystème modèle : bactérie phytopathogène (*Pseudomonas syringae* DC3000) et sa plante hôte, *Arabidopsis thaliana* L.

Méthodes :

Lors de cette étude, nous nous sommes concentrés sur la racine et son apex en y incluant les sécrétions racinaires et les cellules apparentées aux cellules bordantes d'*A. thaliana* (BLC). La coiffe racinaire d'*A. thaliana* produit des BLC qui, contrairement aux cellules bordantes, restent attachées les unes aux autres, formant un bloc de plusieurs couches cellulaires (Driouich et al., 2007; Driouich et al. 2010). Nous avons émis l'hypothèse que les glycomolécules de la paroi végétale (pectines, homogalacturonanes (HG), xylogalacturonanes (XAG) ou AGP) de la coiffe racinaire, ses sécrétions ou les BLC pourraient jouer un rôle clé dans les interactions plantes-bactéries. Les outils utilisés pour mettre en évidence ces relations entre le pathosystème racines d'*A. thaliana*/*Pseudomonas syringae* DC3000 sont des tests de

chimiotactisme, des tests d'activité bactéricide, des mesures de croissance des plantules et la visualisation des dépôts de callose chez la souche sauvage Col-0 et le mutant *quasimodo1* (*qua-1*) dont la paroi est défectueuse en HG.

Résultats :

Les données présentées dans cet article traitent du problème fondamental de l'interaction entre les racines et les phytopathogènes et de l'attraction bactérienne par les polysaccharides de la paroi végétale. Nos résultats montrent que les homogalacturonanes et les oligogalacturonides (résultant de l'hydrolyse des HG par l'enzyme endopolygalacturonase) isolés à partir des racines d'*A. thaliana* semblent être impliqués dans l'attraction par chimiotactisme de *P. syringae* DC3000 vis à vis d'*A. thaliana*.

Conclusion :

Notre étude améliore les connaissances concernant le rôle des polysaccharides, homogalacturonnes de la paroi végétale dans la virulence de *P. syringae* au cours de l'infection chez *A. thaliana*. D'autres études démontreront si ce polysaccharide pourrait être utilisé comme méthode alternative de contrôle bactérien en attirant et en retenant les pathogènes dans un piège conçu spécifiquement pour les bactéries. Par exemple, des dispositifs Bio-Trap® pourraient être supplémentés avec des oligogalacturonides et placés dans un sol contenant des bactéries pathogènes pour les attirer et ainsi réduire leurs attaques sur les cultures.

Mots clés: *P. syringae* DC3000, chimiotactisme, phytopathologie bactérienne, homogalacturonanes, paroi végétale, immunité végétale.

Involvement of oligogalacturonides in root-pathogen interactions in the *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* pathosystem.

B. Plancot^{1§}, M. Ropitiaux^{1§}, C. Plasson¹, Y. Manasfi¹, A. Driouich¹, M. Vicré¹, M-L. Follet-Gueye¹, A. Iyer-Pascuzzi², I. Boulogne^{1*}

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire végétale, EA 4358, 76000, Rouen, France, Fédération de recherche Normandie-Végétal - FED 4277

* Submitting and Corresponding Author: e-mail isabelle.boulogne@univ-rouen.fr

§ First co-authors: Barbara Plancot and Marc Ropitiaux

Acknowledgments

The authors thank l'Université de Rouen and le Grand Réseau de Recherche VASI « Végétal, Agronomie, Sols, et Innovation », Conseil Régional de Haute Normandie for Financial support. The authors also thank Dorian Bergeau and Gaëtan Vanier for their technical help.

Abstract

Background and aims: Bacterial diseases in plants represent an important economic issue, but unsuccessful control measures may cause resistance and irreversible environmental damage. Therefore, there is a need to elucidate plant-pathogen interactions to find alternative methods for pathogen control. Although roots are considered to be important actors in plant-soil-microorganism interactions, there are few studies regarding the functional role of root components in these relations. The aim of this study is to evaluate the relationships between a bacterial pathogen (*Pseudomonas syringae* DC3000) and the roots of its plant host, *Arabidopsis thaliana*.

Methods: We compared chemotaxis, bactericidal activity, seedling growth, and callose deposition of a wild-type *Arabidopsis* line (*Col-0*) and the mutant *quasimodo1* (*qual-1*), which has been reported to be defective in homogalacturonan content of the cell wall.

Results: We found that oligogalacturonides isolated from *A. thaliana* root may be involved in the chemotactic attraction of *Pst* DC3000.

Conclusions: Our work essentially helps to improve the knowledge of interactions between *Pseudomonas syringae* and *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: *Pst* DC3000, chemotaxis, bacterial disease, homogalacturonan, cell walls, immunity.

Introduction

Plant diseases caused by bacteria are known for their important economic impact (Chakraborty and Newton 2011). Synthetic chemicals have been used, and in some cases are still recommended for use, worldwide, despite unsuccessfully reducing bacterial pests and causing resistance and irreversible environmental damage (Paoletti and Pimentel 2000). For these reasons, there is a need to elucidate plant-pathogens interactions to find alternative methods for pathogen control (Strange and Scott 2005). Elucidation of these interactions is usually studied through a bacterial point of view, and bacterial surface polysaccharides are known to be crucial in the establishment of plant-bacteria relations (D’Haeze and Holsters 2004).

There are also important economic reasons to study *Pseudomonas syringae*-plant host interactions because of an increased reappearance of old diseases caused by this pathogen, the emergence of new diseases (Mansfield et al. 2012) and outbreaks of *P. syringae* resistant to control measures such as copper and antibiotics (Kennelly et al. 2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000 (*Pst* DC3000), which causes bacterial disease of tomato, has been used as a model pathogen for investigating plant-pathogen interactions because of its pathogenicity of *Arabidopsis* leaves (Abramovitch and Martin 2004; Ishiga et al. 2011; Xin and He 2013) and roots (Bais et al. 2004, 2005, 2006). Moreover, *Arabidopsis thaliana* is a successful model plant for studying plant and pathogen interactions (Kliebenstein 2004). *Arabidopsis* roots infected with *P. syringae* DC3000 become necrotic and plant mortality occurs 7 days post-inoculation (Bais et al. 2004).

In an infection process, *Pseudomonas* species are capable of detecting chemical gradients in the environment and swim toward or away from them (Liu et al. 2009). This process, known as chemotaxis, involves the recognition of strong chemoattractants such as citrate, succinate and malate (Cuppels 1988; Li et al. 1998; Aizawa et al. 2000; Weert et al. 2002). Chemotaxis is thus thought to be essential in most plant-bacteria interactions (Brencic and Winans 2005).

The chemical composition of root exudates holds a central position in regulating the microbial community and ecology of the rhizosphere (Philippot et al. 2013). In particular, the extracellular environment at the root apex consists of a mucilaginous material enriched in cell wall molecules such as polysaccharides and glycoproteins. The root slime is particularly involved in the molecular dialogues between plants and soil-borne microorganisms (Durand et al. 2009; Cannesan et al. 2012; Koroney et al. 2016). This very special area surrounding the root cap is termed “RET” for root extracellular trap analogous to the “NET” neutrophil extracellular trap in mammals (Driouich et al. 2013). It is speculated that the RET forms a “border cell biofilm” enriched in anti-microbial molecules acting in synergy to protect the root against aggression by pathogens. Plant extracellular matrix and root cells contain high molecular weight glycomolecules including homogalacturonan (HG), xylogalacturonan (XAG) and arabinogalactan-proteins (AGP) (Durand et al. 2009; Nguema-Ona et al. 2013). Recent evidence has highlighted the involvement of AGP in plant-microbe interactions and root protection (Cannesan et al. 2012; Xie et al. 2011, 2012). The presence of phytoalexins, extra-cellular DNA and proteins, including chitinase and glucanase, has also been reported as part of the anti-microbial machinery of root exudates (Wen et al. 2007, 2009; Driouich et al. 2013). Concerted effects of root border cells and their exudates also act as repellents or decoys protecting the root tip against attacks by soil-borne pathogens (Cannesan et al. 2012; Baetz and Martinoia 2014). Moreover, plant polysaccharides induced plant-rhizobacteria interactions (Beauregard et al. 2013). As a consequence, glycomolecules, root exudates and border cells appear to be key components in root protection and contribute to maintaining the health of the whole plant.

To date, involvement of glycomolecules, *e.g.*, polysaccharides and AGP, from root in plant-interactions with pathogenic bacteria remains poorly understood. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationships between root products and bacteria using the *A. thaliana* – *Pst* DC3000 model pathosystem described by Bais et al. (2004). We focused on the root and root apex including the secretions and border-like cells of *A. thaliana*. The root cap of *A. thaliana* produces border-like cells (BLC) that, unlike border cells, remain attached to each other, forming a block of several cell layers (Vicré et al. 2005; Driouich et al. 2007; Driouich et al. 2010). We hypothesized that cell wall glycomolecules (pectin, HG, XGA or AGP) of the root cap, root cap secretions and border-like cells might play a key role in plant-bacterial interactions. To test this, we performed different assays including chemotaxis, bactericidal activity, seedling growth, and callose deposition and used *Arabidopsis* wild-type (*Col-0*) and the mutant *quasimodo 1* (*qua1-1*).

Materials and methods

Plant Growth Conditions

Seeds used were the wild-type (*Arabidopsis* eco-type Columbia, namely *Col-0*) and the mutant *quasimodo1* (SALK_039214, namely *qua1-1*) of *Arabidopsis thaliana* obtained from the Salk Institute. *Arabidopsis* plants (*Col-0* and *qua1-1*) were grown for 12 days, vertically orientated in square petri dishes containing *Arabidopsis* Duchefa agar medium in controlled environmental growth chambers at 22°C in 72% relative humidity under light for 18 h/day.

Bacterial Growth Conditions

For all experiments, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst* DC3000) was precultured overnight and cultured 5 hours in LB liquid medium in an incubator at 27°C. Prior to inoculation, bactericidal or chemotaxis assays, bacteria were washed 3 times and suspended in sterile physiological saline solution.

Effect of DC3000 inoculation on seedlings

Seeds of *A. thaliana* wild-type (*Col-0*) were grown ten days after which roots were infiltrated with 5000 CFU/mL or 5.10^8 CFU/mL of *Pst* DC3000 culture. Inoculated seedlings and control seedlings (infiltrated with sterile physiological saline solution without bacteria) were measured after 48 hours. Each condition was replicated 4 times with 25 seedlings. Images of seedlings were obtained with a desktop scanner and their height was measured with Mesurim® software.

Bright field images of roots and rosettes of seedling (wild-type *Col-0*) were made in order to follow symptoms of infection with DC3000. Laser confocal images were made in order to follow the particular target of DC3000 in the root with a GFP strain.

Callose deposition assay

Callose deposition assay was performed using aniline blue staining (Plancot et al. 2013). Ten days old *A. thaliana* wild-type (*Col-0*) and mutant (*qual-1*) were infiltrated at each root apex with 10 μ L of *Pst* DC3000 culture at 5000 CFU/mL. Controls were infiltrated with sterile physiological saline solution without bacteria. This was performed in 25 seedlings, and 6 roots from each seedling were chosen for the callose assay. Samples were fixed in 3:1 ethanol:acetic acid solution for 2 hours. Roots were then rinsed and rehydrated in 70% ethanol for 2 h, 50% ethanol for an additional 2 h, 25% ethanol for an additional 2 h, and water overnight. Decolorization was performed with 10% NaOH at 37°C for 4 h. Roots were rinsed 3 times with water and then incubated overnight in darkness in 0.1% aniline blue dissolved in 150 mM potassium phosphate dibasic, pH 11. Callose deposits were captured with a laser-scanning confocal microscope, Leica TCS SP2 AOBS (excitation light from a 405 nm UV argon laser). Quantification of the callose in 3 sections of each root was performed by counting the number of deposits with Mesurim[®] software normalized to the number of callose deposits/mm of root.

