



Variabilité génétique et phénotypique des populations d'Aphanomyces euteiches : conséquence pour la gestion durable des QTL de résistance à la pourriture racinaire précoce chez le pois

Anne Quillévére Hamard

► To cite this version:

Anne Quillévére Hamard. Variabilité génétique et phénotypique des populations d'Aphanomyces euteiches : conséquence pour la gestion durable des QTL de résistance à la pourriture racinaire précoce chez le pois. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2022. Français. ⟨NNT : 2022REN1B047⟩. ⟨tel-03993839⟩

HAL Id: tel-03993839

<https://theses.hal.science/tel-03993839v1>

Submitted on 17 Feb 2023

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

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



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : « *Sciences Agronomiques* »

Par

« **Anne QUILLEVERE HAMARD** »

« **Variabilité génétique et phénotypique des populations
d'*Aphanomyces euteiches* : conséquence pour la gestion durable des
QTL de résistance à la pourriture racinaire précoce chez le pois** »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 21 octobre 2022

Unité de recherche : INRAE - UMR IGEPP Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes

Rapporteurs avant soutenance :

Bruno Le Cam	Directeur de recherche, INRAE - UMR IRHS
Emmanuel Wicker	Chercheur, CIRAD

Composition du Jury :

Président :	Alain Bouchereau	Professeur, Université de Rennes 1
-------------	------------------	------------------------------------

Examineurs :	Bruno Le Cam	Directeur de recherche, INRAE - UMR IRHS
	Emmanuel Wicker	Chercheur, CIRAD
	Pascal Frey	Directeur de recherche, INRAE - Université de Lorraine
	Alain Bouchereau	Professeur, Université de Rennes 1

Dir. de thèse : Marie-Laure Pilet-Nayel
Co-dir. de thèse : Christophe Le May

Directrice de recherche, INRAE - UMR IGEPP
Maître de conférence, Institut Agro Rennes-Angers

REMERCIEMENTS

J'ai initié la rédaction de ce manuscrit pendant une période transitoire et l'ai achevée quelques années plus tard dans un nouvel environnement professionnel. Ce travail m'a permis de mener en parallèle une réflexion sur mon parcours grâce à la VAE. Je voudrais donc remercier celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier la direction de l'Anses et l'unité Épidémiologie et Appui à la Surveillance pour m'avoir autorisée à finaliser ma démarche de VAE pour l'obtention d'un doctorat et pour l'avoir financée. Merci à l'université de Rennes I et à l'école doctorale EGAAL d'avoir évalué et accepté ma candidature. Je remercie également les financeurs de mes travaux de recherche à savoir le projet d'investissement d'avenir ANR PeaMUST et le projet FEADER PEI-AGRI SECURIPROT-PROGAILIVE.

Je remercie les membres du jury de thèse Messieurs Bruno Le Cam, Emmanuel Wicker, Pascal Frey et Alain Bouchereau d'avoir accepté d'examiner mon dossier.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans mes co-directeurs Marie-Laure Pilet-Nayel et Christophe Le May qui m'ont accompagnée depuis mon arrivée à INRAE en 2012. Difficile de vous témoigner en quelques lignes toute ma reconnaissance ... Un immense merci pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien indéfectible pendant mon contrat et bien après, pour votre investissement dans ce projet et pour vos conseils avisés depuis ces nombreuses années. Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné. Il est des rencontres qui changent une vie professionnelle et si aujourd'hui j'écris un nouveau chapitre, je vous le dois en grande partie.

Je remercie également mes chefs d'unité de l'Anses, Jean-Philippe Amat et Viviane Henaux pour m'avoir soutenue dans ce projet. Un immense merci pour vos précieux conseils, votre disponibilité et votre écoute bienveillante. Nos points réguliers ont été d'une grande aide.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés à l'UMR IGEPP. Je remercie tous mes anciens collègues de Rennes avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Je pense notamment à Marie-Laure, Christophe, Alain, Angélique, Gilles, Clément, Gwénola, Isabelle, Pierrick, Jean-Philippe, Henri, Christophe, Stéphane, Michèle. Merci également aux collègues de Terres Inovia Anne, Coralie, Marie-Noëlle et Caroline avec qui j'ai pu collaborer. Merci pour les nombreux échanges et les moments conviviaux partagés.

Gwénola, sans toi, une partie de ce travail n'aurait pas vu le jour ! Tu as été d'un grand soutien dans la réalisation de ces travaux. Merci pour ton engagement et la confiance qui nous ont liés pendant ces nombreuses années. Camille, ta joie de vivre est communicative. Tu as su trouver les mots pour me remettre le pied à l'étrier pendant mes moments de doute.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, mes parents, ma sœur, mes amis qui ont toujours été d'un grand soutien.

Nicolas, merci d'être présent à mes côtés au quotidien et de m'accompagner dans mes projets. Mathilde, mon rayon de soleil, je te dédie cette thèse.



UNION EUROPÉENNE
UNANIEZH EUROPA



L'Europe s'engage
en Bretagne



Avec le Fonds européen agricole pour le développement rural :
l'Europe investit dans les zones rurales



UNION EUROPÉENNE



CE PROJET EST COFINANCÉ PAR LE FONDS EUROPÉEN AGRICOLE
POUR LE DÉVELOPPEMENT RURAL. L'EUROPE INVESTIT DANS LES ZONES RURALES

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
Liste des abréviations et acronymes	5
Table des figures.....	7
Table des tableaux	10
Introduction générale	12
1. Les populations d'agents pathogènes des cultures	13
1.1. Les épidémies : genèse et facteurs influençant la dynamique épidémique	14
1.2. L'étude de la structuration génétique des populations d'agents pathogènes.....	18
1.3. Les forces évolutives à l'origine de la diversité et de la structuration des populations d'agents pathogènes	22
2. La gestion durable des résistances	26
2.1. Types de résistances	26
2.1.1 <i>Résistance non-hôte</i>	26
2.2.2 <i>Résistance hôte</i>	26
2.2 Durabilité des résistances.....	31
2.2.1 <i>Définition et concepts</i>	31
2.2.2 <i>Phénomènes de contournement et d'érosion des résistances</i>	33
2.3 Stratégies de gestion durable des résistances	35
2.3.1 <i>Déploiement des résistances</i>	35
2.3.2 <i>Mélanges variétaux, multi-lignées</i>	36
2.3.3 <i>Pyramidage de résistances</i>	36
2.4 Spécificités de la gestion durable des résistances aux agents pathogènes telluriques	39
3. Présentation du modèle d'étude : pois/ <i>Aphanomyces euteiches</i>	40
3.1 L'hôte : le pois protéagineux <i>Pisum sativum</i>	40
3.2 Culture du pois protéagineux	41
3.3 Ravageurs et maladies du pois protéagineux	41
3.4 Le pathogène: <i>Aphanomyces euteiches</i> , agent de la pourriture racinaire.....	44
3.4.1 <i>Symptômes</i>	46
3.4.2 <i>Cycle biologique</i>	46
3.4.3 <i>Epidémiologie</i>	48
3.4.4 <i>Structuration et évolution des populations d'A. euteiches</i>	49
3.4.5 <i>Génomique d'A. euteiches</i>	52
3.5 Méthodes de lutte contre <i>A. euteiches</i> chez le pois	52

3.5.1	<i>Luttes prophylactiques, culturales et biologiques</i>	52
3.5.2	<i>Lutte génétique</i>	54
	Objectifs du travail de recherche	58
	Chapitre 1 : Développement de marqueurs microsatellites pour étudier les populations d' <i>Aphanomyces euteiches</i>	63
1.	Contexte.....	63
2.	Approche	63
3.	Principaux résultats	64
4.	Publication	64
	Chapitre 2 : Etude de la diversité génétique et phénotypique des populations d' <i>Aphanomyces euteiches</i>	71
1.	Contexte.....	71
2.	Approche	71
3.	Principaux résultats	72
4.	Publication	72
	Chapitre 3 : Étude de la diversité d'isolats français pour leur agressivité sur des NILs porteuses de QTL de résistance	88
1.	Contexte.....	88
2.	Approche	88
3.	Principaux résultats	88
4.	Publication	89
	Discussion générale	99
1.	Les marqueurs pour l'étude de la diversité génétique des populations d'A. euteiches	100
2.	La structuration des populations d'A. euteiches : état de référence pré-déploiement de variétés résistantes en vue d'anticiper la gestion durable des QTL résistance	103
3.	La diversité d'agressivité des isolats français vis-à-vis des QTL de résistance, source d'adaptation potentielle des populations d'A.euteiches à la résistance partielle	107
	Conclusion.....	112
	Références bibliographiques	113
	Annexes du chapitre 2 : Etude de la diversité génétique et phénotypique des populations d' <i>Aphanomyces euteiches</i>	136
	Annexes du chapitre 3 : Étude de la diversité d'isolats français pour leur agressivité sur des NILs porteuses de QTL de résistance	152

Liste des abréviations et acronymes

ADN: Acide Désoxyribonucléique ou **DNA:** deoxyribonucleic acid

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AMOVA: Analysis of MOlecular Variance

ANOVA: Analysis Of Variance

BAM: Back-Cross Assisté par Marqueurs ou **MAB:** Marker-Assisted Backcrossing

CLM: Cumulative Linked Model

CLMM: Cumulative Linked Model Mixed

CRN: Crinkler-like effectors

DAPC: Discriminant Analysis of Principal Components

DS: Disease Severity

EST: Expressed Sequence Tag

ETI: Effector Triggered Immunity

ETS: Effector Triggered Susceptibility

EvA: Evaluation du risque Aphanomyces

GSP: Groupe de Sélectionneurs de Protéagineux

GWAS: Genome Wide Association Study

HR: Hypersensitive Response

INR: Indice de Nécrose Racinaire

ISSR: Inter-Simple Sequence Repeat

ITS: Internal Transcribed Spacer

LA: Linkage Analysis

LD: Linkage Disequilibrium

LSMeans: Least Square Means

MAMP: Microbe Associated Molecular Pattern

MCMC: Markov Chain Monte Carlo

MLG: Multilocus Genotype

MSN: Minimum Spanning Networks

MTI: MAMPs Triggered Immunity

NB-LRR: Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat

NGS: Next Generation Sequencing

NIL: Near Isogenic Lines

PAC: Politique Agricole Commune

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PCA: Principal Component Analysis

PCoA: Principal Coordinate Analysis

PCR: Polymerase Chain Reaction

PI: Potentiel Infectieux

PIC: Polymorphism Information Content

PRR: Pattern Recognition Receptors

PTI: PAMP Triggered Immunity

QTL: Quantitative Trait Loci

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

RIL: Recombinant Inbred Line

ROS: Reactive Oxygen Species

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SRAP: Sequence- Related Amplified Polymorphism

SSP: Small Secreted Protein

SSR: Single Sequence Repeat

THV: Trait d'Histoire de Vie

Table des figures

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Tétraèdre épidémique d'après Zadoks & Schein, 1979.

Figure 2 : Modèle en zigzag illustrant le système immunitaire de la plante (Jones & Dangl, 2006).

Figure 3 : Modèles d'évolution des fréquences alléliques dans les interactions hôtes-pathogènes de type « course aux armements » (gauche) et « Reine Rouge » (droite) d'après Woolhouse *et al.* (2002).

Figure 4 : Échelle du risque évolutif organisée en fonction du système de reproduction/accouplement, du flux de gènes/génotypes et de la taille efficace de la population d'après McDonald & Linde (2002).

Figure 5 : Représentation schématique des cycles de « Boom and Bust » d'après Stakman (1957).

Figure 6 : Changement des fréquences des allèles des populations de pathogènes, lié au contournement de la résistance qualitative conférée par un gène majeur R (A et B) et à l'érosion de la résistance quantitative (C et D), d'après McDonald et Linde (2002).

Figure 7 : Stratégies de déploiement des gènes de résistance d'après McDonald et Linde (2002).

Figure 8 : Périodes de surveillance et d'intervention d'après le Guide de culture (Sources : Terres Inovia, 2021).

Figure 9 : Evolution des surfaces de protéagineux en France entre 1984 et 2020 (Sources : Terres Univia).

Figure 10 : Arbre phylogénétique de l'évolution temporelle d'oomycètes, d'après Gaulin *et al.* (2018).

Figure 11 : Arbre phylogénétique basé sur les analyses des séquences ITS de l'ADN r nucléaire des principales espèces d'*Aphanomyces* identifiées d'après Iberahim *et al.*, (2018).

Figure 12 : Symptômes de pourriture racinaire sur plantes.

Figure 13 : Cycle infectieux d'*Aphanomyces euteiches*, d'après Hughes & Grau (2007).

Figure 14 : Principaux pathotypes d'*Aphanomyces euteiches* mis en évidence par la mesure de l'indice de nécrose racinaire sur une gamme différentielle de six génotypes de pois, d'après Wicker & Rouxel (2001).

Figure 15 : Deux races américaines d'*Aphanomyces euteiches* mises en évidence par la mesure de l'indice de nécrose racinaire sur une gamme différentielle de trois génotypes de luzerne, d'après Malvick & Grau (2001).

Figure 16 : Echelle de notation des symptômes racinaires sur plantules de pois d'après Wicker (2001).

Figure 17 : Schéma de rétrocroisement assisté par marqueur (Back-cross Assisté par Marqueurs, BAM) utilisé pour construire des NILs aux principaux QTL de résistance à *A. euteiches* d'après Lavaud *et al.* (2015).

Figure 18 : Organisation des travaux de thèse.

Figure 19 : Schéma de l'évolution expérimentale, adapté de Moussart *et al.*, 2012, pour étudier l'effet des légumineuses sur la sélection des populations naturelles d'*A. euteiches*.

Figure 20 : Dispositif de l'essai d'évolution expérimentale au champ de 2016 à 2019. Organisation parcellaire des différentes modalités de génotype (Pois : AeD990SW45-8-7, NIL 0, NIL A, NIL A + NIL B, NIL B, Solara ; Féverole : Barraca, Hiverna) en fonction de l'année (2016, 2017, 2018, 2019) du bloc (A, B, C, D) et du système de culture (monoculture pois ; alternance pois-féverole). Les différents sols sont numérotés de 1 à 52 (Leprévost, 2019).

CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MICROSATELLITES POUR ÉTUDIER LES POPULATIONS D'*APHANOMYCES EUTEICHES*

Figure 1: Factorial correspondence analysis (FCA) performed on 90 *A. euteiches* isolates from France (grey circle) and US (Black Square) populations, and four referent isolates (white diamond).

CHAPITRE 2: ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET PHÉNOTYPIQUE DES POPULATIONS D'*APHANOMYCES EUTEICHES*

Figure 1: (A) Geographical position of fields distributed in five regions and Bayesian analysis (STRUCTURE) of the corresponding isolates, with Bourgogne (BR) data. Assignment probabilities of *A. euteiches* isolates are presented for $k = 2$ and a delta $k = 100$. Each vertical dotted line separates isolates from each of the 17 sites. (B) Bayesian analysis of the corresponding isolates, without Bourgogne (BR) data. Assignment probabilities of *A. euteiches* isolates are presented for $k = 3$ and a delta $k = 1,600$. Each vertical dotted line separates isolates from each of the 13 sites.

Figure 2: Principal Coordinates Analysis (PCoA) conducted from SSR genotypic data on the *A.euteiches* isolates of the collection. (A) Analysis including all the fields. (B) Analysis performed without Bourgogne fields. Each color corresponds to regions: yellow Ile de France, green: Center, red: Bretagne, black: Nord Pas-de-Calais, blue: Bourgogne.

Figure 3: Minimum spanning network (MSN) of 19 haplotypes detected in the *A. euteiches* collection of 205 isolates. Each circle represents a unique haplotype and the colors represent the sampling fields. The circle size represents the haplotype frequency and the number of isolates was indicated in circles. Line widths and the shading represent relatedness of the haplotypes based on Nei's genetic distance.

Figure 4: PCA of LSMeans disease severity data obtained on eight legume genotypes in response to inoculation with 34 isolates of *A.euteiches*. (A) Analysis included all the fields sites. (B) Analysis was performed without Bourgogne field sites. Each color correspond to group from the hierarchical clustering ascendant analysis: black, field sites from group A, red: field sites from group B and green, field sites from group C.

CHAPITRE 3: ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ D'ISOLATS FRANÇAIS POUR LEUR AGRESSIVITÉ SUR DES NILs PORTEUSES DE QTL DE RÉSISTANCE

Figure 1: Scheme of genetic positions of the seven main resistance quantitative trait loci (QTLs) to *Aphanomyces euteiches* **A**, on each pea linkage group (LG) according to Hamon *et al.* (2013) and **B**, in each pea near-isogenic line (NIL) used in this study according to Lavaud *et al.* (2015). QTL positions are shown in gray, blue, pink, green, purple, orange, and red for *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*, *Ae-Ps4.1*, *Ae-Ps4.5*, *Ae-Ps5.1*, and *Ae-Ps7.6*, respectively. At QTL *Ae-Ps7.6*, “a” denotes NILs carrying a major-effect resistance allele derived from recombinant inbred line (RIL) 847.50 or RIL BAP8.70 and “b” indicates NILs carrying the minor-effect resistance allele derived from 552. In A, the name of the pea chromosome (Chr) corresponding to each LG is indicated at the bottom of each LG, according to Kreplak *et al.* (2019).

Figure 2: Heatmap and cluster analysis of *Aphanomyces euteiches* isolates and pea lines. The color scale corresponds to the least squares means (LSMeans) of disease severity scores obtained in controlled condition assays for 43 French isolates of *A. euteiches* inoculated on the eight pea near-isogenic lines (NILs) carrying resistance quantitative trait loci (QTLs) and two control lines (Isard and AeD990SW45-8-7 [AeD]) used in this study. Green and pink colors indicate low and high LSMeans values, respectively. The cluster dendrogram of isolates generated by principal coordinate analysis indicates three clusters by different color frames: blue, cluster A; purple, cluster B; and yellow, cluster C. The cluster dendrogram of pea lines indicates three clusters by different color frames: white, cluster 1; dark gray, cluster 2; and light gray, cluster 3. The content of each pea NIL in resistance QTLs, according to Lavaud *et al.* (2015), is indicated by black boxes in the table beneath the NIL names. At QTL *Ae-Ps7.6*, the resistance allele(s) present in each NIL is derived from the pea germplasm recombinant inbred line (RIL) 847.50 or RIL BAP8.70 (a) and/or 552 (b).

Table des tableaux

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1 : Forces évolutives impliquées dans l'adaptation des agents pathogènes d'après Hossard *et al.* (2010).

CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MICROSATELLITES POUR ÉTUDIER LES POPULATIONS D'*APHANOMYCES EUTEICHES*

Table 1 *Aphanomyces euteiches* isolates used in this study.

Table 2 Details of locus, primer sequence, T_m, Motif, No. of alleles, allele size, % of heterozygotes, and PIC value of different SSR markers used to evaluate genetic diversity within *Aphanomyces euteiches* isolates.

CHAPITRE 2: ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET PHÉNOTYPIQUE DES POPULATIONS D'*APHANOMYCES EUTEICHES*

Table 1: Origin of the 205 *Aphanomyces euteiches* isolates of the collection, collected in different French fields between 2011 and 2013.

Table 2: SSR genotypic and genetic diversity parameters for each *Aphanomyces euteiches* population.

Table 3: Disease severity (DS) LSMeans values obtained from CLMM analysis of DS ratings on roots of eight genotypes of four different legume species, in response to inoculation with 34 *A. euteiches* isolates from the collection (two isolates per field).

CHAPITRE 3: ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ D'ISOLATS FRANÇAIS POUR LEUR AGRESSIVITÉ SUR DES NILs PORTEUSES DE QTL DE RÉSISTANCE

Table 1: Pea near-isogenic lines (NILs) used for the aggressiveness test of *Aphanomyces euteiches* isolates.

Table 2: Geographical origin and multilocus genotype (MLG) assignation of the 43 French isolates^a of *Aphanomyces euteiches* tested in this study for aggressiveness on pea lines.

Introduction générale



Introduction générale

L'évolution des pratiques agricoles du XX^{ème} siècle a conduit à augmenter la sensibilité des systèmes agricoles au risque sanitaire engendré par les parasites des plantes. Ainsi, les variétés modernes sont plus exposées aux maladies en raison i) de la diminution de la diversité végétale cultivée, l'uniformité des paysages agricoles et des variétés utilisées facilitant l'adaptation des agents pathogènes et ii) du développement de systèmes de production à haut potentiel de rendement s'appuyant sur l'usage d'intrants chimiques. La mise en place de ce type d'agrosystème a donc exercé une sélection sur les agents pathogènes de nature très différente de celle opérant sur une végétation naturelle plus hétérogène. De nos jours, les agents pathogènes représentent une menace importante pour notre système alimentaire, impactant la croissance et la qualité des cultures. Une enquête menée dans 67 pays représentant ainsi 87% de la production mondiale de cinq cultures majeures, a permis d'estimer les pertes moyennes de rendement, causées par 137 bioagresseurs, à 21.5% pour le blé, 30% pour le riz, 22.5% pour le maïs, 17.2% pour la pomme de terre et 21.4% pour le soja (Savary *et al.*, 2019). De plus, les changements climatiques actuels font envisager l'émergence de nouveaux agents pathogènes (Anderson *et al.*, 2004; Skendžić *et al.*, 2021). Avec son climat contrasté mais tempéré et la diversité de ses productions, la France n'échappe pas à ces épidémies. Comprendre cette menace et identifier des moyens pour réduire son impact sont la clé pour assurer un approvisionnement alimentaire durable.

Parmi les leviers disponibles pour mieux contrôler les épidémies, la création de variétés résistantes est une stratégie majeure pour limiter les populations de bioagresseurs sans recours aux pesticides. Les gènes majeurs de résistance ont été largement utilisés dans les variétés car ils ont montré une efficacité le plus souvent élevée. Cependant, des contournements de résistance conférée par ces gènes majeurs ont été fréquemment observés depuis plusieurs décennies, ne permettant pas toujours de protéger durablement les cultures. Les résistances à effet plus partiel et contrôlées par de nombreux gènes ont été observées comme étant moins facilement contournées par les agents pathogènes (Parlevliet, 2002). La pression de sélection plus ou moins élevée, exercée par ces différents types de résistance sur les populations pathogènes peut conduire à leur adaptation, résultant en une perte d'efficacité des résistances. Le déploiement des résistances dans l'espace et dans le temps (Mundt, 2014) constitue donc une approche permettant de maintenir la durabilité des résistances c'est-à-dire leur efficacité sur une période prolongée d'utilisation généralisée dans des conditions propices à la maladie (Johnson, 1984). La capacité d'un agent pathogène à s'adapter à un nouvel environnement dépend en grande partie de ses traits d'histoire de vie incluant notamment le spectre d'hôte, la capacité de dispersion ou le mode de reproduction mais aussi de son potentiel évolutif (Stukenbrock & McDonald, 2008). Etudier la structuration des populations et les phénomènes d'évolution pouvant conduire à une adaptation des agents pathogènes constitue donc un cadre théorique intéressant pour analyser les risques de contournement des résistances et pour mesurer l'efficacité des différentes stratégies de gestion durable de ces résistances.

La pourriture racinaire due à l'oomycète *Aphanomyces euteiches* est l'une des maladies les plus préjudiciables pour le développement de la culture du pois protéagineux (*Pisum sativum*) dans le monde. En France, cette maladie sévit depuis les années 1990 entraînant de fortes pertes de rendements. La résistance génétique du pois à *A. euteiches* présente un niveau partiel et est contrôlée par un grand nombre de loci à effets quantitatifs (Pilet-Nayel *et al.*, 2005; Hamon, 2010). A ce jour, aucune variété de pois très résistante à *A. euteiches* n'est encore disponible. Sept principaux QTL (Quantitative Trait Loci) de résistance, dont un QTL à effet majeur, ont été identifiés et sont en cours d'intégration dans les programmes de sélection privée. Leurs effets ont été validés dans des lignées quasi-isogéniques (NILs, Near-Isogenic-Lines) de pois dont les génomes ne diffèrent que par un ou plusieurs des QTL identifiés (Lavaud *et al.*, 2015). Néanmoins, leur durabilité dans les futures variétés de pois n'est pas connue. Il est donc important d'acquérir des connaissances sur le potentiel évolutif des populations françaises d'*A. euteiches* aux QTL de résistance et l'effet des QTL de résistance vis-à-vis de ces populations pour leur gestion durable et, à terme, permettre une gestion intégrée efficace de la maladie.

Le premier chapitre ci-après fait l'objet d'une étude bibliographique. Dans ce chapitre, nous décrirons tout d'abord les concepts théoriques sur le thème des populations d'agents pathogènes des cultures, leur épidémiologie ainsi que leur structuration et leur évolution. Une attention particulière aux cas des pathogènes telluriques sera portée dans cette partie. Une seconde partie sera consacrée à la gestion durable des résistances et aux différentes stratégies pouvant être déployées. Puis dans une dernière partie, nous présenterons notre modèle d'étude *Aphanomyces euteiches* / pois protéagineux et nous exposerons le sujet de thèse.

1. Les populations d'agents pathogènes des cultures

Dans les écosystèmes, les plantes peuvent être attaquées par un cortège d'agents pathogènes dont les principaux groupes sont les virus, bactéries, oomycètes, champignons. Ces agents pathogènes constituent des populations qui présentent des caractéristiques biologiques, écologiques et génétiques conditionnant leur déploiement dans l'environnement sauvage ou cultivé. Une **population d'agent pathogène** représente un ensemble d'individus d'une même espèce coexistant dans un même lieu et pouvant s'y reproduire au cours des générations. Ces populations sont capables de générer des épidémies entraînant d'énormes pertes dans les cultures, comme par exemple le mildiou de la pomme de terre en Irlande à l'origine d'une grande famine au milieu du XIX^{ème} siècle mais aussi l'épidémie de la rouille du peuplier ayant provoqué des pertes sans précédent en France entre 1995 et 1999 (Persoons *et al.*, 2014) et plus récemment *Xylella fastidiosa* détectée pour la première fois en Italie en 2013 (Saponari *et al.*, 2013) entraînant de lourdes pertes notamment dans les oliveraies des régions italiennes (Stokstad, 2015; Almeida, 2016).

Les agents pathogènes présentent une **spécificité d'hôtes** plus ou moins importante. On distingue les agents pathogènes généralistes capables d'infecter une large gamme d'espèces hôtes, des agents pathogènes spécialistes qui établissent une relation intime avec une seule

espèce hôte. Le spectre d'hôtes des champignons telluriques est souvent très large. C'est le cas de *Verticillium dahliae* capable d'attaquer plus de 400 espèces de plantes hôtes (Malcolm *et al.*, 2013), *Sclerotium rolfsii* qui a un spectre d'hôtes de plus de 500 espèces (Nandi *et al.*, 2017), *Rhizoctonia solani* qu'on retrouve chez 11 familles botaniques (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018) ou *Macrophomina phaseolina* qui peut infecter plus de 284 espèces de plantes (Srinivas *et al.*, 2017). Mais pour d'autres champignons telluriques, un niveau de spécialisation très élevé peut également exister. A titre d'exemple, *Fusarium oxysporum* comprend environ 150 formes spéciales (Rana *et al.*, 2017) chacune étant souvent spécifique d'un seul hôte. En phytopathologie, les agents pathogènes sont caractérisés par leur pouvoir pathogène ou pathogénicité qui se décline en deux composantes: la composante qualitative ou « **virulence** » et la composante quantitative ou « **agressivité** » (Van Der Plank, 1968). La virulence correspond à la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte donné après reconnaissance (Rapilly, 1992). Elle est liée à une reconnaissance hôte/pathogène spécifique correspondant à la relation « gène pour gène » (Flor, 1971). L'agressivité, quant à elle, ne s'exprime que si l'agent pathogène est virulent. Elle est liée à une reconnaissance non spécifique et correspond à une quantité de symptômes mesurables sous différents aspects (période de latence, niveau de sporulation, taille des lésions...). A l'échelle de l'individu, des variations d'agressivité ou de virulence pour un hôte donné peuvent être observées. Ces variations de pathogénicité permettent de structurer les individus sur la base de leur phénotype de virulence ou d'agressivité (pathotype, biotype, race).

1.1. Les épidémies : genèse et facteurs influençant la dynamique épidémique

On parle d'**épidémie** lorsqu'il y a augmentation de l'intensité et extension plus ou moins rapide d'une maladie dans l'espace et sur un temps limité. Les épidémies résultent de l'interaction entre une population d'agent pathogène, un peuplement végétal et des conditions environnementales, tout ceci dans un environnement fortement influencé par l'activité de l'homme et par ses pratiques culturales (tétraèdre épidémique) (Zadoks & Schein, 1979) (**Figure 1**). Certaines maladies sont endémiques et causent peu de problèmes. D'autres, au contraire, provoquent des épidémies sporadiques, comme la rouille jaune du blé, ou des épidémies récurrentes et très dommageables comme la septoriose du blé (Fones & Gurr, 2015; Ali *et al.*, 2017).

A l'origine d'une épidémie se trouve l'**inoculum primaire** décrit comme une partie de l'agent pathogène pouvant initier l'infection (Agrios, 2005). On désigne sous le mot 'propagule' l'unité infectieuse de tout agent pathogène. Dans le cas des champignons, ces propagules correspondent à des spores, des sclérotés (amas mycélien) ou des fragments mycéliens. L'inoculum primaire peut être endogène à la parcelle infectée, on parle alors d'*endoinoculum*. Dans ce cas, il provient i) des formes de conservation de l'agent pathogène (sclérotés, oospores, chlamydospores) ayant survécu à une période sans hôte et/ou dans un environnement défavorable et ii) des résidus ou des hôtes alternatifs sur lesquels l'agent pathogène se maintient sous forme saprophytique. L'inoculum primaire peut également être exogène à la parcelle, on

parle alors d'allo-inoculum. Ce dernier peut être importé par différents moyens, selon la nature de l'agent pathogène.

Une épidémie est caractérisée par sa **dynamique spatio-temporelle**. Ainsi la composante spatiale d'une épidémie s'explique principalement par les capacités de **dispersion** de l'agent pathogène (vent, eau, insecte, nématode) et par la composition du paysage (Plantegenest *et al.*, 2007). Plusieurs dénominations s'appuyant sur le mode de dissémination sont utilisées pour qualifier l'inoculum. On parle ainsi d'*airborne inoculum* pour les agents pathogènes aériens, *soilborne inoculum* pour les agents pathogènes telluriques, *seedborne inoculum* pour les agents pathogènes transmis par les semences (Lucas, 1998). Bien que la dispersion de certains agents pathogènes aériens puisse se faire sur des milliers de kilomètres comme pour la rouille (Nagarajan & Singh, 1990), les distances parcourues par les populations des agents pathogènes s'étendent généralement de quelques mètres de la zone d'émission, dans le cas d'une dispersion par la pluie, à une dizaine voire une centaine de mètres, dans le cas de spores anémophiles (Rapilly, 1991). La dispersion des propagules infectieuses des agents pathogènes telluriques est quant à elle le plus souvent limitée. L'activité humaine *via* le transport de matériels infectés ou l'utilisation de machines agricoles est un facteur de dispersion important pour les populations d'agents pathogènes telluriques (Katan, 2017). Dans le cas des agents pathogènes aériens, un gradient de dispersion est caractérisé par une décroissance de la quantité de l'inoculum qui arrive sur la plante hôte en fonction de l'éloignement à la zone d'émission. Ce gradient s'explique par la dilution de l'inoculum dans le volume d'air qui croît avec la distance et par son dépôt progressif sur le sol ou sur les surfaces hôtes (Rapilly, 1991). Les turbulences atmosphériques, le lessivage par la pluie, la mortalité de l'agent pathogène due à l'exposition aux radiations solaires atmosphériques provoquent également une diminution rapide de la concentration de spores viables qui augmente avec la distance à la source de l'épidémie (Aylor, 1999). Au-delà de l'extension de la maladie dans l'espace, une épidémie peut être schématisée par des **cycles parasitaires** dans le temps. Cette dynamique épidémique temporelle, mono- et poly-cyclique, est caractérisée par une courbe d'amplification de la population de l'agent pathogène à chaque cycle. La rapidité d'une épidémie dépend donc de la durée d'un cycle, du nombre de cycles et bien évidemment de la vitesse de développement de l'agent pathogène dans la plante. Les épidémies mono-cycliques sont la résultante de la présence d'un inoculum primaire au début de la saison culturale responsable de l'augmentation de la maladie. Ce type d'épidémie est fréquemment rencontré pour les maladies telluriques. Les épidémies poly-cycliques correspondent à des cycles répétés d'infection au cours d'une saison culturale due à la régénération de l'inoculum infectieux secondaire et à une période de latence très courte pour ces agents pathogènes. Parmi les maladies poly-cycliques on retrouve par exemple la rouille, l'oïdium, la septoriose, le mildiou dont les spores constituant l'inoculum primaire sont transportées par le vent. Il existe un cas particulier dans le cycle des épidémies où la maladie se développe sur plusieurs saisons végétatives. C'est le cas notamment des cultures annuelles ou pérennes pour lesquelles le cycle de reproduction de la maladie nécessite plusieurs années, produisant chaque année une quantité plus importante d'inoculum primaire actif à la saison suivante. Ce type d'épidémie, qualifié de polyétique est souvent à l'origine d'épidémies sur le long terme (Pfender & Alderman, 2003; Bousset & Chèvre, 2012).

Plusieurs facteurs de l'agroécosystème peuvent influencer la dynamique épidémique. La diversité et l'organisation spatio-temporelle du paysage agricole a un impact direct en épidémiologie grâce à son rôle notamment de réservoir potentiel d'inoculum (Zadoks, 1999; Plantegenest *et al.*, 2007). Le regroupement de plantes d'une même espèce et d'une même variété, qu'elle soit pérenne ou annuelle, dans un espace restreint (champ ou parcelle) contribue à accroître la vulnérabilité des plantes face à une épidémie. Ainsi, l'intensification de l'agriculture, avec pour corollaire l'homogénéisation des champs et l'utilisation de variétés fixées, a favorisé l'émergence d'épidémies et le développement rapide des agents pathogènes. Par ailleurs, la capacité de certains agents pathogènes à survivre sur différents hôtes alternatifs à l'hôte principal cultivé peut contribuer à accentuer ces phénomènes de récurrence et de dynamique épidémique. Ces hôtes alternatifs, sauvages ou cultivés, peuvent, par exemple, jouer le rôle de réservoir potentiel de l'inoculum primaire pendant ou entre deux saisons culturales et favoriser la récurrence d'une maladie dans un environnement donné par contact avec le compartiment de l'hôte principal (Plantegenest *et al.*, 2007; Bousset & Chèvre, 2012). D'autres agents pathogènes ont besoin d'hôtes alternants pour accomplir leur cycle sexué. C'est le cas de la rouille jaune *Puccinia striiformis* et de la rouille brune *Puccinia triticina*, capables de se maintenir respectivement sur l'épine-vinette (*Berberis spp.*) (Hovmøller *et al.*, 2011) et le pigamon (*Thalictrum*) ou l'isopyre (*Isopyrum spp.*) (Bolton *et al.*, 2008).

Le climat, et plus particulièrement la température et l'humidité, est une composante de l'agroécosystème qui va influencer la dynamique épidémique (Caffarra *et al.*, 2012). En effet, le climat en agissant à la fois sur la dynamique du peuplement végétal (phénologie, réceptivité des organes) et sur le cycle de vie des agents pathogènes va conditionner les interactions entre la plante, le peuplement végétal et l'agent pathogène et définir ainsi la dynamique épidémique au cours de la saison culturale. Une distinction est à faire entre micro- et macro-climat dans le développement épidémique d'une maladie. Ainsi, le microclimat, qui fait référence aux conditions climatiques dans un couvert végétal, peut être affecté directement par le macroclimat et l'état du peuplement végétal. Cependant, pour bien comprendre l'épidémiologie d'une maladie, il est important de prendre en compte ces deux environnements. En effet, des régions où les conditions macroclimatiques peuvent s'avérer néfaste au développement d'une maladie, peuvent contenir des zones limitées où les conditions microclimatiques favorables sont réunies pour la survie et la transmission de l'agent pathogène. Ainsi, l'augmentation de la densité de semis peut créer un environnement plus favorable au développement de la maladie notamment par une réduction des mouvements d'air maintenant un niveau d'humidité du microclimat plus important. Ceci a pu être observé pour la maladie de l'ascochytose du pois chiche (Chang *et al.*, 2007) et la brûlure sclérotique de l'arachide causée par *Sclerotinia minor* (Butzler *et al.*, 1998).

Les activités humaines dans un agroécosystème vont influencer les dynamiques épidémiques par exemple par le choix de la parcelle de part sa localisation et de son état sanitaire. Les pratiques culturales telles que la fertilisation azotée, l'irrigation, le travail du sol, le choix des successions ainsi que l'implantation des cultures (densité de semis) jusqu'au choix des méthodes de lutte sont autant de paramètres qui vont contribuer à moduler les dynamiques épidémiques (Agrios, 2005).

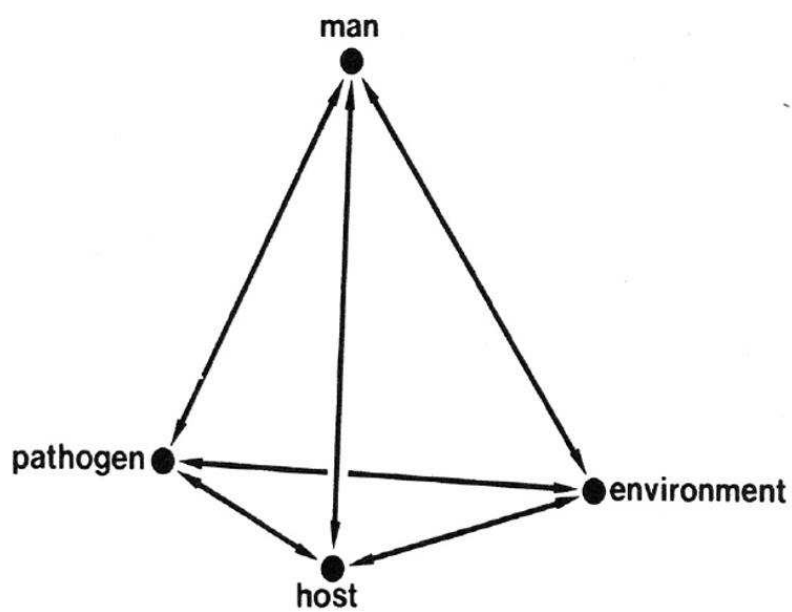


Figure 1 : Tétraèdre épidémique d'après Zadoks & Schein, 1979

1.2. L'étude de la structuration génétique des populations d'agents pathogènes

Le terme de « structure des populations » fait généralement référence aux modèles de variation génétique en termes de quantité et de distribution de la diversité génétique dans et entre les populations d'un agent pathogène (Milgroom & Peever, 2003). A l'échelle phénotypique cela se traduit par des modifications du pouvoir pathogène et des traits d'histoire de vie de l'agent pathogène. La compréhension de la structuration des populations présente un intérêt pour les biologistes de l'évolution car elle est le reflet de l'histoire évolutive et du potentiel évolutif de l'agent pathogène (McDonald, 1997; McDonald & Linde, 2002). La caractérisation de la structure des populations est également essentielle à la génétique de conservation afin d'identifier les unités stables au cours de l'évolution.

Afin de **caractériser la structure génétique des populations**, différents types de marqueurs moléculaires peuvent être utilisés. Leur choix (ou disponibilité) a un impact substantiel sur l'analyse et l'interprétation des résultats. Selon le locus ciblé on distingue deux types de marqueurs génétiques, neutres et adaptatifs (ou non-neutres). Les *marqueurs génétiques neutres* sont définis comme une séquence d'ADN polymorphe à l'intérieur d'une population ou d'une espèce et non soumise à sélection (positive ou négative) (Hoffmann & Willi, 2008) contrairement aux marqueurs génétiques adaptatifs. Grâce à l'arsenal toujours croissant de marqueurs moléculaires, la variation génétique neutre reste simple à mesurer. Les marqueurs neutres permettent de reconstruire les phylogénies, évaluer le flux génétique et la structure spatiale et identifier les unités de conservation (Hoffmann & Willi, 2008). Ils fournissent notamment des estimations non biaisées du temps écoulé depuis l'isolement reproductif et de la quantité de dérive génétique (Gebremedhin *et al.*, 2009). Plusieurs marqueurs neutres sont largement utilisés pour décrire la diversité génétique répartie dans et entre les populations. Parmi ces marqueurs on distingue les marqueurs co-dominants tels que les microsatellites (SSR) ou les SNPs qui, dans le cas des organismes diploïdes, affichent un ou deux allèles par locus. Les marqueurs dominants historiquement (RAPDs, ISSRs, AFLPs) ou plus récemment (SRAPs) utilisés génèrent des profils de type 'code barre' moins informatifs mais rapides et simples à mettre en œuvre. Outre le génome nucléaire, les génomes mitochondrial (ADNmt) et chloroplastique (ADNcp) peuvent également être utilisés dans l'étude de la génétique des populations (Holderegger *et al.*, 2006; Grünwald *et al.*, 2017). Quel que soit le marqueur neutre choisi, celui-ci doit être polymorphe pour mettre en avant un maximum d'allèles et ainsi estimer le niveau de variabilité dans et entre les populations. C'est le cas des microsatellites, largement utilisés en génétique des populations, que l'on retrouve généralement dans les régions génomiques non codantes et qui permettent de révéler un niveau très élevé de polymorphisme. Depuis plusieurs années, des *marqueurs génétiques adaptatifs* sont utilisés en raison d'un besoin d'acquérir des connaissances sur le rôle des gènes adaptatifs en réponse à une pression de sélection comme par exemple les changements environnementaux qui se produisent dans le monde entier (Kirk & Freeland, 2011). Les progrès technologiques en séquençage des génomes permettent de cibler des centaines voire des milliers de loci et d'identifier des marqueurs non-neutres pour l'étude de la génétique des populations, de

l'écologie moléculaire et de la biologie de l'évolution. Des ensembles de gènes, candidats à des changements adaptatifs, sont ainsi identifiés par le biais de divers outils et approches génétiques (Microarrays, NGS, QTL, Genome scan ...) (Hoffmann & Willi, 2008; Kirk & Freeland, 2011).

Afin d'**analyser la structure génétique des populations**, les données de génotypage des populations obtenues à l'aide des marqueurs sont utilisées pour étudier les fréquences des allèles dans les populations. L'étude de la structuration des populations s'appuie sur l'équilibre de Hardy-Weinberg, modèle central de cette étude qui décrit les relations entre les fréquences génotypiques et les fréquences alléliques. La notion d'équilibre de ce modèle est assujettie à différentes hypothèses :

- La population est panmictique (les zygotes sont produits par la fusion au hasard de gamètes)
- La population étudiée est de taille infinie
- Il n'y a ni sélection, ni mutation, ni migration (la population est isolée et il n'y pas de perte ou de gain d'allèle)
- Les générations successives sont discrètes (pas de croisement entre générations différentes)

Dans ces conditions, la diversité génétique de la population se maintient et doit tendre vers un équilibre stable de la distribution génotypique. Dans la nature, cet équilibre est rarement observé mais il permet d'établir un état de référence. Les déviations à l'équilibre de Hardy Weinberg sont alors liées à l'effet des forces évolutives qui structurent et font évoluer les populations. *Plusieurs indicateurs* peuvent être mesurés (**Encadré 1**) sur un échantillonnage d'individus représentatif d'une population pour décrire la diversité génétique d'une population. Un des premiers indicateurs de la diversité génétique dans une population est le nombre de génotypes multilocus (MLGs) correspondant à des combinaisons d'allèles à plusieurs loci indépendants, et qui permet de calculer la richesse génotypique. La mesure statistique la plus usuelle de la variation génétique neutre dans une population est la diversité génétique H_e (Nei, 1973) qui correspond à l'hétérozygotie attendue dans le cas de l'utilisation de marqueurs co-dominants. Cette mesure est composée du nombre d'allèles et de la régularité (ou fréquence) des allèles. Trois indices de fixation F définis par Wright (1969), F_{is} , F_{it} et F_{st} permettent également de décrire la structure génétique des populations. A partir des valeurs d'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e), le coefficient de consanguinité (F_{is}) peut être calculé dans la sous-population. Le F_{is} mesure l'écart à la panmixie (déficit en hétérozygote) dû à la consanguinité du régime de reproduction au sein de la population. Une autre mesure du F statistique, l'index de fixation F_{st} , est communément utilisé pour estimer la différenciation génétique entre les sous-populations et exprime la diminution de l'hétérozygotie liée à la divergence entre la sous-population et la population totale (Wright, 1969; Weir & Cockerham, 1984). Son niveau informatif élevé en fait un indicateur largement utilisé dans les études de génétique des populations. En effet, cet indice renseigne sur la structuration géographique et l'histoire démographique des populations ainsi que sur les différentes forces évolutives à l'origine de cette différenciation génétique au sein des populations (Holsinger & Weir, 2009). Le F_{it} , quant à lui, correspond à la consanguinité des individus dans la population totale.

Etudier la structure génétique consiste à *identifier des groupes de profils génétiques* connexes dans et entre des populations. Parmi les structures génétiques, on retrouve entre autres les clusters génétiques et les profils d'isolement par la distance décrit par Wright (1943). Les clusters génétiques correspondent à des groupes d'individus génétiquement divergents qui surviennent lorsque les flux génétiques sont entravés par des obstacles physiques ou comportementaux. Dans le cas de l'isolement par la distance, il s'agit de différences génétiques locales entre individus, qui peuvent s'accumuler dans le cadre d'une dispersion géographiquement restreinte (François & Durand, 2010). Ces groupes peuvent être définis *a priori* en s'appuyant sur la biologie de l'agent pathogène ou *a posteriori* grâce à des méthodes dites de 'clustering'. La définition de groupes *a priori* s'appuie sur une étude de la variation génétique dans et entre ces populations au travers d'analyses de hiérarchisation spatiale et temporelle, via des méthodes de calcul du F statistique telles que le *Fst* (Weir & Cockerham, 1984) décrit ci-dessus ou l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) basées sur des données génotypiques (Excoffier *et al.*, 1992). D'autres méthodes permettent de réaliser des groupes *a posteriori* sur la base des données génotypiques. Un des outils largement utilisé pour établir des groupes au sein d'une population à reproduction sexuée est le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Ce logiciel est basé sur une méthode d'inférence Bayésienne permettant de regrouper des individus dans des populations génétiquement homogènes. Dans ce cas, on suppose K populations (ou K clusters), caractérisées par un ensemble de fréquences d'allèles à chaque locus, permettant d'attribuer de façon probabiliste les individus à une ou plusieurs K populations. Cette méthode probabiliste est fondée sur le calcul de probabilités postérieures du polymorphisme génétique des individus, par la combinaison d'une probabilité *a priori* avec la fonction de vraisemblance. Le calcul de probabilités postérieures est rendu possible grâce à la technique MCMC (Markov Chain Monte Carlo) correspondant à une classe de méthodes d'échantillonnage minimisant le déséquilibre de Hardy-Weinberg et les déséquilibres de liaison au sein de la population (Delsuc & Douzery, 2004). D'autres méthodes telles que la Minimum Spanning Networks (MSN) basée sur le réseau d'haplotypes ou l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC) permettent de visualiser graphiquement la structure des populations (Grünwald *et al.*, 2017).

Décrire la diversité génétique ainsi que la structuration des populations reste la première étape dans l'étude de la génétique des populations. L'étape ultime consiste à comprendre l'histoire évolutive des populations de l'agent pathogène ainsi que les mécanismes et les processus par lesquels ces évolutions ont pu se produire.

Encadré 1 : Indicateurs de diversité génétique

Indices intrapopulationnels

N : nombre d'individus dans la population

G : nombre de géotypes

R : richesse génotypique = G/N

Ar : richesse allélique. Il correspond au nombre moyen d'allèles par locus et est défini comme suit :

$$A = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L n_i \quad L : \text{nombre de loci et } n_i \text{ le nombre d'allèles au locus } i$$

Ho (observed heterozygosity) : il correspond au taux d'hétérozygotie observé et peut être calculé à partir de la fréquence mesurée des hétérozygotes (nombre des individus hétérozygotes divisé par N)

He (expected heterozygosity) (Nei, 1973) : il correspond à la fréquence théorique des hétérozygotes à un locus donné et peut être calculé à partir des fréquences alléliques. Il est calculé comme suit :

$$he = 1 - (f_1^2 + f_2^2 + f_3^2 + \dots + f_n^2) = 1 - \sum_{n=1}^n f_n^2$$

n= nombre d'allèles et f la fréquence théorique des hétérozygotes.

Si plusieurs loci sont considérés, l'hétérozygotie moyenne (He) représentant la moyenne du taux d'individus hétérozygotes par population et est calculé comme suit :

$$He = (\sum he)/L \quad L = \text{nombre de loci}$$

Fis (coefficient de consanguinité) (Wright, 1969) : il reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations et est calculé comme suit :

$$Fis = \frac{He - Ho}{He} = 1 - \left(\frac{Ho}{He}\right)$$

Fis = 1 : fixation complète (cas d'autofécondation)

Fis < 1 : hétérozygotie excédentaire

Fis = 0 : population à l'équilibre de Hardy-Weinberg

LD (Linkage disequilibrium) : le déséquilibre de liaison décrit les associations préférentielles entre allèles de deux loci. Plus deux loci sont proches l'un de l'autre, moins leurs allèles ont de chance d'être transmis de façon indépendante. On dit d'eux qu'ils sont en déséquilibre de liaison.

Indices interpopulationnels

Fst (index de fixation) (Wright, 1965, 1969) : il s'agit de l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre subdivisions d'une population. Il représente la corrélation entre allèles à l'intérieur d'une sous-population par rapport à l'ensemble des sous-populations. La différenciation des populations par rapport au total (Fst) est calculée en fonction des paramètres Fis (différenciation des individus à l'intérieur des populations) et Fit (différenciation des individus par rapport au total). Le Fst est calculé comme suit :

$$Fst = 1 - \frac{(1 - Fit)}{(1 - Fis)}$$

D'après Wright, 1978 :

0 < Fst < 0.05 : différenciation faible

0.05 < Fst < 0.15 : différenciation modérée

0.15 < Fst < 0.25 : différenciation importante

Fst > 0.25 : différenciation très importante

1.3. Les forces évolutives à l'origine de la diversité et de la structuration des populations d'agents pathogènes

La génétique des populations au travers de l'étude de la diversité génétique permet de comprendre les processus évolutifs qui façonnent et maintiennent la variation génétique au sein et entre les populations. Des changements évolutifs tels que des changements dans la fréquence génotypique ou génétique vont permettre de structurer ces populations (Milgroom & Peever, 2003).

Cinq types de forces évolutives, *i.e* la mutation, la recombinaison, la sélection, la dérive génétique et la migration (ou flux de gènes), façonnent les populations d'agents pathogènes en laissant une signature moléculaire issue d'évènements proches ou lointains permettant de comprendre la structuration et le niveau de diversité génétique actuelle des populations. Ainsi, certaines forces comme la mutation, la recombinaison ou les flux de gènes augmentent la diversité génétique des populations de l'agent pathogène en générant de nouvelles séquences d'ADN, en réarrangeant des séquences d'ADN existante ou par l'acquisition de nouvelles séquences à partir des populations voisines. En contrepartie, la dérive génétique diminue le niveau de diversité génétique. Par ailleurs, la sélection peut augmenter ou diminuer la diversité génétique selon le type de sélection exercée, par exemple par des gènes de résistance (**Tableau 1**). En examinant de près les signaux d'évolution enregistrés dans les populations actuelles, une prédiction de l'évolution potentielle et de la trajectoire adaptative des populations des agents pathogènes peut être avancée.

La sélection est la force la plus étudiée et la plus facile à gérer dans les agroécosystèmes. La sélection joue un rôle dans la fréquence génétique et génotypique. On distingue trois modes de sélection naturelle : la sélection directionnelle, la sélection disruptive, et la sélection stabilisante. Ces modes de sélection sont basés sur la corrélation entre le phénotype et la valeur sélective c'est-à-dire la capacité d'un individu à transmettre ses allèles à la génération suivante. La sélection « directionnelle » ou darwinienne favorise les individus présentant le même phénotype extrême en augmentant les variants les mieux adaptés (sélection positive) ou en éliminant les variants délétères (sélection négative ou purificatrice) dans un environnement donné. C'est le cas par exemple des monocultures d'un cultivar possédant un gène majeur de résistance, qui vont favoriser l'émergence des variants virulents jusqu'à contournement de la résistance déployée. La sélection « disruptive » ou diversifiante quant à elle, favorise les phénotypes extrêmes au détriment des phénotypes intermédiaires. Ainsi, la rotation dans l'espace et dans le temps de gènes majeurs de résistances ou le mélange de cultivars ayant des gènes de résistances différents perturbent la sélection directionnelle au profit de la sélection disruptive. Enfin, la sélection « stabilisante » ou purifiante permet quant à elle la coexistence de plusieurs allèles à un locus donné favorisant les phénotypes intermédiaires au détriment des phénotypes extrêmes. Cette sélection peut se produire par le déploiement de gènes de résistance pyramidés dans un même cultivar (McDonald & Linde, 2002). La sélection représente une force évolutive clé, en façonnant la variation génétique et la trajectoire évolutive des agents pathogènes.

La mutation entraîne des modifications de la séquence d'ADN créant ainsi de nouveaux allèles dans la population. Les populations ayant plus d'allèles ont une plus grande diversité génétique que les populations ayant peu d'allèles. Une mutation est bénéfique lorsqu'elle permet une adaptation plus rapide de l'agent pathogène à son environnement, ce bénéfice disparaissant une fois l'adaptation acquise. C'est le cas des mutations à l'origine de souches plus virulentes ou plus agressives, capables de contourner les sources de résistance des plantes. Néanmoins, ces mutations à elles seules ne permettent pas de contourner une résistance. En effet, d'autres forces comme la sélection directionnelle sont nécessaires pour augmenter la fréquence des mutants dans la population (McDonald & Linde, 2002; Zhan, 2009).

