



HAL
open science

Potentiel évolutif et déterminisme génétique de caractères d'agressivité et morphologiques de l'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina*

Agathe Maupetit

► To cite this version:

Agathe Maupetit. Potentiel évolutif et déterminisme génétique de caractères d'agressivité et morphologiques de l'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina*. Phytopathologie et phytopharmacie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT: 2018LORR0202 . tel-02075708

HAL Id: tel-02075708

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02075708>

Submitted on 21 Mar 2019

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Faculté des Sciences et Technologie
Ecole doctorale Science et Ingénierie des Ressources Naturelles
Département de Formation Doctorale Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et Ecologie,
Biotechnologies
Spécialité Biologie Végétale et Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE par

Agathe Maupetit

Potentiel évolutif et déterminisme génétique de caractères d'agressivité et morphologiques de l'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina*

Soutenue publiquement le 18 décembre 2018

Composition du jury

Marie Foulongne-Oriol	Chargée de recherche, INRA Bordeaux	Rapporteur
Bruno Le Cam	Directeur de recherche, INRA Angers	Rapporteur
Chloé Delmas	Chargée de recherche, INRA Bordeaux	Examineur
Katherine Hayden	Chercheuse, RBGE Edimbourg	Examineur
Cécile Robin	Directrice de recherche, INRA Bordeaux	Examineur
Pascal Frey	Directeur de recherche, INRA Nancy	Directeur de thèse

Membres invités

Fabien Halkett	Chargé de recherche, INRA Nancy	Co-directeur
Stéphane De Mita	Chargé de recherche, INRA Nancy	Co-directeur

UMR 1136 INRA / Université de Lorraine, Interactions Arbres – Microorganismes
Centre INRA Grand Est Nancy



Calvin and Hobbes, Bill Watterson

REMERCIEMENTS

Comme dit Calvin (*Calvin and Hobbes*, Bill Watterson), « il y a des trésors partout » et il n'a pas peur de creuser pour les trouver. Comme lui, j'ai creusé pour trouver des trésors mais je n'ai pas creusé seule. Pendant ces trois ans de thèse, j'ai creusé bien entourée.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire et évaluer ce travail. Merci à Marie Foulongne-Oriol de me faire l'honneur d'inaugurer son HDR en tant que rapporteur et un grand merci à Bruno Le Cam d'avoir accepté cette lourde tâche aussi. Merci également à Cécile Robin, Chloé Delmas et Katherine Hayden de bien avoir voulu considérer ce manuscrit. Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse, Vincent Segura, Mathieu Siol, Josselin Montarry et Elisabeth Fournier, pour leur aide précieuse.

En parlant d'aide précieuse, merci beaucoup à mes trois directeurs de thèse, Pascal Frey, Fabien Halkett et Stéphane De Mita, pour leur encadrement, leurs conseils, leur temps et leur bienveillance. Merci Pascal de toujours avoir le sourire et de toujours avoir pris le temps de répondre à mes questions aussi bien scientifiques que moins scientifiques. Merci Fabien d'avoir eu la patience de m'expliquer, de me réexpliquer et de me réréexpliquer, pour finir par me dessiner tes idées. Merci Stéphane pour avoir essayé de me faire prendre des décisions, ce n'est pas une mince affaire. Merci pour tout le reste aussi.

Merci à toute l'équipe Patho pour l'ambiance chaleureuse et les discussions de café sans fin. Particulièrement, merci à Bénédicte Fabre, Axelle Andrieux et Jérémy Pétrowski pour leur participation conséquente et indispensable à mes expériences ainsi que pour leur bonne humeur constante et communicative.

J'aimerais aussi remercier Katy Hayden pour son accueil chaleureux au Botanic Garden, son encadrement, les courses au bord de la mer et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans un si bel endroit.

Je remercie aussi les stagiaires qui m'ont aidée à avancer et qui m'ont faite rire (beaucoup rire). Merci à Maxime pour sa passion pour les inoculations monospores. Merci à François et Pierre pour avoir fini de mettre en place ce que j'avais commencé. Merci à Marie-Laure de m'avoir écoutée délirer, surtout les vendredis après-midis. Merci à Simon d'avoir refusé d'écrire ma discussion générale...quoique. Et un merci spécial à Manon pour les journées et soirées de travail, de sport et d'écoute attentive 7 jours sur 7, et ce, toujours avec enthousiasme.

En dehors du laboratoire, je tiens à remercier mes colocataires nancéiens et écossais pour leurs petites attentions du quotidien et surtout pour m'avoir donné et redonné le sourire les soirs difficiles. Merci Lulu, Claire, Manu, Lucie, Arnaud, Cédric et Luza, Katie, Jane, Minna, Joel, Morgan et Denisa.

Je tiens aussi à remercier mes amis qui ont su être là quand il le fallait. Merci Justine d'être **toujours** là ou au bout du fil. Laurine, merci de m'avoir convaincue de monter dans le grand Nord. Merci Emma, Lesly et Aurélie pour votre soutien même à distance. Un immense merci à Charles, Emile, Sylvain et Mathias pour ces très nombreuses séances d'escalade qui m'ont motivée à me lever bien des matins. Et Marie bien sûr...merci de m'avoir supportée pendant 2 ans et plus dans ton bureau, dans le bus, dans ton salon et dans les bars. Merci de m'avoir montré que c'était possible.

Je vais faire simple et efficace, en un mot : petit. Merci Papa pour m'avoir appris à ne pas freiner. Merci Maman d'avoir fait tout ce qui était en ton pouvoir pour m'aider (principalement m'écouter, c'était nécessaire). Merci à mon frère, mes grands-parents, ma Marraine, mon cousin et ma cousine pour leur présence rassurante et leurs encouragements.

Merci infiniment, Jean, pour tes photos de champs vus du ciel et, plus sérieusement, pour ton calme et ta sérénité. Merci d'avoir passé tous ces week-ends exceptionnels avec moi et d'en prévoir bien plus.

Enfin, merci à Minoune qui a fait craquer Pascal, Fabien et Stéphane dès le premier entretien Skype (même s'ils ne veulent pas l'avouer) et qui l'a sûrement regretté quand elle a dû physiquement absorber mon stress des derniers mois.

Merci à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenue et encouragée.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
1. Contexte agronomique	1
2. Caractéristiques écologiques et évolutives des interactions hôte-parasite	2
2.1. Résistances qualitatives et quantitatives des plantes	3
2.2. Pouvoir pathogène des parasites de plante	4
2.3. Approches méthodologiques pour l'étude de l'évolution des agents pathogènes.....	7
3. L'agent de la rouille du peuplier, <i>Melampsora larici-populina</i>	10
3.1. Cycle biologique de <i>Melampsora larici-populina</i>	10
3.2. Impact de la rouille du peuplier en populiculture	12
3.3. Les caractères d'agressivité étudiés	13
4. Objectifs de la thèse et démarche scientifique	15
Chapitre 1 : Plasticité des caractères d'agressivité le long d'un gradient de maturité foliaire.	19
Article 1 : Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen.	21
Chapitre 2 : Evolution des caractères d'agressivité et morphologiques lors d'un contournement majeur de résistance	57
Article 2 : How did aggressiveness and morphological traits evolve following a major resistance breakdown in the poplar rust fungus <i>Melampsora larici-populina</i> ?	59
Recherche de compromis évolutifs	81
Chapitre 3 : Localisation de loci impliqués dans la détermination des virulences et des caractères d'agressivité et morphologiques.....	91
Article 3 : Searching for loci involved in aggressiveness-related traits using a genome-wide association study in the poplar rust fungus, <i>Melampsora larici-populina</i>	93
Article 4 : Identification of avirulence loci in the poplar rust fungus <i>Melampsora larici-populina</i> using a genome-wide association study	109
Discussion générale et conclusion.....	141
1. Etude d'un organisme biotrophe en laboratoire	141
2. Quels caractères cibler pour des résistances durables ?	143
3. Conclusion et perspectives	147
Références	149

INTRODUCTION GENERALE

1. Contexte agronomique

L'agriculture moderne dépend fortement d'intrants, notamment les engrais et les produits utilisés pour lutter contre les bioagresseurs (ravageurs et agents pathogènes). Les recherches sur les produits phytosanitaires utilisés en agriculture mettent en évidence leurs effets nocifs aussi bien sur la santé humaine que pour l'environnement. Les conséquences de l'utilisation de ces produits sont considérables : ils détériorent la santé des agriculteurs, celle des consommateurs et celle de l'ensemble des espèces de l'écosystème environnant. La prise de conscience vis-à-vis de ces désagréments est aujourd'hui remontée au niveau des instances politiques qui ont pris des mesures visant à réduire l'utilisation d'un certain nombre de produits phytosanitaires (Guichard *et al.*, 2017). En parallèle de ces avancées législatives, le système industriel demande des produits phytosanitaires toujours plus normés et au cahier des charges toujours plus exigeant.

L'ensemble de ces évolutions contraint les acteurs de l'agriculture et de la foresterie à adapter leurs pratiques. C'est pourquoi différentes stratégies sont étudiées et testées au sein de laboratoires de recherche dans le but de trouver des alternatives à l'utilisation des produits phytosanitaires. Pour lutter contre les agents pathogènes des plantes (virus, champignons, bactéries, nématodes...), une des solutions mises en place est la sélection de variétés végétales résistantes à leurs parasites principaux.

Les espèces en interaction, dont les hôtes et leurs parasites, co-évoluent constamment (Decaestecker *et al.*, 2007; Thrall *et al.*, 2012). Si l'évolution des plantes hôtes est dirigée par les activités humaines, celle des parasites est, par voie de conséquence, aussi impactée par ces pratiques. En effet, le choix des variétés cultivées n'est qu'un des nombreux paramètres influençant les populations d'agents pathogènes. L'ensemble des pratiques agricoles depuis l'échelle individuelle de la plante jusqu'à l'échelle du paysage (telles que le labour, les mélanges variétaux, les récoltes...) influencent la probabilité et le développement des épidémies (Stukenbrock & McDonald, 2008). Ces pratiques créent des conditions bien plus favorables pour les agents pathogènes dans les environnements agricoles très homogènes que dans les environnements naturels diversifiés et hétérogènes, conduisant à une évolution accélérée des espèces parasites (Stukenbrock & McDonald, 2008).

C'est donc la combinaison des plantes hôtes, des parasites et des pratiques qui détermine l'efficacité et la durabilité d'une résistance sélectionnée. L'étude de différentes combinaisons possibles entre ces trois éléments est nécessaire au développement de pratiques agricoles répondant aux enjeux environnementaux actuels. En particulier, des événements de

contournement des résistances qualitatives et d'érosion des résistances quantitatives ont été décrits (Niks & Rubiales, 2002; Caffier & Laurens, 2005; Stukenbrock & McDonald, 2008; Singh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) et confirment l'intérêt d'approfondir la compréhension de la coévolution hôte-pathogène. Dans ce contexte et dans l'objectif d'orienter la sélection variétale vers des plantes aux résistances plus durables, il est primordial de comprendre d'une part le fonctionnement des hôtes et d'autre part celui des parasites (Michelmore *et al.*, 2013).

Pour ce faire, le développement actuel des technologies donne accès à une diversité de méthodes sans précédent. Celles-ci permettent l'étude des interactions plante-parasite à la fois au niveau phénotypique, moléculaire et génétique (Figure 1).

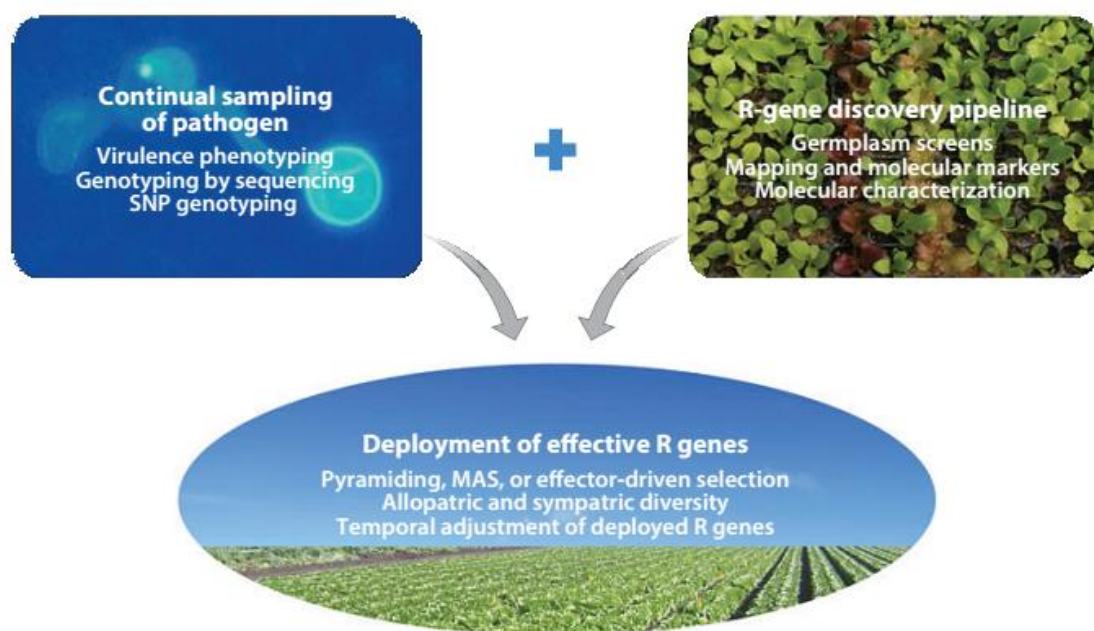


Figure 1 : La connaissance de la génétique des populations d'agents pathogènes devrait faciliter le déploiement de gènes de résistance. Abréviations : MAS, sélection assistée par marqueurs ; R gene, gène de résistance ; SNP, polymorphisme mononucléotidique (Michelmore *et al.*, 2013).

2. Caractéristiques écologiques et évolutives des interactions hôte-parasite

Depuis la symbiose mutualiste jusqu'au parasitisme, les interactions biologiques mettent en scène au moins deux espèces, voire bien plus. Selon la théorie évolutive de la Reine Rouge (Decaestecker *et al.*, 2007; Thrall *et al.*, 2012), les espèces sont en constante interaction, causant des pressions de sélection permanentes et réciproques, nécessitant une adaptation continue (sous peine d'extinction). Dans le contexte agronomique, la symbiose mutualiste et le parasitisme sont les deux types d'interactions les plus étudiés même si l'ensemble du gradient entre les deux existe. Les organismes mutualistes permettent une meilleure

croissance ou qualité des cultures. Certaines pratiques cherchent donc à favoriser ces espèces auxiliaires dans les champs. Au contraire, les espèces parasites affaiblissent les plantes, diminuent les rendements et la qualité des productions. Dans ce type d'interaction néfaste pour la plante hôte, celle-ci réagit à l'infection via des mécanismes de défense qui ont été largement étudiés (Jones & Dangl, 2006). La manipulation des mécanismes de défense des plantes dans le but de contrôler leurs parasites s'est révélée être un moyen de lutte efficace. Dans cette partie, je présenterai tout d'abord les mécanismes de résistance de plantes existant dans la nature et manipulés par l'Homme dans les programmes de sélection variétale. Je définirai ensuite les caractéristiques du pouvoir pathogène des bioagresseurs qui sont impliquées dans l'interaction avec l'hôte. Enfin, des concepts et méthodes permettant d'étudier l'évolution des parasites face aux résistances variétales seront abordés.

2.1. Résistances qualitatives et quantitatives des plantes

Les pesticides et le biocontrôle sont employés en protection des cultures mais nous nous intéressons ici aux mécanismes naturels de résistance des plantes utilisés à des fins agricoles. On s'intéresse à ces résistances car elles conditionnent l'interaction hôte-parasite. Deux principaux types de résistances sont sélectionnés chez les plantes pour lutter contre les agents pathogènes.

D'une part, les résistances qualitatives aussi dites 'totales' ou 'verticales' (Van Der Plank, 1963) confèrent à la plante une immunité complète contre l'agent pathogène ciblé. Elles sont spécifiques, c'est-à-dire efficaces vis-à-vis d'une partie seulement de la population de l'agent pathogène (Schumann & D'Arcy, 2006). Elles sont généralement déterminées par un gène de résistance chez la plante hôte (Jorge *et al.*, 2005; Pariaud *et al.*, 2009) correspondant à un gène du parasite contrôlant l'infection, lequel est qualifié de gène d'aviorulence (Schumann & D'Arcy, 2006; Jones & Dangl, 2006; Lo Presti *et al.*, 2015). Ce déterminisme génétique simple est qualifié de modèle gène-pour-gène (Flor, 1971; Stukenbrock & McDonald, 2009; Plissonneau *et al.*, 2017). Le gène de résistance de l'hôte présente généralement un allèle de résistance dominant et un allèle de sensibilité récessif (Stukenbrock & McDonald, 2009).

D'autre part, les résistances quantitatives, aussi appelées 'partielles' ou 'horizontales', réduisent le pouvoir pathogène du parasite sans empêcher l'infection de la plante (Azzimonti *et al.*, 2013; Delmas *et al.*, 2016; Karisto *et al.*, 2018). Elles sont généralement non-spécifiques, c'est-à-dire efficaces vis-à-vis de la totalité de la population de l'agent pathogène (Schumann & D'Arcy, 2006). La prolifération du parasite est freinée par la diminution de l'efficacité d'infection, la vitesse de développement et le nombre de descendants produits (Pariaud *et al.*, 2009; Delmas *et al.*, 2016; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Les plantes les plus résistantes seraient alors celles qui sont le plus à même de contrer une attaque, c'est-à-dire

celles qui alloueraient le plus d'énergie à leur système de défense (Van Baalen, 1998). Contrairement aux résistances qualitatives, les résistances quantitatives reposent généralement sur un déterminisme génétique plus complexe avec un ensemble de gènes ciblant un caractère de l'agent pathogène (Stewart *et al.*, 2018). Leur effet est de limiter les caractères impliqués dans la valeur sélective, capacité combinée de l'agent pathogène à infecter, survivre et se reproduire (Schumann & D'Arcy, 2006). Les gènes de résistance quantitative jouent un rôle dans des mécanismes variés incluant ceux des résistances constitutives et qualitatives (Bresson *et al.*, 2011; Azzimonti *et al.*, 2013). Ces mécanismes sont impliqués dans la diminution des symptômes d'infection, la modulation des signaux de défense ou la défense directe (Poland *et al.*, 2009).

Les améliorateurs associent ces deux types de résistances afin de conférer aux variétés un spectre de résistances plus large face aux différentes stratégies d'infection des agents pathogènes. On parle de pyramidage de résistances (Palloix *et al.*, 2009; Mundt, 2014; Pilet-Nayel *et al.*, 2017; Laloï *et al.*, 2017).

2.2. Pouvoir pathogène des parasites de plante

Dans un environnement agricole, l'évolution des plantes hôtes est régie par les activités humaines, ce qui a des conséquences sur l'évolution des espèces phytopathogènes. On s'intéresse donc à l'évolution des agents pathogènes en réponse au déploiement des différents types de résistances des plantes.

Le pouvoir pathogène des parasites de plantes est caractérisé par une composante qualitative (est-ce que le parasite est capable d'infecter un hôte donné ?) et une composante quantitative (quelle sera la gravité ou l'étendue de l'infection, notamment en terme de dommages causés ou d'intensité de l'épidémie ?) (Pariaud *et al.*, 2009). Classiquement, en phytopathologie, ces composantes sont nommées 'virulence' et 'agressivité', respectivement (Andrivon, 1995; Schumann & D'Arcy, 2006). Cependant, en pathologie animale, le terme 'virulence' a une acception quantitative. Pour éviter toute confusion, j'utilise les définitions de phytopathologie (Pariaud *et al.*, 2009) dans toute la suite de la thèse : la composante qualitative est la 'virulence' ('virulence' en anglais) et la composante quantitative est 'l'agressivité' ('aggressiveness' en anglais).

2.2.1. Virulence : composante qualitative du pouvoir pathogène

La part qualitative du pouvoir pathogène, aussi nommée virulence, suit la loi du tout ou rien : un individu virulent est capable d'infecter la plante hôte alors qu'un individu avirulent est directement reconnu et stoppé par les réactions de défense de l'hôte (Dodds & Rathjen, 2010;

Cui *et al.*, 2015; Lo Presti *et al.*, 2015). L'interaction plante-pathogène est alors incompatible. Le déterminisme de la virulence est lié à la présence d'un gène d'avirulence codant pour un facteur d'avirulence (Pariaud *et al.*, 2009). Ces facteurs d'avirulence, aussi appelés effecteurs, sont généralement des petites protéines sécrétées et riches en cystéine, qui manipulent les réactions de défense chez les plantes sensibles (Jones & Dangl, 2006; Lo Presti *et al.*, 2015). Un certain nombre de gènes d'avirulence ont été décrits comme correspondant à des résistances totales chez l'hôte par une relation gène-pour-gène (Flor, 1971; de Wit, 1992). S'il y a un polymorphisme, le gène d'avirulence du parasite possède un allèle récessif de virulence et un allèle dominant d'avirulence (Flor, 1971). La mutation d'avirulent à virulent subit une forte pression de sélection imposée par la résistance de l'hôte (Stukenbrock & McDonald, 2009; Plissonneau *et al.*, 2017). Du fait du déterminisme génétique simple, une délétion ou une simple mutation ponctuelle du gène de virulence peut affecter la forme du facteur de virulence et la pathogénicité de l'individu concerné (Daverdin *et al.*, 2012).

En effet, la reconnaissance par la plante hôte de la protéine d'avirulence permet généralement de déclencher des réactions de défense. Des protéines de résistance de la plante hôte reconnaissent spécifiquement la protéine d'avirulence de manière directe ou indirecte (Jones & Dangl, 2006). La perception du parasite induit une cascade de réactions de défense bloquant totalement l'infection (Cui *et al.*, 2015). Ce type de résistance est nommé « effector-triggered immunity » (ETI) et est souvent suivi d'une réponse hypersensible de la plante avec mort cellulaire (Jones & Dangl, 2006; Kushalappa *et al.*, 2016).

Face aux résistances qualitatives de l'hôte, l'évolution de l'agent pathogène peut conduire à leur contournement. Après le déploiement d'une variété résistante au champ, un événement de contournement peut être observé d'autant plus rapidement que le potentiel évolutif de l'agent pathogène est élevé et que la pression de sélection exercée par la présence des résistances qualitatives est forte (McDonald & Linde, 2002; Poland *et al.*, 2009). Un événement de contournement a lieu quand des individus ayant l'allèle virulent du gène apparaissent et augmentent en fréquence dans la population (McDonald & Linde, 2002). Le gène de résistance de la plante hôte n'est alors plus efficace face au parasite ciblé. Ce type de contournement a été observé et étudié en particulier dans le cas de l'oïdium du pommier causé par *Podosphaera leucotricha* (Caffier & Laurens, 2005), de la rouille du peuplier due à *Melampsora larici-populina* (Pinon & Frey, 2005), de la pourriture rouge de la canne à sucre due à *Colletotrichum falcatum* (Singh *et al.*, 2016), et du phoma du colza dû à *Leptosphaeria maculans* (Zhang *et al.*, 2016).

Le contournement d'une résistance peut impliquer un coût de virulence. En effet, le gain d'une virulence peut affecter l'expression des caractères quantitatifs de l'agent pathogène, la plupart du temps diminuant sa valeur sélective ou son agressivité (Montarry *et al.*, 2006;

Dowkiw *et al.*, 2010). Cette relation entre les composantes qualitatives et quantitative de la pathogénicité joue un rôle important dans le processus épidémique et l'évolution des espèces (Roff & Fairbairn, 2012; Laine & Barrès, 2013).

2.2.2. Agressivité : composante quantitative du pouvoir pathogène

La composante quantitative du pouvoir pathogène, l'agressivité, peut être mesurée à différentes échelles, depuis celle de la plante jusqu'à celle de la parcelle. A l'échelle de la plante ou de la feuille, l'agressivité est généralement évaluée pendant la phase infectieuse du cycle de l'agent pathogène par la mesure de plusieurs caractères quantitatifs élémentaires en conditions contrôlées. Les caractères les plus étudiés sont l'efficacité d'infection, le temps de latence, la production de spores, la durée de l'infection, la taille de lésion ou de nécrose et la production de toxine (Lannou, 2012). Ces caractères sont liés à la valeur sélective de l'organisme en reflétant ses capacités d'infection, de survie et de reproduction. Ils sont donc en majorité contrôlés par plusieurs gènes aux effets additifs (Pilet-Nayel *et al.*, 2017). L'architecture génétique des caractères quantitatifs est plus complexe que celle des virulences (Mackay *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2018). De plus, l'expression des gènes est modulée par leurs interactions, par l'interaction avec l'hôte mais aussi par des facteurs environnementaux abiotiques (Lannou, 2012).

L'interaction des agents pathogènes avec la plante hôte implique la confrontation avec les résistances de celle-ci. Les résistances quantitatives des plantes ne bloquent pas complètement l'infection mais réduisent la valeur sélective du parasite et donc ralentissent le processus infectieux dans la plante et la progression de l'épidémie au champ. Les résistances quantitatives sont considérées comme plus durables que les résistances qualitatives de par leur déterminisme polygénique (Palloix *et al.*, 2009; McDonald, 2010; Laloï *et al.*, 2017). L'évolution de l'agressivité face aux résistances quantitatives dépend en partie du potentiel évolutif de l'espèce pathogène (Charmantier & Garant, 2005; Stukenbrock & McDonald, 2009; McDonald, 2015), mais aussi de son pouvoir de dispersion et de l'abondance de la variété résistante. Le potentiel évolutif est estimable mais rarement pris en compte dans les stratégies de sélection variétale et de déploiement au champ des gènes de résistance. Un des facteurs déterminant le potentiel évolutif est la variabilité génétique (McDonald & Linde, 2002) qui est à la fois sous l'influence des forces évolutives telles que la mutation, la recombinaison, la dérive génétique ou la sélection. La capacité de dispersion de l'agent pathogène joue un rôle dans l'augmentation de la diversité génétique. De plus, la capacité de dispersion permet de coloniser des nouvelles parcelles d'hôtes plus ou moins éloignées de la zone géographique d'origine, et ceci est d'autant plus accentué si les résistances quantitatives se trouvent en fréquences importantes dans le paysage. Les agents pathogènes les plus agressifs se voient alors favorisés dans les populations.

La diminution de l'efficacité d'une résistance quantitative face à l'augmentation de l'agressivité d'un parasite ciblé est causée par l'évolution de ce dernier. On parle d'« érosion des résistances », comme formalisé par Gandon et Michalakis (2000). L'érosion de résistances quantitatives a été observée dans divers pathosystèmes comme l'alternariose du coton (Holguin & Bashan, 1992), la rouille brune du blé (Lehman & Shaner, 2007), la virose du piment (Montarry *et al.*, 2012), le mildiou de la vigne (Delmotte *et al.*, 2014; Delmas *et al.*, 2016), le mildiou de la pomme de terre (Andrivon *et al.*, 2007), la tavelure du pommier (Caffier *et al.*, 2014) ou encore la rouille du peuplier (Dowkiw *et al.*, 2010). L'augmentation de l'agressivité d'un parasite est cependant susceptible d'être limitée par la présence de compromis évolutifs entre caractères phénotypiques. Ces derniers reflètent notamment l'investissement énergétique de l'organisme dans une fonction donnée au détriment d'une autre. Les compromis évolutifs jouent un rôle primordial d'un point de vue épidémiologique en conditionnant l'adaptation d'un agent pathogène à son hôte (Laine & Barrès, 2013). L'étude de l'évolution de l'agressivité d'une espèce pathogène implique donc la prise en compte de nombreux facteurs, aussi bien biotiques qu'abiotiques, influençant les trajectoires évolutives des caractères complexes.

2.3. Approches méthodologiques pour l'étude de l'évolution des agents pathogènes

Les résistances durables ont été décrites comme étant celles dont l'efficacité au champ a été observée pendant de nombreuses années (Johnson, 1979). Pour optimiser le processus de sélection de variétés résistantes, il est important de comprendre le fonctionnement des plantes, celui des parasites ciblés et l'interaction entre les deux (Michelmore *et al.*, 2013). Cette dernière est le sujet d'étude de la phytopathologie qui est la science des maladies des plantes, causées par des agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons, les virus et les nématodes. L'étude de ces agents pathogènes implique la description de leur cycle de développement et de leur physiologie. Le phénotype des parasites est déterminé par leur génotype, par leur environnement, biotique et abiotique, et par l'interaction entre les deux. On s'intéresse ici à l'identification des déterminants génétiques des phénotypes.

2.3.1 Identification des bases génétiques des caractères phénotypiques

La génétique quantitative est la science qui étudie les bases génétiques des phénotypes, ensemble de caractères complexes. Elle permet d'identifier, de localiser, de caractériser les éléments génétiques sous-jacents de ces caractères. Deux principales méthodes sont employées : l'analyse de liaison (*linkage analysis*) et l'analyse d'association (*genome-wide association studies* – GWAS). Les deux méthodes reposent sur le même principe : identifier des polymorphismes génétiques significativement corrélés aux variations phénotypiques. La

différence entre ces méthodes réside dans les populations étudiées : l'analyse de liaison est menée sur des descendants de croisements contrôlés alors que l'analyse d'association examine des individus issus de populations naturelles. L'analyse d'association prend en compte les recombinaisons apparues au cours de nombreuses générations permettant de localiser le gène d'intérêt plus précisément que l'analyse de liaison (Ott *et al.*, 2011). Les études sur des populations naturelles ont aussi l'avantage de mieux représenter la diversité génétique et phénotypique naturelles que les descendants de croisements contrôlés, qui reposent nécessairement sur le choix des parents. Enfin, les croisements chez les espèces non-modèles sont parfois compliqués à réaliser, voire impossibles en l'état actuel des connaissances.

L'analyse d'association consiste à calculer la corrélation entre un ensemble de marqueurs génétiques et des variations phénotypiques dans des groupes d'individus non apparentés. Les marqueurs génétiques couvrent l'ensemble du génome et peuvent se compter en millions. Une association significative entre un marqueur (ou un groupe de marqueurs) et un caractère phénotypique indique qu'un gène influençant ce caractère se trouve dans la région du marqueur (voir encadré 1).

Encadré 1 : Analyse d'association pangénomique (GWAS)

L'analyse d'association pangénomique est réalisée grâce à des modèles linéaires généralisés mixtes sur un caractère phénotypique à la fois :

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m x_{ij}a_j + \varepsilon_i$$

Où y_i est le phénotype de l'individu i ; m est le nombre de marqueurs ; x_{ij} est le génotype du j ème marqueur du i ème individu ; a_j est l'effet du j ème marqueur et ε_i l'erreur du modèle. Les effets des marqueurs sont considérés comme additifs et il est supposé que leur somme suit une loi normale de moyenne 0 et de variance σ^2K , où K est la matrice d'apparentement (Korte & Farlow, 2013) qui prend en compte la structure des populations. L'apparentement entre individus est inconnu *a priori* dans les populations naturelles mais il peut être estimé grâce aux variations génétiques. Les composantes de variance et les P -valeurs de chaque marqueur sont estimées à partir du modèle décrit.

Pour prendre en compte le grand nombre de tests, les P -valeurs sont généralement corrigées par la méthode FDR (pour $\alpha < 5\%$ ou 10%) ou celle de Bonferroni. Afin de mettre en évidence des corrélations significatives, des échantillons de taille importante sont requis (Ioannidis *et al.*, 2009).

2.3.2. Estimation du potentiel évolutif

La génétique quantitative permet d'identifier les bases génétiques des caractères phénotypiques des agents pathogènes à un instant donné. Elle fournit aussi des outils utiles pour évaluer le potentiel évolutif de ces caractères qui conditionne leur évolution dans le temps et, par conséquent, la durabilité des résistances correspondantes (Johnson, 1979).

L'évolution d'un caractère est d'autant plus probable qu'il est héritable et sous sélection directionnelle. C'est un prérequis nécessaire pour l'évolution adaptative. L'héritabilité est la part de la variance phénotypique d'une population due à la différence d'hérédité, c'est-à-dire rapportée à la variance génétique (Lush, 1940). On distingue l'héritabilité au sens strict de l'héritabilité au sens large. L'héritabilité au sens strict correspond à la part de la variance phénotypique expliquée par les effets génétiques additifs, alors que l'héritabilité au sens large est la part de la variance phénotypique expliquée par le génotype. La première est une mesure de la transmissibilité d'un caractère au cours de la reproduction sexuée. La seconde mesure la transmission sans reproduction sexuée (Nyquist & Baker, 1991) (voir encadré 2).

Alors que l'héritabilité est la variance phénotypique déterminée par la variance génétique, la plasticité est la capacité d'un individu à exprimer différents phénotypes en fonction de l'environnement biotique et abiotique. La plasticité réduit donc la part de variance phénotypique déterminée génétiquement et limite ainsi l'effet de la sélection naturelle sur l'évolution adaptative du caractère.

L'évolution adaptative d'un caractère, en plus d'être conditionnée par son héritabilité et le type de sélection naturelle, est aussi contrainte par les corrélations génétiques qui existent entre caractères. Ces corrélations peuvent être positives ou négatives, correspondant alors à des compromis évolutifs (Pariaud *et al.*, 2009). Les corrélations génétiques peuvent être propres à une espèce, mais, comme elles influencent les trajectoires évolutives des caractères concernés (Roff & Fairbairn, 2012; Laine & Barrès, 2013), elles peuvent être différentes entre populations aux histoires évolutives distinctes.

Encadré 2 : Héritabilité au sens large

L'héritabilité au sens large H^2 peut être calculée chez les espèces à reproduction asexuée, sur un ensemble de souches non sélectionnées pour un caractère en particulier (Nyquist & Baker,

$$1991) : H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}$$

Où σ_G^2 est la variance génétique de l'ensemble des souches et σ_P^2 est la variance phénotypique de ces mêmes souches.

Dans la pratique, les contraintes expérimentales imposent de calculer la variance phénotypique moyenne sur l lieux, d dates, r répétitions et n individus. La variance phénotypique est alors intégrée sur ces effets environnementaux :

$$\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \frac{\sigma_{\text{lieu}}^2}{l} + \frac{\sigma_{\text{date}}^2}{d} + \frac{\sigma_{\text{répétition}}^2}{l \times d} + \frac{\sigma_{\text{individu}}^2}{l \times d \times r} + \frac{\sigma_{\text{erreur}}^2}{l \times d \times r \times n}$$

où σ_{lieu}^2 , σ_{date}^2 , $\sigma_{\text{répétition}}^2$, $\sigma_{\text{individu}}^2$, σ_{erreur}^2 sont respectivement les variances entre lieux, entre dates, entre répétitions, entre individus et la variance résiduelle. $l \times d \times r \times n$ est alors le nombre de mesures totales pour un ensemble donné de souches.

3. L'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina*

Il existe au moins 12 espèces de *Melampsora* spp. qui causent la rouille sur différentes espèces de peupliers dans le monde (Vialle *et al.*, 2013). Parmi toutes ces espèces, *M. larici-populina* est de loin celle qui pose le plus de problèmes en populiculture et dont l'aire de distribution est la plus large, couvrant tous les continents. C'est donc à cette espèce que nous nous intéressons ici.

3.1. Cycle biologique de *Melampsora larici-populina*

Melampsora larici-populina est un champignon basidiomycète, biotrophe foliaire, au cycle infectieux complexe comptant cinq types de spores (Figure 2). Cette rouille hétéroïque infecte successivement le mélèze et le peuplier. Le champignon effectue un cycle de reproduction sexuée sur le mélèze une fois par an au printemps, puis plusieurs cycles de reproduction asexuée sur les feuilles de peuplier pendant l'été. A cette étape du cycle, les spores sont dicaryotiques, les lésions causées sur les feuilles s'appellent urédies et les spores produites urédospores. Au moment de la sénescence des feuilles de peuplier à l'automne, des télies contenant des téliospores sont produites. Le cycle de reproduction sexuée commence alors par une caryogamie suivie d'un début de méiose. La méiose est interrompue par l'entrée en dormance des téliospores. A ce stade, les téliospores sont une forme de résistance hivernale de *M. larici-populina*. Elles resteront sur les feuilles de peuplier au sol jusqu'au printemps où la méiose se termine et aboutit à la formation de basidiospores. Les basidiospores sont haploïdes et sont la forme de dispersion de l'agent pathogène jusqu'aux jeunes aiguilles de mélèze. Le

cycle de reproduction sexuée se poursuit sur mélèze et produit des spermogonies haploïdes. Ces spermogonies sont fécondées par des spermaties (ou pycniospores) haploïdes de signe sexuel opposé. Cette plasmogamie aboutit à la formation d'écidies produisant des écidiospores (dicaryotiques), qui se disperseront et infecteront les feuilles de peuplier pour un nouveau cycle.

La rouille du peuplier a un impact négligeable sur mélèze mais elle a un impact très fort sur le peuplier, du fait des multiples cycles de reproduction asexuée sur cet hôte produisant de nombreux descendants.

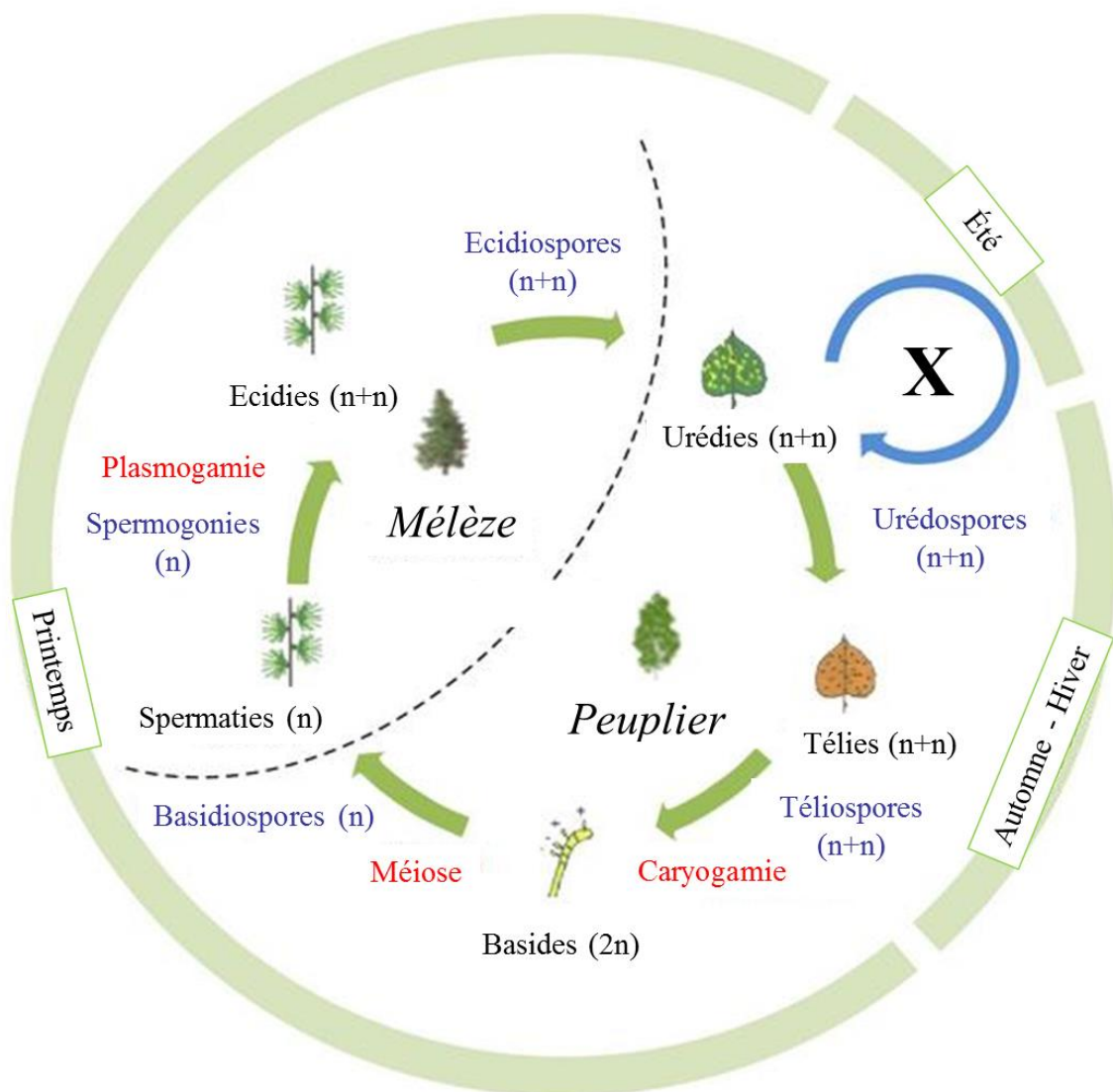


Figure 2: Cycle de développement de *M. larici-populina*, d'après Hacquard *et al.* (2011)

3.2. Impact de la rouille du peuplier en populiculture

La France possède le deuxième peuplement de peupliers cultivés mondial avec 236 000 ha de surface dédiée à la production en 2008 (loin derrière la Chine qui comptait 3 010 000 ha de peupleraies de production la même année) (www.peupliersdefrance.org). La production annuelle de bois de peuplier s'élevait en moyenne à deux millions de mètres cubes entre 1988 et 2008 en France. Environ 54% du volume est utilisé pour le déroulage (incluant les industries de l'emballage léger, du contreplaqué et l'exportation) et 46% pour le sciage (pour palettes et caisserie).

L'infection des peupliers par la rouille induit des défoliations entraînant une diminution de la croissance des plants, voire leur dépérissement dans les cas les plus extrêmes et récurrents. *Melampsora larici-populina* infecte aussi bien les peupliers cultivés que sauvages mais la maladie est plus sévère dans les peupleraies cultivées, en particulier du fait des conditions de culture (Frey *et al.*, 2005).

L'utilisation de fongicides étant économiquement peu rentable, et de plus interdite en populiculture depuis le Grenelle de l'Environnement, les améliorateurs ont sélectionné des variétés de peupliers résistants à la rouille. Cependant, la plupart de ces cultivars, largement plantés en Europe, portent des gènes de résistance qualitative. Les plantations de peupliers sont caractérisées par leur homogénéité : les cultures sont équiennes et monoclonales, c'est-à-dire que tous les plants ont le même âge et sont issus du même clone. Comme précisé précédemment, ces conditions induisent de fortes pressions de sélection sur les agents pathogènes pouvant conduire au contournement rapide des résistances portées par l'hôte cultivé. A ce jour, huit résistances qualitatives (R1 à R8) portées par le peuplier ont été décrites (Pinon & Frey, 2005), auxquelles il faut rajouter deux résistances récemment caractérisées (R9 et R10). Toutes ces résistances sont contournées à ce jour par *M. larici-populina*.

Les contournements des résistances R2 (portée par le cultivar Luisa-Avanzo) en 1986 et R7 (portée par 'Beaupré') en 1994 ont été les plus remarquables car les cultivars résistants étaient largement plantés depuis plusieurs années et totalement résistants. Le contournement de la résistance R7 a déclenché des épidémies de rouille au cours desquelles les individus virulents se sont rapidement dispersés dans tout le territoire français. Les conséquences économiques de cet événement de contournement ont été considérables (Pinon & Frey, 2005). Les conséquences démographiques et génomiques sur les populations de l'agent pathogène ont pu être évaluées grâce à une collection historique conservée à l'INRA de Nancy. Cette collection contient un grand nombre de souches de *M. larici-populina* échantillonnées depuis 1982. A partir de cette collection, l'étude de génétique des populations de Persoons *et al.* (2017) a

distingué trois groupes génétiques. Le groupe génétique sauvage est constitué de souches surtout avirulentes 7 échantillonnées dans le Sud de la France sur des peupliers sauvages. Ce groupe présente une plus forte diversité génétique que les groupes échantillonnés dans le Nord de la France où 80% des peupliers plantés étaient R7 (Persoons *et al.*, 2017). Le groupe génétique pré-contournant était présent avant le contournement de la résistance R7 en 1994 et ne contient que des souches avirulentes 7. Au moment du contournement de la résistance R7, le groupe contournant apparaît, montrant des signatures de goulot d'étranglement (en 1994) qui disparaissent en quelques années (absentes en 1998). Le groupe contournant remplace rapidement le groupe pré-contournant qui disparaît complètement en 1998. Le contournement de la résistance R7 a donc provoqué de profonds bouleversements dans l'évolution de l'agent pathogène *M. larici-populina*.

Face aux contournements successifs des résistances qualitatives et aux dommages en découlant, l'intérêt des améliorateurs s'est porté sur le pyramidage des résistances qualitatives et quantitatives. Notamment, le développement de peupliers possédant des résistances quantitatives élevées est une stratégie permettant aux arbres de présenter une bonne tolérance à la rouille.

La sélection de résistances quantitatives est plus longue et compliquée que celle des résistances qualitatives, du fait de leur déterminisme génétique plus complexe (Jorge *et al.*, 2005). La décomposition de la résistance quantitative en composantes élémentaires (période de latence, nombre d'urédies, taille des lésions, cf. plus loin) permet de cartographier des QTL (*Quantitative Trait Loci*) de résistance quantitative, aussi appelés QRL (*Quantitative Resistance Loci*) (Jorge *et al.* 2005). Cette stratégie de sélection de variétés de peupliers présentant des résistances plus durables est mise en œuvre depuis une vingtaine d'années par le Groupement d'Intérêt Scientifique « Génétique, amélioration et protection du peuplier » (GIS Peuplier). Le GIS peuplier a mis sur le marché en 2012 une première série de cultivars de peupliers *P. deltoides* présentant un très bon niveau de résistance quantitative. Cependant, les résistances quantitatives peuvent également s'éroder du fait de l'augmentation de l'agressivité du champignon (Dowkiw *et al.*, 2010). Par conséquent, afin de guider la stratégie de sélection des améliorateurs, il serait souhaitable de savoir quelles sont les composantes de la résistance quantitative qui seront les plus efficaces pour limiter le développement du champignon.

3.3. Les caractères d'agressivité étudiés

Les résistances quantitatives diminuent les effets nuisibles de l'agent pathogène ciblé en limitant son agressivité. L'agressivité d'un parasite est complexe et peut être décomposée en plusieurs caractères quantitatifs. Chez *M. larici-populina*, les caractères d'agressivité sont

mesurés au stade d'urédie, correspondant à la phase épidémique sur peuplier. Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressée à cinq caractères d'agressivité classiquement étudiés (efficacité d'infection, temps de latence, taille des lésions, taux et capacité de sporulation), un caractère plus rarement étudié (quantité de mycélium *in planta*) et un caractère morphologique (volume des spores) (Figure 3).

L'**efficacité d'infection** est la probabilité qu'une urédospore déposée sur une feuille produise une lésion (Lannou, 2012).

Le **temps de latence** (ou période de latence) est l'intervalle de temps entre l'inoculation et le début de la sporulation suite à l'infection (Lannou, 2012).

La **taille d'une lésion** est l'aire de la surface qui produit des urédospores (Kolmer & Leonard, 1986; Robert *et al.*, 2004).