Plant extracts

Roots of *Arabidopsis* seedlings were collected and crushed with a pestle in sterile *Arabidopsis* Duchefa liquid medium (25 seedlings/mL of medium).

Border-like cells of *Col-0* and mucilage of *qual-1* were aseptically removed from the root tip of seedlings by shaking in *Arabidopsis* Duchefa liquid medium (25 seedlings/mL of medium).

Root exudates were collected from seedlings after 2 weeks of growth in *Arabidopsis* Duchefa liquid medium and 1 week in sterile distilled water. Samples were then gently dried at 30°C and diluted with sterile water to a 10X concentration.

Pectins were extracted from entire plants and roots of wild-type *Col-0*. Plant material was crushed in 70% ethanol and incubated for 3 hours at 70°C. Fractions were separated by centrifugation at 4500 g for 10 minutes. The slurry was rinsed three times with 70% ethanol and incubated for 3 hours at 70°C. It was then resuspended in methanol:chloroform (v:v) and left under agitation overnight at 4°C. Fractions were separated by centrifugation at 4500 g for 15 minutes. Acetone (100%) was added to the slurry and it was left under agitation overnight at 4°C. The slurry was dried to obtain the alcohol insoluble residue (AIR). Water was added to this residue and left at 90°C for 1 hour. Fractions were separated by centrifugation at 4000 g for 10 minutes. The two preceding steps were repeated 3 times and the supernatant, containing RGI, RGII and HG, was freeze dried.

Homogalacturonans were isolated using 200 mg pectin-enriched fraction of wild-type *Col-0* roots. Samples were de-esterified by 0.1 M NaOH under agitation overnight at 4°C. Samples were digested with the enzyme endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* (10 units; Megazyme) overnight at 30°C. This endopolygalacturonase treatment is known to cleave the HG regions releasing a fraction containing fragments of homogalacturonan called oligogalacturonides (Ralet and Thibault 1994; Yapo et al 2007; Voxeur et al 2011). Fractions were separated by centrifugation and supernatants were digested with α -amylase from porcine pancreas (20 units; Megazyme) overnight at 40°C. Fractions were separated by centrifugation and supernatants were dialyzed (3.5-KDa dialysis tubing) against distilled water. Dialyzed samples were freeze-dried. RG-I, RG-II and the endopolygalacturonase-solubilized material were separated by size exclusion chromatography using a Superdex 75 column HR 10/30 column (Amersham

Biosciences) with 50mM ammonium formate buffer with a flow rate of 0.1 ml/min and detected with refractive index detector (Shodex-R171) (Supplemental data 1).

Chemotaxis bioassay

Chemotaxis was examined by using the Chemical Gradient Motility Agar (CGMA) method (Bharali et al. 2013). LB motility agar medium was prepared with 0.7% agar. Three long, equal and parallel rectangular wells were made in Petri dishes containing this LB medium. Volumes of 250 μ L of test solution were loaded in a well to one side of the dish and 100 μ g/mL kanamycin was loaded in the well on the other side. Petri dishes with these contents were incubated 1 hour at 27°C. Bacterial cultures, in broth, were then placed in the central well. The results were recorded after 72 hours at 27°C. Glucose, citrus pectin, and galacturonic acid at 1% w/v were used as positive controls. Sterile water, liquid *Arabidopsis* medium, ruthenium red at 0.05%, calcofluor reagent at 40 μ g/mL and beta D-glucosyl yariv reagent at 10 μ M and 200 μ M were used as negative controls. Each condition was replicated six times. Images of dishes were obtained with a desktop scanner. The distance traveled by the bacterial growth front (distance up to which bacterial growth front went) was measured with Mesurim ® software.

Bactericidal bioassay

An agar well diffusion method was used for screening antibacterial activity (Iscan et al. 2002; Boyanova et al. 2005). *Pst* DC3000 inocula (1 mL at 5×10^8 CFU/mL/100 mL of medium) were placed in LB agar medium 10 g/L at 45°C and were plated onto Petri dishes. Using a sterile borer, 5-mm diameter wells were punched in agar medium, which contained bacteria. Each well was filled with 50 μ L of the solutions to be tested. Petri dishes were incubated at 27°C for 72 hours. Kanamycin at 100 μ g/mL was used as the standard antibacterial agent, and sterile water was used as the negative control. The results were recorded after 72 hours at 27°C. Each condition was replicated 10 times. Images of dishes were obtained with a desktop scanner and inhibition of bacterial growth was measured with Mesurim ® software.

Data Analysis

All data presented are the mean values of at least six replicates, and the data have been presented as the means with standard error of the mean. The data were analyzed by non-parametric analysis using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test and Bonferroni correction. Treatments without common superscript letters (a,b,c,d,e) differ significantly based on the statistical test. All analyses were performed using XLSTAT® software.

Results

Effect of Pst DC3000 inoculation on wild-type seedling growth

To investigate the effect of *Pst* DC 3000 on *Arabidopsis* growth, seedlings were inoculated with 5000 CFU/mL or 5.10^8 CFU/mL of bacterial culture and seedling length was measured. Inoculation with 5000 CFU/mL of bacterial

culture did not influence seedling growth. In contrast, inoculation with 5.10^8 CFU/mL caused a slight but significant inhibition of growth as supported by statistical non-parametric test based on all samples (Kruskal-Wallis, p-value < 0.0001) (Figure 1). Moreover, symptoms of infection were visible on both leaves (Figure 2) and roots (Figure 3). Indeed, a purplish color, likely to be due to anthocyanin accumulation, was clearly seen on the leaves of inoculated seedlings after four days post-infection (Figure 2 F-H). As for roots, the major symptom observed was the presence of longer root hairs (Figure 3D). It is also worth to note the formation of a bacterial biofilm surrounding the root tip after only 2 days of inoculation (Figure 3B). No other significant symptom after 12 days of infection on roots (data not shown).

Callose deposition in inoculated roots

As callose is widely used as a cellular marker of plant defense response, we have checked for callose deposition in the presence or absence of *Pst* DC3000 by staining roots with aniline blue. As illustrated in Figure 4 (at the top), callose deposition was clearly detected in inoculated root cells (C-D), but not in non-inoculated ones (A-B). Callose deposits were then quantified in inoculated roots and shown to be 270 (+/-80) by mm of root (Figure 4, below part). This data demonstrate that root cells are able to produce callose in response to the bacteria *Pst* DC3000.

Accumulation of Pst DC3000 on border-like cells

To locate the particular target zone of the bacteria in the root, we inoculated root with a GFP-expressing bacterial strain (*Pst* DC3000-GFP) at a concentration of 5.10^8 CFU/mL close to wild-type root. Interestingly, GFP-tagged bacteria accumulated in the border-like cells area of the root tip (Figure 5) and also observed all along the root (data not shown).

Chemotactic response of Pst DC3000

We thus wanted to know if the bacteria *Pst* DC3000 was attracted by the root tip and its products, and, if so, which cell wall molecules were involved. This was investigated using a chemotaxis assay.

The chemotaxis data showed that *Pst* DC3000 exhibited a strong chemotaxis toward border-like cells and crushed root of *Arabidopsis* (Figure 6). In contrast, the bacteria showed a lower chemotaxis toward root exudates, glucose 1%, *Arabidopsis* culture medium, sterile water or kanamycin.

In an attempt to identify cell wall molecules from border-like cells and root responsible for chemotaxis activity, we used a variety of substances including ruthenium red (a pectin-inhibiting agent known to bind polygalacturonic acid), calcofluor (a dye that binds to β -glucans such as cellulose), β -D-glucosyl Yariv (a reagent that binds and disrupts arabinogalactan-proteins), commercial citrus pectin, the monosaccharide D-galacturonic acid and native cell wall polymers (pectin and oligogalacturonides) isolated from *A. thaliana* seedlings (Figure 7). When β -D-glucosyl Yariv (10 and 200 μ M) and calcofluor (40 μ g/mL) were added to *Arabidopsis* crushed root, there was no alteration of *Pst* DC3000 chemotaxis. In contrast, a lower chemotactic response was observed when crushed roots were associated with ruthenium red. The presence of the commercial citrus pectin and the monosaccharide D-galacturonic acid failed to attract *Pst* DC3000. Similarly, pectins isolated from the entire plant or root tissues failed to attract the bacteria. In contrast *Pst* DC3000 were strongly attracted by an oligogalacturonide isolated from *Arabidopsis* seedlings at a concentration of 1%

but exhibited a lower chemotactic response when oligogalacturonides were used at 0.25%. These data suggest that homogalacturonan and oligogalacturonides are required for chemotaxis.

To confirm the importance of these pectic molecules in the chemotactic activity, we examined the attraction of *Pst* DC3000 to roots, root border-like cells and root exudates from the *quasimodo1* (*qua1-1*) mutant. The *qua1-1* is a pectin-mutant that has a 25% reduction in galacturonic acid and a lower amount of oligogalacturonans released compared to the wild type (Bouton et al. 2002; Leboeuf et al. 2005). As shown in figure 8, root exudates, border-like cells and crushed roots of the *qua1-1* mutant had lower chemotactic effect towards the bacteria unlike crushed root and border-like cells of the wild-type (*Col-0*).

Effect on bacterial growth

To examine whether the low chemotactic response observed when using the *qua 1* mutant is due to a bactericidal effect, we performed bactericidal assays with root exudates, crushed root and root border-like cells of the mutant (*qua1-1*) and wild-type (*Col-0*). Border-like cells, crushed root and exudates of wild-type (*Col-0*) and mutant (*qua1-1*) did not show any inhibition of bacterial growth compared to kanamycin control (Supplemental data 2).

Effect of Pst DC3000 inoculation on growth of the qua1-1 mutant

As performed for wild-type plants (see above), we also examined the effect of the bacteria *Pst* DC3000 on the growth of the *qua1-1* mutant. We also checked for the occurrence of symptoms and callose deposits in the *qua 1-1* root cells. In these experiments, roots of the mutant were inoculated with a bacterial culture at a concentration of 5000 CFU/mL and 5.10^8 CFU/mL. We first observed a strong accumulation of bacteria over border-like cells as revealed by GFP fluorescence (Supplemental data 3.3) and all along the root (data not shown). In infected plants, symptoms of infection were also visible on both leaves and roots (Supplemental data 3.4 et 3.5). However, *Pst* DC3000 inoculation did not seem to influence seedling growth of wild-type (Supplemental data 3.1). Moreover, surprisingly, no callose deposits were detected in infected and non-infected roots of mutant plants (Supplemental data 3.2).

Discussion

We first investigated the response of *Arabidopsis* plants to root inoculation with *Pst* DC3000. We found that root infection with the bacteria induced a slight but a significant reduction in seedling growth only after 2 days. Symptoms of infection were also visible on both leaves and roots. This is in contrast to *qua 1-1* mutant that, under similar conditions, did not show any reduction of growth while the symptoms of infection were visible on both leaves and roots. In addition, under the same conditions, callose deposition was clearly stimulated in infected roots of wild-type plants but not in the *qua1-1* mutant. Thus it seems that alteration of cell wall pectins does impact the early response of the plant to bacterial infection. Therefore, it is possible that the interaction of the bacteria with the cell wall is altered in the *qua1-1* mutant thus limiting the colonization of the root and retarding the response of the plant to infection. Nevertheless, modification of

other events involved in the defense response pathway of the *qua 1-1* mutant (e.g., perception of the bacterial signals, transduction of the signal, gene activation, ...) cannot be excluded.