La recombinaison fait intervenir les mécanismes de reproduction des agents pathogènes et d'échanges de matériel génétique entre deux génomes différents. Elle affecte la manière dont la diversité génétique est distribuée au sein et entre les individus d'une population, ce qui conduit à différents degrés de diversité génotypique. La reproduction peut être de type sexuée et/ou asexuée. La *reproduction asexuée* résulte en la présence de clones ou de lignées clonales pour lesquels les phénomènes de recombinaison augmentent peu la diversité génétique car se produisent entre allèles identiques. Ces populations affichent généralement une faible diversité génotypique. Les variations observées au sein de ces lignées sont généralement la résultante de phénomènes de mutations ou de flux de gènes. Les allèles favorables alors apparus peuvent ensuite se maintenir dans la population. C'est le cas de tous les *Fusarium oxysporum* et de nombreuses bactéries qui possèdent une reproduction asexuée dans les agroécosystèmes (McDonald & Linde, 2002). La *reproduction sexuée* se fait par le transfert d'une partie de l'information génétique des parents à leur descendance. Elle aboutit à de nouvelles combinaisons de gènes dues à des phénomènes de recombinaison à chaque génération. Ce brassage génétique entraîne un haut niveau de diversité génotypique permettant à l'agent pathogène de s'adapter à son environnement. Néanmoins certaines combinaisons génétiques favorables peuvent être perdues lors des phénomènes de recombinaison. De nombreux champignons présentent les deux modes de *reproduction asexuée et sexuée*. La reproduction sexuée permet l'obtention de nouvelles combinaisons d'allèles. Le génotype le plus adapté à son environnement pourra se reproduire de manière clonale en conservant une combinaison adéquate d'allèles permettant ainsi à cette nouvelle combinaison de se diffuser largement si les propagules asexuées sont dispersées sur de longues distances. Les champignons présentant le double système de reproduction, avec plus particulièrement une reproduction sexuée hétérothallique, présenteront donc un haut potentiel évolutif permettant à leurs populations de s'adapter rapidement à leur hôte sur une échelle spatiale plus ou moins importante. Si la capacité dispersive de l'agent pathogène se fait sur de longues distances, alors sa distribution sur une large zone géographique pourra provoquer des épidémies importantes. C'est le cas de *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* qui sévit dans diverses parties du monde. Au contraire, si la dispersion s'étend à quelques mètres, comme c'est le cas pour les agents pathogènes telluriques, alors l'épidémie restera limitée (McDonald & Linde, 2002).

La recombinaison joue un rôle important dans la dissipation du déséquilibre de liaison, ou DL (« linkage disequilibrium » LD), défini comme l'association statistique de deux allèles présents à deux loci différents. Le déséquilibre de liaison correspond à la différence entre la fréquence

observée d'une combinaison d'allèles à deux loci et la fréquence prévue pour une association aléatoire. Ceci est basé sur l'hypothèse que si le temps d'évolution est suffisant, la survenue d'événements de recombinaisons aléatoires entraînera une distribution équilibrée des allèles à chaque locus. Ainsi la fréquence d'un allèle particulier à un locus donné sera indépendante des allèles à d'autres loci liés. Lorsque le niveau de recombinaison est faible voire inexistant comme dans les populations clonales, les associations non aléatoires entre allèles non liés sont élevées. Dans ce cas, un déséquilibre de liaison peut être observé. Au contraire, les populations recombinantes présentent des associations aléatoires parmi les loci neutres à la suite du réassortiment des gènes non liés et une distribution équilibrée.

Le flux de gènes ou migration est un processus d'échange de l'information génétique au travers des mouvements de gamètes et/ou des génotypes entre des populations géographiquement séparées. La dispersion est le principal mécanisme qui détermine les flux de gènes. Ces flux de gènes tendent à homogénéiser les pools génétiques entre populations et augmenter ainsi la diversité génétique au sein des populations par l'apport de nouveaux allèles issus des populations plus ou moins éloignées. Ainsi, les flux de gènes ont été responsables de la dispersion globale de nouveaux pathotypes comme le pathotype UG-99 de la rouille noire du blé (Singh *et al.*, 2011). L'isolement entre les populations limite les flux de gènes. C'est notamment le cas pour les agents pathogènes telluriques pour lesquels la dispersion sur de courtes distances entraîne un isolement entre populations. Dans ce cas, la dérive génétique peut conduire à la divergence des populations d'agents pathogènes de petite taille et la sélection à une adaptation locale.

La dérive génétique représente la fluctuation aléatoire des fréquences alléliques au sein d'une population et est étroitement liée à la taille des populations. Ce processus tend à éroder la diversité génétique neutre, favorable ou défavorable au sein des populations sur le long terme. Il s'agit d'un processus stochastique déterminant dans la différenciation génétique des populations d'agents pathogènes. Les effets de la dérive génétique sont maximaux sur des populations de petite taille et se manifestent par une forte réduction de la taille des populations sous l'effet i) d'événements stochastiques environnementaux nommés « bottleneck » tels que le déploiement de pratiques culturales modernes (rotation des cultures, utilisation de variétés résistantes) ou des conditions climatiques extrêmes et ii) d'effets fondateurs c'est-à-dire l'apparition d'une nouvelle population à partir d'un faible nombre d'individus. Cette nouvelle population présente alors une partie de la diversité génétique de la population d'origine.

L'histoire évolutive d'une population d'agent pathogène est construite sur la base de l'interaction entre ces 5 forces évolutives qui déterminent *in fine* la structure génétique de la population. Les populations d'agents pathogènes, sous l'effet de ces forces évolutives, se structurent et peuvent évoluer au fil des générations, résultant en une modification de leur pouvoir pathogène. Il est donc primordial d'acquérir des connaissances sur le niveau de structuration et le potentiel évolutif des populations pathogènes susceptibles de faire évoluer leur pouvoir pathogène afin d'anticiper au mieux les contournements de résistances et mieux gérer la durabilité d'une résistance.

Tableau 1 : Forces évolutives impliquées dans l'adaptation des agents pathogènes d'après Hossard *et al.* (2010).

Force évolutive	Mécanisme	Conséquence
Mutation	Changement de la séquence nucléotidique de certains gènes	Apparition de nouveaux allèles dans les populations
Dérive génétique	Fluctuation aléatoire de la fréquence des gènes dans une population d'effectif limité	Disparition et fixation d'allèles
Migration	Flux de gènes ou de génotypes entre populations d'un agent pathogène	Déplacement des allèles et des génotypes mutants virulents entre les populations
Recombinaison sexuée	Modification des associations d'allèles	Modification de la diversité génétique globale (multilocus) et apparition de combinaisons générant des phénotypes nouveaux
Sélection	Survie et reproduction différentielles entre individus au sein d'une population	Augmentation en fréquence des génotypes/phénotypes les mieux adaptés aux conditions locales

2. La gestion durable des résistances

2.1. Types de résistances

La première ligne de défense chez la plante est appelée résistance basale ou non-hôte. Il s'agit de la forme de résistance la plus commune chez les plantes. Ce premier niveau de défense, peu spécifique et peu intense, permet de limiter la propagation de nombreux agents pathogènes. Lorsque cette première barrière de défense est contournée, une deuxième ligne de défense encore appelée résistance induite ou résistance hôte peut alors se mettre en place. La résistance hôte est composée de la résistance race-spécifique qui n'est efficace que vis-à-vis de certaines souches de l'agent pathogène, et/ou de la résistance race-non-spécifique efficace vis-à-vis de l'ensemble des souches de l'agent pathogène. Des passages successifs de la plante d'un état sensible à résistant et qui reflètent la coévolution des interactions hôte/pathogène (**Encadré 2**) ont été décrits par Jones et Dangl (2006) dans le modèle dit « en zig zag » (**Figure 2**).

2.1.1 *Résistance non-hôte*

La résistance non-hôte se définit comme la résistance de tous les cultivars d'une espèce hôte pour toutes les races d'un agent pathogène (Heath, 2000). Elle est déclenchée par des récepteurs généraux, les PRR (Pattern Recognition Receptors) présents dans la paroi végétale, capables de percevoir des signaux moléculaires, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) communs aux agents pathogènes. Les PAMPs les plus connus sont la flagelline des bactéries et la chitine des champignons. Ce premier niveau de résistance basale, encore appelé PTI (PAMP Triggered Immunity), constitutif à l'hôte, limite le développement de l'agent pathogène par la mise en place de barrières physiques et/ou chimiques liées aux structures morphologiques de l'hôte comme par exemple des renforcements pariétaux sous forme de callose ou la production d'espèces réactives (ROS). En réponse à ce premier niveau de défense, les agents pathogènes libèrent des effecteurs responsables de la phase nommée ETS (Effector Triggered Susceptibility) qui court-circuitent les voies de défense basale de la plante au profit de leur développement, ce qui induit une sensibilité de la plante. Ces mécanismes sont peu différents de ceux qui régissent la résistance hôte (Lee *et al.*, 2016).

2.2.2 *Résistance hôte*

La résistance hôte implique une reconnaissance de l'agent pathogène par la plante hôte. Dans ce cadre, l'interaction sera dite « incompatible » si un des génotypes de la plante présente un niveau de résistance totale face à l'agent pathogène. L'interaction est dite « compatible » lorsque cette résistance ne s'exprime pas dans la plante ou bien s'exprime mais ne bloque pas le développement de l'agent pathogène. Van der Plank (1968), propose une classification des

résistances aux maladies en deux catégories : la résistance verticale ou résistance race-spécifique et la résistance horizontale ou résistance race non-spécifique.

a) La résistance verticale ou résistance race-spécifique

La résistance verticale est une résistance le plus souvent dite complète ou qualitative car elle empêche le développement de l'agent pathogène (Parlevliet, 1979). Elle est décrite comme étant « race spécifique » c'est-à-dire qu'une variété est résistante à certaines souches d'un agent pathogène et sensible à d'autres souches. Cette résistance spécifique est le plus souvent monogénique ou oligogénique (Agrios, 2005) et fait intervenir le modèle « gène-pour-gène » décrit par Flor (1971) suite aux travaux sur l'interaction du lin (*Linum usitatissimum*) avec la rouille (*Melampsora lini*). Selon ce modèle et dans le cas d'une interaction hôte/pathogène incompatible, le gène majeur de résistance (R) qui code pour un récepteur de la plante reconnaît le produit du gène d'avirulence (Avr) de l'agent pathogène (A/R). Cette reconnaissance déclenche chez la plante des réponses de défense encore appelées ETI (Effector Triggered Immunity) à l'origine d'une réaction d'hypersensibilité (HR) qui provoque la mort cellulaire et limite l'infection au niveau de la zone de pénétration de l'agent pathogène (Rapilly, 1991; Lee *et al.*, 2016). Dans le cas d'une interaction compatible, cette reconnaissance n'a pas lieu en raison de l'absence de récepteur chez la plante et/ou de l'effecteur produit par l'agent pathogène (A/r; a/R ; a/r). Une méta-analyse de 314 gènes R clonés depuis 25 ans a décrit neuf mécanismes d'action des protéines R (Kourelis & van der Hoorn, 2018). La plupart des gènes R de résistance codent pour des protéines appartenant à la famille des NB-LRR (Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat) (Michelmore *et al.*, 2013). Ce type de résistance, largement étudié, est utilisé dans de nombreux programmes de sélection. Cependant la pression sélective imposée par ce type de résistance sur les populations de l'agent pathogène a fréquemment conduit à l'émergence de nouvelles souches plus virulentes et au contournement des résistances (Parlevliet, 2002).

b) La résistance horizontale ou résistance race-non-spécifique

La résistance horizontale ou « race-non-spécifique » est une résistance décrite le plus souvent comme partielle ou quantitative (Van Der Plank, 1968; Parlevliet, 1979) car elle ne bloque pas mais réduit la multiplication de l'agent pathogène, la colonisation dans la plante et /ou la quantité de symptômes. Cette résistance est le plus souvent déterminée par plusieurs gènes à effets partiels associés à des régions génomiques dites QTL (Quantitative Trait Loci) contribuant à la résistance avec un effet variable. Des études ont montré que les QTL peuvent agir sur plusieurs étapes du cycle infectieux d'un agent pathogène (Richardson *et al.*, 2006; Delmas *et al.*, 2016). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents aux QTL de résistance sont peu connus. A ce jour, seulement une vingtaine de QTL de résistance ont été clonés chez les plantes (Niks *et al.*, 2015; French *et al.*, 2016; Pilet-Nayel *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2018). L'efficacité des QTL est très dépendante de l'environnement (Poland *et al.*, 2009;

McDonald, 2010; Lannou, 2012) et du fond génétique (Lavaud *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016). Le déterminisme génétique de la résistance quantitative est souvent caractérisé par des QTL à effets majeurs et des QTL à effets mineurs. La combinaison des QTL de résistance peut conduire à une résistance totale dans certains cas, plus particulièrement pour des QTL à effets majeurs (Niks *et al.*, 2015). Par exemple, dans le cas du pathosystème *Puccinia striiformis* f.sp *hordei*, responsable de la maladie de la rouille chez l'orge, le cumul des trois QTLs de résistance 4H, 1H et 5H confère un haut niveau de résistance (Richardson *et al.*, 2006).

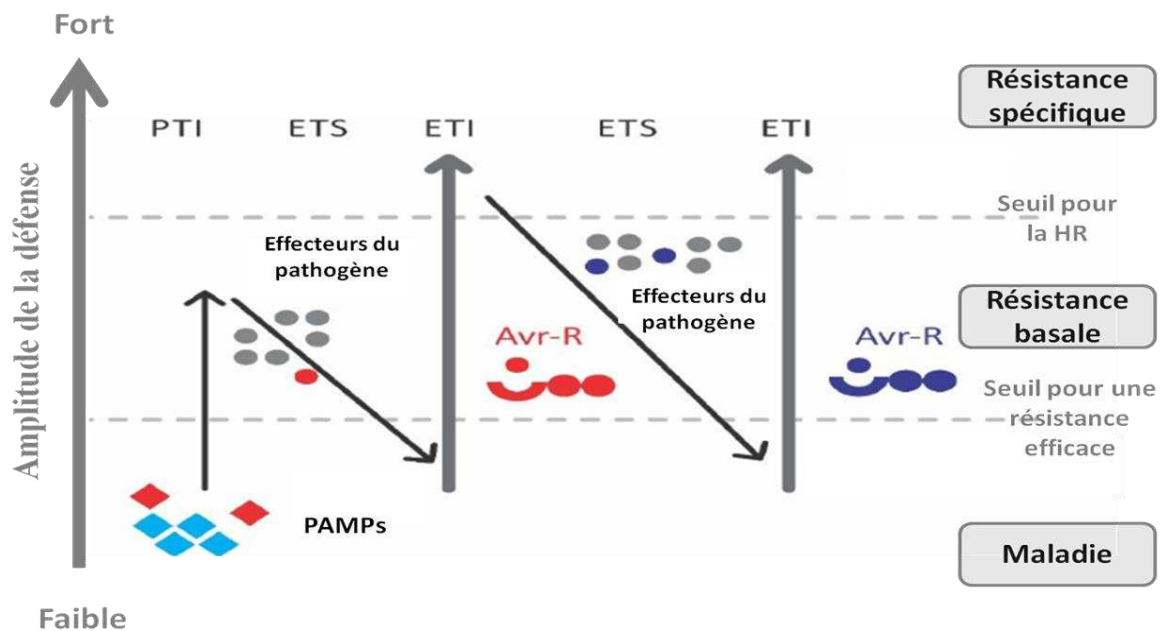


Figure 2 : Modèle en zigzag illustrant le système immunitaire de la plante (Jones & Dangl, 2006). Phase 1 : la plante détecte les MAMPs/PAMPs (« Microbe/Pathogen Associated Molecular Pattern » ; losanges rouges) via les récepteurs extracellulaires PRRs (« Pattern Recognition Receptor ») pour déclencher la réponse de défense MTI/PTI (« MAMPs/PAMPs-Triggered Immunity »). Phase 2 : le pathogène libère des effecteurs de virulence qui court-circuitent la MTI/PTI résultant une sensibilité ETS (« Effector-Triggered Susceptibility »). Phase 3 : un effecteur (rond rouge) reconnu par une protéine de résistance de type NBS-LRR (« Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat ») activent l'ETI (« Effector-Triggered Immunity »), une résistance plus forte que la MTI/PTI correspondant à la réaction d'hypersensibilité HR (« Hypersensitive Response »). Phase 4 : les agents pathogènes ayant perdu l'effecteur reconnu (rouge) ou ayant acquis un nouvel effecteur par transfert horizontal (en bleu) suppriment l'ETI. La co-évolution sélectionne les plantes avec un nouvel allèle NBS-LRR capable de reconnaître le nouvel effecteur, résultant en une nouvelle ETI.

Encadré 2 : coévolution des interactions hôtes/agents pathogènes

Qu'est ce que la coévolution : il s'agit de processus réciproques de sélections naturelles négatives entraînant des modifications génétiques adaptatives des gènes des agents pathogènes codant pour des effecteurs versus des gènes de l'hôte codant pour des protéines cibles ainsi que pour des protéines R. D'un côté, l'agent pathogène est sélectionné par rapport à son niveau de pathogénicité et de l'autre, l'hôte est sélectionné par rapport à son niveau de résistance et à ses mécanismes de défense. Cette interaction hôte/agent pathogène fait intervenir des coûts ainsi que des bénéfices de part et d'autre qui vont définir l'issue finale de cette interaction (Woolhouse *et al.*, 2002).

Modèles explicatifs : la « la course aux armements » et la « guerre de tranchée » (Lo Presti *et al.*, 2015; Terauchi & Yoshida, 2010) (**Figure 3**).

La « **course aux armements** » : une sélection directionnelle récurrente se met en place : le déploiement et la fixation de nouveaux allèles chez l'hôte et l'agent pathogène remplacent les allèles « anciens ». La fréquence de l'allèle possédant la meilleure fitness¹ va augmenter, produisant une sélection sur l'hôte qui à son tour va augmenter la fréquence de l'allèle le plus avantageux pour contrecarrer l'infection par l'agent pathogène. S'en suit une sélection de l'hôte sur l'agent pathogène qui va déployer de nouveaux allèles pour infecter l'hôte. Ce cycle est répété indéfiniment.

La « **guerre de tranchée** » : une sélection disruptive qui maintient les fréquences alléliques de l'hôte et de l'agent pathogène dans une fluctuation dynamique permanente, non pas par l'apparition de nouveaux allèles mais par une augmentation séquentielle et persistante des allèles les plus avantageux.

Dans la nature, les dynamismes de coévolution suivent largement le modèle de la « guerre de tranchée », modèle stable qui entraîne une forte diversité génétique alors que dans les agrosystèmes, l'homogénéité des cultures et la sélection variétale conduit plutôt à un modèle instable qui est celui de la « course aux armements » entraînant une faible diversité génétique (Brown & Tellier, 2011).

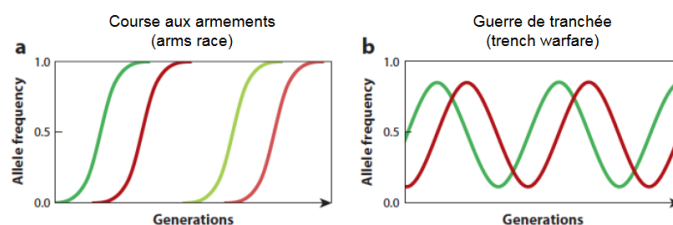


Figure 3 : Modèles d'évolution des fréquences alléliques dans les interactions hôtes-pathogènes de type « course aux armements » (gauche) et « guerre de tranchée » (droite) d'après Lo Presti *et al.* (2015). Lignes vertes : fréquence d'allèle d'effecteur du pathogène ; lignes rouges : fréquence d'allèle de résistance de l'hôte.

¹ La fitness correspond à la capacité d'un individu à survivre et à se reproduire

2.2 Durabilité des résistances

2.2.1 Définition et concepts

Une résistance est dite **durable** lorsque, déployée à grande échelle, elle reste efficace sur le long terme malgré des conditions de développement favorables à la maladie (Johnson, 1984). La résistance quantitative a souvent été décrite comme plus durable que la résistance qualitative (Parlevliet, 2002). Le caractère durable de la résistance quantitative peut être expliqué par une pression sélective plus faible et différentielle de la résistance partielle de l'hôte sur les populations d'agents pathogènes ainsi qu'une combinaison de différents mécanismes associés à la résistance pouvant agir successivement à différentes périodes du cycle de vie de l'agent pathogène ou tout au long du développement de la plante (Palloix *et al.*, 2009; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). De plus, la probabilité de mutations multiples nécessaires chez l'agent pathogène pour contourner la résistance quantitative est faible (Mundt, 2014).

D'un point de vue économique, un **contournement** des résistances apparaît si les pertes de rendements liés à la présence de l'agent pathogène deviennent supérieures au seuil économiquement acceptable. Au niveau biologique, le contournement d'une résistance est lié à des modifications génétiques des populations de l'agent pathogène suite à des pressions sélectives exercées sur l'agent pathogène via les gènes de résistance et leur mode de déploiement. De nos jours, plusieurs disciplines telles que la phytopathologie ou la génétique des populations permettent d'évaluer la durabilité d'une résistance et ainsi d'anticiper un contournement de la résistance par une étude combinée de la dynamique épidémique et du potentiel évolutif de la population de l'agent pathogène ; la dynamique épidémique étant dépendante à la fois des mécanismes de résistance de la plante mais aussi de différents traits de vie de l'agent pathogène (nombre de générations par saison culturale, mode de reproduction, dispersion, formes et capacité de survie). McDonald & Linde (2002) ont ainsi proposé une typologie des profils de risque de contournement de résistances selon les caractéristiques biologiques des agents pathogènes à savoir le système de reproduction, les flux de gènes/génotypes et la taille efficace de la population² (**Figure 4**).

² La taille efficace de la population, notée N_e , correspond au nombre d'individus composant une population idéale c'est-à-dire comportant autant de mâles que de femelles et dans laquelle chaque individu aurait le même nombre de descendants.

Mixed “epidemic” genetic structure	H i g h (3)	<i>Phytophthora sojae</i>	7 6 5	<i>Rhynchosporium secalis</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , <i>graminicola</i> <i>Venturia inaequalis</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Setosphaeria necra</i> <i>Phaeosphaeria nodorum</i> <i>Leptosphaeria maculans</i> <i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>	8 7 6	<i>Blumeria graminis</i> <i>Bremia lactucae</i> <i>Phytophthora infestans</i> - new populations <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> – pre 1930’s <i>P. coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> <i>Sclerospora graminicola</i> <i>Melampsora larici-populina</i> , <i>larici-orticae</i>	9 8 7	(3) (2) (1)	E f f e c t i v e p o p u l a t i o n s i z e	
Outcrossing ↑ Sexual high genotype diversity ↓ Inbreeding	M e d i u m (2)	<i>Pratylenchus</i> <i>Heterodera</i> <i>Armillaria mellea</i>	6 5 4	 <i>Sporisorium reilianum</i>	7 6 5	 <i>Ustilago hordei</i> , <i>maydis</i> <i>Tilletia</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8 7 6	(3) (2) (1)		
Asexual low genotype diversity	L o w (1)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> , <i>lycopersici</i> , <i>cubense</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Soil-borne viruses <i>Meloidogyne incognita</i>	5 4 3	<i>Colletotrichum graminicola</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Eristia amylovora</i> Insect dispersed viruses	6 5 4	<i>Melampsora lini</i> <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> – no alternative host <i>P. striformis</i> <i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> , <i>avenae</i> <i>P. triticea</i> – no alternative host <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	7 6 5	(3) (2) (1)		
Reproduction/ mating system		Low (1)	Medium (2)	High (3)						
Gene/genotype flow		Propagules soilborne, difficult to disperse ~ 5 meter total dispersal	Propagules waterborne, moderate dispersal ~100 m – within field	Propagules airborne, easily dispersed ~10 – 1000 km	Man-aided dispersal may modify risk					

Figure 4 : Échelle du risque évolutif organisée en fonction du système de reproduction/accouplement, du flux de gènes/génotypes et de la taille efficace de la population d’après McDonald & Linde (2002). L’attribution de la valeur totale du risque suppose que tous les effets sont additifs. Ce modèle de risque suppose que les taux de mutation sont constants et que la sélection est efficace pour tous les pathogènes.

2.2.2 Phénomènes de contournement et d'érosion des résistances

a) Contournement des résistances qualitatives

Les phénomènes de contournement des résistances qualitatives font apparaître des cycles dits de « boom and bust ». Un cultivar possédant un gène majeur de résistance est introduit et répandu dans un agroécosystème : c'est la partie « boom » du cycle caractérisé par le déploiement du gène de résistance. La sélection imposée par le cultivar résistant augmente la fréquence des variants virulents qui peuvent se propager par flux de gènes. S'en suit une épidémie liée à l'émergence de la nouvelle population virulente conduisant à une perte totale de l'efficacité du gène de résistance : c'est la partie « bust » du cycle qui correspond à la diminution de la fréquence du gène de résistance. Le cycle peut alors recommencer avec l'introduction d'un nouveau cultivar résistant (**Figure 5**).

b) Erosion de la résistance quantitative

L'érosion de la résistance est caractérisée par une augmentation graduelle et plus lente de la pathogénicité des agents pathogènes vis-à-vis des QTL de résistance contrairement à une résistance qualitative dont le contournement est rapide (**Figure 6**). L'érosion des résistances quantitatives est parfois difficile à démontrer dans des conditions naturelles, en raison de la forte interaction genotype/environnement à la fois pour les agents pathogènes et les plantes. En effet, le niveau de pathogénicité des populations de pathogènes peut fluctuer d'une année à l'autre selon les conditions environnementales et selon l'effet des QTL, également très dépendant de l'environnement. De plus, le fond génétique a un impact direct sur la durabilité de la résistance. En effet, plusieurs études ont montré qu'un gène majeur de résistance est plus rapidement contourné dans un fond sensible que partiellement résistant (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010; Fournet *et al.*, 2013). Des érosions de résistance ont déjà été observées dans la nature notamment pour la maladie de la septoriose du blé (Mundt, 2002) mais aussi dans des conditions expérimentales pour cette même maladie (Cowger & Mundt, 2002) ainsi que pour la tavelure du pommier (Caffier *et al.*, 2014, 2016) et le mildiou de la vigne (Delmas *et al.*, 2016).

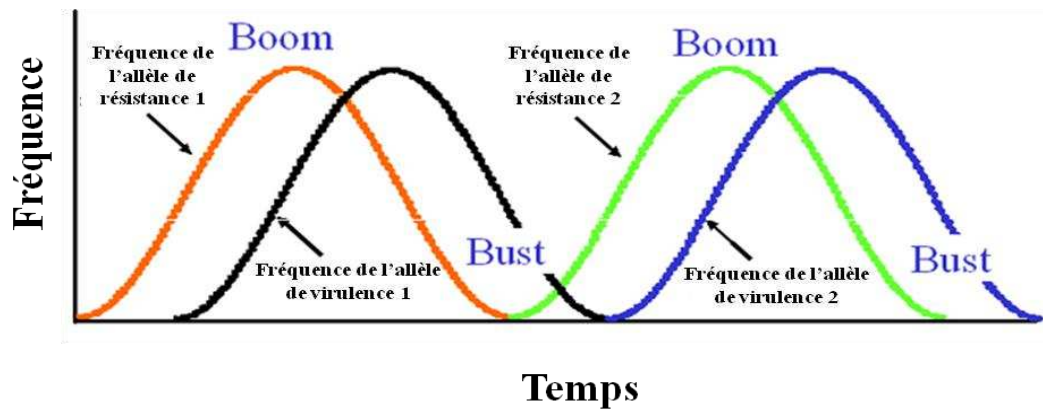


Figure 5 : Représentation schématique des cycles de « Boom and Bust » d'après Stakman (1957). Ce schéma met en avant un décalage de phase des fréquences des principaux allèles de résistance dans la population hôte et des allèles de virulence correspondant dans la population pathogène.

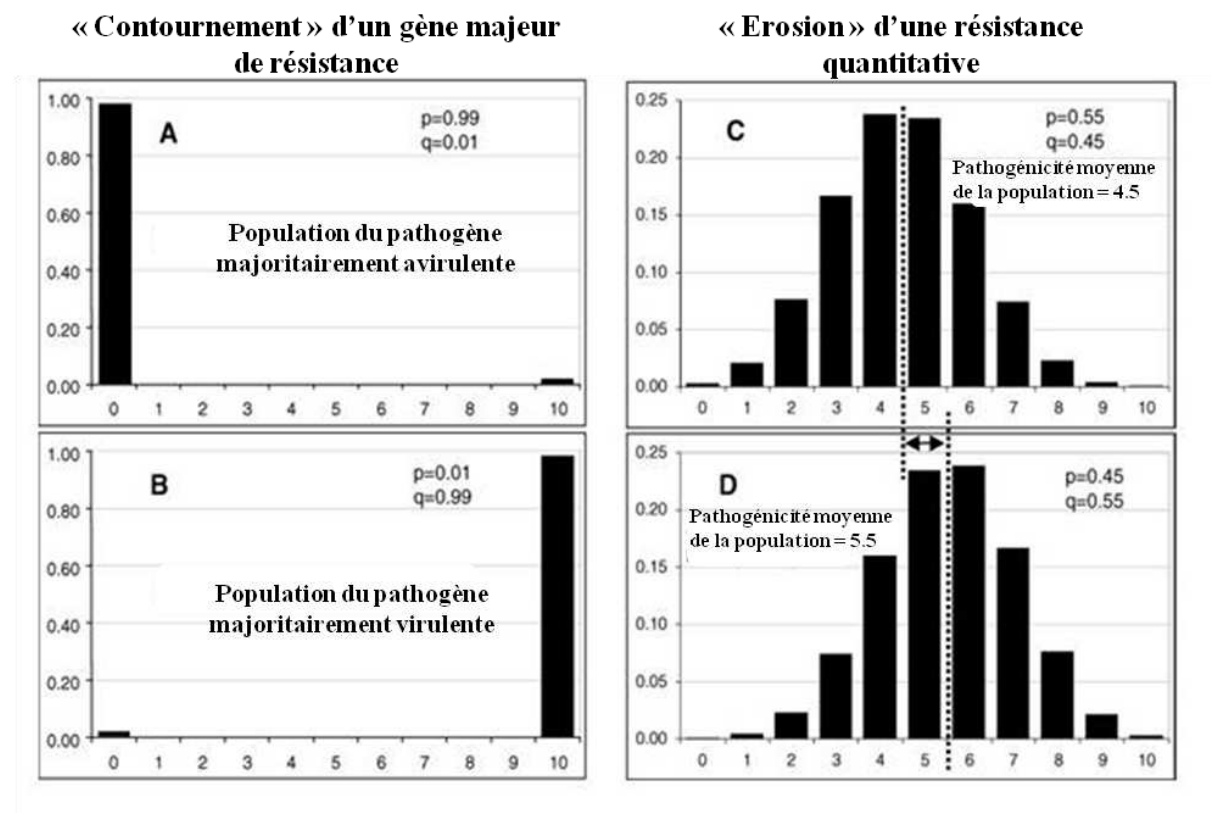


Figure 6 : Changement des fréquences des allèles des populations de pathogènes, lié au contournement de la résistance qualitative conférée par un gène majeur R (A et B) et à l'érosion de la résistance quantitative (C et D), d'après McDonald et Linde (2002). Les figures A et B montrent un changement rapide de l'avirulence à la virulence des populations de pathogènes associé au contournement d'un gène majeur R, ou p et q représentent les fréquences alléliques d'avirulence et de virulence, respectivement, dans la population des agents pathogènes. Les figures C et D montrent l'érosion de la résistance quantitative, caractérisée par une augmentation progressive de la pathogénicité à l'égard d'une population hôte portant un QTL.

2.3 Stratégies de gestion durable des résistances

Le choix de la stratégie à adopter pour gérer durablement une résistance est défini à la fois (i) par la connaissance des gènes majeurs R ou des QTL contrôlant la résistance et si possible de leurs mécanismes moléculaires sous-jacents ainsi que (ii) par la connaissance des traits d'histoire de vie de l'agent pathogène, de son potentiel évolutif et des déterminants génétiques de virulence. La stratégie la plus efficace doit permettre un déploiement spatio-temporel des gènes ou QTL de résistance de façon à minimiser la probabilité que la population de l'agent pathogène puisse évoluer pour contourner la résistance.

2.3.1 Déploiement des résistances

Afin de mettre en place des stratégies efficaces de gestion de la durabilité des résistances plusieurs approches de déploiement de gènes majeurs R et de QTLs dans le temps et dans l'espace ont été proposées.

Le déploiement séquentiel dans le temps de gènes majeurs consiste à utiliser un gène majeur de résistance jusqu'à son contournement puis à le remplacer par un autre gène majeur (REX Consortium, 2016). Cette méthode est efficace lorsque la sévérité de la maladie est faible ou lors de l'introduction d'une nouvelle population de pathogène (Mundt, 2014). De plus, certains gènes majeurs ont déjà montré une résistance durable. C'est le cas notamment du gène *Mlo* introgressé dans des variétés d'orge de printemps en Europe depuis 1979 pour lutter contre la maladie de l'oïdium (Acevedo-Garcia *et al.*, 2014) mais aussi des gènes *pvr2²* et *Pvr4* chez le piment et du gène *Ry* chez la pomme de terre (García-Arenal & McDonald, 2003) (**Figure 7a**).

Le déploiement spatio-temporelle, *i.e.* l'alternance périodique et la diversification de gènes de résistance sur un même site et sur des sites adjacents, évite de conférer un avantage sélectif aux agents pathogènes les plus virulents et limite leur dispersion. Le déploiement des gènes de résistance à l'échelle régionale prend donc en compte le paysage et la dynamique épidémique des populations d'agents pathogènes. Il nécessite d'étudier les facteurs qui influencent la dissémination spatiale d'une population d'agents pathogènes entre différents hôtes. Une bonne efficacité de cette stratégie nécessite une coordination dans le déploiement de ces résistances (**Figure 7b&c**). Une des premières initiatives organisées pour développer de telles mosaïques paysagères est le système britannique des 'groupes de diversification' des variétés de céréales pour la résistance aux maladies foliaires limitant l'implantation sur des parcelles adjacentes ou proches des variétés appartenant au même groupe, afin de créer des ruptures de sélection pour les populations de parasites (Mundt, 2002). Dans les années 1980, des travaux menés sur la rouille de l'avoine mettait déjà en avant l'efficacité de cette approche (Mundt & Browning, 1985). Cependant, elle reste malheureusement très difficile à mettre en œuvre du fait de la préférence des agriculteurs aux variétés les plus performantes et de la nécessité d'une concertation collective des acteurs à l'échelle du territoire.

2.3.2 Mélanges variétaux, multi-lignées

Le mélange variétal ou l'utilisation de multi-lignées qui diffèrent uniquement par leurs gènes de résistance entraîne une diversité génétique des sources de résistance au niveau parcellaire. La théorie du mélange variétal a été élaborée par Leonard (1969) grâce à l'utilisation de variétés résistantes jouant le rôle de barrière physique et permettant de réduire la dispersion de l'agent pathogène via la réduction du nombre de spores et donc la dilution de l'inoculum. Cette méthode, largement utilisée pour la maladie de la rouille et de l'oïdium du blé, est désormais appliquée à plusieurs pathosystèmes (Mundt, 2002) (**Figure 7d**). En Chine, des associations de variétés de riz très sensibles à la pyriculariose et de variétés hybrides plus résistantes ont permis de diminuer fortement la sévérité de la maladie, de 20% dans les cultures monovariétales à 1% dans les associations (Zhu *et al.*, 2000). En Colombie, des multi-lignées de caféiers ont été déployées pour lutter efficacement contre la rouille orangée due à *Hemileia vastatrix* (Moreno-Ruiz & Castillo-Zapata, 1990). L'efficacité des mélanges est cependant très variable d'un essai à l'autre : entre 9% et 80% pour l'oïdium de l'orge et entre 13 et 97 % pour la rouille du blé (Mikaberidze *et al.*, 2015). Cette variabilité des résultats est le plus souvent liée au nombre et au pourcentage de variétés sensibles versus résistantes composant le mélange ainsi qu'aux traits architecturaux de ces variétés.

2.3.3 Pyramidage de résistances

Le pyramidage de gènes de résistance à effets majeurs et/ou mineurs est une stratégie prometteuse (**Figure 7e**) (Mundt, 2018). Trois types de pyramidage peuvent être distingués i) le pyramidage de gènes majeurs ii) le pyramidage de QTL de résistance iii) le pyramidage de QTL à effet partiel et de gènes ou QTL majeurs (Pilet-Nayel *et al.*, 2017). L'association de gènes majeurs de résistance est supposée augmenter la durabilité de la résistance. En effet, le contournement de cette résistance suppose que l'agent pathogène subisse plusieurs mutations lui conférant des allèles de virulence correspondant aux gènes de résistance combinés, ce qui est peu probable (McDonald & Linde, 2002). Cependant, la durabilité de pyramides de gènes de résistance peut être compromise par la présence de mutations dépendantes ou la pré-existence d'un ou de plusieurs facteurs de virulence dans les populations de l'agent pathogène, ou encore par des modes d'action redondant des gènes de résistance (Brown, 2015). Un des plus grands succès du pyramidage de gènes concerne le contrôle des épidémies de rouille noire et brune du blé (stem and leaf rust). Depuis les années 1950, la combinaison de gènes majeurs de résistances à différentes races de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* a permis de garder indemne les cultures de blé. Les mécanismes potentiels de la durabilité des combinaisons employées incluent le nombre de gènes majeurs pyramidés, l'association gènes majeurs – résistance quantitative au stade adulte (gène *Sr2*) et l'effet des combinaisons de gènes sur la fitness de l'agent pathogène (Mundt, 2018). Le pyramidage de gènes devrait être plus efficace lorsqu'aucun des gènes majeurs n'a été préalablement exposé à la population d'agents pathogènes, et lorsque le parasite est asexué, impliquant que la virulence ne puisse être apportée par recombinaison (Brown, 2015). Toutefois, compte tenu de la grande taille des populations de microorganismes pathogènes, la mutation à elle seule peut suffire à créer de nouvelles combinaisons génétiques

contournant des gènes ou combinaisons de gènes de résistance. Ainsi, en Ouganda en 1999, certains gènes de résistance, dont le gène *Sr31* de résistance à la rouille noire du blé réputé très durable, ont été contournés par la race UG99 de *Puccinia graminis* dont la virulence a été acquise par mutation et qui se disperse rapidement à travers le monde. Ceci montre que le pyramidage de gènes n'est pas nécessairement durable (Schumann & Leonard, 2000; Singh *et al.*, 2011).

Le pyramidage de QTL de résistance permet également d'augmenter la durabilité des résistances. L'effet pleiotrope des QTL de résistance sur les différentes étapes du développement épidémique de l'agent pathogène pourrait expliquer le caractère durable de ces combinaisons. En effet, dans plusieurs pathosystèmes, les QTL de résistance ont montré un mode d'action sur plusieurs étapes du cycle de l'agent pathogène, incluant notamment la période de latence, l'efficacité d'infection, la colonisation de la plante et la multiplication du pathogène (Pilet-Nayel *et al.*, 2017).

Le pyramidage de QTL à effet partiel et de gènes majeurs a montré un intérêt pour préserver la durabilité de gènes majeurs résistance chez différents pathosystèmes impliquant virus, champignon et nématode (Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Dans le pathosystème *Brassica napus/Leptosphaeria maculans*, Brun *et al.*, 2010 et Delourme *et al.*, 2014 ont montré que huit années de sélection récurrente des populations pathogènes ont été nécessaires pour contourner la résistance conférée par le gène majeur *Rlm6* lorsque celui-ci était introduit dans un fond génétique partiellement résistant, alors que seulement trois années ont été nécessaires lorsque le gène majeur était présent dans un fond génétique sensible. Chez la pomme de terre, la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* conféré par un QTL à effet majeur (*GpaVvrn*) de *Solanum vernei*, qui agit en masculinisant les populations de nématodes, a été contourné après 8 ans de sélection récurrente en laboratoire. La rapidité avec laquelle la résistance a été contournée dépendait du fond génétique dans lequel *GpaVvrn* avait été introduit (Fournet *et al.*, 2013) suggérant que des QTL à effets faibles pourraient améliorer la durabilité du QTL *GpaVvrn*. Dans le cas de résistances à *Meloidogyne* spp., Barbary *et al.* (2014, 2016) ont également démontré que l'efficacité et la durabilité des gènes majeurs *Me1* et *Me3* dépendaient du fond génétique dans lequel ils avaient été introduits. Chez le piment, la combinaison de l'allèle majeur *pvr2*³ de résistance au virus de la pomme de terre Y (PVY) et de trois QTL de résistance a augmenté significativement la durabilité de la résistance (Palloix *et al.*, 2009; Quenouille *et al.*, 2013). Les mécanismes évolutifs sous-jacents à l'effet protecteur des QTL de résistance sur le gène majeur ont été suggérés multiples (Quenouille *et al.*, 2013), incluant : (i) la capacité réduite du virus à se multiplier, (ii) le nombre accru de mutations nécessaires pour que le virus devienne virulent et (iii) la sélection ralentie de variants virulents du virus.

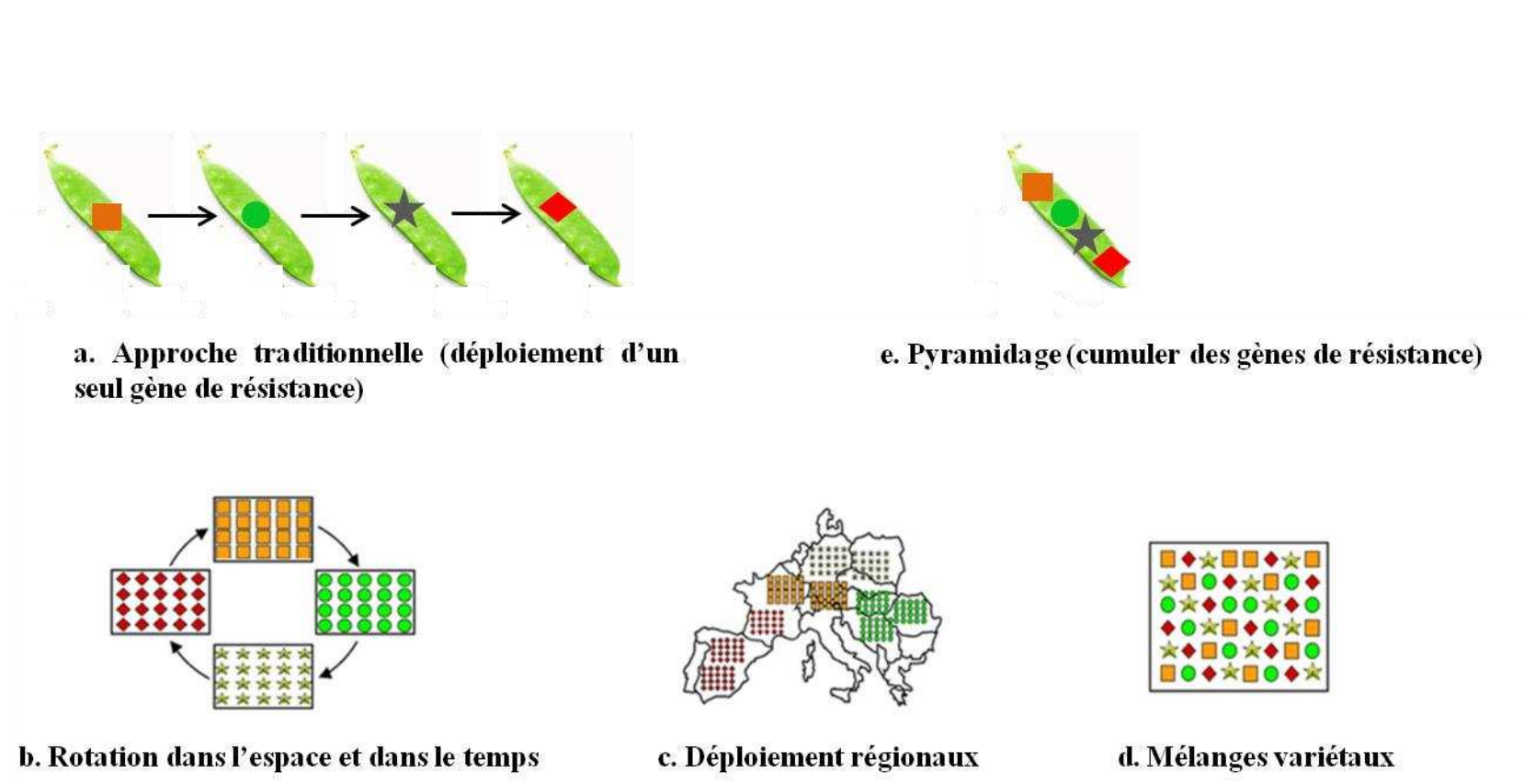


Figure 7 : Stratégies de déploiement des gènes de résistance d'après McDonald et Linde (2002). Face à l'approche traditionnelle du déploiement d'un seul gène de résistance (a), deux grandes familles de stratégies peuvent être élaborées. 1) Diversifier dans l'espace et dans le temps les gènes de résistance (b, c, d). 2) Pyramider les gènes de résistance en cumulant plusieurs gènes de résistance au sein d'une même variété

2.4 Spécificités de la gestion durable des résistances aux agents pathogènes telluriques

Les agents pathogènes telluriques affichent une dispersion sur de courtes distances et sont donc peu soumis aux flux de gènes limitant ainsi le niveau de diversité génétique. Cependant le niveau de spécialisation des agents pathogènes pourrait impacter cette diversité par une sélection différentielle de certains variants par l'hôte. Les phytopathologistes ont largement supposé que le même génotype d'un agent pathogène tellurique provoque la maladie sur différents hôtes ou tissus différents, mais cette hypothèse a rarement été testée (Milgroom & Peever, 2003). En outre, la multiplication de l'agent pathogène dans le sol par reproduction sexuée et/ou asexuée peut augmenter la charge fongique et entraîner ainsi une érosion de la résistance. Il est donc primordial de mettre en œuvre des stratégies de gestion durable des résistances en limitant la taille et le niveau de diversité génétique des populations des agents pathogènes telluriques.

A ce jour, la **rotation culturale des plantes hôtes avec des plantes non-hôtes** reste une stratégie de gestion durable et efficace pour les maladies telluriques. Cette méthode de lutte vient en complément de l'utilisation de variétés résistantes qui peut permettre un contrôle efficace de la maladie. Les flux de gènes entre populations d'agents pathogènes telluriques étant supposés très limités (aucune étude n'a, à ce jour, évalué l'impact des activités anthropiques sur le flux de pathogènes telluriques entre parcelles adjacentes), la gestion durable des résistances par l'utilisation de cultures non-hôtes en alternance, vise principalement la réduction de la taille des populations d'agents pathogènes. Ainsi, des rotations avec le maïs, permettent de réduire les populations de nématodes du soja (*Heterodera glycines*) dans le sol, augmentant ainsi le rendement du soja aux Etats-Unis (Grabau & Chen, 2016; Hu *et al.*, 2018). Cependant le choix de la rotation culturale non-hôte pour un agent pathogène peu spécialisé sera plus contraignant à mettre en œuvre pour la gestion durable des résistances, d'autant plus que cette règle est liée à la disponibilité des espèces intercalaires et au revenu économique pour l'agriculteur. La durée de conservation de l'agent pathogène dans le sol plus ou moins longue (de quelques mois à plusieurs dizaines d'années) peut impacter l'efficacité des rotations culturales. C'est pourquoi, une fréquence retardée de retour de la culture sensible est souvent recommandée pour lutter contre les agents pathogènes dont les formes de survie sont résistantes pendant plusieurs années.

La **stratégie d'associations variétales** pour la gestion durable des résistances des agents pathogènes telluriques est peu documentée dans la littérature scientifique. Néanmoins, Djian-Caporalino *et al.*, 2014, dans une étude comparative de méthode de gestion de la durabilité de la résistance du piment (*Capsicum annuum*) pour le nématode (*Meloidogyne incognita*) menée pendant 3 ans, a montré que le mélange de deux cultivars portant différents gènes de résistance semble être relativement peu efficace pour limiter la multiplication du pathogène contrairement au pyramidage qui affiche un haut niveau d'efficacité pour limiter la multiplication du pathogène dans le sol.

Le pyramidage de gènes ou QTL de résistance semble une voie plus prometteuse pour gérer durablement les résistances aux agents pathogènes telluriques. Ainsi comme déjà mentionné dans la partie 1.2.3 c) des travaux de pyramidage de QTL de résistance aux nématodes ont mis en avant leur efficacité sur plusieurs années. Cependant, pour que cette stratégie soit efficace dans le temps, sa combinaison à d'autres stratégies de lutte est un élément clé.

3. Présentation du modèle d'étude : pois/*Aphanomyces euteiches*

3.1 L'hôte : le pois protéagineux *Pisum sativum*

Le pois protéagineux est une culture riche en protéines, présentant en Europe un fort débouché en alimentation animale, mais également en alimentation humaine pour l'export. En effet, la graine de pois contient environ 21% de matières azotées et 44% d'amidon. En mélange avec du blé, qui en contient respectivement 11% et 59%, elle peut être utilisée en substitution du soja (46% de matières azotées et 3% d'amidon) dans les aliments du bétail. Récolté en grains secs, le pois protéagineux se distingue du pois fourrager qui est récolté vert à floraison. Depuis 20 ans, une baisse des surfaces cultivées et de la production a été observée, dû à une politique de prix défavorable et à l'instabilité des rendements de la culture du fait de sa sensibilité aux stress biotiques et abiotiques. Néanmoins, le fort besoin en autonomie protéique de l'Europe et de la France s'est traduit récemment par une nouvelle hausse de la production (**Encadré 3**).

Cette culture présente de nombreux avantages, notamment écologiques par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique via la fixation symbiotique de la plante et ne nécessite dès lors aucune fumure azotée minérale et organique. Une succession de cultures comportant du pois permettrait de réduire de 20% les émissions de N₂O sur trois ans (Carrouée *et al.*, 2012). Ce bénéfice environnemental s'intègre dans l'initiative 4 pour 1000 lancée en 2015 lors de la COP21 et élaborée par des chercheurs d'INRAE pour restaurer la fertilité des sols et piéger les gaz à effet de serre. En effet, la réduction de la fertilisation azotée dans les systèmes de culture est le principal levier pour réduire l'impact des productions végétales sur les gaz à effet de serre et l'environnement.

D'un point de vue agronomique, le pois possède de nombreux atouts en rotation ou en association avec des céréales. En rotation, c'est l'un des meilleurs précédents du blé et du colza car il permet d'améliorer leurs rendements (+ 6 à 12 q/ha pour le blé ; + 0.5 à 3 q/ha pour le colza en moyenne pluriannuelle) tout en réduisant l'apport azoté (-20 à -60 kg/ha d'azote) (sources Terres Inovia). En culture d'associations, le pois, grâce à un choix variétal judicieux présente un effet majeur sur la maîtrise des parasites et des adventices (Crozat *et al.*, 2000; Corre-Hellou *et al.*, 2006). Ces associations permettraient de limiter la pression sanitaire des maladies aériennes, par l'interférence physique de plantes non hôtes qui joueraient le rôle de barrière physique à la propagation des maladies. Les associations permettraient également de réduire la quantité de mauvaises herbes par rapport aux cultures pures ainsi que les risques de verse, la céréale servant de tuteur pour le pois. Des études d'associations en agriculture

conventionnelle et biologique ont montré de meilleurs rendements et une hausse du taux protéique du blé et de l'orge par rapport à une culture pure (Corre-Hellou *et al.*, 2006).

3.2 Culture du pois protéagineux

Le pois, *Pisum sativum*, appartient à la famille des Légumineuses ou Fabacées et au genre *Pisum*. Il s'agit d'une plante diploïde ($2n=14$ chromosomes) annuelle et autogame. Les variétés commercialisées sont des lignées pures. On distingue deux types de culture, la culture d'hiver semée de mi-octobre à mi-novembre et la culture de printemps semée de mi-mars à début avril quand les conditions de sol le permettent. Le pois de printemps est prédominant en France. Cependant, sur le plan agronomique, les variétés de type printemps sont plus sensibles aux basses températures en début de cycle, aux stress abiotiques de fin de cycle (sécheresse, fortes chaleurs) et aux parasites, et nécessitent souvent un recours à l'irrigation pour sécuriser les rendements. Le pois d'hiver, quant à lui, plus résistant au froid, présente l'avantage de développer son stade de formation et de remplissage des grains lors de conditions climatiques plus propices (avril-mai), résultant en de meilleurs rendements. Il ne nécessite pas d'irrigation et échappe à certains stress pendant la floraison et en fin de cycle. Depuis plusieurs années, des efforts de sélection ont porté sur des variétés d'hiver notamment sur l'échappement aux dégâts du gel à floraison grâce au gène *Hr* (*Highly responsive to photoperiod for floral initiation*) de réponse à la photopériode permettant des semis d'automne précoces (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008).

3.3 Ravageurs et maladies du pois protéagineux

Le pois protéagineux est soumis à un certain nombre de stress biotiques parmi lesquels on retrouve plusieurs ravageurs ainsi que des maladies aériennes et telluriques pouvant être très préjudiciable pour les rendements. Parmi les ravageurs, le puceron vert est le plus fréquent et le plus nuisible avec des pertes de rendements allant jusqu'à 30q/ha. Les thrips peuvent également diminuer le rendement de 30q/ha selon les années. La larve de sitone est préjudiciable lorsqu'elle s'attaque au système racinaire et aux nodosités provoquant des pertes de 10 à 15 q/ha. La nuisibilité des cécidomyies est variable selon leur date d'arrivée et est d'autant plus grave que le nombre d'étages fructifères formés est faible. Enfin la brûche et la tordeuse nuisent à la qualité des graines (**Figure 8**) (Source : Terres Inovia).

Le pois protéagineux peut être sensible aux attaques de maladies aériennes au moment de la floraison. Les maladies les plus courantes, spécialement sur pois d'hiver, sont l'ascochytose, le botrytis, la rouille et sclérotinia pouvant provoquer, respectivement, 20q/ha, 15q/ha, 12q/ha et 5q/ha de pertes en cas de fortes attaques (Source : Terres Inovia). D'autres maladies aériennes telles que l'oidium, le mildiou et la bactériose peuvent également provoquer des dégâts et des pertes de rendement. Parmi les pathogènes telluriques, des complexes parasitaires tels que

Pythium spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp. peuvent provoquer la fonte de semis. Néanmoins, la maladie tellurique la plus préjudiciable est la pourriture racinaire précoce, causée par l'agent pathogène *Aphanomyces euteiches*, devenue dommageable en France dans les années 1990. Elle constitue un facteur majeur d'instabilité des rendements observés depuis 20 ans en France (Figure 8).