Le **taux de sporulation** est le nombre d'urédospores produites par urédie et par unité de temps (par jour de sporulation dans le cas de la rouille du peuplier) (Leonard, 1969; Clifford & Clothier, 1974; Kardin & Groth, 1989).

La **capacité de sporulation** est le nombre d'urédospores produites par unité de surface et par unité de temps (Robert *et al.*, 2002; Dowkiw *et al.*, 2003). C'est une estimation du flux d'urédospores à travers la lésion concernée.

La **quantité de mycélium in planta** est considérée comme un proxy de la colonisation du tissu foliaire par le champignon et est mesurée par qPCR.

Le **volume des urédospores** est calculé avec la formule du volume d'un ellipsoïde à partir des mesures de leur longueur et de leur largeur. Ce caractère morphologique pourrait donner des indications sur la quantité de ressources nutritives.

Ces caractères sont également influencés par l'hôte puisque le développement de l'agent pathogène est contraint par l'état physiologique de la plante et de la feuille qu'il infecte. *Melampsora larici-populina* étant un parasite biotrophe obligatoire, les mesures des caractères d'agressivité sont obligatoirement faites sur du matériel végétal vivant dont les spécificités sont à prendre en compte.

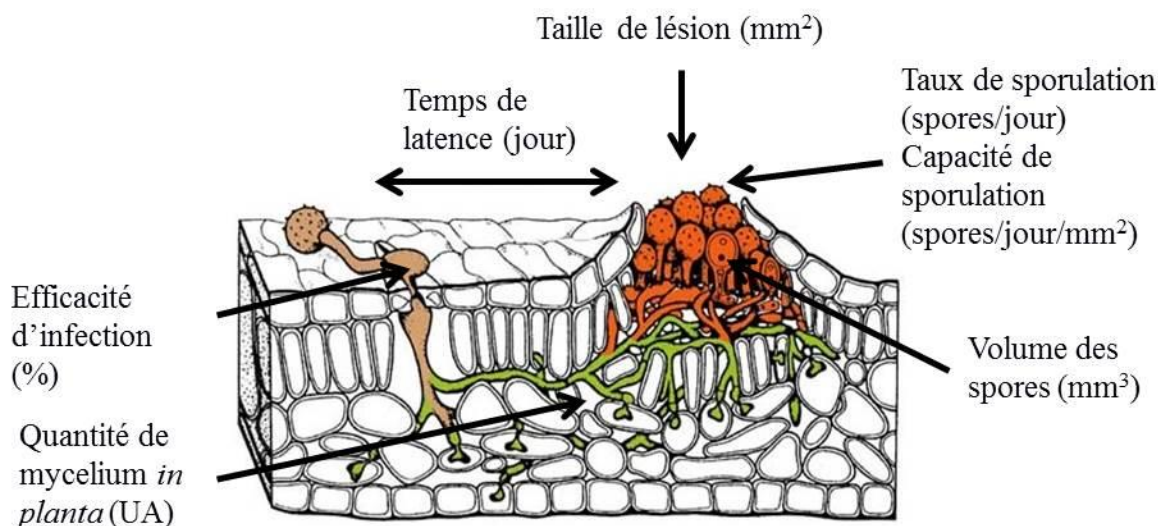


Figure 3 : Caractères d'agressivité étudiés représentés sur une coupe de feuille (face inférieure en haut) au niveau d'une urédie, adapté de Hahn (2000). UA : unité arbitraire.

4. Objectifs de la thèse et démarche scientifique

Dans l'objectif d'optimiser la sélection des résistances quantitatives en populiculture, une meilleure connaissance des caractères d'agressivité du principal parasite des peupliers peut s'avérer utile pour anticiper son évolution face à de telles résistances. Pour aider à orienter le processus de sélection de variétés résistantes vers des résistances plus durables que les résistances qualitatives, nous partons de l'hypothèse que certains caractères d'agressivité sont plus enclins à évoluer que d'autres. L'objectif global de ce travail est donc de déterminer le potentiel évolutif des caractères d'agressivité de *M. larici-populina* ainsi que leurs bases génétiques.

L'expression des caractères d'agressivité dépend notamment de leur niveau de plasticité. Plus un caractère est plastique, plus sa valeur sera déterminée par les variations environnementales, donc moins il sera enclin à répondre à la sélection naturelle. A l'inverse, l'héritabilité des caractères d'agressivité est un prérequis nécessaire à la réponse à la sélection naturelle. L'héritabilité d'un caractère doit être suffisante pour qu'il puisse évoluer en fonction du type et de l'intensité de la sélection naturelle qu'il subit. Le déterminisme génétique joue alors un rôle dans le potentiel évolutif d'un caractère, voire de plusieurs puisque certains d'entre eux sont génétiquement liés par des compromis évolutifs ou corrélations génétiques positives. Identifiées précisément, les bases génétiques des caractères d'agressivité apporteront une connaissance plus approfondie de leur déterminisme.

Ce triptyque (plasticité, potentiel évolutif, bases génétiques) conditionne l'évolution des caractères d'agressivité et définit les trois axes du manuscrit de cette thèse. Des approches expérimentales en biologie évolutive et en génétique quantitative ont été utilisées.

Le premier chapitre de ma thèse porte sur la plasticité des caractères d'agressivité. Dans le cas d'un champignon foliaire biotrophe comme la rouille du peuplier, la feuille de l'hôte constitue son environnement biotique obligatoire. Il a été démontré dans de précédentes études que la maturité de la feuille de peuplier influence le développement des agents pathogènes foliaires (Cellerino *et al.*, 1978; Sharma *et al.*, 1980; Coleman, 1986; Giorcelli *et al.*, 1996). Deux principaux effets de la feuille hôte peuvent jouer sur le développement du champignon : d'une part la disponibilité en éléments nutritifs dans la feuille fournit des éléments indispensables à son développement, d'autre part les réactions de défenses de la feuille l'entravent (Adandonon *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2017).

Nous tenterons donc de répondre aux questions suivantes : Quelle caractéristique de la feuille hôte influence le plus le développement de *M. larici-populina* ? Quelle est la plasticité des caractères d'agressivité sur un gradient de maturité des feuilles, caractérisé par des concentrations différentes en composés nutritifs et de défense ?

Le deuxième chapitre explore l'évolution passée des mêmes caractères d'agressivité et morphologique. Le premier chapitre s'appuyant sur les résultats d'une expérience menée sur une seule souche de *M. larici-populina*, dans ce second chapitre, nous nous sommes intéressés à un grand nombre de souches issues de populations contrastées.

Le troisième chapitre traite de l'identification de gènes impliqués dans le contrôle des caractères phénotypiques. Nous avons aussi cherché à identifier les gènes impliqués dans le contournement de différentes résistances, dont la résistance R7. Une approche de génétique d'association pangénomique (GWAS, *genome-wide association study*) a été utilisée sur quatre populations contrastées.

**CHAPITRE 1 : PLASTICITE DES CARACTERES
D'AGRESSIVITE LE LONG D'UN GRADIENT DE
MATURITE FOLIAIRE**

CHAPITRE 1 : PLASTICITE DES CARACTERES D'AGRESSIVITE LE LONG D'UN GRADIENT DE MATURITE FOLIAIRE

Ce premier chapitre considère la plasticité des caractères d'agressivité de *M. larici-populina* en fonction de la variabilité environnementale imposée par l'hôte. En prenant l'exemple du gradient de maturité foliaire, l'objectif est d'identifier les caractères les plus contraints par ce facteur environnemental majeur.

Chez les champignons foliaires biotrophes obligatoires, dont *M. larici-populina*, la feuille sur laquelle se développe un individu lui procure un environnement biotique particulier. De précédentes études ont d'ailleurs montré que la maturité des feuilles influence le développement de plusieurs agents pathogènes du peuplier (Cellerino *et al.*, 1978; Sharma *et al.*, 1980; Coleman, 1986; Giorcelli *et al.*, 1996). Nous nous sommes donc intéressés ici au développement du champignon sur des feuilles de maturités différentes. Un protocole d'inoculation monospore a été employé afin de caractériser précisément les valeurs de caractères d'agressivité intrinsèques à chaque individu. Pour cela, un ensemble de caractères d'agressivité et morphologique ont été mesurés sur des individus d'une même souche de *M. larici-populina*. Nous avons montré que la taille des lésions créées par le champignon ainsi que le taux de sporulation sont corrélés et que ces deux caractères sont les plus plastiques le long du gradient de maturité foliaire. Sur les feuilles les plus matures, la taille des lésions et le taux de sporulation sont plus élevés, témoins d'une agressivité plus importante.

Cette observation peut s'expliquer par deux effets opposés des composés métaboliques des feuilles. D'une part les sucres de la feuille fournissent des ressources nutritives nécessaires au développement du champignon. D'autre part, les composés phénoliques participent aux réactions de défense de la feuille en contrant l'invasion par le parasite. Nous avons donc mesuré une série de composés nutritifs (sucres, carbone et azote total) et de défense (composés phénoliques) dans les feuilles utilisées et recherché lequel de ces effets a le plus d'influence en testant les corrélations entre l'agressivité du champignon et le composé foliaire considéré.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article publié dans *Frontiers in Plant Science* (doi : 10.3389/fpls.2018.01396).

**Article 1 : Defense compounds rather than nutrient availability
shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient
in a biotrophic plant pathogen.**

Authors

Agathe Maupetit¹, Romain Larbat², Michaël Pernaci^{1*}, Axelle Andrieux¹, Cécile Guinet³,
Anne-Laure Boutigny^{3#}, Bénédicte Fabre¹, Pascal Frey¹, Fabien Halkett¹

¹ Université de Lorraine, Inra, IAM, F-54000 Nancy, France

² Université de Lorraine, Inra, LAE, F-54000 Nancy, France

³ ANSES, Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie, 54220 Malzéville,
France

* Present address: PalmElit SAS, 34980 Montferriez-sur-Lez, France

Present address: Anses, Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Bactériologie,
Virologie et OGM, 49044 Angers, France.

Author for correspondence:

Fabien Halkett

Tel: +33 3 83 39 40 55

Email: fabien.halkett@inra.fr

Abstract

Foliar pathogens face heterogeneous environments depending on the maturity of leaves they interact with. In particular, nutrient availability as well as defense levels may vary significantly, with opposing effects on the success of infection. The present study tested which of these factors have a dominant effect on the pathogen's development. Poplar leaf disks of eight maturity levels were inoculated with the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* using an innovative single-spore inoculation procedure. A set of quantitative fungal traits (infection efficiency, latent period, uredinia size, mycelium quantity, sporulation rate, sporulation capacity and spore volume) was measured on each infected leaf disk. Uninfected parts of the leaves were analyzed for their nutrient (sugars, total C and N) and defense compounds (phenolics) content. We found that *M. larici-populina* is more aggressive on more mature leaves as indicated by wider uredinia and a higher sporulation rate. Other traits varied independently from each other without a consistent pattern. None of the pathogen traits correlated with leaf sugar, total C, or total N content. In contrast phenolic contents (flavonols, hydroxycinnamic acid esters and salicinoids) were negatively correlated with uredinia size and sporulation rate. The pathogen's fitness appeared to be more constrained by the constitutive plant defense level than limited by nutrient availability, as evident in the decrease in sporulation.

Key words: constitutive defense, aggressiveness traits, plasticity, nutrient availability, rust fungus

1. Introduction

Plant diseases and pests are responsible for crop damage that may account for up to 40% of yield losses worldwide (Boonekamp, 2012). Pathogen aggressiveness, the quantitative component of pathogenicity (Pariaud *et al.*, 2009a), has been widely studied in order to forecast the evolutionary potential of plant pathogens and to better design disease control strategies (Lannou, 2012). Aggressiveness can be evaluated at different scales: by measuring the epidemic rate at the field scale or through elementary phenotypic traits at the individual scale (Pariaud *et al.*, 2009a). The environment plays a key role in developmental processes of the pathogen and influences the individual's phenotype and the scale of fitness (Jarosz & Davelos, 1995; Scheiner, 1993). Biotrophic fungal pathogens, such as rust and powdery mildew fungi, spend most of their life cycle within living plant tissues, so their fitness is directly affected by leaf physiology (Agrios, 2005; Duplessis *et al.*, 2013; Gamm *et al.*, 2011). On the one hand the leaf tissue provides the pathogen with the necessary nutrient resources for its development. On the other hand it impedes pathogen development through a battery of plant defense compounds (Ullah *et al.*, 2017).

Studies on interactions between plants and their foliar pathogens have shown that plant age, and especially leaf age, leads to different responses of the pathogen. Coleman (1986) postulated from a series of experiments that leaves pass through a peak of susceptibility to disease and pest attack. He proposed that for many stresses, including infection by biotrophic fungi, this peak coincides with changes in leaf properties during the transition from metabolite sink to source. This stage corresponds to a maximal nutrient availability. After this sink-source transition, free sugar content and thus nutrient resources decrease with increasing leaf maturity (physiological stage at a relative leaf age). Many studies support this view, demonstrating a maximum disease level before leaves are fully expanded and a decrease of disease severity on older leaves, which is also referred to as ontogenetic resistance (Farber & Mundt, 2017; Ficke *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2015). In agreement, Merry *et al.* (2013) demonstrated that the peak in the severity of powdery mildew along a primary shoot of *Vitis vinifera* corresponds to the position of the first leaf that does not import carbohydrates. However, some studies have reported a contrasting pattern, e.g. Knott & Mundt (1991) found that infection efficiency of the wheat leaf rust fungus *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* is 25% higher on older than on younger leaves in five wheat cultivars. The opposite trend may involve the dark side of plant-pathogen interaction: defense compounds. Their actions on a pathogen's development have been studied in several pathosystems, including rust fungi infecting poplar (Johnson & Kim, 2005), black currant (Vagiri *et al.*, 2017) and willow (Hakulinen *et al.*, 1999). Phenolic compounds present in leaves appear to highly influence the general plant resistance to fungi (Adandonon *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2017). Most studies have focused on plant susceptibility to the disease (*i.e.* infection efficiency of the pathogen) or focused on overall disease severity. To dissect which fungal function is most influenced by

leaf maturity and how, we propose to measure a set of elementary traits underlying components of aggressiveness.

Foliar pathogens of woody plants are good biological models to study the influence of leaf age on disease development, because they can infect leaves at various levels of maturity on the same host plant (Cellerino *et al.*, 1978; Sharma *et al.*, 1980; Turechek & Stevenson, 1998). Poplar is particularly well suited for studying the effect of leaf age on pathogens, since poplar plants grown from cuttings in a glasshouse produce new leaves at a constant rate, giving access to a wide range of leaves of increasing maturity on the same plant (Larson & Isebrands, 1971). These authors introduced the concept of leaf plastochron index (LPI) to refer to a position of a leaf along a poplar shoot. The youngest fully expanded leaf corresponds to LPI 1. Older leaves are numbered with increasing LPIs, according to their position along the shoot. In most experimental conditions the sink to source transition in poplar is established around LPI 6 (Coleman, 1986), which thus defines the first mature leaf. The effect of leaf maturity on the development of poplar pathogens (*Marssonina brunnea*, *Melampsora medusae* and *M. larici-populina*) has been widely studied (Cellerino *et al.*, 1978; Coleman, 1986; Giorcelli *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1980). In most of these experiments, leaves were spray-inoculated with spore suspensions. In these conditions, hundreds of spores compete for infection, and as a result, inoculum density has been shown to influence aggressiveness traits (Giorcelli *et al.*, 1996; Pariaud *et al.*, 2009a; Pei *et al.*, 2003). A way to eliminate any possible interaction among spores and to remove the effect of lesion density on trait variation is to use a single-spore inoculation protocol. Moreover, the single-spore inoculation enables the examination of phenotypic variation at the individual lesion level and not by means of average trait values measured on a cohort of lesions.

The aim of this study was to assess the effect of leaf age, and the associated content in nutrients and defense compounds, on the variation in aggressiveness traits in the poplar rust fungus *M. larici-populina*. We quantified trait variation along the leaf maturity gradient using the same fungal genotype to establish a so-called reaction norm (Gavrilets & Scheiner, 1993). We measured the effect of LPI using a single-spore inoculation method for a suite of aggressiveness and morphological traits: infection efficiency, latent period, uredinia size, sporulation rate, sporulation capacity, *in planta* mycelium quantity and urediniospore volume. In a first step, we examined the differences in pathogen development along a leaf maturity gradient in order to study the variation in fungal traits and to assess the correlations between them. In a second step, we estimated the influence of the most important leaf compounds (sugars, total carbon and nitrogen, and phenolics) on the variation in aggressiveness traits.

2. Material and methods

2.1. Plant and fungal material, and experimental design

Characterization of quantitative traits was performed on excised leaf disks of *Populus deltoides* × *P. nigra* ‘Robusta’. Poplar plants were grown from dormant cuttings in 10-liter pots containing a sand-peat (1:1, v/v) mixture, with an initial fertilization of 3.5 g L⁻¹ CaCO₃ and 6 g L⁻¹ of slow release 13-13-13 N-P-K fertilizer (Nutricote® T100, Fertil). The plants were grown in a growth chamber regulated at 20/22°C (night/day temperatures) and 16 h photoperiod in order to ensure optimal growth, and were watered daily with deionized water. After four months, plants were about 1.2 m high and exhibited 25 to 30 fully expanded leaves.

On the same day, we harvested eight leaves of different maturity (LPI 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20) from each of three plants (total of 24 leaves). From each poplar leaf, 24 disks (12-mm-diameter) were excised, and placed in flotation, each in a different cell culture plate. Each plate consists in 24 wells and thus contained one sample (leaf disk) of all leaves. A plate thus corresponded to a complete statistical block: Twenty-four replicate plates were prepared, each containing the 24 combinations of LPI and plants. Within plates, the positions of the samples were randomized (Supplementary Figure S1). After disk excision, the remaining part of each leaf (about half a leaf) was stored individually in an aluminum wrapper at -80°C for sugar, nitrogen, carbon and phenolic compound quantification. We hereafter refer to this plant material as ‘uninfected leaves’.

Because the single-spore inoculation protocol is highly time-consuming, we were not able to inoculate more than six plates per day. Inoculations of the 24 plates were thus distributed over four consecutive days (each inoculation day formed a series of six plates). In other words, all leaf disks were excised the same day (day 1), but inoculated after 0 to 3 days depending on the series they belonged to.

Our experimental design (randomized complete block design) thus consisted in three experimental factors: LPI, plant and day of inoculation. Given an infection efficiency of approximately 25%, we expected six replicates per combination.

2.2 Single-spore inoculation protocol

Single-spore inoculation was performed with pure *M. larici-populina* isolate 98AG31. This isolate was collected in 1998 in Moÿ-de-l’Aisne (France) on *Populus trichocarpa* × *Populus deltoides* ‘Beaupré’ leaves and serves since as a reference isolate (Duplessis *et al.*, 2011). Urediniospores were cryopreserved at -80°C at Institut National de la Recherche Agronomique Nancy (France) and multiplied on fresh poplar leaf disks before inoculation to maximize their germination and infection rates (Pei *et al.*, 2002). To this aim, 1 mg of

urediniospores was dispersed in 200 μL of water-agar (0.1 g L^{-1}). The resulting urediniospore suspension was applied as 2 μL droplets on the abaxial surface of two 30-mm-diameter leaf disks of 'Robusta'. Leaf disks were incubated by floating on deionized water in 6-well polystyrene cell culture plates, with the abaxial surface upside, at $19 \pm 1^\circ\text{C}$, and under continuous fluorescent light ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$). After a 10 to 13 days incubation period, the sporulating leaf disks were gently tapped over a microscope slide to release and collect urediniospores.

A germination test was performed just before inoculation to ensure the quality of urediniospores used. To this aim, a few hundred urediniospores were dispersed on the surface of a Petri dish containing agar (20 g L^{-1}). After an overnight incubation at $19 \pm 1^\circ\text{C}$, the ratio of germinated/total urediniospores was evaluated under a light microscope (100X magnification) to determine the germination rate. This test ensured that nearly all spores used for the experiment were physiologically able to germinate (mean germination rate of 93%).

For single-spore inoculation leaf disks were inoculated one by one. One single urediniospore was picked with a human eyelash under a stereomicroscope (63X magnification) and deposited into a 5 μL water-agar droplet placed at the center of the poplar leaf disk (abaxial surface). After inoculation the plates were incubated for 13 days in the same conditions as described above.

2.3 Quantitative trait measurements

Several aggressiveness traits classically studied in plant-pathogen interactions were measured: infection efficiency, latent period, uredinia size, sporulation rate, and sporulation capacity (Lannou, 2012). In addition, we measured *in planta* mycelium quantity, which is less commonly studied.

- *Infection efficiency* is commonly defined as the probability that a urediniospore deposited on a receptive host surface produces a lesion (Lannou, 2012).
- *Latent period* is defined as the time interval between infection and the onset of sporulation from that infection (Lannou, 2012).
- *Uredinia size* is defined as the surface area that produces the urediniospores (Kolmer & Leonard, 1986; Robert *et al.*, 2004), and has been suggested to be an indication of the pathogen capacity for host tissue colonization (Lannou, 2012; Pariaud *et al.*, 2009b). However, the uredinia size is not a proxy of tissue colonization by *M. larici-populina*, as no necrosis is observed. Unlike necrotrophic pathogens, the only visual symptom is the opening in the leaf epidermis, through which urediniospores are extruded.

- *Sporulation rate* is defined as the number of urediniospores produced by the uredinia per unit of time (Clifford & Clothier, 1974; Kardin & Groth, 1989; Leonard, 1969): sporulation rate = urediniospore number / (13 – latent period).
- *Sporulation capacity* is defined as the amount of spores produced per unit area of sporulating tissue per unit of time (Dowkiw *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2002). It characterizes the flux of spores extruded by the uredinia and is calculated as the ratio between sporulation rate and uredinia size.
- *Mycelium quantity* which gives a proxy of the fungal colonization *in planta* is assessed using qPCR analysis on leaf disks (see below).

Beyond these six quantitative aggressiveness traits, we also measured a morphological trait:

- *Volume of urediniospores* was computed from length and width of urediniospores obtained from image analysis (see below).

We monitored the infections for 13 days, allowing measurements of latent period and infection efficiency. Emergence of uredinia was scored twice a day, at 9 a.m. and at 4 p.m. Infection efficiency was assessed for each leaf disk and was recorded as a binary variable: 1 if the deposited urediniospore produced one uredinia, 0 if not.

At day 13 (end of the monitoring period), leaf disks were harvested. We harvested all infected leaf disks (total: 158 samples out of 576 leaf disks inoculated, mean infection efficiency of 27.4 %), giving from four to twelve biological replicates per LPI and per plant (mean: 6.58 replicates). The first step of the harvest consisted in separating the urediniospores produced from the leaf disk. Infected leaf disks were placed in 2 mL Eppendorf tubes with 2 mL of Isoton® II isotonic buffered diluent (Beckman Coulter). The tubes were vigorously shaken for 20 sec at 4 m s⁻¹ on a MP FastPrep®-24 homogenizer, in order to release all urediniospores from the uredinia. The second step consisted in measuring the size of the uredinia (or lesion size): photographs of the spore-free uredinia were taken under a stereomicroscope (25 x magnification) coupled to a digital camera. Pictures were analyzed using ImageJ version 1.5i with a dedicated script (Supplementary Note S1). To measure the number of yellow pixels corresponding to the sporulating area, the Hue Saturation and Brightness was used: pixels with a hue under 37° were counted. Last, infected leaf disks were stored at -80°C and lyophilized before DNA extraction.

Measurements of both sporulation rate and urediniospore morphological parameters were performed on the urediniospore suspensions using an Occhio® Flowcell FC200+ optical morphogranulometer, which allows simultaneous particle counting and image analysis of the particles. Before counting, urediniospore suspensions were vortexed to disperse clusters of urediniospores. For each sample, counting was performed using the following settings: 0.15 mL of priming, 0.85 mL of volume analysis and 7 % of volume sampling (i.e. 7 %

within 0.85 mL were really analyzed, evenly distributed along the analyzed volume). Two filters parameter values were applied:

- For urediniospore counting: bluntness between 0.6 and 1; length of ellipse minor axis between 20 and 60 μm ; ellipse elongation between 0.18 and 0.79; and ISO eccentricity higher than 0.15,
- For urediniospore size measurement: bluntness between 0.6 and 1; inertia Feret elongation between 0.25 and 1; ISO eccentricity higher than 0.1; minimum Feret diameter between 13.5 and 70 μm ; and Feret diameter length between 23 and 200 μm .

These filters were applied on the raw data to compute sporulation rate expressed in spores per day, length and width of urediniospores produced by each uredinia. The volume of urediniospores was computed following the formula of the volume of an ellipsoid (Philibert *et al.*, 2011):

$$\text{Spore volume} = \frac{4}{3}\pi \times \frac{\text{length}}{2} \times \left(\frac{\text{width}}{2}\right)^2$$

2.4 DNA extraction and qPCR quantitation of *in planta* mycelium

DNA was extracted from infected poplar leaf disks using the DNeasy96® DNA plant kit (Qiagen). The Frozen Plant Tissue protocol (DNeasy 96 Plant Handbook, June 2015) was followed except that twenty 1-mm-diameter glass beads were added to one 3-mm-diameter tungsten carbide bead in the 2 mL Eppendorf tubes. The 158 samples were randomly processed in two DNA extraction plates, which were stored at 4°C until qPCR analysis.

In order to correct for amplification differences among qPCR, three technical replicates were performed.

In order to quantify *M. larici-populina* mycelium *in planta*, quantitative Taqman® PCR was performed using new primers and probe designed for the rDNA ITS (Internal Transcribed Spacer). These primers and probe allowed a significant gain in sensitivity compared to a previously used primer pair, which was designed for a single-copy gene (Guinet *et al.*, 2016). Reagent mix contained 3.1 μL of pure water, 6.5 μL of Mastermix®, 0.13 μL of primer ITS-Mlp-F (Primer sequence 5'-3': TGACTCTTTGTATAAACCATTACCC), 0.13 μL of primer ITS-Mlp-R (TCAAAGTTGCCTTTGAGATACG) and 0.13 μL of probe ITS-Mlp-P (6-FAM-TGCATTGTGGCCCGTCAAAA-BHQ1) per sample. A volume of 3 μL of extracted DNA was added to 10 μL of reagent mix. Standard samples consisted of calibrated quantities of plasmid DNA containing the cloned ITS amplicon. Two series of eight ten-fold dilutions of plasmid DNA (from 1.47×10^7 to 1.47 fg μL^{-1}) were included in each qPCR run to set a standard curve. Quantitative PCR runs were performed on a QuantStudio 6 Flex (Life Technologies) machine and consisted in 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15 sec at 95°C and 45 sec at 62°C. DNA quantity was analyzed using the QuantStudio™ Real-time PCR software (version 1.1).

2.5 Leaf content measurements: total nitrogen and total carbon contents, sugars, phenolic compounds

All leaf content measurements were conducted on the uninfected leaves, stored at -80°C just after disk excision.

Total nitrogen and total carbon concentrations in uninfected leaves were analyzed using an elemental analyser (Thermo Quest, Type NCS 2500). Measurements, data analysis, data record and weighing record (Mettler Tolédo MT5 microbalance) were performed using the EAGER 200 software.

Soluble sugars were extracted from 20 mg of dry leaf powder with 1 mL of 70% (v/v) methanol/water for 10 min and then centrifuged at 17,000 g for 5 min at 4°C . This step was repeated twice and the resulting supernatants were pooled together. The supernatants, containing soluble sugars, were dried overnight with a vacuum evaporator (Maxi-Dry Plus; Hetomodel DW1, 0-110, Heto-HOLTEN A/S) to eliminate methanol. Dried extracts were rehydrated in 1.5 mL of distilled water, dissolved by sonication and then filtered at $0.2\ \mu\text{m}$ (Acrodisc®Supor® filter; $0.2\ \mu\text{m}$, Van Waters Rogers). Undiluted aliquots of $20\ \mu\text{L}$ were injected into a high-pressure liquid chromatography system (Dionex™ ICS-5000+ HPLC™) to determine soluble sugar composition. Soluble sugar separation was achieved on a Dionex™ CarboPac™ SA10 IC separation column ($6\ \mu\text{m}\ 250 \times 4\ \text{mm}$; Thermo Scientific™). The flow rate was maintained at $1\ \text{mL min}^{-1}$, and the column temperature at 40°C . Individual carbohydrates were eluted from 0 to 30 min after injection. The sugar peaks were detected by light scattering (Sedex 45 ELSD system, Seder) then identified according to retention time and commercial standards. Sucrose, glucose and fructose concentrations (% of dry weight) were determined by peak height and standard calibrations.

Phenolics were extracted from 30 mg dry leaf powder using the method described by Royer *et al.* (2013). Total phenolic content was determined according to the Folin-Ciocalteu method. Briefly, each extract was diluted 1:16 in distilled water, and $20\ \mu\text{L}$ of each diluted extract was distributed in a 96 well plate. Then $100\ \mu\text{L}$ of Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma), diluted 1:10 in distilled water, and $80\ \mu\text{L}$ of 7.5% sodium carbonate (w/v) were added. The microplate was incubated 30 min at 25°C and shaken 5 s every 10 minutes. Absorbance of the sample was measured with a microplate-reader (SynergyHT, BioTek) at 760 nm. Quantification of total phenolics was performed according to a calibration curve of gallic acid and the results were expressed as mg of gallic acid equivalent per g of leaf dry weight.

In addition to total phenolic content, the concentration of major phenolics was analysed on Ultra-High Performance Liquid Chromatography (U-HPLC) system (Shimadzu) equipped with a photo Diode Array Detector (DAD) and a mass spectrometer. Each sample ($3\ \mu\text{L}$) was separated on a C18 kinetex ($100 \times 2.1\ \text{mm}$) column (Phenomenex). The mobile phase

consisted in 0.1% formic acid in ultra-pure water (solvent A) and 0.1% formic acid in methanol (solvent B). The molecules were eluted with a flow rate of 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, through a gradient elution from 1 to 50 % B for 10 min, then to 99 % B in 3 min which was maintained for 3 additional minutes. The column was then re-equilibrated to 1 % B for 4 minutes prior to the next run. Mass spectrometry analysis was carried out in ESI positive and negative modes. Quantification was performed by measuring the area under each peak at 280, 320 or 350 nm, depending on the lambda max of each molecule. Due to co-eluting signal at 280 nm, catechin quantification was realized by measuring the area under peak at m/z 289, corresponding to the $[\text{M-H}]^-$ of the molecule. Experimental exact masses and MS fragments were compared to metabolomics databases (Respect: <http://spectra.psc.riken.jp/>; MassBank: <http://massbank.jp/>, DNP:<http://dnp.chemnetbase.com/>) and data available in the literature in order to identify the nature of the metabolites. Sixteen phenolic compounds were identified. According to their structure, these 16 metabolites could be grouped into four phenolic subclasses which are flavan-3-ols (catechin, proanthocyanidin dimer), hydroxycinnamic acid esters (chlorogenic acid, caffeoyl shikimate, caffeoyl glucose isomers (x2), coumaroyl glucose isomers (x2)), flavonols (rutin, quercitrin) and salicinoids (salicine, salicortin, acetylsalicortin, homaloside D, tremulacin and a putative populoside) (Supplementary Figure S2).

2.6 Data analysis

Principal component analyses (PCA) and linear models were used to explore correlations between phenotypic traits. Each independent phenotypic trait was analyzed separately using a generalized linear model evaluating effects of LPI, plant, day of inoculation, and the interaction between LPI and plant. To normalize the error, infection efficiency was analyzed with a binomial error family; latent period and sporulation capacity with a Gamma error family; uredinia size, spore volume, sporulation rate, and mycelium quantity with a Gaussian error family; and uredinia size and sporulation rate were square root transformed. An analysis of variance (ANOVA) with an alpha error < 5% was performed on each model. Differences of means were checked with Tukey tests. PCA on leaf characteristics was performed to explore their variations. Spearman correlation coefficients between phenotypic traits and leaf content were computed on mean phenotypic traits per LPI and plant based on four to twelve replicates. Spearman correlation coefficients' associated P -values were adjusted with a False-Discovery-Rate correction for multiple tests. All data analyses were performed using R version 3.2.5 (see details in the RMARKDOWN document, Supplementary Note S2).

3. Results

3.1 Variation in *M. larici-populina* quantitative traits

To describe the variation in quantitative traits of *M. larici-populina* in this experiment, a PCA was performed on individual trait measurements assessed for each infected leaf disk (latent period, uredinia size, sporulation rate, sporulation capacity, mycelium quantity and mean volume of produced spores). Infection efficiency cannot be included in the PCA analysis because it is set to one for infected leaf disk. Experimental factors (LPI, plant harvested and day of inoculation) were considered as supplementary variables. The first principal component (PC1) explained 31% of the total inertia and was related to uredinia size, sporulation rate and to a lesser extent to sporulation capacity (Figure 1). PC2 and PC3 accounted for almost 20% and 17% of the total variance, respectively. PC2 was related to latent period which varied independently from uredinia size and sporulation rate and PC3 was related to spore volume. However, there was large dispersal of individual measures that remained unexplained by experimental factors (Supplementary Note S2).

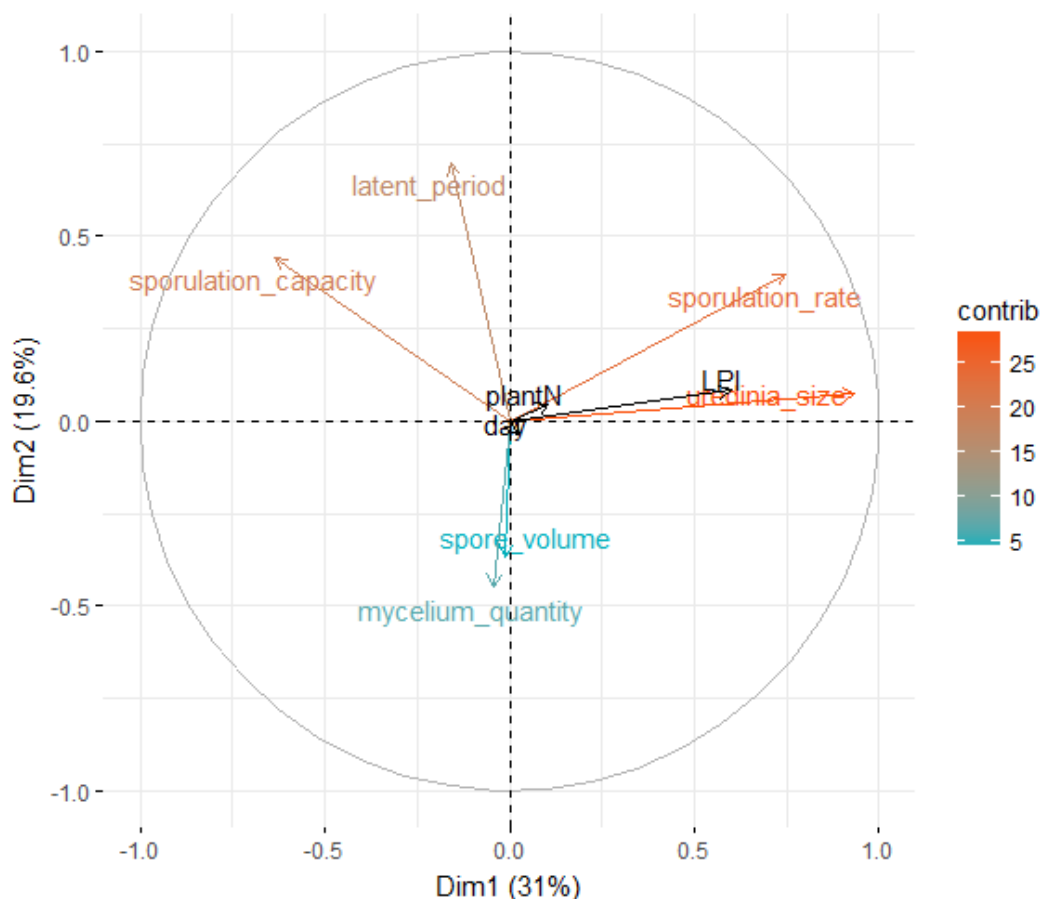


Figure 1: Principal component analysis of fungal phenotypic traits (latent period, uredinia size, sporulation rate, sporulation capacity, spore volume, and mycelium quantity, measured on 4 to 12 replicates per LPI and per plant); LPI, plant and day are supplementary variables. Colors correspond to variables' contribution to the first and second axes.

In accordance with PCA analysis, LPI was the main structuring variable in GLM analyses and had a significant effect on uredinia size ($P_{\text{adjusted}} = 1.22 \times 10^{-21}$), sporulation rate ($P_{\text{adjusted}} = 7.67 \times 10^{-15}$) and sporulation capacity ($P_{\text{adjusted}} = 1.40 \times 10^{-05}$) (Table 1). Uredinia size and sporulation rate increased with the LPI, while sporulation capacity decreased (Figure 2). Uredinia size exhibited a 3-fold increase (from 0.272 to 0.737 mm²) and sporulation rate a 2-fold increase (from 333 to 611 urediniospores day⁻¹) from LPI 6 to 20 (Figure 2). Sporulation capacity was reduced more than 2-fold from LPI 6 to 20 (from 12,420 to 5,800 urediniospores day⁻¹ mm⁻²) (Figure 2). The sporulation rate was also significantly, although less strongly, explained by the plant used for the experiment ($P_{\text{adjusted}} = 4.63 \times 10^{-05}$). Sporulation rate was significantly higher on plant No. 3 (mean rate = 526 urediniospores day⁻¹) and lower on plant No. 2 (mean rate = 396 urediniospores day⁻¹) (Figure 2), but no interaction was found between plant and LPI (Table 1). Other fungal traits varied but not in accordance with LPI, plant and day (Supplementary Figure S3).

We found no significant effect of the day of inoculation on any aggressiveness traits. As there was no difference in fungal traits across days of inoculation, we assumed that the incubation conditions during the pre-inoculation period described above kept the leaf disks in their initial physiological state.

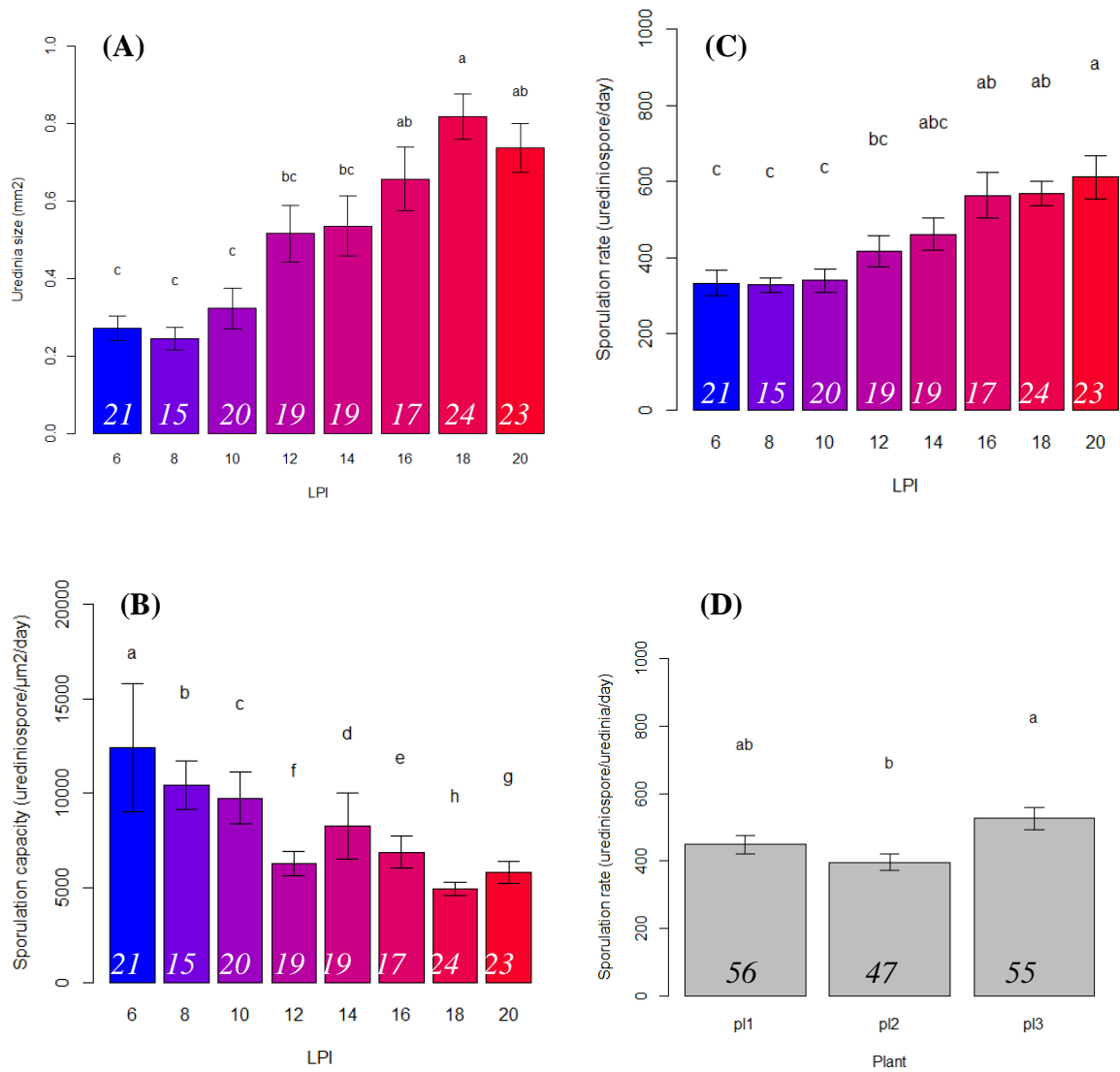


Figure 2: Barplots of means and standard error calculated on three plants and 15 to 24 replicates per LPI (italic numbers at the bottom of the bars) of **(A)** uredinia size, **(B)** sporulation capacity, and **(C)** sporulation rate for each LPI; and **(D)** sporulation rate for each plant. Letters correspond to Tukey test results.

Table 1: Summary of the analysis of variance of each experimental variable in generalized linear models (Chi-square test probability adjusted with a False-Discovery-Rate correction for multiple tests).

Traits	LPI	Plant	LPI:Plant	day
Infection efficiency	0.459	0.661	0.346	0.165
Latent period	0.720	0.165	0.720	0.661
Uredinia size	1.22×10^{-21}	0.092	0.458	0.346
Spore volume	0.980	0.362	0.720	0.720
Sporulation rate	7.67×10^{-15}	4.63×10^{-05}	0.497	0.090
Sporulation capacity	1.40×10^{-05}	0.379	0.720	0.092
Mycelium quantity	0.866	0.980	0.996	0.720

P-values < 0.05 are indicated in bold characters.

3.2 Variation in leaf content characteristics

To assess leaf content variations among the range of leaf maturity, a PCA was performed on leaf characteristics (Figure 3). Leaf characteristics were measured on one uninfected half-leaf of each plant and each LPI, so only plant and LPI supplementary variables were taken into account. PC1 explained almost 53% of the total inertia and was highly related to sugars (sucrose, fructose, glucose) and phenolic compounds (total phenolics, and all the phenolic subclasses) variations. Explaining 18% and 12% of the inertia, PC2 and PC3 were associated to sucrose and nitrogen, respectively. The total carbon content of leaves did not vary among the range of leaf maturity studied. Leaf maturity, characterized by the content in phenolic compounds, appeared to structure more leaf characteristics than plant did.

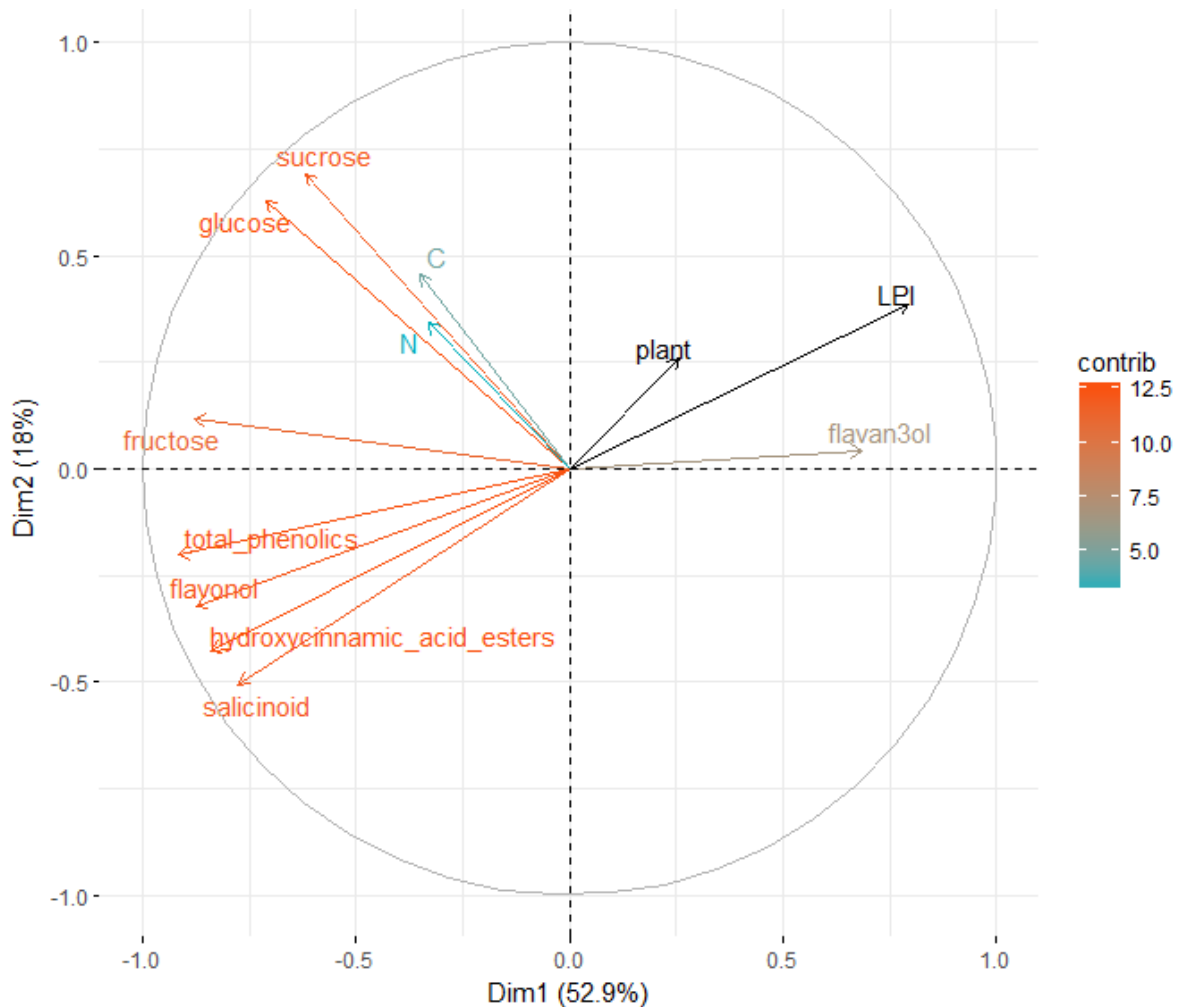


Figure 3: Principal component analysis on leaf chemical content (carbon, nitrogen, glucose, fructose, sucrose, total phenolics, flavan-3-ols, hydroxycinnamic acid esters, flavonols and salicinoids), LPI and plant are supplementary variables. Colors correspond to variables' contribution to the first and second axes.