We then investigated the role of the root extracts, root exudates and root border-like cells of *A. thaliana* on the chemotropic behavior of *Pst* DC3000. Isolated root border-like cells of wild-type exhibited a high chemotactic response of the bacteria similar to that observed with whole roots. Previous studies already showed that root border cells develop a dense mucilage that border cells are capable of attracting or repelling pathogenic microorganisms including bacteria (Hawes et al. 2000; Driouich et al. 2013) or oomycetes (Goldberg et al. 1989; Cannesan et al. 2011; Curlango-Rivera and Hawes 2011).

In contrast, root exudates from *A. thaliana* do not have a significant effect on *Pst* DC3000 chemotaxis. Root exudates of *A. thaliana* contain phytochemicals including carbohydrates, amino acids and secondary metabolites, the composition of which varies according to the developmental stage of the plant (Loyola-Vargas et al. 2007; Badri et al. 2008; Chaparro et al. 2013). However, we previously found that root tips from 10-15 day-old *A. thaliana* seedlings do not produce large amounts of mucilage compared to other plant species, such as *Pisum sativum* (Vicré et al. 2005; Durand et al. 2009; Cannesan et al. 2012). As a consequence, in our experimental conditions, root exudates might be too diluted and/or not efficient enough to induce *Pst* DC3000 chemotaxis on its own.

Some chemical compounds released by plants seemed to play a role in *P. syringae* strain-host interactions. Ethylene (Kim et al. 2007), succinic acid, malic acid and citric acid (Cuppels 1988) have been shown to induce positive chemotaxis, but no studies have dealt with chemotaxis toward homogalacturonan or oligogalacturonides. However, in our study we have shown that when crushed root or root border-like cells of the wild-type were incubated with ruthenium red chemotactic attraction of *Pst* DC3000 was significantly abolished. Moreover *Pst* DC3000 was strongly attracted by isolated oligogalacturonides (1%) from Arabidopsis and both crushed root and border-like cells from the mutant (*qua1*) exhibited a reduced capacity to attract *Pst* DC3000 compared to the wild type. As is generally known, the hexavalent cationic dye ruthenium red is known to bind to anionic sites of glycoconjugates mainly located at the cell surface (El-Saggan and Uhrík 2002). In plants, ruthenium red is known to bind acidic pectin and used as a pectin stain (Sterling 1970). Pectins are complex polysaccharides of the cell wall consisting of four major classes including homogalacturonan, rhamnogalacturonan-I and rhamnogalacturonan-II and xylogalacturonan (Ridley et al. 2001). Homogalacturonans (HG) are defined as linear homopolymers composed of (1→4) linked α -D-galacturonic acid residues (GalA) in which some carboxyl groups are methyl-esterified (Morris et al. 2013). Partial degradation of HG by the endopolygalacturonase enzyme generate oligogalacturonides (oligomers of alpha-1,4-linked galacturonosyl residues (Ralet and Thibault 1994; Yapo et al 2007; Voxeur et al 2011). The mutant (*qua1*) reported to show a 25% reduction in galacturonic acid content (Bouton et al. 2002; Leboeuf et al. 2005) and a lower amount of oligogalacturonans compared to the wild type after endopolygalacturonase treatment (Bouton et al. 2002). This mutant was also shown to have altered cell wall homogalacturonan content in its roots resulting in disruption of border-like cell organization and adhesion (Durand et al. 2009). Altogether, these observations provide clear evidence that oligogalacturonides and HG released by Arabidopsis root cells influence *Pst DC3000* motility towards the root. Thus pectins appear as important elements in modulating bacterial motility and chemotaxis in Arabidopsis. In a previous study on pea, we have shown that root arabinogalactan-proteins, but not pectins, were also able to impact the movement of a root-borne pathogenic oomycete, namely *A.*

euteiches (Cannesan et al. 2012). Interestingly, and in contrast to the effect of AGP on *A. euteiches*, Arabidopsis root pectins have impact on motility of the bacteria *Pst DC3000* at least under our experimental conditions. Whether this differential effect between AGP and pectin do occur on other types of pathogens related to other plant species would be interesting to explore. The structural features of these two cell wall polymers are different (Ridley et al. 2001; Nguema-Ona et al. 2013) and are likely to impact their biological activity with respect to root-microbe relationship. For instance, a variation in pectin structure has been shown to be correlated with fungus resistance (towards *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in wheat (Wiethölter et al. 2003). Analysis of the cell wall composition from resistant and susceptible wheat lines revealed a more blockwise distribution of methyl esters on the homogalacturonan of susceptible wheat cultivars compared with resistant lines (Wiethölter et al. 2003; Vorwerk et al. 2004). Another study indicated that oomycete species produce extracellular endopolygalacturonase that hydrolyzes the homogalacturonan backbone of pectin in plants (Latijnhouwers et al. 2003). Different strains of *P. syringae* also secrete pectolytic enzymes, such as polygalacturonase, which may be involved in the infection process (Magro et al. 1994). The fact that *qual* shows alterations in homogalacturonan cell wall content (Leboeuf et al. 2005) and that pectin structural variations impact cell adhesion (Bouton et al. 2002; Leboeuf et al. 2005) could explain our results. Extracellular *Pst DC3000* polygalacturonase had fewer sites of hydrolysis in mutant (*qual*) compared with wild-type (*Col-0*). Moreover, we can hypothesize that it is detection of homogalacturonan gradients around root tissue by bacterial chemoreceptors that induced *Pst DC3000* to swim toward *Arabidopsis* roots. The same process probably occurred in the border-like cells of the root tip. This observation is in agreement with a previous studies showing homogalacturonan as a major component of root border-like cells walls (Vicré et al. 2005) and its substantial loss in *qual* root cells (Durand et al. 2009). In addition, the fact that DC3000 was strongly attracted by oligogalacturonides (at 1%) isolated from *A. thaliana* but exhibited a lower chemotaxis at 0.25% (figure 2) indicates that the response of the bacteria toward these molecules is dose-dependent.

Conclusions

The data presented in this paper address a fundamental issue on root-microbe interaction related to bacterial attraction by cell wall polysaccharides. Our findings show that HG and oligogalacturonides (resulting from HG hydrolysis by the enzyme endopolygalacturonase) from *A. thaliana* roots are involved in the chemotactic attraction of the bacteria *Pst DC3000*. It is of interest to explore further the impact of structural differences of HG and other pectic polysaccharides from different plant species on the relationship between root and microbes. Clearly, the present study adds to our understanding of the role of the cell wall polysaccharide HG in the virulence of *Pseudomonas syringae* during *Arabidopsis thaliana* infection. Further studies will demonstrate if this polysaccharide could be used to find alternative methods of bacterial control by attracting and retaining pathogens in a trap designed specifically for bacteria. For example, Bio-Trap® Samplers might be “baited” with oligogalacturonides and placed in soil containing pathogenic bacteria to attract them and thus reduce their attacks on crops.

References

Abramovitch, R.B., Martin, G.B (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses.

Current Opinion in Plant Biology 7, 356-364.

- Aizawa, S-I., Harwood, C.S., Kadner, R.J. (2000). Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *Journal of Bacteriology* 182, 1459-1471.
- Baetz, U., Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* 19, 90- 98.
- Badri, D.V., Loyola-Vargas, V.M., Broeckling, C.D., De-la-Peña, C., Jasinski, M., Santelia, D., Martinoia, E., Sumner, L.W., Banta, L.M., Stermitz, F., Vivanco, J.M. (2008). Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiology* 146, 762-771.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiology* 134, 307-319.
- Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., Vivanco, J.M. (2005). Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434, 217-221.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233–266.
- Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 1621-1630.
- Bharali, P., Saikia, J.P., Ray, A., Konwar, B.K. (2013). Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: A novel chemotaxis and antibacterial agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103, 502- 509.
- Bhardwaj, V., Meier, S., Petersen, L.N., Ingle, R.A., Roden, L.C. (2011). Defence Responses of *Arabidopsis thaliana* to Infection by *Pseudomonas syringae* Are Regulated by the Circadian Clock. *PLoS One* 6, e26968.
- Bouton, S; (2002). QUASIMODO1 Encodes a Putative Membrane-Bound Glycosyltransferase Required for Normal Pectin Synthesis and Cell Adhesion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 14, 2577-2590.
- Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R. et al. (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter* *Microbiology* 54, 481–483.
- Brencic, A., Winans, S.C. (2005). Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69, 155-194.

- Cannesan, M.A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., Laval, K., Follet-Gueye, M.-L., Driouich, A., Vicié-Gibouin, M. (2012). Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiology* 159, 1658-1670.
- Cannesan, M.A., Gangneux, C., Lanoue, A., Giron, D., Laval, K., Hawes, M., Vicié-Gibouin, M. (2011). Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of botany* 108, 459-469.
- Chakraborty, S., Newton, A.C. (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60, 2-14.
- Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PloS One* 8, 55731.
- Cuppels, D.A. (1988). Chemotaxis by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 629-632.
- Curlango-Rivera, G., Hawes, M.C. (2011). Root tips moving through soil: an intrinsic vulnerability. *Plant signaling & behavior* 6, 726-727.
- D'Haese, W., Holsters, M. (2004). Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in Microbiology* 12, 555-561.
- Driouich, A., Durand, C., Vicié-Gibouin, M. (2007). Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* 12, 14-19.
- Driouich, A., Durand, C., Cannesan, M.-A., Percoco, G., Vicié-Gibouin, M. (2010). Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of Experimental Botany* 61, 3827-3831.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.L., Vicié-Gibouin, M., Hawes, M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 489-495.
- Durand, C., Vicié-Gibouin, M., Follet-Gueye, M.L., Duponchel, L., Moreau, M., Lerouge, P., Driouich, A. (2009). The organization pattern of root border-like cells of *Arabidopsis* is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiology* 150, 1411-1421.

- El-Saggan, A.H., Uhrík, B. (2002). Improved staining of negative binding sites with ruthenium red on cryosections of frozen cells. *General physiology and biophysics* 21, 457-462.
- Goldberg, N.P., Hawes, M.C., Stanghellini, M.E. (1989). Specific attraction to and infection of cotton root cap cells by zoospores of *Pythium dissotocum*. *Canadian Journal of Botany* 67, 1760-1767.
- Hawes, M.C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., Zhao, X. (2000). The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* 5, 128-133.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Hüsnü, C.B., Demirci, F. (2002). Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3943-3946.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Uppalapati, S.R., Mysore, K.S. (2011). Arabidopsis seedling flood-inoculation technique: a rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. *Plant Methods* 7, 32.
- Kennelly, M.M., Cazorla, F.M., de Vicente, A., Ramos, C., Sundin, G.W. (2007). *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Disease* 91, 4-17.
- Kim, H.-E., Shitashiro, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., Kato, J. (2007). Ethylene chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species. *Microbes and Environments* 22, 186-189.
- Kliebenstein, D. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell & Environment* 27, 675-684.
- Koroney, A.S., Plasson, C., Pawlak, B., Sidikou, R., Driouich, A., Menu-Bouaouiche, L., Vicré-Gibouin, M. (2016). Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Annals of Botany* 118, 797-808.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P.J.G.M., Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology* 11, 462-469.
- Leboeuf, E. (2005). Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of Arabidopsis mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. *Journal of Experimental Botany* 56, 3171-3182.
- Li, X.Z., Starratt, A.N., Cuppels, D.A. (1998). Identification of tomato leaf factors that activate toxin gene expression in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Phytopathology* 88, 1094-1100.