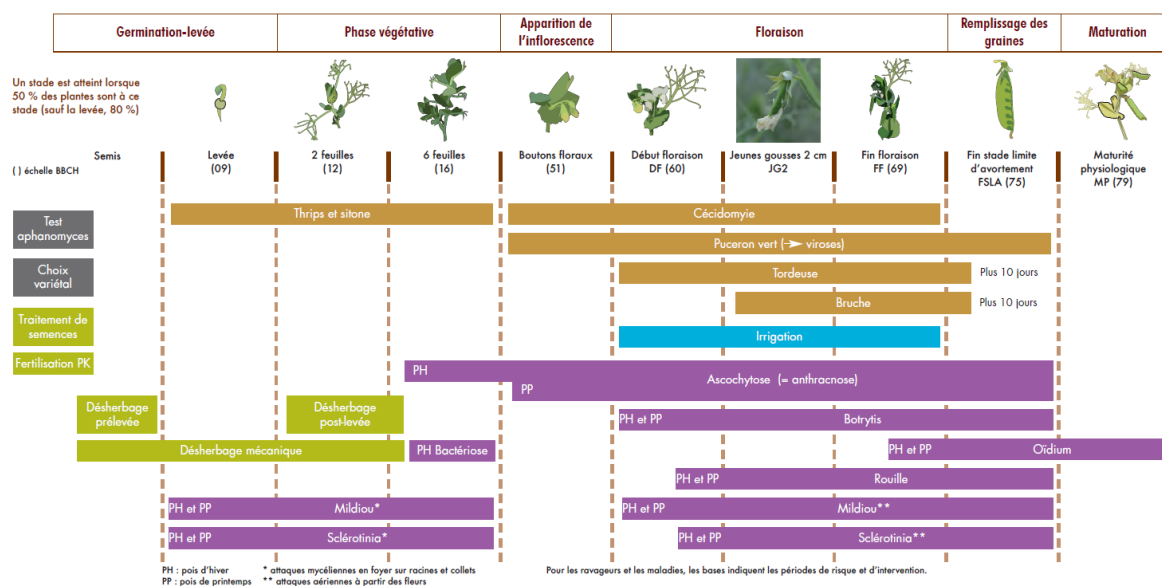


Figure 8 : Périodes de surveillance et d'intervention d'après le Guide de culture (Sources : Terres Inovia, 2021)

Encadré 3 : Production et débouchés du pois protéagineux en France

Quelques dates importantes

1970-1980 : développement de la culture suite à l'embargo décrété en 1973 par les Etats-Unis sur les exportations de tourteaux de soja.

1990 : baisse des surfaces suite à la réforme de la PAC (Politique Agricole Commune) et à la baisse des aides communautaires.

2010 : plan de relance pour les protéagineux, appliqué par l'Union Européenne et le gouvernement dans le but de stopper le déclin et la perte d'indépendance en matière protéique.

2014 : mise en place d'un nouveau plan protéines végétales par le gouvernement afin de développer une filière protéines végétales performantes et durables.

Quelques chiffres

Premier producteur européen (production dans la moitié Nord (Grand-Est, Hauts de France, Centre Val de Loire))

Surfaces actuelles en hausse : 154 000 ha en 2019 à 209 000 ha en 2020 (**Figure 9**)

Décrochage des rendements de l'ordre de 27.7 q/ha pour 2020 selon la SSP contre 40.5 q/ha en 2019.

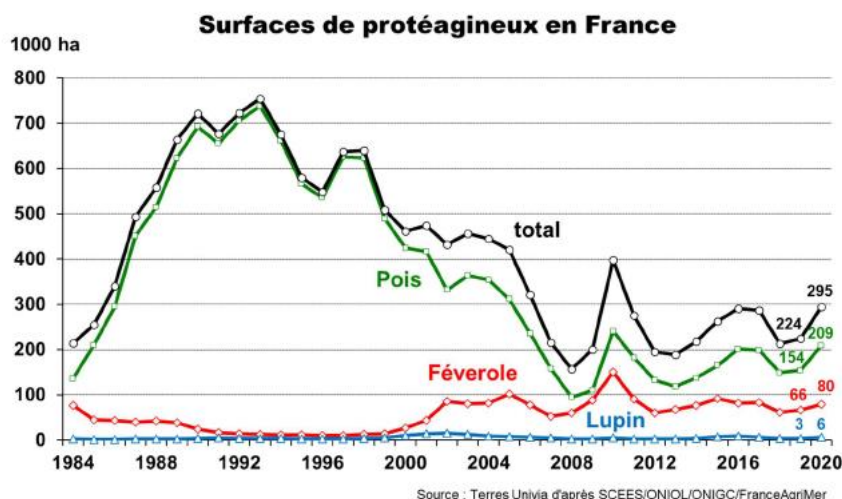


Figure 9 : Evolution des surfaces de protéagineux en France entre 1984 et 2020 (Sources : Terres Univia)

Débouchés actuels

Exportation principalement à destination des pays de l'Union européenne (92 % des exportations en 2018-2019). Depuis 2012-2013, la Belgique est le principal client de la France avec 127 kt importées en 2018-2019. Le premier débouché extra-communautaire est la Suisse avec 6,3 kt importées en 2018-2019 (Sources : FranceAgriMer).

3.4 Le pathogène: *Aphanomyces euteiches*, agent de la pourriture racinaire

Le genre *Aphanomyces* appartient à l'ordre des oomycètes (*Saprolegniales*) phylogénétiquement séparé des autres ordres, tels que les *Peronosporales* ou les *Pythiales*, dans lesquels d'autres agents pathogènes végétaux importants se retrouvent (Petersen & Rosendahl, 2000). Ce genre regroupe à la fois des parasites de végétaux, d'arthropodes (e.g. *A. astaci* responsable de la peste de l'écrevisse) et de vertébrés (e.g. *A. invadans* responsable du syndrome ulcératif des poissons). Parmi les agents pathogènes végétaux les plus importants du genre, on retrouve *A. cladogamus* qui a un spectre d'hôte assez large (tomate, épinard, lin, poivron, radis, aubergine, pensée), *A. cochlioides* capable d'infecter la betterave et l'épinard, ainsi qu'*A. euteiches*. La spécialisation des espèces du genre *Aphanomyces* à l'hôte animal ou végétal est très ancienne (50 millions d'années) (**Figure 10 & 11**) (Gaulin *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018).

Aphanomyces euteiches a été décrit pour la première fois aux Etats Unis en 1925 par Jones et Drechsler après une vaste enquête menée en 1924 pour déterminer l'importance des maladies du pois dans le Wisconsin. Cet agent pathogène a été reconnu comme l'un des plus nuisibles sur cette culture (Jones & Drechsler, 1925). En Europe, il a été observé pour la première fois en Norvège en 1925 (Sundheim, 1972) et a été décrit en France quelques années plus tard (Labrousse, 1933). On le retrouve désormais dans les diverses régions du monde productrices de pois tels que l'Australie, la Nouvelle Zélande, le Japon, l'Europe et l'Amérique du Nord. En France, malgré sa présence très ancienne, il est reconnu comme très dommageable dans les zones de production du Bassin Parisien et du Nord de la France depuis 1993 (Didelot & Chaillet, 1995).

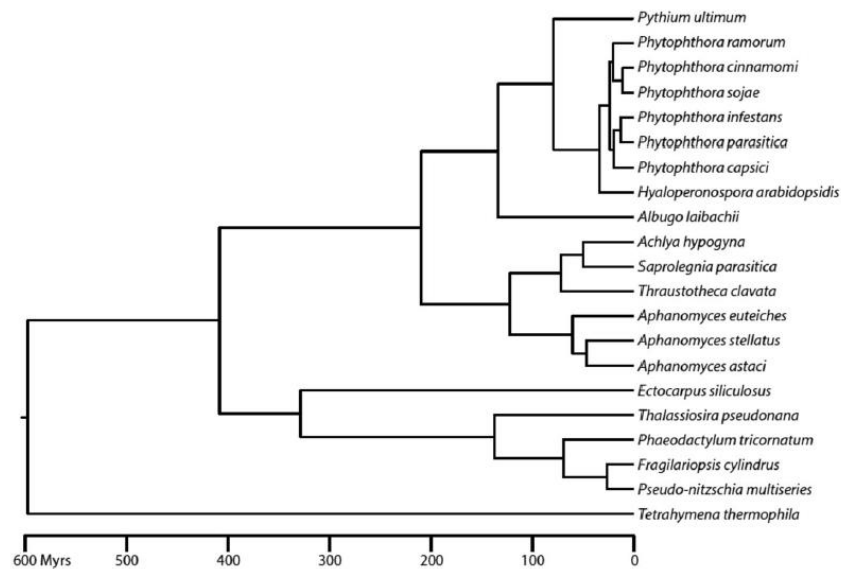


Figure 10 : Arbre phylogénétique de l'évolution temporelle d'oomycètes, d'après Gaulin *et al.* (2018). Les espèces *Aphanomyces* font partie d'un groupe qui a divergé des autres Saprolegniales (*Saprolegnia parasitica*, *Achlya hypogyna*, *Thraustotheca clavata*) il y a 100 millions d'années. Les trois espèces d'*Aphanomyces* ont quant à elle divergée il y a 50 millions d'années.

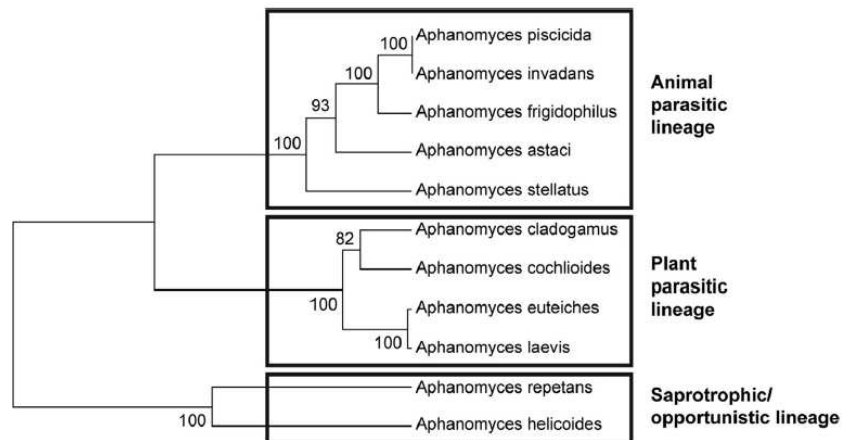


Figure 11 : Arbre phylogénétique basé sur les analyses des séquences ITS de l'ADN r nucléaire des principales espèces d'*Aphanomyces* identifiées d'après Iberahim *et al.*, (2018). Trois lignées se distinguent sur la base de leur mode de vie, *i.e* pathogène végétal, animal et saprophyte/opportuniste

3.4.1 Symptômes

Les symptômes de la maladie apparaissent sur pois de printemps dès le stade 3-4 feuilles lorsque les conditions pédoclimatiques sont favorables. Ces symptômes se manifestent à deux niveaux de la plante. Sur les parties racinaires, des lésions molles et translucides sont observables sur les radicelles dès 3-4 jours après infection. Ces lésions évoluent en pourriture « brun-miel » et envahissent tout le système racinaire. Cette pourriture peut atteindre l'épicotyle et provoquer un étranglement caractéristique. Plus tard dans la saison, les racines et les nodosités se dessèchent. Parfois, ces lésions permettent l'infection par des organismes secondaires détruisant tout le système racinaire et les tissus de couleur « brun-miel » deviennent sombres (**Figure 12B**). Sur les parties aériennes, le symptôme dit secondaire se traduit par un nanisme, un jaunissement des feuilles, un flétrissement et un dessèchement des plantes (Hagedorn, 1991). A l'échelle parcellaire, la maladie se développe par foyers faisant apparaître des ronds jaunes (**Figure 12A**). Lors d'une attaque importante, les plantes touchées produisent très peu d'étages de gousses et la maladie peut engendrer des pertes de rendement de 20 à 50 q/ha.

3.4.2 Cycle biologique

A.euteiches est un pathogène homothallique à mode de vie plutôt hémibiotrophe, démarrant par une phase biotrophe de colonisation des tissus vivants avec observation d'haustorium (Franken *et al.*, 2007) avant de devenir nécrotrophe avec observation et multiplication de la forme sexuée dans les tissus morts. La maladie de la pourriture racinaire est monocyclique, présentant un seul cycle par saison (Hughes & Grau, 2007). Le cycle infectieux est constitué d'une phase sexuée et d'une phase asexuée. L'inoculum primaire est constitué d'oospores (spores à double membrane issu de la reproduction sexuée) présentes dans les débris racinaires de l'hôte ou à l'état libre dans le sol. Ces spores de repos ont une durée de vie très longue (10 à 20 ans dans le sol) et sont capables de résister aux conditions extrêmes telles que la sécheresse ou le gel (Sherwood & Hagedorn, 1962). Lorsque les conditions favorables sont réunies (température, humidité), la phase asexuée débute par la germination directe ou indirecte des oospores. La germination directe se traduit par l'émission d'un tube germinatif qui produit des hyphes et la germination indirecte fait intervenir la formation de sporanges qui libèrent des zoospores biflagellées, mobiles correspondant à l'unité infectieuse. Il est admis qu'une oospore permet de libérer en moyenne 300 à 400 zoospores (Malvick & Percich, 1998). La phase sexuée du cycle infectieux démarre une fois les zoospores libérées. La germination des zoospores est favorisée par la libération d'exsudats racinaires de la plante hôte (Shang *et al.*, 2000). Les zoospores libérées, viables pendant 5 jours, peuvent se déplacer dans l'eau libre du sol via leurs flagelles pour atteindre les racines de l'hôte par chimiotactisme et s'enkyster à leur contact après avoir perdu leurs flagelles (Deacon & Saxena, 1998). La germination des zoospores conduit à la formation d'un tube germinatif. Les hyphes issus du tube germinatif progressent dans les espaces inter- et intra- cellulaires de la racine. Dès le quatrième jour de l'infection, les hyphes se différencient en oogones (organe femelle) et en

anthéridies (organe mâle). La reproduction sexuée peut alors avoir lieu avec pénétration des anthéridies dans les oogones grâce à un tube de fertilisation pour former des oospores diploïdes. De nombreux oospores se retrouvent dans les tissus racinaires et serviront d'inoculum primaire pour l'infection suivante (**Figure 13**).



Figure 12 : Symptômes de pourriture racinaire sur plantes. A : Champ de pois infesté par *Aphanomyces euteiches* avec des symptômes de jaunissement. B : Symptômes de pourriture racinaire sur plantule de pois (Sources : INRAE)

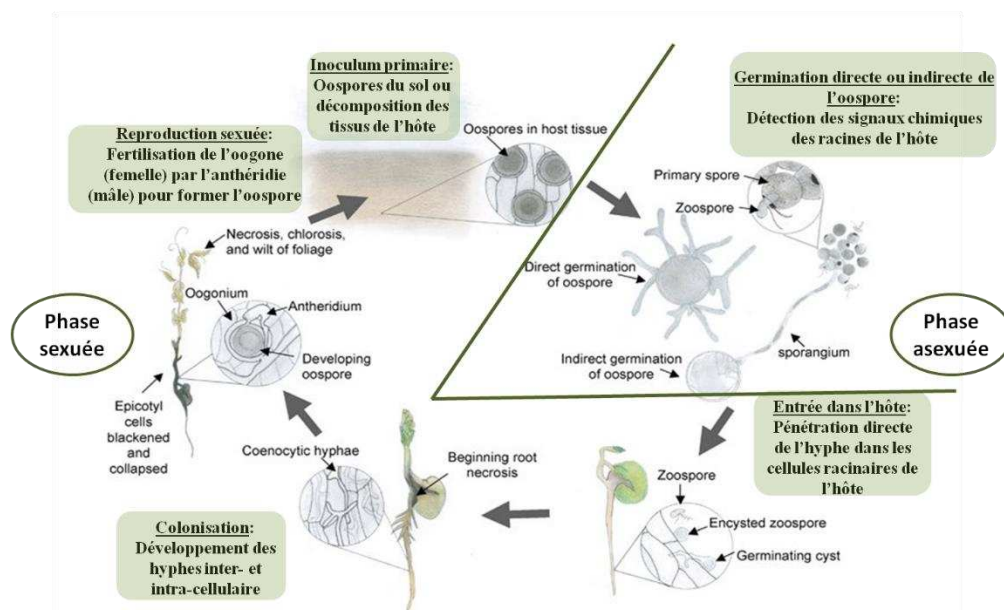


Figure 13 : Cycle infectieux d'*Aphanomyces euteiches*, d'après Hughes & Grau (2007)

3.4.3 Épidémiologie

Le développement d'*A. euteiches* est conditionné par plusieurs facteurs majoritairement pédoclimatiques. Ainsi, une **pluviométrie** importante et des températures supérieures à 15°C favorisent l'expression de la maladie et expliquent entre autre la nuisibilité plus importante de la maladie sur pois de printemps (Moussart *et al.*, 2016). Les basses températures, de l'ordre de 5°C, empêchent la maladie de s'exprimer. **La charge fongique du sol** est un facteur majeur qui va également conditionner l'infection et le développement de la maladie. Pour évaluer le taux de contamination d'une parcelle, une mesure du **potentiel infectieux (PI) du sol** a été mise au point par Malvick *et al.* (1994). Ces auteurs ont référé la mesure du PI à celle d'un index de l'activité potentielle de la maladie qui prend en compte le niveau d'infection et la densité des propagules ainsi que les facteurs du sol favorisant ou inhibant l'infection des racines. Une forte corrélation entre la sévérité de la maladie et le niveau de potentiel infectieux de la parcelle a ainsi pu être établi (Moussart *et al.*, 2009). Les conditions édaphiques (**structure et réceptivité du sol**) jouent également un rôle important dans le niveau de potentiel infectieux des parcelles. Les sols lourds, peu drainants et compacts sont favorables au stress hydrique et ainsi au développement d'*A. euteiches*. En outre, le tassement est un facteur aggravant par une augmentation de l'humidité volumique du sol, favorable à la formation de sporanges et au déplacement des zoospores vers les racines (Allmaras *et al.*, 2003). De plus, une faible aération du sol peut également amplifier le chimiotactisme suite à la libération d'éthanol par les racines asphyxiées (Allen & Newhook, 1973). Le pH du sol jouerait également un rôle important dans le développement de la maladie. D'après Papavizas & Ayers (1974), *A. euteiches* peut se développer lorsque le pH est compris entre 4 et 8 avec un optimal se situant entre 5 et 6.5. Les sols très calcaires ont, quant à eux, été montrés comme étant peu réceptifs à la maladie en inhibant la production des zoospores contrairement aux sols limoneux et/ou argileux (Persson & Olsson, 2000; Heyman *et al.*, 2007). En France, des sols non réceptifs avec un pH supérieur à 8 ont été identifiés en Champagne dans les sols de craie (Wicker & Rouxel, 1998). Bien que l'ensemble de ces facteurs pédoclimatiques et édaphiques impactent le développement de la maladie, la première cause d'augmentation des épidémies de pourriture racinaire par *A. euteiches* reste la **fréquence de retour du pois**. Oyarzum *et al.* (1993) ont ainsi observé une corrélation entre la sévérité de la maladie et la fréquence des cultures de pois et d'autres légumineuses sur une période de 18 ans. Selon les auteurs, le temps nécessaire pour diminuer le niveau d'infestation d'une parcelle fortement infestée jusqu'à un niveau acceptable varie de 5-6 ans à 15 ans (Olofsson, 1967; Temp & Hagedorn, 1967).

La **dissémination** d'*A. euteiches* dans le sol se fait à courte distance par contact direct entre racines, par la mobilité des zoospores dont la distance parcourue excède rarement 15 cm (Pfender & Hagedorn, 1983; Willocquet *et al.*, 2007) et par ruissellement, les sols sableux étant plus favorables à la dispersion des zoospores que les sols argileux (McDonald, 1997). L'activité anthropique est souvent à l'origine de la dissémination sur de plus longues distances *via* les machines agricoles. Aucun cas de dissémination par les semences n'a été identifié.

Des études sur la **distribution spatiale** de l'agent pathogène dans le sol ont mis en avant une distribution horizontale non homogène expliquant ainsi sa présence sous forme de foyers infectieux (Moussart *et al.*, 2008b; Gibert *et al.*, 2021). Les travaux menés sur la distribution

verticale ont montré une distribution maximale du pathogène entre 10 et 30 cm de profondeur correspondant à la zone de colonisation racinaire et de conservation de l'inoculum. Le potentiel infectieux est quant à lui faible dans l'horizon i) 0-10 cm en raison de l'assèchement du sol et de l'irradiation de l'inoculum aux UV et ii) 50-60 cm dû à la faible colonisation racinaire et un taux d'oxygène faible (Moussart *et al.*, 2008b)

3.4.4 Structuration et évolution des populations d'*A. euteiches*

a) Une structuration selon le pouvoir pathogène

A. euteiches a un spectre d'hôtes très large car en conditions contrôlées il est capable d'infecter plusieurs familles botaniques incluant spécialement les légumineuses, mais aussi certaines espèces de graminées, brassicacées et solanacées (Papavizas & Ayers, 1974). Dans le cas des légumineuses, *A. euteiches* est capable d'infecter d'autres espèces que le pois (*Pisum sativum*) (Papavizas & Ayers, 1974), telles que la luzerne (*Medicago sativa*) (Delwiche *et al.*, 1987), la féverole (*Vicia faba*) (Lamari & Bernier, 1985), le haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Pfender & Hagedorn, 1983), la vesce commune (*Vicia sativa*) (Tsvetkova & Kotova, 1985), le trèfle (*Trifolium pratense*) (Tofte & Smith, 1992); *Trifolium subterraneum* (Burnett *et al.*, 1994) et la lentille (*Lens culinaris*) (Lamari & Bernier, 1985). Une spécificité d'hôte des souches d'*A. euteiches* a toutefois été décrite dans plusieurs études. Ainsi une forme spéciale sur haricot, *A. euteiches* f.sp. *phaseoli*, a été mise en évidence par Pfender & Hagedorn en 1983. Des souches isolées sur vesce et luzerne ont également montré un spectre d'hôtes étroit (Malvick *et al.*, 1998; Levenfors *et al.*, 2003).

En France, plusieurs travaux ont montré que les souches françaises isolées sur pois avaient un large spectre d'hôtes. Wicker *et al.* (2001) ont ainsi identifié 4 phénotypes de virulence parmi 91 souches françaises isolées sur pois et caractérisées pour leur niveau d'agressivité sur 5 espèces de légumineuses (pois, vesce, luzerne, féverole, haricot). Une étude réalisée en conditions contrôlées avec une souche française isolée sur pois (Moussart *et al.*, 2008a) a identifié une faible variabilité de réponse à l'infection parmi divers génotypes de (i) lentille, luzerne et haricot qui ont montré une sensibilité à la maladie et (ii) pois chiche et lupin qui se sont montrés, respectivement, résistants et sans symptômes. En outre, une forte variabilité de réponse intra-spécifique a été mise en évidence au sein de génotypes de vesce commune, féverole et trèfle qui ont montré différents niveaux de sensibilité et de résistance à la maladie. Sur le pois, deux pathotypes d'*A. euteiches* ont été identifiés dans une étude comparant des souches d'*A. euteiches* d'origines française et américaine, sur la base de leur pouvoir pathogène sur une gamme différentielle de six génotypes (Wicker *et al.*, 2003). Le pathotype I incluant la totalité des souches françaises testées (9 souches), a présenté des différences d'agressivité vis-à-vis des génotypes de pois de la gamme différentielle testée. Récemment, ce pathotype a été montré comme majoritaire dans les populations canadiennes d'*A. euteiches* (Sivachandra Kumar *et al.*, 2021). Le pathotype III, identifié parmi les souches isolées dans certaines régions des Etats-Unis, a été caractérisé par une moindre agressivité des souches sur l'un des génotypes de la gamme différentielle, le génotype MN313 (**Figure 14**) (Wicker & Rouxel, 2001). Une

souche de référence a été choisie pour chaque pathotype, à savoir RB84 et Ae109, respectivement, pour le pathotype I et III. Ces deux souches de référence ont été utilisées par la suite dans de nombreux travaux en pathologie, génétique et sélection (Moussart *et al.*, 2008a; Lavaud *et al.*, 2015). Une différenciation de races a également été observée pour d'autres espèces hôtes. Ainsi, sur la luzerne, deux races ont été identifiées au sein de plusieurs souches isolées dans différentes régions des Etats-Unis et caractérisées pour leur pouvoir pathogène sur trois populations de luzerne (Malvick & Grau, 2001) (**Figure 15**).

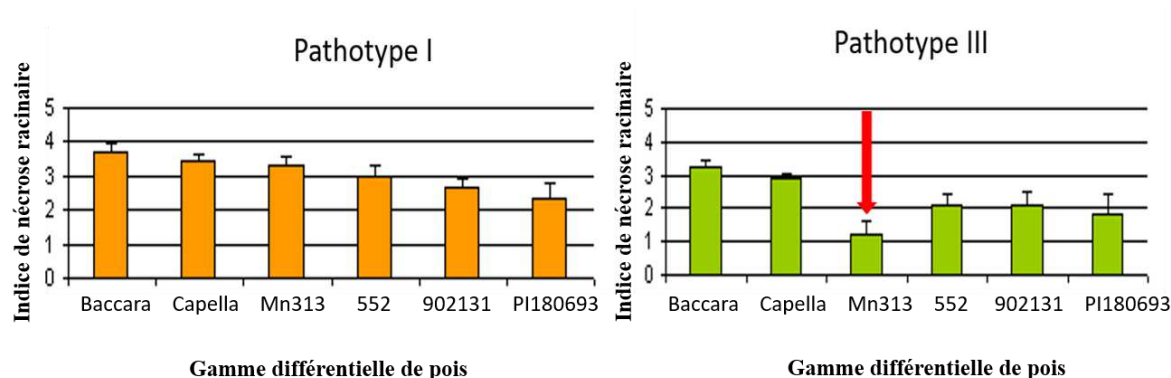


Figure 14 : Principaux pathotypes d'*Aphanomyces euteiches* mis en évidence par la mesure de l'indice de nécrose racinaire sur une gamme différentielle de six géotypes de pois, d'après Wicker & Rouxel (2001). Cette gamme est constituée de deux géotypes sensibles (Baccara et Capella) et trois géotypes partiellement résistants (552, 90-2131, PI180693). Les pathotypes sont définis grâce au géotype MN313, sensible aux souches du pathotype I et résistant aux souches du pathotype III.

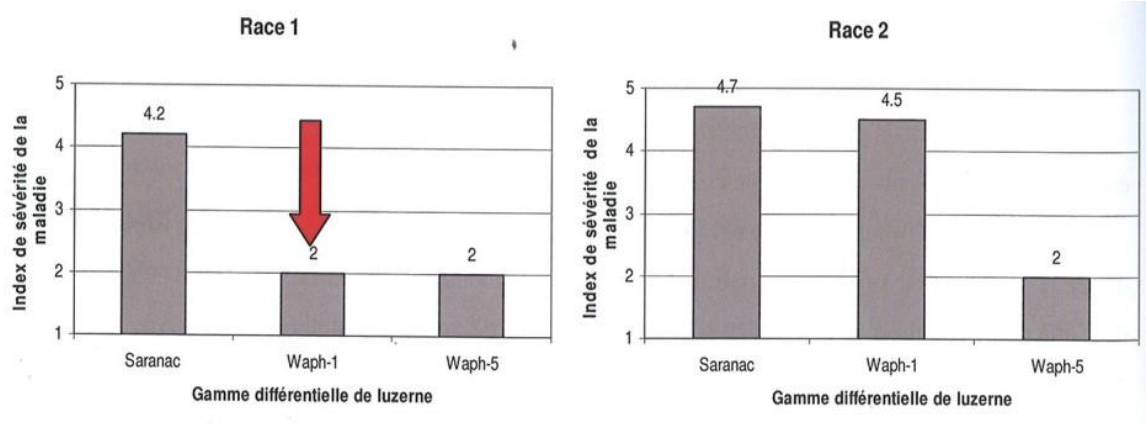


Figure 15 : Deux races américaines d'*Aphanomyces euteiches* mises en évidence par la mesure de l'indice de nécrose racinaire sur une gamme différentielle de trois géotypes de luzerne, d'après Malvick & Grau (2001). Les géotypes Saranac et Waph-5 sont, respectivement, sensible et partiellement résistant. Les races sont définies grâce au géotype Waph-1, partiellement résistant pour la race 1 et sensible pour la race 2.

b) Une structuration génétique peu marquée mais encore méconnue

A ce jour, très peu d'études se sont intéressées à la diversité et structure génétique des populations d'*A. euteiches* et l'état de l'art sur le sujet est assez fragmentaire. Aux Etats Unis, quelques travaux ont été menés pour caractériser cette diversité à l'aide de marqueurs dominants, RAPD et AFLP (Malvick *et al.*, 1998, 2009; Malvick & Percich, 1998; Grünwald & Hoheisel, 2006). Ces études ont mis en évidence une diversité génétique prononcée à l'échelle régionale et/ou parcellaire (Malvick *et al.*, 1998; Grünwald & Hoheisel, 2006). Les travaux de Malvick *et al.*, 1998 ont plus particulièrement montré que cette diversité génétique était corrélée à l'hôte d'origine et au pathotype. Ainsi, trois clusters ont été identifiés correspondant aux pathotypes « haricot », « luzerne » et « luzerne/trèfle ». En outre, une étude des souches isolées de luzerne a montré une forte variabilité génétique ainsi que l'absence de différenciation génétique à l'échelle régionale (Malvick *et al.*, 2009). Les études menées sur pois ont révélé le même niveau de diversité génétique (Malvick & Percich, 1998) mais aucune structuration génétique des populations n'a pu être identifiée à l'échelle parcellaire (Grünwald & Hoheisel, 2006).

En France les premiers travaux sur l'étude de la diversité génétique des souches d'*A. euteiches* ont été menés par Wicker (2001) à l'aide de marqueurs AFLP, qui ont montré également une forte diversité génétique distribuée dans les parcelles mais sans structuration selon l'origine géographique ou la spécificité d'hôte. Une étude plus récente réalisée à partir de marqueurs SRAP sur une collection de souches françaises et américaines a mis en évidence une structuration selon le pays d'origine, mais une absence de structuration à l'échelle nationale (Le May *et al.*, 2018).

L'ensemble des travaux menés sur *A. euteiches* a donc mis en relief une absence de structuration génétique des populations quelque soit l'origine des souches. Le niveau élevé de diversité génétique observé resterait à confirmer, au regard des connaissances de la biologie de l'agent pathogène. En effet, *A. euteiches* est supposé être un organisme à faible potentiel évolutif en raison de sa reproduction de type clonale, et de l'absence de dispersion à grande échelle limitant les flux de gènes et le brassage génétique. De plus, le large spectre d'hôtes d'*A. euteiches* et sa capacité à se multiplier en présence des plantes hôtes sensibles tendent à favoriser l'augmentation de la taille des populations limitant ainsi les phénomènes de dérive génétique.

Actuellement aucune corrélation n'a pu être établie entre la diversité génétique et la diversité phénotypique malgré la variabilité phénotypique observée au sein des populations d'*A. euteiches* (Malvick & Percich, 1998; Wicker, 2001). Ces résultats peuvent s'expliquer par le choix des marqueurs neutres utilisés, ces derniers ne ciblant pas la zone génétique en lien avec les différences de pathogénicité. Grâce au développement de la génomique, de nouveaux outils seront disponibles pour mieux caractériser les populations d'*A. euteiches*.

3.4.5 Génomique d'*A. euteiches*

De nombreux travaux de séquençage du génome d'*A. euteiches* ont été menés afin d'identifier des effecteurs de pathogénicité. Deux banques de cDNA d'une souche de référence (ATCC201684) appartenant au pathotype I ont été créées. Au total, l'ensemble de ces banques a contenu 18 684 EST assemblées dans 7 977 unigènes (Gaulin *et al.*, 2007, 2008) et répertoriées dans la base de données « Aphano DB »³ (Madoui *et al.*, 2007). La caractérisation des ESTs d'*A. euteiches* a mis en lumière la présence d'un certain nombre d'effecteurs CRNs et l'absence des effecteurs RxLR impliqués dans la reconnaissance hôte-pathogène et l'induction des réponses de défense de la plante (ETI). De récents travaux de génomique couplés à la transcriptomique ont mis en exergue la présence d'effecteurs putatifs SSPs spécifique au genre *Aphanomyces* jouant un rôle clé dans l'interaction hôte-pathogène (Gaulin *et al.*, 2018). Le premier génome séquencé d'*A. euteiches* (souche ATCC201684, Version 1) a été publié en 2018. Une version 2 a été publiée récemment (Kiselev *et al.*, 2022). Sa taille a été estimée à 72 Mb, incluant près de 25% de séquences répétées. Son nombre de gènes codant des protéines a été estimé à 23,027, avec 320 gènes en moyenne par Mb. Ce génome de référence a été la base de travaux de re-séquençage de souches de référence pour les principaux pathotypes d'*A. euteiches* identifiés sur pois et luzerne (Kiselev *et al.*, 2022), dont les résultats constituent des ressources précieuses pour l'étude des populations d'*A. euteiches*.

3.5 Méthodes de lutte contre *A. euteiches* chez le pois

A ce jour, bien qu'une récente étude ait mis en évidence l'effet de la fertilité et de l'utilisation d'herbicide pour réprimer la maladie de la pourriture racinaire (Asare *et al.*, 2022), les méthodes disponibles pour lutter contre *A. euteiches* reposent essentiellement sur des mesures prophylactiques et des mesures liées aux pratiques culturales. En effet, les fongicides proposés ne sont pas efficaces, et aucune variété avec un niveau élevé de résistance à la maladie n'est actuellement commercialisée.

3.5.1 Luites prophylactiques, culturales et biologiques

La gestion du risque *Aphanomyces* repose sur le test prédictif de potentiel infectieux (PI) de la parcelle permettant à l'agriculteur d'évaluer le niveau de contamination de la parcelle et de l'orienter dans le choix de l'implantation à mettre en place en vue de sécuriser les rendements. La valeur de PI correspond à une note sur une échelle de symptômes allant de 0 à 5, observée sur les racines et l'épicotyle d'une variété de pois sensible cultivée en conditions contrôlées sur le sol agricole échantillonné (**Figure 16**). Pour un PI<1, la culture du pois est possible. Pour un PI compris entre 1 et 2.5, seule la culture du pois d'hiver, échappant

³ <http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/aphanoDB/>

partiellement à la maladie, est autorisée, alors que pour une PI >2.5 aucune culture de pois n'est possible (Crosson & Moussart, 2011; Moussart *et al.*, 2017, 2018). Malheureusement, ce test n'est pas systématiquement utilisé par les agriculteurs en raison du coût élevé de la prestation. Un nouvel outil EvA⁴ (Evaluation du risque Aphanomyces) développé par Terres Inovia est désormais disponible et permet de classer la parcelle dans un niveau de risque, afin de guider l'agriculteur dans des choix culturels lui permettant de préserver le rendement en pois et l'état sanitaire de la parcelle. Cet outil prend en compte plusieurs critères tels que l'itinéraire technique, l'historique cultural de la parcelle, le type de sol et la charge en pois. D'autres méthodes s'appuyant sur des outils moléculaires permettent également de mesurer le niveau de contamination de la parcelle. Ainsi Gangneux *et al.*, 2014 et Sauvage *et al.*, 2007 ont développé une approche moléculaire de PCR en temps réel permettant de quantifier l'agent pathogène à partir d'échantillons de sol. Plus récemment, une méthode basée sur la PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) a été développée afin de détecter l'agent pathogène dans des échantillons de sols faiblement infestés (Gibert *et al.*, 2021).

Les rotations culturales avec d'autres légumineuses que le pois, non hôtes ou résistantes vis-à-vis d'*A. euteiches*, peuvent préserver l'état sanitaire des sols. Plusieurs espèces de légumineuses sont non-hôtes d'*A. euteiches* (lupin, fenugrec, lotier) ou présentent un niveau élevé de résistance à *A. euteiches* (pois chiche, féverole, soja, sainfoin) (sources Arvalis & Terres Inovia, 2017). La féverole est préconisée comme culture de remplacement au pois en culture principale (printemps ou hiver) ou en alternance, afin d'allonger la fréquence de retour du pois et limiter le risque *Aphanomyces*. Dans tous les cas, il est indispensable de maintenir un délai d'au moins 6 ans entre deux cultures de pois. D'autres cultures ont un effet répressif sur l'agent pathogène et, combinées à des cultures de pois, permettraient de limiter le développement de l'agent pathogène dans le sol. Ainsi l'incorporation de résidus de culture de Brassicacées dans les rotations culturales limiterait le développement de la maladie par la libération de glucosinolates (Rumberger & Marschner, 2003). D'autres résidus de culture de la famille des Poaceae, tels que l'avoine, auraient un effet sur la lyse des zoospores d'*A. euteiches* grâce à la libération de saponines (Fritz *et al.*, 1995).

Le décalage de la date de semis permettrait également de diminuer l'impact de la maladie par un échappement partiel lié à l'âge plus avancé des tissus racinaires (résistance ontogénique) lorsque les conditions deviennent favorables à la maladie au printemps. Ainsi, des travaux conduits par Terres Inovia ont montré que la maladie présente une moindre nuisibilité sur le pois semé en hiver (Moussart *et al.*, 2016, 2018).

Le travail du sol, favorise le drainage et permet de limiter le développement de la maladie dans le sol. En effet, Allmaras *et al.*, 2003 ont mis en évidence une corrélation positive entre la gravité de la pourriture racinaire et la structure du sol, l'humidité et l'aération.

La lutte biologique grâce à l'utilisation de microorganismes comme agent de biocontrôle est reconnue comme étant une méthode alternative à l'utilisation de produits

⁴ [Outil : Evaluation du risque aphanomyces - Terres Inovia](#)

chimiques pour lutter contre plusieurs maladies. Parmi les souches bactériennes et fongiques utilisées comme agent de biocontrôle, on retrouve largement les genres *Pseudomonas* (Weller, 2007), *Streptomyces* (Vurukonda *et al.*, 2018) et *Bacillus* (Albayrak, 2019) ainsi que le genre *Trichoderma* (Sood *et al.*, 2020). Des travaux ont mis en avant l'efficacité de différentes espèces bactériennes vis-à-vis d'*A. euteiches* telles que *Burkholderia cepacia* (Heungens & Parke, 2000), *Pseudomonas cepacia* ou *P. fluorescens* (Parke *et al.*, 1991). Des champignons mycorhiziens comme *Glomus fasciculatum* (Rosendahl, 1985), ainsi que *Trichoderma harzianum* (Bazghaleh *et al.*, 2020), auraient également un effet protecteur. Plus récemment, des études menées sur un panel de souches bactériennes du sol ont permis d'identifier plusieurs genres (*Rhizobium*, *Lysobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pedobacterium*, *Variovorax*) ayant un intérêt dans le biocontrôle contre la pourriture racinaire du pois (Godebo, *et al.*, 2020). L'ensemble de ces études bien que prometteuses, reste encore à l'état exploratoire et devra être validé par tests *in situ*.



Figure 16 : Echelle de notation des symptômes racinaires sur plantules de pois d'après Wicker (2001).

3.5.2 Lutte génétique

La lutte génétique semble être la voie la plus prometteuse, couplée aux autres méthodes de lutte, malgré l'absence de variétés résistantes à ce jour. En effet, la sélection pour la résistance à *A. euteiches* est restée difficile du fait du niveau partiel de résistance et de son déterminisme génétique complexe. Depuis 2000, INRAE a développé des programmes permettant de mieux comprendre la génétique de la résistance à *A. euteiches* chez le pois et développer des outils d'aide à la création variétale.

Entre 2002 et 2008, un large programme de **criblage de sources de résistance** a tout d'abord été mené sur environ 1900 accessions de *Pisum*, en conditions contrôlées puis au champ sur un réseau multi-local et international de parcelles naturellement infestées. Ce programme a résulté en la sélection de 20 lignées, dont les meilleures ont présenté un niveau de résistance partielle similaire à celui de témoins américains de résistance (90-2131, PI180693 et 552) utilisés en France dans les programmes de génétique et sélection (INRAE, Groupement des Sélectionneurs de Pois Protéagineux (GSP)). Par ailleurs, trois principales core-collections de *Pisum sativum* (INRAE, FR; JIC, UK; USDA, US) ont été évaluées pour la résistance à la souche RB84 d'*A. euteiches*. Dans ces collections, moins de 5% des lignées testées ont montré un niveau de résistance partielle similaire à celui des témoins. L'ensemble des résultats obtenus a permis d'identifier un faible nombre de sources de résistance à *A. euteiches* dans la variabilité naturelle étudiée au sein du genre *Pisum* (Pilet-Nayel *et al.*, 2007). La recherche de sources de résistance n'a pas été effectuée au sein d'espèces de genres voisins à *Pisum* (ex.: *Lathyrus*), du fait de leur incompatibilité de croisement avec le pois.

Parallèlement, de 2000 à 2009, un programme **d'analyse génétique de la résistance** à *A. euteiches* a été mené en étroite collaboration avec l'USDA, par **analyse de liaison** (LA, linkage analysis) à partir de quatre populations de lignées recombinantes (RILs, Recombinant Inbred Lines) issues de croisements biparentaux entre quatre sources de résistance partielle identifiées aux Etats-Unis (90-2079, 90-2131, PI180693, 552) et trois variétés sensibles (Puget, DSP et Baccara). A partir de l'ensemble des données de génotypage et de phénotypage recueillies sur les quatre populations (29 environnements au champ en France et aux USA, 12 essais en conditions contrôlées, cartes de marqueurs SSRs-RAPDs), un total de 27 méta-QTL de résistance a été identifié (Hamon *et al.*, 2013). Les méta-QTL ont couvert sept régions génomiques principales associées à la résistance, chacune ayant été détectée de manière très consistante dans deux à quatre populations à partir d'au moins 12 variables initiales (Figure 12) (Pilet-Nayel *et al.*, 2002, 2005; Hamon *et al.*, 2011, 2013; McGee *et al.*, 2012). Parmi les sept régions génomiques principales, les QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps4.5* ont été détectés avec des effets majeurs ($R^2 > 60-89\%$), respectivement, vis-à-vis des pathotypes I et III d'*A. euteiches*.

Depuis 2008, une approche de **génétique d'association génome entier** (GWAS, Genome Wide Association Study) a été réalisée sur une collection « Aphanomyces » de 175 lignées enrichie en sources de résistance. Cette collection est composée d'environ 2/3 de lignées issues d'un programme de création de géniteurs « Aphanomyces » du GSP exploitant les sources 90-2131, 552 et PI180693 (1995-2005) ainsi que d'1/3 de lignées issues des travaux INRAE de génétique et de variétés de pois sensibles. A partir des données de génotypage (13000 SNPs ; Tayeh *et al.*, 2015) et de phénotypage (9 environnements au champ en France et aux USA, 2 souches en conditions contrôlées) obtenues sur la collection, 52 QTL associés à la résistance à *A. euteiches* ont été identifiés dans des intervalles réduits (Desgroux *et al.*, 2016), confirmant six des sept principaux QTL détectés précédemment. L'analyse d'haplotypes aux QTL-GWAS les plus consistants a permis de révéler une accumulation d'haplotypes favorables dans les lignées du GSP présentant des niveaux de résistance accrus par rapport à ceux des témoins américains, spécialement dans la lignée AeD99OSW45-8-7. Plus récemment, une étude GWAS réalisée dans une collection élargie à la collection « Aphanomyces » a permis

d'identifier plusieurs QTL d'architecture racinaire constitutive de la plante ou en réponse à la maladie, co-localisant avec des QTL de résistance à *A. euteiches* (Desgroux *et al.*, 2018).

Depuis 2008, un programme de Back-cross Assisté par Marqueurs (BAM) pour la création de **lignées quasi-isogéniques (NILs, Near Isogenic Lines)** à un ou plusieurs des sept principaux QTL de résistance à *A. euteiches* identifiés a également été conduit à INRAE. Ce programme a permis la création de séries de NILs agronomiques (157 lignées BC5/6) porteuses d'allèles de résistance à *A. euteiches* à 0, 1, 2 à 3 QTL dans différents fonds génétiques (**Figure 17**). La réalisation d'empreintes génétiques des NILs à l'aide de marqueurs SNP a permis d'estimer la taille des introgressions et de confirmer le niveau élevé de retour aux génomes des parents récurrents. L'évaluation des NILs en conditions contrôlées a confirmé l'effet des deux QTL majeurs (*Ae-Ps4.5*, *Ae-Ps7.6*) et celui de QTL mineurs (*Ae-Ps5.1*, *Ae-Ps2.2*), seuls ou en combinaison, et a mis en évidence des interactions QTL x fonds génétiques (Lavaud *et al.*, 2015). L'évaluation de NILs au sein de tests cinétiques en conditions contrôlées a permis de montrer le mode d'action de QTL individuels ou combinés sur le retard de l'apparition des symptômes et/ou sur la réduction de la colonisation de la plante par *A. euteiches* quantifiée par q-PCR (Lavaud *et al.*, 2016). L'évaluation des NILs en pépinières infestées au champ sur le réseau multi-local INRAE-GSP (7 environnements) a permis de valider l'efficacité du QTL majeur *Ae-Ps7.6*, seul ou en combinaison avec plusieurs QTL à effets mineurs, ainsi que de combinaisons de QTL à effets mineurs (Lavaud *et al.*, en prep). L'évaluation pour la croissance et le rendement d'une sélection de NILs présentant des niveaux accrus de résistance a été réalisée en conditions saines vs infestées, en parcelles au champ (réseau GSP) et en serre, afin d'estimer l'effet des meilleures combinaisons de QTL sur la réduction de la nuisibilité de la maladie. Le QTL majeur *Ae-Ps7.6*, seul en combinaison avec des QTL à effets mineurs, a montré un effet pour limiter la nuisibilité de la maladie.

L'ensemble des outils et ressources, *i.e.* marqueurs moléculaires, géniteurs (sources, RILs, NILs), méthodologie de sélection, générés dans ces programmes ont été transférés aux sélectionneurs et une méthodologie simplifiée d'évaluation de la résistance, destinée notamment aux réseaux d'inscription a été élaborée. Les premières variétés tolérantes à la maladie, ayant intégré des QTL de résistance, ont été inscrites récemment au catalogue français (Kagnotte 2019, Karacter 2020). Les outils développés devraient permettre **de poursuivre les efforts de création de variétés partiellement résistantes à *A. euteiches*.**

La mise en place de **stratégies de gestion durable des principaux QTL** de résistance à *A. euteiches*, en cours d'intégration dans les schémas de sélection, constitue un enjeu majeur avec l'inscription des premières variétés tolérantes à *A. euteiches*. Dans un contexte où de nombreux contournements de résistances génétiques ont été observés chez les plantes, spécialement dans le cas de la résistance de la luzerne à la race 1 d'*A. euteiches* aux USA (Grau *et al.*, 1991), préserver l'efficacité des QTL de résistance du pois à *A. euteiches* constitue un objectif incontournable pour maintenir le pois dans les assolements céréaliers. Afin d'anticiper cet objectif, il est primordial de développer des connaissances et méthodes sur (i) les capacités adaptatives des populations d'*A. euteiches* aux QTL de résistance et (ii) les stratégies possibles de gestion durable des QTL, incluant notamment le pyramidage de QTL.

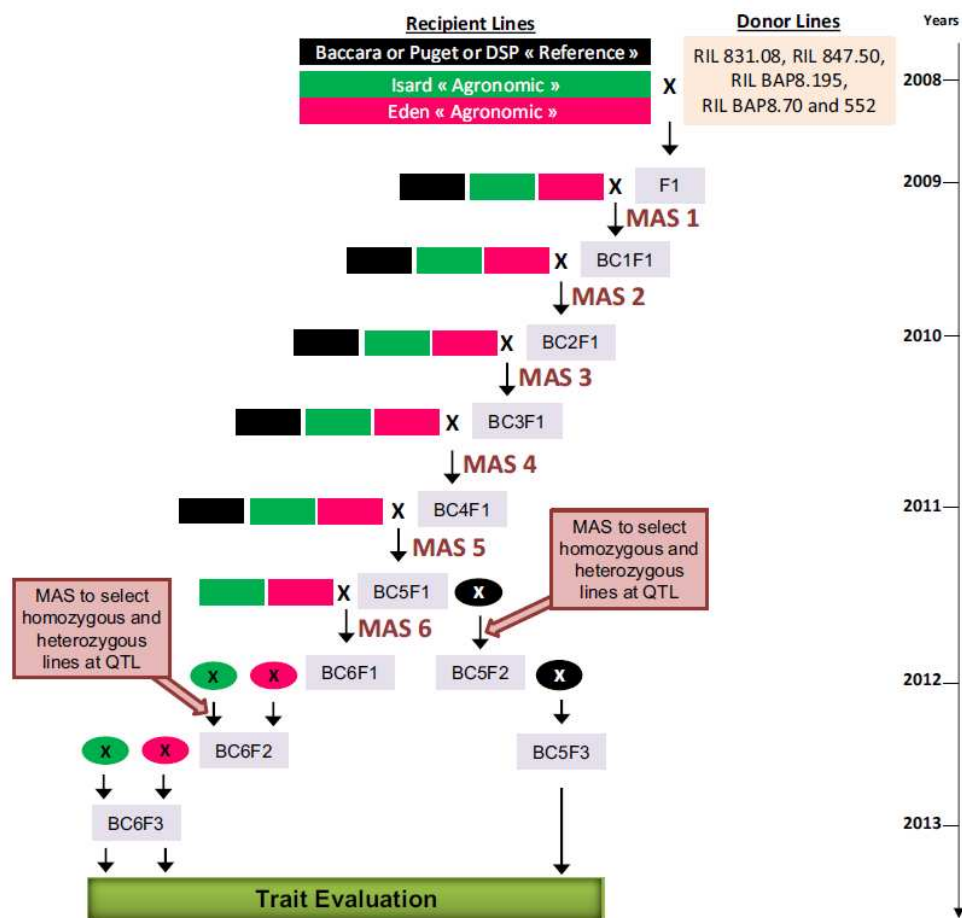


Figure 17 : Schéma de rétrocroisement assisté par marqueur (Back-cross Assisté par Marqueurs, BAM) utilisé pour construire des NILs aux principaux QTL de résistance à *A. euteiches* d'après Lavaud *et al.* (2015).

Objectifs du travail de recherche

Les travaux de cette thèse ont été réalisés entre 2012 et 2017 au sein de l'ex-équipe Résistance et Adaptation (RA) de l'UMR IGEPP. Les travaux de cette équipe visaient à produire des connaissances permettant d'optimiser le choix des constructions génétiques et leur déploiement pour limiter durablement le développement des populations de bioagresseurs. La thèse a été adossée au WP2 du projet Investissement d'Avenir PeaMUST⁵ (2012-2020; 14 partenaires privés et publics), visant à identifier des combinaisons de locus et gènes candidats de résistance à différents stress du pois et de la féverole, dont *A. euteiches*, d'en analyser la conservation inter-espèces et de développer des outils et connaissances pour leur déploiement dans les rotations inter-espèces de légumineuses. La thèse a également été adossée au SP3.9 du projet H2020-FEADER-Région Bretagne PROGRAILIVE⁶ (2016-2021), visant à étudier l'effet de combinaisons de QTL et de rotations avec la féverole sur la durabilité de la résistance quantitative à *A. euteiches* chez le pois.

Cette thèse a visé à contribuer à l'objectif global de développer des connaissances et des outils pour étudier la durabilité des QTL de résistance à *A. euteiches* chez le pois, en vue *in fine* de mettre en oeuvre des stratégies de gestion durable de ces QTL en les couplant à d'autres méthodes de lutte pour en préserver les effets. A ce jour, aucune information n'est disponible dans le monde sur (i) la durabilité des QTL de résistance à *A. euteiches*, récemment identifiés chez le pois et (ii) le potentiel adaptatif des populations d'*A. euteiches* vis-à-vis de ces QTL. On peut faire l'hypothèse que la diversification des cultures de légumineuses et le déploiement de variétés partiellement résistantes dans les prochaines années peuvent potentiellement constituer des facteurs d'évolution des populations d'*A. euteiches*, en exerçant une pression de sélection. Celle-ci a jusqu'à présent été très faible du fait de l'absence de variétés résistantes de pois disponibles pour les agriculteurs, et de la faible diversité de légumineuses exploitée dans les systèmes de production agricoles.

Cet état des connaissances lacunaires m'a conduit à mettre en oeuvre dans cette thèse des travaux visant à évaluer i) la diversité des populations françaises d'*A. euteiches* en anticipation de la mise sur le marché de variétés partiellement résistantes et ii) l'efficacité de QTL, seuls ou en combinaison, dans des lignées quasi-isogéniques vis-à-vis d'un panel de souches représentatives de cette diversité. Les hypothèses testées dans ces travaux de thèse sont (i) qu'il existe une relativement faible diversité génétique des populations françaises d'*A. euteiches*, qui ont été peu soumises à pression de sélection du fait de cultures peu diversifiées de légumineuses depuis 20 ans (prédominance de variétés de pois sensibles) mais (ii) qu'il existe une diversité d'agressivité des souches d'*A. euteiches* vis-à-vis des QTL de résistance ; cette diversité pourrait constituer une source d'évolution des populations d'*A. euteiches* et d'érosion potentielle des effets des QTL dans le temps, par sélection des populations les plus agressives au fur et à mesure des cultures de variétés tolérantes ou partiellement résistantes

⁵ <https://www.peamust-project.fr/>

⁶ <https://www.vegepolys-valley.eu/projet-sos-protein/projet-prograilive/>

contenant ces QTL, mais le pyramidage de QTL de résistance serait efficace pour limiter la sélection de populations plus agressives.

Afin de tester ces hypothèses, j'ai conduit dans la thèse une démarche de recherche en trois étapes, permettant de répondre à des questions de recherche correspondant aux trois chapitres à suivre du manuscrit :

- i) Les marqueurs co-dominants sont-ils adaptés pour caractériser le niveau de diversité génétique des populations françaises d'*A. euteiches* ?