3.3 Correlation of fungal phenotypic trait variation and leaf content characteristics

To assess how fungal and leaf data were correlated, pairwise Spearman's correlation coefficients and their adjusted P -values were calculated.

Spearman's coefficient for uredinia size and both sporulation rate and sporulation capacity were highly significant ($\rho = 0.87$ and -0.73 , $P_{\text{adjusted}} = 3.37 \times 10^{-6}$ and 4.66×10^{-4} respectively) (Figure 4), which is consistent with PCA results on individual traits. No other Spearman's coefficient appeared significant between fungal traits.

Spearman coefficients showed a negative correlation between total phenolic content and uredinia size and sporulation rate ($\rho = -0.77$ and -0.61 , $P_{\text{adjusted}} = 1.62 \times 10^{-4}$ and 1.07×10^{-2} respectively), as well as a negative correlation between hydroxycinnamic acid esters content and uredinia size and sporulation rate ($\rho = -0.83$ and -0.68 , $P_{\text{adjusted}} = 2.25 \times 10^{-5}$ and 1.85

$\times 10^{-3}$ respectively), and a positive correlation between hydroxycinnamic acid esters content and sporulation capacity ($\rho = 0.68$, $P_{\text{adjusted}} = 1.85 \times 10^{-3}$) (Figures 4, 5). Three of the four phenolic subclasses (salicinoids, hydroxycinnamic acid esters and flavonols) showed the same trends as total phenolic content, with the exception that the correlation between sporulation rate and sporulation capacity, on one side, and salicinoids and flavonols, on the other side, were not significant ($P_{\text{adjusted}} > 0.05$). In accordance with the PCA on leaf characteristics, all sugar contents were correlated with each other. However, no correlation was found between fungal phenotypic traits and sugars, carbon and nitrogen contents. Salicinoids, flavonols and hydroxycinnamic acid esters were all positively correlated to each other. Flavan-3-ols were, however, negatively correlated to the three other phenolic subclasses, although this was only significant with flavonols.

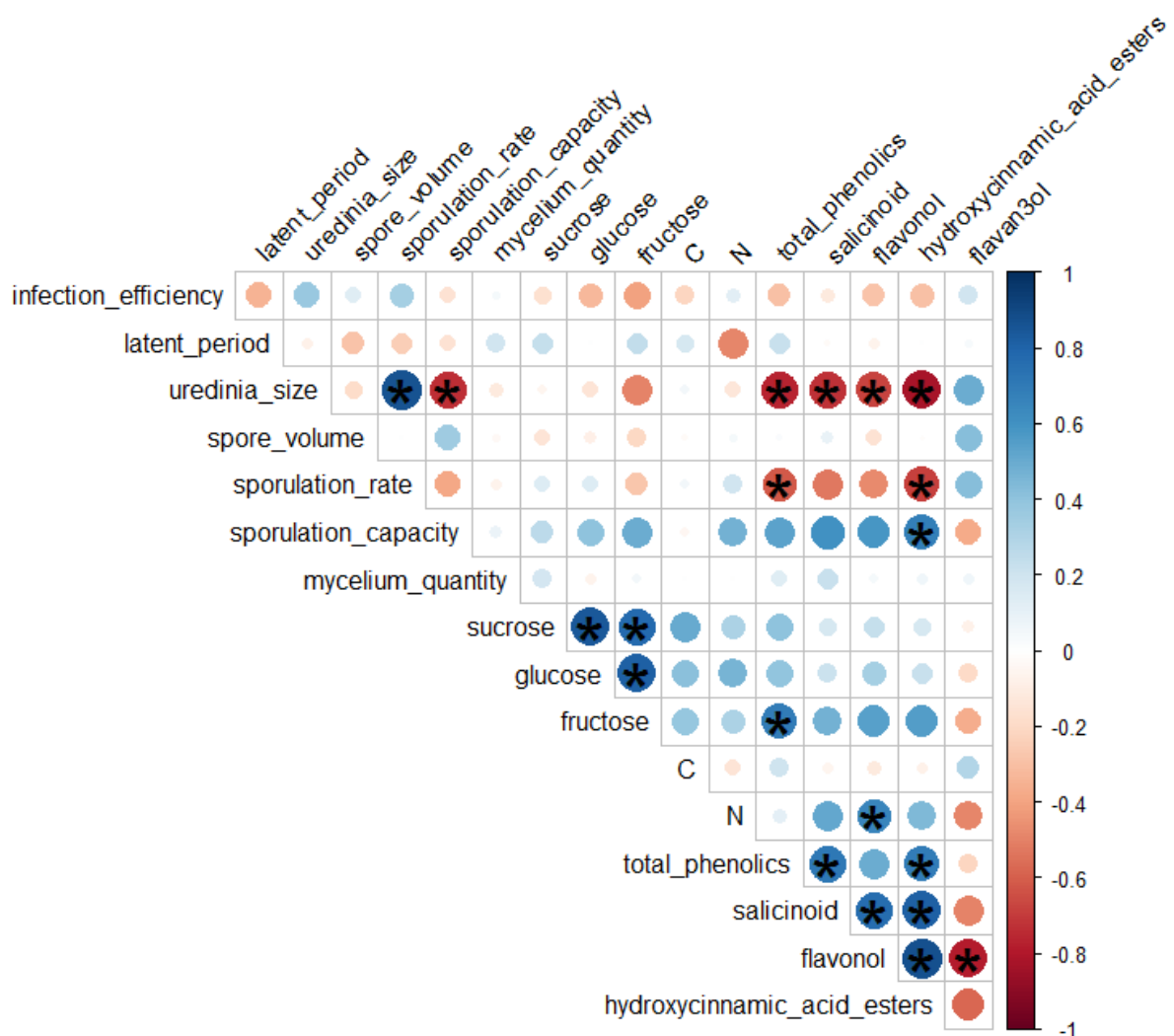


Figure 4: Pairwise Spearman correlation coefficients between leaf chemical content and mean fungal phenotypic traits per LPI and plant based on 4 to 12 replicates. Colors correspond to the sign and dot size to the strength of the correlation. Stars indicate significant correlations according to Student t-test adjusted with a False-Discovery-Rate correction for multiple tests.

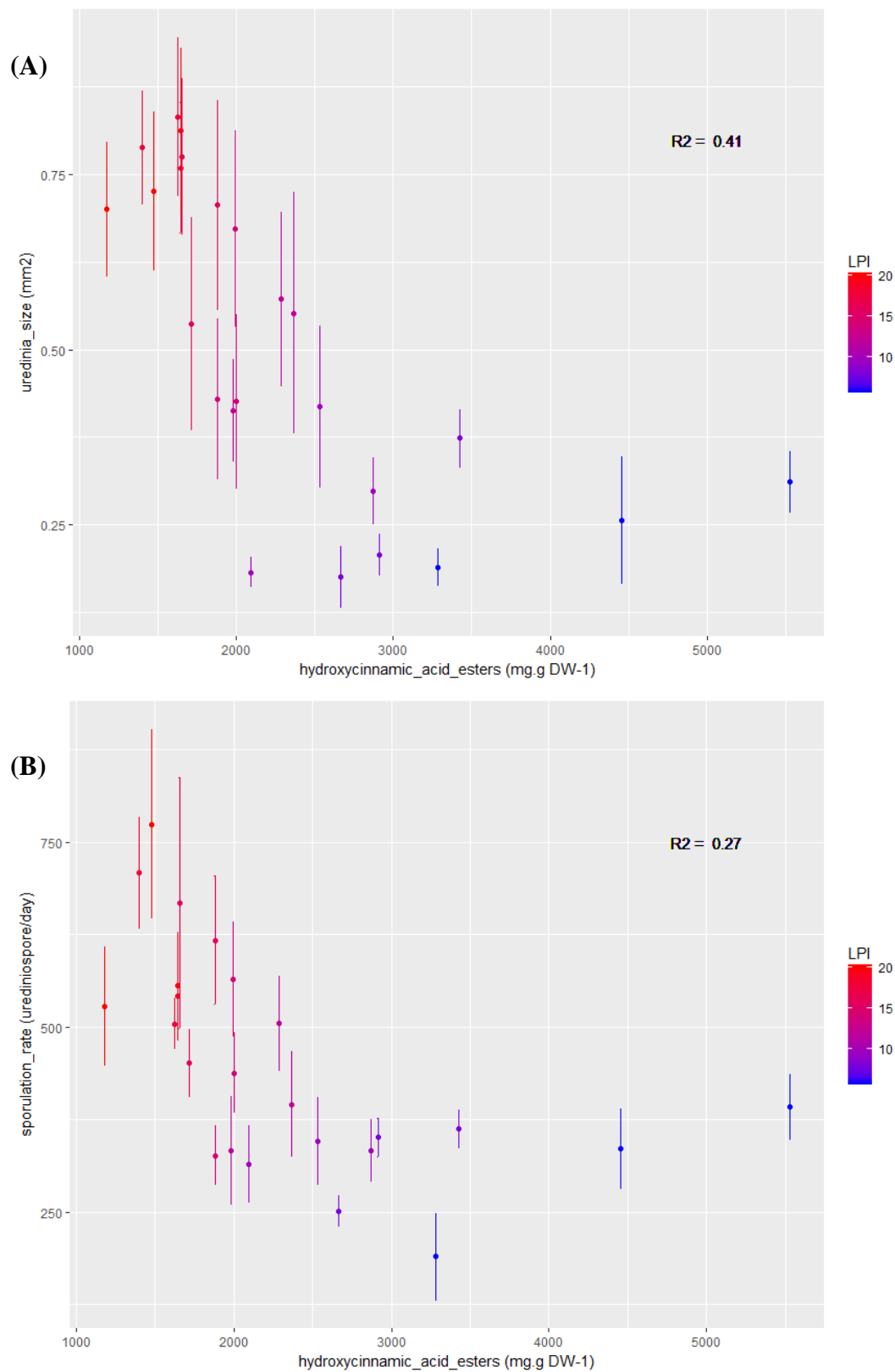


Figure 5: Bivariate plots (LPI and plant mean \pm standard error calculated on three plants and 15 to 24 replicates per LPI) showing the variation in (A) uredinia size and (B) sporulation rate according to the phenolic subclass hydroxycinnamic acid esters content. Colors stand for LPI and R^2 gives the coefficients of determination.

4. Discussion

In this study we analyzed the variation in seven aggressiveness and morphological traits of the poplar rust fungus when inoculated on poplar leaves of varying maturity levels. A single-spore inoculation technique was used, which enabled us to study trait variance and covariance at the individual lesion level. Applying this method, we aimed at assessing the effect of leaf maturity on aggressiveness traits of *M. larici-populina*. In a second step, we explored correlations between the variation in fungal phenotypic traits and physiological features of the leaves in order to determine whether variation in phenotypic traits was influenced by nutritive or defensive compounds of leaves.

4.1 Effect of leaf maturity on aggressiveness and morphological traits

Regarding the variation in aggressiveness traits, our first result was a positive correlation between uredinia size and sporulation rate, whereby both increased with leaf maturity. That is, on more mature leaves, uredinia were wider with a higher production of urediniospores. Some authors found that the breaking down of sporulation rate into uredinia size and sporulation capacity enabled to explain differences in aggressiveness levels: an increase in sporulation rate can either be due to wider uredinia or higher sporulation capacity (flux of urediniospores) (Pariaud *et al.*, 2009b). In our study, we found that the increase in sporulation rate is linked to wider uredinia, but not to higher sporulation capacity. The correlation between uredinia size and sporulation rate has already been identified by several authors, including Dowkiw *et al.* (2003) on poplar rust, Pei *et al.* (2002) on willow rust and Robert *et al.* (2002) on wheat leaf rust. Based on our data, we add to this that sporulation capacity is not necessarily even as assumed by Robert *et al.* (2002). Indeed, sporulation capacity significantly decreased with leaf maturity, in contrast to uredinia size and sporulation rate. Even if the flux of urediniospores was lower on mature leaves, the amount of urediniospores produced was higher, leading to an increased aggressiveness on mature leaves compared to younger ones.

In this study we also quantified individual variation in mycelium quantity through qPCR analysis. This trait has received little attention as a component of aggressiveness, mostly for methodological reasons. However it can serve to measure the relative investment in sporulation vs. mycelium growth, the two main functions to which host extracted resources are allocated (Gilchrist *et al.*, 2006; Yegorov *et al.*, 2017). Notably, the quantity of *in planta* mycelium did not vary along the leaf maturity gradient and was correlated to neither sporulation rate nor lesion size. Hence, lesion size does not equate to mycelium quantity. This makes sense as for biotrophic fungi like rusts, lesion (uredinia) size is only the size of the aperture through which urediniospores are extruded, and may thus not be directly linked to the size of the area within a leaf that is colonized by the mycelium.

Neither leaf maturity, nor the two other experimental factors (plant and day of inoculation) had an effect on latent period, infection efficiency, mycelium quantity and spore volume, even though substantial variances were observed for those traits. The latent period and spore volume varied independently from each other and independently from the main structuring traits (uredinia size and sporulation rate). Variation in latent period and spore volume might have been affected by an unidentified environmental factor. Even though inoculated leaf disks were incubated under controlled conditions of temperature and light, micro-scale variation may have occurred for these crucial parameters influencing fungal development and infection dynamics (Cochrane, 1959; Pap *et al.*, 2013; Rotem *et al.*, 1978; Trapero-Casas & Kaiser, 1992; Turechek *et al.*, 2001; Turechek & Stevenson, 1998). Moreover, the initial position of the disk in the leaf might have influenced infection outcome (Johnston *et al.*, 2016; Katsuya & Green, 1967). Single-spore inoculation is more prone to inter-replicate variance, in contrast to spray-inoculation which buffers micro-environmental variations. Apart from this drawback, this method allowed us to accurately disentangle the variation in each trait and to properly assess putative correlations. In our study, the dissection of the infection process into elementary traits enabled us to assess that the leaf maturity gradient only influences the sporulation function.

4.2 Disentangling nutritive limitation vs defense reaction effects

Two hypotheses were considered to explain variation in uredinia size and sporulation rate. On the one hand, sporulation could be enhanced by a higher nutrient availability in older leaves. On the other hand, higher levels of defense compounds could in contrast prevent fungal development in younger leaves.

Leaf sugars have long been known to be essential to the development of plant pathogenic fungi (Bilgrami & Verma, 1978; Madan & Thind, 1998). Using *Populus deltoides* leaves inoculated with *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*, Coleman (1986) showed that the maximum level of susceptibility, measured by the number of lesions (uredinia) as a proxy for infection efficiency, is reached when the sugar availability is maximal, i.e. at a LPI of 5. This finding is inconsistent with our study, in which the infection efficiency did not vary with leaf maturity and the two responsive traits (uredinia size and sporulation rate) steadily increased from LPI 6 to 20. The discrepancy between Coleman's (1986) experiments and our results may lie in differences in the growth conditions of poplar plants, which may lead to different levels of nutrient availability. The light quality available in growth chambers has been significantly improved during the last decades. In Coleman's experiment (1986) the total sugar content decreased from LPI 6 to 9 (the highest LPI measured). In our experiment, even though sugar contents displayed some variance among leaves, there was no consistent pattern along LPI. Our growth conditions may have led to sugar availability sufficient for steady infection success even at higher LPI. We therefore conclude that leaf sugar content may not be linked to leaf susceptibility *per se*.

Leaf nitrogen content also plays a role in fungal growth and sporulation (Bilgrami & Verma, 1978; Madan & Thind, 1998). Bilgrami & Verma (1978) stated that nitrogen sources are used by fungi for both structural and metabolic functions. These functions require the assimilation of nitrogen into amino acids, proteins and some peptides. For example, Jensen & Munk (1997) and Robert *et al.* (2004) found that higher nitrogen fertilization enhanced barley powdery mildew and wheat leaf rust sporulation. In our experiment, although there was a substantial variance in leaf nitrogen contents (same order of magnitude as in Robert *et al.* (2004)), this variation did not significantly affect *M. larici-populina* development. The leaf nitrogen content only slightly correlated with latent period and sporulation capacity (urediniospores produced per day and per area).

Overall, we did not observe consistent variation in nutrient content along the leaf maturity gradient and, moreover, the variation in nutrient content was not correlated with the two responsive traits, uredinia size and sporulation rate. Consequently, nutrient availability was apparently not the environmental factor best explaining fungal development in our experiment.

By contrast, the defense hypothesis, tested by assessing the constitutive level of phenolics (total and individual) appeared to better explain fungal development related to leaf age. Indeed, the total phenolic content decreased with leaf age and correlated negatively with uredinia size and sporulation rate. Although higher phenolic concentration in younger leaves is common in poplar and other plants (Coleman, 1986; Johnson & Kim, 2005; Royer *et al.*, 2013; Ullah *et al.*, 2017), the correlation between phenolic concentrations and resistance to fungal infection has not been demonstrated. Coleman (1986) and Coleman *et al.* (1987) did not detect a correlation between leaf phenolic content and the amount of uredinia produced by *M. medusae* on poplar trees. By contrast, in the same pathosystem, a negative correlation was observed between total phenolic content and urediniospore germination efficiency and hyphae length (Johnson & Kim, 2005). Other studies on black currant (*Ribes nigrum*) and willow (*Salix myrsinifolia*) identified negative correlation between the concentrations of phenolic compounds and development traits of rusts (Hakulinen *et al.*, 1999; Vagiri *et al.*, 2017). By analyzing specific phenolics from poplar leaves we were able to precisely identify groups of phenolic compounds that correlate with poplar resistance to rust. Among the four phenolic subclasses (from a total of 16 compounds), three subclasses (hydroxycinnamic acid esters, flavonols and salicinoids) showed the same effect as total phenolic contents and correlated negatively with uredinia size and sporulation rate. The hydroxycinnamic acid ester chlorogenic acid has been shown to correlate to rust resistance in black currant (Vagiri *et al.*, 2017). In addition, several studies highlighted the role of leaf surface flavonoids in the resistance to rust in poplar and birch (Shain & Miller, 1982; Valkama *et al.*, 2005). In our study, we did not address the leaf location (inside or on the surface) of the two flavonols, rutin and quercetrin, however, the fact that they negatively correlate with rust development is in

agreement with these previous studies. The only phenolic subclass that did not correlate with resistance to rust was flavan-3-ol which integrates catechin and proanthocyanidin dimers. A role of this phenolic subclass – especially catechin – in resistance to fungal pathogens, including rust fungi, has been proposed in several studies (Brignolas *et al.*, 1998; Hakulinen *et al.*, 1999; Vagiri *et al.*, 2017). Moreover, a recent study on the *M. larici-populina* - *Populus nigra* pathosystem demonstrated that catechin is an effective chemical defense compound against rust (Ullah *et al.*, 2017). This demonstration was based on the fact that (i) catechin is strongly induced upon rust infection, (ii) catechin exhibit a strong antifungal activity against *M. larici-populina* at *in planta* concentration and (iii) poplar engineered to accumulate high or low levels of catechin were more resistant or more susceptible to rust, respectively. In our study, the concentrations of flavan-3-ols increased with leaf age. The same trend was observed in the study by Ullah *et al.* (2017) (see Figure S2). The absence of a correlation between flavan-3-ol concentrations and rust resistance does not indicate that flavan-3-ols are not important factors in leaf rust resistance. Indeed, the compounds were assayed in uninfected leaves; hence reflect constitutive (i.e. non-induced) defense levels. In addition, the concentrations measured in our experiment (from 0.2 to 0.5 mg.g DW⁻¹) were below the concentrations proven to efficiently impair rust development on black poplar leaves (Ullah *et al.*, 2017).

5. Conclusion

Melampsora larici-populina development after single-spore inoculation onto poplar leaf discs was more constrained by the level of plant constitutive defenses than limited by nutrient availability. For the tested strain, uredinia size and sporulation rate, both components of the sporulation function, were the only traits responsive to reaction norms along a gradient of leaf maturity. This experiment – conducted on a single fungal isolate and on a single plant genotype – can nonetheless serve as a pilot study. We report the correlation of a fungal fitness component (sporulation) to an environmental characteristic imposed by the leaf *i.e.* the constitutive level of phenolic content. In the future, it would be worthwhile to assess the generality of this finding with more fungal isolates and plant genotypes and decipher further the interplay between constitutive and induced defense compound levels. From a broader perspective, it would be interesting to determine the plasticity and heritability of sporulation-related traits to better assess how the complexity of leaf environment shapes the evolutionary trajectory of a plant pathogen.

Acknowledgments

Jérémy Pétrowski is acknowledged for his excellent technical help in poplar plant production. We thank Jacqueline Marchand and Carole Antoine (Université de Lorraine, AgroParisTech, Inra, SILVA, Nancy) for the poplar leaf content analyses, Aude Fauvet for the analysis of total phenolics, and Didier Le Thiec for the lyophilization of the samples. We thank Irène

Hummel for advices in statistical analyses, Rantanplan for inspiration, Josselin Montarry, Elisabeth Fournier, Stéphane De Mita, Claire Fourrey and Katherine Hayden for valuable comments on earlier drafts of this manuscript.

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-13-BSV7-0011, FunFit project; ANR-11-LABX-0002-01, Cluster of Excellence ARBRE). A. Maupetit and M. Pernaci were supported by PhD fellowships from the Region Lorraine and INRA, and from the French Ministry of Education and Research (MESR), respectively.

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.

References

- Adandonon A, Regnier T, Aveling TAS, 2017. Phenolic content as an indicator of tolerance of cowpea seedlings to *Sclerotium rolfsii*. *European Journal of Plant Pathology* **149**, 245–251.
- Agrios GN, 2005. *Plant Pathology*. New York: Elsevier Academic Press.
- Bilgrami KS, Verma RN, 1978. *Physiology of fungi*. New Delhi: Vikas Publishing House Pvt Ltd.
- Boonekamp PM, 2012. Are plant diseases too much ignored in the climate change debate? *European Journal of Plant Pathology* **133**, 291–294.
- Brignolas F, Lieutier F, Sauvard D, Christiansen E, Berryman AA, 1998. Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica*. *Canadian Journal of Forest Research* **28**, 720–728.
- Cellerino GP, Anselmi N, Pinon J, 1978. Influence de l'âge des feuilles de peuplier sur la sensibilité à *Marssonina brunnea*. *European Journal of Forest Pathology* **8**, 273–279.
- Clifford BC, Clothier RB, 1974. Physiologic specialization of *Puccinia hordei* on barley hosts with non-hypersensitive resistance. *Transactions of the British Mycological Society* **63**, 421–430.
- Cochrane VW, 1959. *Physiology of Fungi*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Coleman JS, 1986. Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. *Tree Physiology* **2**, 289–299.
- Coleman JS, Jones CG, Smith WH, 1987. The effect of ozone on cottonwood – leaf rust interactions: independence of abiotic stress, genotype, and leaf ontogeny. *Canadian Journal of Botany* **65**, 949–953.
- Dowkiw A, Husson C, Frey P, Pinon J, Bastien C, 2003. Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology* **93**, 421–427.
- Duplessis S, Cuomo CA, Lin Y-C, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL, Chiu R, Coutinho PM, Feau N, Field M, Frey P, Gelhaye E, Goldberg J, Grabherr MG, Kodira CD, Kohler A, Kües U, Lindquist EA, Lucas SM, Mago R, Mauceli E, Morin E, Murat C, Pangilinan JL, Park R, Pearson M, Quesneville H, Rouhier N, Sakthikumar S, Salamov AA, Schmutz J, Selles B, Shapiro H, Tanguay P, Tuskan GA, Henrissat B, Peer YV de, Rouzé P, Ellis JG, Dodds PN, Schein JE, Zhong S, Hamelin RC, Grigoriev IV, Szabo LJ, Martin F, 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 9166–9171.

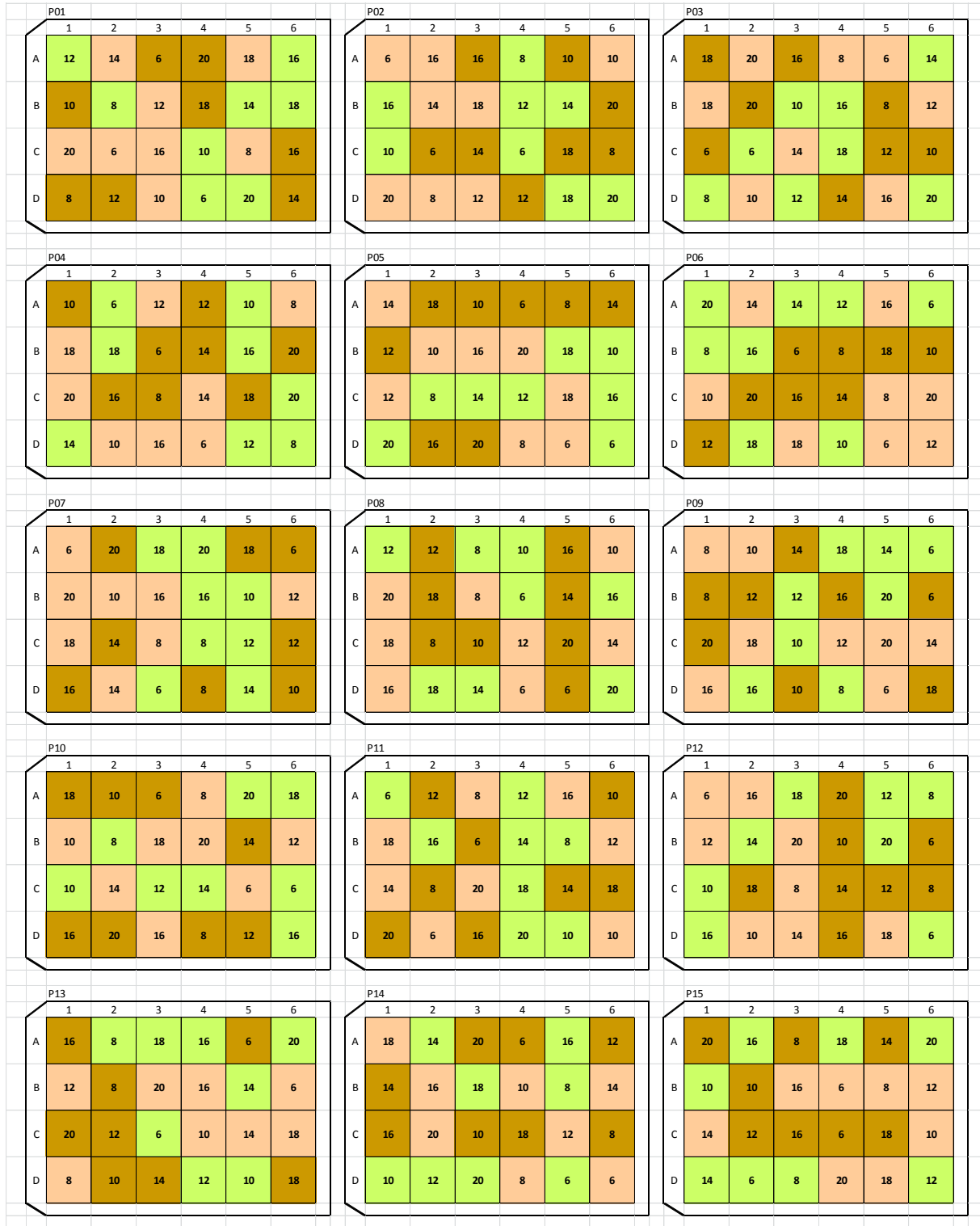
- Duplessis S, Spanu PD, Schirawski J, 2013. Biotrophic Fungi (Powdery Mildews, Rusts, and Smuts). In: Martin F, ed. *The Ecological Genomics of Fungi*. John Wiley & Sons, Inc, 149–168.
- Farber DH, Mundt CC, 2017. Effect of plant age and leaf position on susceptibility to wheat stripe rust. *Phytopathology* **107**, 412–417.
- Ficke A, Gadoury DM, Seem RC, 2002. Ontogenic resistance and plant disease management: a case study of grape powdery mildew. *Phytopathology* **92**, 671–675.
- Gamm M, Héloir M-C, Bligny R, Vaillant-Gaveau N, Trouvelot S, Alcaraz G, Frettinger P, Clément C, Pugin A, Wendehenne D, Adrian M, 2011. Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 1061–1073.
- Gavrilets S, Scheiner SM, 1993. The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape. *Journal of Evolutionary Biology* **6**, 31–48.
- Gilchrist MA, Sulsky DL, Pringle A, Elena S, 2006. Identifying fitness and optimal life-history strategies for an asexual filamentous fungus. *Evolution* **60**, 970–979.
- Giorcelli A, Vietto L, Anselmi N, Gennaro M, 1996. Influence of clonal susceptibility, leaf age and inoculum density on infections by *Melampsora larici-populina* races E1 and E3. *European Journal of Forest Pathology* **26**, 323–331.
- Guinet C, Boutigny AL, Vialle A, Hamelin RC, Frey P, Ioos R, 2016. Simultaneous monitoring and quantification of *Melampsora allii-populina* and *Melampsora larici-populina* on infected poplar leaves using a duplex real-time PCR assay. *Plant Pathology* **65**, 380–391.
- Hakulinen J, Sorjonen S, Julkunen-Tiitto R, 1999. Leaf phenolics of three willow clones differing in resistance to *Melampsora* rust infection. *Physiologia Plantarum* **105**, 662–669.
- Jarosz AM, Davelos AL, 1995. Effects of disease in wild plant populations and the evolution of pathogen aggressiveness. *New Phytologist* **129**, 371–387.
- Jensen B, Munk L, 1997. Nitrogen-induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* on seedlings of six spring barley cultivars. *Plant Pathology* **46**, 191–202.
- Johnson JD, Kim Y, 2005. The role of leaf chemistry in *Melampsora medusae* infection of hybrid poplar: effects of leaf development and fungicide treatment. *Canadian Journal of Forest Research* **35**, 763–771.
- Johnston SF, Cohen MF, Torok T, Meentemeyer RK, Rank NE, 2016. Host phenology and leaf effects on susceptibility of California Bay Laurel to *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* **106**, 47–55.
- Kardin MK, Groth JV, 1989. Density-dependent fitness interactions in the bean rust fungus. *Phytopathology* **79**, 409–412.

- Katsuya K, Green GJ, 1967. Reproductive potentials of races 15b and 56 of wheat stem rust. *Canadian Journal of Botany* **45**, 1077–1091.
- Knott EA, Mundt CC, 1991. Latent period and infection efficiency of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populations isolated from different wheat cultivars. *Phytopathology* **81**, 435–439.
- Kolmer JA, Leonard KJ, 1986. Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology* **76**, 774–777.
- Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–338.
- Larson PR, Isebrands JG, 1971. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Canadian Journal of Forest Research* **1**, 1–11.
- Leonard KJ, 1969. Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology* **59**, 1851–1857.
- Madan M, Thind KS, 1998. *Physiology of Fungi*. New Delhi: APH Publishing Corporation.
- Merry AM, Evans KJ, Corkrey R, Wilson SJ, 2013. Coincidence of maximum severity of powdery mildew on grape leaves and the carbohydrate sink-to-source transition. *Plant Pathology* **62**, 842–850.
- Pap P, Rankovic B, Masirevic S, 2013. Effect of temperature, relative humidity and light on conidial germination of oak powdery mildew (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.) under controlled conditions. *Archives of Biological Sciences* **65**, 1069–1077.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009a. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**, 409–424.
- Pariaud B, Robert C, Goyeau H, Lannou C, 2009b. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* **99**, 869–878.
- Pei MH, Ruiz C, Harris J, Hunter T, 2003. Quantitative inoculations of poplars with *Melampsora larici-populina*. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 269–276.
- Pei MH, Ruiz C, Hunter T, Arnold GM, Bayon C, 2002. Quantitative relationships between inoculum of *Melampsora larici-epitea* and corresponding disease on *Salix*. *Plant Pathology* **51**, 443–453.
- Philibert A, Desprez-Loustau M-L, Fabre B, Frey P, Halkett F, Husson C, Lung-Escarmant B, Marçais B, Robin C, Vacher C, Makowski D, 2011. Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology* **48**, 1381–1390.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, 2002. Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. *Phytopathology* **92**, 762–768.

- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, 2004. Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* **94**, 712–721.
- Rotem J, Cohen Y, Bashi E, 1978. Host and environmental influences on sporulation in vivo. *Annual Review of Phytopathology* **16**, 83–101.
- Royer M, Larbat R, Le Bot J, Adamowicz S, Robin C, 2013. Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato? *Phytochemistry* **88**, 25–33.
- Scheiner SM, 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 35–68.
- Shain L, Miller J., 1982. Pinocembrin: an antifungal compound secreted by leaf glands of eastern cottonwood [*Populus deltoides*]. *Phytopathology*.
- Sharma JK, Heather WA, Winer P, 1980. Effect of leaf maturity and shoot age of clones of *Populus* species on susceptibility to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* **70**, 548–554.
- Trapero-Casas A, Kaiser WJ, 1992. Influence of temperature, wetness period, plant age, and inoculum concentration on infection and development of *Ascochyta* blight of chickpea. *Phytopathology*.
- Turechek WW, Mahaffee WF, Ocamb CM, 2001. Development of Management Strategies for Hop Powdery Mildew in the Pacific Northwest. *Plant Health Progress*.
- Turechek WW, Stevenson KL, 1998. Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathology* **88**, 1294–1301.
- Ullah C, Unsicker SB, Fellenberg C, Constabel CP, Schmidt A, Gershenzon J, Hammerbacher A, 2017. Flavan-3-ols are an effective chemical defense against rust infection. *Plant Physiology* **175**, 1560–1578.
- Vagiri M, Johansson E, Rumpunen K, 2017. Phenolic compounds in black currant leaves – an interaction between the plant and foliar diseases? *Journal of Plant Interactions* **12**, 193–199.
- Valkama E, Koricheva J, Salminen J-P, Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, Pihlaja K, 2005. Leaf surface traits: overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi? *Trees* **19**, 191–197.
- Xavier AA, da Silva AC, da Silva Guimarães LM, Matsuoka K, Hodges CS, Alfenas AC, 2015. Infection process of *Puccinia psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves of different ages. *Tropical Plant Pathology* **40**, 318–325.
- Yegorov I, Grogard F, Mailleret L, Halkett F, 2017. Optimal resource allocation for biotrophic plant pathogens. *IFAC-PapersOnLine* **50**, 3154–3159.

Supplementary material

Figure S1 Experimental design for the 24 cell culture plates. Numbers correspond to the eight LPs and colours to the three plants.



P19						
	1	2	3	4	5	6
A	20	14	10	20	20	14
B	12	18	16	12	10	6
C	6	6	12	8	8	18
D	16	14	8	10	16	18

P20						
	1	2	3	4	5	6
A	16	8	20	16	6	6
B	10	20	8	14	6	16
C	14	10	12	14	18	8
D	18	12	20	12	10	18

P21						
	1	2	3	4	5	6
A	6	18	18	14	12	20
B	6	12	6	20	14	10
C	8	14	16	16	12	16
D	10	10	20	8	8	18

P22						
	1	2	3	4	5	6
A	16	14	10	18	6	12
B	20	10	18	6	16	20
C	12	18	10	16	8	6
D	14	8	8	14	20	12

P23						
	1	2	3	4	5	6
A	12	12	6	16	10	8
B	10	20	6	20	8	14
C	12	16	6	14	18	14
D	10	16	18	20	8	18

P24						
	1	2	3	4	5	6
A	8	6	12	20	18	12
B	16	18	10	16	20	16
C	8	12	20	14	10	10
D	18	14	6	14	8	6

Figure S2 Principal component analysis on leaf chemical content (carbon, nitrogen, glucose, fructose, sucrose, total phenolics, Flavan-3-ols (Catechin, Proanthocyanidin dimers), Hydroxycinnamic acid esters (chlorogenic acid, caffeoyl shikimate, caffeoyl glucose isomer1 and isomer2, coumaroyl glucose isomer1 and isomer2), Flavonols (rutin, quercitrin) and Salicinoids (Salicine, salicortin, acetylsalicortin, homaloside D, tremulacin and a putative populoside), LPI and plant are supplementary variables. Colors correspond to variables' contribution to the first and second axes.

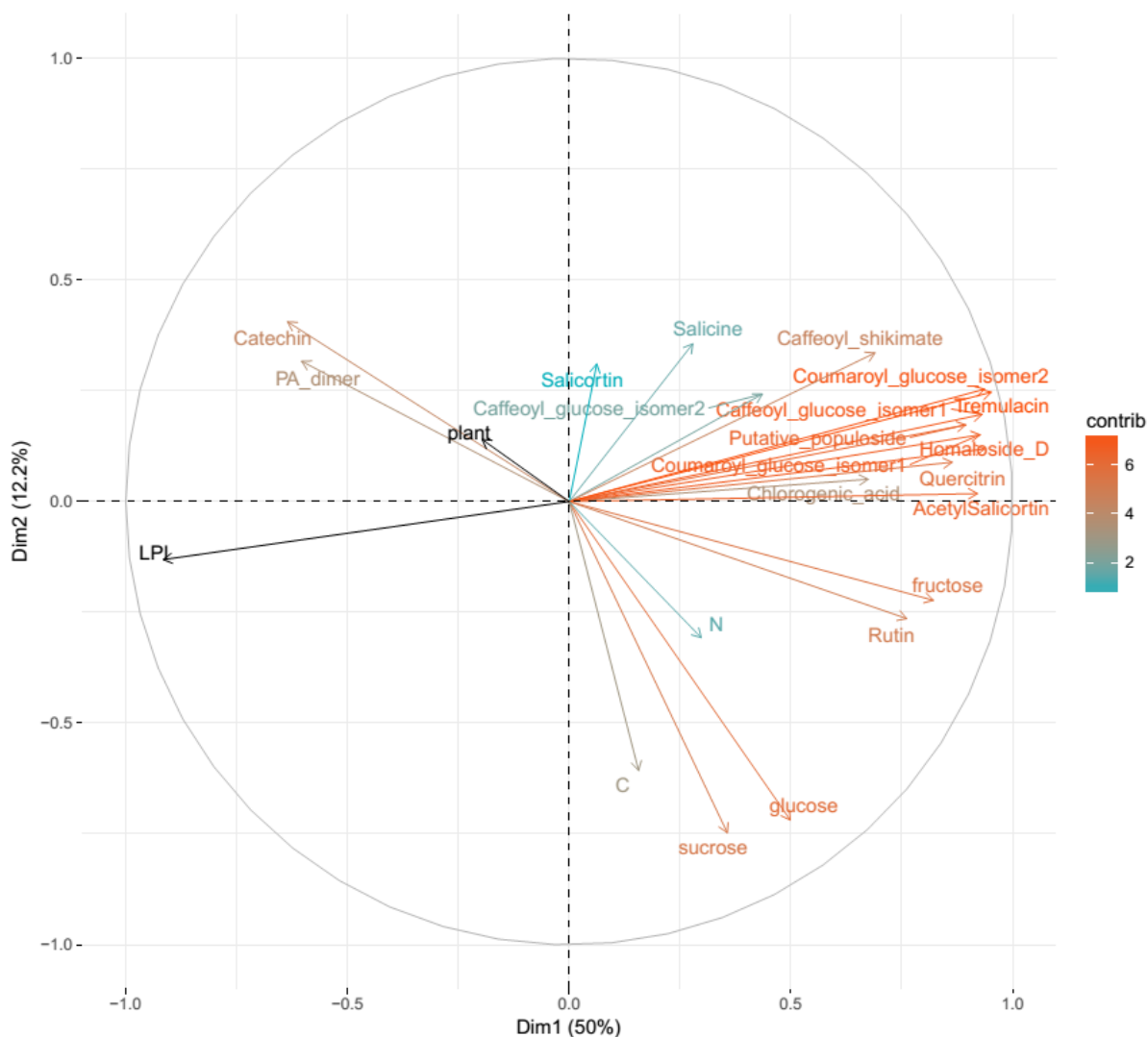
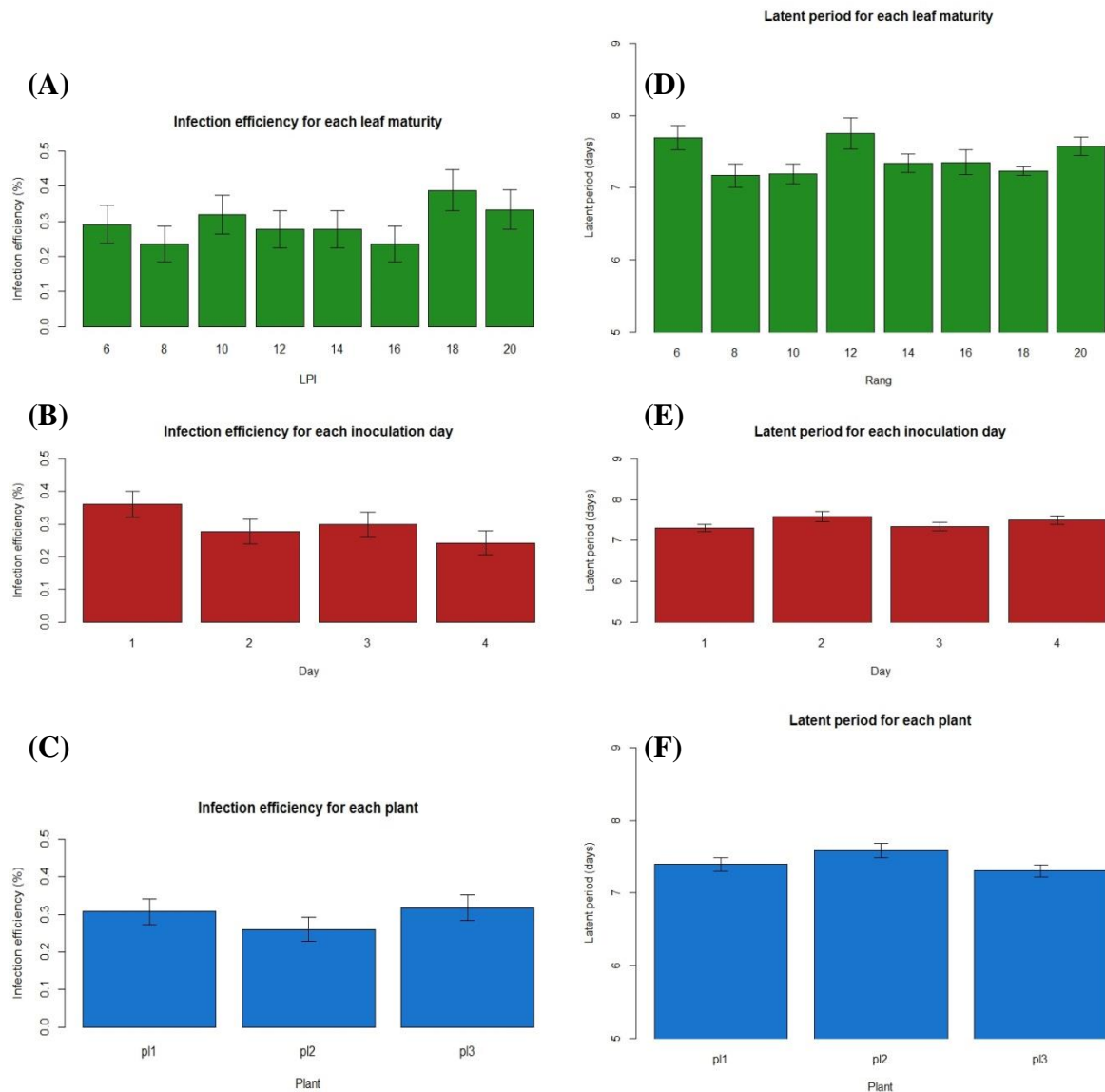
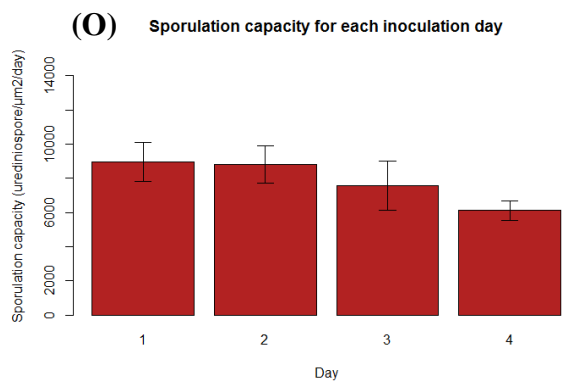
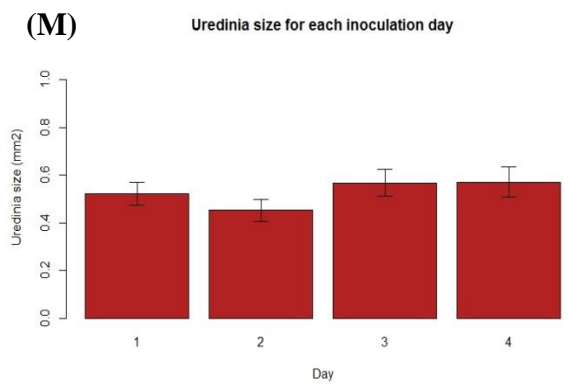
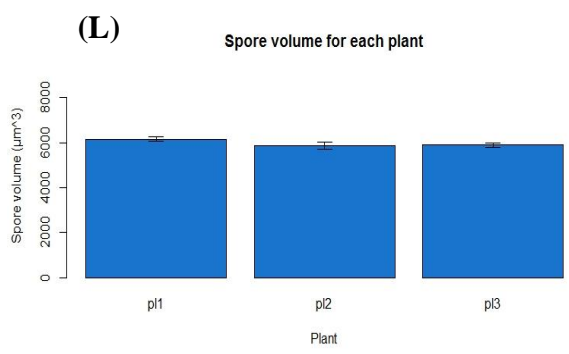
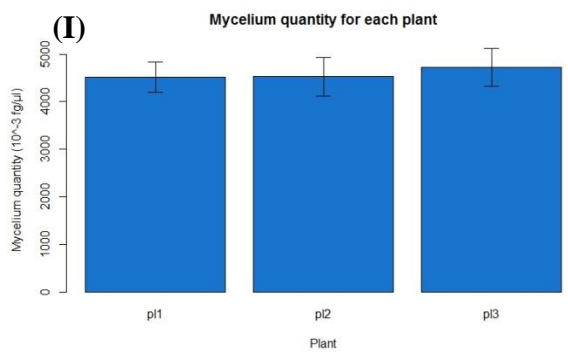
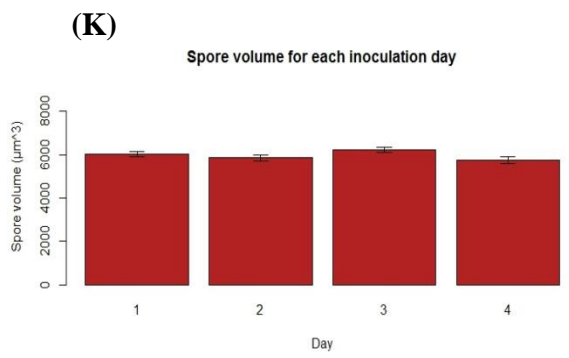
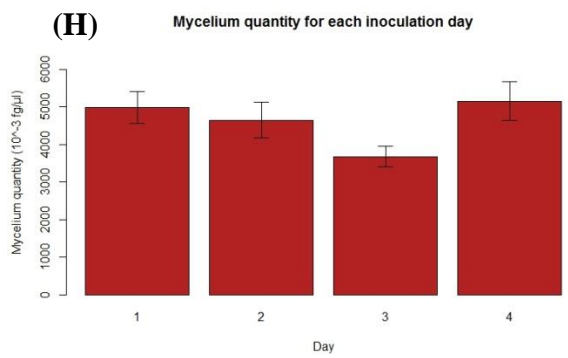
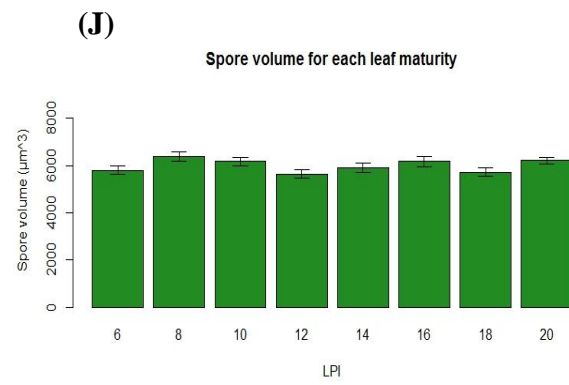
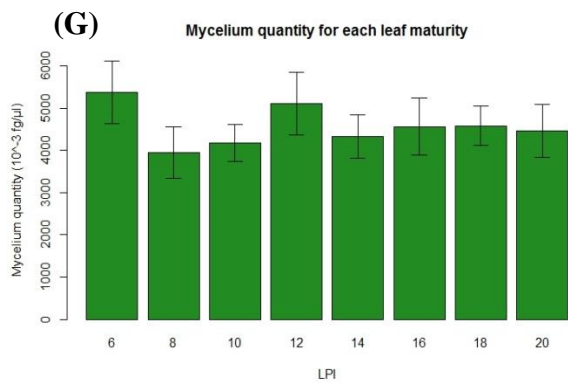
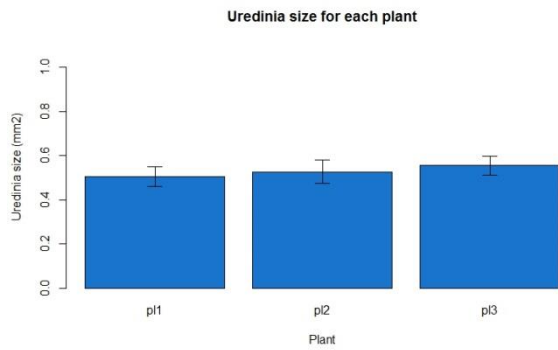


Figure S3 Barplots of trait means and standard error, (i) across LPI: **(A)** infection efficiency, **(D)** latent period, **(G)** mycelium quantity, and **(J)** spore volume; (ii) for each inoculation day and each plant: **(B and C)** infection efficiency, **(E and F)** latent period, **(H and I)** mycelium quantity, **(K and L)** spore volume, **(M and N)** uredinia size, **(O and P)** sporulation capacity, and **(Q)** sporulation rate (for each day only).