- Liu, X., Wood, P.L., Parales, J.V., Parales, R.E. (2009). Chemotaxis to Pyrimidines and Identification a Cytosine Chemoreceptor in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 191, 2909-2916.
- Loyola-Vargas, V.M., Broeckling, C.D., Badri, D., Vivanco, J.M. (2007). Effect of transporters on the secretion of phytochemicals by the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 301-310.
- Magro, P., Varvaro, L., Chilosi, G., Avanzo, C., Balestra, G.M. (1994). Pectolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS microbiology letters* 117, 1-5.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I.A.N., Salmond, G., Foster, G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 614-629.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., Ausubel, F.M. (2010). Innate Immune Responses Activated in Arabidopsis Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell Online* 22, 973-990.
- Morris, V.J., Belshaw, N.J., Waldron, K.W., Maxwell, E.G. (2013). The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1, 21-37.
- Nguema-Ona, E., Vitré-Gibouin, M., Cannesan, M.A., Driouich, A. (2013). Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends in Plant Science* 18, 440-449.
- Paoletti, M., Pimentel, D. (2000). Environmental Risks of Pesticides Versus Genetic Engineering for Agricultural Pest Control. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 12, 279-303.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11, 789-799.
- Plancot, B., Santaella, C., Jaber, R., Kiefer-Meyer, M. C., Follet-Gueye, M. L., Leprince, J., Gattin, I., Souc, C., Driouich, A., Vitré-Gibouin, M. (2013). Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology* 163, 1584-1597.
- Ralet, M. C., Thibault, J. F. (1994). Extraction and characterisation of very highly methylated pectins from lemon cell walls. *Carbohydrate Research* 260, 283-296.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.

- Scheible, W.R., Pauly, M. (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current opinion in plant biology* 7, 285-295.
- Sterling, C. (1970). Crystal-structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectic stain. *American Journal of Botany* 172-175.
- Strange, R.N., Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Phytopathology* 43.
- Vicré, M., Santaella, C., Blanchet, S., Gateau, A., Driouich, A. (2005). Root Border-Like Cells of Arabidopsis. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiology* 138, 998-1008.
- Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* 9, 203–209.
- Voxeur, A., Gilbert, L., Rihouey, C., Driouich, A., Rothan, C., Baldet, P., Lerouge, P. (2011). Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato. *Journal of Biological Chemistry* 286, 8014-8020.
- Wen, F., VanEtten, H.D., Tsapralis, G., Hawes, M.C. (2007). Extracellular proteins in *Pisum sativum* L. root tip and border cell exudates. *Plant Physiology* 143, 773-783.
- Wen, F., White, G.A., Xiong, Z., VanEtten, H.D., Hawes, M.C. (2009). Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiology* 151, 820-829.
- Wiethölter, N., Graebner, B., Mierau, M., Mort, A.J., Moerschbacher, B.M. (2003). Differences in the Methyl Ester Distribution of Homogalacturonans from Near-Isogenic Wheat Lines Resistant and Susceptible to the Wheat Stem Rust Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 945-952.
- Xin, X.F., He, S.Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology* 51, 473-498.
- Xie, D., Ma, L., Šamaj, J., Xu, C. (2011). Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. Benincasae infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Reports* 30, 1555-1569.

Xie, F., Williams, A., Edwards, A., Downie, J.A. (2012). A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 25, 250-258.

Yapo, B.M., Lerouge, P., Thibault, J-F., Ralet, M-C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers* 69, 426-435.

Figure legends

Figure 1: Height of *Arabidopsis* seedlings of wild-type (*Col-0*) after 48 hours of inoculation of roots with 5000 or 5.10^8 CFU/mL of *Pst* DC3000 culture. Treatments without common superscript letters (a, b) differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean

Figure 2: Bright field image of *Arabidopsis* rosette of wild-type (*Col-0*) non-inoculated (A, E, I, M) and inoculated plants with *Pst* DC3000 (B, F, J, N). Arrowheads indicate a color change on the leaves of inoculated seedling. Note the presence of anthocyanin on the rosette of inoculated seedlings (F, J, N). Bars= 2mm

Figure 3: Bright field image of *Arabidopsis* roots from wild-type (*Col-0*) non-inoculated (A, E) and inoculated plants with *Pst* DC3000 (B, F). Note the presence of biofilm around the root and long root hairs on inoculated seedlings (F). Bars= 200 μ m

Figure 4: At the top, number of callose deposits/mm of root after 48 hours of inoculation of roots (wild-type *Col-0*) with 5000 CFU/mL of *Pst* DC3000 culture. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean.

Below, confocal microscopy of callose deposition 48 hours after inoculation of roots with 5000 CFU/mL of *Pst* DC3000 culture of wild-type (*Col-0*) stained with aniline blue. E, F: *Col-0* non-inoculated and G, H: inoculated. BLC, border-like cells; R, root; RC, root cap. Bars= 80 μ m (A-H).

Figure 5: Laser confocal scanning microscopy showing the root cap and border-like cells colonized by *Pst* DC3000-GFP (green color) on wild-type (*Col-0*). The root tip is stained with calcofluor (the red color). BLC, border-like cells; RC, root cap. Bars=20 μ m.

Figure 6: Chemotaxis assay. Distance reached by bacterial front of *Pst* DC3000 for border-like cells (BLC), crushed root and exudates of wild-type (*Col-0*) measured with Mesurim® software. Treatments without common superscript letters (a, b, c) differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test and Bonferroni correction. Bars represent means, and error bars represent standard error of the mean.

Figure 7: Chemotaxis assay. Distance reached by bacterial front of *Pst* DC3000 for crushed root of wild-type (*Col-0*) with yariv, ruthenium red and calcofluor, oligogalacturonides and pectin of wild-type (*Col-0*), citrus pectin, galacturonic acid and crushed root of wild-type (*Col-0*), measured with Mesurim® software. Treatments without common superscript letters (a, b, c, d, e) differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test and Bonferroni correction. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean.

Figure 8: Chemotaxis assay. Distance reached by bacterial front of *Pst* DC3000 for border-like cells (BLC), crushed root and root exudates of wild-type (*Col-0*) measured with Mesurim® software. Treatments without common superscript letters (a, b, c, d) differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test and Bonferroni correction. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean.

Supplemental data 1: Size exclusion chromatography (SEC) of a pectin-enriched fraction isolated from *Arabidopsis thaliana* wild-type (*Col-0*) roots. RG-I : rhamnogalacturonan I ; d-RG-II : RG-II dimer ; mRG-II : RG-II monomer ; OGAs : oligogalacturonides.

Supplemental data 2: At the top, diameter of the *Pst* DC3000 inhibition in mm for BLC, crushed root and root exudates of wild-type (*Col-0*) and mutant (*qua1-1*) and kanamycin 100 µg/mL, measured with Mesurim® software. Treatments without common superscript letters (a,b) differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test and Bonferroni correction. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean. Below, example of result obtained where only kanamycin showed inhibition on bacterial growth.

Supplemental data 3:

3.1 Height of *Arabidopsis* seedlings of mutant (*qua1*) after 48 hours of inoculation of roots with 5000 or 5.108 CFU/mL of *Pst* DC3000 culture. Treatments with common superscript letters (a) do not differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean.

3.2 Confocal microscopy of callose deposition 48 hours after inoculation of roots with 5000 CFU/mL of *Pst* DC3000 culture of mutant (*qua1*) stained with aniline blue. A, B: *qua1* control and C, D: *qua1* inoculated. BLC, border-like cells; R, root; RC, root cap. Bars= 80 µm (A-D).

3.3 Laser confocal scanning microscopy showing the root tip and border-like cells colonized by Pst DC3000-GFP (green color) on mutant (qua1). The root tip is stained with calcofluor (the red color). BLC, border-like cells; R, root. Bars=20 μm .

3.4 Bright field image of Arabidopsis rosette mutant (qua1) controls (A, C, E, G) and inoculated with Pst DC3000 (B, D, F, H). Arrowheads indicate a color change on the leaves of inoculated seedling. Note the presence of anthocyanin on the rosette of inoculated seedlings (D, F, H). Bars= 2mm

3.5 Bright field image of Arabidopsis roots from mutant (qua1) controls (A, C) and inoculated with *Pseudomonas syringae* (B, D). Note the presence of biofilm around the root and long root hairs on inoculated seedlings (B, D). Bars= 200 μm

Figure 1:

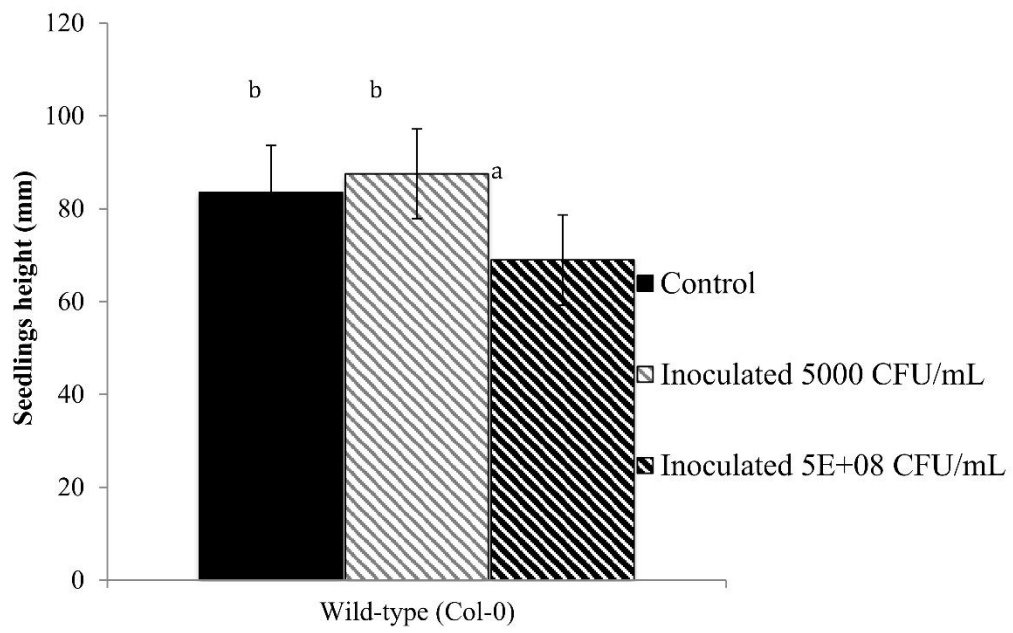


Figure 2:

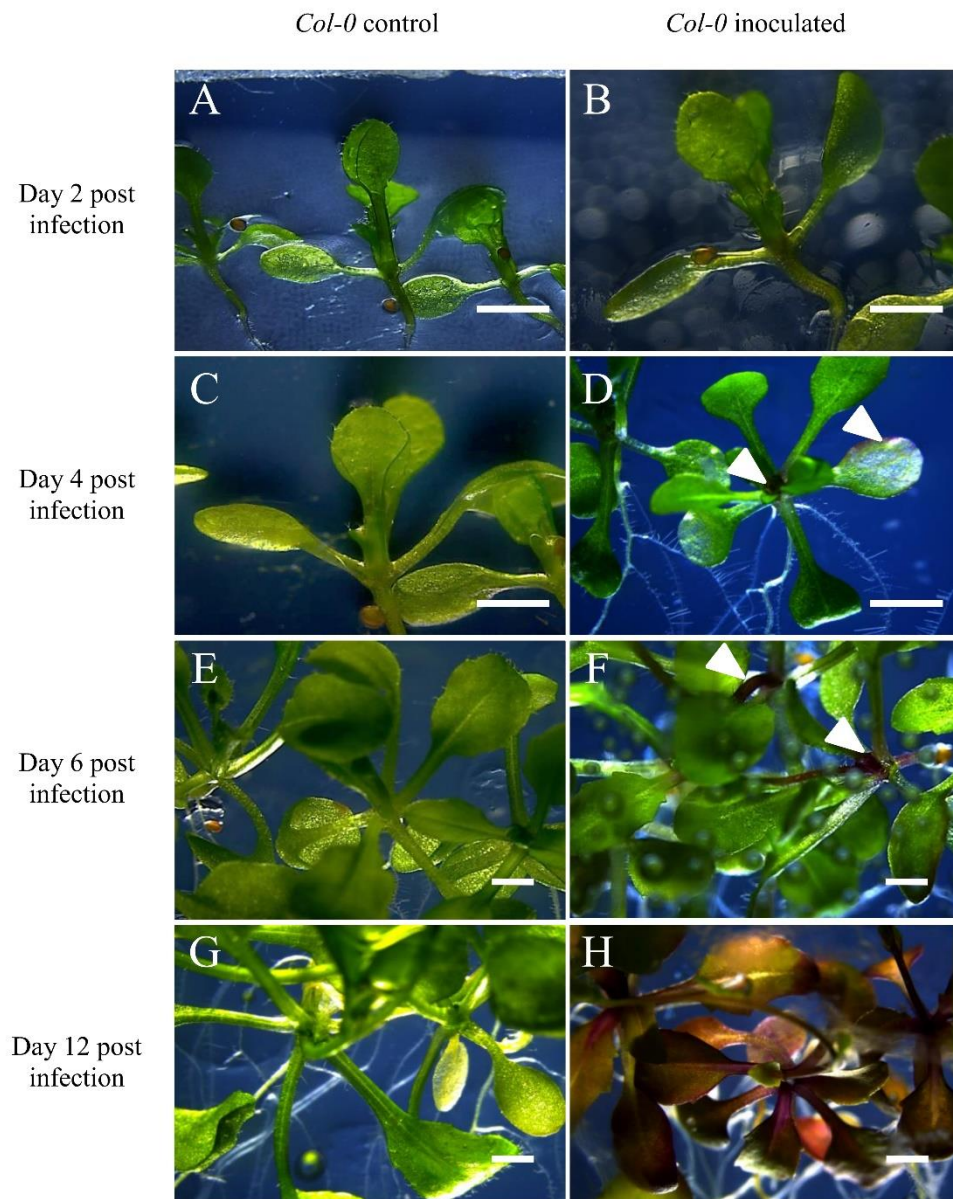


Figure 3:

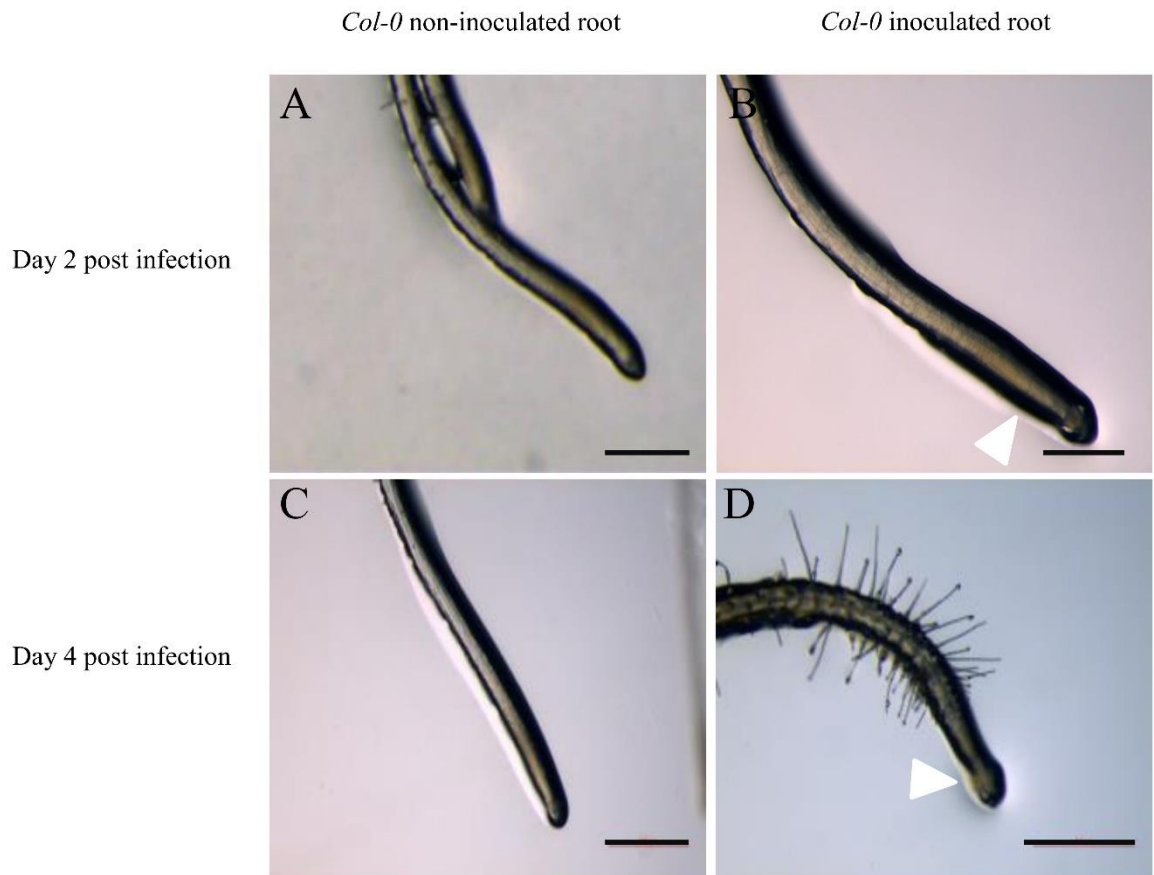


Figure 4:

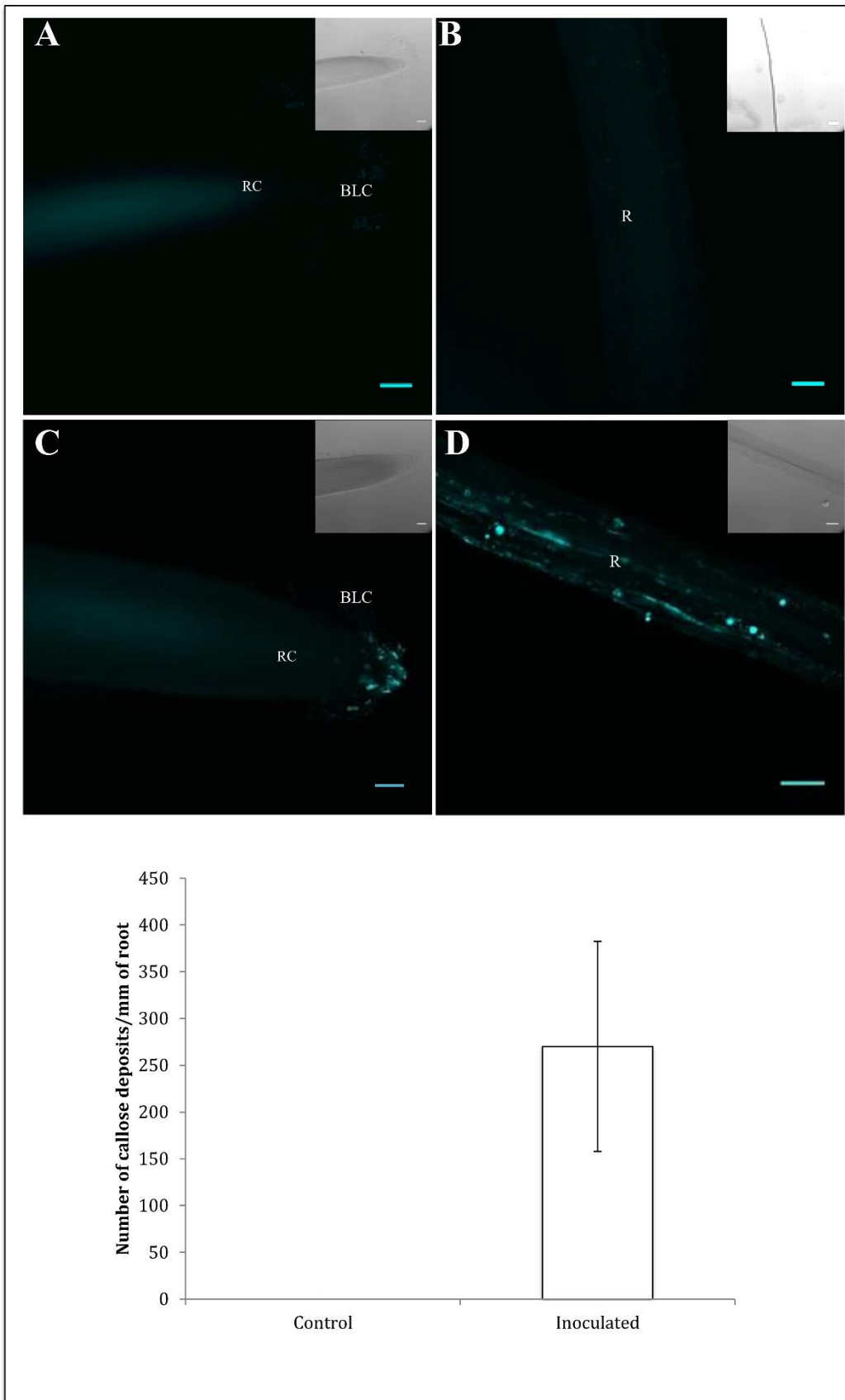


Figure 5:

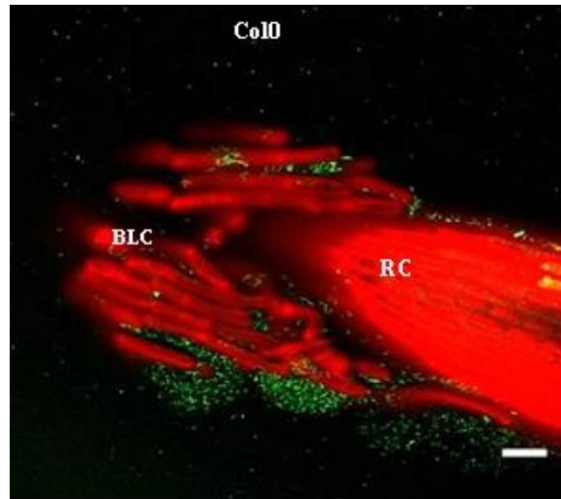


Figure 6:

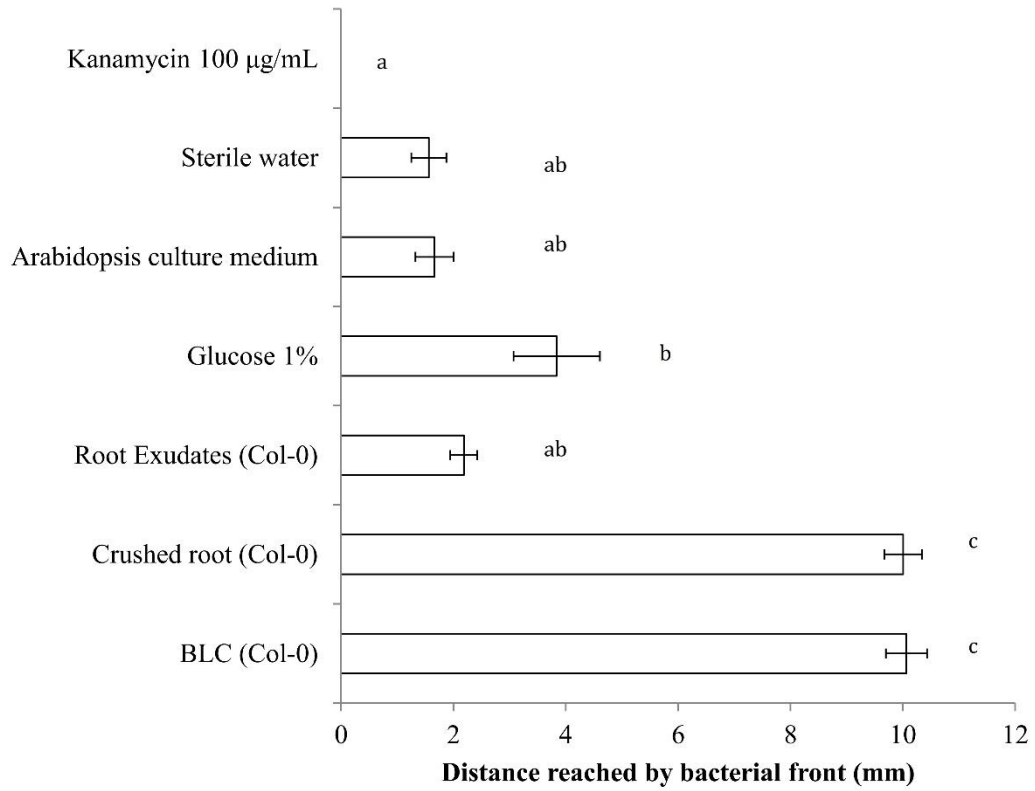


Figure 7:

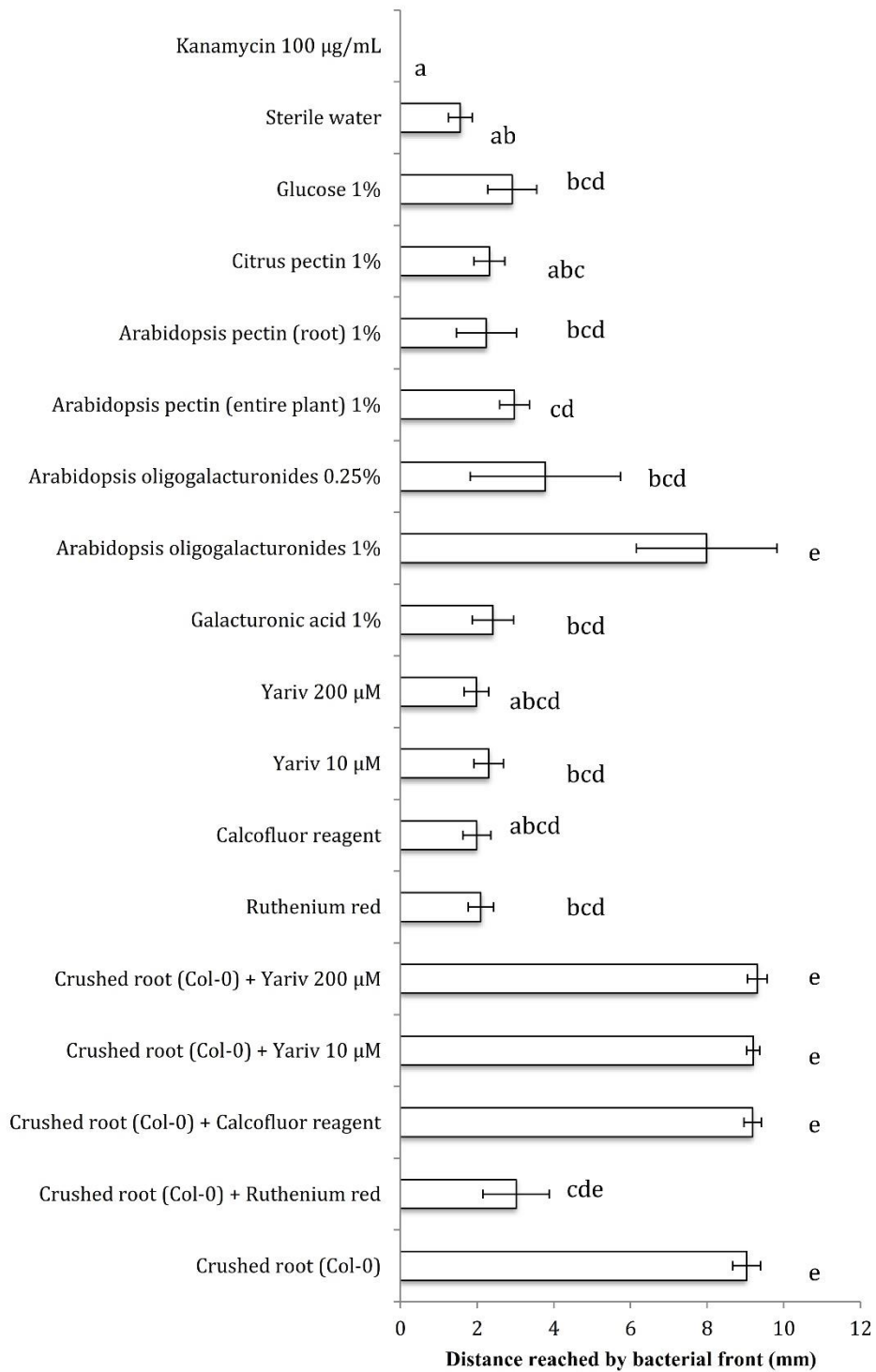
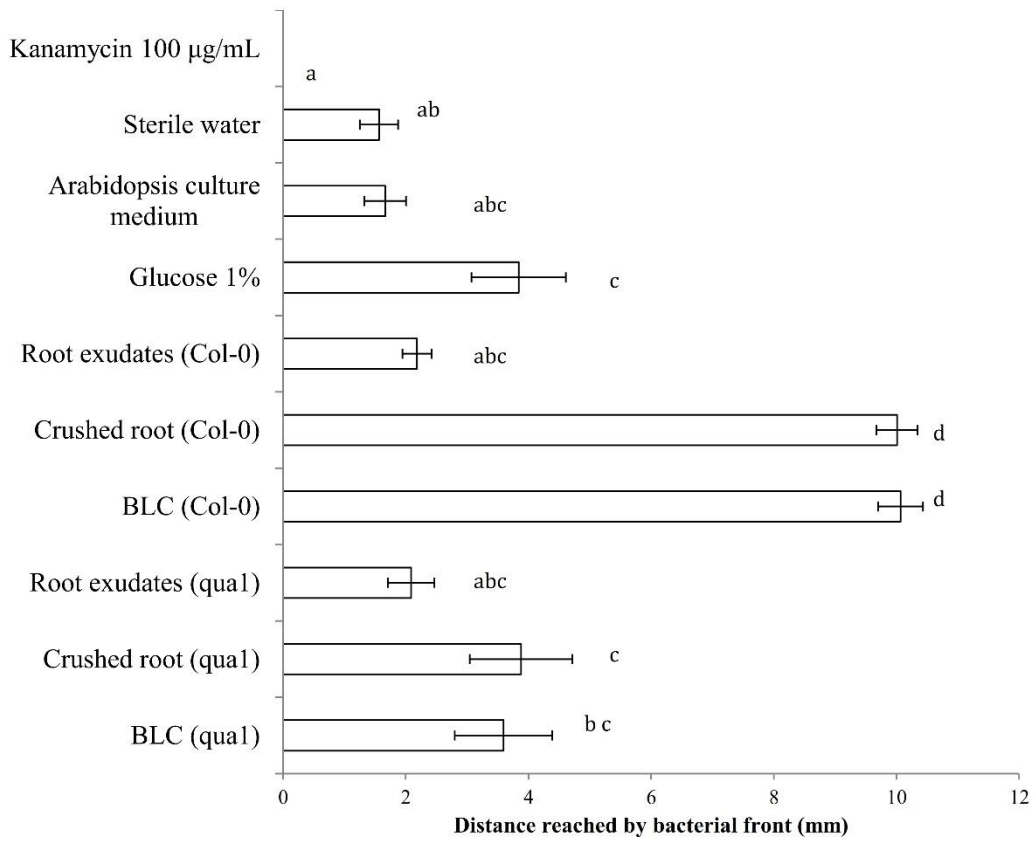
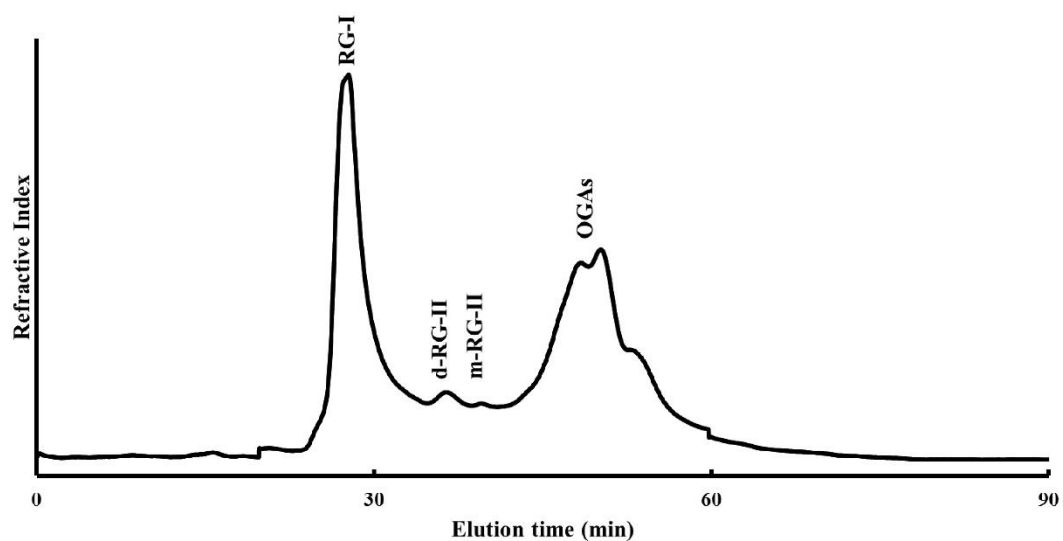


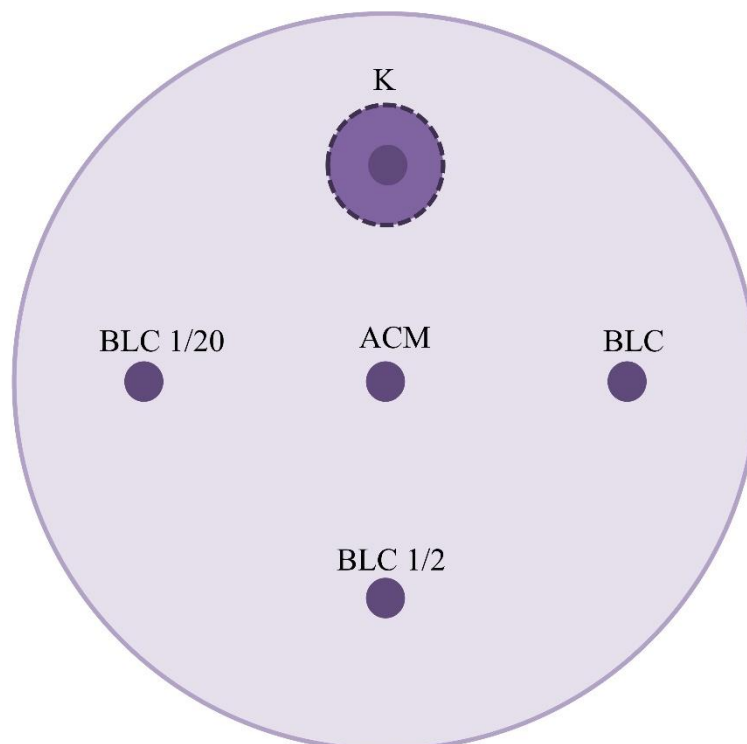
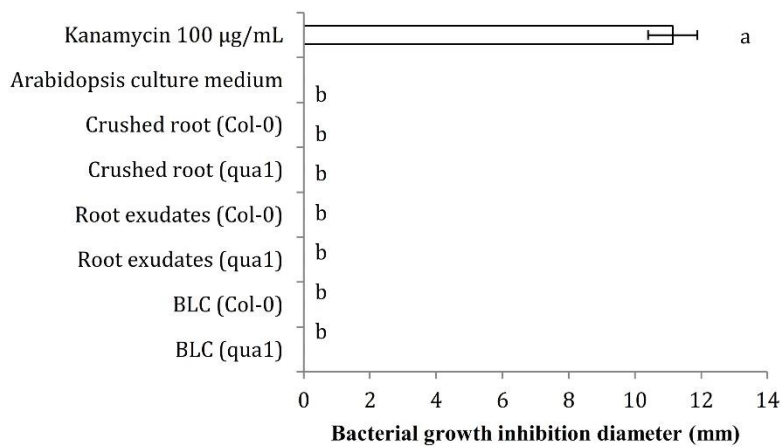
Figure 8:



Supplemental data 1: Size exclusion chromatography (SEC) of a pectin-enriched fraction from *Arabidopsis thaliana* wild-type (*Col 0*) roots. RG-I : rhamnogalacturonan I ; d-RG-II : RG-II dimer ; mRG-II : RG-II monomer ; OGAs : oligogalacturonides.