Chapitre 1 : Développement de marqueurs microsatellites pour étudier les populations d'*A.euteiches*

Plusieurs marqueurs co-dominants de type microsatellite ont été développés à partir d'une collection d'isolats français et américains et la structure génétique a été investiguée. Cette étude a permis de valider la qualité des microsatellites. Le niveau de diversité génétique avec ces nouveaux marqueurs s'est révélé plus faible que celui obtenu dans les précédentes études suggérant l'importance du nombre de locus révélés et d'éventuels biais dans les études précédentes liés à l'utilisation de marqueurs dominants chez un organisme diploïde.

- ii) Quelle est la diversité et la structure génétique et phénotypique des populations d'*A. euteiches* actuelles dans les principaux bassins de production de pois en France ?

Chapitre 2 : Etude de la diversité génétique et phénotypique des populations françaises d'*A. euteiches*, afin d'établir un état de référence de cette diversité à partir d'une collection de 205 isolats échantillonnés dans 17 parcelles infestées de 5 bassins de production de pois protéagineux. Le génotypage a été réalisé grâce à 20 marqueurs SSRs et 34 isolats ont été phénotypés pour leur pouvoir pathogène sur une gamme de 8 génotypes de 4 légumineuses. Les résultats obtenus ont mis en relief i) l'absence de structuration des populations et une faible diversité génétique ii) un pouvoir pathogène dépendant de l'hôte et du génotype iii) l'absence de corrélation entre le génotype et le phénotype observé.

- iii) Quel est le niveau d'agressivité des souches françaises vis-à-vis des QTLs de résistance ?

Chapitre 3 : Etude de la diversité d'isolats français pour leur agressivité sur des NILs porteuses de QTL de résistance, i.e. étude du spectre d'efficacité des QTLs de résistance vis-à-vis de souches françaises

Sur la base des résultats du second chapitre, un set de 43 isolats représentant la diversité des populations observée en France a été choisi. L'agressivité de ces isolats a été évaluée en conditions contrôlées sur une gamme de huit NILs et deux témoins de pois, présentant des niveaux différents de résistance partielle à la maladie et des combinaisons différentes de QTL de résistance. Les résultats ont montré une variabilité d'agressivité des isolats selon le génotype de pois et les QTL de résistance qu'il porte.

L'ensemble des résultats acquis permet de poser les bases de connaissances et de méthodologies pour l'étude de l'adaptation des populations d'*A. euteiches* aux QTL de résistance chez le pois et vis-à-vis de légumineuses hôtes utilisés dans les rotations. Ils apportent des éléments pour raisonner le choix de QTL à combiner en sélection et de stratégies de déploiement de QTL, pour préserver l'efficacité de la résistance à *A. euteiches* dans le temps.

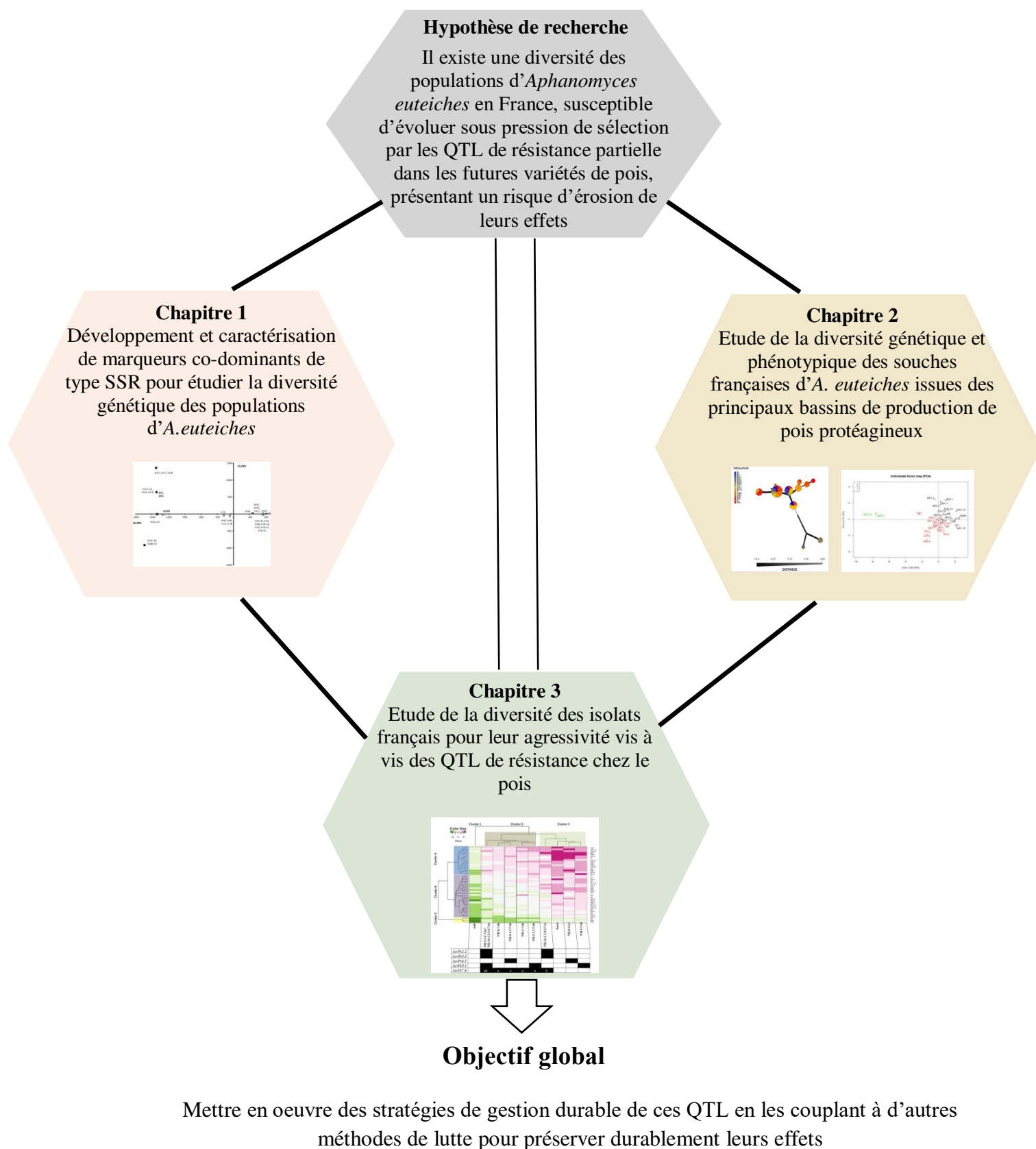


Figure 18 : Organisation des travaux de thèse

Chapitre 1

DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MICROSATELLITES POUR ÉTUDIER LES POPULATIONS D'*APHANOMYCES EUTEICHES*

Chapitre 1 : Développement de marqueurs microsatellites pour étudier les populations d'*Aphanomyces euteiches*

1. Contexte

Aphanomyces euteiches (*A. euteiches*) est un oomycète homothallique dont la reproduction sexuée a pour résultat la production d'oospores diploïdes. Dans l'introduction bibliographique, nous avons vu que de nombreux travaux d'étude de la diversité génétique des populations d'*A. euteiches* ont été réalisés en utilisant des marqueurs dominants malgré le caractère diploïde de l'agent pathogène. On peut s'interroger sur la pertinence des outils moléculaires déployés, les marqueurs dominants ayant un niveau de polymorphisme théoriquement moins élevé comparé aux marqueurs co-dominants qui peuvent révéler plusieurs allèles par locus. En outre, la faible résolution des marqueurs dominants ne permet pas de détecter les profils hétérozygotes. Dans la perspective d'étudier la structure génétique des populations françaises d'*A. euteiches*, l'usage de nouveaux marqueurs discriminants sur un panel de souches d'origines différentes nous a semblé intéressant à mettre en oeuvre.

2. Approche

En l'absence de génome d'*A. euteiches* séquencé au moment de l'étude en 2012, nous avons choisi de développer des marqueurs de type microsatellites qui étaient couramment utilisés et restent encore aujourd'hui de bons candidats pour évaluer la diversité génétique des populations d'agents pathogènes. En effet, ils sont considérés comme des marqueurs moléculaires hautement polymorphes utilisés pour identifier une séquence moléculaire donnée dans un pool d'ADN inconnu et les répétitions en tandem sont omniprésentes et largement utilisées dans les études de génétique des agents pathogènes. En outre, il s'agit de marqueurs neutres et codominants, multi-alléliques et reproductibles. La définition de marqueurs microsatellites a été réalisée grâce à la méthode de séquençage de nouvelle génération NGS (Next-Generation Sequencing), permettant de séquencer, à partir d'une banque de fragments d'ADN, des millions de molécules d'ADN par cycles successifs d'incorporation de nucléotides. Cette approche permet de générer des données massives de séquence. Ce travail a été réalisé à partir d'un panel de huit souches françaises et américaines d'*A. euteiches*. Les marqueurs microsatellites ont été testés sur une population de 94 isolats français et américains. Plusieurs analyses statistiques ont été menées pour évaluer le degré de polymorphisme de ces marqueurs.

3. Principaux résultats

Les microsatellites ont confirmé leur intérêt pour évaluer la diversité génétique des populations d'*A. euteiches*. Le développement et le screening des microsatellites sur une collection de 94 isolats d'origines française et américaine a permis d'identifier 14 marqueurs SSR hautement polymorphes (2 à 4 allèles par marqueurs) sur un total de 48 marqueurs SSR. Ainsi les valeurs du PIC (Polymorphism Information Content), qui fournit une estimation du pouvoir discriminant d'un marqueur pour un locus donné en prenant en compte le nombre et la fréquence relative des allèles, étaient comprises entre 0.101 et 0.511. Le génotypage de 94 isolats d'*A. euteiches* a montré une diversité génétique entre les populations américaines et françaises. Cette analyse a confirmé le pouvoir discriminant de ces marqueurs pour mettre en évidence la diversité génétique entre populations et au sein des populations françaises et américaines.

4. Publication

Ces résultats ont fait l'objet d'un article intitulé « Development and characterization of microsatellite markers for the oomycete *Aphanomyces euteiches* » qui a été publié en 2016 dans le journal *Fungal Genetics and Biology* (DOI : [10.1016/j.fgb.2016.03.001](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.03.001))



Tools and techniques

Development and characterization of microsatellite markers for the oomyceta *Aphanomyces euteiches*Lucie Mieuzet^{a,b}, A. Quillévéré^{a,b}, M.L. Pilet^{a,b}, C. Le May^{a,b,c,*}^a INRA, UMR1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP), Domaine de la Motte, 35653 Le Rheu, France^b Agrocampus Ouest, Laboratoire Ecologie et Santé des Plantes (ESP), 65 rue de Saint Brieuc, 35042 Rennes, France^c Université de Rennes I, 9 rue Jean Macé, 35700 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2015

Revised 2 March 2016

Accepted 5 March 2016

Available online 7 March 2016

Keywords:

Aphanomyces

Genetic study

Microsatellite

Oomyceta

SSR

ABSTRACT

Aphanomyces euteiches Drechsler is a serious pathogen of leguminous crops that causes devastating root rot of pea worldwide. Given that *A. euteiches* is a diploid organism, robust, codominant markers are needed for population genetics studies. We have developed and screened a microsatellite-enriched small-insert genomic library for identification of *A. euteiches* SSR containing sequences. Fourteen out of the 48 primer pairs designed to amplify SSR, produced unambiguous polymorphic products in our test population of 94 isolates. The number of alleles at each locus ranged from one to four. The identification of new markers would enhance the ability to evaluate the genetic structure of *A. euteiches* populations, and pathogen evolution.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aphanomyces euteiches Drechsler is an oomycete pathogen of legumes, which causes a devastating root rot of pea (*Pisum sativum* L.) worldwide (Kraft and Pflieger, 2001). Initially considered as a pea root pathogen (Scott, 1961), *A. euteiches* was later reported to attack other legume species such as common bean, broad bean, faba bean, clover, and alfalfa (Pfender and Hagedorn, 1982; Greenhalgh and Merriman, 1985; Lamari and Bernier, 1985; Burnett et al., 1994; Tivoli et al., 2006; Moussart et al., 2008). The only two efficient ways to control the disease are diverse crop rotations with non-host or suppressive crops and breeding for resistance. Both require knowledge of the genetic diversity and structure of *A. euteiches* populations. Thus, several molecular markers were developed, mainly dominant markers such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) or amplified length polymorphism (AFLP). These techniques indicated the existence of different genetic subpopulations in North America, which differ by host of origin and host preference (Malvick et al., 1998; Grunwald and Hoheisel, 2006). All pea-infecting populations showed significant linkage disequilibrium between markers, supporting the

hypothesis that selfing plays a major role in shaping their genetic structure (Grunwald and Hoheisel, 2006). The degree and spatial distribution of genotypic diversity within *A. euteiches* populations has also been studied in the USA, but reports have been contradictory. Indeed, using RAPD markers, Malvick and Percich (1998) found high genotypic diversity within fields, but no genotypic differentiation between populations from different locations (Wisconsin, Minnesota, Oregon). In a study of an alfalfa-infecting population in central USA (Illinois) using AFLP markers, Malvick et al. (2009) reported high levels of genotypic diversity at all scales but no geographical structure. Using AFLP markers, Grunwald and Hoheisel (2006) also found high genotypic diversity within field samples in Oregon and Washington states, but observed even higher genetic diversity at the regional scale and a significant genotypic differentiation between fields.

These differences in genetic structure of *A. euteiches* populations, and the fact that population genetic studies were carried out with dominant markers whereas *A. euteiches* is a diploid organism justify further investigation. The different conclusions could be partly due to differences in the type and resolute power of the genetic markers employed, and in particular to the ability to detect heterozygotes; therefore, it is useful to explore new techniques to target variability in *A. euteiches* populations. Microsatellite (SSR) is a PCR-based molecular marker, which has many advantages, and has proved to be invaluable in many fields of biology, from genome mapping to forensics, and in population genetics (Dutech et al.,

* Corresponding author at: INRA, UMR1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP), Domaine de la Motte, 35653 Le Rheu, France.

E-mail address: lemay@agrocampus-ouest.fr (C. Le May).

2007). SSR markers have been extensively used in genetic diversity studies (Struss and Plieske, 1998; Tenzer et al., 1999) because of their ubiquity, ease of scoring, co-dominance, reproducibility, assumed neutrality and high level of polymorphism (Maroof et al., 1994; Jarne and Lagoda, 1996). The work reported here had two main aims: first, to develop and screen a microsatellite-enriched small-insert genomic library for identification of *A. euteiches* SSR containing sequences, and second to identify the polymorphic SSR markers in a collection of 94 isolates.

2. Materials and methods

2.1. Microsatellite library development

Microsatellite markers were developed according to the procedure of Malausa et al. (2011) using next-generation sequencing and library enrichment. Eight isolates of *A. euteiches* from different locations (two from France and two from the US) and pathotype groups (pathotype I or pathotype III) were used to identify putative microsatellites sequences. Genomic DNA was extracted by using the CTAB method (Abdelnoor et al., 1995). Construction, emulsion PCR and 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of the microsatellite-enriched DNA libraries were carried out by Genoscreen (Lille, France). Enriched libraries were constructed using eight microsatellite probes ((AG)₁₀, (AC)₁₀, (AAC)₈, (AGG)₈, (ACG)₈, (AAG)₈, (ACAT)₆, (ATCT)₆).

2.2. DNA isolation and SSR amplification

A total of 94 different *A. euteiches* isolates, which included 66 French isolates (Fr1 to Fr66. All isolates belong to pathotype I) sampled from six different locations, 24 American isolates (13 isolates belong to pathotype I (Us01 to Us10, Us20, Us21, Us24), and 11 isolates belongs to pathotype III (Us11 to Us19, Us22, Us23)) sampled from three different locations, and four referent isolates (Rb84 (sampled from a pea field), Ae109, MF1 and NF1 (sampled from alfalfa fields)) were used (Table 1). Total genomic DNA was extracted from these 94 isolates using the CTAB method (Abdelnoor et al., 1995). Each PCR reaction in simplex consisted of 10 µL reaction volumes containing 20 ng template DNA, 2 µL of 5× PCR buffer [20 mM Tris–HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100], 0.2 mM each dNTP, 1 µM of each forward and reverse primer, 0.25 µL of 10 µM fluorescent-labeled M13 primer (VIC; Applied biosystem), and 1 unit of Taq polymerase. Volumes were adjusted to 10 µL with sterile distilled water and amplification reactions were conducted on a S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Cycling conditions included an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 20 cycles of denaturation at 95 °C for 60 s, annealing at 58 °C for 60 s and

Table 1
Aphanomyces euteiches isolates used in this study.

Code	Effective	Country	Plant Origin	Pathotype
Fr1 to Fr66	66	France	Pea	Pathotype I
Us1 to Us10, Us20, Us21, Us24	13	US	Pea	Pathotype I
Us11 to Us19, Us22, Us23	11	US	Pea	Pathotype III
Rb84	1	France	Pea	Pathotype I
Ae109	1	US	Alfalfa	Pathotype III
NF1	1	US	Alfalfa	Pathotype III
MF1	1	US	Alfalfa	Pathotype III

extension at 72 °C for 90 s, followed by 20 cycles of denaturation at 95 °C for 60 s, annealing at 53 °C for 60 s and extension at 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were then diluted 1:40 in sterile water and 3 µL of this dilution was mixed with 0.05 µL of GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystem) and 5 µL of formamide (Applied Biosystem). Analyses of PCR products were conducted on an ABI Prism_3130xl sequencer (Applied Biosystem). Allele size determinations were achieved using the GeneMapper software v3.7 (Applied Biosystem) by manual identification of the peaks and validation of absence or non-valid chromatogram. Allele sizes were determined by the automatic calling and binning module of GeneMapper with manual examination of irregular results.

2.3. Statistical analysis an evaluation of polymorphism

The allelic diversity or polymorphism information content (PIC) was measured for each selected polymorphic SSR as described by Botstein et al. (1980). *A. euteiches* isolates were clustered on the basis of their genetic relatedness using multivariate analyses. A factorial correspondence analysis (FCA) was performed for the overall data set using GENETIX 4.05.2 (Belkhir et al., 2004).

3. Results

3.1. SSR polymorphism

A total of 48 primer pairs were designed and tested. Fourteen markers showed polymorphisms and therefore could be used as SSR markers (Table 2). Thirty percent of the SSRs were polymorphic, and the number of alleles per locus was 2–4 (average 2.5). The number of genotypes detected per locus ranged from 2 to 4 (average 2.9), and the percentage of heterozygous genotypes ranged from 0% to 24.5%. The PIC value of each marker varied between 0.101 and 0.511 (average 0.389) (Table 2). According to the criteria proposed by Botstein et al. (1980), only one (7.2%) of the SSR markers was highly informative (PIC > 0.5), 11 (78.6%) were reasonably informative (0.25 < PIC < 0.5), and 14.3% slightly informative (PIC < 0.25).

3.2. Diversity and cluster analysis

The genetic structure of the American and French *A. euteiches* populations was investigated using the 14 polymorphic SSRs markers. Pea-infecting isolates were collected from four major pea cropping areas in the US where pea and/or alfalfa were grown and from seven fields (differing in crop rotation) from seven major pea cropping areas in France. Based on the polymorphic SSR markers, results indicated low genetic diversity among the different locations in France and the US, with only eight multilocus genotypes observed within the 94 *A. euteiches* isolates tested (Fig. 1). The greatest variation occurred within countries, with a total estimated genetic diversity (*F*_{ST}) of 0.436 for *A. euteiches* between American and French populations. Factorial correspondence analysis (FCA) analyses showed that the genetic structure of *A. euteiches* populations was dependant on the country of origin but not on the pathotype. The first axis explained 57% of the structure, whereas the second axis explained only 13%. Based on pathotype groups, these results suggest that *A. euteiches* pea populations in France are a unique, unstructured population. However, among French populations, two different clusters were observed: one corresponding to isolates sampled from fields where other legume species (vetch, alfalfa, or faba bean) were cultivated during previous growing seasons, and another corresponding to isolates sampled from fields where pea was the only legume crop species.

Table 2

Details of locus, primer sequence, T_m , Motif, No. of alleles, allele size, % of heterozygotes, and PIC value of different SSR markers used to evaluate genetic diversity within *Aphanomyces euteiches* isolates.

Locus	Forward primer	Reverse primer	T_m (°C)	Motif	No. of alleles	Allele size	% heterozygotes	PIC
Ae04	TATTGCTTGTGCTGATTGGAA	ACGATCTCCTGAATGCCG	58	(ACG) ₅	2	90	5.3	0.101
Ae12	CATCTTTCGTCTTCGGATCG	GCCTCTGACGTCCAAATTGA	58	(TCG) ₈	3	90	0.0	0.496
Ae13	CGATAGTCTAGCGTCTTCCTT	GATATCAAATGCATTCAACCG	58	(TCG) ₅	2	91	0.0	0.382
Ae17	TCTTGATGCCGTTTCATGTTT	CATTTTGCGCCGTTCTATTT	58	(TCG) ₅	2	127	5.3	0.444
Ae23	GCGAAGGCCAGGTAATAAG	TGAATTCAAGAATAATCGGAAAG	58	(AC) ₆	2	197	5.3	0.444
Ae26	TTTCAAGGCCAGGAGAAAGA	TTCATCAACGGCAACACAT	58	(AGA) ₅	2	229	25.7	0.382
Ae32	GACGTGTTTGAACCAACGA	ATTGCTCCCAACAACGAC	58	(TCG) ₅	2	113	0.0	0.173
Ae34	TGAAAATGATCCTCGAATCCA	AAATCTTCCATCAACGCCAC	58	(GAC) ₆	2	121	5.3	0.444
Ae36	CCATGGATGCAGTCATCAAC	CTTGCACCATGCTCTACAA	58	(CCAG) ₅	3	164	24.5	0.375
Ae37	GTAAGGACCTTCTCTCG	CGAAATAGGGGCTTTGTCTG	58	(CTC) ₆	4	138	5.3	0.511
Ae44	TCAACTCTGGGTAGGACATTCG	TGATCTGTAGAGATGCTGATTTCCG	58	(TC) ₇	4	140	0.0	0.406
Ae45	AACGGCAACACAGAACG	AAGTGCCGAGGTAGACAACG	58	(GA) ₆	2	146	5.3	0.444
Ae54	GTAGCAAGTGACCGTCGTG	CGATGGTCTAGGTGCTAACG	58	(AG) ₈	3	145	17.0	0.474
Ae63	GCCGAAGCAGTTGAAGAAGT	CCTCGGCTGTTTACGAT	58	(AAG) ₆	2	97	24.5	0.370

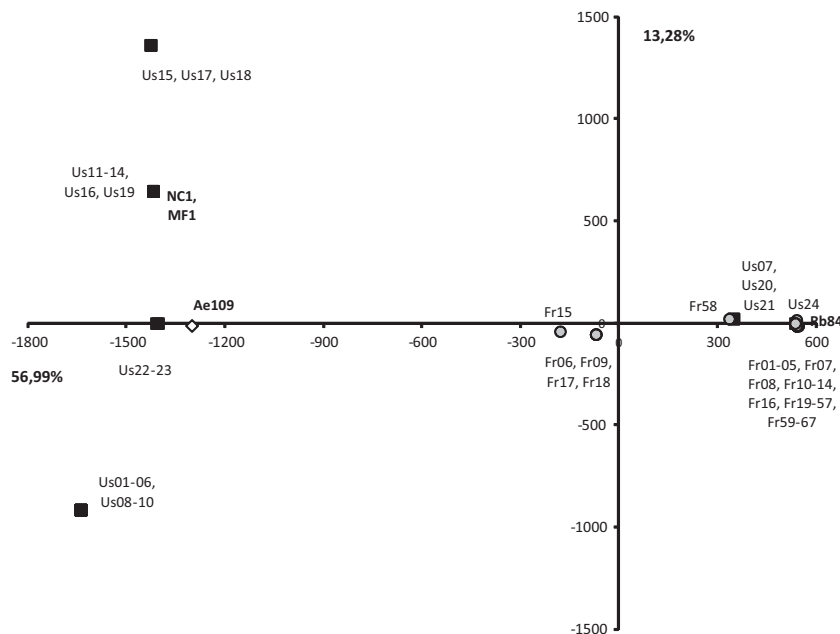


Fig. 1. Factorial correspondence analysis (FCA) performed on 90 *A. euteiches* isolates from France (grey circle) and US (Black Square) populations, and four referent isolates (white diamond). Each point represents one or several isolates. Three genetically distinct clusters were highlighted: the first groups together all individuals from most of the different locations, the referent isolate Rb84 and four American isolates, the second groups together all individuals from two fields where other legume species than pea were cultivated, and the third groups together individuals from the different American locations, and the three referent isolates Ae109, NC1, MF1 (isolates sampled on alfalfa).

4. Discussion

The development and screening of a microsatellite-enriched small-insert genomic library identified fourteen highly polymorphic SSR markers from a total of 48 SSR sequences. These markers produced unambiguous polymorphic products in our test population of 94 isolates. The PIC value of each marker varied between 0.101 and 0.511, and 85.7% of the primers were reasonably informative (Botstein et al., 1980).

The number of polymorphic SSR observed (30%) is quite low, but not surprising. By comparison, Akamatsu et al. (2007), by generating and screening a plasmid library of *A. euteiches* genomic DNA identified only eleven SSRs markers on the sixty-nine primers pairs screened for allelic variation (10% if considering all the markers tested). Moreover, their study showed that 50% of these SSRs markers indicated two polymorphic bands whereas in our study polymorphic SSRs indicated 2–5 different loci. A limited number of polymorphic microsatellite loci isolated from genomic libraries are reported for peculiar biological and genomic traits of

fungi (Dutech et al., 2007). First, plant pathogens, which are the most extensively studied of fungal species, have demographic and reproductive traits promoting low genetic diversity. Crop or human pathogen have often experienced bottlenecks through geographic introduction (Milgroom et al., 1992; Engelbrecht et al., 2004; Rivas et al., 2004) or host shifts (Mackenzie et al., 2001; Paraskevis et al., 2003; Tobler et al., 2003), which can drastically reduce intraspecific genetic diversity. Furthermore, some specific life history traits of fungal pathogens, such as frequent asexual reproduction and recurrent bottlenecks in epidemic cycles, associated with low winter survival and/or selective sweeps following new virulence attributes, are also likely to result in a low level of genetic diversity (Goodwin et al., 1994; Høvmøller et al., 2002; Guérin and Le Cam, 2004). Second, several papers have examined the nature and abundance of microsatellites in published partial or complete fungal genomes, and these have appeared less abundant in these fungal genomes than in other organisms (Lim et al., 2004; Dutech et al., 2007; Stewart et al., 2011).

The use of SSR markers in our study indicated that *A. euteiches* populations seemed to be less diverse than was indicated in past studies (Malvick et al., 1998, 2009; Grunwald and Hoheisel, 2006). Indeed, genetic diversity was low among locations in France and among locations in the US, with only eight multilocus genotypes observed within the 94 *A. euteiches* isolates tested. Factorial correspondence analysis indicated that the genetic structure of *A. euteiches* populations was dependant on the country of origin but not on the pathotype ($F_{ST} = 0.856$). Within French populations, two different clusters were observed, one corresponding to isolates sampled from fields where other legume species (vetch, alfalfa, or faba bean) were cultivated previously, and another corresponding to isolates sampled from fields where pea crops were grown as the only legume species. Thus, for the American *A. euteiches* populations and some French isolates, these results suggest that cultural practices and more particularly the frequency of different legumes species play an important role in the population structure. Indeed, this homothallic pathogen is polyphagous and was also reported to attack other legume species (common bean, broad bean, faba bean, clover, and alfalfa) (Moussart et al., 2008). As sexual recombination and gene flow remained low in population evolutionary processes, there may be a possible role for these host plants in the population structure.

To conclude, these SSR markers prove useful in characterizing genetic variation within and among *A. euteiches* populations. These markers will be helpful to the community to better understand how this soil-borne disease could evolve in their population diversity and how cultural practices could or not modify this diversity (Hernández-Delgado et al., 2009). More particularly, information gathered from population genetics studies may improve models of disease epidemics and forecasting, enhance the evaluation of risks to established plant cultivars, or assist in targeting control measures. *A. euteiches* was reported to attack other legume species (Levenfors and Fatehi, 2004; Moussart et al., 2008). However, infection of several host plants is a prevalent process in agrosystems, leading to change in epidemic process and pathogenicity (Woolhouse et al., 2001). Adaptation event of *A. euteiches* to host plant resistance has already been observed in alfalfa, as isolates overcoming genetic resistance to race 1 of *A. euteiches* have been identified (Grau et al., 1991). Consequently, the impact of alternative host on plant pathogen adaptation processes must be taken into account for the durable management and of resistance cultivars. For instance, incorporating knowledge of a pathogen's population structure into breeding for disease resistance may provide insight into the potential long-term and global effectiveness of resistant breeding lines. The importance of sexual reproduction for the maintenance of polymorphism or for the adaptive dynamic of the species links between wild and agricultural pathosystems exist, but in many cases an insufficient knowledge regarding the diversity and biology of the pathogens have led to wrong conclusions (Duan et al., 2003). By using SSRs markers with highest allelic diversity, we could well address questions of paternity or clonal structure. We can determine if populations deviated from Hardy-Weinberg equilibrium, if there is more or less heterozygote within populations, and if there is outcrossing within populations (McDonald and Linde, 2002; Montarry et al., 2010). Finally, as with many soil borne pathogens *A. euteiches* has limited means of dispersal, thus gene flow is thought to be limited (McDonald and Linde, 2002). The use of these SSRs markers will be helpful to study the role of anthropic activities on dispersal processes and on *A. euteiches* migration between neighboring fields.

Acknowledgments

The authors thank the AAP “Gestion Durable des Résistances” (GDR) program (Project GestAphaleg) for funding. This funding

was delivered by SPE (“Santé des Plantes et Environnement”), BAP (“Biologie et Amélioration des Plantes”), EA (“Environnement et Agronomie”), EF (“Ecologie des Forêts”), PmA (“Prairies et milieu Aquatiques”) INRA departments. Authors would like to thank A. Moussart and M.N. Even (Terres Inovia, UMT PISOM) for their valuable help in collecting soils from the different locations.

References

- Abdelnoor, R.V., Barros, E.G., Moreira, M.A., 1995. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified DNA amplification techniques and comparative analysis with pedigree data. *Braz. J. Genet.* 18, 265–273.
- Akamatsu, H.O., Grünwald, N.J., Chilvers, M.I., Porter, L.D., Peever, T.L., 2007. Development of codominant simple sequence repeat, single nucleotide polymorphism and sequence characterized amplified region markers for the pea root rot pathogen, *Aphanomyces euteiches*. *J. Microbiol. Methods* 71, 82–86.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, A Windows™-based Software for Population Genetic Analyses. Laboratoire Génome, Populations, Interaction CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Botstein, D., White, K.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314–331.
- Burnett, V.F., Coventry, D.R., Hirth, J.R., Greenhalgh, F.C., 1994. Subterranean clover decline in permanent pastures in north-eastern Victoria. *Plant Soil* 164, 231–241.
- Duan, X., Enjalbert, J., Vautrin, D., Solignac, M., Giraud, T., 2003. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Mol. Ecol. Notes*. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00350.x>.
- Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D., Giraud, T., 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fung. Genet. Biol.* 44, 933–949.
- Engelbrecht, C., Harrington, T., Steimel, J., Capettri, P., 2004. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Mol. Ecol.* 13, 2995–3005.
- Goodwin, S., Cohen, B., Fry, W., 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11591–11595.
- Grau, C.R., Muehlchen, A.M., Tofte, J.E., Smith, R.R., 1991. Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Dis.* 75, 1153–1156.
- Greenhalgh, F.C., Merriman, P.R., 1985. *Aphanomyces euteiches*, a cause of root rot of subterranean clover in Victoria. *Aust. Plant Pathol.* 14, 34–37.
- Grunwald, N.J., Hoheisel, G.-A., 2006. Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 96, 1134–1141.
- Guérin, F., Le Cam, B., 2004. Breakdown of the scab resistance gene Vf in apple leads to a founder effect in populations of the fungal pathogen *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94, 364–369.
- Hernández-Delgado, S., Reyes-Valdés, M.H., Rosales-Serna, R., Mayek-Pérez, N., 2009. Molecular markers associated with resistance to *Macrophomina phaseolina* (Tassi), in common bean. *J. Plant Pathol.* 91 (1), 163–170.
- Høvmøller, M.S., Justesen, A.F., Brown, J.K.M., 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathol.* 51, 24–32.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11, 424–429.
- Kraft, J.M., Pfleger, F.L., 2001. *Compendium of Pea Diseases and Pests*, second ed. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Lamari, L., Bernier, C.C., 1985. Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 139–145.
- Levenfors, J.P., Fatehi, J., 2004. Molecular characterization of *Aphanomyces* species associated with legumes. *Mycol. Res.* 108, 682–689.
- Lim, S., Notley-McRobb, L., Lim, M., Carter, D.A., 2004. A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal Genet. Biol.* 41, 1025–1036.
- Mackenzie, J.S., Chua, K.B., Daniels, P.W., Eaton, B.T., Field, H.E., Hall, R.A., Halpin, K., Johansen, C.A., Kirkland, P.D., Lam, S.K., Mcinn, P., Nisbet, D.J., Paru, R., Pyke, A.T., Ritchie, S.A., Siba, P., Smith, D.W., Smith, G.A., van den Hurk, A.F., Wang, L.F., Williams, D.T., 2001. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the western Pacific. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 497–504.
- Malaua, T., Gilles, A., Megléc, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., Delye, C., et al., 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 638–644.
- Malvick, D.K., Percich, J.A., 1998. Genotypic and pathogenic diversity among pea-1 infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from Central and Western United States. *Phytopathology* 88, 915–921.
- Malvick, D.K., Grau, C.R., Percich, J.A., 1998. Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity test and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycol. Res.* 102, 465–475.

- Malvick, D.K., Grunwald, N.J., Dyer, A.T., 2009. Population structure, races, and host range of *Aphanomyces euteiches* from alfalfa production fields in the Central USA. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 171–182.
- Maroof, M.A.S., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R.W., 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5466–5470.
- McDonald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 349–379.
- Milgroom, M.G., Liparis, S., Wang, K.R., 1992. Comparison of genetic diversity in the cheasnut blight fungus *Cryphonectria* (Endothia) *parasitica*, from China and the United States. *Mycol. Res.* 96, 1114–1120.
- Montarry, J., Andrivon, D., Glais, I., Corbière, R., Mialdea, G., Delmotte, F., 2010. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Ecol.* 19, 1965–1977.
- Moussart, A., Even, M.-N., Tivoli, B., 2008. Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122, 321–333.
- Paraskevis, D., Lemey, P., Salemi, M., Suchard, M., Van de Peer, Y., Vandamme, A.M., 2003. Analysis of the evolutionary relationships of HIV-I and SIV cpz sequences using Bayesian inference: Implications for the origin of HIV-I. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1986–1996.
- Pfender, W.F., Hagedorn, D.J., 1982. *Aphanomyces euteiches* f. sp. *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology* 72, 306–310.
- Rivas, G., Zapater, M., Abadie, C., Carlier, J., 2004. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol.* 13, 471–482.
- Scott, W.W., 1961. A Monograph of the Genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, Blacksburg, Virginia.
- Stewart, S., Wickramasinghe, D., Dorrance, A.E., Robertson, A.E., 2011. Comparison of three microsatellite analysis methods for detecting genetic diversity in *Phytophthora sojae*. *Biotechnol. Lett.* 33, 2217–2223.
- Struss, D., Plieske, J., 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. Appl. Genet.* 97, 308–315.
- Tenzer, I., Ivanishevitch, S.D., Morgante, M., Gessler, C., 1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89, 748–753.
- Tivoli, B., Baranger, A., Sivasithamparam, K., Barbetti, M.J., 2006. Annual Medicago – from a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the nature of disease resistance. *Ann. Bot.* 98, 1117–1128.
- Tobler, K., Ackermann, M., Griot, C., 2003. SARS-agent and lessons to be learned from pathogenic coronaviruses of animals. *Schweiz Arch. Tierh.* 145, 316–322.
- Woolhouse, M.E.J., Taylor, L.H., Haydon, D.T., 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* 292, 1109–1112.

Chapitre 2

ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET PHÉNOTYPIQUE DES POPULATIONS D'*APHANOMYCES EUTEICHES*

Chapitre 2 : Etude de la diversité génétique et phénotypique des populations d'*Aphanomyces euteiches*

1. Contexte

Aphanomyces euteiches est un agent pathogène tellurique possédant un large spectre d'hôtes notamment chez les légumineuses. Ce spectre d'hôtes inclut des espèces cultivées (pois, féverole, lentille, luzerne) et des espèces dites sauvages (vesce, gesse, lotier, etc.). Parmi les espèces cultivées, c'est la culture du pois qui est la plus déployée et utilisée dans les assolements (que ce soit en culture de rente ou en tête de succession). Cette culture est ainsi retrouvée dans plusieurs bassins de productions qui se situent principalement dans la partie nord du pays, autour de la région parisienne, en Normandie et dans le Nord. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, lorsque cette étude a été menée, peu de données sur le niveau de diversité génétique et phénotypique des populations françaises d'*A. euteiches* étaient disponibles. Un état des lieux de la diversité des populations d'*A. euteiches* en France, peu sujette à pressions de sélection sur les 20 dernières années (faibles surfaces cultivées en pois, pas de variétés résistantes), est apparu nécessaire à réaliser avant le déploiement des futures variétés partiellement résistantes. Il permettra de bénéficier de données à un point initial de la trajectoire évolutive que suivront les populations lorsqu'elles seront sujettes à pression de sélection et d'anticiper des stratégies de gestion durable des futures variétés partiellement résistantes. Cet état des lieux a été réalisé sur un panel plus large d'isolats français que précédemment étudié et un set plus important de génotypes de légumineuses.

2. Approche

Une collection de 205 isolats français d'*A. euteiches* a été constituée à partir d'échantillons de sols de parcelles naturellement infestées par la maladie, localisées dans les principaux bassins de production de pois en France. Sur la base des travaux du chapitre 1, vingt marqueurs microsatellites les plus polymorphes ont été sélectionnés. La diversité génétique et la structuration des populations d'*A. euteiches* ont ainsi été étudiées en s'appuyant sur plusieurs indicateurs et outils d'analyse de génétique des populations. La diversité de pouvoir pathogène d'un sous-échantillon d'isolats représentatif de la diversité génétique observée a été évaluée sur un set de génotypes de légumineuses élargi (pois, féverole, luzerne, et vesce). Des analyses statistiques ont été menées pour évaluer la variabilité du niveau de pathogénicité des isolats, et pour définir s'il existait des groupes de pathogénicité au sein de ce sous échantillon d'isolats.

3. Principaux résultats

Les analyses génétiques ont révélé une faible structuration des populations d'*A. euteiches*, indépendante de l'origine géographique. En outre, les résultats ont suggéré que ce faible niveau de diversité génétique pouvait s'expliquer par des traits de vie intrinsèques à l'agent pathogène, *i.e* reproduction clonale et faible capacité de dissémination. Cependant, ces travaux ont également révélé un profil particulier pour les isolats issus de parcelles de la région Bourgogne. En effet, le fort niveau d'hétérozygotie observé au niveau des différents loci microsatellites révélés sous-tend l'hypothèse des phénomènes d'outcrossing et du rôle des légumineuses hôtes dans l'augmentation de la variabilité des populations d'*A. euteiches*. Les résultats obtenus dans l'étude de la diversité de pouvoir pathogène corroborent les conclusions de précédentes études publiées, à savoir (i) la prépondérance d'isolats présentant un profil de virulence sur plusieurs espèces de légumineuses avec un niveau élevé d'agressivité sur les différentes espèces de légumineuses et (ii) le niveau élevé d'agressivité des isolats sur pois avec une faible diversité d'agressivité vis-à-vis de plusieurs génotypes, contrairement à d'autres légumineuses sur lesquels la diversité d'agressivité des isolats testés s'est montrée modérée.

4. Publication

Ces résultats font l'objet d'un article intitulé « Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France » qui a été publié dans le journal *Frontiers in Plant Science* (DOI : [10.3389/fpls.2018.01673](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01673)).



Genetic and Pathogenicity Diversity of *Aphanomyces euteiches* Populations From Pea-Growing Regions in France

Anne Quillévéré-Hamard^{1,2}, Gwenola Le Roy^{1,2}, Anne Moussart^{1,2,3}, Alain Baranger^{1,2}, Didier Andrivon¹, Marie-Laure Pilet-Nayel^{1,2†} and Christophe Le May^{2,4*†}

¹ IGEPP, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, Le Rheu, France, ² UMT PISOM INRA/Terres Inovia, Le Rheu, France, ³ Terres Inovia, Thiverval Grignon, France, ⁴ IGEPP, Agrocampus Ouest, INRA, Université de Rennes 1, Université Bretagne-Loire, Rennes, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Silvia Matesanz,
Universidad Rey Juan Carlos, Spain

Reviewed by:

Alfredo Garcia-Fernández,
Universidad Rey Juan Carlos, Spain
Yessica Rico,
Instituto de Ecología (INECOL),
Mexico

*Correspondence:

Christophe Le May
lemay@agrocampus-ouest.fr

†These authors have contributed
equally to this work

†Marie-Laure Pilet-Nayel
orcid.org/0000-0002-4505-1907

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Population Genetics,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 05 April 2018

Accepted: 26 October 2018

Published: 19 November 2018

Citation:

Quillévéré-Hamard A, Le Roy G, Moussart A, Baranger A, Andrivon D, Pilet-Nayel M-L and Le May C (2018) Genetic and Pathogenicity Diversity of *Aphanomyces euteiches* Populations From Pea-Growing Regions in France. *Front. Plant Sci.* 9:1673. doi: 10.3389/fpls.2018.01673

Aphanomyces euteiches is an oomycete pathogen with a broad host-range on legumes that causes devastating root rot disease in many pea-growing countries and especially in France. Genetic resistance is a promising way to manage the disease since consistent QTL controlling partial resistance have been identified in near isogenic lines of pea. However, there are still no resistant pea varieties cultivated in France. This study aimed to evaluate the phenotypic and genetic diversity of *A. euteiches* populations from the major pea-growing regions in France. A collection of 205 isolates, from soil samples collected in infested pea fields located in five French regions, was established and genotyped using 20 SSR markers. Thirteen multilocus genotypes were found among the 205 isolates which displayed a low genotypic richness (ranged from 0 to 0.333). Two main clusters of isolates were identified using PCoA and STRUCTURE, including a predominant group comprising 88% of isolates and another group representing 12% of isolates mainly from the Bourgogne region. A subset of 34 isolates, representative of the fields sampled, was phenotyped for aggressiveness on a set of resistant and susceptible varieties of four legume hosts (pea, faba bean, vetch, alfalfa). Significant differences in disease severity were found among isolates and three groups of aggressiveness comprising 16, 17, and 2 isolates, respectively, were identified using HCA analysis. A higher diversity in pathogen aggressiveness was observed among isolates from Bourgogne, which included different legumes in its crop history. Little relationship was observed between genetic clusters and pathogenicity in the subset of 34 isolates, as expected using neutral markers. This study provides useful knowledge on the current state of low to moderate diversity among *A. euteiches* populations before resistant pea varieties are grown in France. New insights and hypotheses about the major factors shaping the diversity and evolution of *A. euteiches* are also discussed.

Keywords: *Pisum sativum*, legume crops, *Aphanomyces* root rot, genetic structure, host specificity

INTRODUCTION

Aphanomyces euteiches Drechsler is an oomycete pathogen of legumes, which causes the devastating root rot disease of pea (*Pisum sativum* L.) worldwide (Kraft and Pflieger, 2001). In Europe, *A. euteiches* was first observed in Norway in 1925 (Sundheim, 1972), and was reported a few years later in France (Labrousse, 1933), where it has been considered to be highly damaging in infested pea areas since 1993 (Didelot and Chaillet, 1995). The increased frequency of pea crops in French crop rotations since 1978 is believed to have favored the development of the disease in all pea-producing areas (Wicker and Rouxel, 2001). To date, the disease has been recorded in pea-growing regions such as the Bassin-Parisien, Bretagne, Rhône-Alpes, Pyrénées, and Charente-Maritime (Wicker, 2001).

A. euteiches is a diploid, homothallic pathogen, i.e., having the capacity to complete its sexual cycle in the absence of any other individual (Lin and Heitman, 2007), that produces both oospores (sexual reproduction) and zoospores (asexual reproduction). Oospores can survive in the soil for more than 10 years (Papavizas and Ayers, 1974), and can resist unfavorable conditions (e.g., desiccation, freezing). *A. euteiches* was also reported to infect other legume species including alfalfa (*Medicago sativa*) (Delwiche et al., 1987), green bean (*Phaseolus vulgaris*) (Pfender and Hagedorn, 1982), faba bean (*Vicia faba*) (Lamari and Bernier, 1985) and common vetch (*Vicia sativa*) (Tsvetkova and Kotova, 1985). Currently, the main methods for managing the disease in France include avoidance of highly infested fields, which are diagnosed using an inoculum potential test, measuring disease severity on susceptible plants grown in field soil samples within a bioassay (Moussart et al., 2009), and crop rotations with non-host or resistant legume crops (Moussart et al., 2013). There are still no cultivated resistant varieties in France but consistent Quantitative Trait Loci (QTL) controlling partial resistance have been identified, validated in pea (Lavaud et al., 2015; Desgroux et al., 2016) and are being used in French pea breeding programs for the development of future resistant varieties. To support breeding for efficient resistance against *A. euteiches* populations present in French pea-growing regions more knowledge is required about the genetic diversity and the adaptive capacities of *A. euteiches* populations. A description of the state of *A. euteiches* population diversity before resistant varieties are grown is necessary to provide reference information for future comparisons with pathogenicity diversity after the development of resistant varieties.

Previous studies have described the diversity of *A. euteiches* populations worldwide. In the USA, results, obtained with dominant markers, showed high genetic diversity at the field and/or regional scales (Malvick et al., 1998; Grünwald and Hoheisel, 2006). Different genetic subpopulations were identified, which were distinguished based on the host of origin or host preference. However, all pea-infecting populations of *A. euteiches* showed significant linkage disequilibrium between markers, which suggested that selfing had played an important role in shaping the genetic structure of these populations (Grünwald and Hoheisel, 2006). In France, a preliminary study of the genetic diversity using AFLP markers found unstructured

populations among 56 pea *A. euteiches* isolates collected in infested fields (unpublished data). Recently, Mieuze et al. (2016) and Le May et al. (2018) used SSR and Sequence Related Amplified Polymorphisms (SRAP) markers, respectively, to show the absence of genetic structure among French pea isolates sampled from research disease nurseries. However, in the same study, Le May also found significant genetic structure among American isolates sampled from four American nurseries.

Prior studies also analyzed phenotypic diversity among pea-infecting *A. euteiches* isolates based on their pathogenicity on legume species and pea lines. In our study, the term “pathogenicity” included two principal characteristics generally evaluated in pathogens, including virulence and aggressiveness. Virulence refers to the ability of the pathogen to cause a susceptible response on a host plant (Parlevliet, 2002). Aggressiveness refers to the quantitative variation measured on susceptible hosts. In practice, aggressiveness can be measured through a variety of quantitative traits, including infection efficiency, latent period, spore production rate, infectious period and lesion size, expressed during the host–pathogen interaction (Sackett and Mundt, 2005). In the USA, Malvick and Percich (1998) observed field-dependent variations in pathogenicity on pea, alfalfa, and bean hosts among 114 isolates from pea fields in Minnesota, Wisconsin and Oregon. In France, Wicker et al. (2001) identified four types of pathogenicity among 91 French isolates, according to their aggressiveness on five legume species. Most of the isolates were pathogenic on at least three of the five species. Wicker and Rouxel (2001) analyzed the pathogenic variability of 88 French pea-infecting isolates compared to 21 foreign isolates on a differential set of six pea genotypes. All the French isolates belonged to one major pathotype, i.e., virulence group (pathotype I) and a wide range of aggressiveness was observed between these isolates. Another pathotype (pathotype III), which showed lower aggressiveness toward the pea genotype MN313, was identified among American isolates.

Thus, low genetic and pathogenicity diversity among pea-infecting *A. euteiches* isolates was previously reported in France. However, these findings were obtained from collections of small to medium size isolates (<100 individuals) partially isolated from nurseries, using mostly dominant markers that could not reveal heterozygosity on the *A. euteiches* genome, and testing the strain aggressiveness on a limited set of genotypes or legume species. However, we can hypothesize that the diversity of *A. euteiches* populations in France is wider than previously described, because pea is not grown at the same frequency and density in the different French regions and other host legume crops can be grown as intercrops. In addition, *A. euteiches* isolates analyzed in previous studies do not represent the diversity of agronomic and pedo-climatic situations existing in the different French regions grown in peas. Therefore, this study addressed the following question: what is the genetic and pathogenicity diversity of *A. euteiches* populations in pea-growing regions of France? To answer this question, a large novel collection of pea-infecting isolates from major French pea-growing regions was established, as well as a set of differential genotypes of four legume species used in crop rotations in France. The collection was characterized using co-dominant and neutral SSR markers

and genetic structure of the French pathogen populations was analyzed. Pathogenicity diversity was evaluated on a subset of isolates representing the genetic diversity within the populations.

MATERIALS AND METHODS

Creation of the Collection of *A. euteiches* Isolates

A total of 205 *A. euteiches* isolates were obtained from soils sampled between 2011 and 2013 in 17 infested fields, distributed within eight departments corresponding to the main French pea-growing regions (Table 1). These fields belong to a network of plots for epidemic monitoring in the main production areas of pea. The choice of fields was based on the positive results of the inoculum potential tests (Moussart et al., 2009). Fifteen to twenty soil sub-samples were collected in each field at a 20–25 cm depth across the field, according to a spatial distribution in “W” (Campbell and Madden, 1990). Soils were sampled at regular intervals along the spatial pattern in “W.” The soil sub-samples from each field were mixed and 3 liters of soil per field were stored at 5°C. The baiting method used to sample isolates from each 3 liter-soil sample was adapted from Moussart et al. (2001), using the soil indexing method developed by Sherwood and Hagedorn (1958). Soils of each field were placed in pots (4 pots/field) and five plants of the pea cv. Lumina were sown in each pot (20 plants/field). A total of 68 pots was used to harvest the 205 *A. euteiches* isolates from the 17 infested fields. Four to twenty-two isolates were isolated from necrotic roots observed on 20 plants per soil, grown for 14 days, in a climatic chamber under favorable conditions to the disease (photoperiod 8–16 h, temperature 23–25°C, saturating moisture). The heterogeneous number of isolates per soil sample was due to variation in the number of symptomatic plants and level of plant infection between fields. No isolates were isolated from single-zoospore progeny since low level of polymorphism was previously reported between single-zoospore progeny and parental strains (Grünwald and Hoheisel, 2006).

DNA Extraction and SSR Genotyping

DNA was extracted from mycelium samples of the 205 *A. euteiches* isolates. Mycelial explants were grown for 6 days at 25°C on Corn Meal Agar medium (CMA). Seven to ten agar discs (3 mm diameter) per culture were then transferred to peptone-glucose broth and grown for 6 days at 25°C. Mycelial mats were vacuum-filtered on Whatman paper, rinsed three times with sterile water, and transferred to Eppendorf tubes. The harvested mycelia were lyophilized and stored at –20°C. Twenty mg of mycelium were ground with a FastPrep® grinder and extracted with the Macherey-Nagel NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, France) according to the manufacturer's recommendations. The quality and quantity of DNA were evaluated using spectrophotometry and adjusted (Nanodrop ND-100; Nanodrop Technologies) to 10 ng/μL. The extracted DNAs were then stored at –20°C.

Twenty SSR primers, previously developed to amplify *A. euteiches* DNA (Mieuzet et al., 2016), were used in this study. The PCR reaction in simplex was carried out in 10 μL

containing 1X Green GoTaq® Flexi Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP (Promega, France), 1 μM each forward and reverse primer and 0.25 μM fluorescent-labeled M13 primer (FAM, Applied Biosystem), 1 U of GoTaq Flexi DNA polymerase (final concentration) (Promega, France) and 20 ng template DNA. Volumes were adjusted to 10 μL with sterile distilled water. Amplifications were conducted on a S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). The cycling conditions for PCR amplification were as described in Mieuzet et al. (2016). The amplified products were separated on 1.5% agarose (Lonza) gels, stained in 1X Tris-Borate EDTA (TBE) buffer containing 1X Sybr® Safe (Invitrogen) and visualized under UV light. They were diluted 1:75 then 1:25 in sterile distilled water to decrease the signal intensity and to perform a clear analysis of peaks on GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems) Two microliters of this dilution was then added to 10 μL HiDi formamide (Applied Biosystems) and 0.1 μL GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) then run on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The presence of alleles and their sizes were assigned using GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). To check for the absence of genotyping error, the reference isolate RB84 and water were used as positive and negative control, respectively, in three replicates. Samples displaying non-obvious peaks or specific molecular patterns were duplicated.

Genetic Diversity Analysis

SSR data were used to define MultiLocus Genotypes (MLGs) and checked for repeated MLGs. The number of repeated MLGs was identified using GENCLONE 2.0 (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). Genotypic evenness was evaluated using the index $R = (G-1)/(N-1)$, with G the number of distinct multilocus genotypes and N the number of isolates (Grünwald et al., 2003). The allelic richness (A_r) was estimated using the rarefaction method implemented in POPULATIONS 1.2.32 software (Langella, 1999), which estimated the number of alleles per locus for a reduced sample size. This analysis was carried out based on the smallest population size ($n = 4$) in a first estimation. In a second analysis small-size populations ($n < 10$) were rejected and an analysis was carried out only with the smallest remaining population size ($n = 12$). Observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity were computed using GenAlEx 6.5.2 (Peakall and Smouse, 2012). MICRO-CHECKER version 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to estimate the presence of null alleles at the SSR markers. Fis ($Fis = 1 - H_o/H_e$) (Weir and Cockerham, 1984) was calculated using GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995) with and without markers that displayed null alleles for each population. Clonality was assessed with the index of association (I_A) and $\bar{r}_d$ statistic, a measure of the multilocus linkage disequilibrium, calculated using Multilocus software version 3.1b (Agapow and Burt, 2001). The index of association between the scored alleles was estimated by comparing the variance of the genetic distances among alleles in the current dataset to the mean variance of 1,000 artificial re-sampled datasets. The $\bar{r}_d$ statistic is much less dependent on the number of loci than the index of association (Agapow and Burt, 2001). The I_A and $\bar{r}_d$ are expected to be zero if populations are freely recombining and greater than zero if

TABLE 1 | Origin of the 205 *Aphanomyces euteiches* isolates of the collection, collected in different French fields between 2011 and 2013.