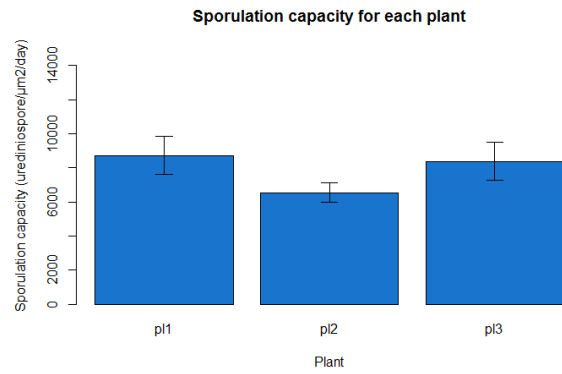




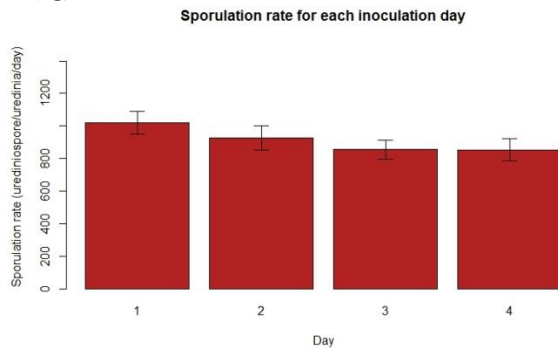
(N)



(P)



(Q)



Note S1 ImageJ script for uredinia size analysis

// Area calculation for all pictures in the directory

input = "Z:\\Rangf\\Rgf_photoU\\";

list = getFileList(input);

for (p = 0; p < list.length; p++) {

 open(list[p]) ;

 // Color Thresholder 1.49v

 // Autogenerated macro, single images only!

 min=newArray(3);

 max=newArray(3);

 filter=newArray(3);

 a=getTitle();

 run("HSB Stack");

 run("Convert Stack to Images");

 selectWindow("Hue");

 rename("0");

 selectWindow("Saturation");

 rename("1");

 selectWindow("Brightness");

 rename("2");

 min[0]=0;

 max[0]=37;

```

filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=0;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  setThreshold(min[i], max[i]);
  run("Convert to Mask");
  if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
run("8-bit");
run("Close-");
run("Fill Holes");
run("Set Scale...", "distance=392 known=1000 pixel=1 unit=microm");
run("Analyze Particles...", "size=19000.00-Infinity display exclude");
run("Close All");
}

```

Note S2 Script and outputs of statistical analyses using R (RMarkdown document available at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01396/full>)

**CHAPITRE 2 : EVOLUTION DES CARACTERES
D'AGRESSIVITE ET MORPHOLOGIQUES LORS D'UN
CONTOURNEMENT MAJEUR DE RESISTANCE**

CHAPITRE 2 : EVOLUTION DES CARACTERES D'AGRESSIVITE ET MORPHOLOGIQUES LORS D'UN CONTOURNEMENT MAJEUR DE RESISTANCE

L'étude précédente a permis de mettre en évidence que le développement de *M. larici-populina* dépend de la maturité de la feuille. Nous en concluons que pour comparer différentes souches, il sera préférable de les inoculer sur des feuilles de maturité identique afin de minimiser les sources de variance environnementale. L'expérience du **chapitre 1** a été menée sur une seule souche du champignon, ce qui ne permet pas d'aborder l'évolution des caractères d'agressivité et morphologique au cours du temps. Avec cet objectif, nous avons conduit une expérience de caractérisation de 72 souches issues de quatre populations distinctes du champignon. Trois populations représentent des moments clés du contournement d'une résistance qualitative et ont été récoltées sur des peupliers cultivés. Au contraire, la quatrième population a été échantillonnée sur des peupliers sauvages, qui n'ont pas été impactés par le déploiement de variétés résistantes.

L'objectif de ce deuxième chapitre est de déterminer et d'expliquer l'évolution des caractères quantitatifs du champignon pathogène autour du contournement de la résistance qualitative R7. Les populations ont été choisies par rapport à la date de cet événement : une population a été récoltée en 1993 juste avant l'observation du contournement ; une population a été récoltée en 1994 au moment du contournement ; et la dernière population a été récoltée en 1998 au moment du remplacement total du groupe génétique pré-contournant. Le phénotypage de 54 souches de *M. larici-populina* nous a donné accès à trois types d'informations nécessaires à la compréhension de l'évolution des caractères d'agressivité et morphologiques. D'une part, la comparaison des valeurs phénotypiques entre populations illustre l'évolution des caractères dans le temps. D'autre part, l'héritabilité d'un caractère est un prérequis à son évolution sous sélection naturelle. Enfin, la comparaison des variances phénotypiques et génétiques informe sur le type de sélection naturelle subie. Cette étude est présentée sous forme d'article en préparation dans la première partie de ce chapitre.

Cependant, l'évolution des caractères peut être contrainte par la présence de compromis évolutifs entre eux. Afin de déterminer leur étendue, nous avons estimé les corrélations génétiques entre caractères à partir des données utilisées pour la première partie du chapitre et de celles récoltées sur la quatrième population. Cette dernière a été récoltée sur des peupliers sauvages ne portant pas de gène de résistance ce qui lui confère une histoire évolutive exempte de contournement de résistance. Cette distinction avec les trois autres populations permettra potentiellement de mettre en avant des compromis évolutifs spécifiquement liés à des stratégies évolutives différentes. Ces analyses sont présentées dans la deuxième partie de ce chapitre.

Article 2 : How did aggressiveness and morphological traits evolve following a major resistance breakdown in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*?

Authors

Agathe Maupetit^{1,2}, Fabien Halkett¹, Bénédicte Fabre¹, Maxime Salot¹, Jérémy Petrowski¹, Axelle Andrieux¹, Stéphane De Mita¹, Pascal Frey¹ and Katherine Hayden²

¹ Université de Lorraine, IAM, 54000 Nancy, France.

² Royal Botanic Garden Edinburgh, EH3 5LR, UK

Author for correspondence:

Fabien Halkett

INRA, UMR 1136 Interactions Arbres/Microorganismes, F-54280, Champenoux, France

E-mail: fabien.halkett@inra.fr

Abstract

The host-parasite coevolution in agro-systems is driven by artificial selection applied on cultivated host plant. In particular, breeders commonly select crop varieties carrying qualitative resistances, which confer a total immunity to a targeted pathogen. These complete resistances, combined with homogeneous fields in terms of genetic diversity and agricultural practices, lead to a strong selection pressure on parasites, sometimes resulting in resistance breakdown. It is well known that qualitative resistance breakdowns modify pathogen population structure but few studies have analysed the consequences on their aggressiveness traits. The aim of this study was to characterize the evolution of these quantitative traits following a resistance breakdown in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. We based our experiment on three temporal samples of populations located in northern France: one population collected just before the resistance breakdown event, one collected right after it and the last one collected four years after. First, we have quantified phenotypic differences among populations for a set of aggressiveness (infection efficiency, latent period, lesion size, mycelium quantity, and sporulation rate) and morphological (spore volume) traits. Then we have estimated heritability levels of these traits to establish which one could be under selection. Lastly, we have compared trait and neutral genetic variations (Q_{ST} - F_{ST} comparisons) to test the response to selection. Our results revealed no variation in aggressiveness traits, but significant changes in the morphological trait. Spore volume increased following the resistance breakdown event. The analyses suggest a probable directional selection on this trait. This evolution may be linked to selection for increased dispersal ability, in relation to the rapid spread of the virulent pathogen population.

Keywords:

Plant pathogen, disease-associated traits, temporal sampling, heritability, mixed model.

1. Introduction

Plant pathogens are one of the main constraints on production in agricultural ecosystems. Yet heavy pesticide use can cause an environmental harm. An alternative solution to control pathogens is to breed resistant crop varieties, reconciling agricultural production and environmental health. Breeders thus select cultivars carrying qualitative or quantitative resistance factors to a targeted pathogen. However, human activities including resistance breeding are known to drive the evolution of plant pathogens in agro-systems by shaping genetically homogeneous host populations and favouring conducive environments structured by agricultural practices (Stukenbrock & McDonald, 2008; Pariaud *et al.*, 2009; Zhan *et al.*, 2015; Papaïx *et al.*, 2017).

Qualitative resistance represents the main and best characterised selective pressures exerted by crop species on pathogen populations. Cultivars carrying qualitative resistance genes prevent any infection by specific strains of the pathogen. This type of resistance often relies on the gene-for-gene model (Flor, 1971) and thus usually has a simple genetic determinism with a single gene carried by the host conferring resistance. Defined as a counterpart of the resistance gene, the presence or absence of the gene controlling a virulence factor determines respectively the virulence or avirulence of a pathogen. Combined with the homogenous host population at the scale of an agro-system, this simple genetic system favours rapid resistance breakdowns (Stukenbrock & McDonald, 2008). Resistance breakdowns and their consequences on genetic diversity are well documented (Brown & Tellier, 2011; Zhan *et al.*, 2015) but little is known about the consequences on quantitative traits of the pathogen, such as aggressiveness – the quantitative component of pathogenicity (Pariaud *et al.*, 2009) – and morphological traits.

One important repercussion of a qualitative resistance breakdown is the colonization of new pools of hosts, previously resistant. This process corresponds to a host range expansion. It involves two main steps: first, the early infection of the new host with a necessary adaptation to physiological characteristics differing from the original host; second, the subsequent invasion of an ecological niche, implying pathogen population dispersal and increased competition among individuals. With these respects, Lê Van and colleagues (2012) suggested that host range expansion can lead to specialization or speciation. Indeed, the gain of new virulence impacts the pathogen's demography, sometimes leading to the emergence of new crop pathogen species (e.g. Couch *et al.*, 2005; Stukenbrock *et al.*, 2007). In the course of this new interaction, any number of pathogenicity traits may be differently expressed, including those related to aggressiveness.

Taking together, these disruptions are expected to trigger modifications at a phenotypic level. In order to understand the evolution of parasites facing qualitative resistance, we will study

the consequences of a resistance breakdown at a phenotypic level, on both aggressiveness and morphological traits.

In this study, we focus on the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*, a foliar pathogen which has overcome eight qualitative poplar resistances since 1949 (Pinon & Frey, 2005) including one very well studied resistance breakdown event in 1994. Because *M. larici-populina* is the most important threat to poplar cultivation in Europe, poplar cultivars carrying qualitative resistances, denoted as numeric types, have been released in commercial cultivation. In 1982, the poplar cultivar *Populus × interamericana* ‘Beaupré’ which carries the resistance R7 was released throughout Europe. This cultivar remained immune to *M. larici-populina* for 12 years, but in 1994, a major resistance breakdown occurred in Belgium for resistance R7, resulting in the emergence of a new genetic group of *M. larici-populina* (Xhaard *et al.*, 2011). The first corresponding virulent 7 strains of *M. larici-populina* were observed in September 1994 in Belgium, rapidly followed by its observation in northern France (Pinon & Frey, 2005). The new virulence triggered the colonisation of the ecological niche formed by ‘Beaupré’ stands. In five years, virulent 7 strains spread all over France, reaching the southern regions. This population rapidly superseded the initial and avirulent 7 population where it was present before the resistance R7 breakdown. The initial genetic group has been completely vanished by the new one, leading to the total extinction of the avirulent 7 population in four years, as apparent in the analysis of temporal samplings (Persoons *et al.*, 2017).

The objective of this study is to characterize the evolution of aggressiveness and morphological traits following the resistance R7 breakdown event. To tackle this issue, it is necessary to answer the following questions: (i) Is there differentiation between traits before and after the resistance breakdown? (ii) Which traits could respond to selection? And (iii) Is there selection applied on these traits? To answer question (i) using linear regressions, we assessed aggressiveness traits differentiation among three populations sampled before, just after and four years after the resistance R7 breakdown. To answer question (ii), we estimated the genetic determinism of each trait through the computation of heritability. Finally, to answer question (iii), we compared the variances within and between populations of neutral markers and quantitative traits (Q_{ST} - F_{ST} comparisons).

2. Materials and methods

2.1. Plant and fungal material and experimental design

We studied 54 strains from a historical collection of *M. larici-populina* that has been cryopreserved at -80°C at Institut National de la Recherche Agronomique Nancy (France) giving access to ‘frozen’ genotypes (*i.e.* without cultivation in the lab and therefore without any possibility of *in vitro* evolution). All strains were sampled in northern France and in

Belgium among homogenous pathogen populations. Three temporal populations of 18 strains each were chosen to reflect three key dates: population 1993 was collected on susceptible poplars, before the resistance R7 breakdown; population 1994 and 1998 were collected on resistant R7 poplars, just after the resistance breakdown and four years later, respectively. Population 1993 belongs to the genetic group which vanished after the breakdown with limited gene flow with the new genetic group (Persoons *et al.*, 2017). Populations 1994 and 1998 belong to the same genetic group, which emerged after resistance R7 breakdown (Xhaard *et al.*, 2011; Persoons *et al.*, 2017). Virulent 7 strains carried multiple virulence factors and formed a unique and homogeneous genetic group all over France. Population 1994 displayed the hallmarks of a founding event (genetic disequilibrium, reduced genetic diversity), while population 1998 did not depart from equilibrium and displayed increased genetic diversity.

All *M. larici-populina* strains were inoculated on the same cultivar to carry out a common garden experiment. Characterization of quantitative traits was thus performed on excised leaf discs of *Populus deltoides* × *P. nigra* ‘Robusta’ which is known to be susceptible to all tested strains. Poplar plants were grown from dormant cuttings in 10-liter pots containing a sand-peat (1:1, v/v) mixture, with an initial fertilization of 3.5 g.L⁻¹ CaCO₃ and 6 g.L⁻¹ of slow release 13-13-13 N-P-K fertilizer (Nutricote® T100, Fertil). The plants were grown in a growth chamber (5.7 plants.m⁻²) regulated at 20/22°C (night/day temperatures) and 16 h photoperiod, and were watered daily with deionized water. After four months, young trees were about 1.2 m high and exhibited 25 to 30 fully expanded leaves.

As leaf age and physiology is known to influence trait variation (Sharma *et al.*, 1980; Maupetit *et al.*, 2018), we used leaves of the same leaf plastochron index (LPI, Larson & Isebrands, 1971). Leaves of LPI 9 from 39 plants were used and harvested the day of inoculation. Forty-eight 12-mm-diameter discs were excised from each poplar leaf, and placed in flotation on deionized water in two 24-well polystyrene cell culture plates.

Because the single-spore inoculation protocol that was applied is highly time consuming, we were not able to inoculate more than nine plates per inoculation day per manipulator. Two manipulators inoculated the plates. Inoculations were thus distributed over fourteen days (each inoculation day formed a series of eighteen culture plates).

Each plate contained four strains (six leaf disks per strain). Each strain was inoculated on at least 72 leaf discs (corresponding to 12 quarter-plates) and distributed according to a balanced incomplete block design among 240 plates in order to maximize the distribution of each strain over all days of inoculation.

2.2. Single-spore inoculation protocol

A germination test was performed just before inoculation to ensure the quality of spores used (Pei *et al.*, 2002). To this aim, spores of all strains were dispersed on the surface of a Petri dish containing agar (20 g.L⁻¹). After an overnight incubation at 19±1°C, the proportion of germinated spores was evaluated under a light microscope (100X magnification). Only strains with a germination rate higher than 90% were used.

All *M. larici-populina* strains were multiplied on poplar leaf discs prior to their inoculation and inoculated one by one as described in Maupetit *et al.* (2018). Measurement of quantitative traits was conducted on 4 to 42 replicates per strain (mean number of replicates = 20), depending on strain infection success (mean infection success = 26%). One of the 54 strains failed to infect all the 72 leaf disks, and was thus removed from the analysis.

2.3. Quantitative trait measurements

All aggressiveness traits classically studied in plant-pathogen systems were measured: infection efficiency, latent period, lesion size, and sporulation rate (Lannou, 2012). Infection efficiency is defined as the probability that a spore creates a lesion. Latent period is the time between spore inoculation and the sporulation from this infection. Lesion size (also referred to as uredinia size) is defined as the surface area that produces spores (Kolmer & Leonard, 1986; Robert *et al.*, 2004). Sporulation rate is defined as the number of spores produced by the lesion per unit of time (Leonard, 1969; Clifford & Clothier, 1974; Kardin & Groth, 1989). Beyond these four classical traits, we also measured the quantity of mycelium *in planta* developing in an infected leaf disc, through qPCR analysis. We also measured one morphological trait: the volume of spores, which was computed from length and width of spores obtained from image analysis (see Maupetit *et al.* (2018) for details).

Measurements of sporulation rate and spore morphological parameters were performed on the spore suspensions using an Occhio® Flowcell FC200+ optical morphogranulometer, which allows simultaneous particle counting and image analysis of the particles. Before counting, spore suspensions were shaken to disperse clusters of spores. For each sample, counting was performed using the following settings: 0.15 mL of priming, 0.85 mL of volume analysis and 7% of volume sampling (i.e. 7% within 0.85 mL were really analysed, evenly distributed along the analysed volume). To distinguish spores from other particles, a custom filter was applied on parameter values:

- Feret diameter length between 23 and 200 µm;
- bluntness between 0.6 and 1;
- minimum Feret diameter between 13.5 and 70 µm;
- eccentricity higher than 0.1;

- ellipse elongation between 0.18 and 0.79;
- width of ellipse minor axis lower than 22 μm ;
- length of ellipse minor axis lower than 54 μm .

This filter was applied on the raw data to compute sporulation rate on one hand (expressed in spores.uredinia⁻¹.day⁻¹) and the dimensions (length and width) of spores produced by each uredinium. The volume of spores was computed from the formula of the volume of an ellipsoid (Philibert *et al.*, 2011):

$$\text{Spore volume} = \frac{4}{3}\pi \times \frac{\text{length}}{2} \times \left(\frac{\text{width}}{2}\right)^2$$

2.4. DNA extraction and qPCR quantification of *in planta* mycelium

DNA was extracted from infected poplar leaf discs using the DNeasy96® DNA plant kit (Qiagen) as described in Maupetit *et al.* (2018). The infected leaf discs were randomly displayed in 38 half plates (keeping together all replicates from the same culture plate, to maintain statistical blocks). All DNA extraction plates were stored at -20°C until qPCR analysis. In order to correct for qPCR variance, three technical replicates of each DNA extraction plate were performed using an incomplete block design: 15 qPCR were run each including a different combination of four DNA extraction plates (Supplementary Table 1).

2.5. Data analysis

Nonlinear mixed models were used to analyse the phenotypic differentiation of measured traits among populations, with each trait as the dependent variable in its own model (see Table 1 for transformations and error family), population as a fixed effect, strains as random effect nested in population and day of inoculation and plate as random effects. Population differentiation was assessed with an analysis of variance contrasting the previous model and the null model (without population effect), with Wald chi-square tests and $\alpha = 0.05$. Differences of trait means were assessed with Tukey's HSD (honestly significant difference) test. Variance estimates were extracted from the null model for heritability computation and from the full model for Q_{ST} computation.

Table 1: Variable transformations and error families used

Aggressiveness trait	Variable transformation	Error family
Infection efficiency	none (identity)	binomial
Latent period	none (identity)	gamma
Lesion size	square root	Gaussian
Mycelium quantity	square root	Gaussian
Sporulation rate	cube root	Gaussian
Spore volume	cube root	Gaussian

Uneven infection efficiency led to large differences in the representation of strains within and among inoculation plates. In order to balance the experimental design and the number of replicates for all strains, 1000 bootstrapped datasets were created by randomly selecting one replicate per strain and per plate. This bootstrapped datasets were used to compute confidence intervals for Q_{ST} and heritability (H^2).

All analyses were conducted using R Version 3.5.0, with packages lme4 (Bates *et al.*, 2015), car (Fox *et al.*, 2017), sciplot (Morales *et al.*, 2017), agricolae (Mendiburu, 2017), Hmisc (Harrell Jr & Dupont, 2018), and ade4 (Dray *et al.*, 2018, p. 4).

2.6. Heritability and population differentiation indices calculation

The broad sense heritability (H^2) of each quantitative trait was computed for each population as defined by Nyquist & Baker (1991):

$$H^2 = \frac{\sigma_{Gw}^2}{\sigma_{Gw}^2 + \frac{\sigma_{plate}^2}{plate} + \frac{\sigma_{day}^2}{day} + \frac{\sigma_{residuals}^2}{plate \times repetition}}$$

Where σ_{Gw}^2 , σ_{plate}^2 , σ_{day}^2 , $\sigma_{residuals}^2$ are the variance effects associated to, respectively, strains (that is the quantitative genetic variance component within a population), plates, days, and the residual variance; *plate* is the mean number of plate with sporulating lesions from one strain; *day* is the mean number of day with positive infecting spores from one strain; *repetition* is the mean number of sporulating lesions from one strain from one plate (equal to 1 per definition in all bootstrapped datasets). Variances were estimated from the null model described above. Differences of heritability among traits and population were tested with a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn test.

The fixation index, F_{ST} , was computed on neutral markers assayed for each strain of the three populations using FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 1995). Strains were genotyped using a set of 25 microsatellite markers. Genotype data were available from a previous population genetic study (data archive available from Dryad repository: <https://doi.org/10.5061/dryad.r6d8h>, Persoons *et al.* (2017)). Both overall and pairwise estimates were computed according to Weir and Cockerham (1984).

The Q_{ST} , an equivalent to F_{ST} for quantitative traits, was calculated for overall and for pairwise populations for each trait as defined by Spitze (1993):

$$Q_{st} = \frac{\sigma_{Gb}^2}{\sigma_{Gb}^2 + 2\sigma_{Gw}^2}$$

where σ_{Gb}^2 and σ_{Gw}^2 are the quantitative genetic variance components, respectively between and within populations, estimated from the full model described above.

3. Results

3.1. Phenotypic differentiation among populations

To understand the evolution of aggressiveness and morphological traits following the resistance R7 breakdown event, we first looked at the traits' differentiation among populations sampled before, at the time and after the breakdown event.

Spore volume was the only trait to significantly differ among populations (Table 2). None of the five other aggressiveness traits presented consistent variation (Supplementary Figure 1). Spore volume increased significantly following the resistance R7 breakdown event (P -value < 0.0001). Strains from avirulent 7 population had a smaller volume (mean = $4.996 \mu\text{m}^3$) than strains from virulent 7 populations sampled after the resistance breakdown event in 1994 and 1998 (mean = 5.609 and $5.684 \mu\text{m}^3$ respectively). No significant difference was observed between 1994 and 1998 samples (Figure 1).

Table 2: Means and standard error of traits for each population and anova among populations (significant P -value is in bold)

Trait	1993	1994	1998	Anova (P -value)
Infection efficiency (%)	25 ± 1	30 ± 1	26 ± 1	1.000
Latent period (days)	7.23 ± 0.05	7.57 ± 0.06	7.26 ± 0.05	0.663
Lesion size (μm^2)	520 ± 11	469 ± 10	479 ± 11	0.586
Mycelium quantity (UA)	3455 ± 111	3632 ± 122	3120 ± 113	0.901
Sporulation rate (spore.day ⁻¹)	238 ± 9	244 ± 8	250 ± 9	0.937
Spore volume (μm^3)	4996 ± 31	5609 ± 36	5684 ± 39	9.00×10^{-5}

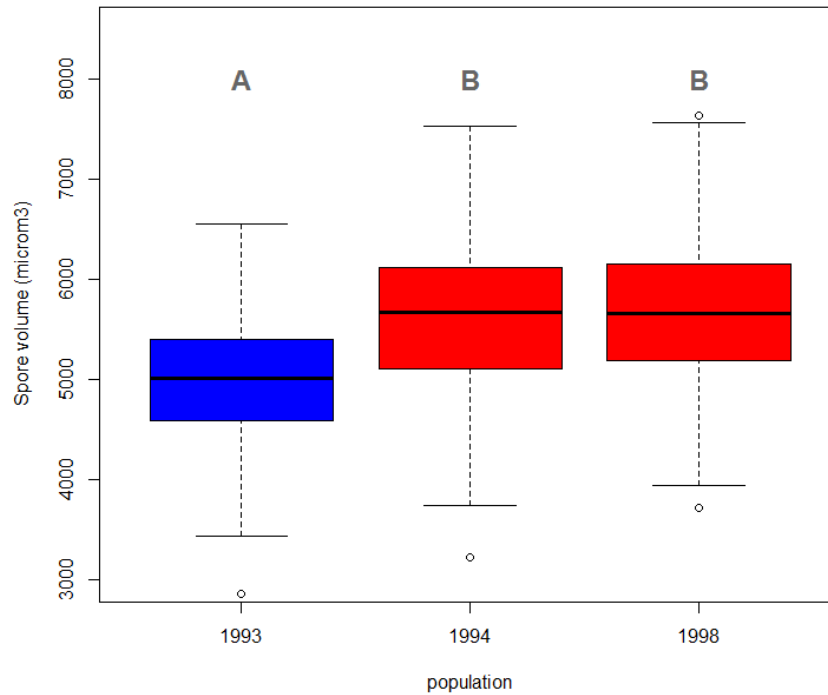


Figure 1: Boxplot of spore volume (μm^3) for each population. The blue box stands for avirulent 7 population sampled in 1993 and red boxes for virulent 7 populations sampled in 1994 and 1998. Letters correspond to Tukey test results.

3.2. Heritability levels of quantitative traits

In order to identify the traits potentially subjected to selection, we studied the heritability of each trait (Figure 2). This highlighted two main groups of traits: infection efficiency, spore volume, mycelium quantity, and lesion size have a relatively high heritability; and latent period and sporulation rate had much lower values.

According to the Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn test among populations, the heritabilities of infection efficiency and lesion size significantly increased between 1993 and 1998 from 0.40 to 0.77 and from 0.09 to 0.49 respectively. The heritability of *in planta* mycelium quantity was consistently high (>0.36). Spore volume also had a relatively high heritability (always >0.24) which significantly increased between 1994 and 1998 to reach 0.47. On the contrary, the heritability of latent period and sporulation rate remained low (<0.14) across all populations.

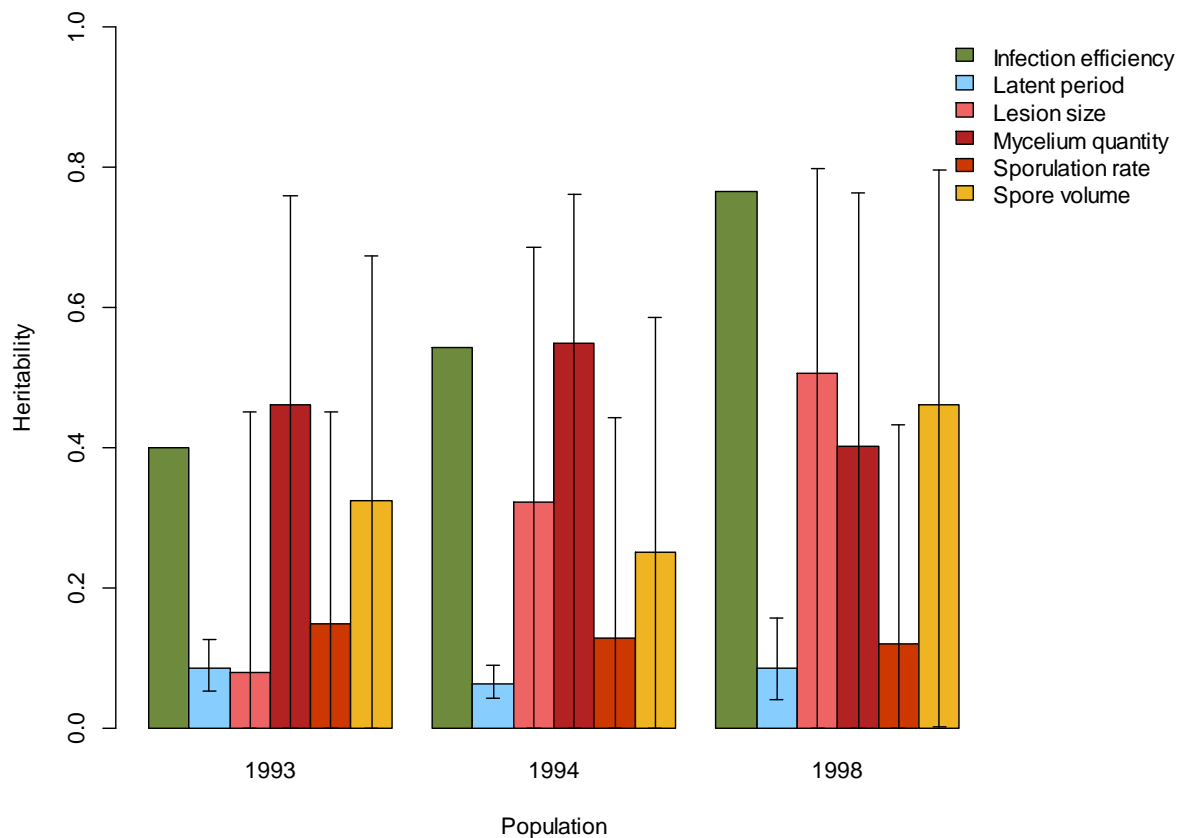


Figure 2: Heritability of aggressiveness and morphological traits for each population. The error bars represent 5% and 95% confidence intervals calculated from bootstrapped datasets (not available for infection efficiency).

3.3. Q_{ST} - F_{ST} comparison for quantitative traits

To test for selection, trait divergence among populations was estimated with Q_{ST} and compared to neutral genetic divergence F_{ST} computed from microsatellite genotypes. Pairwise indices allowed us to assign a type of selection to a given trait and pair of populations. Five and 95% confidence intervals of Q_{ST} and F_{ST} allowed us to highlight robust results (Miller *et al.*, 2008).

Globally, comparisons between avirulent 7 and virulent 7 populations (1993 vs 1994 and 1993 vs 1998) are similar: the F_{ST} are around 0.10 and there are differences in Q_{ST} values among traits (Figure 3). The Q_{ST} for spore volume reaches 0.50, standing significantly above the F_{ST} . On the contrary, infection efficiency, latent period and mycelium quantity showed very low Q_{ST} values (< 0.015) and Q_{ST} values were significantly lower than F_{ST} . Lesion size and sporulation rate displayed Q_{ST} values nearly equal to the F_{ST} level (confounded confidence intervals). Comparing the two virulent 7 populations (1994 and 1998), no

differentiation was observed, neither based on neutral markers ($F_{ST} = 9.5 \times 10^{-4}$) nor on quantitative traits.

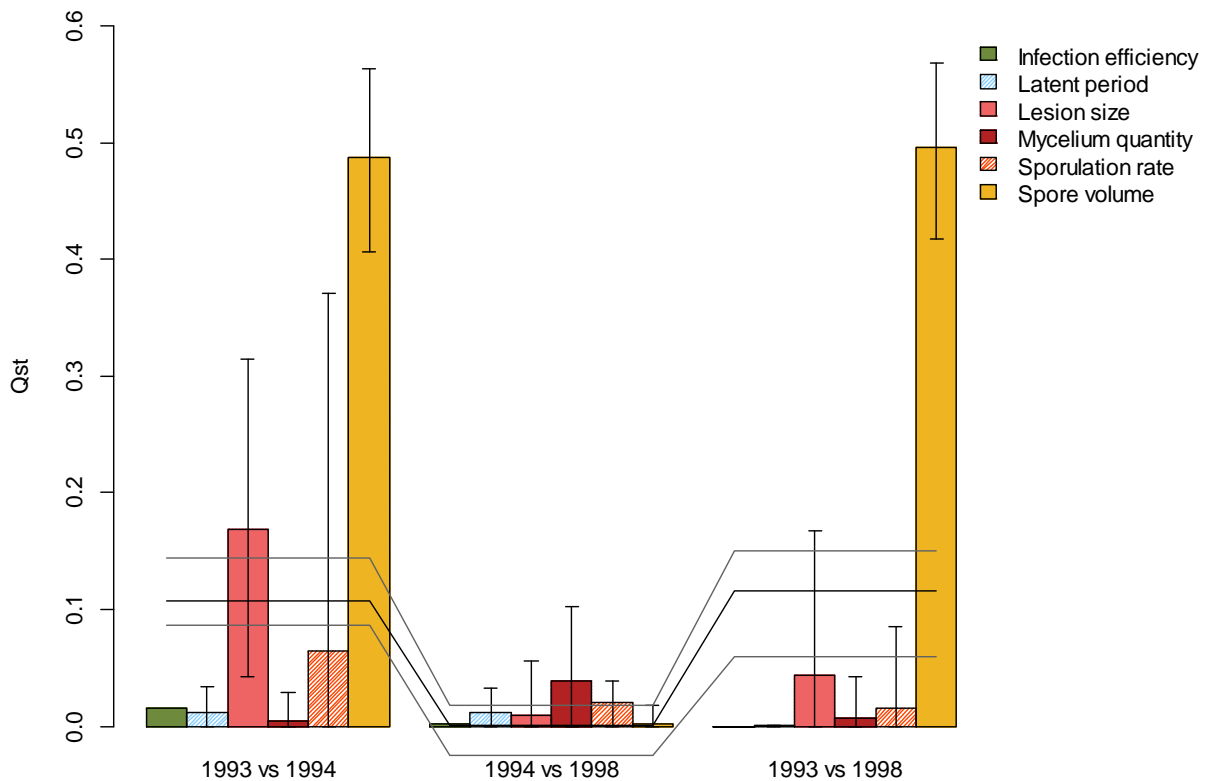


Figure 3: Q_{ST} - F_{ST} comparison. The bar plot represents Q_{ST} values (bars are grouped according to pairwise comparison and traits are displayed in the same order). Plain bars correspond to the most heritable traits and hatched bars to the less heritable ones. Confidence intervals (5 and 95%) were computed from bootstrap analysis (not available for infection efficiency). The black line corresponds to pairwise F_{ST} and grey lines represent 5 and 95% confidence intervals (jack-knife over loci).

4. Discussion

The aim of this study was to characterize the evolution of aggressiveness and morphological traits following the resistance R7 breakdown event. To test the hypothesis of evolution driven by this event, we measured six life history traits on three *M. larici-populina* populations in a common garden experiment using a single-spore inoculation protocol.

Among the six traits measured (infection efficiency, latent period, lesion size, mycelium quantity, sporulation rate and spore volume), spore volume was the only one to vary significantly among the three populations. Other traits, usually associated to aggressiveness, were constant among the three studied populations. In the following discussion, we discuss traits evolution following a major qualitative resistance breakdown event, considering their heritability and the selection applied on them.

The increase in spore volume is associated to a high heritability and a potential directional selection at the time of the breakdown event, providing evidence for evolution following this resistance breakdown. Larger spore volumes seemed to have been selected following the resistance R7 breakdown in 1994 and to have been maintained for at least four years after this event. The high heritability value indicates an ability to respond to selection. The heritability values of spore volume we found are not surprising. Indeed, Price & Schluter (1991) concluded that morphological traits tend to have a higher heritability than life-history traits, and Stefansson *et al.* (2014b) estimated a heritability of spore size (0.55), comparable to the ones we calculated. Additionally, Q_{ST} - F_{ST} comparison between populations from 1993 and 1994 indicated the presence of directional selection acting on spore volume. Given the heritability level, this suggests a response to selection for this trait. A similar result in the short-term evolution of spore size and shape has been observed by Delmas *et al.* (2016) as an adaptation to quantitative resistance. Bever & Morton (1999) and Bentivenga *et al.* (1997) also observed a rapid evolution of these morphological traits in a single generation of selection on arbuscular mycorrhizal fungi.

The evolution of spore volume is consistent with an adaptation to dispersal. It has been shown that poplar rust spores have long distance dispersal abilities (Barrès *et al.*, 2008) which is consistent with the rapid invasion of virulent 7 strains across France (Xhaard *et al.*, 2011). The first virulent 7 strains were found in Belgium in September 1994 and subsequently sampled in northern France (Pinon & Frey, 2005). It is thus probable that the collected strains originated from the migrant strains from Belgium. Assuming that, the larger volume observed for the 1994 population is consistent with a previous study conducted in the Durance River valley (Pernaci *et al.*, in prep.), which showed that migrant spores tend to have a larger volume than resident ones during an annual epidemic. In spite of these results, the role of spore volume in the dispersal process is not clear for poplar rust. On one hand, at equal spore density, larger spores could have a higher wind surface and disperse further. On the other hand, several studies found a positive correlation between spore volume (or size of other propagules) and germination or multiplication. This has been linked to an autoinfection of the susceptible host, to a higher nutrient availability during the autonomous development (Werner & Platt, 1976) or to a higher survival ability to temperature variation, desiccation and UV radiation (Rotem *et al.*, 1985).

After the resistance breakdown event, it appeared that spore volume was not under directional selection anymore, staying constant between 1994 and 1998. This could be explained by no or a low selection on this trait after the colonisation of ‘Beaupré’ stands. A larger volume of spores may have been no longer an advantage for individuals but regarding the low F_{ST} value between 1994 and 1998, homogenising selection would not have been detectable.

If the volume of spores seems to be the only evolving trait following the resistance breakdown event, the mycelium quantity also seems under selection, but in this case stabilizing selection.

Stefansson *et al.* (2014a) found that life history traits, such as *in planta* mycelium quantity, tend to have a higher heritability than morphological traits. The high heritability of life history traits could be due to the importance of maintaining the functions associated with these traits. This statement is often verified for crop pathogens as the barley pathogen *Rhynchosporium commune* (Stefansson *et al.*, 2014b), the wide host range pathogen *Rhizoctonia solani* (Willi *et al.*, 2011), the corn pathogens *Helminthosporium maydis* (Hill & Nelson, 1982) and *Cochliobolus carbonum* (Hamid *et al.*, 1982), or the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* (Willi *et al.*, 2010). Alongside the high heritability, the Q_{ST} - F_{ST} comparison suggests that the mycelium quantity was under homogenising selection at the time of the resistance R7 breakdown event.

Like for mycelium quantity, lesion size could have responded to selection regarding its high genetic heritability but no evolution of this trait has been observed between the populations studied. According to Gandon & Michalakis (2000), qualitative host resistance indirectly influences the evolution of aggressiveness traits through the reduction of the probability of parasite transmission and multiplication. The selection pressure applied on parasite aggressiveness traits is relatively low, unlike the one induced by quantitative resistances. This implies a relatively slow decrease of aggressiveness for parasites facing qualitative resistance. The lack of evolution of mycelium quantity and lesion size on a four-year period following the resistance breakdown is thus consistent with Gandon & Michalakis (2000).

However, Gandon & Michalakis (2000) did not consider the possibility of resistance breakdown when host qualitative resistance is quite easy to overcome. At the beginning of the colonisation of 'Beaupré' stands, which were free from rust before the resistance R7 breakdown, space and nutrient resources were not limiting factors. At that time, the selection pressure on aggressiveness trait was still low. After the massive colonisation of 'Beaupré' stands, however, virulent 7 strains would presumably have experienced competition among themselves for space and nutrient resources and faced higher selection pressure. Evolution of heritable aggressiveness traits was then expected.

Interestingly, lesion size's heritability increased from the population sampled in 1993 to the one sampled in 1998. This change in the part of phenotypic variance explained by the genetic one could be due to several causes. The increase observed between the avirulent 7 population and the virulent 7 population sampled in 1994 could be due to differences in genetic background (Xhaard *et al.*, 2011) involving differences in genetic variances. This change may be explained by the different selection history of populations (Charmantier & Garant, 2005) marked by the resistance R7 breakdown event for the latter population. Populations from

1994 and 1998 have the same genetic background (Xhaard *et al.*, 2011; Persoons *et al.*, 2017) but it seems realistic to hypothesize an increase in genetic variance either due to new variants coming in the population from the remaining avirulent population, or to mutation (Hartl & Jones, 2001). These considerations have to be taken with caution because lesion size (as most of the studied traits in our experiment) is an interaction trait and measuring them on a common poplar cultivar may modify their expression compared to their original host (Charmantier & Garant, 2005).

As it is a prerequisite for selection on traits, a relatively high estimate of heritability identifies traits potentially subject to selection. It is noteworthy that we have estimated the heritability of each trait from their measure in a laboratory experiment, probably leading to an overestimation of heritability values in comparison to field estimates (Charmantier & Garant, 2005). The low heritability of sporulation rate and latent period for populations before and after the resistance breakdown prevents the evolution of these traits and thus the interpretation of Q_{ST} - F_{ST} comparisons. These low levels of heritability are in agreement with Price & Schluter (1991), which has already been verified for other fungal species (e.g. Bever & Morton (1999) for *Scutellospora pellucida* and by Zhan *et al.* (2005) for *Mycosphaeraella graminicola*).

5. Conclusion

In summary, this study has highlighted a probable evolution of spore volume under directional selection type following the resistance R7 breakdown event. Surprisingly we did not find evidence for virulence cost as suggested by Montarry *et al.* (2006) and Dowkiw *et al.* (2010). Trade-offs are known to shape trait evolution and it would be worth studying their influence on aggressiveness traits in the context of a resistance breakdown.

A model for resistance durability (Papaix *et al.*, 2017) already exists: the next step would be to test pathogen evolution facing quantitative resistance in its host using an experimental coevolution approach.

Acknowledgement

We thank Mathieu Siol, Josselin Montarry, Elisabeth Fournier and Vincent Segura for advices in statistical analyses.

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-13-BSV7-0011, FunFit project; ANR-11-LABX-0002-01, Cluster of Excellence ARBRE). A. Maupetit was supported by PhD fellowships from the Region Lorraine and INRA.