Supplemental data 2: At the top, diameter of the Pst DC3000 inhibition in mm for BLC, crushed root and root exudates of wild-type (Col-0) and mutant (qua1), Arabidopsis culture medium (ACM) and kanamycin 100 µg/mL, measured with Mesurim ® software. Treatments without common superscript letters (a,b) differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test and Bonferroni correction. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean. Below, example of result obtained where only kanamycin showed inhibition on bacterial growth.



Supplemental data 3:

3.1 Height of Arabidopsis seedlings of mutant (*qua1*) after 48 hours of inoculation of roots with 5000 or 5.108 CFU/mL of Pst DC3000 culture. Treatments with common superscript letters (a) do not differ significantly based on the Kruskal-Wallis Test with Dunn's multiple comparison test. Bars represent means and error bars represent standard error of the mean.

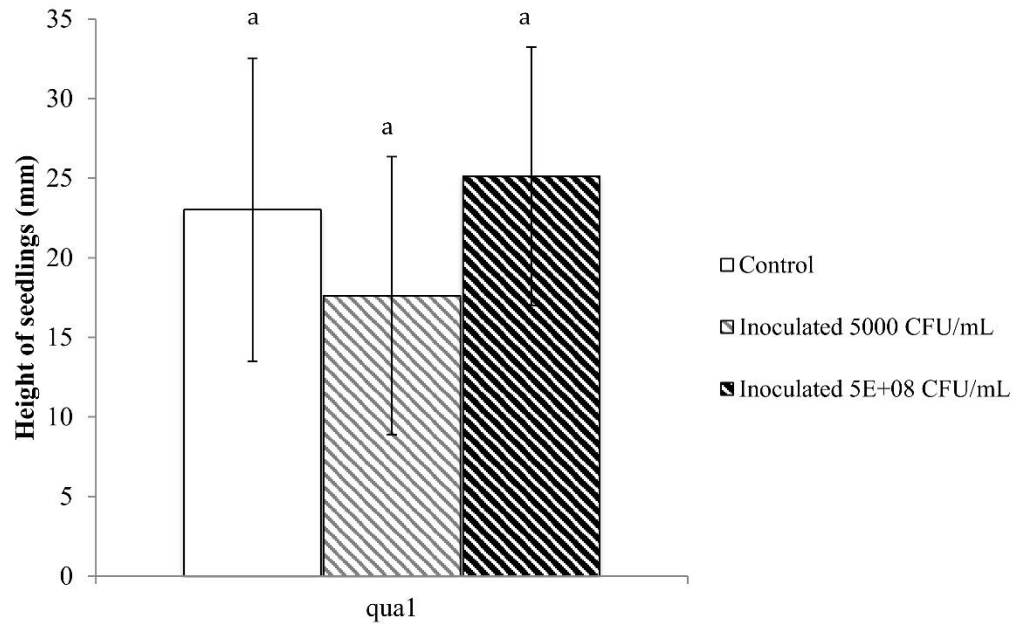
3.2 Confocal microscopy of callose deposition 48 hours after inoculation of roots with 5000 CFU/mL of Pst DC3000 culture of mutant (*qua1*) stained with aniline blue. A, B: *qua1* control and C, D: *qua1* inoculated. BLC, border-like cells; R, root; RC, root cap. Bars= 80 μm (A-D).

3.3 Laser confocal scanning microscopy showing the root tip and border-like cells colonized by Pst DC3000-GFP (green color) on mutant (*qua1*). The root tip is stained with calcofluor (the red color). BLC, border-like cells; R, root. Bars=20 μm .

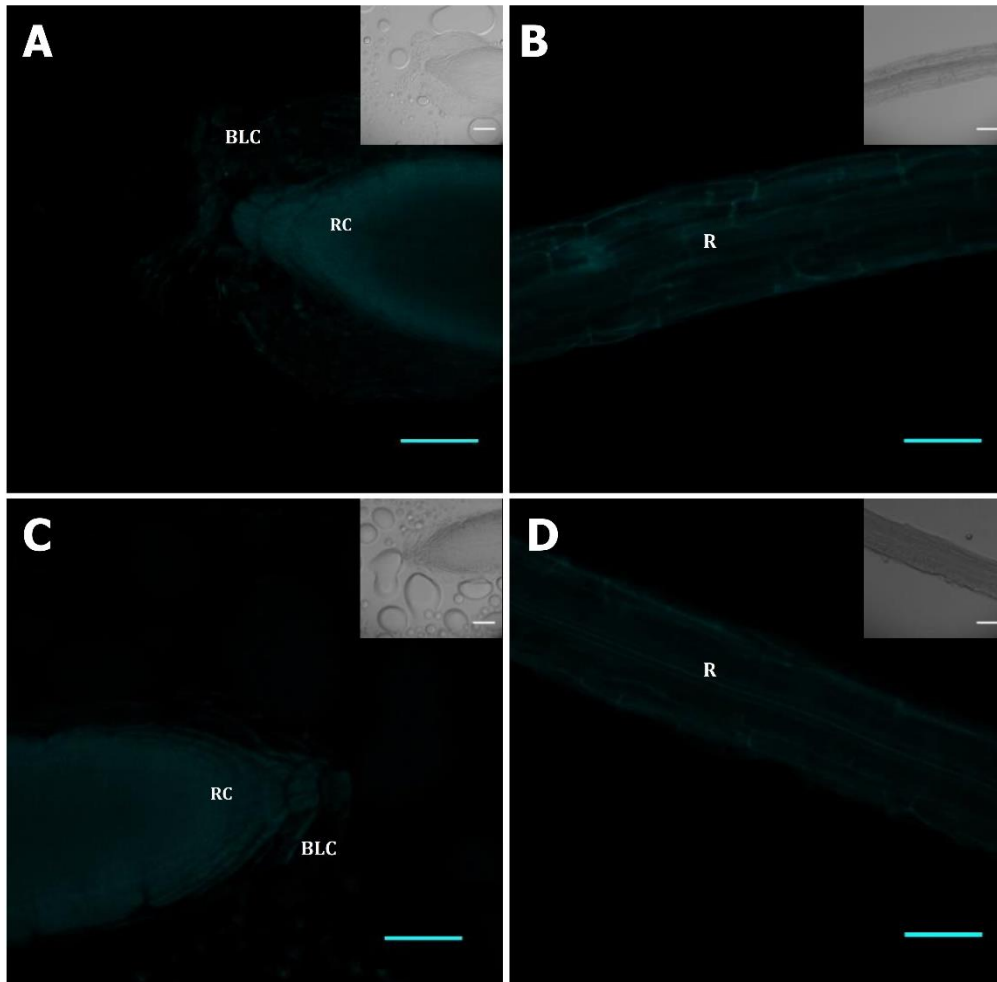
3.4 Bright field image of Arabidopsis rosette mutant (*qua1*) controls (A, C, E, G) and inoculated with Pst DC3000 (B, D, F, H). Arrowheads indicate a color change on the leaves of inoculated seedling. Note the presence of anthocyanin on the rosette of inoculated seedlings (D, F, H). Bars= 2mm

3.5 Bright field image of Arabidopsis roots from mutant (*qua1*) controls (A, C) and inoculated with *Pseudomonas syringae* (B, D). Note the presence of biofilm around the root and long root hairs on inoculated seedlings (B, D). Bars= 200 μm