Region	French department (area code)	Field (population code)	N	Latitude	Longitude
Bretagne	Finistère (29)	Riec/Belon (RB)	6	47°52'40.69"N	3°42'28.57"O
	Morbihan (56)	Bignan (BI)	6	47°52'51.30"N	2°44'21.70"O
Bourgogne	Côte d'Or (21)	Bretenière SO (BRO)	8	—	—
		Bretenière S1 (BR1)	16	47°14'17.68"N	5°05'39.37"E
		Bretenière S2 (BR2)	4	47°14'18.96"N	5°05'42.15"E
		Bretenière S3 (BR3)	8	47°14'34.44"N	5°05'44.90"E
		Houville La Branche SO (HBO)	12	48°27'03.55"N	1°38'25.93"E
Center	Eure-et-Loir (28)	Houville La Branche S1 (HB1)	22	48°27'23.30"N	1°38'20.98"E
		Pierres (P)	20	48°34'21.54"N	1°32'07.79"E
		Fresnay l'Evêque (F)	12	48°14'45.00"N	1°48'32.00"E
		Loiret (45)	13	48°19'47.80"N	2°22'96.20"E
		Nord-Pas-de-Calais	21	50°31'50.12"N	3°07'45.10"E
Nord-Pas-de-Calais	Nord (59)	Ennevelin SO (ENO)	21	50°31'50.12"N	3°07'45.10"E
		Ennevelin S1 (EN1)	8	50°31'50.71"N	3°08'09.90"E
Ile de France	Essonne (91)	Nainvilles Les Roches (NR)	16	48°51'96.00"N	2°49'00.00"E
		Mondeville (MO)	9	48°28'57.00"N	2°25'15.00"E
		Boigneville (BO)	11	48°32'94.90"N	2°38'72.20"E
		Seine et Marne (77)	13	48°35'43.13"N	2°45'10.58"E
		Crisenoy (CR)	13	48°35'43.13"N	2°45'10.58"E

N, Number of isolates sampled in each field.

linkage disequilibrium between alleles is maintained through selfing (clonality).

Population Structure Analysis

Partition of molecular diversity among and within regions, as well as among and within populations, was studied using analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992; Lynch and Milligan, 1994). AMOVA was performed using Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005).

A principal coordinate analysis (PCoA) of the mean pairwise population genetic distance matrix was performed using the standardized genetic distance in GenALEX 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). *A. euteiches* isolates were clustered with and without Bourgogne population using the Bayesian Clustering approach implemented in STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000). The analysis was performed using 5×10^5 burn-in replicates and a run length of 2×10^5 Markov chain Monte Carlo (MCMC) replicates, adopting the admixed model and the correlated allele frequencies option. The number of genetic groups (*K*-value) was estimated using the model developed by Evanno et al. (2005), which provides an estimate of the posterior probability of the data for a given *K*, *Pr* (*X*/*K*). We used the height of the modal value of the distribution as an indicator of the strength of the signal detected by STRUCTURE software. Five independent runs were performed for *K* values between one and 10 in order to verify the convergence of parameter estimates. A Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) was also performed using the “adeget” package of R software (Jombart et al., 2018), to confirm and describe the genetic clusters identified. Finally, a Minimum spanning network (MSN) using Nei's distance for the different populations of *A. euteiches* was calculated with the “poppr” package (Kamvar et al., 2018) from R software, version 3.2.2 (R Core Team, 2014). The interactive

tool “imsn()” was used to create minimum spanning networks. Multilocus genotypes (MLG) were collapsed to multilocus haplotypes based on the minimum genetic distance at which two individuals would be considered from different clonal lineages. Haplotypes were represented by circles containing the number of isolates, and sized in proportion to haplotype frequency.

Pathogenicity Testing

Pathogen and Plant Material

The strain aggressiveness level was evaluated for 34 of the 205 *A. euteiches* isolates, including two isolates randomly sampled in each of the 17 fields used for the collection. The RB84 French reference strain (pathotype I, Moussart et al., 2007) was also used as a control.

Pathogenicity tests were conducted on eight genotypes from four leguminous species, which previously showed various levels of resistance vs. susceptibility to the RB84 strain of *A. euteiches* (Moussart et al., 2008). The plant genotypes included: pea (*Pisum sativum*) cv. Lumina (susceptible), gm. MN313 (susceptible to pathotype I isolates, but partially resistant to pathotype III isolates, Wicker and Rouxel, 2001) and gm. PI180693 (partially resistant); alfalfa (*Medicago sativa*) cv. Zenith (susceptible); vetch (*Vicia sativa*) cv. Amethyste (susceptible) and cv. Topaze (resistant); faba bean (*Vicia faba*) cv. Baraca (moderately susceptible) and cv. Melodie (resistant).

Pathogenicity Tests and Disease Severity

Assessment

The 34 isolates were assayed in an experiment comprising eight pathogenicity tests conducted in controlled conditions (Additional File 1). Each test included four to five isolates and the RB84 strain, individually inoculated on the eight genotypes. Each test comprised four replicates of four to five plants per

genotype and isolate tested. The experiment was performed twice, in 2016 and 2017, respectively, in the same climatic chamber, in order to confirm the results. A modified version of the standardized test developed for evaluating pea resistance to *A. euteiches* was used (Moussart et al., 2001). Seeds were sown in plastic pots (9*9*9.5 cm) containing unsterilized vermiculite (VERMEX, M). Faba bean seeds were soaked in water for 2 h before sowing. In each pot, five seeds of one pea, vetch or alfalfa genotype, and four seeds of one faba bean genotype were sown. Each pot constituted a replicate. Trays containing the four replicates (pots) were placed in a randomized design in a growth chamber (thermo period: 25/23°C and 16 h photoperiod). Seven days after sowing, each plant was inoculated by applying 5 ml of a zoospore suspension adjusted to 5.10^3 spores/ml, as previously described by Moussart et al. (2001). After inoculation, the vermiculite was saturated with water to provide favorable conditions for infection. After 10 days, the plants were carefully removed from the vermiculite, the roots were washed in tap water and disease severity (DS) was scored on each plant using a 0–5 scoring scale (14): 0 = no symptoms; 1 = traces of discoloration on the roots (<25%); 2 = discoloration of 25 to 50% of the roots; 3 = discoloration of 50 to 75% of the roots; 4 = discoloration of >75% of the roots; 5 = plant dead.

Statistical Analysis of Phenotypic Data

Statistical analysis was performed using R software, version 3.2.2 (R Core Team, 2014).

To check that a given isolate shows consistent results across experiments, correlations were estimated between DS score means obtained for (i) the different isolates in the two experiments and (ii) the RB84 strain in the sixteen pathogenicity tests over the two experiments, using Pearson coefficients (p -value = 0.05).

DS scores were analyzed as ordinal qualitative data using a cumulative link mixed model (CLMM; “clmm” function, “ordinal” package) (Christensen, 2015). In a first analysis, the DS score was considered as the dependant variable, the isolate, legume species, or genotypes as fixed factors and the replicate and experiment as random factors. ANOVA tests using “car” and “RVAideMemoire” packages (Hervé M., 2015; Fox and Weisberg, 2016) were performed to evaluate the legume species and genotype effects (p -value = 0.05) in the CLMM model. In a second analysis conducted for each genotype, the DS score was considered as the dependant variable, the isolate as a fixed factor and the replicate and experiment as random factors. ANOVA tests using “car” and “RVAideMemoire” packages (Hervé M., 2015; Fox and Weisberg, 2016) were carried out to evaluate the isolate effects (p -value = 0.05) in the CLMM model. Least square means (LSMeans) were calculated for each isolate and genotype using the “lsmeans” function of the “lsmeans” package (Lenth and Herve, 2015). Then, for each genotype, LSMeans were compared to the value obtained for the RB84 reference isolate in all tests with a Tukey test (p -value = 0.001), using the “cld” function of the “MultCompView” package (Graves et al., 2015). The probability to obtain each DS scores (0 to 5) for each isolate per genotype was calculated with the “rating lsmeans” function. The probability of DS scores was comprised between 0 and 1.

Virulence is usually associated with the pathogen's capacity to infect a specific host (Van der Plank, 1968) and to multiply in the host (Casadevall and Pirofski, 2001). Virulence phenotypes were defined based on the DS score probability obtained from the CLMM for the four susceptible legume genotypes. An isolate was declared virulent on a legume species (P: pea; V: vetch; F: faba bean; A: alfalfa) when the probability of symptom appearance on the susceptible legume genotype (DS score ≥ 1 , presence of oospores in roots; Wicker et al., 2001) was greater than 0.5.

Isolates were assigned to previously described pea pathotypes (Wicker and Rouxel, 2001), based on their level of aggressiveness on the three pea genotypes used in this study. An isolate was assigned to pathotype I when LSmean scores obtained from CLMM on the three pea genotypes were significantly different (p -value < 0.05), with Lumina, the most susceptible genotype, MN313, the genotype with intermediate behavior and PI180693, the most resistant genotype. An isolate was assigned to pathotype III when the LSmean score obtained on MN313 was both significantly lower than on Lumina and equal to or lower than on PI180693 (Onfroy et al., personal communication).

A principal component analysis (PCA; “pca” function, “FactoMineR” package) (Husson et al., 2007) was performed using DS LSmean scores for each isolate and genotype, in order to analyze the structure of *A. euteiches* isolates according to their phenotypic variability on the eight genotypes. A hierarchical clustering analysis (HCA) was then carried out to define groups of isolates using the “hclust” function of the “fastcluster” package (Müllner, 2015).

Statistical analysis was carried out in order to evaluate the differences between the DS scores of the different genetic clusters from the Bayesian analysis (STRUCTURE) on each plant genotype. DS scores were analyzed using a cumulative link mixed model (CLMM; “clm” function, “ordinal” package), in which the DS score was considered as the dependant variable, the genetic cluster and the genotypes as fixed factors and the replicate and experiment as random factor. ANOVA tests using “car” and “RVAideMemoire” packages were performed to evaluate the cluster and genotype effects (p -value = 0.05) in the CLMM model. In a second analysis conducted for each genotype, the DS score was considered as the dependent variable, the cluster as a fixed factor and the replicate and experiment as random factors. ANOVA tests using “car” and “RVAideMemoire” packages (Hervé M., 2015; Fox and Weisberg, 2016) were carried out to evaluate the cluster effects (p -value = 0.05) in the CLMM model. Least square means (LSMeans) were calculated for each cluster using the “lsmeans” function of the “lsmeans” package (Lenth and Herve, 2015). Then, for each genotype, LSMeans were compared with a Tukey test (p -value = 0.05), using the “cld” function of the “MultCompView” package (Graves et al., 2015).

RESULTS

Genetic Diversity and Structure of *A. euteiches* Populations

Genotyping of the 205 *A. euteiches* isolates with the 20 SSRs revealed a total of 42 alleles, with one to three alleles

per SSR marker within the collection. Most of the isolates were homozygous at SSR loci. However, some isolates from the Bourgogne region displayed distinct patterns, with a lot of heterozygous loci (**Additional File 2**). A low level of SSR genotypic diversity was observed among isolates within fields, according to the number of distinct MLGs observed per field ($G \leq 3$, except at BR1 and ENO; **Table 2**). Indeed, among the 205 isolates, GENCLONE analysis detected 19 different MLGs, including six MLGs differing from each other by one allele. Due to scoring errors, distinct MLGs belonging to the same clone can be found (Meirmans and Van Tienderen, 2004). As this was observed in this microsatellite data sets, each MLG pair presenting extremely low distance (i.e., 1–2 allelic differences) was grouped into the same multilocus lineages (Arnaud-Haond et al., 2007) resulting in a total of 13 MLG identified among the isolates in the collection (**Additional File 3**). MLGs 1 and 7 were the most represented, comprising 54 and 16% of the isolates studied, respectively. Genotypic richness (R) ranged from 0 (BRO, BR2, HBO, F, BO, and CR) to 0.333 (BR1). Only four fields (ENI, BR1, RB, and B1) showed an R index equal or greater than 0.20 (**Table 2**).

Genetic diversity indexes also showed low variability among isolates within fields, with a low level of heterozygosity and high proportion of allele fixation. Ar values did not exceed 1.84 alleles per population and were similar between populations except for BR1 and BR3 (**Table 2**). The rate of heterozygosity observed in each population was low, except for BR1 and BR3 ($H_o = 0.269$ and $H_o = 0.788$, respectively). Null alleles were present in the BR1, HB1, BL, P, ENO, EN1, NR, MO, and CR populations.

The excess of heterozygosity in the two fields BR1 and BR3 was confirmed by a negative Fis value, whether corrected or not with null alleles, whereas complete allele fixation was observed for the other fields except for the HB1 population which showed a quasi-complete allele fixation (**Table 2**). A majority of the populations had significant I_A and $\bar{r}_d$ (p -value < 0.01), suggesting high multi-locus linkage disequilibrium and clonal populations (**Table 2**).

AMOVA confirmed the lack of genetic subdivision between regions and revealed that 53% (p -value < 0.001) and 45% (p -value < 0.001) of the total genetic variance was partitioned among populations and within populations, respectively, whereas 2% (p -value = 0.025) was attributable to differences among regions.

STRUCTURE analysis showed a maximum log likelihood score at $K = 2$ (delta $K = 100$) (**Additional File 4A**), suggesting no differentiation between populations except for most populations from Bourgogne (**Figure 1A**, **Additional File 3**). Results showed that 87.8 and 12.2% of the isolates belonged to cluster 1 and cluster 2, respectively, with moderate to high inference probabilities of isolates to cluster 1 ($p > 0.99$) and cluster 2 ($p > 0.68$). Cluster 1 included isolates with homozygous genotypic patterns from the five different French regions sampled. Cluster 2 included 25 isolates, among which 14 isolates from Bourgogne (BR1, BR3) showed heterozygous genotypic profiles. PCoA analysis confirmed distinct genetic structure of isolates from Bourgogne (BR1, BR3) compared to isolates from the other fields, with the first principal axis contributing to 52.11% of the variation (**Figure 2A**). The distinct genetic

TABLE 2 | SSR genotypic and genetic diversity parameters for each *Aphanomyces euteiches* population.

Field (population) code	SSR genotypic diversity			Genetic diversity							Genetic disequilibrium	
	N	G	R	Ar (n = 4)	Ar (n = 12)	He	Ho	Na	Fis non-corrected	Fis corrected	I_A	$\bar{r}_d$
RB	6	2	0.2	1.15	–	0.067	0	0	1	1	2.000***	1.000***
BI	6	2	0.2	1.05	–	0.022	0	0	1	1	–	–
BRO	8	1	0	1	–	0	0	0	–	–	–	–
BR1	16	6	0.333	1.75	1.4	0.267	0.269	2	–0.03	–0.146	11.372***	0.769***
BR2	4	1	0	1	–	0	0	0	–	–	–	–
BR3	8	2	0.14	1.84	–	0.403	0.788	0	–0.95	–0.95	1.000**	1.000***
HBO	12	1	0	1	1	0	0	0	–	–	–	–
HB1	22	2	0.048	1.14	1	0.053	0.005	3	0.78	–0.024	1.809***	0.677***
BL	13	2	0.083	1.05	1.05	0.021	0	1	1	1	–	–
P	20	3	0.105	1.11	1.05	0.048	0.003	2	0.96	1	0.214	0.114
F	12	1	0	1	1	0	0	0	–	–	–	–
ENO	21	4	0.15	1.12	1.1	0.054	0.005	2	0.93	1	0.656***	0.349***
EN1	8	3	0.286	1.09	–	0.034	0	1	1	1	–	–
NR	16	2	0.066	1.05	1.05	0.025	0	1	1	1	–	–
MO	9	2	0.125	1.19	–	0.069	0	4	1	1	3.000***	1.000***
BO	12	1	0	1	0	0	0	0	–	–	–	–
CR	13	1	0	1.05	1.05	0.018	0	1	1	1	–	–

N, number of isolates; G, number of distinct multilocus genotype; R, genotypic richness; Ar, allelic richness corrected for sample size (n); He: expected heterozygosity without bias (Nei, 1978); Ho, observed heterozygosity; Na, number of SSR markers with null alleles; Fis, average deviation from Hardy-Weinberg proportions with (non-corrected) or without (corrected) null alleles; I_A index of association and $\bar{r}_d$ the standardized index of association (** p -value < 0.001 , * p -value < 0.01 , p -value < 0.05 , p -value < 0.1); – missing data.

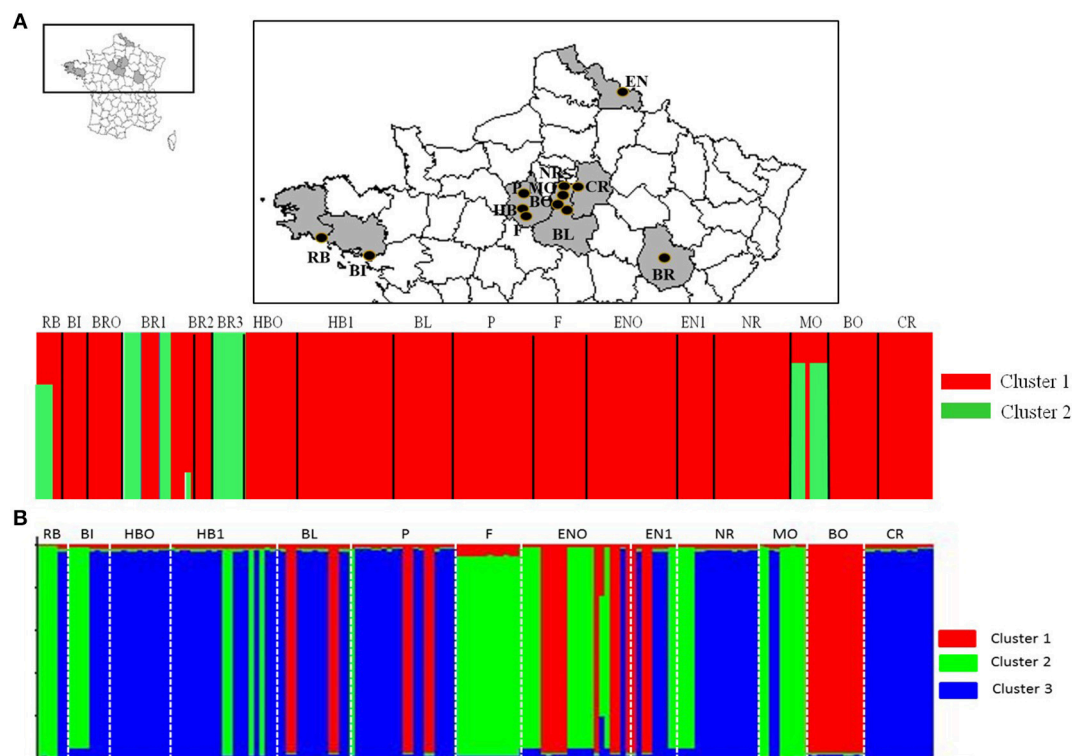


FIGURE 1 | (A) Geographical position of fields distributed in five regions and Bayesian analysis (STRUCTURE) of the corresponding isolates, with Bourgogne (BR) data. Assignment probabilities of *A. euteiches* isolates are presented for $k = 2$ and a delta $k = 100$. Each vertical dotted line separates isolates from each of the 17 sites. **(B)** Bayesian analysis of the corresponding isolates, without Bourgogne (BR) data. Assignment probabilities of *A. euteiches* isolates are presented for $k = 3$ and a delta $k = 1,600$. Each vertical dotted line separates isolates from each of the 13 sites.

structure of BR1 and BR3 populations was also confirmed by DAPC analysis (**Additional File 5A**).

Structure analysis excluding isolates from Bourgogne revealed a highest level of hierarchical sub-structure with $K = 3$ (delta $K = 1600$) (**Figure 1B**, **Additional Files 3, 4B**). However, this result is not fully consistent with the results obtained with PcoA and DAPC, which more highlighted a structure of *A. euteiches* populations according to their region of origin (**Figure 2B**, **Additional File 5B**).

The MSN analysis confirmed results obtained with STRUCTURE and PCoA on the entire collection, since the nineteen identified haplotypes were classified into two main groups separated by more than 0.25 Nei's genetic distance. One genetic group included isolates from Bourgogne in seven poorly represented haplotypes and the other genetic group included most of the isolates in 12 haplotypes. For the latter group there was no relationship between haplotype and geographical origin (**Figure 3**).

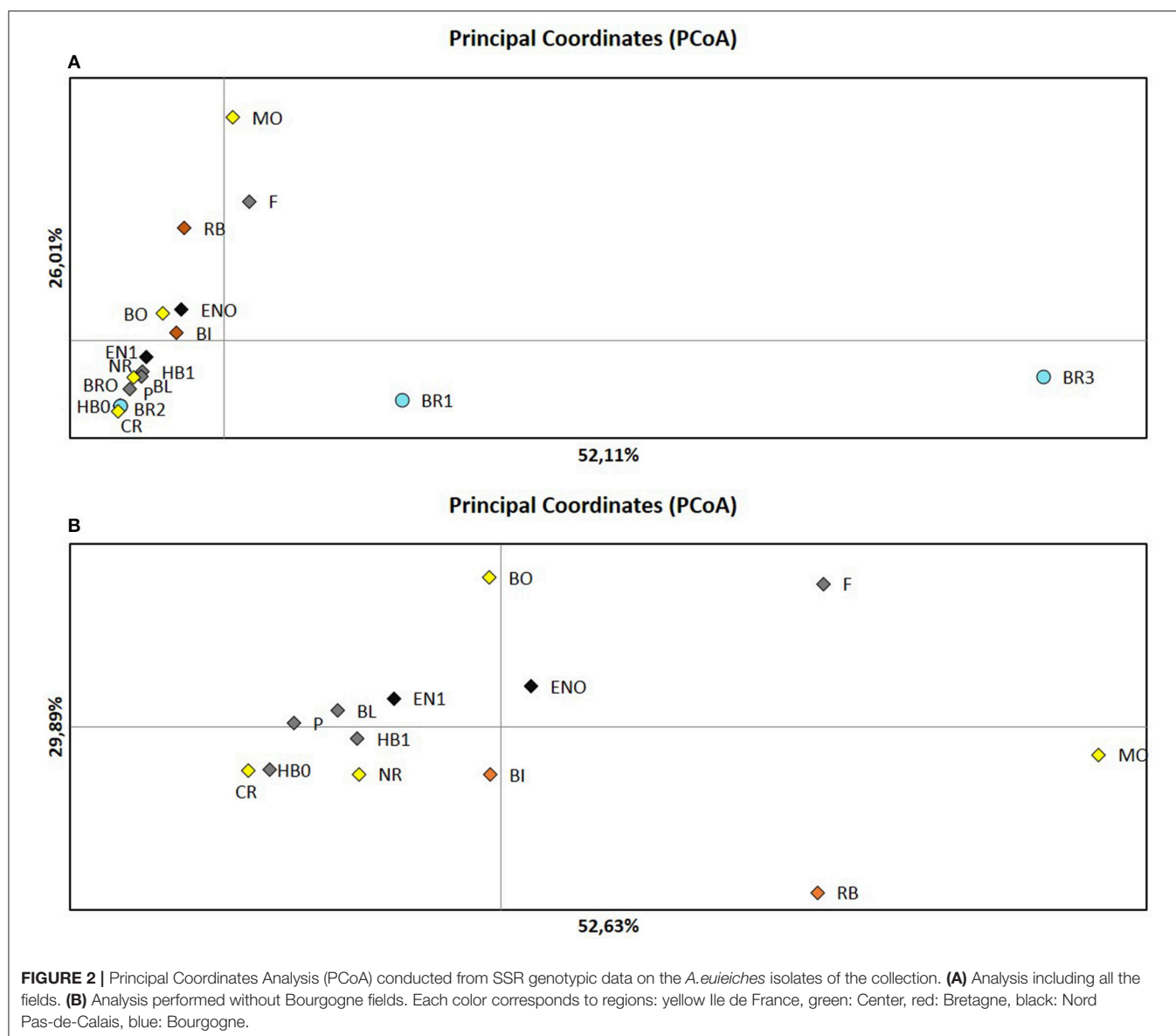
Pathogenicity Diversity of *A. euteiches* Isolates

DS scores on the eight legume genotypes tested for all 34 isolates were significantly correlated between the two experiments ($r > 0.84$, $P < 0.05$). DS scores for the RB84 strain were significantly

correlated between the sixteen tests in the two experiments ($r > 0.93$, $P < 0.05$).

A. euteiches isolates caused significantly different levels of disease severity among the tested legume species (p -value = $6.34 \cdot 10^{-15}$), genotypes (p -value = $2.07 \cdot 10^{-8}$) and isolates (p -value $< 2 \cdot 10^{-16}$). Highest levels of disease were observed on pea, followed by alfalfa, vetch and faba bean. In each legume species, our results confirmed the expected response of resistance or susceptibility of the genotypes tested. In pea, Lumina, MN313 and PI180693 presented high, intermediate and low average DS values, respectively, in response to each of the isolates tested (**Table 3**).

Significant DS differences were observed between several isolates of the collection and RB84, on the pea genotype PI180693, the vetch genotype Améthyste and the faba bean genotype Baraca (p -value < 0.0049) (**Table 3**). In addition, some isolates had the same effects on different genotypes (low variance) and other had different effects (high variance) depending on the French regions and the plant genotype. Isolates from Bourgogne showed the highest DS variance on almost all the genotypes tested. The vetch genotype Topaze, as well as the faba bean genotype Baraca and mostly Melodie, had the most highly diverse DS scores in response to the isolates sampled from the different regions (**Additional File 6**). Twenty eight isolates were virulent on the four susceptible legume genotypes (PVFA

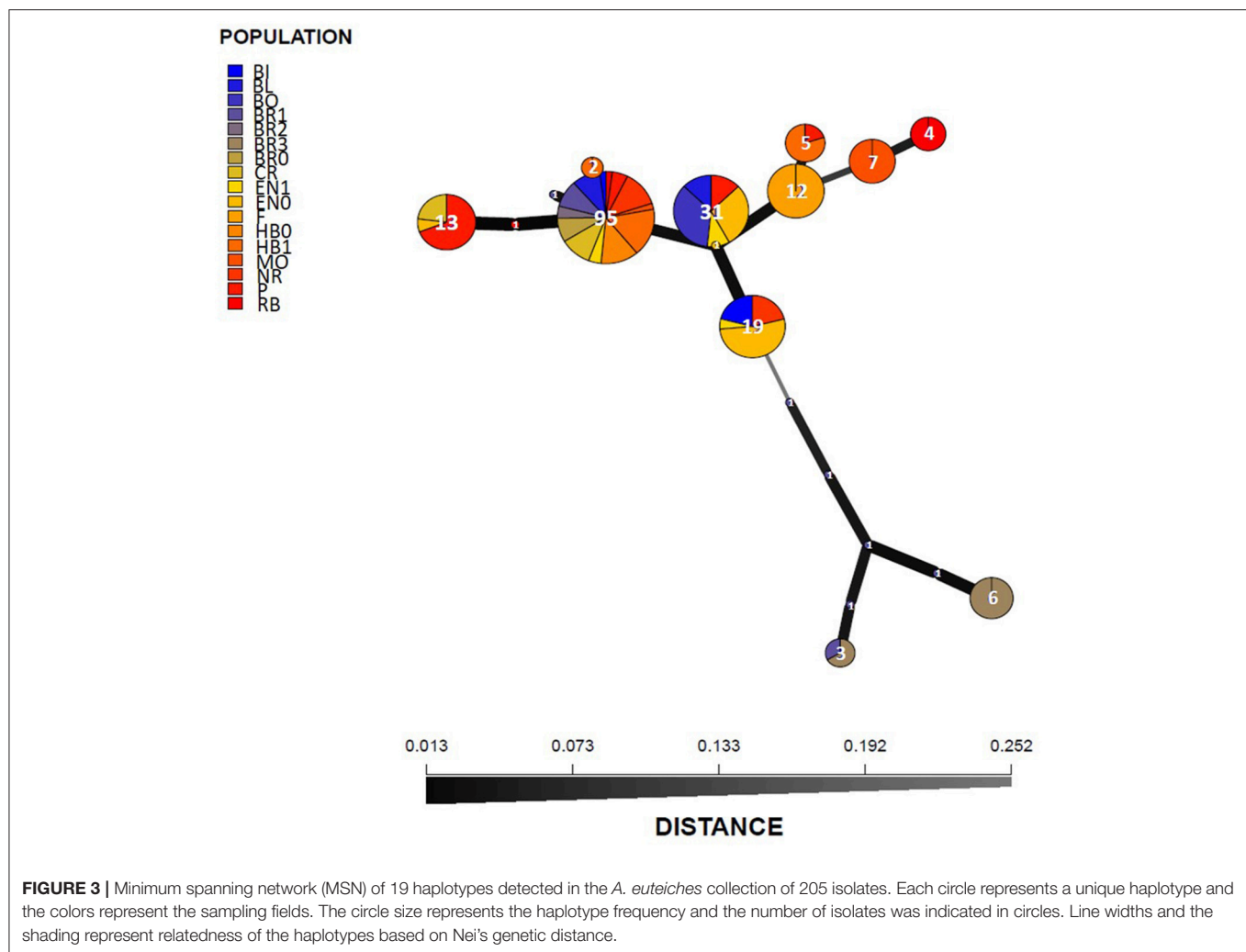


virulence phenotype profile). Four isolates (BR2-4, EN1-3, BO5, and BO13) were virulent on all the legumes tested but vetch (PFA profile) and two isolates from Bourgogne (BRO-2 and BRO-6) were virulent only on pea (P profile) (Table 3, Additional File 7). All 34 isolates were assigned to pea pathotype I (Table 3, Additional File 8).

Hierarchical clustering and PCA identified three clusters of pathogenicity (cluster A: 16 isolates, cluster B: 17 isolates, and cluster C: 2 isolates) among the 34 isolates (Figure 4A). Cluster C included two isolates from Bourgogne (BRO-2, BRO-6), isolated from a different field than those identified in genetic group 2 (BR1, BR3). The first PCA axis ($R^2 = 58.04\%$) separated cluster C from clusters A and B (Figure 4A). Hierarchical clustering on the PCA analysis performed without isolates from Bourgogne separated isolates belonging to clusters A and B regardless of their region of origin, with a first PCA axis accounting for

39.26% of the total phenotypic variability (Figure 4B). Isolates belonging to cluster A included the reference isolate RB84 and showed a PVFA virulence phenotype profile. Isolates belonging to cluster B displayed PVFA and PFA profiles and the two isolates belonging to cluster C displayed a P virulence phenotype profile (Table 3).

A. euteiches isolates caused significantly different levels of disease severity among the genetic cluster and genotypes (p -value $< 2.10^{-16}$). On each plant genotype, significant differences (p -value < 0.05) were observed between LSMeans of DS scores of two out of the three genetic clusters obtained from the Bayesian analysis (STRUCTURE), except on the vetch genotypes Amethyste and Topaze. On Amethyste, DS Score LSMeans were significantly different between the three genetic clusters, whereas on Topaze, these were not different between clusters (Additional File 9).



DISCUSSION

A. euteiches is a major devastating disease of spring pea in France. Intensification of spring crops and short rotations resulted in the significant development of the disease. This study is the first report analyzing both the genetic and pathogenicity diversity of *A. euteiches* populations from French pea-growing regions using co-dominant markers. This study gives insights into (i) the genetic diversity of French *A. euteiches* populations at the regional scale, (ii) the phenotypic diversity of isolates for pathogenicity on different legume hosts, and (iii) the relationship between genotypic and phenotypic group.

Most French *A. euteiches* Populations Have Low Genetic Structure and Diversity

Based on the genetic polymorphism of SSR markers, this study shows that the genetic structure of French *A. euteiches* populations is low and not related to geographical origin. A low level of genetic diversity in *A. euteiches* populations was observed between the different locations in France, as shown by the moderate number of multilocus genotypes identified (13

different MLGs within 205 isolates) including a predominant MLG (MLG1) shared by 54% of the isolates studied. This result is consistent with previous studies conducted on French and American *A. euteiches* populations, using codominant or dominant markers (Malvick and Percich, 1998; Wicker, 2001; Grünwald and Hoheisel, 2006; Mieuzet et al., 2016; Le May et al., 2018). In this study, the similar level of differentiation observed within and among populations also confirmed the absence of a clear genetic structure, as previously reported (Malvick and Percich, 1998; Wicker et al., 2001; Grünwald and Hoheisel, 2006). The absence of resistance level toward the disease and the deployment of the same pea susceptible cultivars across several geographic area in France limit selection by host. This could explain the low level of neutral genetic differentiation effects. Moreover, founder effect which can lead to reduce the genetic variation within the *A. euteiches* populations may not occur due to the production of a large number of oospores at each cropping season and the ability of oospores to be conserved in the soil for many years. The high level of linkage disequilibrium observed suggests clonal reproduction in the populations studied, in line with the low level of genotypic diversity observed. These results

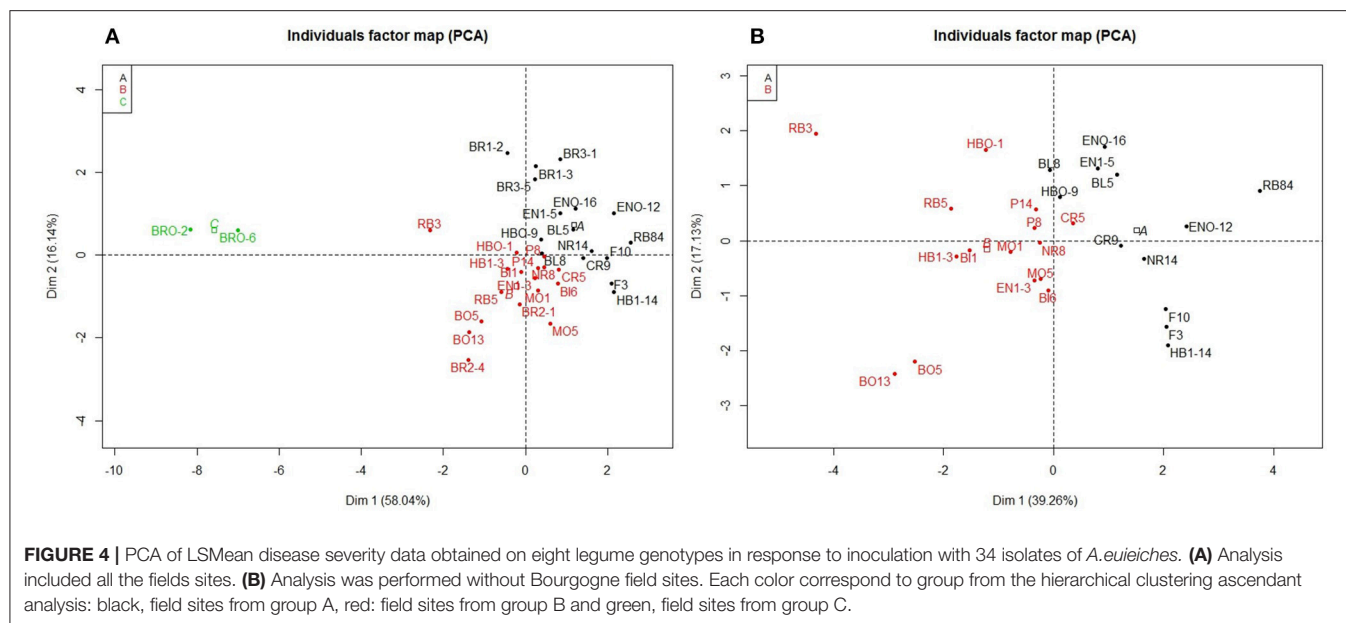
TABLE 3 | Disease severity (DS) LSMeans values obtained from CLMM analysis of DS ratings on roots of eight genotypes of four different legume species, in response to inoculation with 34 *A. euteiches* isolates from the collection (two isolates per field).

Species	Pea			Vetch		Faba bean		Alfafa	Virulence phenotype	Pathotype	MLG
Isolates	LSMeans Lumina	LSMeans MN313	LSMeans PI180693	LSMeans Amethyste	LSMeans Topaze	LSMeans Baraca	LSMeans Melodie	LSMeans Zenith			
RB84	12.328	6.813	2.236	4.119	−3.785	1.111	−2.143	1.274	PVFA	I	3
RB3	5.892	4.830	−0.537***	−0.391***	−1.729	−1.861***	−5.595	−1.150***	PVFA	I	3
RB5	8.316	5.616	1.089	0.542***	−3.856	−1.899***	−5.615	−0.071	PVFA	I	1
BI1	7.285	6.764	0.614	1.612	−4.255	−2.261***	−3.853	0.067	PVFA	I	4
BI6	8.316	7.845	1.292	1.565	−4.652	−1.655	−3.294	0.168	PVFA	I	1
BRO-2	−1.013	−3.535***	−4.583***	−9.432***	−2.320	−5.620***	−5.623	−5.468***	P	I	1
BRO-6	0.444	−1.891***	−2.775***	−7.566***	−1.547***	−5.535***	−5.603	−4.034***	P	I	1
BR1-2	2.452	3.888	−0.753***	1.121	−3.426	0.494	−2.671	2.258	PVFA	I	12
BR1-3	5.396	5.975	−0.762***	−0.654***	−2.977	0.649	−1.644	1.650	PVFA	I	11
BR2-1	7.105	5.752	0.994	−3.603***	−5.411	−1.829***	−3.510	−0.027	PVFA	I	1
BR2-4	9.035	6.675	0.923	−6.639***	−4.555	−2.508***	−5.656	−2.495***	PFA	I	1
BR3-1	5.547	5.901	−1.939***	3.124	−4.271	1.175	−1.665	1.804	PVFA	I	11
BR3-5	5.749	5.978	−1.003***	−0.949***	−3.497	0.707	−0.765	0.009	PVFA	I	10
HBO-1	8.175	4.128	−0.130	−1.640***	−4.317	−1.401	−4.028	1.939	PVFA	I	1
HBO-9	9.012	4.981	1.829	1.991	−3.003	−0.018	−2.898	−0.617	PVFA	I	1
HB1-3	7.536	6.546	−0.954***	−1.058***	−4.687	−1.396	−3.355	−1.135	PVFA	I	1
HB1-14	8.982	5.966	4.200	0.919	−5.411	−0.305	−1.313	0.560	PVFA	I	1
BL5	8.941	5.617	2.057	3.666	−3.294	1.002	−3.260	0.485	PVFA	I	1
BL8	9.012	4.371	1.713	1.414	−3.679	−0.575	−3.826	0.969	PVFA	I	1
P8	8.292	5.737	0.242	0.969	−4.688	−0.978	−2.772	0.181	PVFA	I	1
P14	8.966	4.687	0.610	0.919	−4.688	−0.365	−3.547	−0.357	PVFA	I	7
F3	9.035	6.081	3.466	2.439	−5.447	0.377	−1.589	−0.264	PVFA	I	8
F10	8.959	7.125	2.641	2.133	−4.634	0.339	−1.074	−0.123	PVFA	I	8
ENO-12	8.975	7.479	1.317	2.298	−3.954	0.634	−0.850	1.663	PVFA	I	4
ENO-16	8.064	5.592	1.121	2.466	−3.570	0.211	−2.630	2.494	PVFA	I	5
EN1-3	8.175	7.312	2.270	−8.745***	−3.109	−0.861	−3.242	1.825	PFA	I	7
EN1-5	9.035	6.196	0.451	1.633	−3.131	0.495	−2.399	0.582	PVFA	I	1
NR8	9.012	4.660	1.087	1.979	−4.707	−1.776***	−2.198	−0.240	PVFA	I	1
NR14	8.982	6.262	2.903	2.411	−3.952	0.605	−2.097	0.095	PVFA	I	1
MO1	7.853	6.783	1.920	0.843	−4.254	−1.298	−4.846	0.510	PVFA	I	1
MO5	9.006	5.584	2.487	0.558***	−5.395	−1.065	−4.914	0.003	PVFA	I	6
BO5	7.291	5.211	1.982	−11.334***	−4.271	−2.422***	−2.769	−0.673	PFA	I	7
BO13	7.105	5.932	2.507	−10.555***	−3.698	−1.906***	−3.890	−1.883***	PFA	I	7
CR5	9.035	4.925	0.390	−1.097***	−5.410	−0.168	−2.871	0.770	PVFA	I	1
CR9	8.989	6.161	1.636	1.427	−4.688	0.252	−2.435	0.515	PVFA	I	1
Mean	7.580	5.370	0.873	−0.672	−4.008	−0.847	−3.155	0.037			
Standard Deviation	2.556	2.234	1.780	4.211	0.986	1.622	1.432	1.640			

LSMean scores highlighted in gray with the isolates tested are significantly different from the LSMeans score obtained with the RB84 reference strain for the same genotype (***p-value < 0.001). A Virulence phenotype is defined on pea (P), vetch (V), faba bean (F) and alfalfa (A) when the probability of DS score ≥ 1 on the four susceptible legumes (Pea: Lumina; Vetch: Amethyste; Faba bean: Baraca; Alfalfa: Zenith) is equal or higher than 0.5, according to the CLMM analysis. Pathotype I was attributed for all the isolates since LSMeans scores between the three pea genotypes were significantly different (p-value < 0.05), with Lumina, MN313 and PI180693 being the susceptible, intermediate and partially resistant genotypes, respectively (Additional File 8). MLGs (Multilocus groups) are indicated according to the genetic diversity analysis conducted in this study.

are consistent with the homothallic mode of reproduction of the pathogen and its lower dissemination in the soil than that of airborne pathogens in the air. These *A. euteiches* life traits contribute to limit genetic mixing and maintain highly inbred pathogen populations.

However, *A. euteiches* populations from Bourgogne appeared to have unique characteristics compared to the other locations sampled in this study. Indeed, some *A. euteiches* isolates from Bourgogne showed a specific molecular pattern, with a high level of heterozygosity, which contributed to the high level of



genetic diversity observed in this region. SSR markers used in our study allowed heterozygosity to be revealed in populations from Bourgogne, whereas no previous study using dominant markers could be able to reveal such genetic profiles. An excess of heterozygous genotypes was observed for BR1 and BR3 populations, which clustered separately from the other populations in the analysis and DAPC analysis. Our results are consistent with those of Grünwald and Hoheisel (2006), which suggested that population structure of the homothallic *A. euteiches* pathogen is mostly determined by regular selfing, but also occasional recombination, indicating a mixed mode of reproduction in *A. euteiches* populations. This complex pattern of sexuality was identified in other oomycetes (Francis and Stclair, 1993; Whisson et al., 1994), suggesting that outcrossing could occur even in pathogen populations with a high level of selfing. Indeed, Grünwald and Hoheisel (2006) suggested that outcrossing and migration occurred, albeit rarely, and contributed to the genetic diversity and differentiation observed in *A. euteiches* populations sampled from two fields in Oregon and Washington in the USA.

In our study, heterozygous isolates were obtained from fields in the Bourgogne region, which included legumes (faba bean, vetch, and alfalfa) other than pea in their cropping history, in contrast to all the other fields sampled, which only had a history of pea production. We could thus hypothesize that the occurrence of these isolates may result from outcrossing between genetically distinct isolates adapted to different legumes. *A. euteiches* is reported to attack other legume species including common bean, broad bean, faba bean, clover, and alfalfa (Pfender and Hagedorn, 1982; Lamari and Bernier, 1985; Tivoli et al., 2006; Moussart et al., 2008). In some regions of the United States, where pea and alfalfa crops were frequently included in cropping systems, populations of pea-infecting *A. euteiches* showed differentiation into sub-populations with differences in genotypes and virulence toward pea and alfalfa

(Holub et al., 1991; Malvick et al., 1998, 2009; Malvick and Grau, 2001). To investigate the presence of such distinct isolate genotypes, influenced by their host of origin in France, it would thus be necessary to increase the number of isolates sampled from the Bourgogne fields studied and from other fields with various legumes in their crop histories.

Pathogenicity Diversity of French *A. euteiches* Populations Depends on Plant Host and Genotypes

Low to moderate pathogenicity diversity and structure was observed among the 34 isolates sampled in the collection from the different locations studied, depending on isolates and plant hosts and genotypes. Most isolates showed high aggressiveness on pea and virulence on vetch, faba bean and alfalfa (PVFA) with variable aggressiveness. Moreover, the level of aggressiveness of the isolates recorded on pea differential set used in this study indicated that all 34 isolates belong to pathotype I. Because of the heaviness of pathological tests and low genetic structure of populations studied, sub-samples of two isolates per field population were chosen to have a good geographic representation of the aggressiveness of French populations. The pathogenicity diversity observed within the French *A. euteiches* populations studied is consistent with previous studies. Using 91 pea-infecting isolates of *A. euteiches*, Wicker et al. (2001) reported that French isolates were able to infect a wide range of legume species with a low diversity of aggressiveness on pea genotypes and a moderate diversity of aggressiveness on vetch and alfalfa. The prevalence of pea crops in France since the 1980s and the susceptibility to *A. euteiches* of the pea cultivars used by the growers may explain the high aggressiveness and small variation of pathogenicity on pea of most of the French isolates tested. Moussart et al. (2008) reported a lower variability of disease response to *A. euteiches* infection in pea than in vetch and faba bean, with most varieties showing high level of susceptibility.

In this study, a poor relationship between genetic clusters and pathogenicity was observed in the subset of 34 isolates analyzed. Despite the low isolate-sample size used in this study to compare genotypic and pathogenicity diversity, the type of markers used could explain the lack of relationship observed between genetic and phenotypic structure of *A. euteiches* populations. Indeed, the neutral nature of SSR markers would probably not allow the *A. euteiches* isolates to be genotyped in genomic regions under selection. Similar results were obtained previously using RAPD or AFLP markers. Malvick and Percich (1998) did not find any correlation between pathogenic and genetic diversity in four American populations of *A. euteiches* from Minnesota, Wisconsin and Oregon, despite pathogenic variation being observed among the populations on a differential pea set. Grünwald and Hoheisel (2006) reported discrepancies between the levels of genetic and pathogenic diversity observed in two *A. euteiches* populations baited on pea from two fields located in Athena, Oregon and Mount Vernon, Washington. The use of Next Generation Sequencing methodologies to sequence the genome of *A. euteiches* isolates (Madoui et al., 2007; Gaulin et al., 2008) and further knowledge of pathogen effectors (Ramirez-Garcés et al., 2016) would help to decipher the relationship between genetic and pathogenic diversity in *A. euteiches* populations.

CONCLUSION

A low level of genetic and phenotypic diversity among French *A. euteiches* populations was observed in this study, based on the analysis of a collection of 205 isolates sampled from the major pea-growing regions in France. However, significant differences in aggressiveness were observed between several isolates on some genotypes. In addition, some isolates originating from fields where other legumes besides pea have been grown, also showed a distinct genetic structure with heterozygous genotypic patterns. This could suggest that crosses may have occurred between isolates which may have evolved on different hosts. Up till now, French *A. euteiches* populations have been subjected to limited selective pressure from hosts, since the diversification of legume species in rotation was restricted and no pea resistant varieties have yet been cultivated in France. Breeding for resistance is making progress, especially due to cumulating stable resistance QTL which were identified and recently confirmed in germplasm (Desgroux et al., 2016; Lavaud et al., 2016). Future partially resistant pea varieties and the increasing diversification

of cropping systems with host legumes will likely modify selection pressures on the pathogen populations and thus their genetic and pathogenic structures, as suggested in this study from some isolates. A better understanding and management of the evolutionary forces affecting *A. euteiches* populations will thus be required, in order to develop integrated control strategies for the durable management of *Aphanomyces* root rot disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AQ-H and GL generated the phenotypic and genotypic data. AQ-H and CL performed the statistical and genetic analyses and drafted the manuscript. AM contributed to the establishment of the collection. AM, AB, and DA provided scientific expertise on the conception of the study. CL and M-LP-N coordinated and supervised the manuscript writing and the experiments. All the authors approved the final draft of the manuscript.

FUNDING

This study was supported by INRA, AAP 2010 Gestion Durable des Résistances, the PeaMUST project, which received funding from the French Government managed by the Research National Agency (ANR) under the Investments for the Future call 2011 (ANR-11-BTBR-0002), and the PROGRAILIVE project (grant: RBRE160116CR0530019) funded by the Bretagne region, France, and European FEADER grants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly thank Dr. C. Lavaud (INRA IGEPP, France) for his helpful advice on statistical analysis, as well as G. Boutet and A. Lesné (INRA IGEPP, France) for their help using GeneMapper software. We also thank M-N. Even and C. Onfroy (Terres Inovia, UMT PISOM) for providing soil and several isolates. We acknowledge the greenhouse and experimental device plat-form of IGEPP for providing and managing equipment for the experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01673/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Agapow, P. M., and Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes* 1, 101–102. doi: 10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x
- Arnaud-Haond, S., and Belkhir, K. (2007). GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol. Ecol. Notes* 7, 15–17. doi: 10.1111/j.1471-8278.2006.01522.x
- Arnaud-Haond, S., Migliaccio, M., Diaz-Almela, E., Teixeira, S., Vand De Vliet, M. J., Alberto, F., et al. (2007). Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: east-west cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *J. Biogeogr.* 34, 963–976. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01671.x
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. (1990). *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York, NY: J. Wiley and Sons.
- Casadevall, A., and Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184, 337–344. doi: 10.1086/322044
- Christensen, R. (2015). *Regression Models For Ordinal Data*. Available Online at: <https://cran.r-project.org/package=ordinal>
- Delwiche, P. A., Grau, C. R., Holub, E. B., and Perry, J. B. (1987). Characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from alfalfa in Wisconsin. *Plant Dis.* 71, 155–161. doi: 10.1094/PD-71-0155
- Desgroux, A., L'Anthoëne, V., Roux-Duparque, M., Rivièrè, J. P., Aubert, G., Tayeh, N., et al. (2016). Genome-wide association mapping of partial

- resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC Genomics* 20:124. doi: 10.1186/s12864-016-2429-4
- Didelot, D., and Chaillat, I. (1995). Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France in AEP (ed) 2nd European Conference of Grain Legumes. July 9–13th, Copenhagen.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1, 47–50. doi: 10.1177/117693430500100003
- Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491
- Fox, J., and Weisberg, S. (2016). *Companion to Applied Regression*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=car>
- Francis, D. M., and Stclair, D. A. (1993). Outcrossing in the homothallic oomycete, *Phythium ultimum*, detected with molecular markers. *Curr. Genet.* 24, 100–106. doi: 10.1007/BF00324672
- Gaulin, E., Madoui, M. A., Bottin, A., Jacquet, C., Mathe, C., Couloux, A., et al. (2008). Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS ONE* 3:e1723. doi: 10.1371/journal.pone.0001723
- Graves, S., Piepho, H., and Selzer, L. (2015). *Visualizations of Paired Comparisons*. Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/multcompView/index.html>
- Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., and Fry, W. E. (2003). Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93, 738–746. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.6.738
- Grünwald, N. J., and Hoheisel, G. A. (2006). Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 96, 1134–1141. doi: 10.1094/PHYTO-96-1134
- Hervé M. (2015). *RVAideMemoire: Diverse Basic Statistical and Graphical Functions*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire>
- Holub, E. B., Grau, C. R., and Parke, J. L. (1991). Evaluation of the forma-specialis concept in *Aphanomyces euteiches*. *Mycol. Res.* 95, 147–157. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81004-6
- Husson, F., Josse, J., Lê S and Mazet J (2007). *Factor Analysis and Data Mining with R*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=FactoMineR>
- Jombart, T., Kamvar, Z. N., Collins, C., Lustrik, R., Beugin, M. P., Knaus, B. J., et al. (2018). *Adegenet: Exploratory Analysis of Genetic And Genomic Data*. Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/adegenet/index.html>
- Kamvar, Z. N., Tabina, J. F., Everhart, S. E., Brooks, J. C., Krueger-Hadfield, S. A., Sotka, E., et al. (2018). *Genetic Analysis of Populations With Mixed Reproduction*. Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/poppr/index.html>
- Kraft, J. M., and Pfleger, F. L. (2001). *Compendium of Pea Diseases and Pests*. 2edn. St.Paul, MN: The American Phytopathological Society Press.
- Labrousse, F. (1933). Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* 19, 71–84.
- Lamari, L., and Bernier, C. C. (1985). Etiology of seedling blight and root rot of Faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 139–145.
- Langella, O. (1999). *Population Genetic Software*. Available online at: <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>
- Lavaud, C., Bavière, M., Roy, G. L., Hervé M., Moussart, A., Delourme, R., et al. (2016). Single and multiple resistance QTL reduce *Aphanomyces euteiches* infection and colonization in roots of pea Near-Isogenic-Lines. *BMC Plant Biol.* 16:166. doi: 10.1186/s12870-016-0822-4
- Lavaud, C., Lesne, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., et al. (2015). Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theor. Appl. Genet.* 128, 2273–2288. doi: 10.1007/s00122-015-2583-0
- Le May, C., Onfroy, C., Moussart, A., Andrivon, D., Baranger, A., Pilet-Nayel, M. L., et al. (2018). Genetic structure of *Aphanomyces euteiches* populations sampled from United States and France pea nurseries. *Eur. J. Plant Pathol.* 150, 275–286. doi: 10.1007/s10658-017-1274-x
- Lenth, R., and Herve, M. (2015). *Lsmeans: Least-Squares Means*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=lsmeans>
- Lin, X., and Heitman, J. (2007). “Mechanisms of homothallism in fungi-transitions between heterothallism and homothallism,” in *Sex in Fungi: molecular determination and evolutionary implications*, eds J. Heitman, J. W. Kronstad, J. W. Taylor, L. A. Casselton (Washington DC: ASM Press), 35–58.
- Lynch, M., and Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3, 91–99. doi: 10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x
- Madoui, M. A., Gaulin, E., Mathé C., San Clemente, H., Couloux, A., Wincker, P., et al. (2007). AphanoDB: a genomic resource for *Aphanomyces* pathogens. *BMC Genomics* 8:471. doi:10.1186/1471-2164-8-471
- Malvick, D., Grunwald, N., and Dyer, A. (2009). Population structure, races, and host range of *Aphanomyces euteiches* from alfalfa production fields in the central USA. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 171–182. doi: 10.1007/s10658-008-9354-6
- Malvick, D. K., and Grau, C. R. (2001). Characteristics and frequency of *Aphanomyces euteiches* races 1 and 2 associated with alfalfa in the midwestern United States. *Plant Dis.* 85, 740–744. doi: 10.1094/PDIS.2001.85.7.740
- Malvick, D. K., Grau, C. R., and Percich, J. A. (1998). Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity tests and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycol. Res.* 102, 465–475. doi: 10.1017/S0953756297005029
- Malvick, D. K., and Percich, J. A. (1998). Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from the central and western United States. *Phytopathology* 88, 915–921. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.9.915
- Meirmans, P. G., and Van Tienderen, P. H. (2004). GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4, 792–794. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x
- Mieuzet, L., Quillévéré A., Pilet, M. L., and Le May, C. (2016). Development and characterization of microsatellite markers for the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Fungal Genet. Biol.* 91, 1–5. doi: 10.1016/j.fgb.2016.03.001
- Moussart, A., Even, M. N., Lesné A., and Tivoli, B. (2013). Successive legumes tested in a greenhouse crop rotation experiment modify the inoculum potential of soils naturally infested by *Aphanomyces euteiches*. *Plant Pathol.* 62, 545–551. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02679.x
- Moussart, A., Even, M. N., and Tivoli, B. (2008). Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122, 321–333. doi: 10.1007/s10658-008-9297-y
- Moussart, A., Onfroy, C., Lesné A., Esquibet, M., Grenier, E., and Tivoli, B. (2007). Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Eur. J. Plant Pathol.* 117, 57–69. doi: 10.1007/s10658-006-9071-y
- Moussart, A., Wicker, E., Duparque, M., and Rouxel, F. (2001). “Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*,” in AEP, ed 4th European Conference on Grain Legumes. July 8–12th)Cracow, Poland
- Moussart, A., Wicker, E., Le Delliou, B., Abelard, J. M., Esnault, R., Lemarchand, E., et al. (2009). Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inocula in a naturally infested pea fields. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 153–158. doi: 10.1007/s10658-008-9350-x
- Müllner, D. (2015). *Fast Hierarchical Clustering Routines for R and Python*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=fastcluster>
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- Papavizas, G., and Ayers, W. (1974). *Aphanomyces species and their root diseases on pea and sugarbeet*. US Department of Agricultural Research Technical Bulletin 1484, 1–157
- Parlevliet, J. E. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens: present situation. *Euphytica* 124, 147–156. doi: 10.1023/A:1015601731446
- Peakall, R., and Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Pfender, W. F., and Hagedorn, D. J. (1982). *Aphanomyces euteiches* f.sp. *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology* 72, 306–310. doi: 10.1094/Phyto-72-306
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959

- R Core Team (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R foundation for Statistical Computing
- Ramirez-Garces, D., Camborde, L., Pel, M. J. C., Jauneau, A., Martinez, Y., Néant, I., et al. (2016). CRN13 candidate effectors from plant and animal eukaryotic pathogens are DNA-binding proteins which trigger host DNA damage response. *New Phytologist*. 210, 602–617. doi: 10.1111/nph.13774
- Raymond, M., and Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573
- Sackett, K. E., and Mundt, C. C. (2005). Primary disease gradients of wheat stripe rust in large field plots. *Phytopathology* 95, 983–991. doi: 10.1094/PHYTO-95-0983
- Sherwood, R. T., and Hagedorn, D. J. (1958). Determining common root rot potential of pea fields. *Wisconsin Agricultural Experimental Station Bulletin* 531: 11p
- Sundheim, L. (1972). Physiologic specialization in *Aphanomyces euteiches*. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 301–306. doi: 10.1016/0048-4059(72)90013-6
- Tivoli, B., Baranger, A., Sivasithamparam, K., and Barbetti, M. J. (2006). Annual *Medicago*: from a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the nature of disease resistance. *Ann. Bot.* 98, 1117–1128. doi: 10.1093/aob/mcl132
- Tsvetkova, N., and Kotova, V. (1985). Root rots of peas and vetch. *Zashchita Rastenij* 8, 50–51.
- Van der Plank, J. E. (1968). *Disease Resistance in Plants*. New York, NY: Academic Press.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., and Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Weir, B. S., and Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370. doi: 10.2307/2408641
- Whisson, S. C., Drenth, A., Maclean, D. J., and Irwin, J. A. (1994). Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker to 2 avirulence genes. *Curr. Genet.* 27, 77–82. doi: 10.1007/BF00326582
- Wicker, E. (2001). *Diversité des populations françaises d'Aphanomyces euteiches Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois: variabilité pathogène et moléculaire*. Thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Wicker, E., Hulle, M., and Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathol.* 50, 433–442. doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x
- Wicker, E., and Rouxel, F. (2001). Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. Populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 919–929. doi: 10.1023/A:1013171217610

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer AG-F and handling Editor declared their shared affiliation.