References

- Barrès B, Halkett F, Dutech C, Andrieux A, Pinon J, Frey P, 2008. Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 577–587.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S, Christensen RHB, Singmann H, Dai B, Scheipl F, Grothendieck G, Green P, 2018. *lme4: Linear Mixed-Effects Models using “Eigen” and S4*.
- Bentivenga Stephen P., Bever James D., Morton Joseph B., 1997. Genetic variation of morphological characters within a single isolate of the endomycorrhizal fungus *Glomus clarum* (Glomaceae). *American Journal of Botany* **84**, 1211–1216.
- Bever JD, Morton J, 1999. Heritable variation and mechanisms of inheritance of spore shape within a population of *Scutellospora pellucida*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *American journal of botany* **86**, 1209–1216.
- Brown JKM, Tellier A, 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 345–367.
- Charmantier A, Garant D, 2005. Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 1415–1425.
- Clifford BC, Clothier RB, 1974. Physiologic specialization of *Puccinia hordei* on barley hosts with non-hypersensitive resistance. *Transactions of the British Mycological Society* **63**, 421–430.
- Couch BC, Fudal I, Lebrun M-H, Tharreau D, Valent B, Kim P van, Nottéghem J-L, Kohn LM, 2005. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics* **170**, 613–630.
- Delmas CEL, Fabre F, Jolivet J, Mazet ID, Richart Cervera S, Delière L, Delmotte F, 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evolutionary Applications* **9**, 709–725.
- Dowkiw A, Voisin E, Bastien C, 2010. Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* **59**, 523–534.
- Dray S, Dufour A-B, Thioulouse J, Jombart with contributions from T, Pavoine S, Lobry JR, Ollier S, Borcard D, Chessel PL and ASB on earlier work by D, 2018. *ade4: Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences*.
- Flor HH, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–296.
- Fox J, Weisberg S, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, Ellison S, Firth D, Friendly M, Gorjanc G, Graves S, Heiberger R, Laboissiere R, Monette G, Murdoch D, Nilsson H, Ogle D,

- Ripley B, Venables W, Winsemius D, Zeileis A, R-Core, 2017. *car: Companion to Applied Regression*.
- Gandon S, Michalakis Y, 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **267**, 985–990.
- Goudet J, 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485–486.
- Hamid A, Ayers J, Schein R, Hill R, 1982. Components of Fitness Attributes in *Cochliobolus Carbonum* Race-3. *Phytopathology* **72**, 1166–1169.
- Harrell Jr FE, Dupont C, 2018. *Hmisc: Harrell Miscellaneous*.
- Hartl DL, Jones EW, 2001. *Genetics: analysis of genes and genomes*. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers.
- Hill JP, Nelson RR, 1982. The heritability of three parasitic fitness attributes of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* **72**, 525.
- Kardin MK, Groth JV, 1989. Density-dependent fitness interactions in the bean rust fungus. *Phytopathology* **79**, 409–412.
- Kolmer JA, Leonard KJ, 1986. Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology* **76**, 774–777.
- Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–338.
- Larson PR, Isebrands JG, 1971. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Canadian Journal of Forest Research* **1**, 1–11.
- Lê Van A, Gladieux P, Lemaire C, Cornille A, Giraud T, Durel C-E, Caffier V, Cam BL, 2012. Evolution of pathogenicity traits in the apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications* **5**, 694–704.
- Leonard KJ, 1969. Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology* **59**, 1851–1857.
- Maupetit A, Larbat R, Pernaci M, Andrieux A, Guinet C, Boutigny A-L, Fabre B, Frey P, Halkett F, 2018. Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Mendiburu F de, 2017. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Miller JR, Wood BP, Hamilton MB, 2008. FST and QST under neutrality. *Genetics* **180**, 1023–1037.
- Montarry J, Corbiere R, Lesueur S, Glais I, Andrivon D, 2006. Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant–pathogen systems? *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 522–531.

- Morales M, community with code developed by the RDCT and with general advice from the R-hel.listserv, Murdoch especially D, 2017. *sciplot: Scientific Graphing Functions for Factorial Designs*.
- Nyquist WE, Baker RJ, 1991. Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**, 235–322.
- Papaix J, Rimbaud L, Burdon JJ, Zhan J, Thrall PH, 2017. Differential impact of landscape-scale strategies for crop cultivar deployment on disease dynamics, resistance durability and long-term evolutionary control. *Evolutionary Applications* **0**, 1–13.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**, 409–424.
- Pei MH, Ruiz C, Hunter T, Arnold GM, Bayon C, 2002. Quantitative relationships between inoculum of *Melampsora larici-epitea* and corresponding disease on *Salix*. *Plant Pathology* **51**, 443–453.
- Pernaci M, Fabre B, Frey P, Halkett F, in prep. Evolution of spore size during dispersal of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*.
- Persoons A, Hayden KJ, Fabre B, Frey P, De Mita S, Tellier A, Halkett F, 2017. The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology* **26**, 1902–1918.
- Philibert A, Desprez-Loustau M-L, Fabre B, Frey P, Halkett F, Husson C, Lung-Escarmant B, Marçais B, Robin C, Vacher C, Makowski D, 2011. Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology* **48**, 1381–1390.
- Pinon J, Frey P, 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: Pei MH., McCracken AR, eds. *Rust diseases of willow and poplar*. Wallingford, UK: CAB International, 139–154.
- Price T, Schluter D, 1991. On the low heritability of life-history traits. *Evolution* **45**, 853–861.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, 2004. Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* **94**, 712–721.
- Rotem J, Wooding B, Aylor DE, 1985. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopathology* **75**, 510.
- Sharma JK, Heather WA, Winer P, 1980. Effect of leaf maturity and shoot age of clones of *Populus* species on susceptibility to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* **70**, 548–554.
- Spitze K, 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* **135**, 367–374.
- Stefansson TS, McDonald BA, Willi Y, 2014a. The influence of genetic drift and selection on quantitative traits in a plant pathogenic fungus. *PLOS ONE* **9**, e112523.

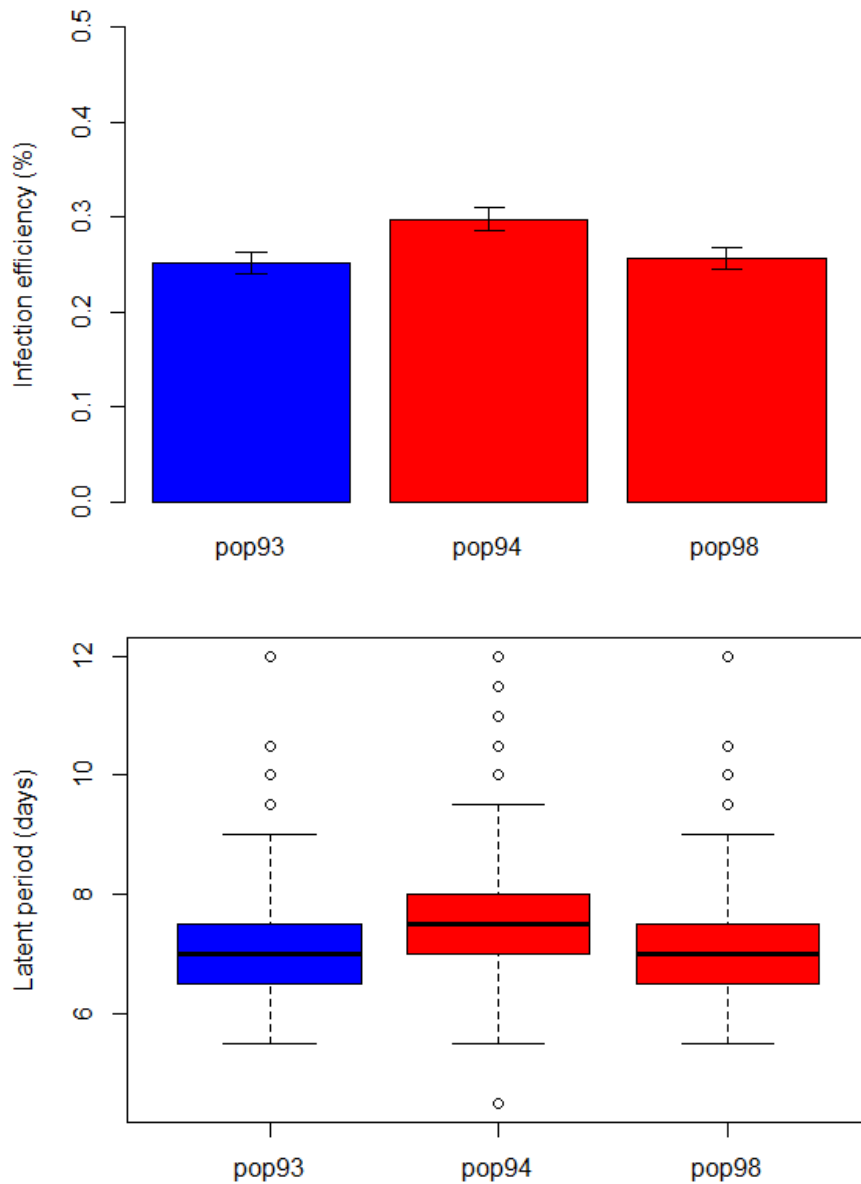
- Stefansson TS, Willi Y, Croll D, McDonald BA, 2014b. An assay for quantitative virulence in *Rhynchosporium commune* reveals an association between effector genotype and virulence. *Plant Pathology* **63**, 405–414.
- Stukenbrock EH, Banke S, Javan-Nikkhah M, McDonald BA, 2007. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 398–411.
- Stukenbrock EH, McDonald BA, 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 75–100.
- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370.
- Werner PA, Platt WJ, 1976. Ecological relationships of co-occurring goldenrods (Solidago: Compositae). *The American Naturalist* **110**, 959–971.
- Willi Y, Follador R, Keller N, Schwander Y, McDonald BA, 2010. Heritability under benign and stressful conditions in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. **12**, 761–768.
- Willi Y, Frank A, Heinzelmann R, Kälin A, Spalinger L, Ceresini PC, 2011. The adaptive potential of a plant pathogenic fungus, *Rhizoctonia solani* AG-3, under heat and fungicide stress. *Genetica* **139**, 903.
- Xhaard C, Fabre B, Andrieux A, Gladieux P, Barres B, Frey P, Halkett F, 2011. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* **20**, 2739–2755.
- Zhan J, Linde CC, Jürgens T, Merz U, Steinebrunner F, McDonald BA, 2005. Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **14**, 2683–2693.
- Zhan J, Thrall PH, Papaïx J, Xie L, Burdon JJ, 2015. Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annual Review of Phytopathology* **53**, 19–43.

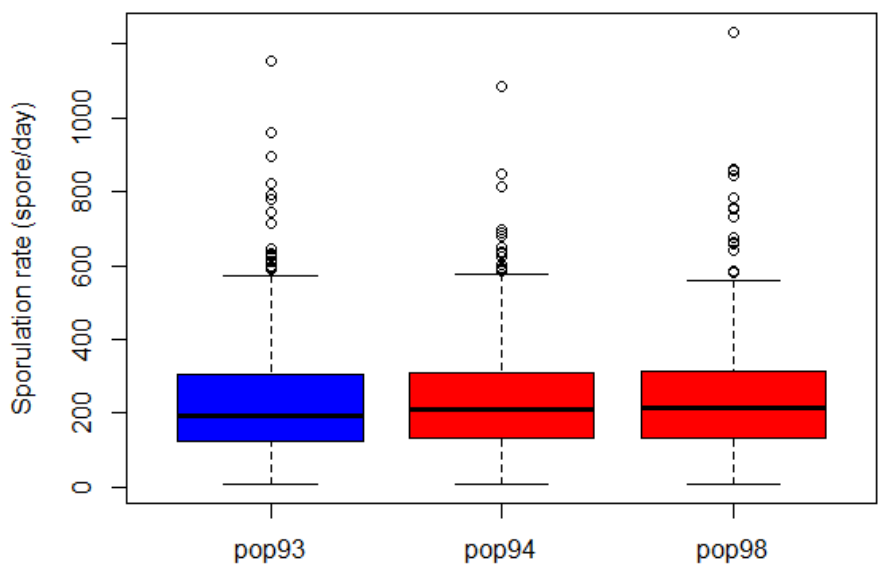
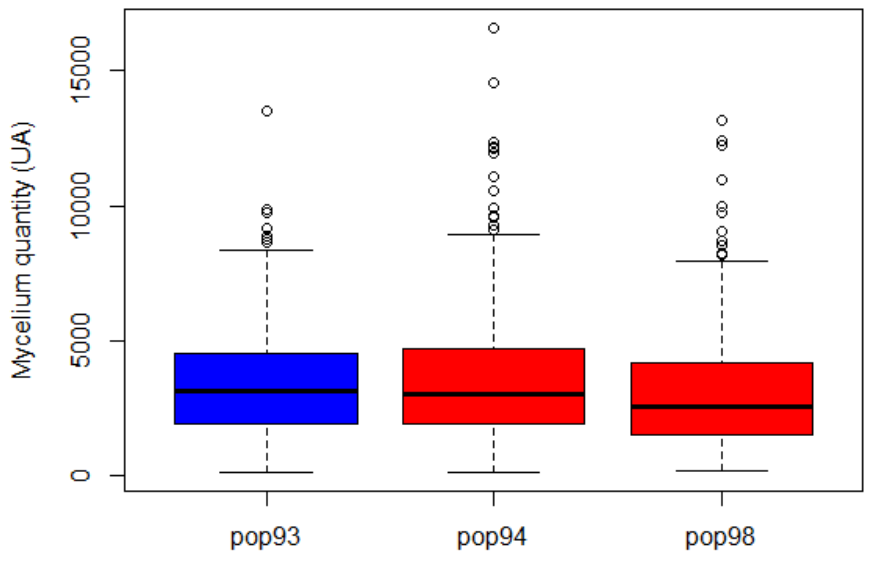
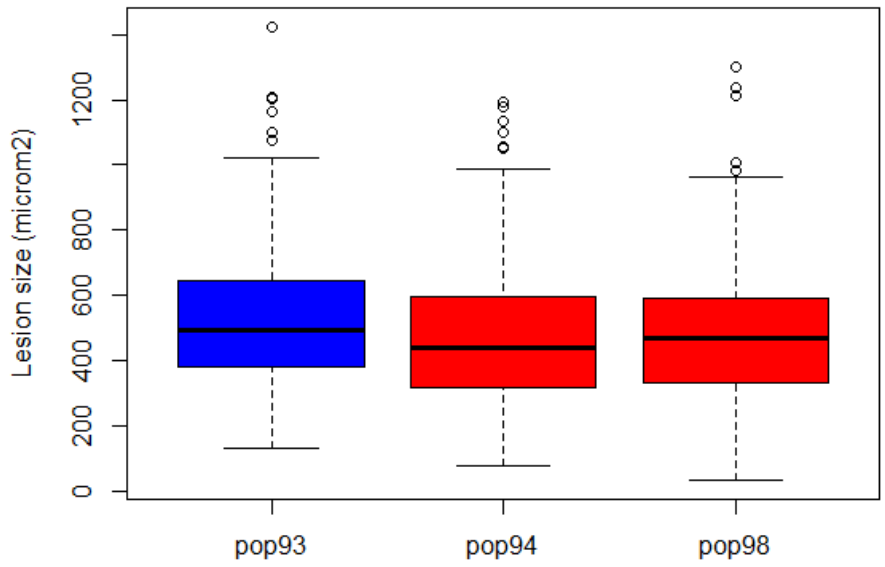
Supplementary material

Supplementary Table 1: Incomplete block design for qPCR analysis

		DNA extraction plate number																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19				
qPCR run number	1	1	2	3	4																			
	2					5	6	7	8															
	3									9	10	11	12											
	4													13	14	15	16							
	5	1																17	18	19				
	6		2				6				10				14									
	7			3				7				11				15								
	8				4				8				12					16						
	9					5				9				13						17				
	10		2					7					12							17				
	11			3					8					13							18			
	12	1					5				10					15								
	13				4					9					14							19		
	14					6						11					16						19	
	15																				18			
Total nb of repetition per plate		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		

Supplementary Figure 1: Barplot of infection efficiency (%) with standard errors and boxplots of latent period (days), lesion size (μm^2), mycelium quantity and sporulation rate (spore/day) for each population. Blue box stands for avirulent population sampled in 1993 and red boxes for virulent populations sampled in 1994 and 1998.





Recherche de compromis évolutifs

1. Introduction

L'étude précédente visait à déterminer l'évolution des caractères morphologiques et d'agressivité de *M. larici-populina* autour du contournement de la résistance R7. La comparaison des Q_{ST} et des F_{ST} a mis en évidence que le volume des spores a été sous sélection directionnelle et la quantité de mycélium sous sélection stabilisante. Le Q_{ST} donne une estimation de la variance génétique d'un caractère quand il est considéré seul, mais la covariance génétique entre deux caractères joue aussi un rôle dans leur évolution (Roff *et al.*, 2012). Cette covariance génétique est la base des compromis évolutifs qui s'observent à l'échelle phénotypique et orientent les trajectoires évolutives des caractères concernés (Roff & Fairbairn, 2012; Laine & Barrès, 2013).

Cette deuxième partie du **chapitre 2** vise à tester l'existence et l'évolution des compromis évolutifs dans le contexte d'un contournement de résistance. Pour ce faire, nous avons estimé les variances et covariances entre caractères phénotypiques au sein de quatre populations.

2. Matériels et méthodes

2.1. Données sur les caractères d'agressivité et morphologique

Les données brutes phénotypiques des souches des populations récoltées en 1993, 1994 et 1998 sont celles utilisées dans l'analyse du **chapitre 2.1**. Les souches de la population de 1993 appartiennent au groupe génétique 'fossile' qui a été remplacé à partir de 1998 par le groupe génétique 'cultivé' auquel appartiennent les souches des populations de 1994 et de 1998.

A ces données, ont été ajoutées les mesures des caractères de 18 souches issues d'une population récoltée en 2008 sur des peupliers sauvages ne portant pas de gène de résistance. Cette population appartient à un troisième groupe génétique nommé 'sauvage' (Xhaard *et al.*, 2011) et permet de maximiser les différences d'histoires évolutives entre populations. La mesure des caractères a été réalisée au sein de l'expérience décrite précédemment dont sont issues les données des trois autres populations.

Seuls les caractères mesurés, et non pas ceux calculés à partir de ces derniers, ont été inclus dans l'analyse des compromis évolutifs pour éviter toute corrélation par construction. Les six caractères considérés sont donc l'efficacité d'infection, le temps de latence, la taille de lésion, la quantité de mycélium *in planta*, le nombre de spores et le volume des spores.

2.2. Estimation des compromis évolutifs

Une valeur moyenne de chaque caractère pour chaque souche a été obtenue en corrigeant pour les effets expérimentaux ('jour d'inoculation', 'plant' et 'boîte' emboîtés dans 'jour d'inoculation', ainsi que 'manipulateur'). Les transformations et famille d'erreur utilisées dans les modèles sont listées dans le Tableau 1. Les compromis évolutifs ont été estimés par le calcul des coefficients de Spearman entre paires de caractères à partir des moyennes corrigées de chaque souche. Pour prendre en compte la multitude de tests, les *P*-values ont été corrigées par la méthode FDR (pour $\alpha < 5\%$).

Toutes les analyses ont été réalisées avec R version 3.5.0 incluant l'utilisation des extensions suivantes : lsmmeans (Lenth & Love, 2018), lmerTest (Kuznetsova *et al.*, 2018), Hmisc (Harrell Jr & Dupont, 2018) et corrplot (Wei *et al.*, 2017).

Tableau 1: Transformations des variables et familles d'erreur

Caractère	Transformation	Famille d'erreur
Efficacité d'infection	Ø	Binomiale
Temps de latence	Ø	Gamma
Taille de lésion	Racine carrée	Gaussienne
Quantité de mycélium	Racine carrée	Gaussienne
Nombre de spores	Ø	Gaussienne
Volume des spores	Racine cubique	Gaussienne

3. Résultats et discussion

Les compromis évolutifs reflètent les mécanismes de compensation ou d'opposition entre deux caractères, typiquement dus à l'investissement énergétique de l'organisme dans une fonction donnée au détriment d'une autre fonction. Dans ce cas, le coefficient de corrélation de Spearman entre deux caractères impliqués dans ces fonctions sera négatif. Au vu des résultats, aucun compromis évolutif n'a été mis en évidence grâce aux mesures faites sur les quatre populations.

Les coefficients de Spearman indiquent une seule corrélation significativement négative dans l'ensemble du jeu de données. Cette corrélation négative entre le temps de latence et la taille de lésion dans la population de 1994 (Figure 1C) doit en fait être interprétée comme une corrélation positive entre caractères d'agressivité puisque le temps de latence (qui est mesuré) correspond à l'inverse de la vitesse de développement du champignon, qui, lui, est positivement corrélé à son succès évolutif. La corrélation négative entre temps de latence et taille de lésion a déjà été observée chez *Zymoseptoria triciti* (ou *Mycosphaerella graminicola*) (Suffert *et al.*, 2013), chez *Puccinia recondita* (Milus & Line, 1980) ainsi que chez *M. larici-*

populina avec la souche 93CV1, qui appartient à la population de 1993 (Dowkiw *et al.*, 2003) et la souche 98AG69, qui appartient à la population de 1998 (Dowkiw & Bastien, 2004). Cette relation implique deux caractères considérés comme pertinents dans l'évaluation de l'agressivité des parasites des plantes (Suffert *et al.*, 2013). Il est donc étonnant qu'on ne l'observe que dans la population de 1994. Une hypothèse serait que le contournement de la résistance R7 aurait généré, par dérive, une plus forte variance de temps de latence. Cette variance sur les valeurs de latence des souches permettrait d'observer la corrélation dans la population échantillonnée en 1994. Par la suite, les pressions de sélection liées à une compétition entre souches auraient réduit cette variance en l'espace de quatre ans (phénomène de canalisation du développement lors de l'infection). Ainsi, la moyenne de temps de latence n'a pas changé au cours de ces quatre années (comme vu dans la section précédente), mais la variance aurait diminué.

Aucune autre corrélation négative n'apparaît alors que certains compromis évolutifs sont connus chez d'autres champignons phytopathogènes (Pariaud *et al.*, 2009; Lannou, 2012). En revanche, des corrélations génétiques positives ressortent. En particulier, dans la population de 1998, on observe une corrélation positive entre la taille de lésions et le nombre de spores (Figure 1D). Cette corrélation positive avait été mise en évidence lors de l'inoculation de 336 géotypes de peuplier avec une souche de la population de 1993 (Dowkiw *et al.*, 2003) et fait également écho au **chapitre 1**. En effet, lors de cette première étude (Maupetit *et al.*, 2018), nous avons mis en évidence une corrélation entre la taille de lésion et le taux de sporulation (estimé à partir du nombre de spores) chez une souche de *M. larici-populina* de la population 1998. Lors de la première expérience (**chapitre 1**) la corrélation était purement phénotypique et résultait d'un ajustement des caractéristiques d'infection en fonction des conditions environnementales (gradient de maturité foliaire). Il s'agissait donc de plasticité. L'expérience décrite dans le **chapitre 2.1** et la recherche des compromis évolutifs ont permis de généraliser cette corrélation en ajoutant une dimension génétique. En revanche, ces analyses ont aussi mis en avant l'absence de corrélation entre ces caractères dans les autres populations.

(A) toutes les populations ensemble

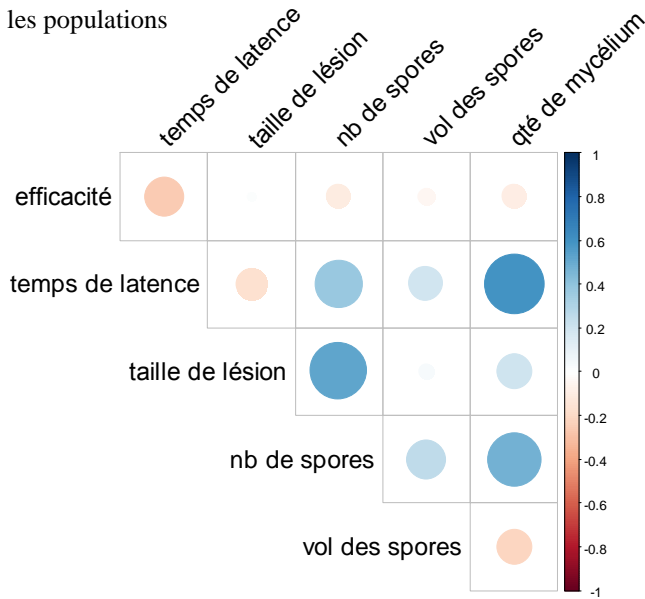
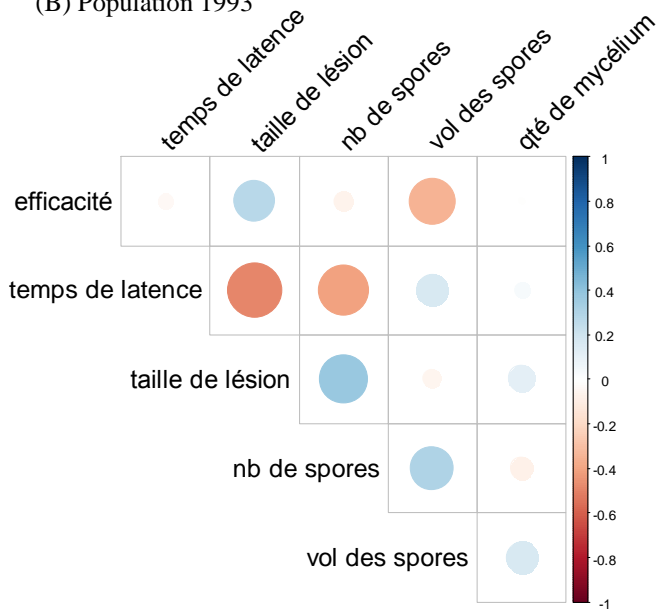
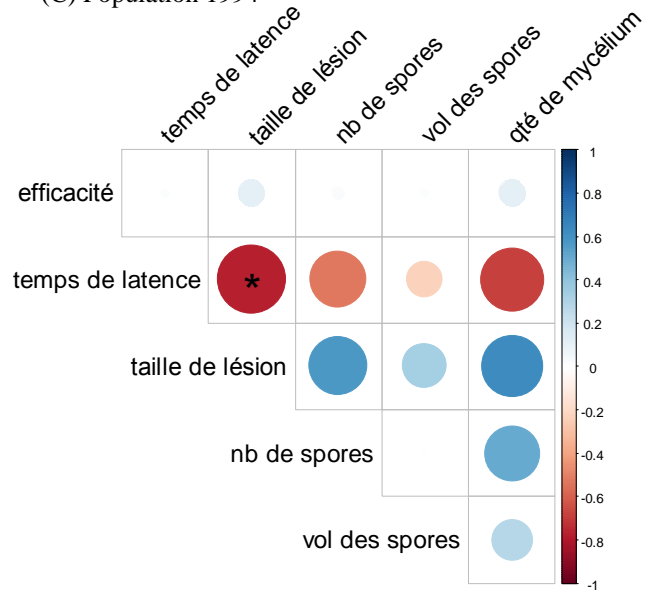


Figure 1: Coefficient de corrélation de Spearman pour toutes les populations ensemble (A) puis pour chaque population séparément (B : 1993 ; C : 1994 ; D : 1998 ; E : 2008). La couleur des points correspond au signe de la corrélation (bleu : positive ; rouge : négative), la taille des points correspond à leur valeur. Les astérisques désignent les coefficients significativement non nuls après ajustement par la méthode FDR ($\alpha < 5\%$).

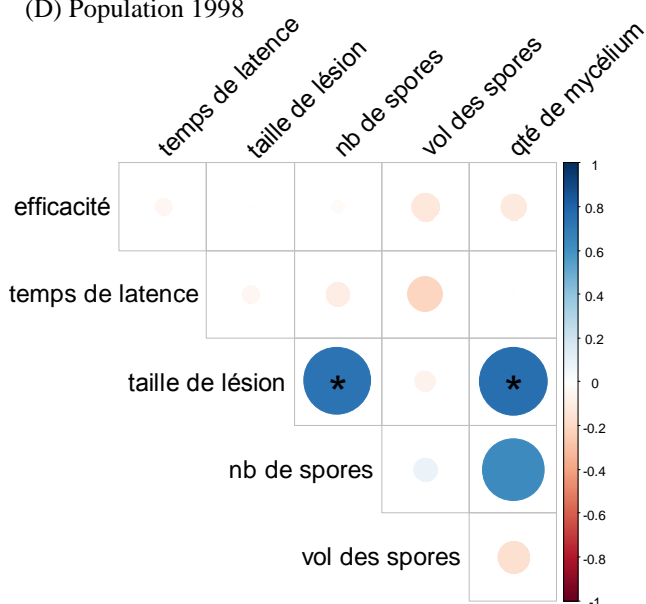
(B) Population 1993



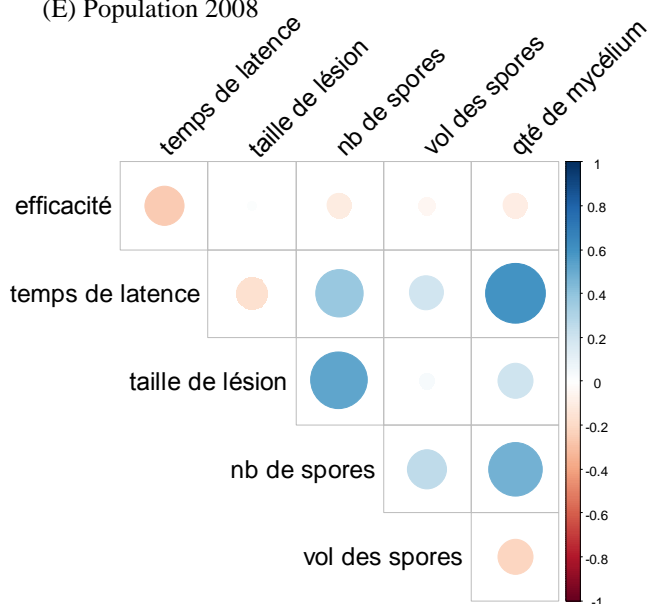
(C) Population 1994



(D) Population 1998



(E) Population 2008



Sur l'ensemble des populations (Figure 1A), la taille des lésions, le nombre de spores et la quantité de mycélium co-varient positivement. La corrélation entre taille de lésion et quantité de mycélium n'avait pas été observée dans le **chapitre 1**. En effet contrairement à la taille des lésions, la quantité de mycélium ne variait pas en fonction du gradient de maturité des feuilles. Dans ce **chapitre 2**, nous montrons en revanche que la quantité de mycélium est un caractère hautement héritable et qu'il varie fortement entre individus d'une même population. Les corrélations positives que nous observons traduiraient alors une différence de performance des individus au sein de chaque population (Nespolo *et al.*, 2014). Ainsi l'ensemble de ces co-variations vont de pair avec un développement accru de certaines souches : une plus grande quantité de mycélium pourra être à l'origine d'un plus grand nombre de spores, ce qui produira une lésion plus étendue sur la feuille de peuplier. Il est à noter que ces corrélations positives sont susceptibles d'empêcher la détection des compromis évolutifs (Fry, 1993).

Enfin, au sein des populations de 1993 et 2008 (Figure 1B et 1E), aucune corrélation, ni positive ni négative, n'est observée. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces populations sont proches de l'équilibre génétique et donc composées de souches aux stratégies évolutives globalement uniformes.

Si aucun compromis évolutif n'a été mis en évidence grâce à cette expérience, il semble probable qu'il en existe tout de même. L'expérience a été réalisée en jardin commun sur un seul cultivar de peuplier ('Robusta') sans gène de résistance qualitative afin de pouvoir comparer des souches virulentes 7 et avirulentes 7. L'interaction entre ce cultivar et les différentes souches de *M. larici-populina* testées ne représente pas l'hétérogénéité présente sur le terrain. Par contre, notre expérience a permis de mesurer précisément les caractères d'agressivité et un caractère morphologique à l'échelle de la lésion sans interaction entre individus, ce qui donne accès aux caractéristiques propres de chacune d'elles.

Références

- Dowkiw A, Bastien C, 2004. Characterization of two major genetic factors controlling quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: strain specificity, field expression, combined effects, and relationship with a defeated qualitative resistance gene. *Phytopathology* **94**, 1358–1367.
- Dowkiw A, Husson C, Frey P, Pinon J, Bastien C, 2003. Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology* **93**, 421–427.
- Fry JD, 1993. The “general vigor” problem: can antagonistic pleiotropy be detected when genetic covariances are positive? *Evolution* **47**, 327–333.
- Harrell Jr FE, Dupont C, 2018. *Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package* [<https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>].
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB, 2018. *lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models. R package* [<https://CRAN.R-project.org/package=lmerTest>].
- Laine A-L, Barrès B, 2013. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathology* **62**, 96–105.
- Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–338.
- Lenth R, Love J, 2018. *lsmeans: Least-Squares Means. R package* [<https://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>].
- Maupetit A, Larbat R, Pernaci M, Andrieux A, Guinet C, Boutigny A-L, Fabre B, Frey P, Halkett F, 2018. Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1396.
- Milus EA, Line RF, 1980. Characterization of resistance to leaf rust in Pacific Northwest wheats. *Phytopathology* **70**, 167–172.
- Nespolo RF, Bartheld JL, González A, Bruning A, Roff DA, Bacigalupe LD, Gaitán-Espitia JD, 2014. The quantitative genetics of physiological and morphological traits in an invasive terrestrial snail: additive vs. non-additive genetic variation. *Functional Ecology* **28**, 682–692.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**, 409–424.
- Roff DA, Fairbairn DJ, 2012. The evolution of trade-offs under directional and correlational selection. *Evolution* **66**, 2461–2474.
- Roff DA, Prokkola JM, Krams I, Rantala MJ, 2012. There is more than one way to skin a G matrix: Comparing G matrices. *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 1113–1126.

- Suffert F, Sache I, Lannou C, 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**, 1330–1341.
- Wei T, Simko V, Levy M, Xie Y, Jin Y, Zemla J, 2017. *corrplot: Visualization of a correlation matrix R package* [<https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>].
- Xhaard C, Fabre B, Andrieux A, Gladioux P, Barres B, Frey P, Halkett F, 2011. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* **20**, 2739–2755.

**CHAPITRE 3 : LOCALISATION DE LOCI IMPLIQUES DANS
LA DETERMINATION DES VIRULENCES ET DES
CARACTERES D'AGRESSIVITE ET MORPHOLOGIQUES**

CHAPITRE 3 : LOCALISATION DE LOCI IMPLIQUES DANS LA DETERMINATION DES VIRULENCES ET DES CARACTERES D'AGRESSIVITE ET MORPHOLOGIQUES

Dans le **chapitre 2**, nous avons vu que certains caractères d'agressivité et un caractère morphologique ont évolué au moment du contournement de la résistance R7. Afin de mieux cibler les caractères d'agressivité avec les résistances quantitatives, nous nous sommes intéressés à leur déterminisme génétique. Précédemment, l'étude de Persoons *et al.* (in prep.) a décrit la structure génétique des quatre populations de *M. larici-populina* grâce au séquençage du génome de 86 souches incluant celles étudiées dans le **chapitre 2**. En combinant ces données génotypiques avec les données phénotypiques acquises et analysées dans le **chapitre 2**, nous avons tenté de localiser les régions génomiques contrôlant les caractères d'agressivité et morphologique avec une analyse d'association pangénomique (*genome-wide association study*, GWAS). La première partie du **chapitre 3** présente les résultats de cette analyse préliminaire sous la forme d'un article court en préparation.

Les analyses GWAS sont plus adaptées pour détecter les gènes à effet majeur que mineur. Les facteurs de virulence étant connus pour avoir un déterminisme génétique simple, nous avons cherché à identifier les gènes contrôlant ceux présents chez les souches étudiées. Ces souches présentent des profils de virulences divers qui ont permis de mener l'analyse sur les virulences 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. Concernant la virulence 7, l'étude citée ci-dessus (Persoons *et al.*, in prep.) a également cherché à localiser les bases génétiques de cette virulence par une approche de scan génomique. Cette dernière a mis en évidence 20 régions potentiellement sous sélection au moment du contournement de la résistance R7. Ces régions contiennent 14 gènes considérés comme des gènes candidats associés à la virulence 7, mais le locus d'avirulence n'a pas pu être déterminé précisément. La deuxième partie de ce chapitre combine donc les données génotypiques de Persoons *et al.* (in prep.), les profils de virulence de ces souches établis dans le cadre de ma thèse et la méthode d'analyse GWAS du **chapitre 3.1**. Le tout est présenté sous la forme d'un article en préparation.

Article 3 : Searching for loci involved in aggressiveness-related traits using a genome-wide association study in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*

Authors

Agathe Maupetit¹, Vincent Segura², Pascal Frey¹, Fabien Halkett¹, Stéphane De Mita¹

1 Université de Lorraine, Inra, UMR IAM, 54000 Nancy, France.

2 Inra, ONF, UMR BioForA, 45075 Orléans, France

1. Introduction

In an agronomical context, one way to fight plant diseases is to breed disease resistant crop varieties. Qualitative resistances have been the most employed and studied because they are easy to select and effective at least in the short term. These resistances are often based on the gene-for-gene model, i.e. determined by one major effect gene (Flor, 1971). However, conditions in an environment modified by agricultural practices are creating high selection pressures on pathogens (Stukenbrock & McDonald, 2008). As a result, plant pathogens have been observed to overcome qualitative resistances in many crops (Niks & Rubiales, 2002; Caffier & Laurens, 2005; Stukenbrock & McDonald, 2008; Singh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). In particular, resistance breakdowns have been observed for qualitative resistances carried by poplar cultivars against the Eurasian poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. Since 1949, eight resistance breakdowns have been recorded (Pinon & Frey, 2005) including one very well studied which occurred in 1994 for the resistance R7.

In contrast, quantitative resistances have the potential to be more durable (Johnson, 1979; McDonald & Linde, 2002). These resistances impede pathogen development by inhibiting the full expression of one or several of its aggressiveness traits (quantitative component of pathogenicity (Pariaud *et al.*, 2009)). Based on a polygenic determinism, these resistances are expected to be more difficult to overcome (Fabre *et al.*, 2012; Mundt, 2014). Nevertheless, these resistances are expected to erode with time (Gandon & Michalakis, 2000), which has been observed experimentally (Andrivon *et al.*, 2007; Dowkiw *et al.*, 2010; Montarry *et al.*, 2012; Caffier *et al.*, 2014; Delmas *et al.*, 2016). In order to guide breeding strategies towards more durable quantitative resistance, the knowledge of the genes controlling aggressiveness traits could help targeting one particular trait (Van den Berg *et al.*, 2014). The genetic underpinnings of these traits may give us insight on their potential erosion and evolution.

To this aim, two main methods can be considered: an association study (Genome-Wide Association Study – GWAS) or a linkage study (QTL mapping). Both methods allow

localizing loci involved in the control of quantitative traits such as aggressiveness and morphological traits, without previous knowledge on them. Still, there are some substantial differences between these methods. Association studies examine individuals from natural populations whereas linkage studies analyse progenies from controlled crosses between parents expressing contrasting phenotypes (Plissoneau *et al.*, 2017). For both, there are some pros and some cons but one important point is that, by studying natural populations, GWAS take into account recombination over many generations allowing to identify loci more precisely (in a range ≤ 100 kb) than linkage studies (in a range ≤ 5 Mb) (Ott *et al.*, 2011). Natural populations better represent the phenotype distribution found in the fields than experimental crosses. Moreover, in the case of *M. larici-populina*, controlled crosses are very difficult to produce in the laboratory because of the complex life cycle of this heteroecious fungus, altering between poplar and larch (Pernaci *et al.* 2014). With that in mind and thanks to previous studies and experiments giving us access to all the necessary material, we conducted a GWAS on *M. larici-populina* quantitative traits.

This study combines phenotypic data from the experiment described in Maupetit *et al.* (in prep. a), with genotypic data from Persoons *et al.* (in prep.) in a genome-wide analysis.

2. Material and methods

2.1. Characterization of quantitative traits

2.1.1. *Plant and fungal material and experimental design*

Seventy-one strains were studied during the experiment. These strains belong to a large historical collection whose population genetic structure has been thoroughly investigated (Persoons *et al.*, 2017). The 71 strains belong to four populations. Three temporal populations sampled in northern France and in Belgium were chosen to reflect three key dates: population 1993 (18 strains) was collected on susceptible poplars, before the resistance R7 breakdown; population 1994 (18 strains) and 1998 (17 strains) were collected on resistant R7 poplars, just after the resistance breakdown and four years later, respectively. Population 1993 belongs to a genetic group, called ‘fossil’, which vanished after the resistance breakdown with limited gene flow with the new genetic group (Persoons *et al.*, 2017). Populations 1994 and 1998 belong to the same genetic group, called ‘cultivated’, which emerged after resistance R7 breakdown (Xhaard *et al.*, 2011; Persoons *et al.*, 2017). The fourth population was collected in 2008 (18 strains) on wild poplars carrying no qualitative resistance gene in the Durance River valley (southern France). This population belongs to a third genetic group called ‘wild’ (Xhaard *et al.*, 2011).

All *M. larici-populina* strains were inoculated on the same cultivar to carry out a common garden experiment. Characterization of quantitative traits was performed on excised leaf discs of *Populus deltoides* \times *P. nigra* ‘Robusta’ which are susceptible to strains of all qualitative

virulence types. Thirty-nine poplar plants were used during the fourteen days of inoculation. Each day of inoculation, two manipulators inoculated eighteen 24-well polystyrene cell culture plates. Day of inoculation, plant, plate and manipulator will be considered as experimental factors.

Each plate contained four strains, so six leaf discs were inoculated per strain. Strains were inoculated on at least 72 leaf discs (corresponding to 12 quarter-plates) and randomly distributed among 240 plates in order to maximize the distribution of each strain over all days of inoculation.

2.1.2. *Single-spore inoculation protocol*

All *M. larici-populina* strains were multiplied on poplar leaf discs prior to their inoculation and inoculated one by one as described in Maupetit *et al.* (2018). Measurement of quantitative traits was conducted as described in Maupetit *et al.* (in prep. a): on 5 to 42 sporulating uredinia per strain (mean number of uredinia used to measure traits = 20), as available depending on infection frequency. One of the 71 strains did not produce uredinia, so it has not been taken into account in the analysis.

2.1.3. *Quantitative trait measurements*

Aggressiveness traits classically studied in plant-pathogen systems were measured: infection efficiency, latent period, uredinia size, and sporulation rate (Lannou, 2012); another less classically studied trait was estimated too: *in planta* mycelium quantity. Traits and their measurement are defined in Maupetit *et al.* (in prep. a). We also measured one morphological trait: the volume of spores, which was computed from length and width of spores obtained from image analysis (see Maupetit *et al.* (2018) for details).

2.2. DNA extraction and qPCR quantification of *in planta* mycelium

DNA was extracted from infected poplar leaf discs and *in planta* mycelium quantity estimated by qPCR as described in Maupetit *et al.* (in prep. a).

2.3. SNP calling

We used a data set of SNP markers from Persoons *et al.* (in prep.) obtained with the following parameters: minimum minor allelic frequency = 0.05; minimum sequencing depth = 15; maximum missing rate = 0.1. The final set of SNP contained 293,975 positions over the 18 chromosomes. More details are provided in Maupetit *et al.* (in prep. b).

2.4. Genome-wide association mapping

GWAS was performed on each quantitative trait separately using a mixed-model approach including multiple loci (Segura *et al.*, 2012) in R. For each strain, quantitative trait means have been adjusted for experimental effects (day of inoculation, plant, plate and manipulator) using the lsmeans library (Lenth & Love, 2018) in R. Trait variation was thus considered as following:

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m x_{ij}a_j + u_i + \varepsilon_i$$

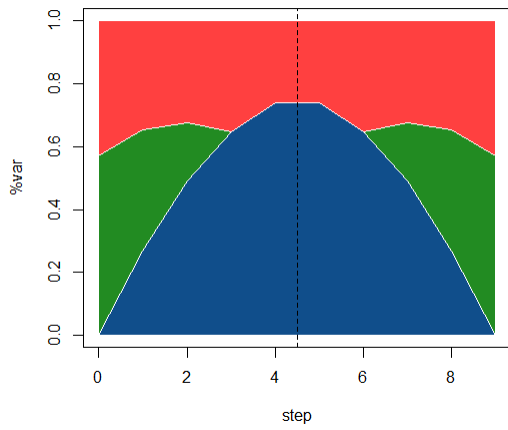
where y_i is the adjusted mean of strain i ; m is the number of loci; x_{ij} is the genotype of the j th locus to the i th strain; a_j is the effect size of the j th locus; u_i is a random polygenic effect for the genotype i and ε_i is the error. Loci effects are considered as additive and the sum is assumed to follow a Gaussian distribution with mean of 0 and variance of σ^2K , where K is the kinship matrix (Korte & Farlow, 2013) taking into account the population structure. We used a forward-backward stepwise approach which adds the most significant locus as a fixed effect in the following step. Variance components of the model and P -values for all loci were estimated at each step. We applied two significance thresholds: a Bonferroni correction for multiple tests on significance threshold: P -value $< 1.70 \times 10^{-6.77}$ (corresponding to a threshold of 0.05 adjusted for multiple testing) and false discovery rate (FDR) threshold of 5% calculated using the R `p.adjust` function.

3. Results and discussion

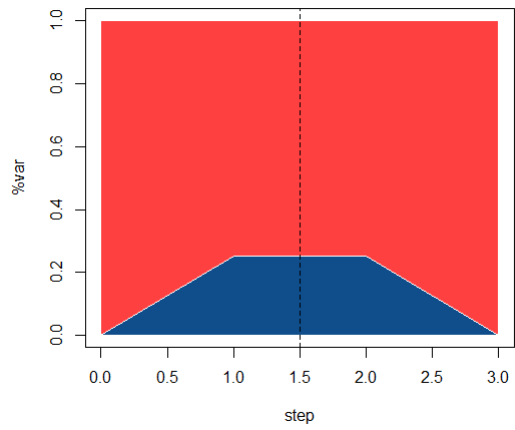
These analyses aimed to identify loci controlling aggressiveness and morphological traits in *M. larici-populina* using GWAS. We used a genome-wide panel of 293,975 SNPs to analyse the variation of each of the six quantitative traits measured: infection efficiency, latent period, uredinia size, mycelium quantity, sporulation rate, and spore volume.

Partition of variance explained by SNPs included in the model, kinship and noise are represented for each step forward and backward (Figure 1). All plots are symmetric indicating that orders in which SNPs are ranked is robust, except for sporulation rate. For latent period and mycelium quantity, variance explained by the models remained very low ($< 30\%$). Both of these traits are determined by the pathogen genotype and leaf characteristics which produced noise in trait measurements, increasing the variance of fungal traits.

