



**HAL**  
open science

# L'agressivité est-elle une composante significative de l'adaptation au paysage variétal cultivé, des populations de *Puccinia triticina*, agent de la rouille brune du blé?

Cécilia Fontyn

## ► To cite this version:

Cécilia Fontyn. L'agressivité est-elle une composante significative de l'adaptation au paysage variétal cultivé, des populations de *Puccinia triticina*, agent de la rouille brune du blé?. Phytopathologie et phytopharmacie. AgroParisTech, 2022. Français. NNT : 2022AGPT0012 . tel-04151499

**HAL Id: tel-04151499**

**<https://pastel.hal.science/tel-04151499v1>**

Submitted on 5 Jul 2023

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

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

# THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

**Docteur d'AgroParisTech**

**Spécialité : Sciences végétales**

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

**Cécilia FONTYN**

**L'agressivité est-elle une composante significative de l'adaptation au paysage variétal cultivé des populations de *Puccinia triticina*, agent de la rouille brune du blé ?**

Directeur de thèse : **Frédéric SUFFERT**  
Co-encadrante de thèse : **Henriette GOYEAU**  
Co-encadrant de thèse : **Thierry C MARCEL**

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 8 novembre 2022**

**Composition du jury :**

Jacqui SHYKOFF, Directrice de Recherche, CNRS (Université Paris-Saclay)	Présidente
Pascal FREY, Directeur de Recherche, INRAE (Université de Lorraine)	Rapporteur & Examineur
Didier THARREAU, Directeur de Recherche, CIRAD (Université de Montpellier)	Rapporteur & Examineur
Valérie CAFFIER, Chargée de Recherche, INRAE (centre Pays de la Loire)	Examinatrice
Benoit MOURY, Directeur de Recherche, INRAE (centre PACA)	Examineur
Frédéric SUFFERT, Ingénieur de Recherche (HDR), INRAE (Université Paris-Saclay)	Directeur de thèse
Henriette GOYEAU, Ingénieure de Recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)	Invitée
Thierry C MARCEL, Chargé de Recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)	Invité



## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je remercie mes encadrants de thèse. Merci Thierry C Marcel pour avoir pensé à moi pour ce sujet de thèse à la suite d'un entretien pour un autre sujet ; merci également pour ton encadrement et tes conseils tout au long de ces presque 4 années. Merci Henriette Goyeau, pour avoir partagé tes incroyables connaissances sur la rouille brune avec moi, pour ton écoute et tes conseils ; malgré ton départ à la retraite, tu as su rester présente pour l'encadrement de ma thèse, et notamment pour l'écriture du manuscrit, malgré le peu de temps libre en ta possession, parce qu'en effet, ce n'est pas une retraite conventionnelle ! Merci Frédéric Suffert, d'avoir suivi ma thèse depuis le début sans être officiellement l'un de mes encadrants ; et surtout merci d'avoir accepté de reprendre la direction de cette thèse. Je n'aurais pas pu penser à une autre personne pour reprendre ce rôle ; merci également pour ton implication et ta réactivité sans égale. Un grand merci à vous trois pour ce super encadrement de fin de thèse, et la bonne organisation et entente entre vous ; j'ai pu être sereine dans cette dernière ligne droite. Merci également à Ivan Sache, désormais directeur adjoint de l'école doctorale ABIES, pour avoir fait partie de l'équipe encadrante au démarrage de ce projet.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury, Pascal Frey, Didier Tharreau, Valérie Caffier, Benoit Moury et Jacqui Shykoff d'avoir accepté d'évaluer mon travail, et également les membres de mon comité de thèse, Philippe Du Cheyron, Julien Papaïx, Josselin Montarry, Fabien Halkett, pour nos discussions et tous vos conseils lors de nos réunions de comité.

Merci également à tous les Biogeroises et Biogerois pour ces presque 4 années parmi vous. Merci tout particulièrement à Anne-Lise, pour ton soutien, ta bonne humeur, ta gentillesse ; merci d'avoir toujours été là pour m'aider quand j'en avais besoin. Merci aussi à Corentin, pour ton aide précieuse lors de mes interminables expériences, et notamment pour toutes les pailles que je n'ai pas eu besoin de peser grâce à toi ! Je vous souhaite un bon courage à tous pour le déménagement.