Copyright © 2018 Quillévéré-Hamard, Le Roy, Moussart, Baranger, Andrivon, Pilet-Nayel and Le May. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre 3

ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ D'ISOLATS FRANÇAIS POUR LEUR AGRESSIVITÉ SUR DES NILs PORTEUSES DE QTL DE RÉSISTANCE

Chapitre 3 : Étude de la diversité d'isolats français pour leur agressivité sur des NILs porteuses de QTL de résistance

1. Contexte

Pour lutter contre *Aphanomyces euteiches*, l'une des voies les plus prometteuses est l'utilisation de variétés partiellement résistantes. A cette fin, des travaux d'analyse génétique de sources de résistance ont permis d'identifier sept principaux QTLs dont un QTL à effet majeur et de créer des lignées quasi-isogéniques (NILs) à un ou plusieurs QTLs de résistance. Exceptée la prophylaxie, les résistances variétales sont l'unique levier permettant à ce jour de contrôler la maladie au champ. Aussi, afin d'anticiper le déploiement de ces nouvelles variétés de pois, il nous a semblé important de définir, si, au sein des populations naturelles d'*A. euteiches*, l'on pouvait retrouver des individus ayant la capacité d'infecter et de se multiplier sur des NILs porteuses de différentes combinaisons de QTL. En effet, si dans les populations naturelles d'*A. euteiches*, un certain nombre d'isolats présente une agressivité plus élevée vis-à-vis de ces NILs, on peut faire l'hypothèse que l'effet des QTL de résistance dans les variétés tolérantes récemment inscrites et les futures variétés partiellement résistantes, pourrait être érodé par sélection directionnelle de populations d'*A. euteiches* plus agressives.

2. Approche

Quarante-trois isolats français ont été sélectionnés, parmi les 205 isolats étudiés dans le Chapitre 2, sur la base de leur représentativité géographique et géotypique pour évaluer en conditions contrôlées leur niveau d'agressivité sur 8 NILs, porteuses de 1 à 4 QTL de résistance et deux témoins sensible ou très résistant. Des analyses statistiques de l'indice de nécrose racinaire ont permis de calculer le niveau d'agressivité de chaque isolat sur chaque lignée. Une approche de classification hiérarchique a ensuite été réalisée pour structurer la diversité de pouvoir pathogène de ces isolats.

3. Principaux résultats

Grâce à cette étude, nous avons pu mettre en évidence 3 groupes d'agressivité faible, modérée et élevée, au sein des isolats d'*A. euteiches*. Ces groupes sont constitués d'isolats indépendants de l'origine géographique ou du groupe génétique dont ils sont issus. Du côté de la plante, trois clusters ont été identifiés au sein des NILs avec des spectres d'efficacité plus ou

moins larges vis-à-vis des isolats testés. Le cluster regroupant l'ensemble des NILs porteuses de l'allèle à effet le plus fort au QTL majeur *Ae-Ps7.6*, a présenté un spectre d'efficacité plus large que celui regroupant les NILs dépourvues de cet allèle. Certains isolats se sont révélés être agressifs sur ce QTL majeur seul ou en combinaison avec d'autres QTL. Parmi les NILs testées, la NIL cumulant 4 QTL a montré la plus grande efficacité vis-à-vis du set d'isolats. Le témoin très résistant, cumulant un nombre accru d'allèles de résistance (>10), a montré une efficacité élevée pour limiter les symptômes de la maladie vis-à-vis de l'ensemble des isolats.

Sur la base de ces résultats et des connaissances sur les capacités de reproduction et de conservation d'*A. euteiches* dans le sol, l'hypothèse d'un risque potentiel d'érosion de l'effet des QTL de résistance dans les futures variétés résistantes, par sélection de populations d'*A. euteiches* plus agressives après plusieurs cycles culturaux de pois a été discutée. Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent également que les stratégies de pyramidage de QTL peuvent être efficaces pour éviter l'érosion de la résistance quantitative.

4. Publication

Ces résultats ont fait l'objet d'un article intitulé « Agressiveness of diverse french *Aphanomyces euteiches* isolates on pea Near-Isogenic-Lines differing in resistance quantitative trait loci » qui a été publié dans le journal *Phytopathology* (DOI : [10.1094/PHYTO-04-20-0147-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0147-R))

Aggressiveness of Diverse French *Aphanomyces euteiches* Isolates on Pea Near Isogenic Lines Differing in Resistance Quantitative Trait Loci

Anne Quillévéré-Hamard,¹ Gwenola Le Roy,¹ Angélique Lesné,¹ Christophe Le May,² and Marie-Laure Pilet-Nayel^{1,†}

¹ IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35653, Le Rheu, France

² IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35000, Rennes, France

Accepted for publication 11 August 2020.

ABSTRACT

Aphanomyces root rot is a major disease in many pea growing regions worldwide. Development of resistant varieties is necessary to manage the disease. Near isogenic lines (NILs) carrying resistance alleles at main quantitative trait loci (QTLs) were developed by marker-assisted backcrossing. This study aimed to evaluate the aggressiveness of diverse French isolates of *Aphanomyces euteiches* on NILs carrying different resistance QTLs. Forty-three *A. euteiches* isolates from different French pea growing regions were tested for aggressiveness on eight NILs carrying single or combinations of resistance QTLs and two susceptible or resistant control lines, in controlled conditions. Three clusters of isolates, unrelated to geographical origin, were identified, including 37, 56, and 7% of isolates with high, moderate, and low average levels of aggressiveness, respectively. Three groups of pea lines were also identified. The first group consisted of a pea resistant control line,

moderately to highly resistant to all of the isolates. The second group included five NILs carrying a major-effect resistance allele at QTL *Ae-Ps7.6*, with a medium to broad range of effects on the isolates. The third group consisted of three NILs carrying minor-effect resistance alleles, with a narrow range of effects on the isolates. The results suggest that highly aggressive isolates occur naturally, which may be selected by future partially resistant pea varieties carrying QTLs and increase the risk of erosion of QTL effect. QTL pyramiding strategies for a higher level and a broader range of effect of quantitative resistance on *A. euteiches* populations will be required for breeding for durable pea resistant varieties.

Keywords: *Aphanomyces* root rot, durability, genetics, partial resistance, *Pisum sativum*, population biology, QTL pyramiding, resistance

Quantitative resistance is of major interest for plant protection because it is generally more durable than qualitative resistance (Parlevliet 2002) and is sometimes the only type of resistance available in the natural variability of plant species. Quantitative resistance is usually controlled by many genes associated with genomic regions or quantitative trait loci (QTLs), each contributing to the resistance phenotype with variable effects. Breakdown or erosion of quantitative resistance or resistance QTLs by pathogen isolates has been reported in experimental evolutionary studies or under natural conditions (Caffier et al. 2014, 2016; Delmas et al. 2016; Montarry et al. 2012). Narrow-spectrum QTLs have been described as being easier to overcome by a pathogen than broad-spectrum QTLs (i.e., QTLs that are effective against a wide range of isolates of a pathogen species; Caffier et al. 2016; Chaipanya et al. 2017; Lê Van et al. 2013). Knowledge of the variability of pathogen populations for their aggressiveness toward resistance QTLs, reflecting the range of effect of resistance QTLs on pathogen populations, provides information to anticipate the risks of QTL-conferred resistance erosion by selection of aggressive strains.

Aphanomyces root rot of pea is caused by the soilborne pathogen *Aphanomyces euteiches* and is considered one of the most damaging diseases of the pea crop worldwide. This oomycete pathogen was observed for the first time in France in 1933 (Labrousse 1933). Since the 1990s, the intensification of the pea crop in rotations has led to the development of this disease in the main pea growing regions of France (i.e., Bassin-Parisien, Bretagne, Rhône-Alpes, Pyrénées, and Charente-Maritime; Quillévéré-Hamard et al. 2018; Wicker and Rouxel 2001). *Aphanomyces* root rot can cause a total loss of the crop in cases of a strong attack in French fields (Didelot and Chaillet 1995). In France, the main strategies recommended to manage the disease are crop rotations with nonhost or resistant legume crops (Moussart et al. 2008) and avoidance of pea crops in fields with moderate to high inoculum levels (Moussart et al. 2009). No resistant pea varieties are currently cultivated. Breeding programs for *Aphanomyces* root rot resistance have been initiated in France since 1995 using partially resistant germplasm identified in the United States (Gritton 1990; Kraft 1992; Lockwood and Ballard 1960). In the 2000s, genetic analysis of resistance identified seven main resistance QTLs, including a major-effect QTL *Ae-Ps7.6*, from a meta-QTL analysis in four recombinant inbred line (RIL) populations evaluated for resistance in field and controlled conditions in France and the United States (Hamon et al. 2011, 2013; Pilet-Nayel et al. 2002). The QTLs were introgressed into agronomic lines by marker-assisted backcrossing (MAB), and near isogenic lines (NILs) carrying resistance alleles at different combinations of one to three of the seven main QTLs were produced (Lavaud et al. 2015). The effects of the major and some minor QTLs were validated in NILs for resistance in controlled conditions using two reference isolates from the two main pathotypes of *A. euteiches* described on pea (Lavaud et al. 2015), especially pathotype I present in France (Wicker et al. 2001). However, the effects of the QTLs in NILs have not been evaluated against a large set of *A. euteiches* isolates, and the spectrum of action of the QTLs on pathogen diversity remains unknown.

[†]Corresponding author: M.-L. Pilet-Nayel; marie-laure.pilet-nayel@inrae.fr

Funding: This study was supported by the PROGRAILIVE project (grant RBRE160116CR0530019) funded by the Brittany region, France, and European FEADER grants. Additional support was provided by the PeaMUST project, which received funding from the French Government managed by the Research National Agency (ANR) under the Investments for the Future call 2011 (grant ANR-11-BTBR-0002).

C. Le May and M.-L. Pilet-Nayel contributed equally to this work.

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that five supplementary figures are published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

Previous studies showed that *A. euteiches* populations had low genetic diversity among pea-infecting isolates of *A. euteiches* from French pea growing regions, except for some isolates showing heterozygosity (Le May et al. 2018; Mieuze et al. 2016; Quillévéré-Hamard et al. 2018). However, variation was observed in aggressiveness on legume varieties (Quillévéré-Hamard et al. 2018; Wicker and Rouxel 2001; Wicker et al. 2001), suggesting that isolates with variable aggressiveness against resistance QTLs may occur in natural populations of *A. euteiches*. Previous experimental studies on different pathosystems (Andrion et al. 2007; Caffier et al. 2014; Cowger and Mundt 2002) also supported this hypothesis, showing that quantitative resistance could select higher aggressive strains by exerting selection pressure on pathogen populations.

The objectives of this study were to describe the efficacy of resistance QTLs toward a collection of *A. euteiches* isolates representative of the French pathogen population and to analyze the diversity of the isolates for their aggressiveness against resistance QTLs in pea NILs. A collection of 43 French isolates selected from Quillévéré-Hamard et al. 2018 was evaluated for aggressiveness under controlled conditions on 10 pea NILs carrying single or combinations of resistance QTLs and control lines. Clustering analysis identified different groups of isolates and pea lines, confirming variability among isolates for aggressiveness on resistance QTLs as well as among pea NILs for their range of effect on the isolates studied.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Eight NILs were used for the aggressiveness assays (Fig. 1; Table 1). Seven of the NILs were selected among 157 NILs that were previously evaluated for partial resistance in controlled conditions (Lavaud et al. 2015) and in infested field nurseries (Lavaud et al., *unpublished data*). These QTLs showed partial resistance at early stages of disease development, delaying symptom appearance and/or slowing root colonization (Lavaud et al. 2016). The seven NILs were produced by MAB and derived from crosses between three pea lines carrying resistance alleles at one to three QTLs as donor lines: RIL 847-50 (McGee et al. 2012), RIL BAP8-70 and 552 (Hamon et al. 2011), and the winter pea variety Isard (2005; Agri-Obtentions, Guyancourt, France) as the recipient line (Lavaud et al. 2015). The eighth NIL, cumulating four resistance alleles at three QTLs, was produced by intercrossing two NILs carrying different resistance alleles in the Isard recipient background, including one NIL with resistance alleles from pea line 552 at QTLs *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*, and *Ae-Ps7.6* and one NIL with resistance alleles from pea RIL 847.50 at QTLs and *Ae-Ps7.6*. The susceptible winter pea cultivar Isard and the resistant pea germplasm line AeD990SW45-8-7 (coded AeD in this study; Desgroux et al. 2016) were used as controls. The AeD control line was found to cumulate 12 favorable haplotypes at consistent resistance loci in four of the seven main QTL regions (i.e., *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*, and *Ae-Ps7.6*) (Desgroux et al. 2016), but further studies using additional markers suggest that the AeD pea line carries resistance haplotypes at all seven QTLs (M.-L. Pilet-Nayel, *personal communication*).

Pathogen isolates. Forty-three French isolates of *A. euteiches* were selected from the collection characterized in Quillévéré-Hamard et al. 2018 (Table 2) for the aggressiveness assay on 10 pea lines. The isolates were chosen to represent, as much as possible, both the different French pea growing regions previously sampled and the 13 multilocus genotype (MLG) groups from two main genetic clusters previously identified (minimum one isolate per MLG) (Quillévéré-Hamard et al. 2018). Isolates from three MLGs (6, 12, and 13) were not selected for this study as a result of their low sporulation capacity and their low representativeness of MLG. Thus, 36 isolates chosen for this study belonged to cluster 1 and seven isolates (from MLG groups 3, 10, and 11) belonged to cluster

2 (Quillévéré-Hamard et al. 2018). Of the 43 isolates, 25 were previously tested for their aggressiveness on resistant and susceptible varieties of four legume hosts (Quillévéré-Hamard et al. 2018). The RB84 French reference strain, belonging to pathotype I (Moussart et al. 2007), was used as a control in the aggressiveness tests.

Aggressiveness assays. The experiment consisted of 10 assays performed in controlled conditions to assess the aggressiveness of the 43 isolates. Each test included three to six isolates and the RB84 strain, which were inoculated individually on the 10 pea lines. Each test comprised four blocks of five plants per line and isolate, as technical replicates. The experiment was performed twice, as biological replicates in 2017 and 2018, respectively, in the same climatic chamber. A modified version of the standardized test developed to assess pea resistance to *A. euteiches* was used (Moussart et al. 2001). Five seeds were sown in a plastic pot (9 × 9 × 9.5 cm), as a block, containing vermiculite (VERMEX M). Trays containing the four blocks were placed in a randomized design in a growth chamber (thermoperiod: 25/23°C and 16-h photoperiod). Seven days after sowing, seedlings were inoculated with 5 ml of a zoospore suspension adjusted to 200 spores/ml, as described by Moussart et al. (2001). After inoculation, the vermiculite was saturated with water to favor disease development. Seven days after inoculation, the plants were carefully removed from the vermiculite. The roots were washed in tap water and disease severity (DS) was assessed on each plant using the following 0 to 5 scoring scale (Moussart et al. 2008): 0, no symptoms; 1, traces of discoloration on the roots (<25%); 2, discoloration of 25 to 50% of the roots; 3, discoloration of 50 to 75% of the roots; 4, discoloration of >75% of the roots; and 5, plant death.

Data analysis. Statistical analysis was performed using R software version 3.2.2 (R Core Team 2014). To verify the reproducibility of the data, correlations between the DS scores obtained for (i) the reference RB84 isolate in the 10 aggressiveness assays over the two experiments and (ii) each isolate in the two experiments were calculated using the Pearson coefficient ($P < 0.05$).

DS scores were analyzed as ordinal qualitative data using a cumulative link model (CLM; *clm* function, ordinal package). Analysis of variance tests using the *car* and *RVAideMemoire* packages (Fox and Weisberg 2016; Hervé 2015) were applied to evaluate the effect of each explanatory factor in two CLM analyses ($P < 0.05$).

In a first CLM analysis of RB84 data obtained in the 10 aggressiveness assays and the two experiments, the DS score was considered the dependent variable and the pea line or genotype (G), experiment (E), pathogenicity test (T), block (B), and G × E and G × T interactions were considered fixed. A likelihood ratio (LR) test ($\alpha = 5\%$) was applied to evaluate the significance of each fixed effect in the CLM model.

In a second CLM analysis of data obtained with all of the isolates in the 10 aggressiveness assays and the two experiments, the DS score was considered the dependent variable and the isolate (I), pea line or genotype (G), experiment (E), block (B), and I × G, I × E, and G × E interactions were considered fixed factors. From this second analysis, least squares means (LSMeans) were estimated for each pea line and isolate using the *lsmeans* function of the *lsmeans* package (Lenth and Herve 2015). For each isolate, LSmean values for pea lines were compared with the Tukey test ($\alpha = 5\%$) using the *cld* function of the *MultCompView* package (Graves et al. 2015). For each pea line, LSmean values for the different isolates were compared between each other and to the LSmean value obtained for RB84 in all tests, with the Tukey test ($\alpha = 5\%$) using the *pairs* and *cld* functions, respectively, of the *MultCompView* package (Graves et al. 2015). The probability (between 0 and 1) of obtaining each DS score (0 to 5) for each isolate and each pea line was calculated using the *rating* *lsmeans* function.

Based on the LSmean values obtained from the second analysis, a principal component analysis (PCA) and an ascending hierarchical

classification (AHC; Ward's method) were performed to classify isolates and pea lines using the *pca* and *HPCP* functions, respectively, of the *FactoMineR* package (Husson et al. 2007).

RESULTS

Aggressiveness assay of *A. euteiches* isolates on pea NILs. DS scores obtained for the RB84 reference isolate were moderately to highly significantly correlated (i) between the 10 aggressiveness assays over the two experiments ($0.43 < r < 0.94$; $0.05 < P < 1.4 \times 10^{-10}$) and (ii) between the two experiments of each pathogenicity test ($0.69 < r < 0.92$; $0.01 < P < 6 \times 10^{-5}$) except for two tests ($r > 0.34$; $P < 0.30$). DS scores obtained for each isolate were moderately to highly significantly correlated between the two experiments ($r \geq 0.58$; $P \leq 0.05$), except for the HB0-9 isolate ($r = 0.28$; $P > 0.05$). The first CLM analysis of DS scores obtained with the RB84 isolate showed significant effects of G, E, T, G $\times$ E, and G $\times$ T ($P < 0.001$) but no significant effect of B ($P > 0.05$). However, the LR of χ^2 values (LR Chisq) obtained for T (174.44), E (13.83), G $\times$ T (279.16), and G $\times$ E (74.99) were much lower to negligible compared with the value obtained for the G factor (1,811.99). All of these statistical results showed that data from the 10 aggressiveness assays and the two experiments were reproducible, justifying analysis of them as a single experiment.

Thus, the second CLM analysis of DS scores was conducted for all of the isolates over the 10 aggressiveness assays and the two experiments. The results showed a highly significant effect of I, G, and I $\times$ G ($P < 2.2 \times 10^{-16}$) but no significant B effect ($P > 0.05$). A significant effect of I $\times$ E ($P < 2.2 \times 10^{-16}$) and G $\times$ E ($P < 1.8 \times 10^{-10}$) interactions was also observed, in accordance with the moderate correlations observed between the two experiments for

some isolates. However, the variance contributed by these interactions to the total variation was small (LR Chisq = 957.2 and 64.4 for I $\times$ E and G $\times$ E, respectively) compared with the variance contributed by the isolate or the pea line factor (LR Chisq = 4,888.7 and 6,501.1 for I and G, respectively).

Aggressiveness of *A. euteiches* isolates on pea lines. *A. euteiches* isolates were all able to develop symptoms ($DS \geq 1$) on the 10 pea lines studied. Despite a moderate and similar range of LSMeans values observed between pea lines (Supplementary Fig. S1), significant differences of mean DS values were observed between isolates on each pea line ($P < 0.05$). Low to high significant differences in LSMeans of DS scores were observed between each isolate and the reference isolate RB84 for each pea line (Supplementary Fig. S2). A higher number of isolates showed highly significant differences in aggressiveness compared with RB84 on pea lines NIL5-5.1b, NIL8-4.1a, NIL14-2.2/3.1/7.6a, and Isard than on the other pea lines studied (Supplementary Fig. S2).

Based on LSMeans of DS scores recorded on all of the pea lines, AHC analysis distinguished three clusters of aggressiveness among the 43 *A. euteiches* isolates. Cluster A included 16 isolates and clusters B and C included 24 and 3 isolates, respectively (Fig. 2). The first PCA axis ($R = 74.10\%$) separated cluster A from clusters B and C. The results showed that isolates from cluster A displayed a higher average level of aggressiveness on the 10 pea lines than isolates from clusters B and C, which showed moderate and low average levels of aggressiveness, respectively (Fig. 2; Supplementary Fig. S3). Isolates from cluster A also showed lower variation in aggressiveness on most of the pea lines than isolates from clusters B and C, which displayed larger intra- and intergenotype variations (Supplementary Fig. S4). Cluster A contained isolates that were moderately to highly aggressive on all pea NILs, specifically more

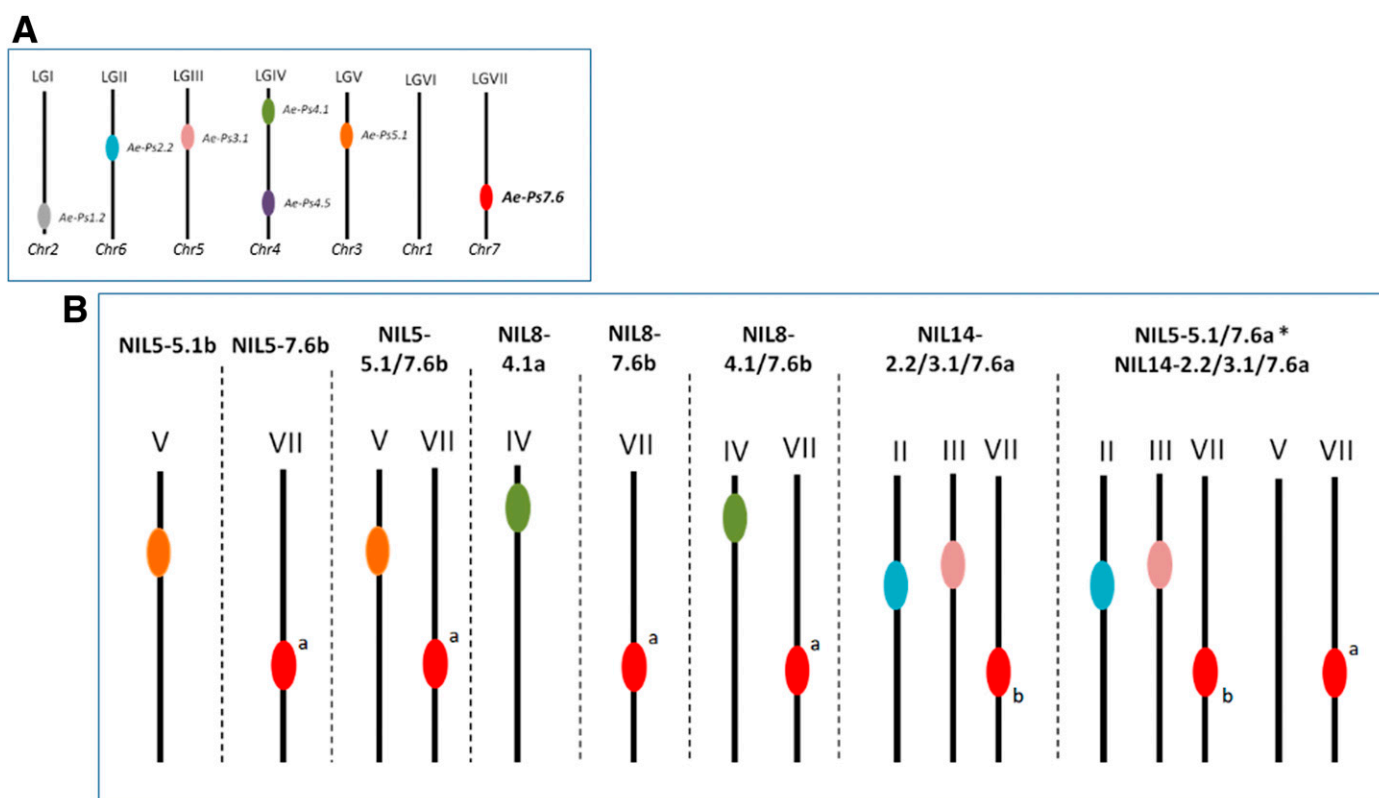


Fig. 1. Scheme of genetic positions of the seven main resistance quantitative trait loci (QTLs) to *Aphanomyces euteiches* **A**, on each pea linkage group (LG) according to Hamon et al. (2013) and **B**, in each pea near-isogenic line (NIL) used in this study according to Lavaud et al. (2015). QTL positions are shown in gray, blue, pink, green, purple, orange, and red for *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*, *Ae-Ps4.1*, *Ae-Ps4.5*, *Ae-Ps5.1*, and *Ae-Ps7.6*, respectively. At QTL *Ae-Ps7.6*, “a” denotes NILs carrying a major-effect resistance allele derived from recombinant inbred line (RIL) 847.50 or RIL BAP8.70 and “b” indicates NILs carrying the minor-effect resistance allele derived from 552. In A, the name of the pea chromosome (Chr) corresponding to each LG is indicated at the bottom of each LG, according to Kreplak et al. (2019).

aggressive on NIL8.4.1a and NIL5.5.1b, but not on the resistant control line AeD. Cluster B contained isolates that were moderately aggressive on NILs lacking the RIL 847.50 or RIL BAP8.70 resistance allele at QTL *Ae-Ps7.6* and weakly aggressive on the other pea NILs. Some isolates from cluster B were more aggressive on some pea lines than most other isolates within the cluster (e.g., BL8 on NIL5-7.6b, P8 on NIL8-4.1/7.6b), whereas some were less aggressive (e.g., BL8 and B11 on NIL14-2.2/3.1/7.6a). The isolates from this cluster displayed no aggressiveness on the pea resistant control AeD. Cluster C contained weakly aggressive isolates on all lines (Fig. 2; Supplementary Fig. S5).

The clustering of the isolates did not seem geographically structured (Fig. 2; Supplementary Fig. S2). Clusters A and B grouped isolates from Bretagne, Centre, Nord-Pas-de-Calais, and Ile-de-France. Isolates sampled from Bourgogne belonged to cluster B. The clustering of the isolates also showed no clear structure related to their genetic groupings. Clusters A and B contained two isolates (from Bretagne) and five isolates (from Bretagne and Bourgogne), respectively, classified in the genetic cluster 2 reported previously (Quillévéré-Hamard et al. 2018). Cluster C also grouped isolates from Bretagne and Ile-de-France from the previous genetic cluster 1 (Quillévéré-Hamard et al. 2018). Clusters A and B grouped isolates from MLGs 3 and 7, whereas isolates from MLG 4 were only present in clusters B and C. Isolates from the other MLGs studied were found in the three clusters (Fig. 2; Supplementary Fig. S2).

Range of resistance effect of pea lines on *A. euteiches* isolates. Significant differences in LSMeans of DS scores were observed (i) between the two susceptible and resistant pea control lines for all of the isolates, and (ii) between the susceptible control line Isard and more than one NIL for 78% of the isolates studied (Supplementary Fig. S2). AHC analysis identified three clusters of pea lines (Fig. 2). The second axis of PCA ($R^2 = 5.92\%$) separated two of these clusters from the last one (Supplementary Fig. S3B).

Cluster 1 only included the pea resistant control line AeD. The AeD line showed highly significant differences of LSMean values compared with Isard for all of the isolates and an average LSMean value much lower than that of the NILs studied.

Cluster 2 consisted of five NILs carrying resistance allele from RIL BAP8.70 and/or RIL 847.50 at QTL *Ae-Ps7.6* individually or in combination with other QTLs. The NILs were NIL5-5.1/7.6b, NIL5-7.6b, NIL8-4.1/7.6b, NIL8-7.6b, and NIL5-5.1/7.6a × NIL14-2.2/3.1/7.6a. The five NILs showed significant DS LSMean differences with the susceptible control Isard when inoculated with the reference isolate RB84 and with 12 other isolates from the different clusters (Supplementary Fig. S2). The NILs showed average lower LSMean values with all of the isolates than the other NILs and the susceptible control Isard. The NIL pyramiding four resistance alleles at three QTL, derived from the cross NIL5-5.1/7.6a × NIL14-2.2/3.1/7.6a, especially had the average lowest DS

LSMean value among all NILs studied (Supplementary Fig. S2). The five NILs showed a wider spectrum of effects on the isolates studied than the other NILs. They showed significantly lower DS LSMean values than those on Isard for 50 to 79% of the isolates, according to the NILs.

Cluster 3 consisted of the susceptible control line Isard and three NILs that did not carry resistance alleles derived from RIL 847.50 or RIL BAP8.70 at QTL *Ae-Ps7.6*, (Fig. 2). The NILs from this cluster, carrying resistance alleles from RIL 847.50 or RIL BAP8.70 at minor-effect QTLs (i.e., NIL5-5.1b, NIL8-4.1a) or pea line 552 alleles at QTLs *Ae-Ps7.6*, *Ae-Ps2.2*, and *Ae-Ps3.1* (i.e., NIL14-2.2/3.1/7.6a), had a narrower spectrum of effects on the isolates studied than NILs from cluster 2. Indeed, they showed significant LSMean differences compared with Isard for only 5 (NIL5-5.1b) to 31% (NIL14-2.2/3.1/7.6a) of the isolates studied (Fig. 2; Supplementary Fig. S2).

DISCUSSION

The detection and validation of QTLs for resistance to *Aphanomyces* root rot provides new insights into the control of this damaging disease, as no resistant variety is currently cultivated. However, before deploying resistance QTLs in pea growing regions, knowledge is required to determine whether natural populations of *A. euteiches* do not include individuals that are more aggressive than others. Most aggressive isolates would be selected by resistance QTLs in new varieties and would contribute to increased aggressiveness of *A. euteiches* natural populations.

This study is the first to evaluate the partial resistance of NILs developed by MAB on a set of *A. euteiches* isolates representative of the diversity of the pathogen populations. NILs constitute a unique resource to distinguish the effects of different genetic components of quantitative resistance (i.e., QTLs) on pathogen populations. To our knowledge, no study has used NIL plants to evaluate the effects of single QTLs or QTL combinations on a diverse population of a soilborne pathogen. In our study, the diversity of the French *A. euteiches* populations was considered by selecting isolates from diverse MLGs and French geographic locations, although all of the isolates belonged to pathotype I (Quillévéré-Hamard et al. 2018). Our results highlight (i) the variability of French *A. euteiches* isolates for aggressiveness toward resistance QTLs and (ii) the variable range of effects of single or combinations of QTLs on French *A. euteiches* populations.

Three aggressiveness groups of *A. euteiches* isolates toward NILs carrying different resistance QTLs. The clustering of *A. euteiches* isolates for their aggressiveness on the different NILs studied identified three groups with various levels of aggressiveness, unrelated to their geographical origin or genetic groups previously reported. This result is consistent with a previous study that showed a wide range of aggressiveness among 88 French

TABLE 1. Pea near-isogenic lines (NILs) used for the aggressiveness test of *Aphanomyces euteiches* isolates

NIL code ^a	Recipient line	Donor line ^b	Resistance alleles at QTL introgressed (n)	Target QTL
NIL5-5.1b	Isard	RIL 847.50	1	<i>Ae-Ps5.1</i>
NIL5-7.6b	Isard	RIL 847.50	1	<i>Ae-Ps7.6</i>
NIL5-5.1/7.6b	Isard	RIL 847.50	2	<i>Ae-Ps5.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i>
NIL8-4.1a	Isard	RIL BAP8.70	1	<i>Ae-Ps4.1</i>
NIL8-7.6b	Isard	RIL BAP8.70	1	<i>Ae-Ps7.6</i>
NIL8-4.1/7.6b	Isard	RIL BAP8.70	2	<i>Ae-Ps4.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i>
NIL14-2.2/3.1/7.6a	Isard	552	3	<i>Ae-Ps2.2</i> , <i>Ae-Ps3.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i>
NIL5-5.1/7.6a × NIL14-2.2/3.1/7.6a intercross	Isard	RIL 847.50 + 552	4	<i>Ae-Ps7.6</i> (847.50) + <i>Ae-Ps2.2</i> , <i>Ae-Ps3.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i> (552)

^a NIL codes are from Lavaud et al. (2015). The pea NILs were produced by marker-assisted backcrossing to introgress one to three resistance alleles at target quantitative trait loci (QTLs) identified in Hamon et al. (2013) from a donor to a recipient pea line (Lavaud et al. 2015). The last NIL was produced by intercrossing two NILs carrying two and three resistance alleles, respectively.

^b RIL = recombinant inbred line.

pea-infecting isolates on a differential set of six pea genotypes (Wicker and Rouxel 2001).

Isolates showing higher levels of aggressiveness on NILs carrying QTL *Ae-Ps7.6* individually or in combination with another QTL grouped to cluster A. Although this cluster is not the largest in the collection considered, it contains isolates that originated from different areas of France (i.e., Bretagne, Centre, Nord-Pas-de-Calais, and Ile-de-France). This observation makes it possible to assume that in natural field populations, more aggressive isolates, even possibly present in low frequency, would be able to develop low to moderate symptoms on varieties carrying these QTLs. QTLs deployed in varieties would then select for more aggressive isolates, resulting in a reduction of the effect or “erosion” of partial resistance conferred by the single QTL or QTL combinations after several cycles of isolate selection. Indeed, previous studies conducted in controlled conditions on oomycete pathogens have shown erosion of quantitative resistance in potato (Andrivon et al. 2007) and grapevine (Delmas et al. 2016; Delmotte et al. 2014) by selection of more aggressive isolates by the host. Erosion of quantitative resistance was also observed under natural conditions attributable to selection pressure exerted on pathogen populations (Delourme et al. 2014; Fukuoka et al. 2014). Theoretical models reported that local adaptation of pathogen populations depended on selection, gene flow, and population size (Gandon and Michalakakis 2002). In the case of *A. euteiches* populations, we can hypothesize that the predominantly clonal pathogen reproduction pattern and the sustainable survival of oospores in the soil would increase the size of aggressive isolate populations selected by the deployment of resistance QTLs at a regional scale and may favor the erosion of resistance QTLs after several cycles of aggressive isolate selection. This hypothesis can be reversed if higher aggressiveness is associated with higher fitness cost for the pathogen or if levels of resistance in varieties are so high that

they do not allow the pathogen to multiply, as observed in our study for the resistant control line AeD.

Pea lines structured in three groups according to their range of effects on *A. euteiches* isolates. The clustering of pea lines based on their partial resistance versus susceptibility to the 43 isolates studied identified three groups with variable ranges of effects on the isolates. Clusters 2 and 3 comprised NILs that differed by the presence and absence, respectively, of the major-effect resistance allele from RIL BAP8.70 or RIL 847.50 at QTL *Ae-Ps7.6*. NILs carrying these resistance alleles had a broader range of effects on the isolates tested than NILs without these alleles, which had a narrow range of effects. This result is in accordance with the validated effect of these resistance alleles at QTL *Ae-Ps7.6* in different field environments (Lavaud et al., *unpublished data*). Among NILs carrying a major-effect resistance allele at QTL *Ae-Ps7.6*, the NIL pyramiding four resistance alleles at three QTL, including two resistance alleles at QTL *Ae-Ps7.6*, expressed the highest level partial resistance to isolates from cluster B. The additive effects of pyramided resistance QTLs were reported previously in different pathosystems. The combination of three QTLs in apple and four QTLs in rice increased resistance efficacy to *Venturia inaequalis* and *Magnaporthe oryzae*, respectively (Fukuoka et al. 2014; Laloi et al. 2017). However, the efficacy of QTL combinations is not always correlated with the number of QTLs combined. In our study, partial resistance of NIL14-2.2/3.1/7.6a, cumulating minor-effect resistance alleles from pea line 552, was lower than that of NIL8-7.6b carrying the major-effect resistance allele. The range of effects of QTLs on the isolates studied was correlated with the level of partial resistance conferred by the QTL or QTL combination in the NILs.

Cluster 1 was composed of the resistant control pea line AeD, which showed a broad range of effect (i.e., a resistance efficacy on

TABLE 2. Geographical origin and multilocus genotype (MLG) assignment of the 43 French isolates^a of *Aphanomyces euteiches* tested in this study for aggressiveness on pea lines

Region	French department (area code)	Field (population code)	Isolates from each field (n)	Isolates distributed in each MLG per field (n)	MLG
Bretagne	Finistère (29)	Riec/Belon (RB)	6	2	1
				4	3
	Morbihan (56)	Bignan (BI)	6	2	1
				4	4
Bourgogne	Côte d’Or (21)	Bretenière SO (BRO)	1	1	1
				1	2
		Bretenière S1 (BR1)	3	1	10
				1	1
		Bretenière S2 (BR2)	1	1	1
		Bretenière S3 (BR3)	2	1	10
Centre	Eure-et-Loir (28)	Houville La Branche SO (HBO)	2	1	11
				2	1
		Houville La Branche S1 (HB1)	3	1	9
				1	1
		Pierres (P)	3	1	7
				1	9
		Fresnay l’Evêque (F)	1	1	8
				1	1
	Loiret (45)	Bleville (BL)	2	1	7
				1	1
Nord-Pas-de-Calais	Nord (59)	Ennevelin SO (ENO)	4	1	4
				1	5
		Ennevelin S1 (EN1)	3	1	7
				1	1
		Nainvilles Les Roches (NR)	3	1	4
				2	7
Ile-de-France	Seine et Marne (77)	Boigneville (BO)	2	1	1
				2	7
		Crisenoy (CR)	1	1	1

^a From Quillévéré-Hamard et al. (2018).

all isolates tested). Desgroux et al. (2016) reported that this resistant germplasm cumulated 12 favorable haplotypes at 14 consistent resistance loci, some of them covering the QTL *Ae-Ps7.6* genomic region. QTL pyramiding has been suggested as a promising strategy to increase levels of partial resistance to *A. euteiches* in pea, which has been confirmed in the pyramided NIL used in this study. However, the nature of QTLs (e.g., their effect levels, ranges of effects on isolates, and effects on key steps of pathogen life cycle), more than their number, is reported as crucial to consider for the durability of quantitative resistance (den Boer et al. 2014; Pilet-Nayel et al. 2017). Indeed, broad-spectrum QTLs have been

associated with durable resistance in apple (Lê Van et al. 2013). In pea, little information is available on the effect of resistance QTLs on life history traits of *A. euteiches*. Lavaud et al. (2016) showed that QTLs delayed first symptom appearance and decreased root colonization. Other studies attempted to extract and quantify oospore production from infested roots (Billard et al. 2019), but extraction yields were not sufficient to correctly quantify the impact of QTL resistance on oospore production. Resistance durability is mainly the result of two effects: a reduction in the parasite's population dynamics (the less strong this population dynamic, the more effective the resistance will be), and a slowing of the evolution

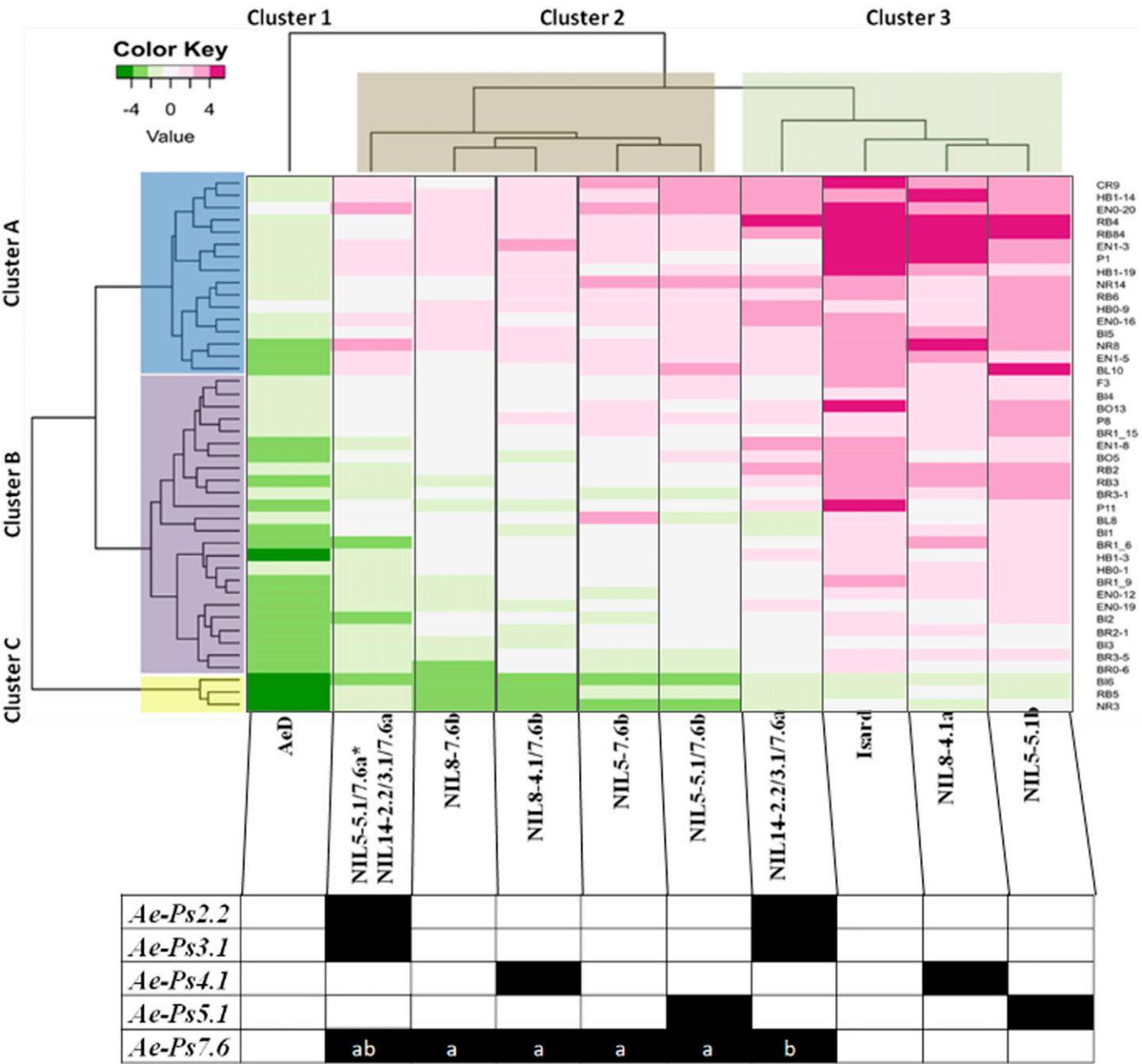


Fig. 2. Heatmap and cluster analysis of *Aphanomyces euteiches* isolates and pea lines. The color scale corresponds to the least squares means (LSMeans) of disease severity scores obtained in controlled condition assays for 43 French isolates of *A. euteiches* inoculated on the eight pea near-isogenic lines (NILs) carrying resistance quantitative trait loci (QTLs) and two control lines (Isard and AeD990SW45-8-7 [AeD]) used in this study. Green and pink colors indicate low and high LSMeans values, respectively. The cluster dendrogram of isolates generated by principal coordinate analysis indicates three clusters by different color frames: blue, cluster A; purple, cluster B; and yellow, cluster C. The cluster dendrogram of pea lines indicates three clusters by different color frames: white, cluster 1; dark gray, cluster 2; and light gray, cluster 3. The content of each pea NIL in resistance QTLs, according to Lavaud et al. (2015), is indicated by black boxes in the table beneath the NIL names. At QTL *Ae-Ps7.6*, the resistance allele(s) present in each NIL is derived from the pea germplasm recombinant inbred line (RIL) 847.50 or RIL BAP8.70 (a) and/or 552 (b).

of its genetic structure toward more aggressive individuals. Based on our observations and knowledge of the disease, it would thus be interesting to define whether the resistance QTL will particularly act on *A. euteiches* life history traits involved in the pathogen multiplication process and fitness.

Our study highlighted a significant level of partial resistance conferred by QTL *Ae-Ps7.6* to *A. euteiches* isolates. However, to maintain its effectiveness, it would be necessary to combine *Ae-Ps7.6* with other QTLs (e.g., in the same variety or by mixing cultivars carrying different QTLs) and also to use it with appropriate agronomic practices such as rotation with nonhost and/or resistant legume crops or an early sowing date. In our study, the pea line AeD displayed a high level of resistance against highly aggressive isolates of cluster A. Thus, future breeding programs will need to be investigated to achieve the level of resistance of AeD for the creation of varieties with durable resistance.

In conclusion, this study conducted in controlled conditions describes a reference state of the aggressiveness level and variation of natural *A. euteiches* populations in France toward resistance QTLs before their deployment in future pea varieties. Variation for aggressiveness on resistance QTLs in NILs was observed among the isolates studied. This suggested that *A. euteiches* populations may erode resistance QTL effects over time by selection of higher aggressive isolates such as those identified in this study. Thus, to ensure a sustainable efficacy of partial resistance conferred by QTLs, especially the major QTL *Ae-Ps7.6*, it is necessary to monitor the prevalence and the population size of more aggressive isolates. Variation in the range of effects of the pea lines studied on *A. euteiches* isolates was also observed, in relation with their level of partial resistance/susceptibility. QTL pyramiding for a higher level and broader range of effects of quantitative resistance on *A. euteiches* isolates, coupled with cultural practices maintaining low pathogen population sizes in the soil, will be a promising strategy for the durable development of resistant varieties.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Didier Andrivon, Josselin Montarry, Yannick Outreman, and Alain Baranger for their scientific contributions to the design of this study; and the greenhouse and experimental device platform of Institute for Genetics, Environment and Plant Protection for providing and managing equipment for the experiments.

LITERATURE CITED

- Andrivon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbiere, R., Achbani, E. H., Pelle, R., and Ellisseeche, D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* 97:338-343.
- Billard, E., Quillevere-Hamard, A., Lavaud, C., Pilet-Nayel, M. L., and Le May, C. 2019. Testing of life history traits of a soilborne pathogen in vitro: Do characteristics of oospores change according the strains of *Aphanomyces euteiches* and the host plant infected by the pathogen? *J. Phytopathol.* 167:313-320.
- Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., van de Weg, E., Expert, P., Denance, C., Didelot, F., Le Cam, B., and Durel, C. E. 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple $\times$ *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infect. Genet. Evol.* 27:481-489.
- Caffier, V., Le Cam, B., Al Rifai, M., Bellanger, M. N., Comby, M., Denance, C., Didelot, F., Expert, P., Kerdraon, T., Lemarquand, A., Ravon, E., and Durel, C. E. 2016. Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific quantitative trait locus. *Infect. Genet. Evol.* 44:541-548.
- Chaipanya, C., Telebanco-Yanoria, M. J., Quime, B., Longya, A., Korinsak, S., Korinsak, S., Toojinda, T., Vanavichit, A., Jantasuriyarat, C., and Zhou, B. 2017. Dissection of broad-spectrum resistance of the Thai rice variety Jao Hom Nin conferred by two resistance genes against rice blast. *Rice (N. Y.)* 10:18.
- Cowger, C., and Mundt, C. C. 2002. Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of *Septoria tritici* blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 92:617-623.
- Delmas, C. E. L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Cervera, S. R., Deliere, L., and Delmotte, F. 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: Selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evol. Appl.* 9:709-725.
- Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H. H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M., and Deliere, L. 2014. Rapid and multi-regional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: Evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* 27:500-508.
- Delourme, R., Bousset, L., Ermel, M., Duffe, P., Besnard, A. L., Marquer, B., Fudal, I., Linglin, J., Chadaeuf, J., and Brun, H. 2014. Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Infect. Genet. Evol.* 27:490-499.
- den Boer, E., Pelgrom, K. T. B., Zhang, N. W. W., Visser, R. G. F., Niks, R. E., and Jeuken, M. J. W. 2014. Effects of stacked quantitative resistances to downy mildew in lettuce do not simply add up. *Theor. Appl. Genet.* 127:1805-1816.
- Desgroux, A., L'Anthoene, V., Roux-Duparque, M., Riviere, J. P., Aubert, G., Tayeh, N., Moussart, A., Mangin, P., Vetel, P., Piriou, C., McGee, R. J., Coyne, C. J., Burstin, J., Baranger, A., Manzaneres-Dauleux, M., Bourion, V., and Pilet-Nayel, M. L. 2016. Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC Genomics* 17:124.
- Didelot, D., and Chaillet, I. 1995. Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. Page 150 in: *Proceedings of the Second European Conference of Grain Legumes*. European Association for Grain Legume Research, Paris, France.
- Fox, J., and Weisberg, S. 2016. Companion to applied regression. <https://cran.r-project.org/package=car>
- Fukuoka, S., Yamamoto, S. I., Mizobuchi, R., Yamanouchi, U., Ono, K., Kitazawa, N., Yasuda, N., Fujita, Y., Nguyen, T. T. T., Koizumi, S., Sugimoto, K., Matsumoto, T., and Yano, M. 2014. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Sci. Rep.* 4:4550.
- Gandon, S., and Michalakakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: Interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.* 15:451-462.
- Graves, S., Piepho, H., and Selzer, L. 2015. Visualizations of paired comparisons. <https://cran.r-project.org/web/packages/multcompView/index.html>
- Gritton, E. T. 1990. Registration of five root-rot resistant germplasm lines of processing pea. *Crop Sci.* 30:1166-1167.
- Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C. J., McGee, R. J., Le Goff, I., L'Anthoene, V., Esnault, R., Riviere, J. P., Klein, A., Mangin, P., McPhee, K. E., Roux-Duparque, M., Porter, L., Miteul, H., Lesné, A., Morin, G., Onfroy, C., Moussart, A., Tivoli, B., Delourme, R., and Pilet-Nayel, M. L. 2011. New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theor. Appl. Genet.* 123:261-281.
- Hamon, C., Coyne, C. J., McGee, R. J., Lesné, A., Esnault, R., Mangin, P., Hervé, M., Le Goff, I., Deniot, G., Roux-Duparque, M., Morin, G., McPhee, K. E., Delourme, R., Baranger, A., and Pilet-Nayel, M. L. 2013. QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biol.* 13:45.
- Hervé, M. 2015. RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. <https://cran.microsoft.com/snapshot/2017-08-01/web/packages/RVAideMemoire/index.html>
- Husson, F., Josse, J., Lê, S., and Mazet, J. 2007. FactoMine R: Factor analysis and data mining with R. <http://132.180.15.2/math/statlib/R/CRAN/doc/packages/FactoMineR.pdf>
- Kraft, J. M. 1992. Registration of 90-2079, 90-2131 and 90-2322 pea germplasm. *Crop Sci.* 32:1076.
- Kreplak, J., Madoui, M. A., Capal, P., Novak, P., Labadie, K., Aubert, G., Bayer, P. E., Gali, K. K., Syme, R. A., Main, D., Klein, A., Berard, A., Vrbova, I., Fournier, C., d'Agata, L., Belser, C., Berrabah, W., Toegelova, H., Milec, Z., Vrana, J., Lee, H., Kougbadjio, A., Terezol, M., Huneau, C., Turo, C. J., Mohellibi, N., Neumann, P., Falque, M., Gallardo, K., McGee, R., Tar'an, B., Bendahmane, A., Aury, J. M., Batley, J., Le Paslier, M. C., Ellis, N., Warkentin, T. D., Coyne, C. J., Salse, J., Edwards, D., Lichtenzweig, J., Macas, J., Dolezel, J., Wincker, P., and Burstin, J. 2019. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nat. Genet.* 51:1411-1422.
- Labrousse, F. 1933. Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* 19:71-84.
- Laloi, G., Vergne, E., Durel, C. E., Le Cam, B., and Caffier, V. 2017. Efficiency of pyramiding of three quantitative resistance loci to apple scab. *Plant Pathol.* 66:412-422.
- Lavaud, C., Baviere, M., Le Roy, G., Herve, M. R., Moussart, A., Delourme, R., and Pilet-Nayel, M. L. 2016. Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines. *BMC Plant Biol.* 16:166.