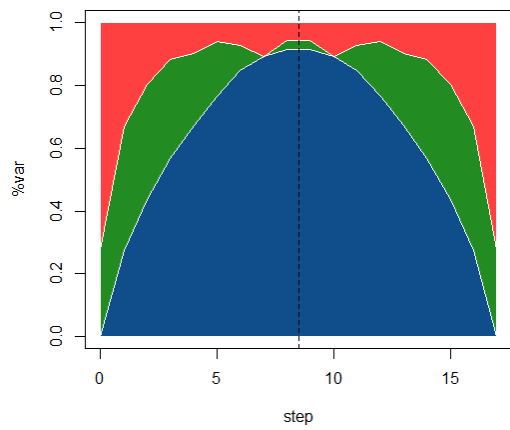
Infection efficiency



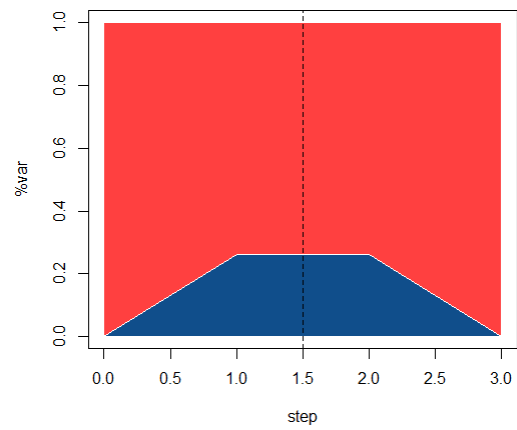
Latent period



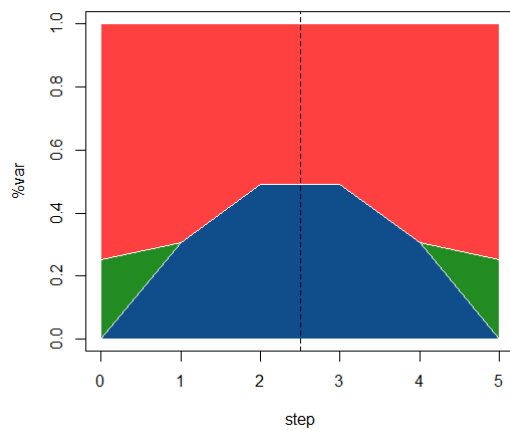
Uredinia size



Mycelium quantity



Spore volume



Sporulation rate

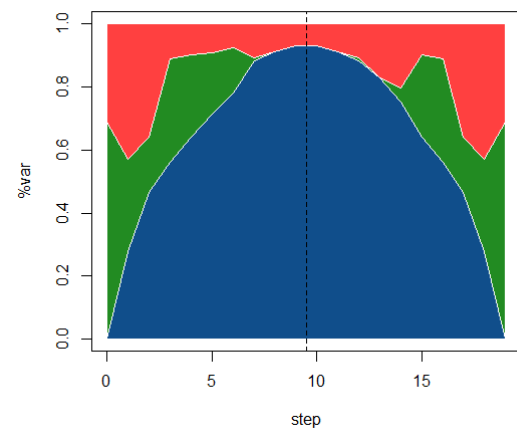
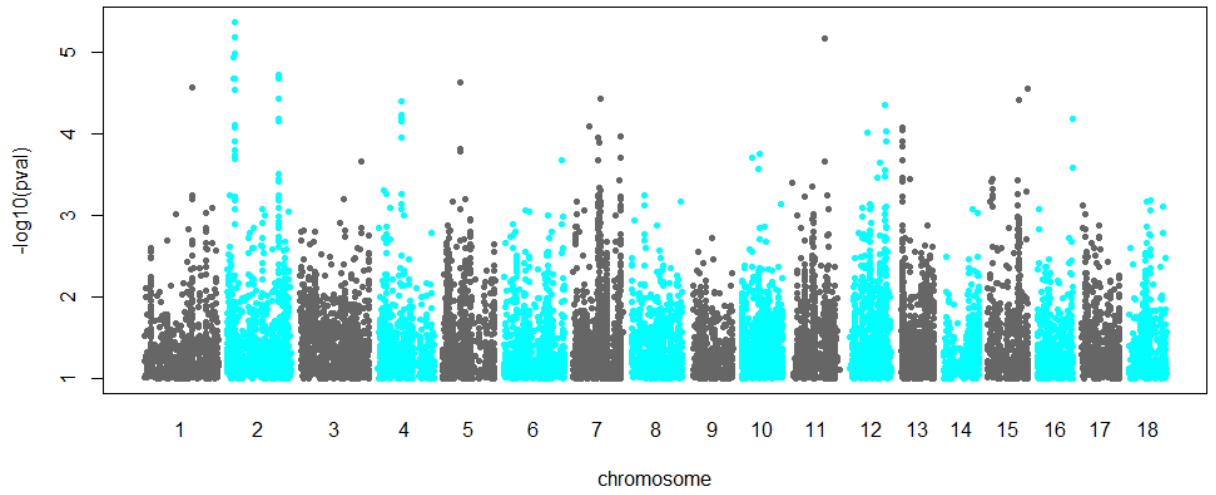
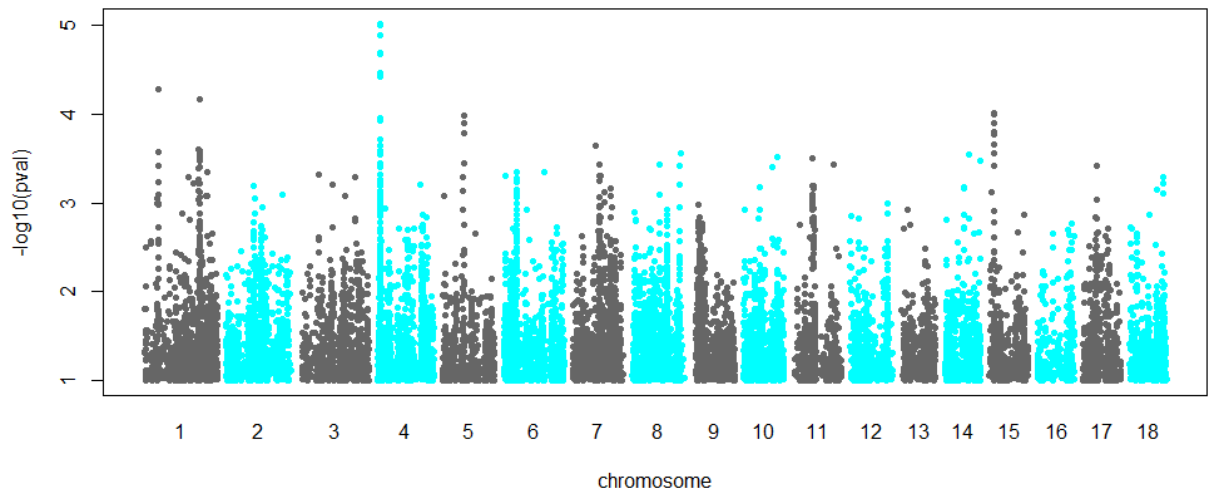


Figure 1: Partition of variance at each step forward and backward for each trait: variance explained by SNPs included in the model is in blue, variance explained by SNPs not included in the model is in green and unexplained variance is in red.

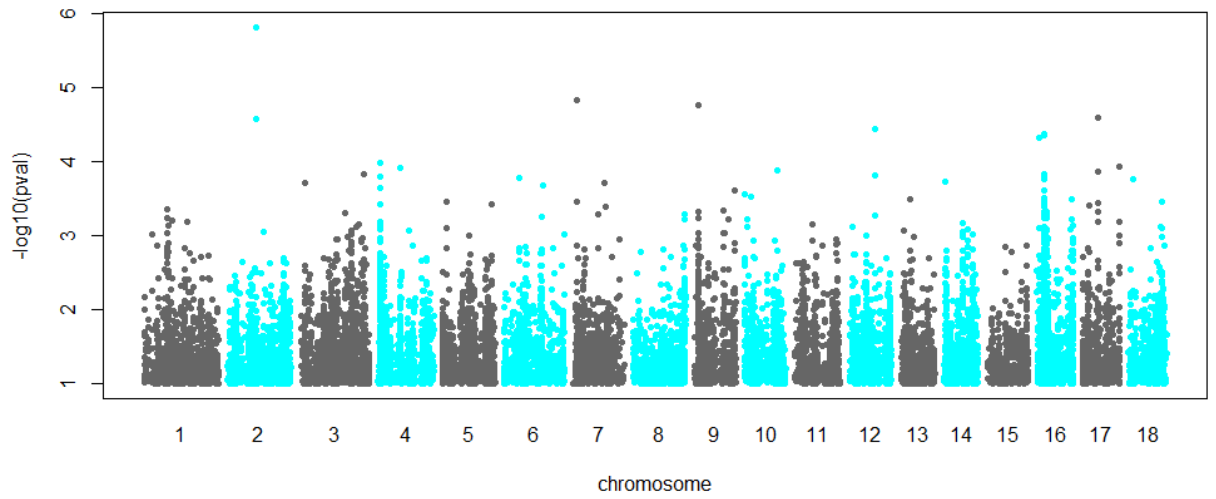
Infection efficiency



Latent period



Uredinia size



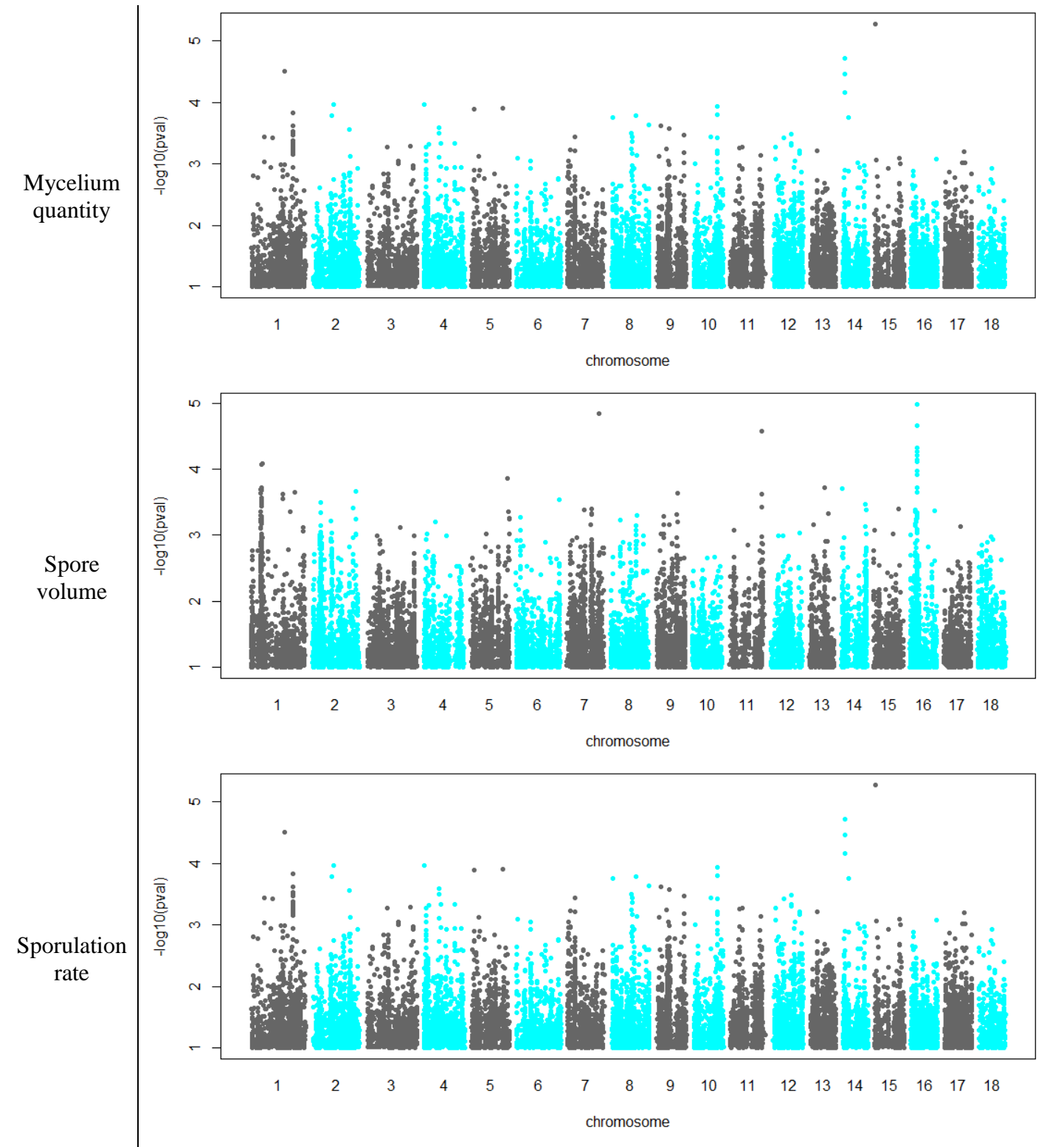


Figure 2: Manhattan plots for each quantitative trait. Only P -values <0.1 are displayed and the FDR and Bonferroni ($\alpha = 5\%$) thresholds are never represented because they are out of all frames.

No SNP has been significantly pointed out as correlated with these traits according to both FDR threshold and Bonferroni threshold for multiple tests fixed at $10^{-6.77}$ (Figure 2). Three explanations of these results are discussed below, followed by perspectives to dig into the genetic determinism of quantitative traits in *M. larici-populina*.

The first obstacle to the identification of precise genomic position associated with aggressiveness traits is their narrow variance among strains (Korte & Farlow, 2013). As seen in Maupetit *et al.* (in prep. a) and presented in Figure S1, trait variation within and between populations is rarely significant. The exception is for spore volume, which significantly increased following the resistance R7 breakdown event. Because of the differentiation among populations and of its high heritability value, we could have expected to highlight genomic positions associated with spore volume, but no SNP reached significance thresholds. To address the issue of limited phenotypic variance, including strains from more diverse populations in the analysis may enhance traits and genetic variance and help to identify loci involved in aggressiveness traits.

Second, a classic limit to experimental studies is the sample size. Association mapping studies, in particular, require large samples to identify meaningful associations because of multiple tests (Ioannidis *et al.*, 2009; Korte & Farlow, 2013). GWAS on fungal traits have proved to be efficient with sample sizes from 20 to almost 200 individuals (Bartoli & Roux, 2017; Hartmann *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2017; Talas *et al.*, 2016). Increasing the number of strains should bring us closer to the detection limit.

The problem may come from a third obstacle. Aggressiveness and morphological traits are expected to have complex genetic architectures and to be under the control of multiple genes with minor effects. Association studies are more suited to identify genes with major effects than genes with minor effects. However, GWAS have been proven to be efficient to also localize genes controlling quantitative fungal traits as shown for fungal growth in *Heterobasidion annosum* s.s. (Dalman *et al.*, 2013), lesion size in *Parastagonospora nodorum* (Gao *et al.*, 2016), infection efficiency in *Fusarium graminearum* (Talas *et al.*, 2016), necrosis area in *Zymoseptoria tritici* (Hartmann *et al.*, 2017) and fungal communication in *Neurospora crassa* (Palma-Guerrero *et al.*, 2013). To refine our results, genotype-phenotype associations could be estimated by using sliding windows along the genome (Wu *et al.*, 2011). This analysis consists in segmenting the genome into multiple regions and searching for association within each region. To better detect polymorphism, the size of sliding windows could be chosen according to linkage disequilibrium, genome annotations or genomic regions. Genes with additive effects on a trait may be identified within their respective regions.

Combining linkage and association studies (Ott *et al.*, 2011; Hauser, 2014) seems to be the most efficient way to identify a wide range of genes involved in quantitative traits. Both

methods have pros and cons which make them complementary and lead to the identification of different types of quantitative trait loci. The GWAS conducted here did not point out genomic position associated with aggressiveness or morphological traits but a linkage study may do so. Using a linkage analysis, Pernaci (2015) identified several QTL potentially controlling lesion size, latent period, and infection efficiency in a progeny of *M. larici-populina*. For the further identification of loci involved in other traits control, new controlled crosses strains will be necessary to carry out this analysis but the biological material is not available yet.

References

- Andrivon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbière R, Achbani EH, Pellé R, Ellissèche D, 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**, 338–343.
- Bartoli C, Roux F, 2017. Genome-Wide Association Studies in plant pathosystems: toward an ecological genomics approach. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Caffier V, Lasserre-Zuber P, Giraud M, Lascostes M, Stievenard R, Lemarquand A, van de Weg E, Expert P, Denancé C, Didelot F, Le Cam B, Durel C-E, 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple×*Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 481–489.
- Caffier V, Laurens F, 2005. Breakdown of *PI2*, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathology* **54**, 116–124.
- Dalman K, Himmelstrand K, Olson Å, Lind M, Brandström-Durling M, Stenlid J, 2013. A Genome-Wide Association Study identifies genomic regions for virulence in the non-model organism *Heterobasidion annosum* s.s (Y-H Lee, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e53525.
- Delmas CEL, Fabre F, Jolivet J, Mazet ID, Richart Cervera S, Delière L, Delmotte F, 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evolutionary Applications* **9**, 709–725.
- Dowkiw A, Voisin E, Bastien C, 2010. Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* **59**, 523–534.
- Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B, 2012. Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist* **193**, 1064–1075.
- Flor HH, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–296.
- Gandon S, Michalakis Y, 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **267**, 985–990.
- Gao Y, Liu Z, Faris JD, Richards J, Brueggeman RS, Li X, Oliver RP, McDonald BA, Friesen TL, 2016. Validation of Genome-Wide Association Studies as a tool to identify virulence factors in *Parastagonospora nodorum*. *Phytopathology* **106**, 1177–1185.
- Hartmann FE, Sánchez-Vallet A, McDonald BA, Croll D, 2017. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *The ISME Journal* **11**, 1189–1204.
- Hauser M-T, 2014. Molecular basis of natural variation and environmental control of trichome patterning. *Frontiers in Plant Science* **5**, 320.
- Ioannidis JPA, Thomas G, Daly MJ, 2009. Validating, augmenting and refining genome-wide association signals. *Nature Reviews Genetics* **10**, 318–329.
- Johnson R, 1979. The concept of durable resistance. *Phytopathology* **69**, 198.

- Korte A, Farlow A, 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* **9**, 29.
- Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–338.
- Lenth R, Love J, 2018. *lsmeans: Least-Squares Means. R package* [<https://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>].
- Maupetit A, Halkett F, Fabre B, Salot M, Pétrowski J, Andrieux A, De Mita S, Frey P, Hayden KJ, in prep. a. How aggressiveness and morphological traits did evolve following a major resistance breakdown in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*?
- Maupetit A, Lariat R, Pernaci M, Andrieux A, Guinet C, Boutigny A-L, Fabre B, Frey P, Halkett F, 2018. Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Maupetit A, Segura V, Frey P, Halkett F, De Mita S, in prep. b. Identification of avirulence loci in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* using a genome-wide association study.
- McDonald BA, Linde C, 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* **124**, 163–180.
- 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.
- Mundt CC, 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 446–455.
- Niks RE, Rubiales D, 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* **124**, 201–216.
- Ott J, Kamatani Y, Lathrop M, 2011. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* **12**, 465–474.
- Palma-Guerrero J, Hall CR, Kowbel D, Welch J, Taylor JW, Brem RB, Glass NL, 2013. Genome wide association identifies novel loci involved in fungal communication (JM Akey, Ed.). *PLoS Genetics* **9**, e1003669.
- Pariaud B, Robert C, Goyeau H, Lannou C, 2009. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* **99**, 869–878.
- Pernaci M, 2015. Étude des traits d’histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier: de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine.
- Pernaci M, De Mita S, Andrieux A, Pétrowski J, Halkett F, Duplessis S, Frey P, 2014. Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a

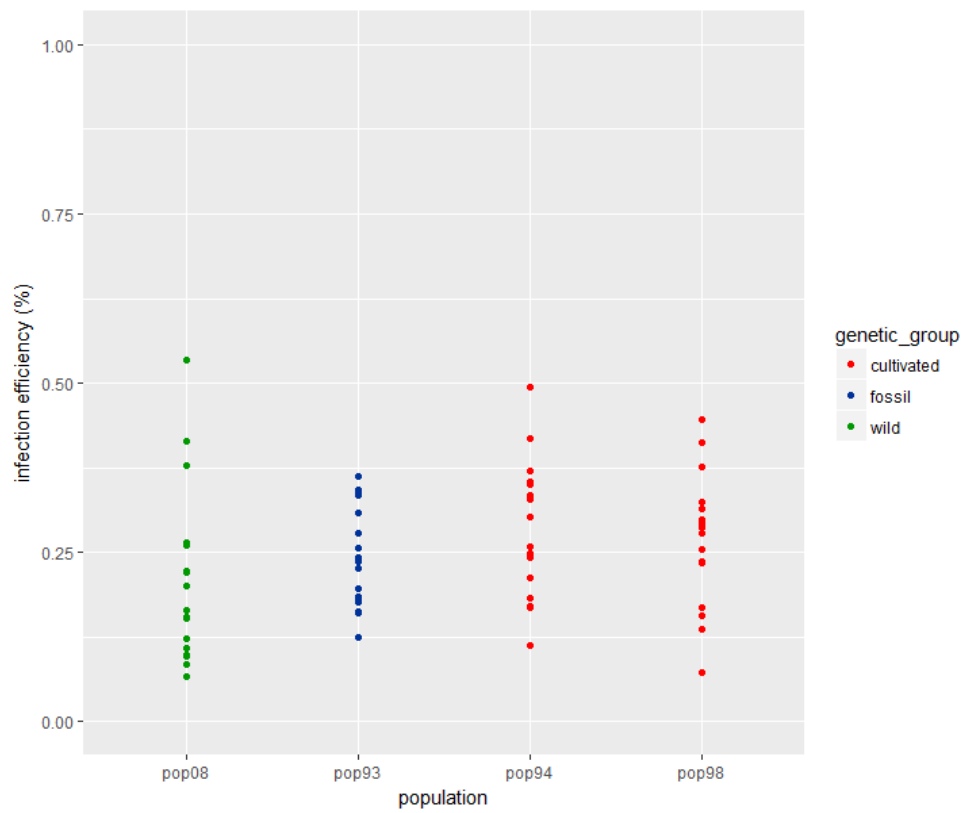
- linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Frontiers in Plant Science* **5**, 454.
- Persoons A, Halkett F, Duplessis S, De Mita S, in prep. Demographic and genomic consequences of a major event of adaptation in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*.
- Persoons A, Hayden KJ, Fabre B, Frey P, De Mita S, Tellier A, Halkett F, 2017. The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology* **26**, 1902–1918.
- Pinon J, Frey P, 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: Pei MH., McCracken AR, eds. *Rust diseases of willow and poplar*. Wallingford, UK: CAB International, pp 139–154.
- Plissonneau C, Benevenuto J, Mohd-Assaad N, Fouché S, Hartmann FE, Croll D, 2017. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. *Frontiers in Plant Science* **8**, 119.
- Segura V, Vilhjálmsson BJ, Platt A, Korte A, Seren Ü, Long Q, Nordborg M, 2012. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nature Genetics* **44**, 825–830.
- Singh RK, Banerjee N, Khan MS, Yadav S, Kumar S, Duttamajumder SK, Lal RJ, Patel JD, Guo H, Zhang D, Paterson AH, 2016. Identification of putative candidate genes for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* species hybrid) using LD-based association mapping. *Molecular Genetics and Genomics* **291**, 1363–1377.
- Stukenbrock EH, McDonald BA, 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 75–100.
- Talas F, Kalih R, Miedaner T, McDonald BA, 2016. Genome-Wide Association Study identifies novel candidate genes for aggressiveness, deoxynivalenol production, and azole sensitivity in natural field populations of *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **29**, 417–430.
- Van Den Berg F, Lannou C, Gilligan CA, van den Bosch F, 2014. Quantitative resistance can lead to evolutionary changes in traits not targeted by the resistance QTLs. *Evolutionary Applications* **7**, 370–380.
- Wu MC, Lee S, Cai T, Li Y, Boehnke M, Lin X, 2011. Rare-variant association testing for sequencing data with the sequence kernel association test. *The American Journal of Human Genetics* **89**, 82–93.
- Xhaard C, Fabre B, Andrieux A, Gladioux P, Barres B, Frey P, Halkett F, 2011. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* **20**, 2739–2755.
- Zhang X, Peng G, Kutcher HR, Balesdent M-H, Delourme R, Fernando WGD, 2016. Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada. *European Journal of Plant Pathology* **145**, 659–674.

Zhong Z, Marcel TC, Hartmann FE, Ma X, Plissonneau C, Zala M, Ducasse A, Confais J, Compain J, Lapalu N, Amselem J, McDonald BA, Croll D, Palma-Guerrero J, 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the Stb6 resistance gene. *New Phytologist* **214**, 619–631.

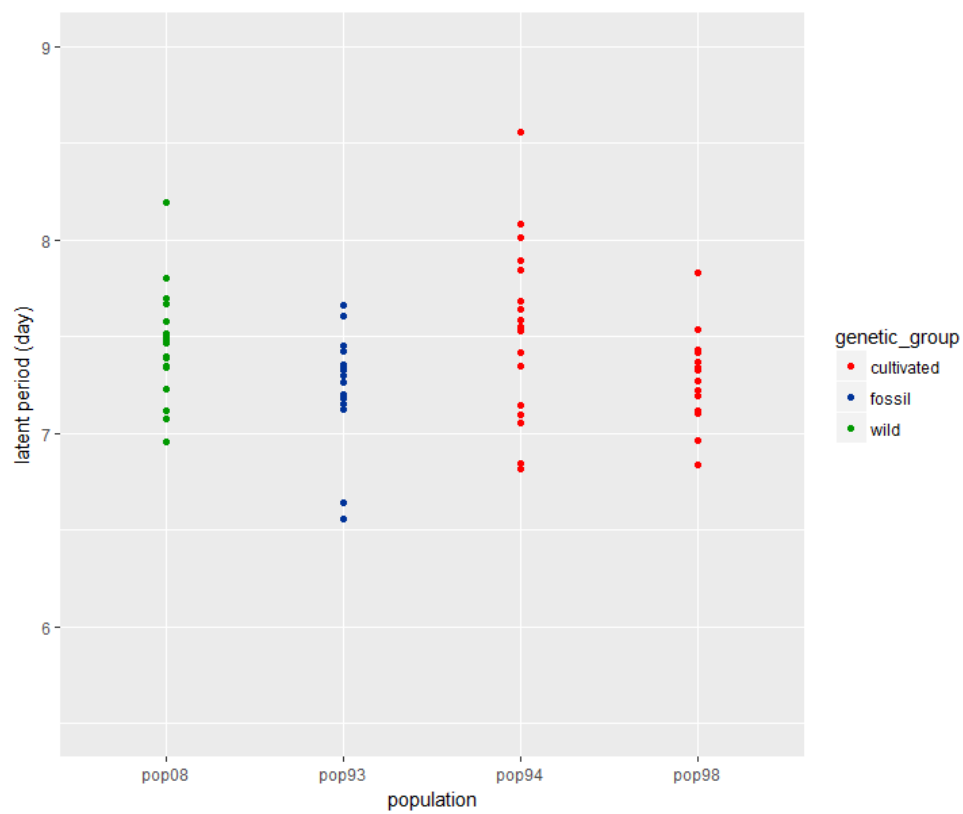
Supplementary material

Figure S1: Adjusted means distribution: (A) infection efficiency, (B) latent period, (C) uredinia size, (D) mycelium quantity, (E) spore volume, (F) sporulation rate.

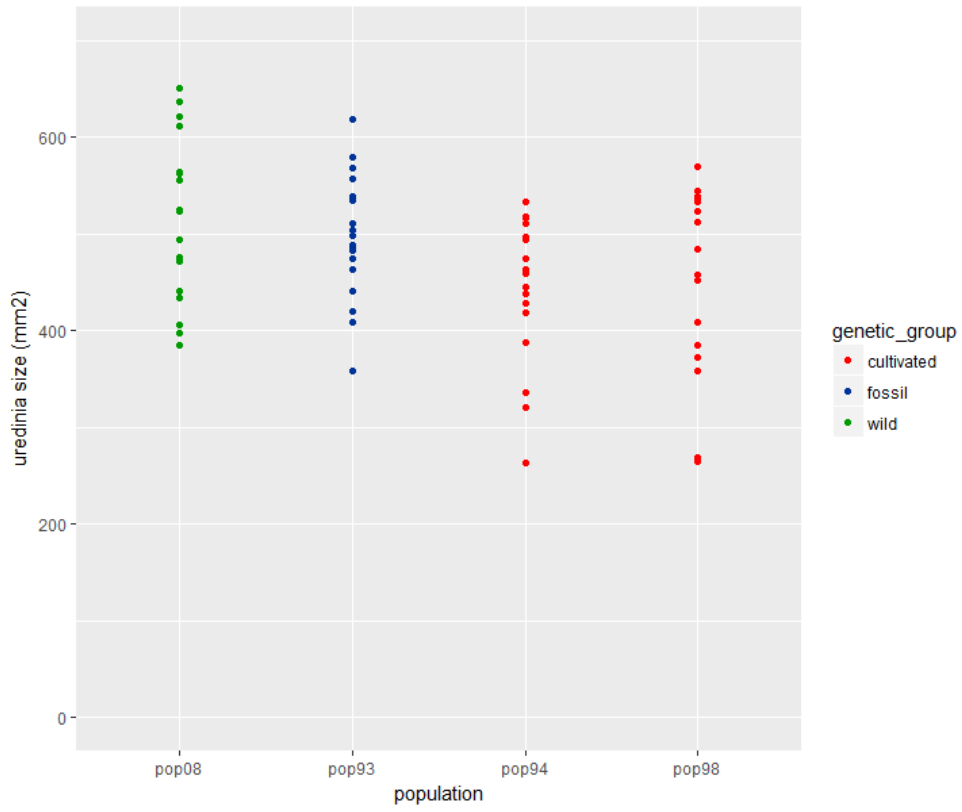
(A)



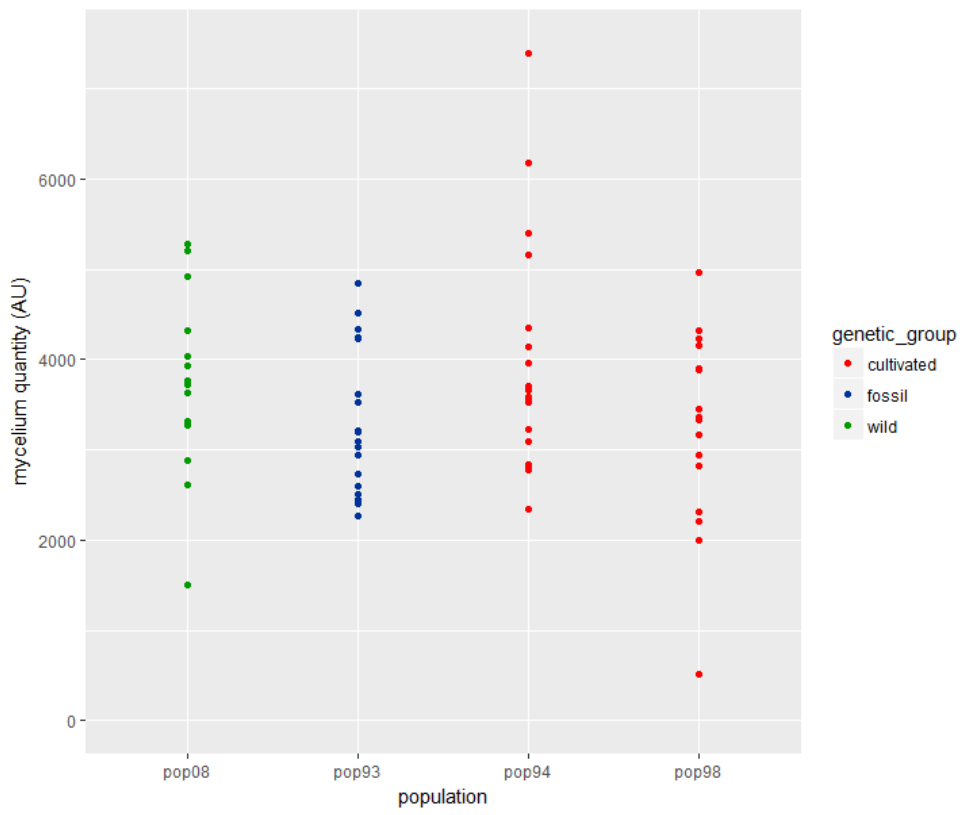
(B)



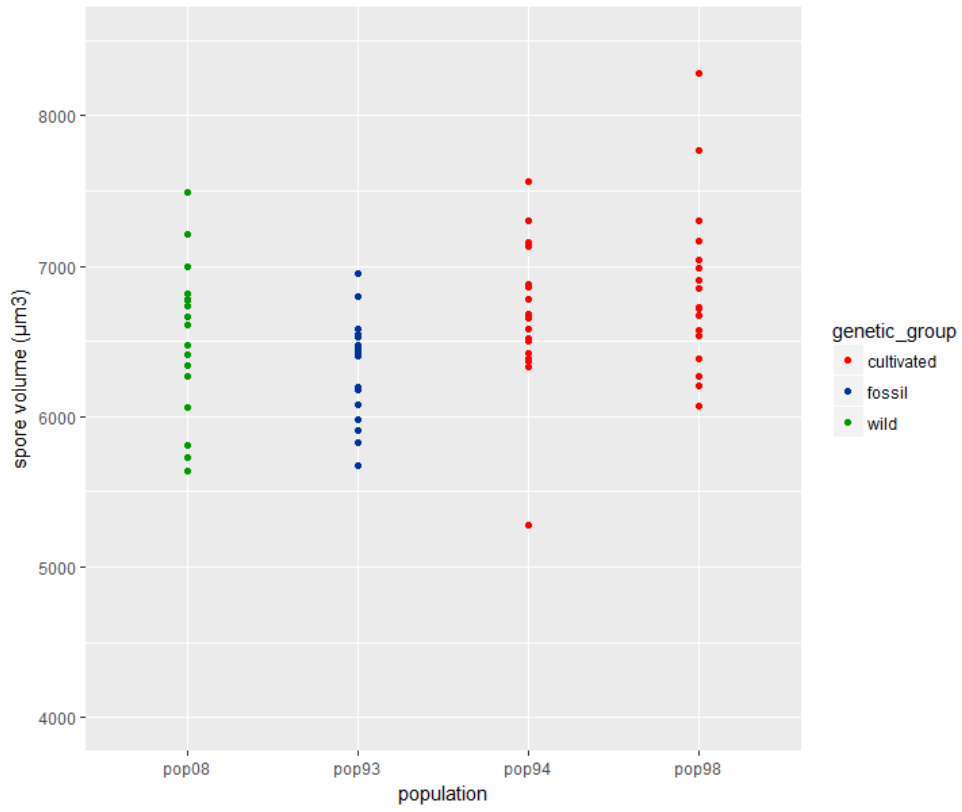
(C)



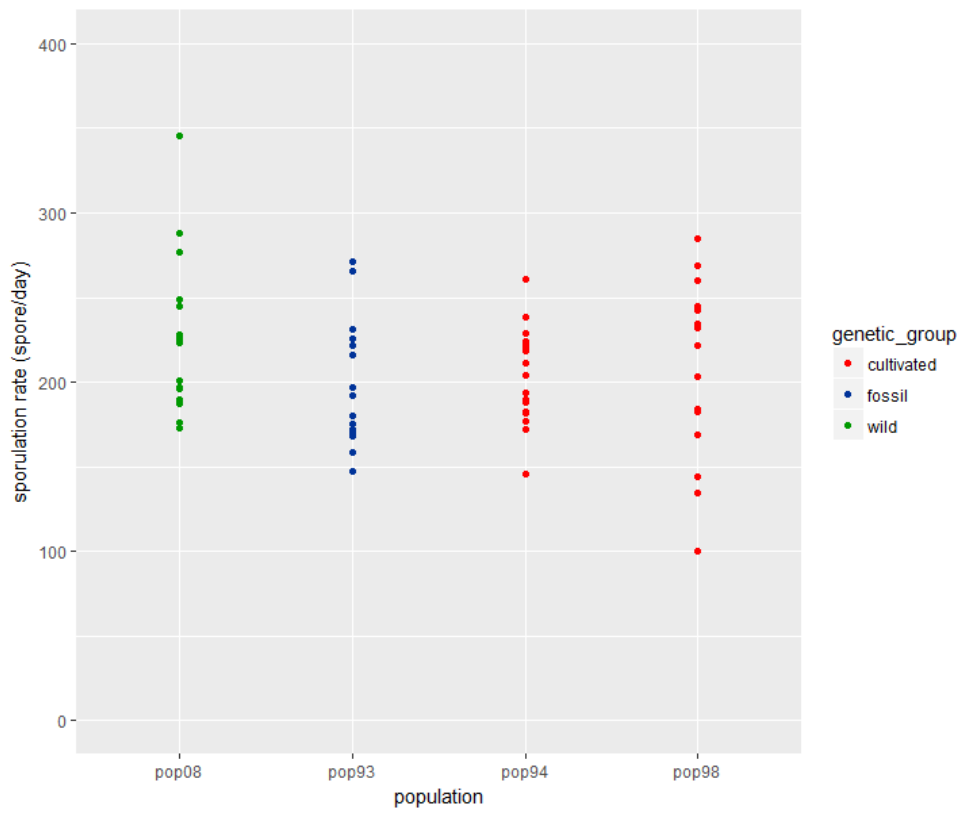
(D)



(E)



(F)



Article 4 : Identification of avirulence loci in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* using a genome-wide association study

Authors

Agathe Maupetit¹, Vincent Segura², Pascal Frey¹, Fabien Halkett¹, Stéphane De Mita¹

1 Université de Lorraine, Inra, UMR IAM, 54000 Nancy, France.

2 Inra, ONF, UMR BioForA, 45075 Orléans, France

Abstract

Qualitative resistance is the most frequently envisioned solution against plant pathogens in an agronomical context. However, plant pathogens are known for their evolutionary potential allowing them to overcome host resistances frequently, triggering large epidemics. Resistance breakdown could be even favoured by the fact that virulence phenotypes are expected to have a simple genetic determinism. However, until now few avirulence loci have been characterized. Genome-Wide Association Studies (GWAS) are a way to precisely localize genetic determinants of quantitative traits and can be applied to avirulence genes without previous knowledge on their molecular function and localization. This method has been used in our study to identify potential avirulence loci in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. This non-model pathogen is the main constraint in poplar cultivation and has overcome eight qualitative resistances during the last 30 years. The resistance R7 breakdown event is the one with the greatest economic repercussions and thus, the most documented. Seventy-eight strains have been selected in a historical collection to cover the R7 breakdown event and to represent diverse genetic backgrounds. Virulence phenotypes and genotypes of this set of strains allowed us to localize precise genomic regions potentially controlling virulence phenotypes. In particular, a putative avirulence Avr7 locus was identified on chromosome 15.

1. Introduction

Plant pathogens are the main cause of production loss in agriculture, causing important food production and economic issues. Chemicals are used to fight these parasites but they raise other health and ecological issues. An alternative strategy to prevent plant diseases is to breed cultivars carrying qualitative or quantitative resistance to pathogens. Qualitative resistance is defined as a complete resistance against only some genotypes (pathotypes) of the pathogen and is usually monogenic, whereas quantitative resistance is partially effective against all genotypes of the pathogen and is usually polygenic (Caffier *et al.*, 2016; Schumann & D'Arcy, 2006). Resistant cultivars are extensively cultivated in homogeneous environments, with little genetic diversity in fields. These conditions drive strong selective pressures on pathogens to overcome resistances, which is made easier when cultivars carry monogenic qualitative resistances. These strong selective pressures have led to resistance breakdowns in many crops (Caffier & Laurens, 2005; Niks & Rubiales, 2002; Singh *et al.*, 2016; Stukenbrock & McDonald, 2008; Zhang *et al.*, 2016).

The study of the interactions between qualitative resistance genes and pathogenicity genes has led to the gene-for-gene (GFG) interaction model, in which resistant plants have dominant resistance genes (R genes) that match dominant avirulence (*Avr*) genes in the pathogen (Flor, 1971). In a modern view of the GFG model, proteins encoded by the pathogen *Avr* genes are called effectors (Cui *et al.*, 2015; Lo Presti *et al.*, 2015). Most effector genes encode small, cysteine-rich proteins that are secreted and highly expressed *in planta*, which manipulate the immune system and host metabolism in susceptible plants (Lo Presti *et al.*, 2015). In resistant plants, the effector protein is recognized directly or indirectly by the product of the host R gene (Jones & Dangl, 2006). This recognition triggers plant immune defenses, including hypersensitive response (HR), and leads to an incompatible interaction (Dodds & Rathjen, 2010). The GFG interaction model was validated in several plant-pathogen systems and numerous fungal *Avr* effector genes have been cloned so far (Lo Presti *et al.*, 2015; Salcedo *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2017). Due to the strong selection pressure exerted by resistant plants on the pathogen populations, effector genes evolve quickly to escape recognition, leading to virulent pathogens that overcome resistance genes (Plissonneau *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2017).

Poplar is an important production in Europe for wood industry and energy. Poplar rust, caused by the fungal pathogen *Melampsora larici-populina*, is one the main phytosanitary constraint in commercial poplar cultivation in Europe and worldwide (Barrès *et al.*, 2008; Gérard *et al.*, 2006). The selection of disease-resistant poplar varieties was based for decades on the selection of interspecific F1 hybrids (*Populus deltoides* × *P. nigra* and *P. deltoides* × *P. trichocarpa*) with a good level of field resistance, or even complete resistance (Dowkiw *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2005). As a result, these varieties carried predominantly monogenic and dominant qualitative resistance genes. However, successive release of these poplar cultivars

has resulted in the rapid breakdown of these resistances by the pathogen (Persoons *et al.*, 2017; Xhaard *et al.*, 2011).

R-genes carried by qualitative resistant poplars are denoted as numeric codes from R1 to R9 (Pinon & Frey, 2005). Since 1982, nine virulence phenotypes were described and denoted Vir1 to Vir9 (Pinon & Frey, 2005), four of them (Vir1, Vir2, Vir7, and Vir8) corresponding to R-genes breakdowns occurring after several years of cultivation of the corresponding resistant poplar cultivars. The most thoroughly studied R-gene breakdown is that of resistance R7, carried by the hybrid cultivar *Populus × interamericana* ‘Beaupré’ (Persoons *et al.*, 2017; Pinon & Frey, 2005; Xhaard *et al.*, 2011). This cultivar showed high yield performance and was widely planted in western Europe between 1980 and 1994, accounting for 80% of new plantations in northern France (Pinon & Frey, 2005). Breakdown of the R7 resistance was detected in Belgium and northern France in 1994, and Vir7 *M. larici-populina* individuals spread all over western Europe in a few years, causing highly damaging epidemics (Pinon & Frey, 2005). The breakdown of resistance R7 has been characterized by an important disruption in the population of poplar rust resulting in the emergence of a new genetic group of *M. larici-populina*, hereafter called the “cultivated group” (Xhaard *et al.*, 2011). Indeed, Vir7 strains have rapidly superseded the initial Avr7 (avirulent) population where it was present before the R7 breakdown. The initial population has been completely replaced by the cultivated one, leading to the total extinction of the Avr7 population in four years (Persoons *et al.*, 2017). Nevertheless, an avirulent population persists on wild poplars (*Populus nigra*) which do not carry any R-genes in southern France (Xhaard *et al.*, 2011).

Our laboratory maintains a large historical collection of *M. larici-populina* containing samples collected from both cultivated and wild poplars, before and after the R7 breakdown event. This collection gives us access to a wide range of virulence combinations and geographical origins. The population genetic structure of this collection has been well studied (Persoons *et al.*, 2017; Xhaard *et al.*, 2011). However, due to the poor accessibility to genome sequencing for numerous individuals until recently, the genetic bases of avirulence phenotypes have not yet been identified.

Next generation sequencing (NGS) technologies have triggered a revolution for genetic studies, providing more data (Grünwald *et al.*, 2016) and offering new opportunities in non-model species such as *M. larici-populina*. In particular, genome-wide association studies (GWAS) are particularly well suited to identify genes with major effect in natural populations, with a resolution reaching down to the single nucleotide variant (SNP) level and without any a priori on genetic architecture of a trait or candidate genes. The GWAS approach was recently used in several fungal plant pathogens in order to identify avirulence/virulence factors (Gao *et al.*, 2016; Hartmann *et al.*, 2017; Plissonneau *et al.*, 2017; Talas *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2017).

This study aimed to identify the genetic basis of avirulence in the poplar rust fungus *M. larici populina*. A set of 78 strains has been selected from the historical collection mentioned above to represent diversity of the virulence phenotypes Vir1 to Vir7. In particular, this sampling provided a balanced representation of Vir7 and Avr7 strains. We used these virulence phenotype data associated with high-density SNP data set in a GWAS to consider the following questions: Where are located the genetic basis of avirulence/virulence? Can alleles at the precise identified position explain the difference between avirulent and virulent strains?

2. Material and methods

2.1. Fungal material

Four *M. larici populina* populations (for a total of 78 strains) from the historical laboratory collection (INRA Nancy, Champenoux, France) were studied during this work (Table S1). Three of them have been collected on poplars in northern France: 19 strains were sampled in 1993 (before the R7 breakdown), 22 in 1994 (right after the R7 breakdown), and 22 in 1998 (four years later) (Persoons *et al.*, in prep.). The last 19 strains have been sampled on wild poplars (*Populus nigra*) in the Durance River valley in 2008 (Xhaard *et al.*, 2012). All strains are living samples stored at -80°C with a germination rate higher than 90%.

2.2. Characterization of virulence phenotype

Virulence profiles (i.e. combination of virulences phenotypes) of the 78 strains were characterized on a differential set of nine poplar cultivars each carrying a single qualitative resistance to *M. larici-populina* (R1: *Populus* × *euramericana* ‘Ogy’; R2: *Populus* × *jackii* ‘Aurora’; R3: *Populus* × *euramericana* ‘Brabantica’; R4: *Populus* × *interamericana* ‘Unal’; R5: *Populus* × *interamericana* ‘Rap’; R6: *Populus* × *interamericana* ‘84B09’; R7: *Populus* × *interamericana* ‘Beaupré’; R8: *Populus* × *interamericana* ‘Hoogvorst’; R9: *P. deltoides* ‘L270-3’) and on the universal susceptible clone *Populus deltoides* × *P. nigra* ‘Robusta’ (Gérard *et al.*, 2006). Poplar plants were grown during 2-3 months in a glasshouse at 20-24°C, with a 16 hours photoperiod, as previously described in Pernaci *et al.* (2014). Leaves of leaf plastochron index (LPI, Larson & Isebrands, 1971) 7 to 14 from several plants were harvested for inoculation. In each leaf, 12-mm-diameter discs were excised and placed in flotation on deionized water in 24-well polystyrene cell culture plates, abaxial surface uppermost. A suspension (approximately 3.2×10^6 spores/mL) of each strain was deposited as 1- μ l droplets on each disc of the differential set of poplar cultivar and three discs of ‘Robusta’, as a positive control. Culture plates were incubated for 13 days at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ under continuous illumination (fluorescent light, $25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) before scoring. Strains resulting in a clear infection with numerous sporulating uredinia on a specific leaf disc were scored as virulent on this cultivar. Strains resulting in no or weak infection (less than ten uredinia on a leaf disc) were considered

as avirulent. Three replications of this protocol allowed us to precisely determine virulence profiles.

2.3. SNP calling

We used a dataset of SNP markers from Persoons *et al.* (in prep.). The mapping was based on *M. larici-populina* reference genome generated by the Joint Genome Institute (Jeremy Schmutz and Jerry Jenkins, pers. comm. see https://genome.jgi.doe.gov/Mellp2_3/Mellp2_3.info.html). SNP calling was performed using EggLib version 3.0.0 alpha (De Mita & Siol, 2012) with the following parameters: minimum minor allelic frequency = 0.05; minimum sequencing depth = 15; maximum missing rate = 0.1. The final set of SNP contained 293,975 positions over the 18 chromosomes corresponding to a mean of 2.68 SNPs /kb. For more details, the complete method for SNP calling from Persoons *et al.* (in prep.) is in supplementary material (Note S1).

Missing genotypes were imputed by the most common genotype at a given position.