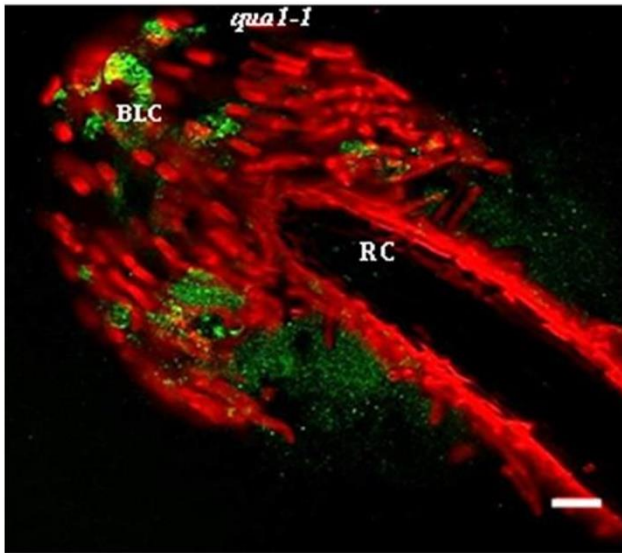
Supplemental data 3.1



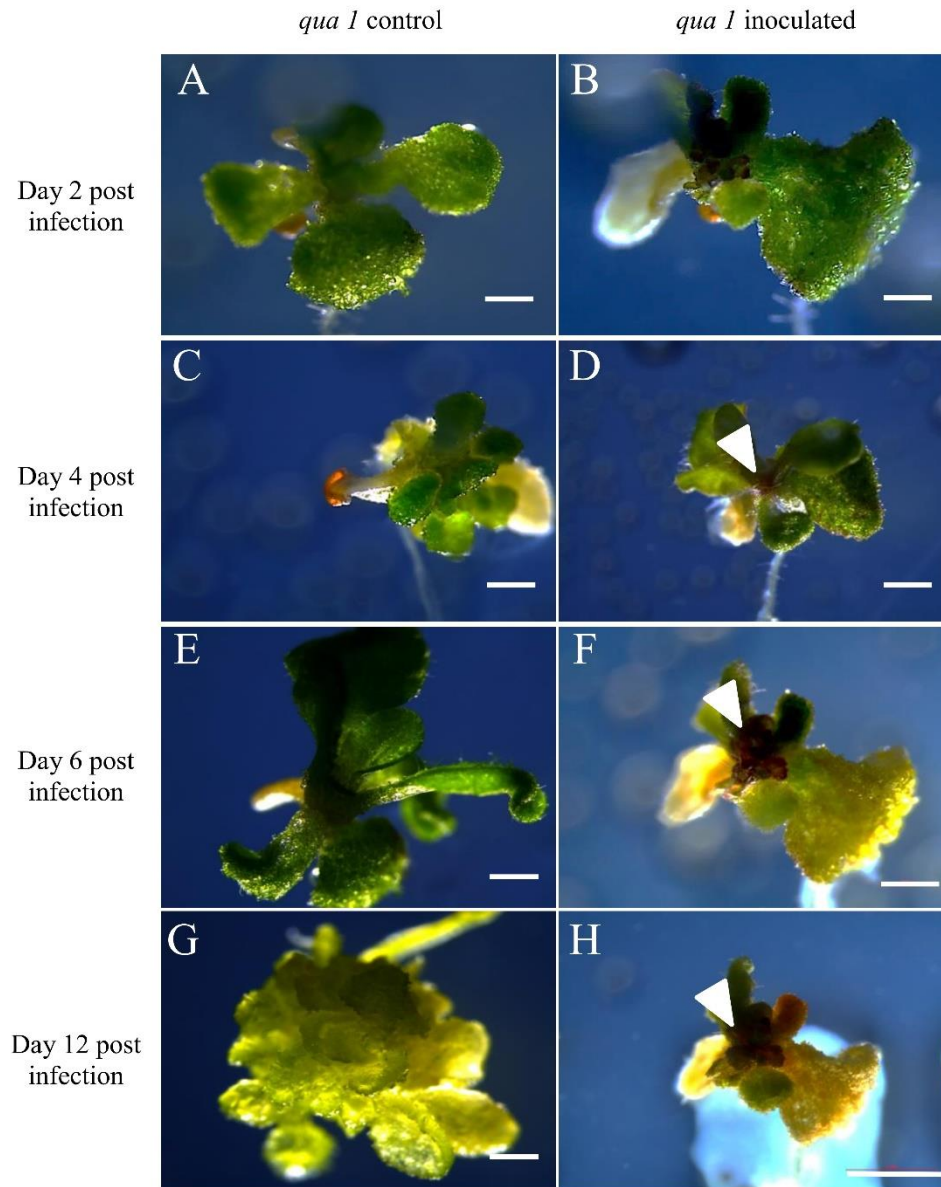
Supplemental data 3.2



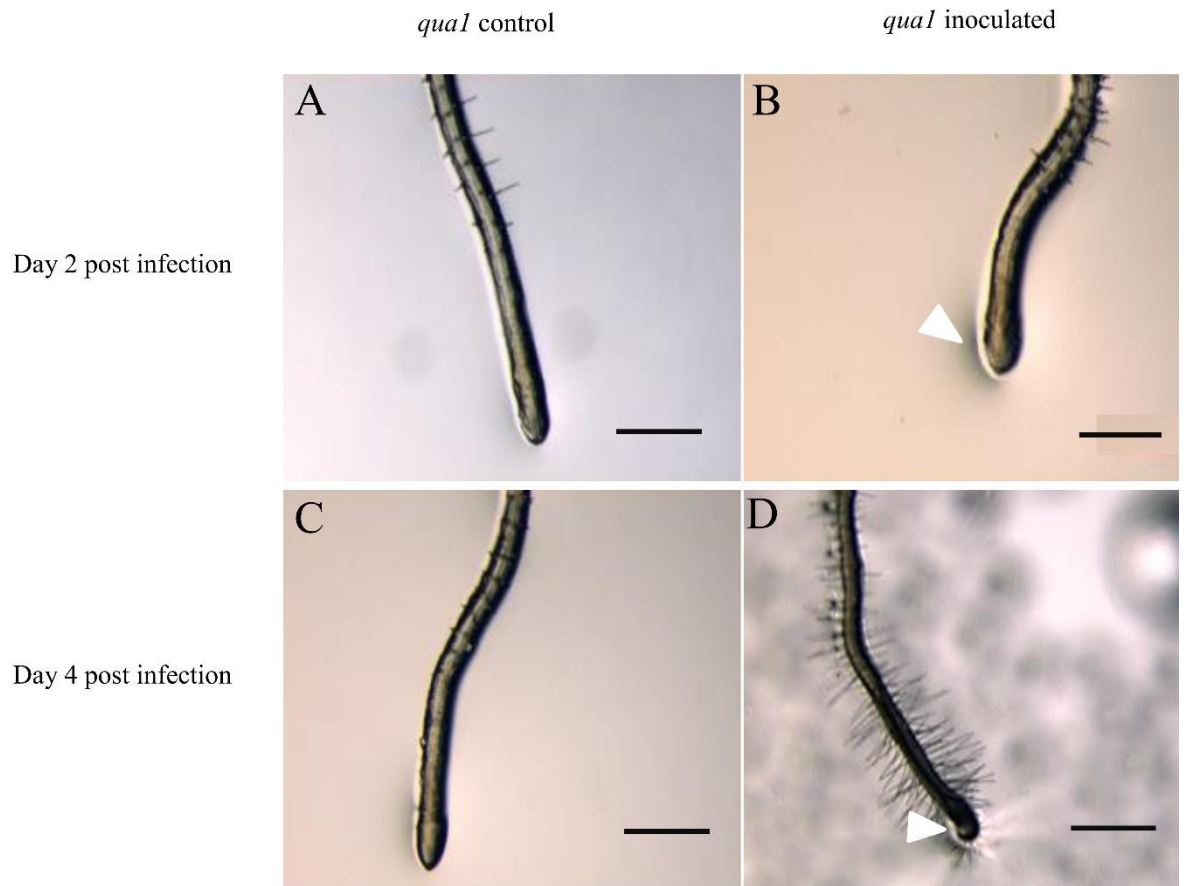
Supplemental data 3.3



Supplemental data 3.4



Supplemental data 3.5



Résumé

Choisya ternata est une plante ornementale souvent touchée par la maladie de la pourriture racinaire provoquée par *Phytophthora*. Cette maladie peut induire de pertes allant jusqu'à 80 %, ce qui implique l'utilisation intensive de produits phytosanitaires. Afin de limiter l'utilisation de ces produits toxiques, une meilleure connaissance des acteurs de la défense des plantes est nécessaire. Pour cela, les objectifs de cette thèse sont I) d'identifier les espèces du genre *Phytophthora* pathogènes de *C. ternata*, II) d'étudier des acteurs de défense au niveau racinaire et III) de développer une approche de lutte alternative aux phytosanitaires. L'identification des espèces de *Phytophthora* par l'amplification et le séquençage de la région ITS, montre la présence de *Phytophthora parasitica* dans la production de *C. ternata* en pépinière. Ils mettent aussi en évidence, pour la première fois en France et chez *Choisya*, la présence de *Phytophthora tropicalis*.

Deux cultivars de *C. ternata* sont utilisés pour étudier les acteurs de la défense racinaire contre *P. parasitica*, Aztec pearl (moins sensible à la pourriture racinaire) et Goldfinger (plus sensible). Les arabinogalactane-protéines (AGPs) sont des glycomolécules de la paroi cellulaire qui constitue une barrière physique face aux pathogènes. Des études ont montré le rôle des AGPs dans l'interaction plante-pathogène et plus particulièrement avec les oomycètes. Toutefois, le rôle des AGPs racinaires de *Choisya* dans l'interaction avec *P. parasitica* n'est pas étudié. Nos résultats montrent des différences biochimiques au niveau de la composition monosaccharidique des AGPs racinaires d'Aztec pearl en comparaison avec les AGPs de feuilles de ce cultivar et les AGPs de feuilles et de racines de Goldfinger. Contrairement aux autres fractions, ces AGPs n'ont pas augmenté la croissance du mycélium de *P. parasitica*. Ces résultats suggèrent que l'oomycète n'est pas capable de dégrader cette fraction pour l'utiliser comme une source d'énergie. Pendant l'infection de la plante par *P. parasitica*, ces AGPs peuvent freiner la pénétration du pathogène, et par conséquent diminuer la sévérité de la maladie. Les plantes ont aussi développé des molécules chimiques nommées métabolites secondaires (MS) capables de les protéger contre leurs agresseurs. Des études ont montré que la partie foliaire de *Choisya* est riche en MS tels que les alcaloïdes dont plusieurs effets pharmacologiques sont connus. Cependant, leur composition racinaire et leur rôle dans la protection de la plante contre *P. parasitica* ne sont pas élucidés. Nos résultats montrent que les racines des deux cultivars sont riches en alcaloïdes furoquinoliques. Certains alcaloïdes sont présents en plus grande quantité chez Aztec pearl, mais suite à l'inoculation de zoospores de *P. parasitica* cette différence n'est plus détectable. De plus, l'extrait contenant les alcaloïdes totaux d'Aztec pearl ont été capables d'inhiber la croissance du mycélium de l'oomycète, contrairement à l'extrait issu de Goldfinger. Ces résultats montrent le rôle potentiel des alcaloïdes furoquinoliques dans la protection de la plante contre cet oomycète.

Une autre stratégie utilisée dans la protection des plantes est l'utilisation des microorganismes bénéfiques du sol qui permettent de limiter le développement de pathogènes et de stimuler les défenses de la plante. Ces micro-organismes nommés agents de contrôle biologique (BCA) font partie des moyens de lutte biologique parfois utilisés dans le domaine de l'horticulture. Des traitements de *C. ternata* classique par différents BCA ont été évalués par un suivi du développement de *P. parasitica* dans le substrat, grâce au développement de PCR quantitative en temps réel (qPCR) ciblant le gène *ypt1*, et un suivi des symptômes. Cette évaluation montre que les traitements combinés de *Glomus intraradices* associé à *Gliocladium catenulatum* et de *G. intraradices* associé à *Trichoderma atroviridae* (respectivement des champignons mycorrhiziens et filamenteux) offrent une meilleure protection contre *P. parasitica*.

Mots-clés : *Choisya ternata* (oranger du Mexique), *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora tropicalis*, défense des plantes, arabinogalactane-protéines, alcaloïdes furoquinoliques, qPCR, agents de contrôle biologique

Abstract

Choisya ternata is an ornamental plant that suffers from root rot disease due to *Phytophthora*. This disease can lead to severe production losses (up to 80 %), which require intensive use of phytosanitary products. A better understanding of plants defenses is required in order to reduce the use of these products. Therefore, the objectives of this thesis are I) identifying *Phytophthora* spp. pathogens of *C. ternata*, II) studying roots defense actors and III) developing an alternative control approach. *Phytophthora* spp. identification by ITS region amplification and sequencing highlighted the presence of *Phytophthora parasitica* on *Choisya*. Furthermore, *Phytophthora tropicalis* was identified for the first time in France and on *Choisya* culture.

Two *C. ternata* cultivars were used to study the plants root defense actors against *P. parasitica*, Aztec pearl (less susceptible to root rot) and Goldfinger (more susceptible to root rot). Arabinogalactan proteins (AGPs) are glycomolecules of the cell wall which constitutes a physical barrier to pathogens. Studies showed the role of AGPs in the plant-pathogen interaction and more specifically in the case of oomycetes. However, *Choisya* root AGPs role in the interaction with *P. parasitica* is not studied. Our results showed biochemical differences in the monosaccharide composition of Aztec pearl root AGPs and the other AGPs fractions (Aztec pearl leaves and Goldfinger roots and leaves). Contrary to other fractions Aztec pearl root AGPs did not increase *P. parasitica* mycelium growth. These results suggest that oomycete was not able to degrade this fraction and use it as energy source. When *P. parasitica* infects the plant, these AGPs may be able to slow the infection and reduce disease severity. Plants have also developed chemical molecules known as secondary metabolites (SM) capable of protecting them against attackers. Studies showed that *C. ternata* leaves are rich with SM as alkaloids that have many pharmacological activities. Nevertheless, roots alkaloids composition and role in plant protection are not studied. Our results showed that roots of the two cultivars are rich with furoquinoline alkaloids. Some of these alkaloids were more concentrated in Aztec pearl. But after inoculation with *P. parasitica* zoospores, the difference was not detectable anymore. Moreover, the total alkaloids extract of Aztec pearl inhibited *P. parasitica* mycelium growth, unlike the extract of Goldfinger.

Another strategy of plants protection is the use of beneficial soil microorganisms that limits pathogens development and stimulate plant defenses. These microorganisms are known as biological control agents (BCA) and are sometimes used in horticulture as an alternative control strategy. In our study, treatments of *C. ternata* by different BCA were evaluated by a developed real time PCR (qPCR) targeting *ypt1* and by symptoms annotation. This evaluation showed that combined treatments by *Glomus intraradices* with *Gliocladium catenulatum* and *G. intraradices* with *Trichoderma atroviridae* (respectively mycorrhizal fungi and filamentous fungi) offer a better protection against *P. parasitica*.

Keywords: *Choisya ternata* (Mexican orange), *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora tropicalis*, plant defenses, arabinogalactan proteins, furoquinoline alkaloids, real time PCR, Biological control agent.