- Lavaud, C., Lesné, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., Poncet, C., Delourme, R., Baranger, A., and Pilet-Nayel, M. L. 2015. Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theor. Appl. Genet.* 128:2273-2288.
- Le May, C., Onfroy, C., Moussart, A., Andrivon, D., Baranger, A., Pilet-Nayel, M. L., and Vandemark, G. 2018. Genetic structure of *Aphanomyces euteiches* populations sampled from United States and France pea nurseries. *Eur. J. Plant Pathol.* 150:275-286.
- Lê Van, A., Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Chauveau, A., Brunel, D., Le Cam, B., and Durel, C. E. 2013. Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: A case study in an apple *Venturia inaequalis* pathosystem. *New Phytol.* 197:899-908.
- Lenth, R., and Herve, M. 2015. Lsmeans: Least-squares means. <https://cran.r-project.org/package=lsmeans>
- Lockwood, J., and Ballard, J. 1960. Evaluation of pea introductions for resistance to *Aphanomyces* and *Fusarium* root rots. *Mich. Q. Bull.* 42:704-713.
- McGee, R. J., Coyne, C. J., Pilet-Nayel, M. L., Moussart, A., Tivoli, B., Baranger, A., Hamon, C., Vandemark, G., and McPhee, K. 2012. Registration of pea germplasm lines partially resistant to *Aphanomyces* root rot for breeding fresh or freezer pea and dry pea types. *J. Plant Regist.* 6:203-207.
- Mieuzet, L., Quillevere, A., Pilet, M. L., and Le May, C. 2016. Development and characterization of microsatellite markers for the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Fungal Genet. Biol.* 91:1-5.
- Montarry, J., Cartier, E., Jacquemond, M., Palloix, A., and Moury, B. 2012. Virus adaptation to quantitative plant resistance: Erosion or breakdown? *J. Evol. Biol.* 25:2242-2252.
- Moussart, A., Even, M. N., and Tivoli, B. 2008. Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122:321-333.
- Moussart, A., Onfroy, C., Lesné, A., Esquibet, M., Grenier, E., and Tivoli, B. 2007. Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Eur. J. Plant Pathol.* 117:57-69.
- Moussart, A., Wicker, E., Delliou, B., Abelard, J. M., Esnault, R., Lemarchand, E., Rouault, F., Le Guennou, F., Pilet-Nayel, M. L., Baranger, A., Rouxel, F., and Tivoli, B. 2009. Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:153-158.
- Moussart, A., Wicker, E., Duparque, M., and Rouxel, F. 2001. Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. In: *Proceedings of the Fourth European Conference on Grain Legumes*. European Association for Grain Legume Research, Paris, France.
- Parlevliet, J. E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124:147-156.
- Pilet-Nayel, M. L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M. C., Fournet, S., Durel, C. E., and Delourme, R. 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Front. Plant Sci.* 8:1838.
- Pilet-Nayel, M. L., Muehlbauer, F. J., McGee, R. J., Kraft, J. M., Baranger, A., and Coyne, C. J. 2002. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theor. Appl. Genet.* 106:28-39.
- Quillévère-Hamard, A., Le Roy, G., Moussart, A., Baranger, A., Andrivon, D., Pilet-Nayel, M. L., and Le May, C. 2018. Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France. *Front. Plant Sci.* 9:1673.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Wicker, E., Hulle, M., and Rouxel, F. 2001. Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathol.* 50:433-442.
- Wicker, E., and Rouxel, F. 2001. Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:919-929.

Discussion générale

Discussion générale

Les travaux que j'ai menés pendant cette thèse se sont inscrits dans un contexte de besoin urgent d'accroître la production de légumineuses en France et en Europe, alors que les stress, spécialement la pourriture racinaire précoce à *A. euteiches*, sont des verrous majeurs à l'augmentation de la production de ces cultures. En effet, d'un côté, les objectifs d'autonomie protéique de l'Europe et de réduction des pesticides conduisent à ce jour à revoir les systèmes de production en accroissant notamment la part de légumineuses à graines dans les rotations, et de l'autre côté, les variétés françaises de pois restent sensibles ou tolérantes à *A. euteiches* même si des QTL et sources de résistance sont en cours d'intégration dans les programmes de sélection. Bien que plusieurs travaux menés dans l'équipe ont porté sur la gestion de la pourriture racinaire, aucune étude n'a été conduite depuis les années 2000 (Wicker, 2001) pour mieux décrire les populations d'*A. euteiches* en France. Ce type d'étude permettrait de dresser un état de référence de la structuration des populations françaises et évaluer si les nouvelles pratiques culturales et le déploiement à venir des légumineuses dans les systèmes de production sont susceptibles de faire évoluer la diversité et la structure des populations de l'agent pathogène. C'est dans ce contexte que j'ai réalisé mes travaux qui ont visé à acquérir des connaissances plus approfondies sur i) la diversité génétique et phénotypique des populations françaises d'*A. euteiches*, en s'appuyant notamment sur des marqueurs moléculaires plus discriminants que ceux précédemment utilisés et ii) le niveau d'agressivité des isolats d'*A. euteiches* vis-à-vis des QTL de résistance identifiés dans les travaux de génétique. Ce travail de thèse a comporté trois axes principaux, avec les deux premiers axes qui ont visé à développer des marqueurs microsatellites, étant le type de marqueurs développés au moment de l'étude (Chapitre 1) pour étudier la diversité génétique et phénotypique des populations françaises d'*A. euteiches* (Chapitre 2). Le troisième axe a eu, quant à lui, pour objectif d'évaluer la diversité des isolats français pour leur agressivité vis-à-vis de NILs contenant un ou plusieurs QTL de résistance, afin d'émettre des hypothèses prédictives sur l'évolution potentielle des souches lors du déploiement de variétés partiellement résistantes.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux et décrits dans les chapitres précédents :

- 1) Ont permis de développer des marqueurs microsatellites informatifs pour étudier la diversité génétique des populations d'*A. euteiches*, à partir d'isolats d'origines géographiques différentes (France et US) ;
- 2) Ont révélé une faible structuration génétique des populations françaises d'*A. euteiches*, avec un pattern particulier pour les isolats issus de parcelles avec un historique cultural comportant plusieurs légumineuses ;
- 3) Ont mis en évidence trois groupes d'agressivité, dans un set d'isolats français d'*A. euteiches*, sur NILs de pois contenant différents QTL de résistance, ainsi que des gammes d'efficacité plus ou moins larges des QTL de résistance dans les NILs vis-à-vis de ce set d'isolats français d'*A. euteiches*.

L'ensemble de ces résultats a permis de valider les hypothèses de recherche dressées dans ce travail de thèse (cf Chapitre I) à savoir : (1) une faible diversité génétique des populations

d'A. euteiches présentes en France, (2) mais une diversité modérée de pouvoir pathogène des isolats français sur des lignées porteuses de QTL de résistance, constituant une source potentielle d'évolution des populations *d'A. euteiches* face au développement futur de variétés partiellement résistantes de pois.

Dans ce chapitre, nous allons revenir sur les résultats marquants du travail de thèse et discuter leurs apports aux connaissances scientifiques actuelles dans le contexte de la transition agroécologique prônant une augmentation des surfaces agricoles en légumineuses. Ces résultats seront discutés au regard des nouvelles connaissances acquises depuis la réalisation de ces travaux entre 2012 et 2017 et des pistes d'action à envisager seront dressées pour poursuivre ces travaux.

1. Les marqueurs pour l'étude de la diversité génétique des populations d'*A. euteiches*

La connaissance de la variabilité génétique au sein des populations d'agents pathogènes repose sur l'utilisation de marqueurs moléculaires permettant de mettre en relief un polymorphisme qui reflète la signature moléculaire d'évènements fondateurs plus ou moins proches et qui ont structuré les populations au fil de plusieurs générations. Pendant longtemps, que ce soit en France et aux Etats-Unis, les études menées pour décrire la diversité génétique d'*A. euteiches* ont reposé uniquement sur des marqueurs dominants malgré le génome diploïde (hétérozygotie) de l'agent pathogène. Des études menées sur les populations françaises d'*A. euteiches* grâce aux marqueurs AFLP et SRAP (Wicker, 2001; Le May *et al.*, 2018) ont mis en avant une absence de structuration génétique des populations et une diversité génétique faible à élevée selon l'origine géographique des isolats, malgré un potentiel évolutif de l'agent pathogène supposé faible en raison de son régime de reproduction homothallique et de son caractère tellurique limitant les flux de gènes et le brassage génétique.

Le niveau informatif d'un marqueur repose sur un équilibre entre le niveau de polymorphisme détecté et le nombre de locus polymorphes révélés au cours d'un essai (Powell *et al.*, 1996). Les marqueurs AFLP, même s'ils révèlent de nombreux locus sur le génome, semblent être moins intéressants en raison du polymorphisme d'absence/présence pour chaque locus, comparé aux microsatellites qui ont un potentiel de polymorphisme plus élevé en révélant plusieurs allèles par locus sur la base de répétitions en tandem de di- ou tri-nucléotides. En outre, les marqueurs AFLP ne permettent pas de révéler une hétérozygotie. Les marqueurs SRAP, quant à eux, sont utilisés pour amplifier des régions codantes avec des amorces ciblant les cadres de lecture ouverts. A notre connaissance, les limites de ces marqueurs sont peu renseignées à ce jour, ces derniers étant relativement nouveaux comparé aux autres marqueurs dominants. Cependant leur utilisation se généralise puisqu'ils ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique d'un certain nombre d'agents pathogènes dont les nématodes (Devran &

Baysal, 2012) et les oomycètes (Chen *et al.*, 2009). Comme pour les marqueurs AFLP, les marqueurs SRAP ne produisent pas d'information sur le niveau d'hétérozygotie.

Au cours des dernières décennies, les microsatellites se sont affichés comme les marqueurs moléculaires de choix pour étudier les questions relatives à l'étude des populations de plusieurs espèces, en raison notamment de leur prix, de leur reproductibilité ainsi que de leur distribution sur tout le génome et de leur taux élevé de polymorphisme. Ainsi plusieurs études de génétique des populations utilisant ce type de marqueurs ont été menées sur les pathogènes telluriques comme le nématode à kyste de la carotte *Heterodera carotae* (Gautier *et al.*, 2019) ou le nématode de la betterave *Heterodera schachtii* (Gracianne *et al.*, 2016), mais aussi sur des oomycètes tels que *Phytophthora infestans* (Montarry *et al.*, 2010). Néanmoins leur développement est plus complexe car nécessite l'acquisition de données de séquence pour identifier des motifs di- ou tri-nucléotides en tandem et requiert de définir des amorces. Ces amorces se localisent notamment dans des régions génomiques non codantes, ce qui peut constituer un avantage de neutralité pour l'étude de la diversité génétique. De plus, la question de savoir si un nombre limité de marqueurs microsatellites reflète avec précision la diversité de l'ensemble du génome reste une question controversée (Väli *et al.*, 2008). Depuis, grâce aux progrès de la génétique, de la baisse des coûts de séquençage de génomes entiers, le développement et l'utilisation de marqueurs SNP a connu un essor grandissant en raison notamment de l'utilisation des nouvelles techniques de séquençage à haut débit pouvant être appliquées efficacement à un large éventail d'organismes. Ces progrès apportent des marqueurs en masse pour explorer la diversité génétique d'*A. euteiches*. En effet, comparé aux marqueurs microsatellites, les SNPs présentent l'avantage d'être plus nombreux et très bien répartis sur l'ensemble du génome, y compris dans les régions riches en gènes, apportant ainsi des résultats plus précis. L'utilisation de SNPs s'avère d'autant plus intéressante que ces marqueurs sont situés dans des zones génomiques codantes ou soumises à des pressions de sélection.

En 2013, lorsque nous avons entrepris les travaux sur les populations françaises d'*A. euteiches*, notre choix s'est orienté vers les marqueurs microsatellites pour étudier la diversité des populations en France, en raison de l'essor à l'époque de ce type de marqueurs locus-spécifique et co-dominant et de l'absence de séquençage complet du génome d'*A. euteiches*. Le niveau de polymorphisme obtenu grâce à ces marqueurs s'est révélé intéressant pour mener notre étude de génétique des populations de l'agent pathogène mais a mis en évidence une faible diversité génétique au sein des populations françaises. Néanmoins, ces marqueurs ont permis de distinguer deux groupes distincts d'isolats entre les populations françaises et américaines. Ces résultats sont convergents avec ceux obtenus avec les marqueurs SRAP (Le May *et al.*, 2018). Bien que nous ayons considéré ces marqueurs comme étant suffisamment informatifs et polymorphes pour mener une étude de génétique des populations (Mieuzet *et al.*, 2016), le nombre de marqueurs développés est resté modeste et leur répartition, homogène ou non, sur le génome d'*A. euteiches* est restée inconnue. Ceci n'a pas permis d'estimer si le niveau d'information du set de 14 SSRs (dont 4 amorces di- ; une amorce tétra- et 9 amorces tri-nucléotides) utilisés a été suffisant pour caractériser la diversité génétique au sein des populations analysées. Avec l'obtention de la séquence complète du génome d'*A. euteiches* en 2018 (Gaulin *et al.*, 2018; Kiselev *et al.*, 2022), il serait à présent possible de localiser sur le

génomique les motifs SSRs des marqueurs utilisés, par alignement de leurs séquences sur celle du génome de référence. Kiselev *et al.* (2022) ont identifié 41 familles d'ADN satellites répétés en tandem (nommées AeSat), localisés pour la plupart dans des régions non codantes.

Depuis 2008, les travaux de séquençage d'*A. euteiches* ont permis d'apporter des avancées majeures sur l'état des connaissances des effecteurs impliqués dans sa pathogénicité. Ainsi les premières études ont permis d'identifier la présence d'effecteurs cytoplasmiques de type Crinklers (CRNs) impliqués dans la reconnaissance hôte-pathogène (Gaulin *et al.*, 2008). Par la suite, des analyses de génomique couplées à des analyses transcriptomique ont permis d'identifier une nouvelle classe d'effecteurs de type SSP (Small Secreted Protein) correspondant à des protéines de petite taille impliquées dans les interactions hôte-pathogène. Récemment, ces effecteurs ont fait l'objet d'une étude fonctionnelle plus approfondie afin de comprendre leur rôle dans les mécanismes de défense des plantes (Gaulin *et al.*, 2018; Camborde *et al.*, 2022). L'avancée des techniques de séquençage ont permis pour la première fois d'assembler le génome mitochondrial de la souche européenne ATCC201684 d'*A. euteiches*, et d'avoir accès à une première version du génome des souches de référence RB84 et Ae109 utilisées dans nos travaux (Kiselev *et al.*, 2022). Cette avancée majeure récente ouvre de nouvelles perspectives pour développer de nouveaux marqueurs et analyser plus finement la structure des populations du pathogène. En effet, sur la base de ces génomes, l'identification de SNP sur tout le génome pourrait être réalisée afin notamment de développer une puce SNP permettant de caractériser les populations d'*A. euteiches* avec un plus grand nombre de marqueurs localisés dans des zones codantes ou neutres. Cette puce pourrait être utilisée pour génotyper la collection des 205 isolats français étudiés dans ce travail, afin de confirmer ou non, avec une résolution plus élevée, la faible diversité génétique observée avec les marqueurs SSRs dans ce travail de thèse. Cependant le mode de reproduction clonal de l'agent pathogène et sa dissémination sur de courtes distances laissent présager que l'utilisation en nombre plus élevé de nouveaux marqueurs moléculaires tels que les SNP ne révèlent pas une plus grande variabilité génétique que celle déjà observée dans les populations isolées des parcelles avec des précédents culturels de pois. Néanmoins, cette approche serait envisageable pour des isolats issus de parcelles avec des précédents culturels diversifiés en légumineuses. Ainsi, la comparaison génomique des isolats européens et américains a permis d'identifier des variations génétiques entre isolats issus de parcelles ayant présenté des historiques culturels diversifiés en légumineuses qui seraient étroitement liées aux protéines sécrétées SSP (Kiselev *et al.*, 2022). Ce résultat ouvre donc de nouvelles perspectives pour identifier des marqueurs plus informatifs de type SNP non-neutres en ciblant des zones codantes sous sélection par l'hôte. En effet, en développant des marqueurs dans les gènes codant des effecteurs CRN et SSP, il serait envisageable de réaliser des analyses de génétique des populations pour élucider avec une plus grande précision la diversité génétique et la structure des populations en fonction de leur relation avec la plante hôte, *i.e* la pathogénicité et la préférence d'hôte. Cette approche permettrait également d'établir un lien génotype-phénotype avec une meilleure précision que celle réalisée avec les marqueurs neutres qui ne ciblent pas les régions sous sélection.

Aujourd'hui les approches de phénotypage des isolats d'*A. euteiches* nécessitent de mettre en place des essais en conditions contrôlées par des inoculations artificielles sur une

gamme de légumineuses permettant de révéler les différences de pouvoir pathogène de ces isolats. Cette méthodologie relativement longue et contraignante permet de classer les isolats selon leurs pathotypes et leurs phénotypes de virulence. L'accès au génome d'*A. euteiches* laisse désormais envisager la possibilité de développer des marqueurs spécifiques de pathotypes. L'analyse phylogénique menée par Kiselev *et al.*, 2022 sur la base de cinq génomes re-séquencés d'*A. euteiches* a mis en évidence deux clusters distinguant les deux souches européennes de pathotype I sur pois et la souche de référence américaine de pathotype III sur pois plus proche des deux souches de références des races 1 et 2 sur luzerne. Le développement de marqueurs spécifiques de pathotypes pourrait non seulement fournir un diagnostic rapide des isolats présents en France mais aussi développer des stratégies de surveillance de leur évolution.

2. La structuration des populations d'*A. euteiches* : état de référence pré-déploiement de variétés résistantes en vue d'anticiper la gestion durable des QTL résistance

L'estimation du potentiel d'adaptation des populations d'agents pathogènes aux résistances génétiques est une étape indispensable pour gérer durablement les résistances variétales. McDonald & Linde (2002) ont ainsi proposé des indicateurs basés sur les caractéristiques biologiques et génétiques des agents pathogènes pour prédire la durabilité des résistances. En s'appuyant sur le tableau d'estimation de risque proposé par McDonald & Linde (2002), la faible dispersion et le régime d'autofécondation majoritaire d'*A. euteiches* permettent de conclure au faible potentiel évolutif des populations d'*A. euteiches*. Néanmoins, cette grille reste générique et ne donne qu'une estimation très partielle du potentiel évolutif. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la capacité de survie dans le sol pendant de nombreuses années ainsi que le large spectre d'hôtes d'*A. euteiches* contribueraient à augmenter la taille des populations naturelles. Cela pourrait donc avoir un impact non négligeable sur le risque de contournement des résistances par un maintien dans le temps des populations les plus adaptées. Dans un contexte où des contournements de résistances ont été observés chez les plantes, spécialement dans le cas de la résistance partielle de la luzerne à la race 1 d'*A. euteiches* aux USA, il est important de connaître le niveau de diversité des populations naturelles d'*A. euteiches* en France. La paucité des approches de génétique des populations d'*A. euteiches* en France depuis les années 2000 (Wicker, 2001), nous a conduit à mener une étude de la diversité génétique et phénotypique des populations françaises d'*A. euteiches* issues des principaux bassins de production ayant eu des fréquences de retour du pois variables d'une parcelle à l'autre et des conditions pédoclimatiques différentes selon les régions. Lorsque cette étude a été menée, aucune variété résistante de pois vis-à-vis de la maladie n'était encore déployée. Il s'agissait donc d'établir un état de référence du niveau de diversité des populations françaises, à partir d'un set élargi d'isolats d'*A. euteiches* isolés du pois et d'un set de légumineuses cultivées en France.

Dans cette étude, menée entre 2013 et 2015, l'utilisation de marqueurs co-dominants nous a permis de mettre en évidence une faible diversité génétique ainsi qu'une absence de

structuration génétique des populations de l'agent pathogène à l'échelle régionale (Quillévéré-Hamard *et al.*, 2018). Cependant, les données génétiques n'ont pu être corrélées à celles des phénotypes observés, ce qui a montré la spécificité d'utilisation des marqueurs neutres qui ne ciblent pas les régions sous sélection. Sur la base de nos résultats, nous avons pu émettre l'hypothèse du rôle fondateur de l'hôte sur la structuration génétique des populations d'*A. euteiches* en France. Selon cette hypothèse, la présence du pois comme culture principale de légumineuse dans les parcelles d'où sont issus les isolats et l'absence de variétés de pois résistantes à la maladie ont pu limiter la pression de sélection exercée par l'hôte sur les populations d'*A. euteiches* et ainsi l'évolution des populations. Néanmoins, l'identification de quelques isolats avec un fort niveau d'hétérozygotie dans les parcelles échantillonnées de la région de Bourgogne, présentant un historique en légumineuses diversifiées (féverole, vesce, luzerne et pois), a renforcé l'hypothèse émise par Grünwald & Hoheisel en 2006 de l'existence de phénomène d'outcrossing dans un régime majoritairement d'autofécondation. Ces phénomènes de brassage génétique interviendraient entre isolats avec des profils génétiques différents, sélectionnés par l'hôte. A ce jour, de nombreuses questions restent en suspens sur les déterminismes écologiques qui conduisent l'agent pathogène *A. euteiches* à des phénomènes d'outcrossing. Néanmoins, ces phénomènes bien que ponctuels, contribueraient à accroître le niveau de diversité génétique des populations de l'agent pathogène. A l'échelle phénotypique, notre étude a montré une variabilité relativement faible, la plupart des isolats testés ayant présenté un profil de virulence sur l'ensemble des espèces de légumineuses testées (pois, vesce, luzerne et féverole) et l'ensemble de ces isolats ayant été caractérisés comme appartenant au pathotype I d'*A. euteiches* sur pois. La prépondérance de la culture de variétés sensibles de pois parmi les légumineuses cultivées depuis les 40 dernières années en France limiterait donc la variabilité phénotypique des isolats d'*A. euteiches* observée sur pois, contrairement à ce qui a été observé par ailleurs sur d'autres légumineuses (Wicker *et al.*, 2001). Le rôle de la plante hôte est donc un point central de notre étude dans la structuration génétique et phénotypique des populations d'*A. euteiches*. Aux Etats-Unis, la diversification des légumineuses et l'utilisation de la luzerne bien plus ancienne qu'en France en rotation avec le pois a eu des répercussions non négligeables sur les populations d'*A. euteiches* en mettant en évidence davantage de variabilité des populations au niveau génétique (Malvick *et al.*, 2009) et phénotypique (Fitzpatrick *et al.*, 1998; Malvick & Grau, 2001). Une étude comparative de la diversité génétique des isolats d'*A. euteiches* provenant de trois pépinières françaises et quatre pépinières américaines a montré que la variabilité génétique observée était plus élevée aux Etats-Unis qu'en France (Le May *et al.*, 2018). Au niveau phénotypique, de récents travaux comparatifs entre ces populations françaises et américaines ont montré une agressivité plus élevée des isolats issus des pépinières françaises, avec une variabilité phénotypique plus élevée entre les pépinières américaines qu'entre les pépinières françaises plus uniformes. Alors que le pathotype III est observé dans certaines pépinières des USA, spécialement dans l'état du Minnesota largement cultivé en luzerne, le pathotype I a été retrouvé dans la plupart des pépinières américaines étudiées et dans l'ensemble des pépinières françaises (Onfroy *et al.*, en préparation). Le séquençage récent de quatre souches de référence d'*A. euteiches*, représentant les principaux pathotypes identifiés sur pois (souche RB84, pathotype I ; souche Ae109, pathotype III) et luzerne (race 1, MF1 ; race 2, NC1), a montré une plus grande proximité génétique de la souche Ae109 isolée du pois (pathotype III) avec les souches luzerne (MF1,

NC1) qu'avec la souche RB84 isolée du pois (Kiselev et al, 2022). Ces études comparatives sont en cohérence avec l'hypothèse que les rotations incluant du pois et de la luzerne pourraient favoriser l'émergence de populations d'*A. euteiches* avec une plus grande variabilité. Elles ouvrent de nouvelles perspectives pour comprendre l'histoire évolutive d'*A. euteiches* dans les deux pays étudiés.

En se basant sur l'hypothèse du rôle de la légumineuse hôte dans la structuration des populations d'*A. euteiches* et du constat que la filière protéagineuse est aujourd'hui en plein essor pour répondre aux enjeux climatiques et au besoin des marchés de valoriser les protéines végétales en France, il semble urgent de poursuivre cette approche de cartographie génétique des populations d'*A. euteiches* dans les bassins de production de légumineuses. En effet, l'augmentation et la diversification souhaitées des cultures de légumineuses sur le territoire national laisse présager, comme cela a été le cas aux USA, à l'émergence de nouveaux variants entraînant ainsi une modification du niveau de diversité génétique et phénotypique des populations françaises. En outre, le large spectre d'hôtes d'*A. euteiches* pourrait aussi contribuer à augmenter son potentiel évolutif en favorisant l'augmentation de la taille des populations limitant ainsi les phénomènes de dérive génétique. L'ensemble de ces processus contribueraient donc à accroître le niveau de diversité génétique des populations naturelles d'*A. euteiches*. L'hypothèse selon laquelle plusieurs trajectoires évolutives des populations d'*A. euteiches* se distinguant génétiquement et par leurs spécificités d'hôtes, coexistent dans le sol, a déjà été évoqué dans les travaux de Wicker (2001). Cependant nos travaux n'ont pas permis de répondre à cette hypothèse en raison de l'absence d'échantillonnage dans des régions avec des historiques culturels variés en légumineuses. Il conviendrait donc d'orienter l'effort d'échantillonnage dans des parcelles pour lesquelles un historique culturel diversifié en légumineuses a été mis en place et ceci au niveau régional. En France, peu de parcelles offrent une diversité d'historique en légumineuses cultivées car le pois a été la culture de légumineuse prépondérante depuis les 40 dernières années. En revanche, au niveau international, et plus particulièrement aux Etats-Unis et au Canada, d'autres légumineuses telles que la luzerne ou la lentille, ont été largement cultivées dans les mêmes zones de culture que le pois. La proximité génétique des souches de référence du pathotype III du pois et des races 1 et 2 de luzerne (Kiselev *et al.*, 2022) et l'identification de souches du pathotype III dans les pépinières situées dans des régions de culture de la luzerne aux Etats-Unis (Onfroy et al, en préparation) laissent supposer un continuum d'évolution entre les populations d'*A. euteiches* via les différents hôtes de légumineuses. Au Canada où le pathotype I a été montré récemment majoritaire (Kumar *et al.*, 2021), aucune étude de la diversité génétique n'a été investiguée jusqu'à ce jour. Un effort d'échantillonnage important à plus grande échelle aux Etats-Unis notamment dans les localités de Washington, du Minnesota, du Wisconsin et de l'Oregon ainsi qu'au Canada, serait intéressant à réaliser dans des parcelles présentant des historiques de charge en pois et de culture de légumineuses diversifiés, afin de mener une étude de la diversité génétique des populations en fonction des hôtes. Ce type d'étude vient d'être mené en Europe et a identifié des différences entre les populations d'*A. euteiches* issues de parcelles cultivées en pois dans différents pays d'Europe, notamment d'Italie, sans néanmoins que le lien avec l'historique culturel en légumineuses n'ait pu être étudié (Kälin *et al.*, 2022).

Lors de mon travail à INRAE, j'ai pu investiguer l'étude de la sélection des isolats par l'hôte dans des essais de successions culturales de pois ou de féverole simulées en conditions contrôlée. La co-inoculation de deux isolats distincts a été effectuée au premier cycle et le système racinaire a été réenfoui à chaque cycle suivant dans du substrat inerte comme source d'inoculum. A l'issue des essais, des isollements ont été réalisés à partir de racines symptomatiques pour *in fine* caractériser les isolats d'*A. euteiches* au niveau moléculaire. Les résultats obtenus n'ont pas permis de conclure quant au rôle sélectif du pois ou de la féverole sur le mélange d'isolats en raison de plusieurs verrous méthodologiques. D'une part, les effectifs d'isolement se sont avérés être trop faibles pour émettre des conclusions à partir des résultats obtenus. D'autre part, le passage par une phase d'isolements des souches à partir du pois ou de la féverole a induit des biais d'échantillonnage. Enfin la méthode de réenfouissement racinaire a accru de manière exponentielle la charge fongique entraînant une rapide augmentation de la pression d'inoculum. Pour étudier le rôle des légumineuses sur la sélection directionnelle des isolats d'*A. euteiches*, il conviendrait de mettre en place des essais de successions culturales de différentes légumineuses *in natura* dans des micro-parcelles naturellement infestées. Cependant ces essais peuvent s'avérer long (un cycle de culture par an) et sont généralement soumis aux aléas climatiques et à des pressions sanitaires. L'approche d'évolution expérimentale en conditions contrôlées peut dans ce cas s'avérer être une bonne alternative en permettant de contrôler efficacement les effets confondants. De plus, cette approche permet l'obtention rapide de résultats à moindre coûts. Dans d'autres pathosystèmes telluriques, *i.e.* *Globodera pallida*/pomme de terre (Fournet *et al.*, 2013) ou *Meloidogyne incognita*/tomate (Castagnone-Sereno *et al.*, 2007), des essais d'évolution expérimentale ont été menés en conditions contrôlées pour explorer les conséquences phénotypiques et génomiques de l'adaptation d'agents pathogènes aux résistances de leur hôte. A partir du dispositif de successions culturales développé en conditions contrôlées par Moussart *et al.*, 2012 dans du sol naturellement infesté, une expérimentation d'évolution expérimentale pourrait être conduite afin d'étudier l'effet de légumineuses sur la sélection des populations naturelles d'*A. euteiches* issues de parcelles présentant un historique de culture de pois. Dans ce type de dispositif, des successions culturales de diverses légumineuses avec réenfouissement des racines à chaque cycle et des isolements d'isolats d'*A. euteiches* au début et en fin de test, couplés à l'usage de méthodes de séquençage haut-débit des isolats, devraient être envisagés pour caractériser avec précision l'évolution des populations de l'agent pathogène au fur et à mesure des successions et ainsi étudier l'effet de la pression sélective des légumineuses sur la l'évolution de la diversité génétique et de la structuration des populations d'*A. euteiches* (Figure 19).

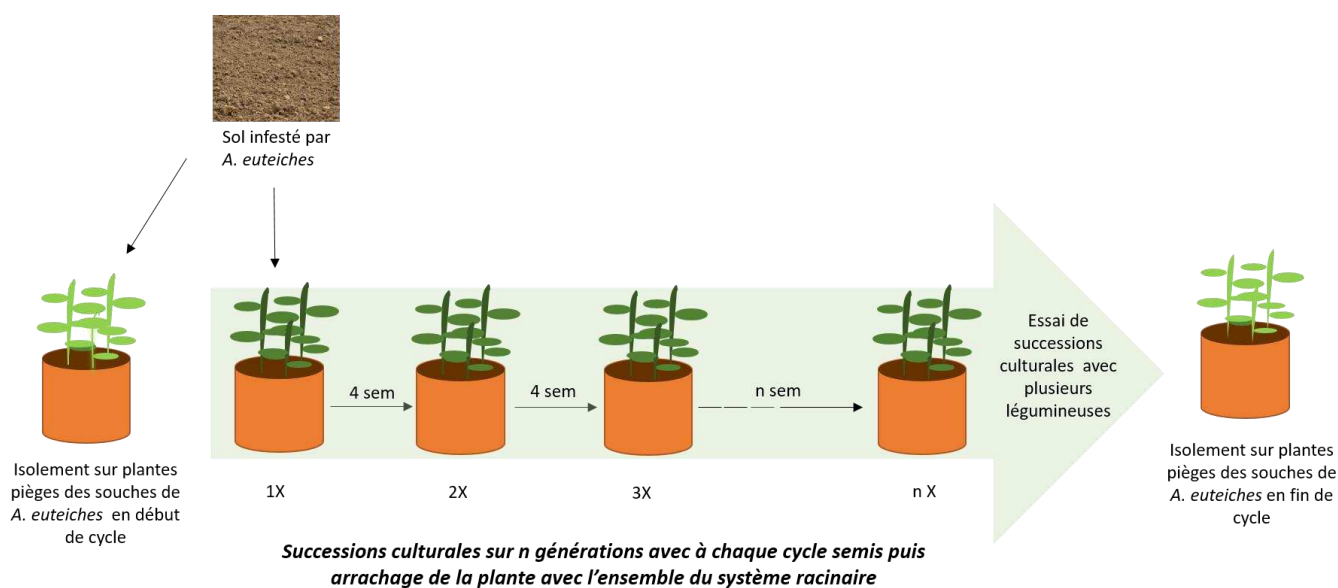


Figure 19 : Schéma de l'évolution expérimentale, adapté de Moussart *et al.*, 2012, pour étudier l'effet des légumineuses sur la sélection des populations naturelles d'*A. euteiches*.

3. La diversité d'agressivité des isolats français vis-à-vis des QTL de résistance, source d'adaptation potentielle des populations d'*A. euteiches* à la résistance partielle

En raison de l'absence de méthodes de lutte efficaces vis-à-vis d'*A. euteiches*, la création de variétés résistantes apparaît comme étant une solution efficace et durable pour cultiver le pois protéagineux et d'autres légumineuses dans les assolements. Les travaux engagés dans le groupe légumineuses de l'UMR IGEPP depuis 2000 ont permis d'identifier des régions du génome contrôlant la résistance partielle chez le pois (Hamon *et al.*, 2013; Desgroux *et al.*, 2016). Préserver la durabilité de ces résistances est un enjeu majeur dans un contexte d'urgence à augmenter l'autonomie protéique de l'Europe et l'introduction des légumineuses, spécialement le pois, dans les rotations culturales. L'évaluation du niveau d'agressivité des populations d'*A. euteiches* vis-à-vis des QTL résistance est donc une étape primordiale afin d'anticiper au mieux l'efficacité de la résistance partielle conférée par ces QTL lorsque les premières variétés les intégrant seront cultivées à large échelle. Nos travaux de recherche ont ainsi mis en avant une variabilité de l'agressivité des isolats français vis-à-vis de différentes combinaisons de QTL de résistance intégrés dans des NILs (Lavaud *et al.*, 2015) dont les génomes ne diffèrent que par ces QTL (Quillévéré-Hamard *et al.*, 2021). Les résultats obtenus ont permis d'établir un état de référence du niveau d'agressivité des populations d'*A. euteiches* vis-à-vis des QTL de résistance qui sont aujourd'hui déployés dans de nouvelles variétés de pois. La mise en évidence d'isolats présentant un niveau d'agressivité élevé vis-à-vis de différents QTL de résistance, y compris du QTL de résistance à effet majeur *Ae-Ps7.6*, amène à avancer l'hypothèse qu'une érosion de la résistance partielle serait possible par sélection directionnelle des isolats les plus agressifs et par augmentation de la taille de la population de

ces individus *via* la reproduction clonale et la survie des oospores dans le sol. Néanmoins, nos résultats ont montré que les lignées de pois cumulant plusieurs QTL présentaient un spectre accru d'efficacité de la résistance partielle du pois vis-à-vis des isolats testés, bien qu'aucune corrélation entre l'efficacité de la combinaison de QTL et le nombre de QTL combinés n'ait été mis en évidence dans notre étude. Ceci peut s'expliquer par des différences d'effets additifs des QTL, les lignées ayant intégré l'allèle à effet le plus fort (issue de la source 90-2131) au QTL à effet majeur *Ae-Ps7.6*, étant plus résistantes vis-à-vis davantage d'isolats, quel que soit le nombre d'autres QTL introduits. Cela peut également s'expliquer par la présence d'effets épistatiques potentiels des QTL. Le témoin très résistant, ayant été caractérisé comme cumulant des allèles favorables à une dizaine de locus de résistance (Desgroux *et al.*, 2016), a montré une résistance efficace vis-à-vis de tous les isolats testés dans cette étude. Ce résultat conforte l'intérêt de la stratégie de pyramidage de QTL pour augmenter durablement les niveaux de résistance dans les variétés. Pour assurer une efficacité durable de la résistance partielle, il semble également nécessaire d'acquérir des connaissances sur la prévalence des isolats à forte agressivité dans les populations naturelles ainsi que sur la taille de ces populations. Cette étude nécessiterait donc un échantillonnage plus conséquent à l'échelle nationale.

En complément des travaux menés par Lavaud *et al.* (2016) concernant l'effet des QTL sur les étapes précoces du cycle de développement de la maladie, il conviendrait également de connaître la diversité de mode d'action des QTL sur des traits d'histoire de vie (THV) clés des populations pathogènes tel que leur capacité de multiplication, et sur leur fitness. En outre, des travaux préliminaires sur les THV ont permis de montrer des effets contrastés des exsudats racinaires de différentes légumineuses sur la germination des oospores (Billard *et al.*, 2019). En s'appuyant sur la méthodologie développée dans cette étude, il serait intéressant d'étudier d'une part l'effet des QTL seuls ou combinés sur la production d'oospores de plusieurs isolats d'agressivités différentes et d'autre part l'effet des exsudats racinaires des différentes lignées sur la germination des oospores et la mobilité des zoospores de ces isolats, deux étapes clés du cycle du pathogène. L'étude de la diversité des populations d'*A. euteiches* pour les THV clés de l'agent pathogène en relation avec leur niveau d'agressivité vis-à-vis des QTL de résistance, permettrait d'anticiper des stratégies de combinaison des QTL pour limiter le risque d'érosion de la résistance partielle.

Afin d'étudier la durabilité potentielle de la résistance partielle, j'ai été également amenée à expérimenter à INRAE des tests de successions culturales accélérées de monocultures de NILs en conditions contrôlées contaminées par *A. euteiches*. Pour cela, les lignées ont été semées dans un substrat inerte préalablement inoculé avec une solution d'oospores. Pour les cycles suivants, l'ensemble du système racinaire a servi d'inoculum par ré-enfouissement des racines dans un nouveau substrat avant semis des lignées. Cette méthodologie s'est avérée inadaptée pour mesurer la durabilité des résistances en raison d'une pression d'inoculum trop forte conduisant à une érosion de la résistance partielle du pois dès les premiers cycles de monoculture. Ces premiers essais infructueux, nous ont conduit à mettre en place un dispositif pluriannuel (2016 à 2023) *in natura* de successions culturales de NILs de pois porteuses de QTL, cultivées en monocultures ou en alternance avec de la féverole résistante, sur une parcelle naturellement contaminée par *A. euteiches* au champ à Bignan (Morbihan) (**Figure 20**).

L'objectif de cet essai est d'étudier l'effet de la combinaison de QTL dans les NILs et de l'alternance avec la féverole sur i) l'évolution de la quantité d'inoculum dans le sol et ii) l'évolution du niveau d'agressivité des isolats sur 8 ans. Les résultats des travaux sur l'évaluation des isolats français d'*A. euteiches* vis-à-vis des NILs n'étant pas disponibles au moment de la mise en place de cette étude, le choix des lignées s'est orienté en prenant en compte les résultats obtenus par Lavaud *et al.*, 2015 en conditions contrôlées et au champ. Ainsi, les lignées avec la nomenclature NIL5-5.1/7.6b (NIL A), NIL14-2.2/3.1/7.6a (NIL B) du chapitre 2 ont été utilisées dans cet essai de successions culturales au champ, ainsi qu'un mélange 50 : 50 de la NIL A et la NIL B. La lignée AeD990SW45-8-7 a été utilisée comme témoin résistant et la variété Solara comme témoin sensible. Un témoin NIL 0 sur fond génétique Isard sans QTL a été ajouté à l'essai. En complément, deux monocultures de variétés de féverole sensible (Barraca) et résistante (Hiverna) ont été implantées. La notation du potentiel infectieux (PI) du sol chaque année entre 2016 et 2019 dans les 48 micro-parcelles a mis en avant l'intérêt de l'alternance pois-féverole pour limiter l'évolution croissante du PI. En outre, i) la féverole (sensible et résistante) a montré une efficacité accrue pour limiter l'augmentation du PI du sol par rapport au pois et ii) la NIL A s'est montrée plus efficace que la NIL B pour limiter l'augmentation du PI du sol au cours des quatre années de tests (Leprévost, 2019). Ces résultats restent à confirmer sur les années supplémentaires, mais ceux obtenus avec les lignées de pois peuvent être mis en cohérence avec ceux du chapitre 2 de ma thèse pour lesquels nous avons vu que la NIL A présentait un spectre d'action plus efficace vis-à-vis d'*A. euteiches* que la NIL B. L'efficacité accrue de la féverole sensible par rapport au pois partiellement résistant sur l'évolution du PI du sol soulève l'hypothèse évoquée dans la partie 2 de cette discussion sur le rôle sélectif de l'hôte vis-à-vis des isolats d'*A. euteiches*. L'étude de l'évolution de l'agressivité des isolats issus de monoculture de la NIL A entre l'année 2016 et l'année 2019 a été réalisée sur 5 géotypes de pois, *i.e* AeD990SW45-8-7, NIL 0, NIL A, NIL B et la NIL C correspondant à la NIL5-7 .6b du chapitre 2 de ma thèse. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la fréquence d'isolats plus agressifs entre 2016 et 2019 sur l'ensemble des géotypes, avec un classement des géotypes de pois des plus résistants au plus sensibles correspondant à AeD990SW45-8-7, NIL C, NIL A, NIL B et NIL 0 (Leprévost, 2019). Ce classement des géotypes est cohérent avec les résultats que j'ai obtenus dans le chapitre 2 de ma thèse, qui ont mis en l'avant l'efficacité du QTL à effet majeur *AePs7.6* seul vis-à-vis d'une large gamme d'isolats d'*A. euteiches* et l'intérêt du cumul d'allèles de résistance tel que dans la lignée AeD990SW45-8-7 pour obtenir une efficacité accrue de la résistance partielle. Ces résultats renforcent également l'hypothèse soulevée dans mon étude sur le risque d'érosion de la résistance partielle par une sélection directionnelle récurrente des isolats les plus agressifs.

Grâce à l'ensemble de ces travaux, nous avons pu dresser l'hypothèse d'un risque potentiel d'érosion des QTL de résistance chez le pois, par une augmentation progressive de la fréquence d'isolats plus agressifs dans les populations naturelles d'*A. euteiches*, par sélection directionnelle récurrente. Le potentiel d'augmentation du niveau d'agressivité des populations d'*A. euteiches* en réponse aux pressions sélectives de l'hôte pourrait néanmoins être limité par les coûts potentiels de sa fitness associés à l'adaptation à la résistance partielle et impacter ainsi différents traits phénotypiques tels que sa capacité à survivre ou à produire des descendants. Le coût de fitness des agents pathogènes associé à l'érosion des résistances quantitatives reste

encore peu étudié aujourd’hui bien que quelques études aient été conduites en conditions contrôlées notamment sur l’interaction entre le PVY et le piment (Montarry *et al.*, 2012) ou encore entre l’oomycète *Plasmopara viticola* et la vigne (Delmas *et al.*, 2016). Dans notre étude, il serait intéressant de caractériser les THV d’isolats issus de populations d’*A. euteiches* sous pression de sélection par des QTL de résistance dans des NILs, afin de tester les trade-off éventuels entre le gain d’agressivité et les principaux traits d’*A. euteiches* nécessaires à sa survie. Ainsi, plusieurs mesures de traits phénotypiques tels que la période de latence, le niveau de sporulation (Billard *et al.*, 2019) ou la taille des spores pourraient être étudiés sur les isolats d’*A. euteiches* collectés dans les micro-parcelles entre 2016 et 2019. De telles études constitueraient une étape clé vers la conception de stratégies efficaces pour la gestion durable des résistances partielles.

La caractérisation des zones génétiques sous sélection sur le génome d’*A. euteiches* responsables de l’adaptation des populations à la résistance partielle permettrait de rechercher des mécanismes de défense chez la plante qui cibleraient les facteurs génétiques dans ces zones sous sélection, et ainsi développer des stratégies pour préserver l’effet de la résistance partielle du pois. L’approche de scan génomique est aujourd’hui largement utilisée pour détecter les signatures laissées par la sélection dans le génome pour *in fine* identifier les gènes impliqués dans les interactions. Elle pourrait être développée à partir des populations d’*A. euteiches* isolées de successions choisies en 2016 et en 2023, afin d’identifier les régions génomiques d’*A. euteiches* sous sélection par les QTL de résistance. Plusieurs facteurs de pathogénicité, i.e des « core proteases » ont été identifiés, et constitueraient de bon gènes candidats aux régions du génome identifiées sous sélection (Kiselev *et al.*, 2022).

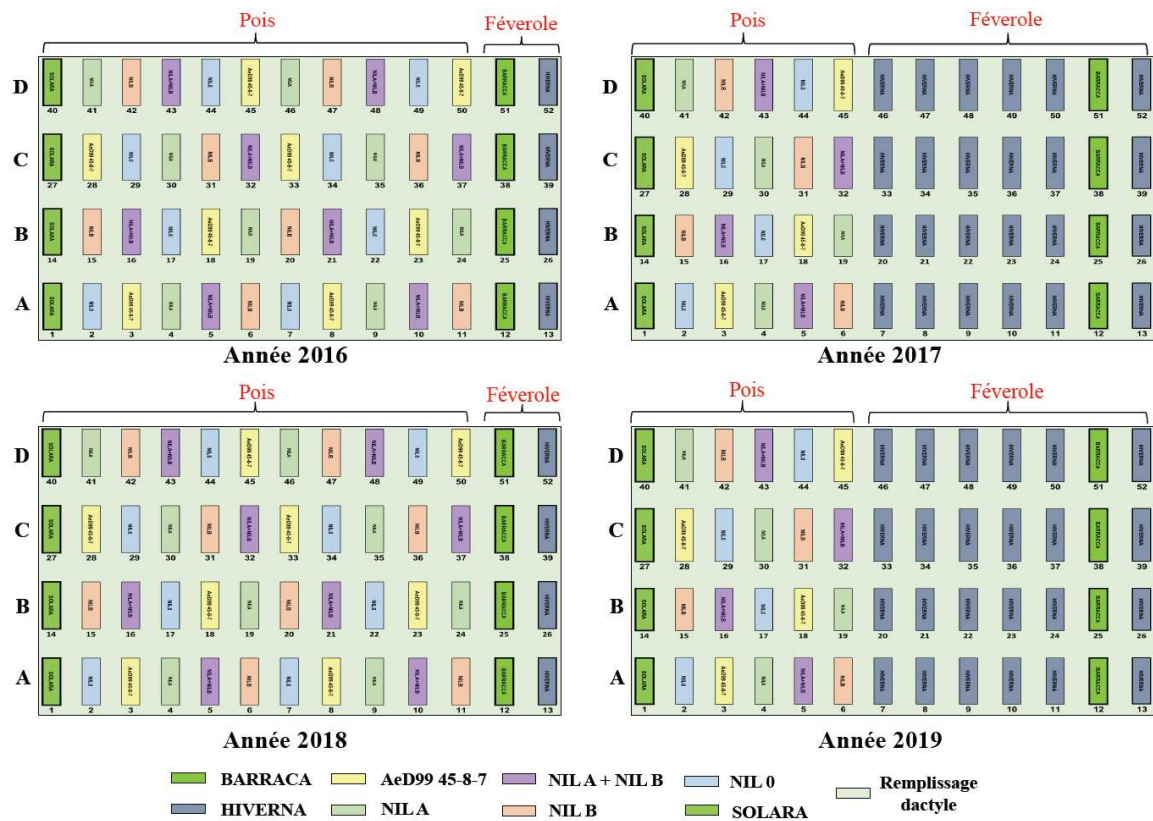


Figure 20 : Dispositif de l'essai d'évolution expérimentale au champ de 2016 à 2019. Organisation parcellaire des différentes modalités de génotype (Pois : AeD990SW45-8-7, NIL 0, NIL A, NIL A + NIL B, NIL B, Solara ; Féverole : Barraca, Hiverna) en fonction de l'année (2016, 2017, 2018, 2019) du bloc (A, B, C, D) et du système de culture (monoculture pois ; alternance pois-féverole). Les différents sols sont numérotés de 1 à 52 (Leprévost, 2019).

Conclusion

Ce travail de thèse a permis d'apporter des connaissances sur le niveau de diversité des populations d'*A. euteiches* responsable de la pourriture racinaire précoce en France ainsi que sur le comportement de lignées quasi-isogéniques de pois porteuses de QTL de résistance vis-à-vis de ces populations. Nous avons vu au cours de ces travaux de recherche que la diversité des populations d'*A. euteiches* en France est relativement faible comparé aux résultats des travaux précédents mais que ces populations présentent une variabilité de niveau d'agressivité pouvant être source de risque d'érosion de la résistance partielle des futures variétés résistantes de pois par sélection des populations d'*A. euteiches* les plus agressives. Nous avons également émis l'hypothèse du rôle de la diversité des légumineuses hôtes sur la structuration des populations de l'agent pathogène. Les avancées majeures des connaissances en génomique d'*A. euteiches* depuis la réalisation de ces travaux, couplées aux résultats et ressources acquises à l'IGEPP sur ce pathosystème (collections d'isolats d'*A. euteiches*/de NILs de pois, méthodologie de tests), ouvrent de nouvelles perspectives pour approfondir l'étude de la diversité génomique et de l'adaptation des populations de l'agent pathogène aux QTL de résistance. Les connaissances apportées par ce travail ouvrent également de nouvelles perspectives pour évaluer le rôle des QTL de résistance chez le pois et des différents hôtes de légumineuses cultivés, comme « drivers » de l'évolution des populations de l'agent pathogène tellurique, via le développement d'approches d'évolution expérimentale pour tester l'effet de la sélection comme force évolutive.

Références bibliographiques

A

- Acevedo-Garcia J, Kusch S, Panstruga R, 2014. Magical mystery tour : MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* **204**, 273–281.
- Agrios GN, 2005. Plant Pathology. San Diego:Fifth Edition/ Ed. Academic Press.
- Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA, 2018. *Rhizoctonia solani* : taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology* **67**, 3–17.
- Albayrak ÇB, Islam MT, Rahman MM, Pandey P, Boehme MH, Haesaert G, 2019. Bacillus species as biocontrol agents for fungal plant pathogens. Eds. *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol: Volume 2*. Springer International Publishing, 239–265.
- Ali S, Rodriguez-Algaba J, Thach T *et al.*, 2017. Yellow rust epidemics worldwide were caused by pathogen races from divergent genetic lineages. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1057.
- Allen RN, Newhook FJ, 1973. Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi* to ethanol in capillaries of soil pore dimensions. *Transactions of the British Mycological Society* **61**, 287-IN12.
- Allmaras R, Fritz VA, Pflieger FL, Copeland SM, 2003. Impaired internal drainage and *Aphanomyces euteiches* root rot of pea caused by soil compaction in a fine-textured soil. *Soil and Tillage Research* **70**, 41–52.
- Almeida RPP, 2016. Can Apulia’s olive trees be saved? *Science* **353**, 346–348.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 535–544.
- Asare EK, Bulani D, LaForge T, Zhang V, 2022. Production strategies management to

minimize root rot disease in field pea grown on infected southwestern Saskatchewan soils. *Journal of Plant Nutrition* , 1–21.

Aylor D, 1999. Biophysical scaling and the passive dispersal of fungus spores: relationship to integrated pest management strategies. *Agricultural and Forest Meteorology* **97**, 275–292.

B

Barbary A, Djian-Caporalino C, Marteu N *et al.*, 2016. Plant genetic background increasing the efficiency and durability of major resistance genes to root-knot nematodes can be resolved into a few resistance QTLs. *Frontiers in Plant Science* **7**.

Barbary A, Palloix A, Fazari A, Marteu N, Castagnone-Sereno P, Djian-Caporalino C, 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes Me1 and Me3. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 499–507.

Bazghaleh N, Prashar P, Woo S, Vandenberg A, 2020. Effects of lentil genotype on the colonization of beneficial trichoderma species and biocontrol of Aphanomyces Root Rot. *Microorganisms* **8**, 1290.