2.4. Genome-wide association mapping

GWAS was performed on each virulence phenotype separately using a mixed-model approach including multiple loci (Segura *et al.*, 2012) in R. Virulence phenotype was thus considered as following:

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^m x_{ij}a_j + u_i + \varepsilon_i$$

where y_i is the virulence phenotype of strain i denoted as 0 or 1; m is the number of loci; x_{ij} is the genotype of the j th locus to the i th strain; a_j is the effect size of the j th locus; u_i is a random polygenic effect for the genotype i and ε_i is the random residual error. Loci effects are considered as additive. The random polygenic effect u is assumed to follow a Gaussian distribution with mean of 0 and variance of σ^2K , where K is the kinship matrix (Korte & Farlow, 2013) taking into account the population structure. We used a forward-backward stepwise approach which adds the most significant locus as a fixed effect in the following step. Variance components of the model and P -values for all loci were estimated at each step. If the effect of the loci considered as fixed effects is real, it reduces the unexplained heritable variance. At each step, variance was partitioned into genetic, random and explained variance allowing us to stop the process when genetic variance reached 0. As virulence factors are expected to be monogenic, we have considered a maximum of ten forward steps. The backward stepwise regression consisted in dropping the least significant locus at each step. Variance components and P -values were re-estimated. We applied a Bonferroni correction for multiple tests on significance threshold: P -value $< 1.70 \times 10^{-7}$ (corresponding to $\alpha < 0.05$). For

each virulence phenotype, the optimal model has been defined as the largest model in which all loci have a *P*-value below the Bonferroni-corrected threshold (Segura *et al.*, 2012).

2.5. Prediction of genes associated with virulence phenotypes

We checked if loci significantly associated with virulence phenotypes were located in region rich in transposable elements according to the RepeatMasker tool and a standard set of fungal repeats. For loci located in coding sequences, protein identification was based on the Gene Catalog predictions from the *M. larici-populina* v2.0 genome available on the JGI browser (https://genome.jgi.doe.gov/Mellp2_3/Mellp2_3.info.html). When available, KOG description has been filled out.

3. Results

3.1. Virulence phenotypes

According to the set of strains selected to cover the resistance R7 breakdown, about half (49%) of the *M. larici-populina* strains were recorded as Vir1, Vir5, and Vir7 (Figure 1). In contrast, virulence phenotypes Vir2, Vir3, Vir4 and Vir6 showed very unbalanced distributions between virulent and avirulent strains. None of the strains were recorded as Vir8 or Vir9 (Figure 1), preventing us from conducting analysis for these virulence phenotypes. Levels of co-occurrence of virulence phenotypes among the whole set of strains were variable and particularly high for Vir1 and Vir5 (Figure 2). All strains recorded as Vir1 were also Vir5, only two strains in our sampling were Vir5 but not Vir1 (Supplementary Table 1).

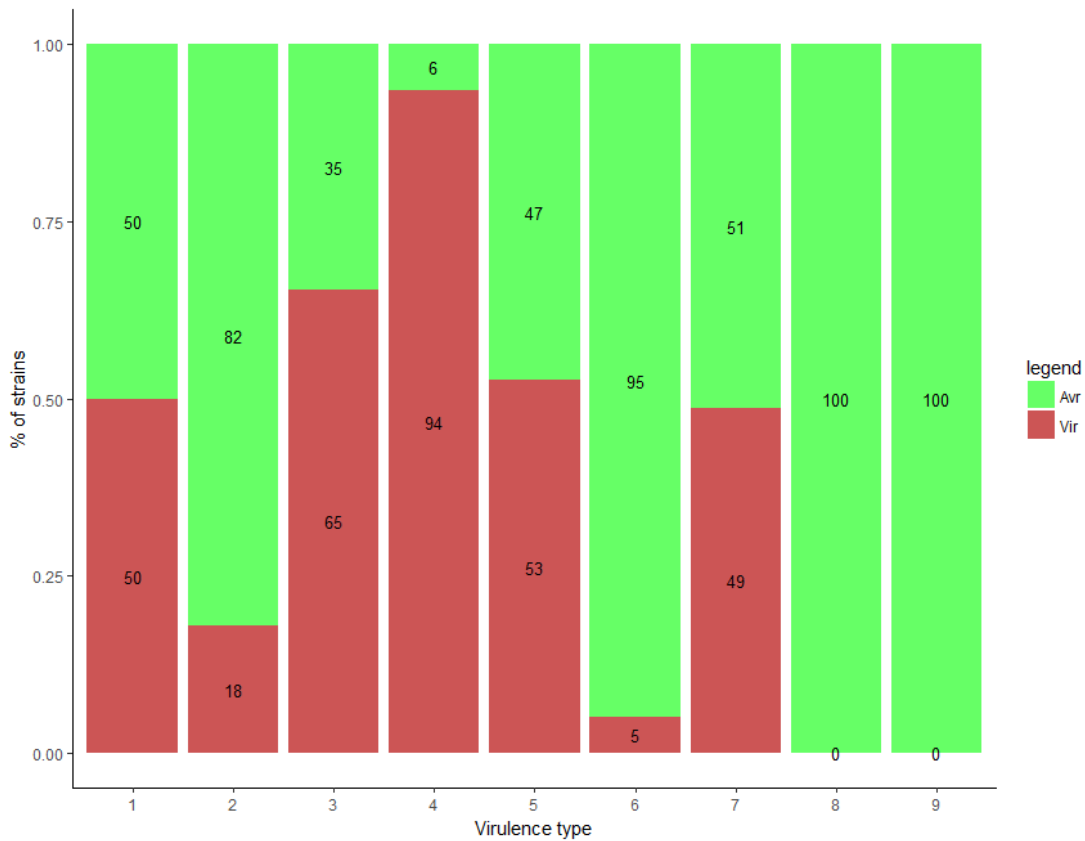


Figure 1: Distribution of avirulent/virulent strains for each virulence phenotype in the 78 *M. larici-populina* strains



Figure 2: Squared Pearson's correlation coefficients between virulence phenotypes among the 78 *M. larici-populina* strains.

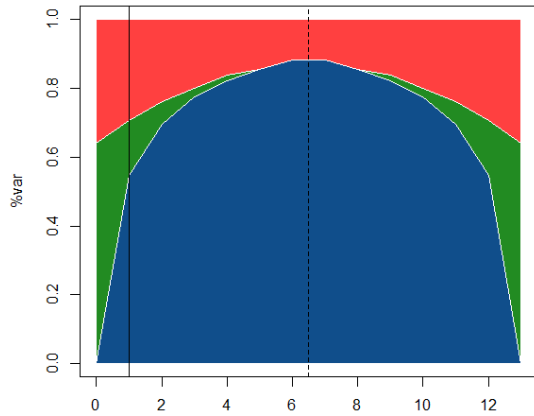
3.2. GWAS

The GWA study was performed on a panel of 293,975 SNPs for seven virulence phenotypes. Partition of variance explained by SNPs included in the model, polygenic term and residual error are represented for each step forward and backward (Figure 3). Plots were symmetric indicating that orders of SNPs significance were robust. For all virulence phenotypes except Vir2, almost 90% of the phenotypic variance was explained by selected SNPs. Interestingly, the first SNP associated with Vir2 explained 70% of the variance. For Vir5 and Vir7, the first SNP also explained most of the variance with about 60%. Other virulence phenotypes needed more SNPs to reach this level of explanation. The optimal models were chosen according to the threshold with a Bonferroni correction on *P*-values (Figure 4).

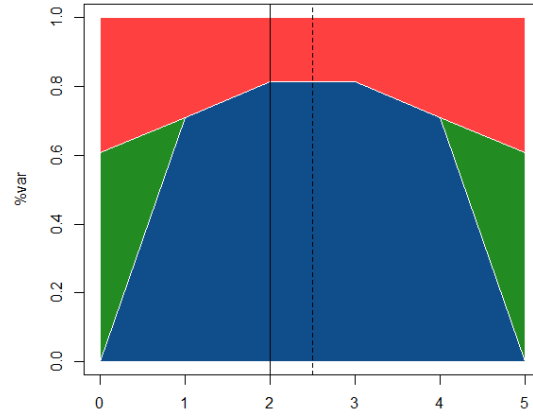
Seventeen candidate SNPs (Table 1) were found to be significantly associated with virulence phenotypes in *M. larici-populina*. Five loci were associated with the Vir3, four with Vir6, three with the Vir4, two with the Vir2 and one for each of the Vir1, Vir5 and Vir7. Eight positions associated with virulence types were located in intergenic regions, five of which were in regions rich in transposable elements. Seven loci were located in exons and one in an intron. Concerning coding sequences, all were annotated as hypothetical protein in *M. larici-populina* and only three had a more precise description including a transmembrane protein, a polymerase and a carboxylase (Table 1).

At the position identified for Vir7 factor (chromosome 15, position 2,233,055), it appeared that all Vir7 strains were homozygous CC, except one strain (98GC04) and that all Avr7 strains were homozygous TT or heterozygous CT, except one strain (08EA95). Loci correlated to virulence phenotypes Vir1, Vir2, Vir4, Vir5 and Vir6 showed less consistent patterns (Table S2).

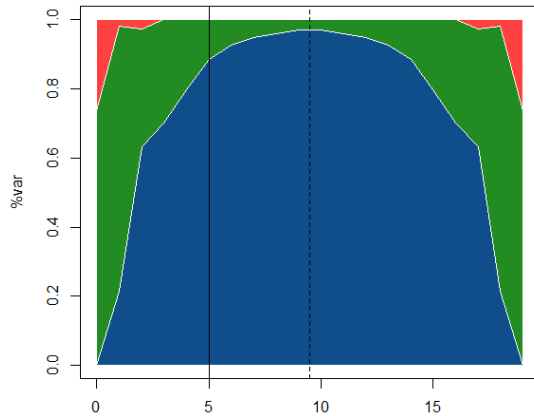
Vir1



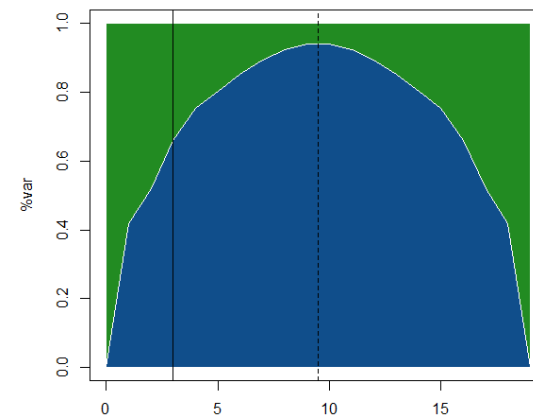
Vir 2



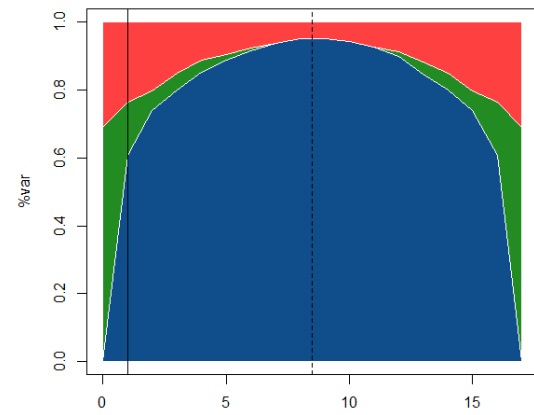
Vir3



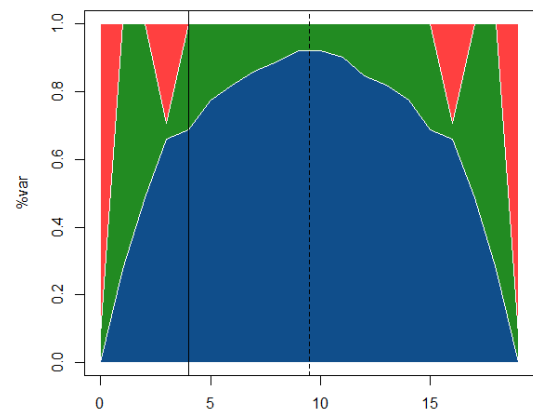
Vir4



Vir5



Vir6



Vir7

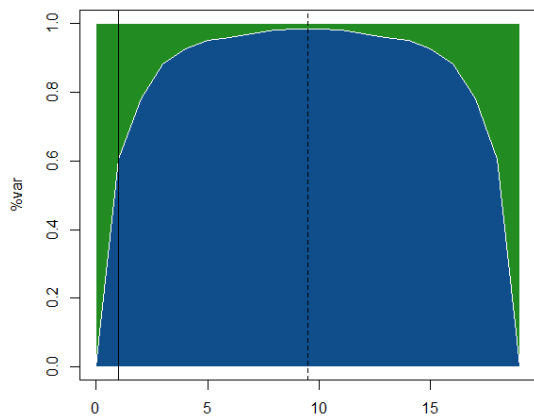
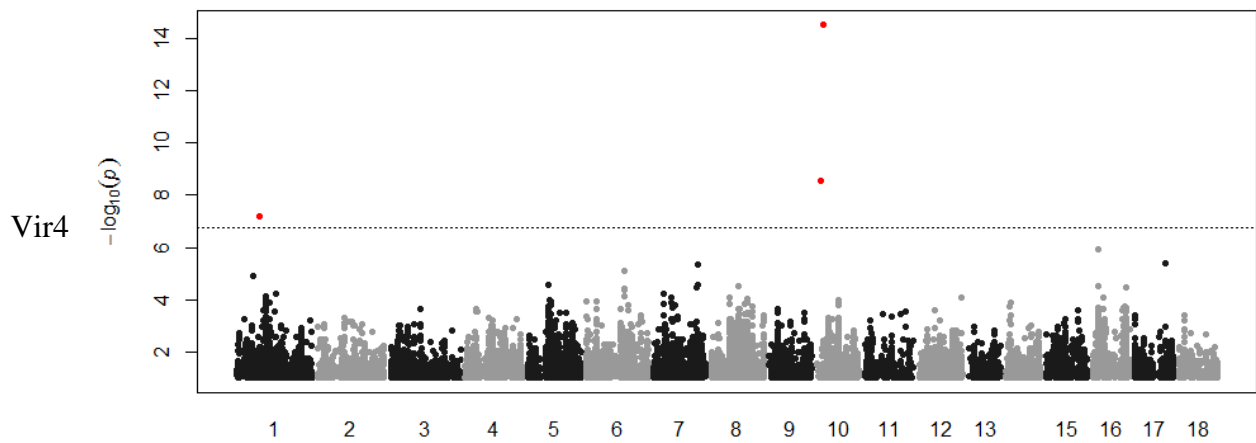
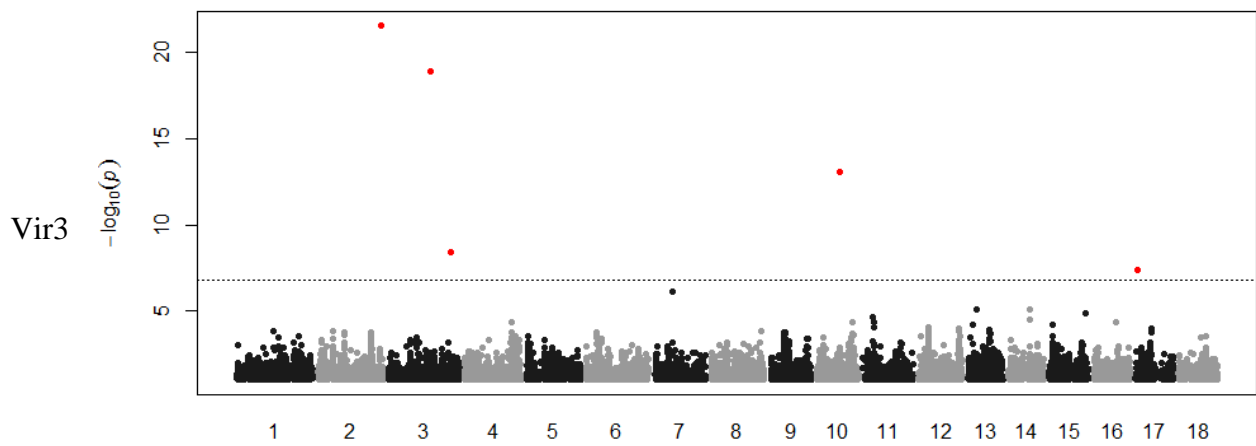
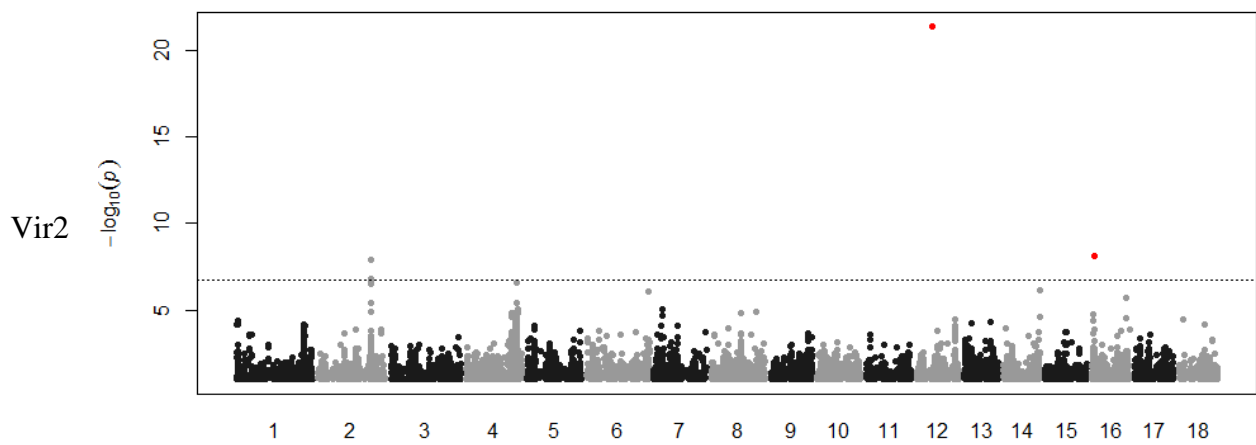
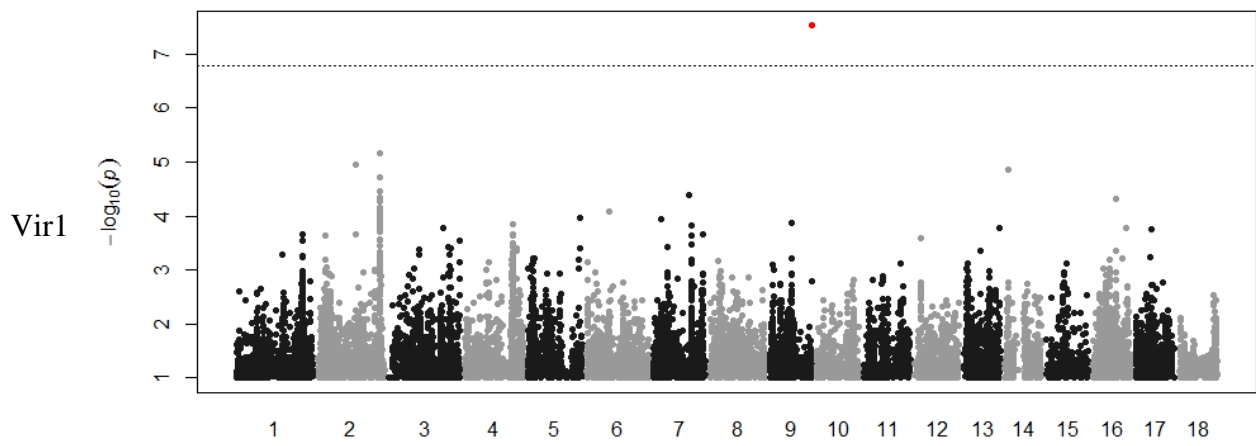


Figure 3: Partition of variance at each step forward and backward for each virulence type: variance explained by individual SNPs included in the model is in blue, polygenic variance explained by SNPs not included in the model is in green and unexplained residual variance is in red. Vertical line indicates the best model according to a 5 % Bonferroni corrected significance threshold.



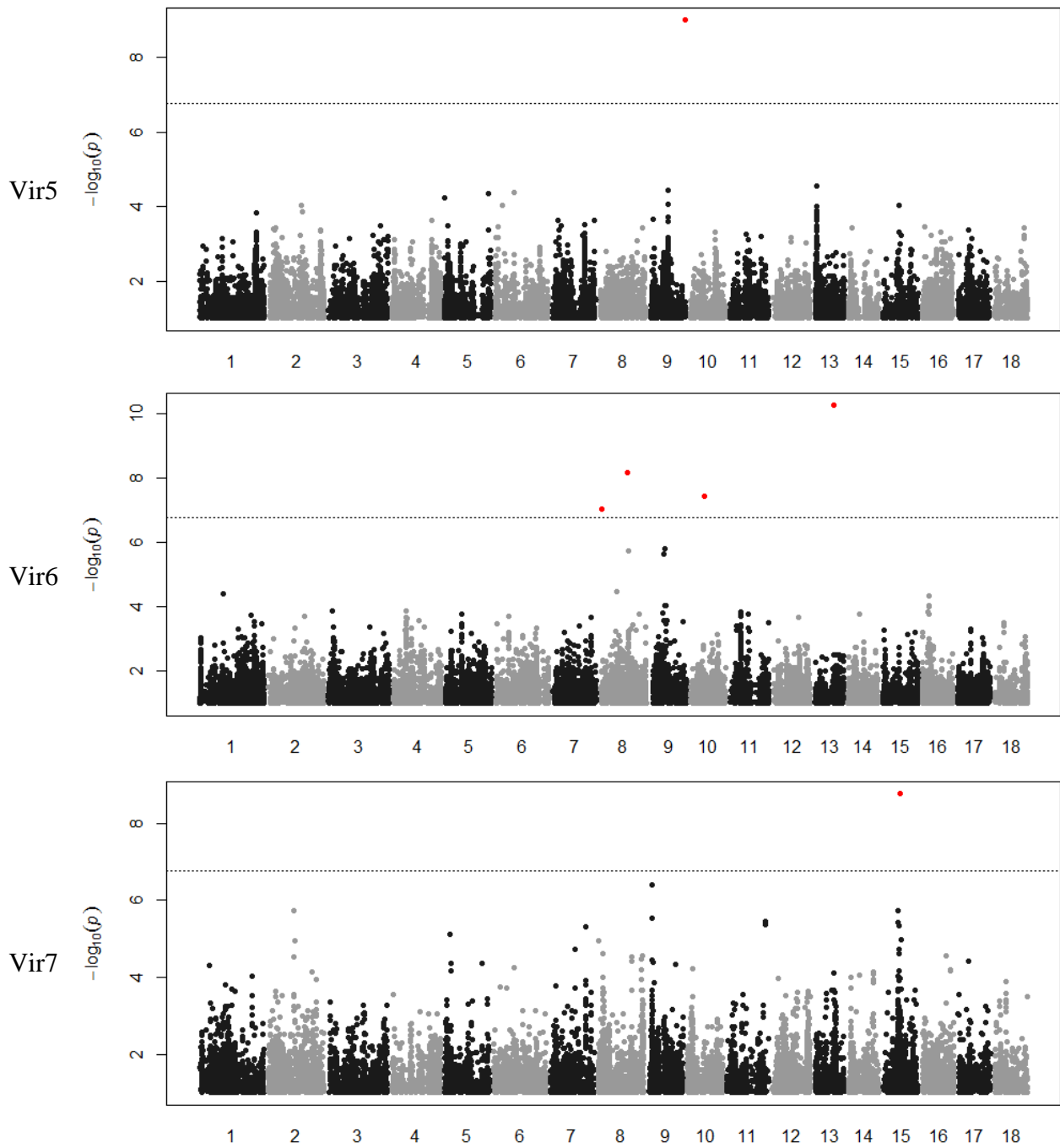


Figure 4: Manhattan plots for Vir1, Vir2, Vir3, Vir4, Vir5, Vir6 and Vir7 along the 18 chromosomes of *M. larici-populina*. Only P -values < 0.1 are displayed and the dashed line represents the 5 % Bonferroni corrected threshold.

Table 1: Variants significantly associated with the virulence phenotypes in the 78 strains of *M. larici-populina* according to Bonferroni correction. TE: variant inside transposable element.

Associated virulence	Chr.	Position (bp)	P-value	Status*	Protein ID	TE	KOG description
Vir1	9	4,753,911	3.08×10^{-8}	intergenic	-	yes	-
Vir2	12	1,859,611	4.58×10^{-22}	S → P	1857251	no	Putative transmembrane protein cmp44E
	16	287,178	7.80×10^{-9}	intergenic	-	yes	-
Vir3	2	7,104,975	2.85×10^{-22}	intergenic	-	no	-
	3	4,637,034	1.21×10^{-19}	intergenic	-	yes	-
	10	2,635,990	9.12×10^{-14}	P (syn)	86914	no	-
	3	6,957,639	3.54×10^{-9}	intergenic	-	no	-
	17	238,860	4.07×10^{-8}	intergenic	-	no	-
Vir4	10	795,050	3.00×10^{-15}	exon	46475	no	RNA polymerase II transcription initiation/nucleotide excision repair factor TFIIH, subunit TFB2
	10	520,340	2.75×10^{-9}	intergenic	-	yes	-
	1	2,531,434	6.64×10^{-8}	D → N	1887211	no	-
Vir5	9	4,753,911	9.71×10^{-10}	intergenic	-	yes	-
Vir6	13	2,589,430	5.73×10^{-11}	Q → R	55074	no	-
	8	3,509,779	7.01×10^{-9}	W → S	102012	no	-
	10	1,914,284	3.68×10^{-8}	intergenic	-	no	-
	8	140,480	9.31×10^{-8}	K → N	50190	no	3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase, non-biotin containing subunit/Acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase, subunit beta
Vir7	15	2,233,055	1.72×10^{-9}	intron	1427900	no	-

*If the variant is in an exon, amino acid change is provided; “syn” stands for synonymous mutation.

4. Discussion

The aim of this work was to identify the genetic basis of avirulence/virulence in the poplar rust fungus, *M. larici-populina*, using a GWAS approach. This approach was recently used in several fungal plant pathogens in order to identify avirulence/virulence factors (Bartoli & Roux, 2017; Plissonneau *et al.*, 2017). Most of these studies focused on fungal wheat pathogens (Gao *et al.*, 2016; Hartmann *et al.*, 2017; Talas *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2017), and one focused on a necrotrophic fungus on forest conifers (Dalman *et al.*, 2013). Our study is thus among the first studies to use a GWAS approach to bring new insight in the genetic basis of pathogenicity in a rust fungus.

The GWAS approach allowed us to locate putative avirulence loci in the *M. larici-populina* genome by associating virulence phenotypes with genotypes in four natural fungal populations collected on cultivated cultivars before, at the time and four years after the R7 breakdown event and on wild poplar stands. The sample contained polymorphism for seven out of nine virulence phenotypes with sufficiently balanced distribution to allow us attempt a GWAS analysis for each of them, although virulences Vir2, Vir4, and Vir6 were unequally distributed. We identified seventeen candidate avirulence loci associated with all seven virulence phenotypes. The most convincing result is the mapping of a putative avirulence locus for the Vir7 on chromosome 15. Indeed, genotypes at this locus were much more consistent with the gene-for-gene model than other identified loci. Results for all virulence phenotypes are discussed regarding their consistency.

The putative avirulence Avr7 locus has been found to be located around the position 2.233 Mb on chromosome 15 of *M. larici-populina*. Interestingly, in the populations collected in 1993 and 1994, this region was found in linkage disequilibrium with a region identified in a previous study using a genome scan analysis as involved in the R7 breakdown (Persoons *et al.*, in prep.) (Figure S1). This suggests that we have found the same region but our localization was more accurate. As the alleles at the identified locus almost exactly followed the gene-for-gene model, it seems probable that this locus, or one in strong linkage disequilibrium with it, is indeed the Avr7 locus.

The genotypes of the SNP identified at the putative Avr7 locus on chromosome 15 are mostly consistent with the gene-for-gene hypothesis (Flor, 1971). Indeed, Vir7 strains are all homozygous CC at this SNP and Avr7 strains are either homozygous TT or heterozygous CT (Table S1), consistently with the hypothesis of a recessive virulent allele (Flor, 1971). It should be noted that the GWAS model used here does not take allele dominance into account. Therefore this observation can be considered to be an additional argument supporting the functional role of this locus.

It is noteworthy that six individuals have missing data at the position most significantly associated with the Vir7 phenotype on chromosome 15. Interestingly, all these individuals are recorded as Vir7. As already mentioned by Flor (1971) concerning *M. lini* and documented in *Zymoseptoria tritici* (Hartmann *et al.*, 2017), this suggests a segmental deletion in this region rather than small indels or non-synonymous mutations. However, deletions cannot be confidently assessed in our dataset because the reference genome was obtained from a Vir7 strain. Further characterization of one or several possible insertion/deletion polymorphism will require *de novo* sequencing of both virulent and avirulent individuals.

The most probable hypothesis is that the transition from avirulence to virulence is the result of a significant modification of the shape of the avirulence protein which prevents the recognition of the pathogen by the host (Dodds & Rathjen, 2010; Jones & Dangl, 2006). Three explanations can justify the fact that the putative causal locus is located in an intron. First, it can be involved in the splicing process. Second, this locus may be physically linked to the real causal one which is not included in the data. And third, the reference strain being virulent, it is expected to carry a non-functional protein which could be incorrectly (or differently) annotated with respect to the avirulent protein. The effect of genetic variations in protein-coding genes in the identified region should be assessed with further functional characterization, but this is beyond the scope of present work.

The same locus has been identified as correlated with both virulence phenotypes Vir1 and Vir5. Historically, Vir1 was defined in 1984 as the ability to overcome the qualitative resistance present in both cultivars ‘Ogy’ and ‘Rap’ (Pinon *et al.*, 1987). Later, it was considered that the cultivars ‘Ogy’ and ‘Rap’ had two different resistances, named R1 and R5, respectively, which define virulence phenotypes Vir1 and Vir5 (Pinon & Frey, 2005). However, Vir1 and Vir5 were found associated in most of the populations studied so far (Barrès *et al.*, 2008; Gérard *et al.*, 2006; Persoons *et al.*, 2017; Xhaard *et al.*, 2011), raising the question of a genetic linkage of the two corresponding avirulence loci. Anyway, considering our dataset, specific loci associated with either Vir1 or Vir5 would have been very difficult to distinguish because all strains recorded as Vir1 are also Vir5, and only two strains in our sampling are Vir5 but not Vir1 (Table S1). To discriminate the two avirulence loci (if they exist) a balanced set of strains Vir1 and Vir5 with little redundancy would be needed.

Five loci were identified as associated with Vir3, among them only one is located in a gene (coding for a hypothetical protein in *M. larici-populina*). Because each locus explained little part of the variance, Vir3 seems to be polygenic. As genotypes did not follow the gene-for-gene model, Vir3 phenotype may have a more complex genetic architecture than expected.

Two loci have been identified as associated with Vir2. The most significant one explained 70% of the phenotypic variance on its own and it is located in an exon of a transmembrane

protein. However, the unbalanced frequencies (82% avirulent – 18% virulent) put this finding into question. This result should be validated with analyses on a more equally balanced dataset for Vir2/Avr2 phenotypes.

Genomic positions identified for Vir4 and Vir6 have to be considered cautiously because of the highly unbalanced virulence distribution among strains (5% - 95%, see Figure 1). This low phenotypic variance between studied strains may imply an important bias in the GWAS and can generate high rates of false positives (Korte & Farlow, 2013). Moreover, rare variants are more difficult to genotype and likely to be, by chance, in linkage disequilibrium with non-causal loci also leading to a high rate of false positives (Asimit & Zeggini, 2010). Indeed, there are some inconsistencies between virulence phenotypes and genotypes in both cases (Table S2). An analysis conducted on a set of strains more equally balanced for these virulence phenotypes is required to confirm this result.

5. Conclusion

Despite the relatively low number of strains studied, this study has identified a genomic position, which is likely to be involved in the Vir7 phenotype in *M. larici-populina*. This Avr7 locus is located near a region already highlighted in a previous study as involved in the R7 breakdown (Persoons *et al.*, in prep.). This incites to further investigate the functions of the putative avirulence genes in the region of the detected SNP. Additional experiments and analyses will be necessary to look deeper into candidate localizations for other virulence phenotypes.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jean Pinon who initiated poplar rust population sampling and virulence typing at INRA Nancy in the 1980s. Without his pioneer work, this study would not have been possible. Jérémy Pétrowski is acknowledged for his excellent technical help in poplar plant production.

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-13-BSV7-0011, FunFit project; ANR-12-ADAP-0009, Gandalf project; ANR-11-LABX-0002-01, Cluster of Excellence ARBRE). A. Maupetit was supported by a PhD fellowship from the Region Lorraine and INRA.

References

- Asimit J, Zeggini E, 2010. Rare variant association analysis methods for complex traits. *Annual Review of Genetics* **44**, 293–308.
- Barrès B, Halkett F, Dutech C, Andrieux A, Pinon J, Frey P, 2008. Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 577–587.
- Bartoli C, Roux F, 2017. Genome-Wide Association Studies in plant pathosystems: toward an ecological genomics approach. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Caffier V, Laurens F, 2005. Breakdown of *Pl2*, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathology* **54**, 116–124.
- Caffier V, Le Cam B, Al Rifai M, Bellanger M-N, Comby M, Denancé C, Didelot F, Expert P, Kerdraon T, Lemarquand A, Ravon E, Durel C-E, 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.
- Cui H, Tsuda K, Parker JE, 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 487–511.
- Dalman K, Himmelstrand K, Olson Å, Lind M, Brandström-Durling M, Stenlid J, 2013. A Genome-Wide Association Study identifies genomic regions for virulence in the non-model organism *Heterobasidion annosum* s.s (Y-H Lee, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e53525.
- De Mita S, Siol M, 2012. EggLib: processing, analysis and simulation tools for population genetics and genomics. *BMC Genetics* **13**, 27.
- Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.
- Dowkiw A, Voisin E, Bastien C, 2010. Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* **59**, 523–534.
- Flor HH, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–296.
- Gao Y, Liu Z, Faris JD, Richards J, Brueggeman RS, Li X, Oliver RP, McDonald BA, Friesen TL, 2016. Validation of Genome-Wide Association Studies as a tool to identify virulence factors in *Parastagonospora nodorum*. *Phytopathology* **106**, 1177–1185.
- Gérard PR, Husson C, Pinon J, Frey P, 2006. Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology* **96**, 1027–1036.
- Grünwald NJ, McDonald BA, Milgroom MG, 2016. Population genomics of fungal and Oomycete pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **54**, null.

- Hartmann FE, Sánchez-Vallet A, McDonald BA, Croll D, 2017. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *The ISME Journal* **11**, 1189–1204.
- Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C, 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* **167**, 113–127.
- Korte A, Farlow A, 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* **9**, 29.
- Larson PR, Isebrands JG, 1971. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Canadian Journal of Forest Research* **1**, 1–11.
- Li H, Durbin R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R, 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 513–545.
- Niks RE, Rubiales D, 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* **124**, 201–216.
- Pernaci M, De Mita S, Andrieux A, Pétrowski J, Halkett F, Duplessis S, Frey P, 2014. Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Persoons A, Halkett F, Duplessis S, De Mita S, in prep. Demographic and genomic consequences of a major event of adaptation in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*.
- Persoons A, Hayden KJ, Fabre B, Frey P, De Mita S, Tellier A, Halkett F, 2017. The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology* **26**, 1902–1918.
- Pinon J, Dam BC van, Genetet I, Kam M de, 1987. Two pathogenic races of *Melampsora larici-populina* in north-western Europe. *European Journal of Forest Pathology* **17**, 47–53.
- Pinon J, Frey P, 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: Pei MH., McCracken AR, eds. *Rust diseases of willow and poplar*. Wallingford, UK: CAB International, 139–154.

- Plissonneau C, Benevenuto J, Mohd-Assaad N, Fouché S, Hartmann FE, Croll D, 2017. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. *Frontiers in Plant Science* **8**, 119.
- Salcedo A, Rutter W, Wang S, Akhunova A, Bolus S, Chao S, Anderson N, De Soto MF, Rouse M, Szabo L, Bowden RL, Dubcovsky J, Akhunov E, 2017. Variation in the *AvrSr35* gene determines *Sr35* resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science* **358**, 1604–1606.
- Schumann GL, D’Arcy CJ, 2006. Essential plant pathology. *Essential plant pathology*.
- Segura V, Vilhjálmsson BJ, Platt A, Korte A, Seren Ü, Long Q, Nordborg M, 2012. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nature Genetics* **44**, 825–830.
- Singh RK, Banerjee N, Khan MS, Yadav S, Kumar S, Duttamajumder SK, Lal RJ, Patel JD, Guo H, Zhang D, Paterson AH, 2016. Identification of putative candidate genes for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* species hybrid) using LD-based association mapping. *Molecular Genetics and Genomics* **291**, 1363–1377.
- Stukenbrock EH, McDonald BA, 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 75–100.
- Talas F, Kalih R, Miedaner T, McDonald BA, 2016. Genome-Wide Association Study identifies novel candidate genes for aggressiveness, deoxynivalenol production, and azole sensitivity in natural field populations of *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **29**, 417–430.
- Wu JQ, Sakthikumar S, Dong C, Zhang P, Cuomo CA, Park RF, 2017. Comparative genomics integrated with association analysis identifies candidate effector genes corresponding to Lr20 in phenotype-paired *Puccinia triticina* isolates from Australia. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Xhaard C, Barrès B, Andrieux A, Bousset L, Halkett F, Frey P, 2012. Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Molecular Ecology* **21**, 2383–2398.
- Xhaard C, Fabre B, Andrieux A, Gladieux P, Barres B, Frey P, Halkett F, 2011. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* **20**, 2739–2755.
- Xia C, Wang M, Wan A, Jiwan DA, See DR, Chen X, 2016. Association analysis of SP-SNPs and avirulence genes in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the wheat stripe rust pathogen. *American Journal of Plant Sciences* **07**, 126.
- Zhang X, Peng G, Kutcher HR, Balesdent M-H, Delourme R, Fernando WGD, 2016. Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada. *European Journal of Plant Pathology* **145**, 659–674.
- Zhong Z, Marcel TC, Hartmann FE, Ma X, Plissonneau C, Zala M, Ducasse A, Confais J, Compain J, Lapalu N, Amselem J, McDonald BA, Croll D, Palma-Guerrero J, 2017. A

small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the Stb6 resistance gene. *New Phytologist* **214**, 619–631.

Supplementary material

Table S1: Virulence profiles of the 78 *M. larici-populina* strains

population	strain	vir1	vir2	vir3	vir4	vir5	vir6	vir7	vir8	vir9
pop08	08EA01	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA08	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA09	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA105	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pop08	08EA106	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA11	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA15	0	1	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA16	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA18	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA19	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA22	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA42	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA43	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA50	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA55	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA61	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA66	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA85	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop08	08EA95	0	0	0	1	0	0	0	0	0
pop93	93CU1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
pop93	93CV1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
pop93	93DL2	0	1	1	1	0	0	0	0	0
pop93	93EA2	0	1	1	1	0	1	0	0	0
pop93	93EC4	0	0	1	1	0	0	0	0	0
pop93	93EF8	0	0	1	1	0	0	0	0	0
pop93	93GR7	0	1	1	1	0	1	0	0	0
pop93	93GS3	0	1	0	1	0	0	0	0	0
pop93	93GT1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
pop93	93GV8	0	1	0	0	0	0	0	0	0
pop93	93GW3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
pop93	93HW5	1	0	1	0	1	1	0	0	0
pop93	93IB7	1	0	1	1	1	0	0	0	0
pop93	93IC8	0	1	0	1	0	0	0	0	0
pop93	93NU2	0	0	1	1	0	0	0	0	0
pop93	93NU4	1	0	1	1	1	0	0	0	0
pop93	93NX6	0	1	0	0	0	0	0	0	0
pop93	93OC5	0	1	0	1	0	0	0	0	0
pop93	93Q1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
pop94	94ZZ1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ3	0	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ7	1	0	1	1	1	0	1	0	0

pop94	94ZZ10	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ11	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ12	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ13	0	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ14	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ15	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ16	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ18	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ19	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ20	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ21	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ33	0	0	1	1	0	0	1	0	0
pop94	94ZZ35	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ36	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop94	94ZZ37	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AA6	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AB02	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AB07	1	0	1	1	1	0	0	0	0
pop98	98AC08	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AD04	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG3	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG18	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG36	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG42	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG49	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG54	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG56	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AG69	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AI1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AI35	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AI58	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98AP2	0	0	1	1	0	0	1	0	0
pop98	98AP3	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98GB3	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98GC4	1	0	1	1	1	1	1	0	0
pop98	98GD5	1	0	1	1	1	0	1	0	0
pop98	98GF7	0	1	1	1	0	0	0	0	0

Note S1: Genome re-sequencing, filtering and mapping of short reads from Persoons *et al.* (in prep.)

Genomic DNA libraries were used for sequencing by Beckman Coulter Genomics (Grenoble, France) for 24 samples and by the Joint Genome Institute (Walnut Creek, California, United States) for others (Table 1). Each library was quantified by qPCR and sequenced on the Illumina HiSeq2000 platform as paired-end 150 bp reads. The total number of sequencing reads for each sample is presented in Table 1.

For the mapping we used the new version of the *M. larici-populina* reference genome generated by the Joint Genome Institute (Jeremy Schmutz and Jerry Jenkins, pers. comm.). This genome is assembled in 18 linkage groups (versus 462 scaffolds for the current released version) based on the genetic map obtained from a selfing of the reference isolate 98AG31 (Pernaci *et al.*, 2014). The length of each linkage group is presented in Table 2.

The forward and reverse libraries of each sample were aligned on the reference genome using the bwa software version 0.7.5 (Li & Durbin, 2009). We fixed the maximum number of differences for each read against the reference to 2. All others options were used with default values. The number of mapped and unmapped reads and the sequencing depth by isolate were computed with samtools version 0.1.19 (Li *et al.*, 2009) (Table 1). Variant call format files (vcf) were generated for each linkage group using samtools with default parameters. SNP calling was performed using a custom filtering procedure implemented in Python using EggLib version 3.0.0 alpha (De Mita & Siol, 2012). Filter parameters were: minimum minor allelic frequency = 0.05; minimum sequencing depth = 15; maximum genotype likelihood for each sample: 20.

References:

- De Mita S, Siol M, 2012. EggLib: processing, analysis and simulation tools for population genetics and genomics. *BMC Genetics* **13**, 27.
- Li H, Durbin R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079.
- Pernaci M, De Mita S, Andrieux A, Pétrowski J, Halkett F, Duplessis S, Frey P, 2014. Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Persoons A, Halkett F, Duplessis S, De Mita S, in prep. Demographic and genomic consequences of a major event of adaptation in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*.