Un énorme gigantesque merci à mes deux collègues du bureau du fun ! Camilla et Kevin ; merci pour tous les fous rires, les discussions, les concerts de Camilla et votre soutien. La fin de thèse fut difficile sans vous et le bureau bien trop calme !

Enfin, merci à ma famille d'avoir toujours cru en moi ; merci Papa et merci à mes frères Yoann et Joffrey, merci Bab, d'avoir partagé mes doutes et mes réussites au cours de cette thèse et pour votre soutien. Merci Richard, merci de m'avoir soutenue et supportée dans ma thèse et dans notre quotidien comme tu le fais déjà depuis 16 ans !



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<i>Avr</i>	Gène d'avirulence
APR	Résistance plante adulte
IE	Efficacité d'infection
LP	Période de latence
Lr	Leaf rust
PCA	Analyse en composantes principales
QTL	Quantitative trait loci
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	Capacité de sporulation
SSR	Simple sequence repeat



## SOMMAIRE

---

<b>Remerciements</b> .....	1
<b>Liste des abréviations</b> .....	3
<b>Sommaire</b> .....	5
<b>Chapitre 1 : introduction générale</b> .....	6
I. Contexte général .....	7
II. Capacité d'adaptation des champignons phytopathogènes .....	10
A. L'adaptation : concepts et généralités .....	10
B. Adaptation des champignons phytopathogènes à leur hôte.....	11
C. Les forces évolutives motrices de l'adaptation des champignons phytopathogènes.....	19
III. La rouille brune du blé .....	23
A. Généralités.....	23
B. Biologie .....	24
C. Interaction entre <i>Puccinia triticina</i> et <i>Triticum aestivum</i> .....	27
D. Évolution et suivi des populations.....	28
IV. Problématique et questions de thèse.....	29
<b>Chapitre 2: Is virulence phenotype evolution driven exclusively by Lr gene deployment in French Puccinia triticina populations?</b> .....	51
<b>Chapitre 3: Evolution within a given virulence phenotype (pathotype) is driven by changes in aggressiveness: a case study of French wheat leaf rust populations</b> .....	93
<b>Chapitre 4: Higher aggressiveness explains the domination of certain Puccinia triticina pathogenotypes in the cultivated landscape, despite advantages conferred to others by their virulences</b> .....	132
<b>Chapitre 5: Discussion et perspectives</b> .....	155
I. L'agressivité des agents pathogène, une force évolutive.....	156
A. Qu'est-ce que l'agressivité ? .....	156
B. Mesurer l'agressivité .....	157
C. Le rôle de l'agressivité dans l'évolution des populations d'agents pathogènes.....	159
II. Évolution de l'agressivité et érosion des résistances quantitatives.....	161
III. Agressivité et épidémiosurveillance .....	162
<b>Productions scientifiques</b> .....	167



## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

---

## I. CONTEXTE GENERAL

Les projections démographiques prévoient une augmentation de près de 2 milliards de personnes d'ici 2050 (Leridon, 2020). En 2021, l'ONU a révélé que la sous-alimentation dans le monde concernait plus de 800 millions de personnes, un chiffre qui a récemment progressé après une décennie de baisse (FAO, 2022). On estime que la production agricole devra augmenter de 60% d'ici 2050 pour satisfaire aux besoins de l'humanité (Fedoroff, 2015). Il est nécessaire de maintenir et d'augmenter la production agricole au niveau mondial afin de répondre aux enjeux actuels et futurs. Néanmoins, les perspectives d'un tel accroissement de la production de denrées agricoles, au-delà du défi biologique et technique qu'il représente, soulève plusieurs problèmes. En effet, la production agricole n'est pas seulement limitée par des contraintes d'espace, mais aussi par des contraintes abiotiques et biotiques, plus difficilement contrôlables, et spécifiques de chaque région et/ou système de production. Les contraintes abiotiques les plus importantes concernent la température et la disponibilité en eau, deux facteurs pouvant fortement impacter les niveaux de production agricole, aggravés par le réchauffement climatique, tout particulièrement dans les zones qui sont actuellement tempérées ou chaudes (Ainsworth & Ort, 2010; Casalegno, 2011). L'agriculture utilise 70% des ressources en eau au niveau mondial (Casalegno, 2011), mais depuis ces dernières années, les régions agricoles du monde entier ont été soumises à des contraintes hydriques importantes et croissantes, les événements de sécheresses sont de plus en plus fréquents, comme aux Etats-Unis, au Chili ou encore cette année en France. Cela impacte la production agricole, avec par exemple une baisse de rendement de 20% pour la culture de la pomme de terre en France en 2022. Ce type d'évènement de sécheresse diminue également les réserves en eau ("Agriculture," 2022; "Water and agriculture - OECD"). La crise climatique entraîne une élévation des températures ce qui peut entraîner une baisse de rendement et de qualité pour de nombreuses cultures, et notamment pour les céréales (Adams et al., 1998; Malhi et al., 2021). En effet, une température plus élevée peut réduire la période de remplissage des grains, ce qui entraîne la formation de grains plus petits et plus légers, engendrant ainsi une baisse de rendement (Adams et al., 1998). Par ailleurs, une augmentation de température entraîne une augmentation de la respiration des végétaux et ainsi l'évaporation, ce qui accroît leur besoin en eau. D'autre part, les maladies des plantes et les insectes ravageurs constituent une contrainte biotique majeure qui va également affecter le potentiel de production. Les pertes sur les grandes cultures provoquées par les maladies sont estimées à 17,2% pour la pomme de terre, 21,4% pour le soja, 21,5% pour le blé ou encore 30,3% pour le riz (Savary et al., 2019). Les plantes sont la cible d'une multitude d'agents pathogènes, incluant des champignons, bactéries, oomycètes et virus, chacun de ces organismes ayant des caractéristiques spécifiques. Les champignons sont les agents pathogènes qui causent le plus de pertes en agriculture, et représentent ainsi un défi majeur pour la sécurité alimentaire mondiale (Steinberg & Gurr, 2020).

Les plantes et leurs agents pathogènes sont engagés dans une course évolutive permanente. D'un côté les agents pathogènes évoluent pour contourner les mécanismes de défense des plantes et de l'autre côté les plantes répondent par une protection renforcée pour prévenir ou atténuer les dommages causés par l'attaque des agents pathogènes (Zhan et al., 2014). Les plantes ont d'abord été sélectionnées pour leur potentiel de développement dans des conditions locales et leur capacité à être transformées en denrées alimentaires, et progressivement pour un rendement de plus en plus important. Suite à la révolution verte du milieu du vingtième siècle, l'intensification de la production agricole a renforcé la pression exercée par les agents pathogènes, et notamment les champignons. L'augmentation de la production agricole s'est accompagnée d'une homogénéisation des pratiques, la réduction de la diversité des cultures incluant la généralisation des couverts monovariétaux, et l'utilisation de fongicides. Cela a favorisé l'émergence de nouvelles souches fongiques résistantes aux fongicides, capables de contourner la résistance de l'hôte et de se propager sur des surfaces cultivées très vastes (Fisher et al., 2012). Pour répondre à ce défi, l'effort de sélection s'est orienté vers le développement de variétés résistantes aux maladies et agents pathogènes (Rosenthal & Dirzo, 1997; Lindig-Cisneros et al., 2002).