Billard E, Quillévéré-Hamard A, Lavaud C, Pilet-Nayel ML, Le May C, 2019. Testing of life history traits of a soilborne pathogen in vitro: do characteristics of oospores change according the strains of *Aphanomyces euteiches* and the host plant infected by the pathogen? *Journal of Phytopathology* **167**, 313–320.

Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF, 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* **9**, 563–575.

Bousset L, Chèvre AM, 2012. Controlling cyclic epidemics on the crops of the agroecosystems: articulate all the Dimensions in the formalisation, but look for a local solution. *Journal of Botany* **2012**, 1–9.

Brown JKM, 2015. Durable resistance of crops to disease: a darwinian perspective. *Annual*

Review of Phytopathology **53**, 513–539.

Brown JKM, Tellier A, 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 345–367.

Brun H, Chèvre A, Fitt BD *et al.*, 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**, 285–299.

Burnett VF, Coventry DR, Hirth JR, Greenhalgh FC, 1994. Subterranean clover decline in permanent pastures in north-eastern Victoria. *Plant and Soil* **164**, 231–241.

Butzler TM, Bailey J, Beute MK, 1998. Integrated management of sclerotinia blight in peanut: utilizing canopy morphology, mechanical pruning, and fungicide timing. *Plant Disease* **82**, 1312–1318.

C

Caffarra A, Rinaldi M, Eccel E, Rossi V, Pertot I, 2012. Modelling the impact of climate change on the interaction between grapevine and its pests and pathogens: European grapevine moth and powdery mildew. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **148**, 89–101.

Caffier V, Lasserre-Zuber P, Giraud M *et al.*, 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 481–489.

Caffier V, Le Cam B, Al Rifaï M *et al.*, 2016. Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus. *Infection, Genetics and Evolution* **44**, 541–548.

Camborde L, Kiselev A, Pel MJC *et al.*, 2022. An oomycete effector targets a plant RNA helicase involved in root development and defense. *New Phytologist* **233**, 2232–2248.

Carrouée BB, Schneider AA, Flénet FF, Jeuffroy M-HM-H, Nemecek TT, 2012. Introduction du pois protéagineux dans des rotations à base de céréales à paille et colza : impacts sur

- les performances économiques et environnementales. *Innovations Agronomiques* **25**, 125–142.
- Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Wajnberg E, 2007. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evolutionary Ecology* **21**, 259–270.
- Chang KF, Ahmed HU, Hwang SF *et al.*, 2007. Impact of cultivar, row spacing and seeding rate on ascochyta blight severity and yield of chickpea. *Canadian Journal of Plant Science* **87**, 395–403.
- Chen CQ, Huang LL, Buchenauer H, Zhao HY, Zuo YH, Kang ZS, 2009. Diversity among single zoospore isolates derived from single-zoosporangia of *Phytophthora sojae* Kauf. and Gerd. *Journal of Phytopathology* **157**, 181–187.
- Corre-Hellou G, Dibet A, Aveline A, Crozat Y, 2006. Le pois au service des systèmes de culture à faibles intrants : quels besoins variétaux ? *Les dossiers de l'environnement de l'INRA* **30**, 11–116.
- Cowger C, Mundt CC, 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 624–630.
- Crosson P, Moussart A, 2011. Aphanomyces : un test pour cultiver du pois sans crainte. *Perspectives Agricoles* **378**, 68–71.
- Crozat Y, Corre G, Larmure A, 2000. Des pois plus rapides que les mauvaises herbes. *Perspectives Agricoles*, 92.

D

- Deacon JW, Saxena G, 1998. Germination triggers of zoospore cysts of *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora parasitica*. *Mycological Research* **102**, 33–41.
- Delmas CEL, Fabre F, Jolivet J *et al.*, 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew.

Evolutionary Applications **9**, 709–725.

- Delourme R, Bousset L, Ermel M *et al.*, 2014. Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 490–499.
- Delsuc F, Douzery EJP, 2004. Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire: L’approche bayésienne. *Biosystema*, 75–86.
- Delwiche P, Grau C, Holub E, Perry JB, 1987. Characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from alfalfa in Wisconsin. *Plant Disease* **71**.
- Desgroux A, Baudais VN, Aubert V *et al.*, 2018. Comparative genome-wide-association mapping identifies common loci controlling root system architecture and resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2195.
- Desgroux A, L’Anthoëne V, Roux-Duparque M *et al.*, 2016. Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC Genomics* **17**, 124.
- Devran Z, Baysal O, 2012. Genetic characterization of *Meloidogyne incognita* isolates from Turkey using sequence-related amplified polymorphism (SRAP). *Biologia* **67**, 535–539.
- Didelot D, Chaillet I, 1995. Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In: AEP (ed) “2nd European Conference on Grain Legumes-Improving production and utilisation of grain legumes” pp.150; Copenhagen-Denmark.
- Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Fazari A *et al.*, 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 592–600.

E

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from

metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491.

F

Fitzpatrick S, Brummer J, Hudelson B, Malvick D, Grau C, 1998. Standard test: Aphanomyces root rot resistance (Races 1 and 2). North American Alfalfa Improvement Conference.

Flor HH, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–296.

Fones H, Gurr S, 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 3–7.

Fournet S, Kerlan MC, Renault L, Dantec JP, Rouaux C, Montarry J, 2013. Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence: Local adaptation and cross-virulence in *Globodera pallida*. *Plant Pathology* **62**, 184–193.

François O, Durand E, 2010. Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics: Spatial Clustering Models. *Molecular Ecology Resources* **10**, 773–784.

Franken P, Donges K, Grunwald U *et al.*, 2007. Gene expression analysis of arbuscule development and functioning. *Phytochemistry* **68**, 68–74.

French E, Kim B-S, Iyer-Pascuzzi AS, 2016. Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **56**, 201–208.

Fritz VA, Allmaras RR, Pfleger FL, Davis DW, 1995. Oat residue and soil compaction influences on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas in a fine-textured soil. *Plant and Soil* **171**, 235–244.

G

García-Arenal F, McDonald BA, 2003. An analysis of the durability of resistance to plant

- viruses. *Phytopathology* **93**, 941–952.
- Gaulin E, Jacquet C, Bottin A, Dumas B, 2007. Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology* **8**, 539–548.
- Gaulin E, Madoui MA, Bottin A *et al.*, 2008. Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS ONE* **3**, e1723.
- Gaulin E, Pel MJC, Camborde L *et al.*, 2018. Genomics analysis of *Aphanomyces spp.* identifies a new class of oomycete effector associated with host adaptation. *BMC Biology* **16**, 43.
- Gautier C, Esquibet M, Fournet S *et al.*, 2019. Microsatellite markers reveal two genetic groups in European populations of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae*. *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* **73**, 81–92.
- Gebremedhin B, Ficetola GF, Naderi S *et al.*, 2009. Frontiers in identifying conservation units: from neutral markers to adaptive genetic variation. *Animal Conservation* **12**, 107–109.
- Gibert S, Edel-Hermann V, Moussa Mcolo R *et al.*, 2021. Risk assessment of *Aphanomyces euteiches* root rot disease: quantification of low inoculum densities in field soils using droplet digital PCR. *European Journal of Plant Pathology* **161**, 503–528.
- Godebo, AT, Germida JJ, Walley FL, 2020. Isolation, identification, and assessment of soil bacteria as biocontrol agents of pea root rot caused by *Aphanomyces euteiches*. *Canadian Journal of Soil Science*, 1–11.
- Grabau ZJ, Chen S, 2016. Determining the role of plant–parasitic nematodes in the corn–soybean crop rotation yield effect using nematicide application. *Agronomy Journal* **108**, 782–793.
- Gracianne C, Jan P, Fournet S *et al.*, 2016. Temporal sampling helps unravel the genetic structure of naturally occurring populations of a phytoparasitic nematode. 2. Separating the relative effects of gene flow and genetic drift. *Evolutionary Applications* **9**, 1005–1016.

- Grau CR, Muehlchen AM, Tofte JE, Smith RR, 1991. Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* **75**, 1153–1156.
- Grünwald NJ, Everhart SE, Knaus BJ, Kamvar ZN, 2017. Best practices for population genetic analyses. *Phytopathology* **107**, 1000–1010.
- Grünwald NJ, Hoheisel GA, 2006. Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **96**, 1134–1141.

H

- Hagedorn DJ, 1991. Handbook of Pea Diseases. Produced by Cooperation Extension Publication, University of Wisconsin Extension.
- Hamon C, 2010. Variabilité structurale des déterminants génétiques de la résistance à *Aphanomyces euteiches* chez le pois (*Pisum sativum* L.) et l'espèce légumineuse modèle *Medicago Truncatula*. Thèse de doctorat. Université de Rennes I, Rennes.
- Hamon C, Baranger A, Coyne C *et al.*, 2011. New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and applied genetics* **123**, 261–81.
- Hamon C, Coyne CJ, McGee RJ *et al.*, 2013. QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biology* **13**, 45.
- Heath MC, 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 315–319.
- Heyman F, Lindahl B, Persson L, Wikström M, Stenlid J, 2007. Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 2222–2229.
- Hoffmann AA, Willi Y, 2008. Detecting genetic responses to environmental change. *Nature*

Reviews Genetics **9**, 421–432.

Holderegger R, Kamm U, Gugerli F, 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology* **21**, 797–807.

Holsinger KE, Weir BS, 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* **10**, 639–650.

Hossard L, Lannou C, Papaix J *et al.*, 2010. Quel déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques pour accroître la durabilité des résistances variétales ? *Innovations Agronomiques* **8**, 15–33.

Hovmøller MS, Sørensen CK, Walter S, Justesen AF, 2011. Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 197–217.

Hu W, Strom N, Haarith D, Chen S, Bushley KE, 2018. Mycobiome of cysts of the soybean cyst nematode under long-term crop rotation. *Frontiers in Microbiology* **9**, 386.

Huang YJ, Jestin C, Welham SJ *et al.*, 2016. Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics* **129**, 169–180.

Hughes TJ, Grau CR, 2007. Aphanomyces root rot or common root rot of legumes. *American Phytopathological Society*.

I

Iberahim NA, Trusch F, Van West P, 2018. *Aphanomyces invadans*, the causal agent of epizootic Ulcerative Syndrome, is a global threat to wild and farmed fish. *Fungal Biology Reviews* **32**, 118–130.

J

Johnson R, 1984. A Critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**, 309–330.

Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.

Jones FR, Drechsler C, 1925. Root Rot of Peas in the United States Caused by *Aphanomyces euteiches* (n.sp.). *Journal of Agricultural Research* **30**, 293-325.

K

Kälin C, Berlin A, Kolodinska Brantestam A *et al.*, 2022. Genetic diversity of the pea root pathogen *Aphanomyces euteiches* in Europe. *Plant Pathology*.

Katan J, 2017. Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology*, 12.

Kirk H, Freeland JR, 2011. Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 3966–3988.

Kiselev A, San Clemente H, Camborde L, Dumas B, Gaulin E, 2022. A comprehensive assessment of the secretome responsible for host Adaptation of the legume root pathogen *Aphanomyces euteiches*. *Journal of Fungi* **8**, 88.

Kourelis J, Van Der Hoorn RAL, 2018. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell* **30**, 285–299.

L

Labrousse F, 1933. Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'entomologie agricole* **19**.

Lamari L, Bernier CC, 1985. Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 139–145.

Lannou C, 2012. Variation and Selection of Quantitative Traits in Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–338.

Lavaud C, Baviere M, Le Roy G *et al.*, 2016. Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in

- pea near isogenic lines. *BMC Plant Biology* **16**, 166.
- Lavaud C, Lesné A, Piriou C *et al.*, 2015. Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics* **128**, 2273–2288.
- Le May C, Onfroy C, Moussart A *et al.*, 2018. Genetic structure of *Aphanomyces euteiches* populations sampled from United States and France pea nurseries. *European Journal of Plant Pathology* **150**, 275–286.
- Lee S, Whitaker VM, Hutton SF, 2016. Mini Review: Potential applications of non-host resistance for crop improvement. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Lejeune-Hénaut I, Hanocq E, Béthencourt L *et al.*, 2008. The flowering locus Hr colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 1105–1116.
- Léonard KJ, 1969. Factors effecting rates of stem rust increase in mixed plantings of susceptible and resistant oat varieties. *Phytopathology* **59**, 1845–1850.
- Leprévost T, 2019. Impact des sources de résistance variétale sur l'évolution du pouvoir pathogène des populations d'*Aphanomyces euteiches* dans des successions culturales de légumineuses. Ingénieur Agronome, option Inter-Etablissement Protection des Plantes et Environnement. Agrocampus-Ouest. 25pp
- Levenfors JP, Wikstrom M, Persson L, Gerhardson B, 2003. Pathogenicity of *Aphanomyces* spp. from different leguminous crops in Sweden. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 535–543.
- Lucas JA, 1998. Plant Pathology and Plant Pathogens. 3rd Blackwell, Science.

M

- Malcolm GM, Kuldau GA, Gugino BK, Jiménez-Gasco M, 2013. Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: an ecological perspective. *Phytopathology*

103, 538–544.

- Malvick DK, Grau CR, 2001. Characteristics and frequency of *Aphanomyces euteiches* races 1 and 2 associated with alfalfa in the midwestern United States. *Plant Disease* **85**, 740–744.
- Malvick DK, Grau CR, Percich JA, 1998. Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity tests and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycological Research* **102**, 465–475.
- Malvick DK, Grünwald NJ, Dyer AT, 2009. Population structure, races, and host range of *Aphanomyces euteiches* from alfalfa production fields in the central USA. *European Journal of Plant Pathology* **123**, 171–182.
- Malvick DK, Percich JA, 1998. Genotypic and pathogenic diversity among pea infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from the central and western United States. *Phytopathology* **88**, 915–921.
- Malvick DK, Percich JA, Pflieger FL, Givens J, Williams JL, 1994. Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Plant Disease* **78**, 361–365.
- McDonald BA, 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* **87**, 448–453.
- McDonald B, 2010. How can we achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems? *New Phytologist* **185**, 3–5.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.
- McGee RJ, Coyne CJ, Pilet-Nayel ML *et al.*, 2012. Registration of pea germplasm lines partially resistant to *Aphanomyces* root rot for breeding fresh or freezer pea and dry pea types. *Journal of Plant Registrations* **6**, 203–207.

- Michelmore RW, Christopoulou M, Caldwell KS, 2013. Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 291–319.
- Mieuzet L, Quillévéré A, Pilet ML, Le May C, 2016. Development and characterization of microsatellite markers for the oomyceta *Aphanomyces euteiches*. *Fungal Genetics and Biology* **91**, 1–5.
- Mikaberidze A, McDonald BA, Bonhoeffer S, 2015. Developing smarter host mixtures to control plant disease. *Plant Pathology* **64**, 996–1004.
- Milgroom MG, Peever TL, 2003. Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* **87**, 608–617.
- Montarry J, Andrivon D, Glais I, Corbiere R, Mialdea G, Delmotte F, 2010. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* **19**, 1965–1977.
- Montarry J, Cartier E, Jacquemond M, Palloix A, Moury B, 2012. Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 2242–2252.
- Moreno-Ruiz G, Castillo-Zapata J, 1990. The variety Colombia: A variety of coffee with resistance to rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). *Colombia Technical Bulletin* **9**, 1–27.
- Moussart A, Even MN, Baranger A, 2016. Effect of pea sowing date on *Aphanomyces* root rot development and yield losses. International Legume Society Congress, Lisbon, Portugal, October 10 - 14th.
- Moussart A, Even MN, Lesné A, Tivoli B, 2013. Successive legumes tested in a greenhouse crop rotation experiment modify the inoculum potential of soils naturally infested by

Aphanomyces euteiches. *Plant Pathology* **62**, 545–551.

Moussart A, Even MN, Pilet-Nayel ML, Baranger A, 2017. Agricultural practices to prevent and reduce *Aphanomyces* root rot epidemics and damages on the pea crop in France.

7th International Legume Root Diseases workshop, East Lansing, November 1st.

Moussart A, Even MN, Tivoli B, 2008a. Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 321–333.

Moussart A, Pilet-Nayel ML, Baranger A, 2018. Gestion du risque *Aphanomyces* sur pois. 12e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Association Française de Protection des Plantes, Tours, France, 10-12 décembre.

Moussart A, Wicker E, Le Delliou B *et al.*, 2008b. Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field. *European Journal of Plant Pathology* **123**, 153–158.

Mundt CC, 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 381–410.

Mundt CC, 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 446–455.

Mundt CC, 2018. Pyramiding for resistance durability: theory and practice. *Phytopathology* **108**, 792–802.

Mundt CC, Browning JA, 1985. Development of crown rust epidemics in genetically diverse oat populations: effect of genotype unit area. *Phytopathology* **75**, 607.

N

Nagarajan S, Singh DV, 1990. Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 139–153.

Nandi S, Hembaram S, Adhikari A, Tiwari BK, Dutta S, 2017. Host infection beyond the

traditional range of *Sclerotium (Athelia) rolfsii* with *Physalis minima*. *Biomedical Informatics* **13**, 333–338.

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**, 3321–3323.

Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wisser R, Balint-Kurti P, 2018. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics* **19**, 21–33.

Niks RE, Qi X, Marcel TC, 2015. Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annual Review of Phytopathology* **53**, 445–470.

O

Olofsson J, 1967. Root rot of canning and freezing peas in Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica* **17**, 101–107.

Oyarzun P, Gerlagh M, Hoogland AE, 1993. Pathogenic fungi involved in root rot of peas in the Netherlands and their physiological specialization. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99**, 23–33.

P

Palloix A, Ayme V, Moury B, 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**, 190–199.

Papavizas GC, Ayers WA (Eds.), 1974. “*Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet”, U.S. Department of Agricultural Research Technical Bulletin 1485, pp. 1-157.

Parke JL, Rand RE, Joy AE, King EB, 1991. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P.fluorescens*

- to seed. *Plant Disease* **75**, 987–992.
- Parlevliet JE, 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* **17**, 203–222.
- Parlevliet JE, 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* **124**, 147–156.
- Persoons A, Morin E, Delaruelle C *et al.*, 2014. Patterns of genomic variation in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* identify pathogenesis-related factors. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Persson L, Olsson S, 2000. Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1141–1150.
- Petersen AB, Rosendahl S, 2000. Phylogeny of the *Peronosporomycetes* (*Oomycota*) based on partial sequences of the large ribosomal subunit (LSU rDNA). *Mycological Research* **104**, 1295–1303.
- Pfender WF, Alderman SC, 2003. Evaluation of postharvest burning and fungicides to reduce the polyetic rate of increase of choke disease in Orchardgrass seed production. *Plant Disease* **87**, 375–379.
- Pfender WF, Hagedorn DJ, 1983. Disease progress and yield loss in *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytopathology* **73**, 1109–1113.
- Pilet-Nayel ML, Coyne CJ, Hamon C *et al.*, 2007. Understanding genetics of partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea for new breeding prospects. In “3d International Workshop on *Aphanomyces* in Legumes”, Rennes, France, 7-9 novembre.
- Pilet-Nayel ML, Moury B, Caffier V *et al.*, 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1838.
- Pilet-Nayel ML, Muehlbauer F, Mcgee R, Kraft J, Baranger A, Coyne C, 2002. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and applied*

genetics **106**, 28–39.

Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ, 2005. Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology* **95**, 1287–1293.

Plantegenest M, Le May C, Fabre F, 2007. Landscape epidemiology of plant diseases. *Journal of the Royal Society Interface* **4**, 963–972.

Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ, 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**, 21–29.

Powell W, Morgante M, Andre C *et al.*, 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**, 225–238.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.

Q

Quenouille J, Montarry J, Palloix A, Moury B, 2013. Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown: Mechanisms of polygenic resistance durability. *Molecular Plant Pathology* **14**, 109–118.

Quillévéré-Hamard A, Le Roy G, Lesné A, Le May C, Pilet-Nayel M-L, 2021. Aggressiveness of diverse french *Aphanomyces euteiches* isolates on pea near isogenic lines differing in resistance quantitative trait loci. *Phytopathology* **111**, 695–702.

Quillévéré-Hamard A, Le Roy G, Moussart A *et al.*, 2018. Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1673.

R

Rana A, Sahgal M, Johri BN, 2017. *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host

- interaction. *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*, 159–199.
- Rapilly F, 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes. Editions Quae.
- Rapilly F, 1992. Apports de l'épidémiologie à la connaissance de la résistance des végétaux aux agressions parasitaires. *Cahiers Agricultures* **1**, 239-248.
- REX Consortium, 2016. Combining selective pressures to enhance the durability of disease resistance genes. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Richardson KL, Vales MI, Kling JG, Mundt CC, Hayes PM, 2006. Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 485–495.
- Rumberger A, Marschner P, 2003. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 445–452.

S

- Saponari M, Boscia D, Nigro F, Martelli GP, 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology* **95**.
- 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.
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A, 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* **3**, 430–439.
- Schumann GL, Leonard KJ, 2000. Stem rust of wheat. *The Plant Health Instructor* **58**, 1–12.
- Shang H, Grau CR, Peters RD, 2000. Oospore germination of *Aphanomyces euteiches* in root exudates and on the rhizoplanes of crop plants. *Plant Disease* **84**, 994–998.

- Sherwood B, Hagedorn D, 1962. Studies on the biology of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **52**, 150–154.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J *et al.*, 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat Production. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 465–481.
- Sivachandra Kumar NT, Caudillo-Ruiz KB, Chatterton S, Banniza S, 2021. Characterization of *Aphanomyces euteiches* pathotypes infecting peas in Western Canada. *Plant Disease* **105**, 4025-4030.
- Skendžić S, Zovko M, Živković IP, Lešić V, Lemić D, 2021. The impact of climate change on agricultural insect pests. *Insects* **12**, 440.
- Sood M, Kapoor D, Kumar V *et al.*, 2020. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitaled biocontrol agent. *Plants* **9**, 762.
- Srinivas P, Ramesh Babu S, Sharma M, Narayan Reddy P, Pushpavathi B, 2017. Effect of temperature on *Rhizoctonia bataticola* and dry root rot in chick pea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**, 3349–3355.
- Stokstad E, 2015. Italy’s olives under siege. *Science* **348**, 620–620.
- Stakman E, 1957. Problems in preventing plant disease epidemics. *American Journal of Botany* **44**, 259-267.
- Stukenbrock EH, McDonald BA, 2008. The Origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 75–100.
- Sundheim L, 1972. Physiologic specialization in *Aphanomyces euteiches*. *Physiological Plant Pathology* **2**, 301–306.

T

- Tayeh N, Aluome C, Falque M *et al.*, 2015. Development of two major resources for pea genomics: the GenoPea 13.2K SNP Array and a high-density, high-resolution consensus

- genetic map. *The Plant Journal* **84**, 1257–1273.
- Temp MV, Hagedorn DJ, 1967. Influence of cropping practices on *Aphanomyces* root rot potential of Wisconsin pea fields. *Phytopathology* **57**, 667–670.
- Terauchi R, Yoshida K, 2010. Towards population genomics of effector–effector target interactions. *New Phytologist* **187**, 929–939.
- Tofte JE, Smith RR, 1992. Reaction of red clover to *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* **76**, 39–42.
- Tsvetkova NA, Kotova VV, 1985. Root rots and vetch. *Zashchita Rastenij* **8**, 50–51.

V

- Väli Ü, Einarsson A, Waits L, Ellegren H, 2008. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology* **17**, 3808–3817.
- Van Der Plank JE, 1968. Disease resistance in plants. New York: Academic Press.
- Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E, 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 952.

W

- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358.
- Weller DM, 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* **97**, 250–256.
- Wicker E, 2001. Diversité des populations françaises d'*Aphanomyces euteiches* Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois: variabilité pathogène et moléculaire. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes.

- Wicker E, Hullé M, Rouxel F, 2001. Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology* **50**, 433–442.
- Wicker E, Moussart A, Duparque M, Rouxel F, 2003. Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 47–60.
- Wicker E, Rouxel F, 1998. *Aphanomyces euteiches* on pea in France: receptivity of some soils related to their physical properties. In “3rd European conference on grain legumes Opportunities for high quality, healthy and added value crops to meet European demands”, Spain, 14–19 November, pp 256–257.
- Wicker E, Rouxel F, 2001. Specific behaviour of french *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 919–929.
- Willoquet L, Jumel S, Lemarchand E, 2007. Spatio-temporal development of pea root rot disease through secondary infections during a crop cycle. *Journal of Phytopathology* **155**, 623–632.
- Woolhouse MEJ, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR, 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* **32**, 569–577.
- Wright S, 1943. Isolation by Distance. *Genetics* **28**, 114–138.
- Wright OR, 1969. Summary of research on the selection interview since 1964. *Personnel Psychology* **22**, 391–413.

Z

- Zadoks J, 1999. Reflections on space, time and diversity. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 1–17.
- Zadoks J, Schein R, 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University

Press, New York, 429 pp.

Zhan J, 2009. Population genetics of plant pathogens. *eLS*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

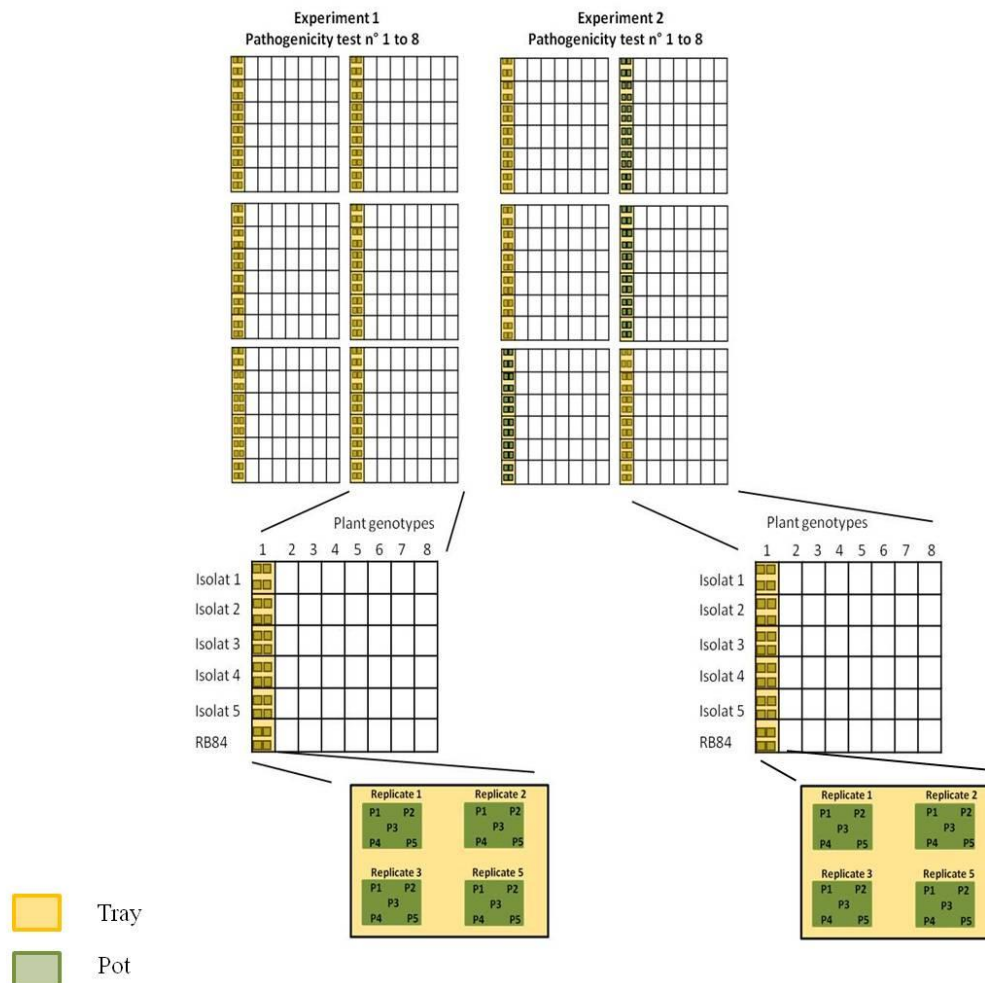
Zhu Y, Chen H, Fan J *et al.*, 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* **406**,718-722.

Annexes



Annexes du chapitre 2 : Etude de la diversité génétique et phénotypique des populations d'*Aphanomyces euteiches*

Additional file 1. Diagram of pathogenicity tests conducted in controlled conditions



Additional file 2. Genotyping profiles of the 205 *A. euteiches* isolates obtained with the 20 SSRs

Population	Ae36	ssraph25	Ae44	Ae34	ssraph27	ssraph35	Ae17	Ae12	ssrap h1	ssrap h16	ssrap h4	ssrap h32	ssrap h76	Ae54	ssrap h9	ssrap h50	ssrap h82	ssrap h20	ssrap h5	Ae37
BI1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
BI2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
BI3	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
BI4	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
BI5	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BI6	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL7	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL8	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL9	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL4	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL5	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL6	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL12	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL13	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL10	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	193/193	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL11	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	193/193	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BL2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	193/193	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160

BR1_13	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1_14	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1_16	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1_5	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1_6	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1_7	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1_8	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1-15	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	164/182	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR1-2	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/168	200/202	207/209	160/160	103/109	154/160
BR1-3	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	164/182	200/202	207/209	160/160	103/109	154/160
BR1-1	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	164/182	200/202	207/209	160/160	103/109	154/160
BR1-9	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	187/191	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
BR1-10	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	107/107	187/191	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
BR1-4	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	107/107	191/193	130/132	129/136	137/141	216/216	157/157	168/182	200/202	209/209	160/160	103/109	154/160
BR2_1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR2_2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR2_3	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR2_4	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
BR3-1	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	164/182	200/202	207/209	160/160	103/109	154/160
BR3-2	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	164/182	200/202	207/209	160/160	103/109	154/160
BR3-3	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
BR3-4	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160

BR3-5	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
BR3-6	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
BR3-7	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
BR3-8	182/182	192/192	158/158	140/140	226/230	122/125	139/146	101/107	191/193	130/132	129/136	137/141	213/216	157/161	168/182	200/202	207/209	160/162	103/109	154/160
CR1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR8	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR9	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR10	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR3	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR4	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR5	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR6	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR7	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR11	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR12	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
CR13	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
ENO_1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
ENO_10	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
ENO_11	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
ENO_12	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
ENO_13	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160

[illegible]

								113/ 113	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	109/ 109	160/ 160
HB1-17	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/ 113	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	109/ 109	160/ 160
HB1-19	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/ 113	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	109/ 109	160/ 160
HB1-2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	191/ 191	130/1 30	129/ 129	13014 1	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	162/1 62	109/ 109	160/ 160
HB1-20	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	191/ 191	130/1 30	129/ 129	13014 1	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	162/1 62	109/ 109	160/ 160
M01	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	106/ 106	157/ 157
MO2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	106/ 106	157/ 157
MO5	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	106/ 106	157/ 157
MO6	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	106/ 106	157/ 157
MO7	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	106/ 106	157/ 157
MO9	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	193/ 193	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	106/ 106	157/ 157
MO1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	191/ 191	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	162/1 62	109/ 109	160/ 160
MO3	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	191/ 191	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	162/1 62	109/ 109	160/ 160
MO4	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	191/ 191	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	162/1 62	109/ 109	160/ 160
NR1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/ 107	191/ 191	130/1 30	129/ 129	141/1 41	216/2 16	157/ 157	168/ 168	200/2 00	209/2 09	160/1 60	109/ 109	160

[illegible]

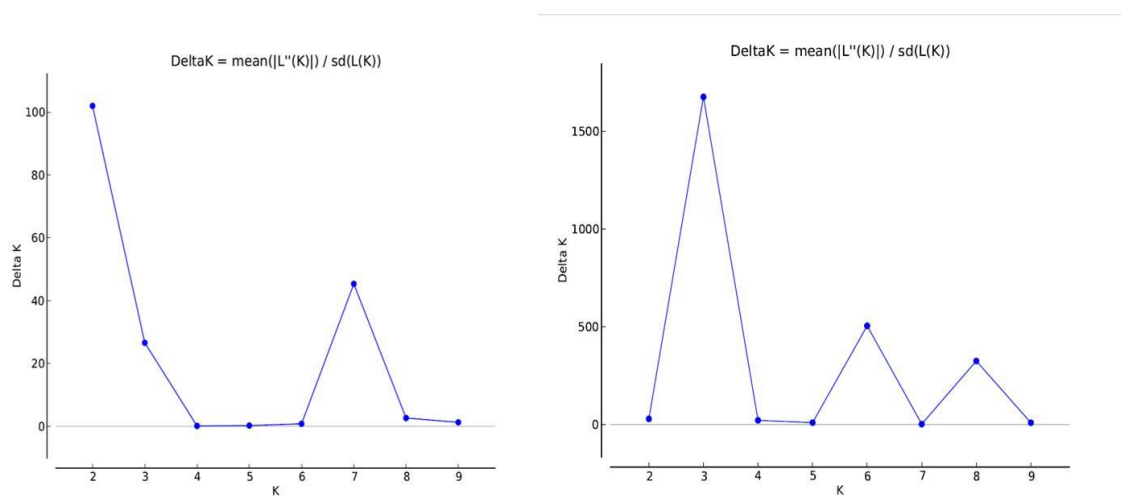
P9	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
P16	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
P2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
P10	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
P1	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	113/113	193/193	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	109/109	160/160
RB84	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	106/106	157/157
RB2	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	106/106	157/157
RB3	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	106/106	157/157
RB4	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	160/160	106/106	157/157
RB6	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160
RB5	182/182	192/192	158/158	137/137	226/226	125/125	146/146	107/107	191/191	130/130	129/129	141/141	216/216	157/157	168/168	200/200	209/209	162/162	109/109	160/160

Additional file 3. Distribution of the 13 multilocus genotypes (MLGs) within and between sites. ^{a, b} The cluster number is indicated according to the Structure analysis with or without Bretenieres populations (Figure 1, Additional file X)

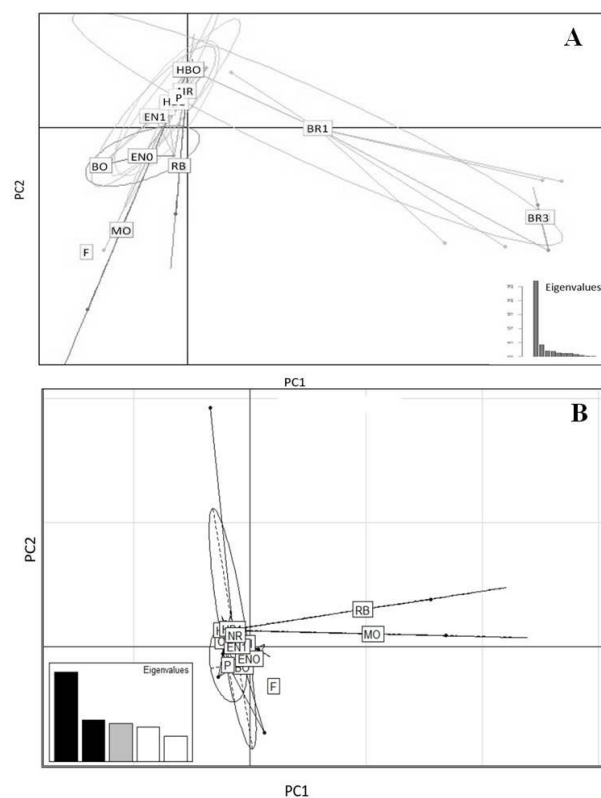
Population code	MLG	n	cluster assignment ^a	cluster assignment ^b
			delta k=100	without Bretenière delta k= 1600
RB	MLG1	2	1	3
	MLG3	4	2	2
BI	MLG1	2	1	3
	MLG4	4	1	2
BRO	MLG1	8	1	-
BR1	MLG1	9	1	-
	MLG2	1	1	-
	MLG10	2	2	-
	MLG11	2	2	-
	MLG12	1	2	-
	MLG13	1	2	-
BR2	MLG1	4	1	-
BR3	MLG10	6	2	-
	MLG11	2	2	-
HBO	MLG1	12	1	3
HB1	MLG1	18	1	3
	MLG9	4	1	2
P	MLG1	15	1	3
	MLG7	4	1	1
	MLG9	1	1	2
F	MLG8	12	1	2
BL	MLG1	9	1	3
	MLG7	4	1	1
ENO	MLG1	1	1	3
	MLG4	10	1	2
	MLG5	1	1	2
	MLG7	9	1	1
EN1	MLG1	4	1	3
	MLG4	1	1	2
	MLG7	3	1	1
NR	MLG1	12	1	3
	MLG4	4	1	2
MO	MLG1	3	1&2	2&3
	MLG6	6	1	2
BO	MLG7	11	1	1
CR	MLG1	13	1	3

Population codes are according to Table 1. MLGs were identified using 20 SSR markers among the 205 French *A. euteiches* isolates of the collection. MLG number (MLG), number of isolates (n) and cluster assignment with all the data and without Bretenière obtained with STRUCTURE.

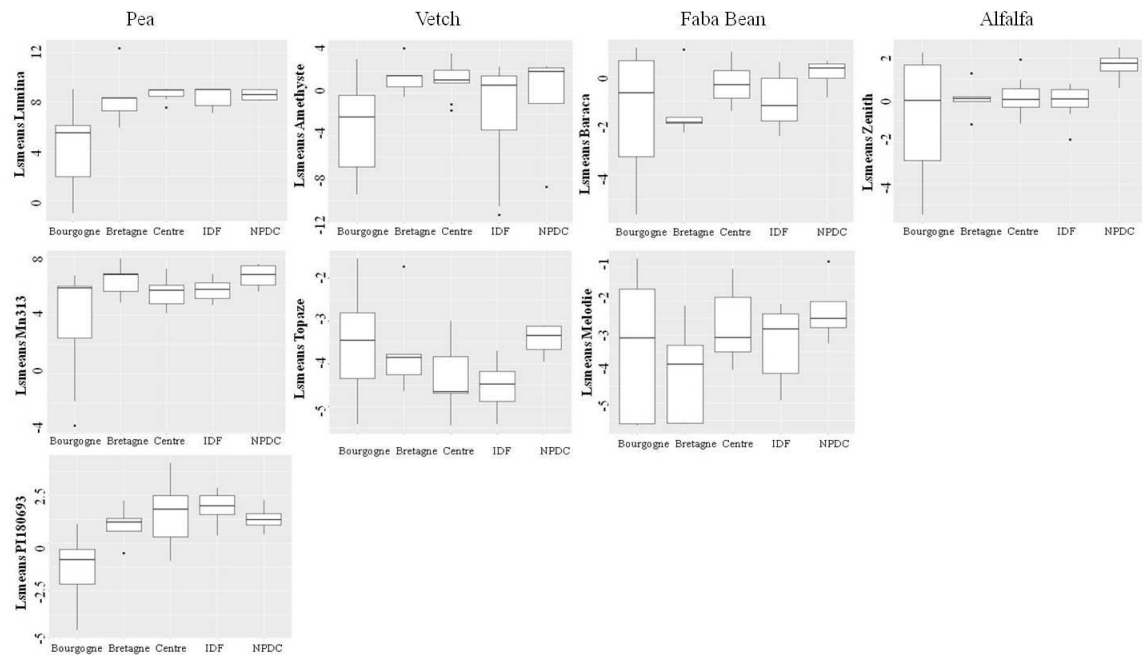
Additional file 4. Results of the Bayesian assignment analysis using STRUCTURE HARVESTER with (A) and without (B) Bourgogne data



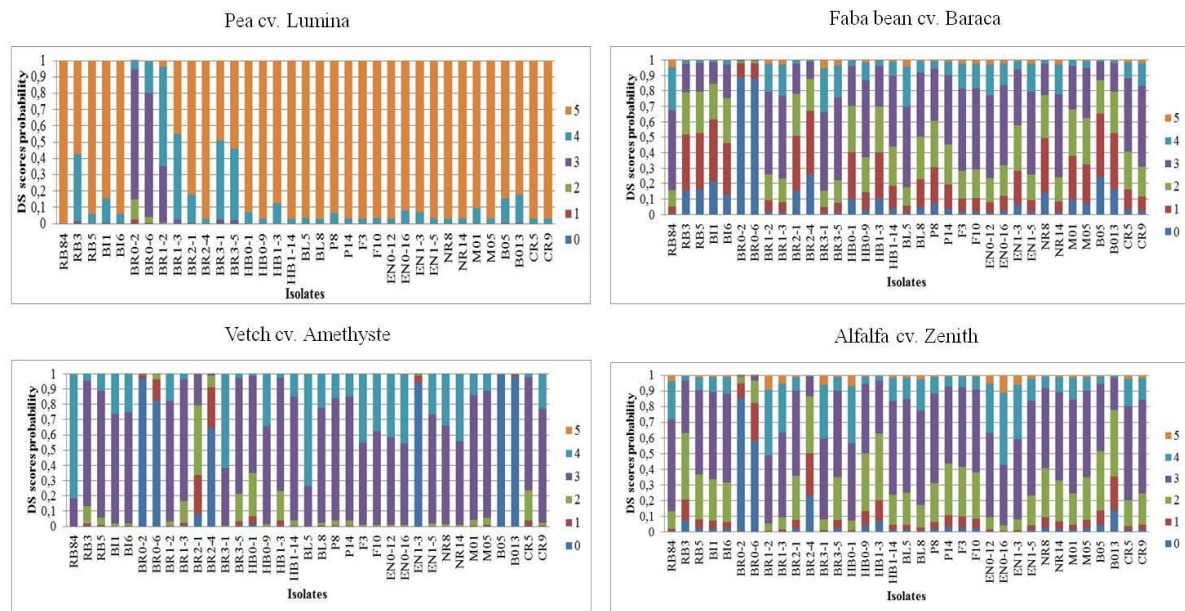
Additional file 5. Discriminant Analysis of Principal Component (DAPC) performed with (A) and without (B) Bourgogne fields. The dots represent individuals. The analysis was carried out with the Adegenet package of the software R version 3.2.2 (Jombart *et al.*, 2018; R Development Core Team 2014)



Additional file 6. Box-plot of LSmean values of Disease Severity (DS) on eight genotypes from four legume species for 34 *A. eteiches* isolates from five French regions. Boxplots show 25% and 75% quartile



Additional file 7. DS scores probability obtained from CLMM analysis for 34 *A. eteiches* isolates on the four susceptible genotypes from the four legume species studied. The color in each bar represent the probabilities of scores “0” (healthy plant) to “5” (dead plant), according to the DS rating scale used.



Additional file 8. LSMeans of disease severity on the three pea genotypes studied in response to inoculation with 34 *A. euteiches* isolates

	Lumina			MN313			PI180693		
	LSM	SD		LSM	SD		LSM	SD	
RB84	10,2669	0,3208	a	6,8845	0,2913	b	3,8372	0,2664	c
RB3	7,4682	0,2693	a	4,0858	0,2562	b	1,0384	0,2363	c
RB5	8,9058	0,2897	a	5,5234	0,2657	b	2,4760	0,2415	c
BI1	8,8760	0,2916	a	5,4936	0,2687	b	2,4463	0,2435	c
BI6	9,7636	0,3112	a	6,3812	0,2848	b	3,3339	0,2593	c
BR0-2	1,3141	0,2090	a	-2,0683	0,2071	b	-5,1157	0,2335	c
BR0-6	3,0008	0,2207	a	-0,3816	0,2162	b	-3,4289	0,2318	c
BR1-2	5,7363	0,2815	a	2,3539	0,2691	b	-0,6934	0,2671	c
BR1-3	7,4651	0,2588	a	4,0827	0,2429	b	1,0353	0,2233	c
BR2-1	8,6981	0,2890	a	5,3157	0,2672	b	2,2683	0,2432	c
BR2-4	9,1746	0,2921	a	5,7922	0,2666	b	2,7449	0,2410	c
BR3-1	6,9682	0,2672	a	3,5858	0,2559	b	0,5385	0,2409	c
BR3-5	7,4767	0,2685	a	4,0943	0,2546	b	1,0469	0,2366	c
HB0-1	8,2281	0,3415	a	4,8457	0,3255	b	1,7983	0,3087	c
HB0-9	9,1872	0,2975	a	5,8048	0,2728	b	2,7574	0,2477	c
HB1-3	8,5126	0,3070	a	5,1302	0,2889	b	2,0828	0,2696	c
HB1-14	10,3549	0,3394	a	6,9725	0,3124	b	3,9252	0,2867	c
BL5	9,3201	0,3007	a	5,9377	0,2740	b	2,8903	0,2501	c
BL8	8,9663	0,2910	a	5,5839	0,2662	b	2,5366	0,2426	c
P8	8,5343	0,2866	a	5,1519	0,2658	b	2,1046	0,2425	c
P14	8,5606	0,2867	a	5,1782	0,2649	b	2,1308	0,2422	c
F3	10,0237	0,3293	a	6,6413	0,3026	b	3,5940	0,2786	c
F10	10,1315	0,3184	a	6,7490	0,2893	b	3,7017	0,2645	c
EN0-12	9,7391	0,3118	a	6,3567	0,2843	b	3,3094	0,2604	c
EN0-16	9,0317	0,3684	a	5,6493	0,3488	b	2,6020	0,3304	c
EN1-3	10,2375	0,4001	a	6,8551	0,3769	b	3,8078	0,3585	c
EN1-5	8,8280	0,2917	a	5,4456	0,2690	b	2,3983	0,2452	c
NR8	8,7744	0,2880	a	5,3920	0,2648	b	2,3447	0,2412	c
NR14	9,8027	0,3105	a	6,4203	0,2818	b	3,3730	0,2580	c
M01	9,6018	0,3023	a	6,2194	0,2746	b	3,1721	0,2494	c
M05	9,4792	0,3003	a	6,0968	0,2726	b	3,0495	0,2483	c
B05	9,0428	0,2937	a	5,6604	0,2689	b	2,6130	0,2445	c
B013	9,3460	0,3055	a	5,9636	0,2800	b	2,9163	0,2562	c
CR9	9,3274	0,3055	a	5,9450	0,2802	b	2,8976	0,2563	c
CR5	8,5284	0,2827	a	5,1460	0,2612	b	2,0987	0,2385	c

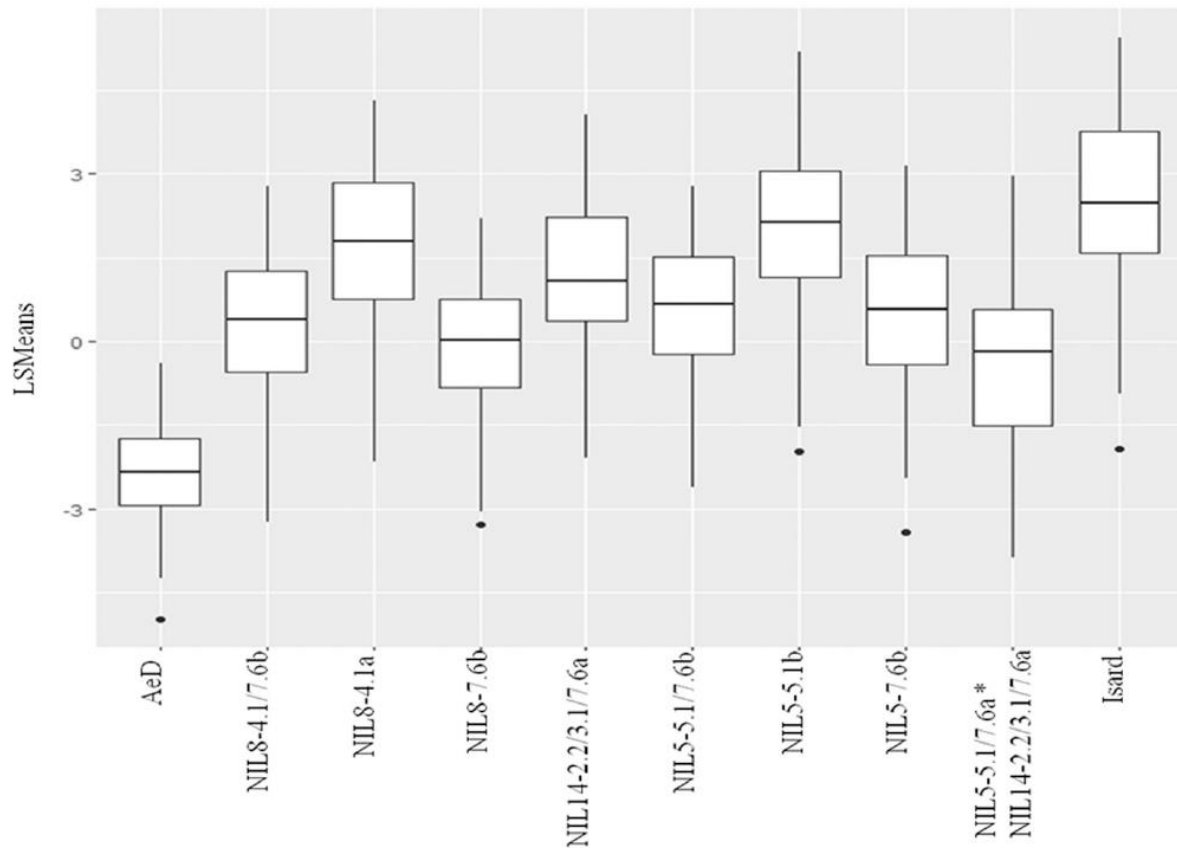
For each isolate, LSMean scores obtained from CLMM on the three pea genotypes were significantly different, as shown by different letters between genotypes (Tuckey test, p-value < 0.05) with Lumina, the most susceptible genotype, MN313, the genotype with intermediate behavior and PI180693, the most resistant genotype.

Additional file 9. LSMeans of disease severity for each genetic cluster of structure analysis without Bourgogne data (delta K=1600)

Genetic Cluster	Pea									Vetch				Faba Bean				Alfalfa						
	Lumina			MN313			PI180693			Amethyste			Topaze		Baraca		Melodie		Zenith					
	LSM	SD		LSM	SD		LSM	SD		LSM	SD		LSM	SD		LSM	SD		LSM	SD				
1	2,264	0,293	a	2,108	0,419	a	1,517	0,222	ab	-1,610	0,202	a	-4,630	0,576	a	-0,799	0,193	a	-3,087	0,253	a	-0,363	0,191	a
2	2,393	0,199	a	2,942	0,375	b	1,460	0,171	a	3,187	0,189	b	-4,381	0,525	a	-0,078	0,135	b	-2,427	0,174	b	0,536	0,140	b
3	3,250	0,230	b	2,146	0,366	a	1,092	0,154	b	2,749	0,169	c	-4,614	0,519	a	-0,011	0,108	b	-2,685	0,160	ab	0,459	0,119	b

For each variety, LSMeans scores obtained from CLM followed by the same letter are not significantly different (Tuckey test, p -value > 0.05).

Annexes du chapitre 3 : Étude de la diversité d'isolats français pour leur agressivité sur des NILs porteuses de QTL de résistance



Supplementary Figure S1. Box-plot of Least Square Mean values of Disease Severity scores on eight Near Isogenic Lines and two control lines (Isard and AeD) of pea for 43 French isolates of *Aphanomyces euteiches*. Boxplots show 25% and 75% quartiles.

Titre : Variabilité génétique et phénotypique des populations d'*Aphanomyces euteiches* : conséquence pour la gestion durable des QTL de résistance à la pourriture racinaire chez le pois

Mots clés : *Aphanomyces*, marqueurs, *Pisum sativum*, diversité, agressivité, NILs

Résumé : La pourriture racinaire précoce du pois, due à l'oomycète *Aphanomyces euteiches*, est une maladie majeure du pois en France et dans le monde. Cette thèse a visé à évaluer la diversité génétique et phénotypique des populations françaises d'*A. euteiches* vis-à-vis de légumineuses cultivées et de QTL de résistance chez le pois, en vue de contribuer au développement de connaissances pour l'étude de la durabilité de la résistance partielle du pois à *A. euteiches*. Afin d'étudier la diversité génétique des populations d'*A. euteiches*, des marqueurs microsatellites ont été développés, parmi lesquels 14 marqueurs hautement polymorphes ont été identifiés. Le génotypage de 94 isolats a montré une diversité génétique entre des populations américaines et françaises, confirmant le pouvoir discriminant de ses marqueurs. L'analyse génétique d'une collection de 205 isolats français a mis en évidence une faible

structuration des populations et un faible niveau de diversité génétique. De plus, l'analyse phénotypique de 34 de ces isolats français sur une gamme de 8 génotypes de 4 légumineuses hôtes a montré que la plupart des isolats était virulent sur pois, fève, luzerne et vesce et présentait un niveau élevé et peu diversifié d'agressivité sur pois. Enfin, le niveau d'agressivité de 43 isolats français vis-à-vis de 8 NILs de pois porteuses de QTL de résistance a été étudié. Les résultats ont identifié 3 groupes d'isolats présentant une variabilité d'agressivité et 3 groupes de NILs avec des spectres d'efficacité plus ou moins larges sur les isolats d'*A. euteiches* étudiés. Cette thèse ouvre de nouvelles perspectives pour mieux connaître la diversité génomique des populations d'*A. euteiches* et le rôle de la plante comme « driver » d'évolution des populations de l'agent pathogène.

Title : Genetic and phenotypic variability of *Aphanomyces euteiches* populations: consequence for the durable management of root rot resistance QTL in pea

Keywords : *Aphanomyces* root rot, markers, *Pisum sativum*, diversity, aggressiveness, NILs

Abstract: *Aphanomyces* root rot of pea, caused by the oomycete *Aphanomyces euteiches*, is a major disease of pea in France and worldwide. This thesis aimed to evaluate the genetic and phenotypic diversity of French populations of *A. euteiches* towards leguminous crops and resistance QTL in pea, in order to contribute to knowledge development on the durability of partial resistance in pea. In order to study the genetic diversity of *A. euteiches* populations, microsatellite markers were developed, among which 14 highly polymorphic markers were identified. Genotyping of 94 isolates showed genetic diversity between American and French populations, confirming the discriminatory power of these markers. Genetic analysis of a collection of 205 French isolates showed low population structure and

low genetic diversity. In addition, phenotypic analysis of 34 of these French isolates from a range of 8 genotypes of 4 host-legume species showed that most isolates was virulent on pea, faba bean, alfalfa and vetch and showed high level but low diversity of aggressiveness on pea. Finally, the level of aggressiveness of 43 French isolates towards 8 NILs carrying resistance QTL was studied. The results highlighted 3 groups of isolates showing a variability of aggressiveness and 3 groups of NILs with variable broad spectrum of efficacy. This thesis opens new perspectives for understanding the genomic diversity of *A. euteiches* populations and the role of the plant as a driving force in the evolution of the pathogen populations.