Table S2: Alleles at positions significantly associated with the virulence phenotypes Vir1 to Vir7 (Chr. stands for chromosome; 0 stands for avirulent phenotype and 1 for virulent phenotype)

Strain	Vir1	Chr.9, Pos. 4,753,911	Vir2	Chr.12, Pos. 1,859,611	Chr.16, Pos. 287,178	Vir3	Chr.2, Pos. 7,104,975	Chr.3, Pos. 4,637,034	Chr.10, Pos. 2,635,990	Chr.3, Pos. 6,957,639	Chr.17, Pos. 238,860
08EA01	0	GA	0	TT	TT	0	CC	CT	GG	AG	GG
08EA06	0	GA	0	TT	TA	0	CC	CT	n/a	AG	GG
08EA09	0	GA	0	TT	TT	0	CC	CT	GG	AG	GG
08EA105	0	GA	0	TT	TT	0	CT	CT	GG	AG	GG
08EA106	0	GA	0	TT	TT	0	CC	CT	GG	AG	GG
08EA11	0	AA	0	TT	TT	0	CC	CT	GA	AG	GA
08EA15	0	GA	1	TT	AA	0	CC	CT	GG	AG	GG
08EA16	0	AA	0	TT	TT	0	n/a	CT	GG	AG	GG
08EA18	0	GA	0	TT	TT	0	CC	TT	GG	AG	GA
08EA19	0	GA	0	TT	TT	0	CC	CT	GG	AG	GG
08EA22	0	AA	0	TT	TT	0	CT	CC	GA	AG	GG
08EA42	0	GA	0	TT	TT	0	TT	CT	GG	GG	GA
08EA43	0	GA	0	TT	TT	0	CC	CT	GG	AG	GG
08EA50	0	GA	0	TT	TA	0	CT	CT	GG	AG	GG
08EA55	0	AA	0	TT	TT	0	CC	TT	GG	AG	AA
08EA61	0	GA	0	TT	TT	0	n/a	CT	GG	AG	GG
08EA66	0	AA	0	TT	TT	0	CT	CC	GG	AA	GG
08EA85	0	AA	0	TT	TT	0	n/a	TT	GG	AG	AA
08EA95	0	GA	0	TT	TT	0	CC	CT	GG	AG	GG
93CU01	0	GA	1	TC	AA	0	CC	CT	GA	AG	GG
93CV01	1	GA	0	TT	n/a	1	CC	CC	GA	AG	GA
93DL02	0	AA	1	CC	TT	1	CC	CC	GG	n/a	GG
93EA02	0	GA	1	CC	TT	1	CC	CT	GG	GG	GA
93EC04	0	AA	0	TC	TT	1	CT	CC	GG	AG	GA
93EF08	0	AA	0	n/a	AA	1	n/a	CC	GG	AA	GA
93GR07	0	GA	1	TC	TA	1	CC	CC	n/a	AG	GG
93GS03	0	GA	1	TC	AA	0	CT	CC	AA	n/a	GG
93GT01	0	AA	1	CC	n/a	0	TT	CC	n/a	AA	GA
93GV08	0	GA	1	TC	TA	0	CT	CC	GG	AA	GG
93GW03	0	GA	1	CC	TA	0	CT	CC	AA	GG	GG
93HW05	1	GG	0	TC	n/a	1	CC	CC	GG	AG	GG
93IB07	1	GG	0	TC	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
93IC08	0	GG	1	TC	TT	0	TT	CC	GA	AG	GA
93NU02	0	GA	0	n/a	TT	1	CC	CC	n/a	AG	GG
93NU04	1	GG	0	TT	TT	1	n/a	CC	GG	AG	GA
93NX06	0	GA	1	TC	TA	0	CT	CC	GG	AA	GG
93OC05	0	AA	1	CC	AA	0	CC	CC	AA	AA	GG
93Q01	0	GG	1	CC	TT	1	CC	CC	GG	n/a	GG
94ZZ01	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
94ZZ03	0	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
94ZZ07	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ10	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ11	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ12	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
94ZZ13	0	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ14	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
94ZZ15	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ16	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ18	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ19	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ20	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ21	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ23	0	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA

94ZZ35	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GA	AG	GA
94ZZ36	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
94ZZ37	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GA	AG	GA
98AA06	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AB02	1	GA	0	TT	n/a	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AB07	1	GG	0	TT	TA	1	CC	CC	GG	n/a	GG
98AC08	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AD04	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG03	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG18	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG36	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
98AG42	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG49	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG54	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG56	1	GG	0	n/a	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AG69	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
98AI01	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GA
98AI35	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AI58	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AP02	0	GA	0	TT	TA	1	CC	CC	GG	AG	GG
98AP03	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98GB03	1	GG	0	TT	TT	1	n/a	CC	GG	AG	GG
98GC04	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GA	AG	GG
98GD05	1	GG	0	TT	TT	1	CC	CC	GG	AG	GG
98GF07	0	GA	1	TC	AA	1	CT	CC	n/a	AG	GA

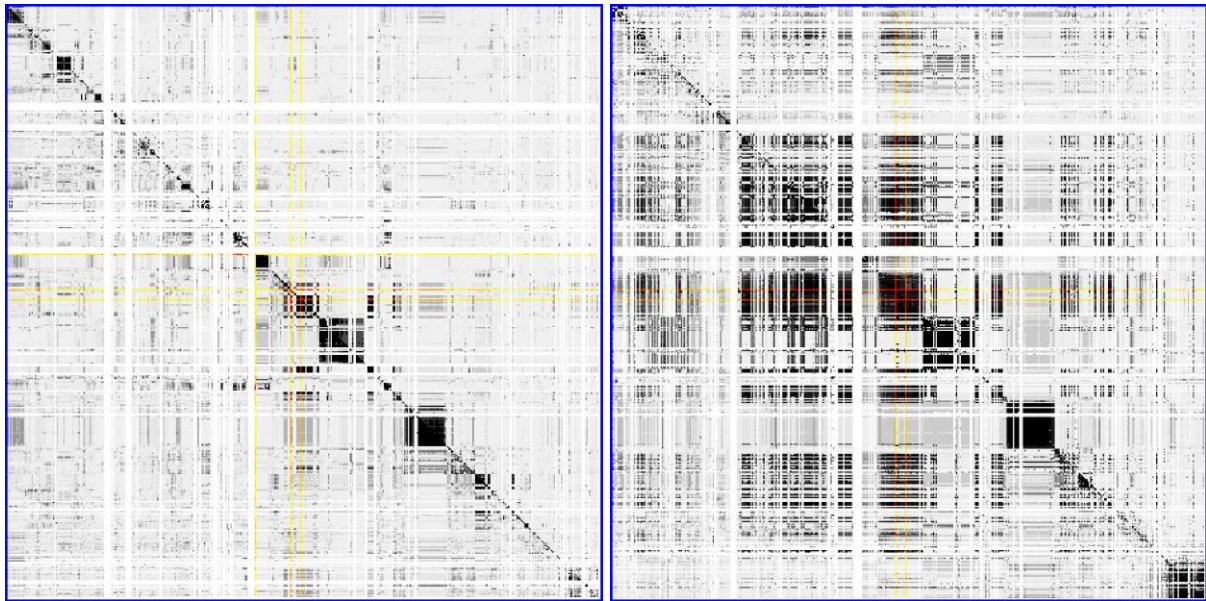
Strain	Vir4	Chr.10,	Chr.10,	Chr.1,	Vir5	Chr.9,	Vir6	Chr.13,	Chr.8,	Chr.10,	Chr.8,
		Pos.	Pos.	Pos.		Pos.		Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
		795,050	520,340	2,531,434		4,753,911		2,589,430	3,509,779	1,914,284	140,480
08EA01	1	CC	AG	n/a	0	GA	0	TC	CC	TT	AA
08EA06	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CG	TT	AA
08EA09	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CG	TT	AA
08EA105	0	CT	GG	GG	0	GA	0	n/a	CC	TT	AA
08EA106	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TT	AA
08EA11	1	CC	AG	GG	0	AA	0	CC	CC	TT	AA
08EA15	1	n/a	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TT	AA
08EA16	1	CC	AG	GG	0	AA	0	CC	CG	TT	AA
08EA18	1	CT	AG	GG	0	GA	0	CC	CG	TT	AA
08EA19	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TC	AA
08EA22	1	CC	AG	GG	0	AA	0	CC	CG	TT	AA
08EA42	1	n/a	AG	GG	0	GA	0	CC	CG	TT	AA
08EA43	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TT	AA
08EA50	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TC	AA
08EA55	1	CC	AG	GG	0	AA	0	CC	CC	TT	AA
08EA61	1	CC	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TT	AA
08EA66	1	CC	AG	GG	0	AA	0	CC	CC	TC	AA
08EA85	1	CC	AG	GG	0	AA	0	CC	CC	TC	AA
08EA95	1	CC	AG	GA	0	GA	0	CC	CG	TT	AA
93CU01	1	CT	AG	GA	0	GA	0	TC	CG	TT	AC
93CV01	1	CC	AG	GG	1	GA	0	CC	CC	TT	AA
93DL02	1	CC	GG	GA	0	AA	0	CC	CG	TT	AC
93EA02	1	TT	AG	AA	0	GA	1	TT	GG	TT	AA
93EC04	1	CC	AG	n/a	0	AA	0	CC	CC	TC	AC
93EF08	1	CC	AG	GG	0	AA	0	TC	CC	TT	AC
93GR07	1	CC	n/a	GG	0	GA	1	TT	CG	TC	AA
93GS03	1	CC	n/a	GG	0	GA	0	TC	CC	TT	AC
93GT01	1	CC	GG	GA	0	AA	0	TC	CG	TT	CC
93GV08	0	TT	AG	GG	0	GA	0	TC	CC	TT	AC
93GW03	0	CT	GG	n/a	0	GA	0	TC	CG	TT	CC
93HW05	0	TT	AG	GG	1	GG	1	TC	CG	CC	AA
93IB07	1	CC	AG	GA	1	GG	0	TC	CC	TC	AC
93IC08	1	CC	AG	GA	0	GG	0	CC	CC	TC	AC
93NU02	1	CT	AG	GG	0	GA	0	CC	CC	TC	AC
93NU04	1	CC	AG	GA	1	GG	0	CC	CC	TC	AC
93NX06	0	TT	AG	GG	0	GA	0	TC	CC	TT	AC
93OC05	1	TT	AG	AA	0	AA	0	TC	CC	TT	CC
93Q01	1	CT	AG	AA	0	GG	0	TC	CC	TT	AA
94ZZ01	1	CC	AG	GA	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
94ZZ03	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CG	TT	AA
94ZZ07	1	CC	n/a	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ10	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ11	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ12	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ13	1	CC	n/a	GG	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
94ZZ14	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CG	TT	AA
94ZZ15	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ16	1	CC	AG	GG	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
94ZZ18	1	CC	AG	AA	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
94ZZ19	1	CC	AG	GG	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
94ZZ20	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ21	1	CC	AG	GG	1	GG	0	n/a	CC	TT	AA
94ZZ33	1	CC	AG	GG	0	GG	0	CC	CG	TT	AA
94ZZ35	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CG	TT	AA
94ZZ36	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
94ZZ37	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
98AA06	1	CC	AG	GA	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98AB02	1	CT	AG	GA	1	GA	0	CC	CG	TT	AA

98AB07	1	CT	AG	GA	1	GG	0	CC	CC	TC	AA
98AC08	1	CC	AG	GA	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
98AD04	1	CC	AG	GA	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98AG03	1	CC	AG	GG	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98AG18	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
98AG36	1	CC	AG	GG	1	GG	0	n/a	CC	TT	AA
98AG42	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CG	TT	AA
98AG49	1	CC	AG	n/a	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
98AG54	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CG	TT	AA
98AG56	1	CC	AG	GG	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98AG69	1	n/a	AG	GG	1	GG	0	n/a	CG	TT	AA
98AI01	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TT	AA
98AI35	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CG	TT	AA
98AI58	1	CC	AG	n/a	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98AP02	1	CC	AG	GG	0	GA	0	TC	CC	TT	AA
98AP03	1	CC	AG	GG	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98GB03	1	CC	AG	GA	1	GG	0	TC	CC	TT	AA
98GC04	1	CC	AG	n/a	1	GG	1	TT	GG	TC	AA
98GD05	1	CC	AG	GG	1	GG	0	CC	CC	TC	AA
98GF07	1	CC	n/a	AA	0	GA	0	TC	CC	TC	AC

Strain	Vir7	Chr.15, Pos. 2,233,055
08EA01	0	TT
08EA06	0	TT
08EA09	0	CT
08EA105	0	TT
08EA106	0	TT
08EA11	0	CT
08EA15	0	TT
08EA16	0	TT
08EA18	0	CT
08EA19	0	TT
08EA22	0	TT
08EA42	0	TT
08EA43	0	TT
08EA50	0	TT
08EA55	0	CT
08EA61	0	CT
08EA66	0	CT
08EA85	0	TT
08EA95	0	CC
93CU01	0	TT
93CV01	0	TT
93DL02	0	TT
93EA02	0	TT
93EC04	0	TT
93EF08	0	TT
93GR07	0	CT
93GS03	0	TT
93GT01	0	TT
93GV08	0	TT
93GW03	0	CT
93HW05	0	TT
93IB07	0	TT
93IC08	0	TT
93NU02	0	TT
93NU04	0	TT
93NX06	0	TT

93OC05	0	TT
93Q01	0	TT
94ZZ01	1	CC
94ZZ03	1	CC
94ZZ07	1	n/a
94ZZ10	1	CC
94ZZ11	1	CC
94ZZ12	1	CC
94ZZ13	1	CC
94ZZ14	1	CC
94ZZ15	1	CC
94ZZ16	1	n/a
94ZZ18	1	n/a
94ZZ19	1	CC
94ZZ20	1	CC
94ZZ21	1	CC
94ZZ33	1	CC
94ZZ35	1	CC
94ZZ36	1	CC
94ZZ37	1	CC
98AA06	1	CC
98AB02	1	n/a
98AB07	0	TT
98AC08	1	CC
98AD04	1	CC
98AG03	1	CC
98AG18	1	CC
98AG36	1	CC
98AG42	1	CC
98AG49	1	CC
98AG54	1	CC
98AG56	1	CC
98AG69	1	n/a
98AI01	1	CC
98AI35	1	n/a
98AI58	1	CC
98AP02	1	CC
98AP03	1	CC
98GB03	1	CC
98GC04	1	CT
98GD05	1	CC
98GF07	0	CC

Figure S1: Linkage disequilibrium along chromosome 15 for each population. Linkage disequilibrium was computed for all pairs of SNPs within the chromosome 15 as the squared correlation coefficient. Values were obtained for each population separately. Coloured positions (1) and (3) correspond to the centre of regions identified as under selection by Persoons *et al.* (in prep.): 1.940 Mb – 1.945 Mb and 2.310 Mb – 2.315 Mb; coloured position (2) corresponds to the position 2,233,055 identified as significantly associated with the Vir7. Colour scales: black and red= 1; white and yellow=0.



Population 1993

Population 1994



Population 1998

Population 2008

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'objectif de ce travail était d'estimer le potentiel évolutif des caractères d'agressivité et morphologique de l'agent de la rouille du peuplier en vue d'orienter les stratégies de sélection de variétés de peupliers résistantes vers des résistances plus durables. Pour cela, nous avons combiné des approches et outils de génétique quantitative et de biologie évolutive. Afin d'identifier les gènes impliqués dans ces caractères quantitatifs et dans les virulences, nous avons cherché à localiser leurs déterminants génétiques dans des populations naturelles de *M. larici-populina*. Pour mener à bien ces analyses, nous avons estimé les variations des différents caractères phénotypiques le plus précisément possible. Au cours de cette discussion, j'aborderai d'abord les verrous techniques rencontrés lors de l'étude de *M. larici-populina*. Je discuterai ensuite des apports de ma thèse dans l'identification des caractères d'agressivité et morphologiques à cibler pour sélectionner des résistances plus durables.

1. Etude d'un organisme biotrophe en laboratoire

1.1. Apport d'un échantillonnage temporel

Pour évaluer l'évolution passée des caractères d'agressivité et morphologique de *M. larici-populina*, l'échantillonnage temporel disponible a été un apport décisif. Ce champignon offre la possibilité d'être cryopréservé à -80°C pendant des décennies sans conséquence sur son développement lors des inoculations suivantes. Cette technique de stockage permet aussi de conserver les génotypes originaux des échantillons collectés au cours du temps. Les génotypes sont alors fixés et n'évoluent pas contrairement à ce qui pourrait se passer avec un mode de conservation impliquant des inoculations régulières ou des événements de reproduction sexuée. Grâce à la maîtrise de la mise en collection et du réveil des échantillons au laboratoire, mis au point dans les années 1980 par Jean Pinon, une collection historique est conservée et disponible à l'INRA. Elle regroupe des souches récoltées depuis 1982, ce qui donne accès à une grande diversité de phénotypes et de pathotypes. Ceci nous a donné l'opportunité d'utiliser une approche de résurrection (Franks *et al.*, 2018) dans le **chapitre 2** avec quatre populations naturelles réparties sur une période de 15 ans (de 1993 à 2008) pour étudier l'évolution et les bases génétiques des caractères quantitatifs.

1.2. Avantages et contraintes du protocole d'inoculation monospore

Les caractères d'agressivité et morphologique ont été mesurés sur ces quatre populations. Pour homogénéiser les conditions expérimentales biotiques, nous avons employé un protocole d'inoculation monospore. Ce protocole, consistant à déposer une seule spore de *M. larici-populina* sur un disque foliaire de peuplier, permet d'éviter toute interaction positive ou négative entre individus. Ainsi, nous avons pu mesurer précisément et individuellement six caractères phénotypiques. Ces mesures individuelles nous ont permis d'effectuer des analyses

de génétique quantitative, pour lesquelles les données de variance et covariance pour chaque individu sont indispensables.

Le protocole d'inoculation monospore a donc été avantageux pour avoir accès aux informations dont nous avons besoin. En revanche, c'est un protocole chronophage dans la réalisation des expérimentations et l'acquisition des données. D'une part, le nombre d'individus inoculés par jour s'est élevé à environ 430 spores déposées individuellement dans mon étude contre plusieurs milliers en pulvérisant des spores sur des disques foliaires de peuplier comme dans l'expérience de Pei *et al.* (2003). Le temps investi dans l'inoculation du champignon est donc très important. D'autre part, la mesure des caractères à l'échelle individuelle demande un grand nombre de manipulations de chaque échantillon (mesure du temps de latence, photographie sous loupe, analyse d'images, compteur de particules, extraction d'ADN et qPCR) dont l'ensemble peut durer plusieurs mois.

1.3. Problématiques liées à la mesure des caractères d'agressivité et morphologique

Le temps de latence est classiquement étudié en phytopathologie mais il est difficile à mesurer précisément. Dans les expériences menées au cours de ma thèse, le temps de latence a été enregistré une à deux fois par jour sous loupe, donnant une résolution des mesures à la demi-journée près. Pour améliorer la précision de la mesure, un dispositif permettant de mesurer le temps de latence à l'heure près a été mis en place pour de futures expériences. Ce dispositif est constitué d'un automate qui se déplace au-dessus de la paillasse à intervalles réguliers et porte deux appareils photographiques. Ces derniers prennent des photographies à la verticale des boîtes à puits contenant les disques foliaires inoculés. Un script d'analyse d'images a été développé pour repérer, sur chaque disque foliaire, la date de première sporulation qui marque la fin du temps de latence (D'Arrentières, 2018). Ce dispositif permet ainsi de calculer le temps de latence précisément.

Pour pouvoir comparer les différentes souches et populations, la mesure des caractères d'agressivité et morphologique a nécessité des expériences en jardin commun pour lesquelles nous avons uniformisé le protocole autant que possible concernant les conditions abiotiques (température, lumière, humidité) et biotiques (variété de peuplier, maturité des feuilles). Le choix du matériel végétal à utiliser était restreint par la contrainte de devoir inoculer des souches aux pathotypes divers sur une seule variété de peuplier : les inoculations ont donc impérativement été réalisées sur la variété 'Robusta' qui est sensible à toutes les souches de *M. larici-populina*.

Les caractères d'agressivité mesurés chez *M. larici-populina*, champignon biotrophe, sont des caractères d'interaction avec la plante. Ils sont donc déterminés par le génome du champignon mais aussi influencés par le génome et le statut physiologique de la plante. Les caractères phénotypiques de l'agent pathogène sont aussi influencés par la maturité des feuilles comme

illustré par l'étude du **chapitre 1** (Maupetit *et al.*, 2018). Plus précisément, nous avons montré que le taux de sporulation et la taille de lésions sont sensibles à la quantité de composés phénoliques dans les feuilles. Cette quantité reflète un niveau de défenses constitutives des feuilles car elle a été mesurée sur des feuilles non infectées par le champignon. L'analyse de la quantité de composés phénoliques induits au cours de l'infection permettrait de mieux comprendre leur rôle dans l'interaction hôte – parasite. Récemment, une expérience menée au laboratoire a étudié l'induction des réactions de défenses de la variété 'Robusta' après inoculation par *M. larici-populina* (Paineau, 2018). Les résultats de cette expérience sont en cours d'analyse et semblent prometteurs.

2. Quels caractères cibler pour des résistances durables ?

Pour déterminer les caractères quantitatifs du champignon que les résistances quantitatives devraient cibler, il faudrait identifier les caractères quantitatifs les moins susceptibles d'évoluer, en se basant sur l'observation de leur évolution passée. Nous avons donc considéré leur évolution adaptative (sur la base de leur héritabilité et de la sélection naturelle subie autour du contournement de la résistance R7) et les compromis évolutifs qui les lient dans trois populations représentatives de moments clés du contournement de la résistance R7.

2.1. Quels sont les caractères qui ont le moins évolué ?

Les contournements successifs des résistances qualitatives du peuplier ont conduit les améliorateurs à s'orienter depuis une vingtaine d'années vers la recherche de résistances plus durables, définies comme des résistances qui restent efficaces longtemps pour un cultivar largement déployé (Johnson, 1979). Ceci les a conduits vers la sélection de résistances quantitatives, à déterminisme génétique plus complexe et basée sur la cartographie de QTL de résistance quantitative (Jorge *et al.*, 2005 ; Dowkiw *et al.*, 2010). Afin d'accompagner cette stratégie de sélection, il est nécessaire d'étudier l'évolution potentielle des caractères d'agressivité du champignon et leurs éventuels compromis évolutifs (Lannou, 2012) et de déterminer quels caractères d'agressivité devraient être ciblés par les résistances quantitatives.

L'échantillonnage temporel que nous avons étudié a permis de mettre en évidence l'évolution du volume des spores au moment du contournement de la résistance R7. L'hypothèse de l'évolution de ce caractère est probable car son héritabilité est importante et une sélection directionnelle a été décrite entre 1993 et 1994. Précédemment, une évolution rapide du volume des spores a aussi été observée au cours d'épidémies de rouille du peuplier dans la vallée de la Durance (Pernaci, 2015). Cependant, le rôle du volume des spores est difficile à évaluer et à interpréter : il peut jouer un rôle dans la dispersion des spores par le vent en fonction de leur forme et de leur masse volumique ; il peut conditionner la quantité de ressources nutritives disponible ; il peut aussi participer à la résistance aux facteurs environnementaux comme la sécheresse ou les chocs thermiques et physiques (Rotem *et al.*,

1985; Werner and Platt, 1976). L'évolution rapide du volume des spores n'en ferait donc pas une bonne cible pour augmenter la durabilité des résistances quantitatives.

La quantité de mycélium, tout comme le volume des spores, a une héritabilité élevée. Ceci confère à ce caractère la possibilité de répondre à la sélection naturelle. Ainsi, il semble avoir été sous sélection stabilisante au moment du contournement de la résistance R7. En considérant que le mycélium est le tissu d'absorption des nutriments indispensables à la croissance du parasite, l'investissement mis dans le développement de ce tissu devrait conduire à des valeurs égales entre les différentes populations. La quantité de mycélium *in planta* est d'ailleurs apparue peu variable et pas influencée par la quantité de composés de défenses des feuilles. Ceci est cohérent avec un investissement énergétique principal dans ce tissu mais c'est aussi étonnant car le mycélium est le tissu fongique directement au contact des cellules foliaires. L'héritabilité élevée de ce caractère lui conférerait la possibilité d'évoluer en présence d'un autre régime de sélection naturelle. En effet, face à une résistance quantitative, les individus au mycélium le plus développé pourraient être favorisés (Gandon and Michalakis, 2000) conduisant à une possible augmentation de l'agressivité du parasite. Pour estimer l'ampleur et les conséquences d'une telle évolution, une étude épidémiologique serait nécessaire et permettrait de renseigner sur la durabilité d'une résistance quantitative ciblant la quantité de mycélium *in planta*.

Contrairement au volume des spores et à la quantité de mycélium, les autres caractères d'agressivité ont des valeurs d'héritabilité relativement faibles (l'héritabilité de l'efficacité d'infection étant *a priori* surestimée), ce qui les empêcherait d'évoluer par adaptation génétique. De façon cohérente, le temps de latence, la taille des lésions et le nombre de spores (donc le taux de sporulation) n'ont pas évolué avec le contournement de la résistance R7.

L'héritabilité du temps de latence peut avoir été sous-estimée à cause de la faible résolution des mesures comme mentionné plus haut. Il semble tout de même probable que ce caractère ait évolué au moment et après le contournement de la résistance R7. Si la différence de temps de latence entre populations n'est pas apparue significative dans le **chapitre 2** (Maupetit *et al.*, in prep.), une légère augmentation a été mesurée entre 1993 (7,23 j) et 1994 (7,57 j), suivie d'une diminution en 1998 (7,26 j). Une diminution significative du temps de latence entre 1994 et 1998 avait déjà été observée dans des études précédentes (Pinon and Frey, 2005; Fabre, non publié). La différence de résultats entre ces expériences et celle décrite dans le **chapitre 2** peut s'expliquer par la différence entre les variétés de peuplier utilisées pour l'inoculation. En effet, les études antérieures ont été réalisées sur 'Beaupré' (R7) alors que nous avons ici inoculé les souches sur 'Robusta' comme précisé précédemment. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec ceux de l'expérience qui a consisté à inoculer des souches de 1994 et 1998 sur six variétés de peuplier, dont 'Beaupré' et 'Robusta' (Hayden, non publié). Cette dernière a mis en évidence une diminution significative du temps de latence quatre ans après le contournement de la résistance R7 sur 'Beaupré' mais pas sur 'Robusta',

ni sur les quatre autres cultivars de peuplier porteurs de la résistance R7. L'augmentation de l'agressivité de *M. larici-populina* observée uniquement sur 'Beaupré' peut être interprétée comme une adaptation spécifique à cet hôte.

Concernant la taille des lésions et le nombre de spores, l'absence de différence entre populations peut aussi s'expliquer par le fait que ces caractères sont les plus influencés par les caractéristiques foliaires, comme mis en évidence par l'étude de la plasticité le long d'un gradient de maturité foliaire du **chapitre 1** (Maupetit *et al.*, 2018). Ceci explique qu'aucun de ces caractères ne varie dans l'expérience en jardin commun menée sur un seul rang foliaire. Ces résultats suggèrent que la sporulation est la fonction la plus contrainte par l'environnement biotique et donc susceptible d'évoluer en fonction de ce dernier.

2.2. Quels sont les caractères dont l'évolution est limitée par des compromis évolutifs ?

Contrairement à nos attentes, aucun compromis évolutif n'a été observé alors que Laine et Barrès (2013) en ont référencé chez plusieurs agents pathogènes dont des champignons. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. D'une part, des compromis évolutifs différents illustrent des stratégies évolutives différentes. Il était donc important de considérer séparément les quatre populations étudiées aux histoires évolutives distinctes. Or chacune des populations contenait une vingtaine de souches seulement, ce qui limite la détection de covariance génétique entre caractères. D'autre part, la rouille du peuplier a un cycle de développement complexe comptant cinq types de spores au cours d'une année et deux hôtes distincts. Dans ce travail, nous avons étudié le stade urédien uniquement, forme de reproduction asexuée sur peuplier. Il est probable que des compromis évolutifs apparaissent en prenant en compte les autres stades de développement de la rouille (Montarry *et al.*, 2007; Nespolo *et al.*, 2009, 2014), notamment sur son hôte alternant, le mélèze. Des études complémentaires incluant sur les autres stades de développement de *M. larici-populina* apporteront peut-être plus d'informations sur les compromis évolutifs entre caractères phénotypiques.

Si la recherche de compromis évolutifs n'a pas été fructueuse, elle a tout de même permis de faire ressortir plusieurs corrélations génétiques positives : entre la taille des lésions et le nombre de spores d'une part et entre la taille des lésions et la quantité de mycélium d'autre part. La première corrélation (taille des lésions – nombre de spores) semble robuste puisqu'elle apparaît aussi bien au niveau phénotypique que génétique dans deux expériences indépendantes. Cibler un de ces caractères avec des résistances quantitatives permettrait de limiter l'expression des deux et de réduire ainsi la sporulation, et par conséquent le nombre de descendants de *M. larici-populina*.

Au-delà de la connaissance des caractères à cibler avec les résistances quantitatives, il serait efficace de pouvoir cibler directement les fonctions des gènes clés de leur contrôle. Afin

d'identifier les bases génétiques de l'agressivité et des virulences, des études d'association pangénomiques (GWAS) ont été réalisées.

2.3. Quels gènes sont impliqués dans le contournement des résistances ?

L'analyse GWAS a mis en évidence des régions du génome associées aux différentes virulences de *M. larici-populina*. En particulier, le locus d'avirulence Avr7 a été localisé dans une région précédemment identifiée comme ayant été sous sélection au moment du contournement de la résistance R7 (Persoons *et al.*, in prep.). Nous n'avons pas pu identifier la fonction du gène associé à la virulence 7 mais la cohérence de ces résultats ouvre des pistes prometteuses pour une caractérisation fonctionnelle du gène d'avirulence. L'hypothèse principale est que ce gène d'avirulence serait sous la forme d'un allèle muté dans le génome de référence (98AG31) puisqu'il appartient à une souche virulente. Ce résultat a souligné l'importance du séquençage d'une souche avirulente 7 pour la suite des analyses. En effet, dans le but de préciser la position et le rôle du gène d'avirulence, il est nécessaire de disposer de la séquence d'un génome d'une souche avirulente possédant une version fonctionnelle du gène.

Si l'ensemble des souches étudiées a donné accès à une diversité de pathotypes, les analyses ont montré l'importance de la répartition entre souches virulentes et avirulentes au sein du jeu de données. Ainsi, concernant les virulences 2, 4 et 6, des échantillonnages plus équilibrés seront indispensables pour mener à bien les analyses GWAS. De plus, malgré la petite taille de l'échantillon, notre travail a montré que des résultats sont tout de même exploitables, même s'ils seront plus fiables avec un plus grand nombre de souches. A terme, plus de souches de la collection historique seront séquencées, ce qui permettra de renforcer ou d'invalider les résultats de cette étude.

La caractérisation des gènes aux loci identifiés comme associés aux différentes virulences a été limitée par le manque d'information sur l'annotation du génome de *M. larici-populina*. Le séquençage de génomes d'autres espèces de champignons, et notamment de Pucciniales, est en cours dans le cadre du projet « 1000 génomes fongiques » (<http://1000.fungalgenomes.org/home/>). Celui-ci donnera la possibilité d'élargir les connaissances sur les génomes et leur annotation, donnant accès à des informations génomiques et fonctionnelles importantes.

Les analyses GWAS ont montré leur efficacité sur les virulences, caractères qualitatifs à déterminisme *a priori* simple, à condition d'avoir un échantillonnage suffisant et équilibré. Au contraire, les analyses GWAS sur les caractères quantitatifs de *M. larici-populina* n'ont pas été concluantes. Les limites de ces analyses et des pistes d'amélioration sont discutées dans le paragraphe suivant.

2.4. Quels gènes contrôlent les caractères d'agressivité et morphologique de *M. larici-populina* ?

Vu l'héritabilité du volume des spores et les différences observées entre populations, il est surprenant de ne pas avoir identifié de gène contrôlant ce caractère. L'absence de corrélation entre génotype et phénotype est moins étonnante pour les autres caractères quantitatifs dont l'héritabilité est faible (temps de latence, taille de lésion, taux de sporulation) ou la différence entre populations non significative (quantité de mycélium *in planta*).

Une des limites de l'approche GWAS semble être atteinte ici car la valeur d'un caractère phénotypique est généralement déterminée par plusieurs gènes aux effets additifs. Les résultats seront d'autant plus fiables que la part de variation du caractère expliquée par le ou les gènes le contrôlant est importante. Une méthode permettant de détecter les gènes aux effets additifs associés à un caractère est l'analyse sur fenêtres glissantes le long du génome qui évalue les différences entre individus au sein d'une fenêtre plutôt que SNP par SNP (Wu *et al.*, 2011). Cette méthode permettrait d'identifier des gènes aux effets additifs mineurs dans chaque région génomique.

Précédemment, l'étude de Pernaci (2015) a porté sur une descendance de l'auto-croisement de 98AG31 (souche de référence) et a permis de localiser des QTL potentiellement liés à la taille des lésions, à la latence et à l'efficacité d'infection. Des analyses de liaison sur d'autres croisements contrôlés pourront apporter des informations supplémentaires pour identifier les gènes recherchés. De notre côté, nous avons tenté de compléter son analyse de liaison par nos analyses d'association. Malheureusement, nos résultats n'ont pas confirmé ou infirmé les siens. Afin d'affiner la recherche des bases génétiques de l'agressivité de *M. larici-populina*, l'analyse d'association (GWAS) et l'analyse de liaison (QTL mapping) étant complémentaires, combiner les deux semble être la méthode la plus robuste (Ott *et al.*, 2011).

3. Conclusion et perspectives

Ce travail a permis de mieux connaître l'évolution d'un agent pathogène et ses déterminants autour du contournement de la résistance qualitative de son hôte. Des approches de biologie évolutive et de génétique quantitative nous ont permis d'acquérir des informations complémentaires pour alimenter nos analyses et nos réflexions. Ainsi, nous avons estimé le potentiel adaptatif de caractères d'agressivité et morphologique de *M. larici-populina* et identifié ceux soumis à la sélection naturelle. L'association de ces disciplines a conduit à la localisation de certaines des bases génétiques de facteurs d'avirulence à l'origine de l'adaptation du champignon aux résistances qualitatives des peupliers. Si, dans ce travail, aucun caractère quantitatif de l'agent de la rouille du peuplier n'a été mis en évidence comme étant une cible prometteuse pour les résistances quantitatives, une meilleure compréhension

de leur évolution permettra, à terme, de guider les stratégies de gestion basées sur des résistances quantitatives supposées plus durables.

Cependant, la durabilité des résistances quantitatives est aussi mise à mal par l'érosion et les contournements. Un autre cas de figure a été étudié par Van Den Berg *et al.* (2014) : face à une résistance quantitative ciblant un caractère donné (capacité de sporulation), un autre caractère (taille des lésions) impliqué dans la même fonction pourrait évoluer. L'évolution de ce dernier pourrait alors compenser la perte d'agressivité due à la résistance et restaurer l'agressivité du parasite. D'autres moyens de lutte contre *M. larici-populina* sont donc à envisager en populiculture. Si les mélanges variétaux se sont révélés efficaces contre certains parasites (McDonald, 2015), ce n'est malheureusement pas le cas contre *M. larici-populina* (Miot *et al.*, 1999). En revanche, le pyramidage de résistances, qui associe gènes de résistances qualitatives et quantitatives, semble aussi être un moyen de lutte performant (McDonald, 2015; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Dans la considération de tels projets, les connaissances apportées par cette thèse et par les précédentes (Pernaci, 2015; Persoons, 2015; Xhaard, 2011) constituent une base indispensable aux prochaines études. Il sera néanmoins impératif de connaître plus précisément l'évolution des caractères quantitatifs et qualitatifs de *M. larici-populina* autour d'autres contournements de résistances.

La localisation du locus d'avorulence Avr7 constitue une piste majeure pour de futures analyses. Il serait intéressant d'approfondir ces résultats par la recherche de gènes présents dans les régions identifiées. Une première étape peut consister en la comparaison de séquences puis de protéines d'organismes proches afin de déterminer les potentielles retombées d'une modification dans le gène ciblé. Des validations fonctionnelles pourront être envisagées par la suite comme fait par Palma-Guerrero *et al.* (2013) et proposé par Plissonneau *et al.* (2017). Un prochain projet de l'équipe de recherche sera de caractériser le facteur d'avorulence Avr7.

RÉFÉRENCES

- Adandonon A, Regnier T, Aveling TAS, 2017. Phenolic content as an indicator of tolerance of cowpea seedlings to *Sclerotium rolfsii*. *European Journal of Plant Pathology* **149**, 245–251.
- Andrivon D, 1995. Nomenclature for pathogenicity and virulence: precision vs. tradition. *Phytopathology*, 518–519.
- Andrivon D, Pilet F, Montarry J *et al.*, 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**, 338–343.
- Azzimonti G, Lannou C, Sache I, Goyeau H, 2013. Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathology* **62**, 970–981.
- Bresson A, Jorge V, Dowkiw A *et al.*, 2011. Qualitative and quantitative resistances to leaf rust finely mapped within two nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR)-rich genomic regions of chromosome 19 in poplar. *New Phytologist* **192**, 151–163.
- 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, Laurens F, 2005. Breakdown of *Pl2*, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathology* **54**, 116–124.
- Cellerino GP, Anselmi N, Pinon J, 1978. Influence de l'âge des feuilles de peuplier sur la sensibilité à *Marssonina brunnea*. *European Journal of Forest Pathology* **8**, 273–279.
- Charmantier A, Garant D, 2005. Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 1415–1425.
- Clifford BC, Clothier RB, 1974. Physiologic specialization of *Puccinia hordei* on barley hosts with non-hypersensitive resistance. *Transactions of the British Mycological Society* **63**, 421–430.
- Coleman JS, 1986. Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. *Tree Physiology* **2**, 289–299.
- Cui H, Tsuda K, Parker JE, 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 487–511.
- D'Arrentières P, 2018. *Mise au point d'un automate et d'une méthode d'analyse d'images pour le suivi de cinétiques d'infection par la rouille du peuplier*. Mémoire de stage.
- Daverdin G, Rouxel T, Gout L *et al.*, 2012. Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLOS Pathogens* **8**, e1003020.

- Decaestecker E, Gaba S, Raeymaekers JAM *et al.*, 2007. Host–parasite ‘Red Queen’ dynamics archived in pond sediment. *Nature* **450**, 870–873.
- 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.
- Delmotte F, Mestre P, Schneider C *et al.*, 2014. Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: Evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 500–508.
- Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.
- Dowkiw A, Husson C, Frey P, Pinon J, Bastien C, 2003. Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology* **93**, 421–427.
- Dowkiw A, Voisin E, Bastien C, 2010. Potential of Eurasian poplar rust to overcome a major quantitative resistance factor. *Plant Pathology* **59**, 523–534.
- Flor HH, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–296.
- Franks SJ, Hamann E, Weis AE, 2018. Using the resurrection approach to understand contemporary evolution in changing environments. *Evolutionary Applications* **11**, 17–28.
- Frey P, Gérard P, Feau N, Husson C, Pinon J, 2005. Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. In: Pei MH., McCracken AR, eds. *Rust diseases of willow and poplar*. Wallingford, UK: CAB International, pp 63–72.
- Gandon S, Michalakis Y, 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **267**, 985–990.
- Giorcelli A, Vietto L, Anselmi N, Gennaro M, 1996. Influence of clonal susceptibility, leaf age and inoculum density on infections by *Melampsora larici-populina* races E1 and E3. *European Journal of Forest Pathology* **26**, 323–331.
- Guichard L, Dedieu F, Jeuffroy M-H, Meynard J-M, Reau R, Savini I, 2017. Le plan Ecophyto de réduction d’usage des pesticides en France : décryptage d’un échec et raisons d’espérer. *Cahiers Agricultures* **26**, 14002.
- Hacquard S, Petre B, Frey P, Hecker A, Rouhier N, Duplessis S, 2011. The poplar–poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens* **2011**, 1–11.
- Hahn M, 2000. The Rust Fungi. In: Kronstad JW, ed. *Fungal Pathology*. Springer Netherlands, 267–306.

- Holguin G, Bashan Y, 1992. Increased aggressiveness of *Alternaria macrospora*, a causal agent of leaf blight in cotton monoculture. *Canadian Journal of Botany* **70**, 1878–1884.
- Ioannidis JPA, Thomas G, Daly MJ, 2009. Validating, augmenting and refining genome-wide association signals. *Nature Reviews Genetics* **10**, 318–329.
- Johnson R, 1979. The concept of durable resistance. *Phytopathology* **69**, 198.
- Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C, 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* **167**, 113–127.
- Kardin MK, Groth JV, 1989. Density-dependent fitness interactions in the bean rust fungus. *Phytopathology* **79**, 409–412.
- Karisto P, Dora S, Mikaberidze A, 2018. Measurement of infection efficiency of a major wheat pathogen using time-resolved imaging of disease progress. **2018**, 318204.
- Kolmer JA, Leonard KJ, 1986. Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology* **76**, 774–777.
- Korte A, Farlow A, 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* **9**, 29.
- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S, 2016. Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**, 38–55.
- Laine A-L, Barrès B, 2013. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathology* **62**, 96–105.
- Laloi G, Vergne E, Durel CE, Le Cam B, Caffier V, 2017. Efficiency of pyramiding of three quantitative resistance loci to apple scab. *Plant Pathology* **66**, 412–422.
- Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–338.
- Lehman JS, Shaner G, 2007. Heritability of latent period estimated from wild-type and selected populations of *Puccinia triticina*. *Phytopathology* **97**, 1022–1029.
- Leonard KJ, 1969. Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology* **59**, 1851–1857.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G *et al.*, 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 513–545.
- Lush JL, 1940. Intra-sire correlations or regressions of offspring on dam as a method of estimating heritability of characteristics. *Journal of Animal Science* **1940**, 293–301.
- Mackay TFC, Stone EA, Ayroles JF, 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics* **10**, 565–577.

- Maupetit A, Halkett F, Fabre B *et al.*, in prep. How aggressiveness and morphological traits did evolve following a major resistance breakdown in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*?
- Maupetit A, Larbat R, Pernaci M *et al.*, 2018. Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1396.
- McDonald BA, 2010. How can we achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems? *New Phytologist* **185**, 3–5.
- McDonald BA, 2015. How can research on pathogen population biology suggest disease management strategies? The example of barley scald (*Rhynchosporium commune*). *Plant Pathology* **64**, 1005–1013.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.
- 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.
- Miot BS, Frey P, Pinon J, 1999. Varietal mixture of poplar clones: Effects on infection by *Melampsora larici-populina* and on plant growth. *European Journal of Forest Pathology* **29**, 411–423.
- 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.
- Montarry J, Corbiere R, Andrivon D, 2007. Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Functional Ecology* **21**, 603–610.
- Montarry J, Corbiere R, Lesueur S, Glais I, Andrivon D, 2006. Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant–pathogen systems? *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 522–531.
- Mundt CC, 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 446–455.
- Nespolo RF, Bartheld JL, González A *et al.*, 2014. The quantitative genetics of physiological and morphological traits in an invasive terrestrial snail: additive vs. non-additive genetic variation. *Functional Ecology* **28**, 682–692.
- Nespolo RF, Halkett F, Figueroa CC, Plantegenest M, Simon J-C, 2009. Evolution of trade-offs between sexual and asexual phases and the role of reproductive plasticity in the genetic architecture of aphid life histories. *Evolution* **63**, 2402–2412.
- Niks RE, Rubiales D, 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* **124**, 201–216.
- Nyquist WE, Baker RJ, 1991. Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**, 235–322.

- Ott J, Kamatani Y, Lathrop M, 2011. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* **12**, 465–474.
- Paineau M, 2018. *Influence des conditions biotiques et abiotiques sur la cinétique de développement d'un champignon biotrophe : Melampsora larici-populina, agent de la rouille du peuplier*. Mémoire de stage.
- 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.
- Palma-Guerrero J, Hall CR, Kowbel D *et al.*, 2013. Genome wide association identifies novel loci involved in fungal communication (JM Akey, Ed.). *PLoS Genetics* **9**, e1003669.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**, 409–424.
- Pei MH, Ruiz C, Harris J, Hunter T, 2003. Quantitative inoculations of poplars with *Melampsora larici-populina*. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 269–276.
- Pernaci M, 2015. Étude des traits d’histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier: de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine.
- Persoons A, 2015. Les contournements de résistance par *Melampsora larici-populina*, l’agent de la rouille du peuplier : impact démographique et déterminisme génétique. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine.
- Persoons A, Halkett F, Duplessis S, De Mita S, in prep. Demographic and genomic consequences of a major event of adaptation in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*.
- Persoons A, Hayden KJ, Fabre B *et al.*, 2017. The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology* **26**, 1902–1918.
- Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V *et al.*, 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Pinon J, Frey P, 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: Pei MH., McCracken AR, eds. *Rust diseases of willow and poplar*. Wallingford, UK: CAB International, 139–154.
- Plissonneau C, Benevenuto J, Mohd-Assaad N, Fouché S, Hartmann FE, Croll D, 2017. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. *Frontiers in Plant Science* **8**, 119.
- 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.

- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, 2002. Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. *Phytopathology* **92**, 762–768.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, 2004. Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* **94**, 712–721.
- Roff DA, Fairbairn DJ, 2012. The evolution of trade-offs under directional and correlational selection. *Evolution* **66**, 2461–2474.
- Rotem J, Wooding B, Aylor DE, 1985. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopathology* **75**, 510.
- Schumann GL, D’Arcy CJ, 2006. *Essential plant pathology*. St. Paul, USA: American Phytopathological Society (APS Press).
- Sharma JK, Heather WA, Winer P, 1980. Effect of leaf maturity and shoot age of clones of *Populus* species on susceptibility to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* **70**, 548–554.
- Singh RK, Banerjee N, Khan MS *et al.*, 2016. Identification of putative candidate genes for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* species hybrid) using LD-based association mapping. *Molecular Genetics and Genomics* **291**, 1363–1377.
- Stewart E I, Croll D, Lendenmann MH *et al.*, 2018. Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology* **19**, 201–216.
- Stukenbrock EH, McDonald BA, 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 75–100.
- Stukenbrock EH, McDonald BA, 2009. Population genetics of fungal and Oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 371–380.
- Thrall PH, Laine A-L, Ravensdale M *et al.*, 2012. Rapid genetic change underpins antagonistic coevolution in a natural host-pathogen metapopulation: Coevolution in a wild host-pathogen system. *Ecology Letters* **15**, 425–435.
- Ullah C, Unsicker SB, Fellenberg C *et al.*, 2017. Flavan-3-ols are an effective chemical defense against rust infection. *Plant Physiology* **175**, 1560–1578.
- Van Baalen M, 1998. Coevolution of recovery ability and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **265**, 317–325.
- Van Den Berg F, Lannou C, Gilligan CA, van den Bosch F, 2014. Quantitative resistance can lead to evolutionary changes in traits not targeted by the resistance QTLs. *Evolutionary Applications* **7**, 370–380.
- Van Der Plank JE, 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. New York and London, Academic Press.

- Vialle A, Feau N, Frey P, Bernier L, Hamelin RC, 2013. Phylogenetic species recognition reveals host-specific lineages among poplar rust fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **66**, 628–644.
- Werner PA, Platt WJ, 1976. Ecological relationships of co-occurring goldenrods (Solidago: Compositae). *The American Naturalist* **110**, 959–971.
- de Wit PJGM, 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 391–418.
- Wu MC, Lee S, Cai T, Li Y, Boehnke M, Lin X, 2011. Rare-variant association testing for sequencing data with the sequence kernel association test. *The American Journal of Human Genetics* **89**, 82–93.
- Xhaard C, 2011. *Influence des processus démographiques sur la structure et les caractéristiques génétiques des champignons phytopathogènes : cas de l'agent de la rouille du peuplier Melampsora larici-populina.*
- Zhang X, Peng G, Kutcher HR, Balesdent M-H, Delourme R, Fernando WGD, 2016. Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem in western Canada. *European Journal of Plant Pathology* **145**, 659–674.

Potentiel évolutif et déterminisme génétique de caractères d'agressivité et morphologiques de l'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina*

Résumé : Pour lutter contre les agents phytopathogènes, la sélection de plantes résistantes est la stratégie la plus rentable et la plus écologique. Les résistances quantitatives, basées sur des mécanismes de résistances complexes, sont connues pour être sujettes à l'érosion, en cas d'évolution de l'agressivité des agents pathogènes. L'objectif de ce travail basé sur le pathosystème peuplier – rouille du peuplier (*Melampsora larici-populina*) est d'évaluer le potentiel évolutif des caractères d'agressivité et morphologiques du parasite par des approches de génétique quantitative et d'identifier les bases génétiques par génétique d'association. Pour estimer la plasticité, l'héritabilité et les compromis évolutifs d'un ensemble de caractères quantitatifs, nous avons précisément mesuré leurs variations dans quatre populations contrastées du champignon. Nous avons montré que le volume des spores est un caractère héritable qui évolue rapidement. La quantité de mycélium *in planta* est aussi héritable mais très conservée car sous sélection stabilisante dans les populations étudiées. Le temps de latence, la taille des lésions et le taux de sporulation présentent une héritabilité faible, ce qui explique l'absence d'évolution observées au cours du temps pour ces trois caractères. Les caractères liés à la fonction de sporulation semblent être les plus plastiques le long d'un gradient de maturité foliaire. Cependant, l'absence de mise en évidence de compromis évolutifs ne nous a pas permis d'identifier des caractères d'agressivité qui seraient les meilleures cibles pour les résistances quantitatives chez le peuplier. Si aucune base génétique de ces caractères quantitatifs n'a été mise en évidence, nous avons localisé un locus d'avirulence potentiel (Avr7) sur lequel une caractérisation fonctionnelle est envisagée.

Mots clés : Champignon phytopathogène, génétique quantitative, évolution, pouvoir pathogène, GWAS (étude d'association sur génome complet)

Evolutionary potential and genetic underpinnings of aggressiveness and morphological traits in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*

Abstract: To control plant pathogens, breeding resistant plants is the most cost-effective and ecological strategy. Quantitative resistances, which are based on complex plant mechanisms, are known to be exposed to erosion through an increase of pathogens aggressiveness. Through the study the poplar – poplar rust (*Melampsora larici-populina*) pathosystem, this work aims to estimate the evolutionary potential of aggressiveness and morphological traits using quantitative genetic approaches and to identify molecular bases through genome-wide association study. To estimate plasticity, heritability, and trade-offs for a set of quantitative traits, we precisely measured their variation in four contrasted pathogen populations. It appeared that spore volume is highly heritable and evolved rapidly. *In planta* mycelium quantity is also heritable but constant because of stabilizing selection occurring in the studied populations. Latent period, lesion size and sporulation rate exhibit low heritability, which explains the absence of evolution during the studied time period. Traits involved in the sporulating function seem to be the most plastic ones along a leaf maturity gradient. However, the lack of evidence of trade-offs did not allow us to identify aggressiveness traits that would be the best targets for the construction of durable resistance in poplar. No genetic underpinning has been found for quantitative traits, but we have identified a potential avirulence locus (Avr7), opening the way for its functional characterization.

Key words: fungal plant pathogen, quantitative genetics, evolution, pathogenicity, GWAS (genome-wide association study)