Plusieurs méthodes de protection des cultures contre les agents pathogènes existent, les plus utilisées étant la lutte agronomique via les pratiques agricoles, la protection phytosanitaire et la lutte génétique. Les moyens de lutte agronomique mettent en œuvre diverses pratiques : réduction de la densité de peuplement (Calonnec et al., 2013), recours à une date de semis précoce (Andrabi et al., 2011), gestion des résidus de culture (Bailey & Lazarovits, 2003), amélioration de la qualité du sol (Sturz & Christie, 2003; Ghorbani et al., 2010), mais également rotation des cultures et utilisation des mélanges variétaux. Ces deux dernières pratiques permettent de diversifier les cultures à différentes échelles spatiotemporelles. La rotation consiste à alterner dans le temps sur une même parcelle différentes espèces, ce qui limite la survie et la propagation des agents pathogènes, souvent spécifiques d'une espèce (Yates, 1954). L'efficacité de cette méthode est toutefois limitée par les capacités de conservation et/ou de dispersion spatiale des agents pathogènes ; elle est d'autant plus efficace contre des agents pathogènes incapables de se disperser dans l'air (Curl, 1963; Bullock, 1992). L'utilisation d'associations variétales est également une méthode efficace pour limiter le développement de certaines épidémies. Des variétés présentant une diversité de sensibilité à un agent pathogène, et/ou des résistances complémentaires, sont cultivées en mélange dans une même parcelle. Cela a pour effet de limiter la propagation de l'agent pathogène, via un effet de dilution qui diminue la production d'inoculum à l'échelle du couvert (Mundt, 2002; Vidal et al., 2017; Orellana-Torrejon et al., 2022). Néanmoins, ces moyens de lutte ne permettent pas un contrôle total des maladies et sont très souvent associés à la protection phytosanitaire.

La protection phytosanitaire cible les agents pathogènes mais aussi les ravageurs (dont les insectes) et les adventices. Pour les champignons phytopathogènes, le recours à l'utilisation des fongicides est pratiqué depuis plus d'un siècle (Russell,

2005). Des normes plus strictes entourant l'utilisation de certaines molécules, et notamment des fongicides, sont apparues ces dernières années, ce qui a entraîné l'interdiction de certains produits. En effet, les politiques ont traduit une volonté de réduire l'utilisation de ces produits phytosanitaires par la mise en place des plans EcoPhyto 2008 et 2018, qui visent à réduire de 50% l'utilisation des produits phytosanitaire en 10 ans (Butault et al., 2010). L'utilisation des produits phytosanitaires présente plusieurs inconvénients. Ils peuvent avoir un effet délétère sur les espèces non ciblées (Eijsackers et al., 2005; Marinho et al., 2020; Noel et al., 2022). Par exemple de nombreuses études ont montré l'effet négatif de l'utilisation des fongicides sur les abeilles, pouvant entraîner un changement de comportement (Artz & Pitts-Singer, 2015), une réduction de l'espérance de vie (Fisher et al., 2017), ou encore des changements au niveau de leur système immunitaire les rendant plus sensibles aux agents pathogènes (Degrandi-Hoffman et al., 2015; Cizelj et al., 2016). De plus, l'utilisation régulière de ces fongicides combinée à la forte capacité d'adaptation des agents pathogènes a entraîné le développement de résistances parmi les organismes ciblés. Cela peut poser un réel problème pour la lutte contre certains agents pathogènes qui sont capables de s'adapter très rapidement (Lucas et al., 2015; Garnault et al., 2019; Massi et al., 2021). Par exemple, *Botrytis cinerea*, l'agent pathogène de la pourriture grise, a développé des populations résistantes face à l'utilisation intensive des fongicides, avec l'apparition de souches multirésistantes dans plusieurs pays (Hahn, 2014). Ces cas de résistance associés à l'utilisation des fongicides renforcent la nécessité de trouver des stratégies alternatives à leur utilisation.

L'utilisation des résistances variétales comme moyen de lutte contre les agents pathogènes est une méthode efficace et plus respectueuse de l'environnement. En effet elle permet de réduire, voire même d'éliminer le recours à l'utilisation de quantités importantes de produits phytosanitaires (Sharma & Ortiz, 2002; Dedieu et al., 2015). Cette méthode qualifiée de « lutte génétique », utilisée depuis plusieurs décennies (Crute & Pink, 1996), se base sur l'introgression de gènes de résistance contre les agents pathogènes dans les variétés. Cependant, cette méthode de lutte, bien qu'étant efficace, n'est pas toujours durable. En effet, certains agents pathogènes possèdent un fort potentiel évolutif (McDonald & Linde, 2002b), et la forte pression de sélection engendrée par l'utilisation de gènes de résistance identiques dans les variétés les plus cultivées peut entraîner un contournement plus ou moins rapide de la résistance et donc une perte d'efficacité de cette résistance. Ce contournement a d'autant plus de risque de se produire si le gène de résistance est déployé à grande échelle (Parlevliet, 2002).

Les populations d'agents pathogènes sont en constante évolution. Cela se traduit notamment par l'émergence de nouveaux individus qui ont contourné les gènes de résistance déployés (Gandon & Michalakis, 2000; Sacristán & García-Arenal, 2008; Goyeau et al., 2012). C'est pourquoi il est important d'étudier ces populations d'agents pathogènes en réalisant un suivi régulier de l'apparition d'individus capables de contourner une ou plusieurs résistances, que l'on nomme « epidémiosurveillance ».

L'objectif est notamment de détecter l'apparition de nouvelles races et de comprendre les déterminants de leur évolution afin de pouvoir mettre en place des stratégies de lutte plus efficaces et durables (Goyeau et al., 2006; Hovmøller et al., 2016; Dorrance et al., 2016; Liu et al., 2017; Zhang et al., 2019).

## II. CAPACITE D'ADAPTATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES

### A. L'ADAPTATION : CONCEPTS ET GENERALITES

On dit d'une espèce qu'elle est adaptée lorsque celle-ci est capable d'effectuer son cycle de vie dans un environnement donné (Bock, 1980).

L'environnement dans lequel les populations d'agents pathogènes évoluent, notamment constitué par le paysage de plantes hôtes cultivées, est en constante transformation, et les agents pathogènes s'y adaptent continuellement (McDonald & Linde, 2002b). A mesure que la composition génétique du paysage d'hôte évolue, les populations d'agents pathogènes évoluent. On parle de coevolution entre l'hôte et l'agent pathogène (Janzen, 1980). Le concept d'« adaptation locale » peut permettre de mesurer ce phénomène de coevolution. Une situation d'adaptation locale existe lorsque deux conditions sont remplies : premièrement, la *fitness* moyenne d'une population est plus élevée dans son habitat d'origine (sympatrique) que dans d'autres habitats (allopatrique), « meilleur chez soi » (*home-vs-away*); deuxièmement, la *fitness* moyenne d'une population dans son habitat d'origine doit être en moyenne plus élevée que la *fitness* moyenne de populations issues d'autres habitats, « meilleur que les autres » (*local-vs-foreign*) (Gandon et al, 1998 ; Mopper et Strauss, 1998). Ce phénomène d'adaptation locale de ravageurs des plantes a été démontré pour la première fois chez des insectes herbivores qui performant mieux sur leur hôte sympatrique que sur des hôtes allopatriques (Edmunds et Alstad, 1978). L'émergence de l'adaptation locale dans un système hôte-parasite peut être favorisée par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques, un environnement plus ou moins hétérogène à l'origine de variations de ces facteurs dans l'espace et le temps, et l'expression de différentes forces évolutives comme un flux de gènes restreint ainsi qu'une forte pression de sélection (Gandon et Zandt, 1998). Les champignons phytopathogènes sont de bons candidats pour étudier l'expression de patrons d'adaptations locales. En effet, ceux-ci possèdent en général un temps de génération court, ce qui leur procure un avantage sur leur hôte étant donné qu'ils peuvent évoluer plus rapidement. En pratique, cela leur permet de contourner les nouvelles stratégies de résistance de leur hôte. Les espèces ont la nécessité d'évoluer continuellement pour maintenir un avantage face aux espèces avec lesquelles elles coévoluent (théorie de la reine rouge; Van Valen, 1973). Les agents pathogènes biotrophes obligatoires sont soumis à une sélection permanente pour infecter davantage d'hôtes, et par conséquent les génotypes des agents pathogènes capables d'infecter les génotypes hôtes les plus courants bénéficient généralement d'un avantage sélectif (Clay & Kover, 1996;

Persoons et al., 2017).

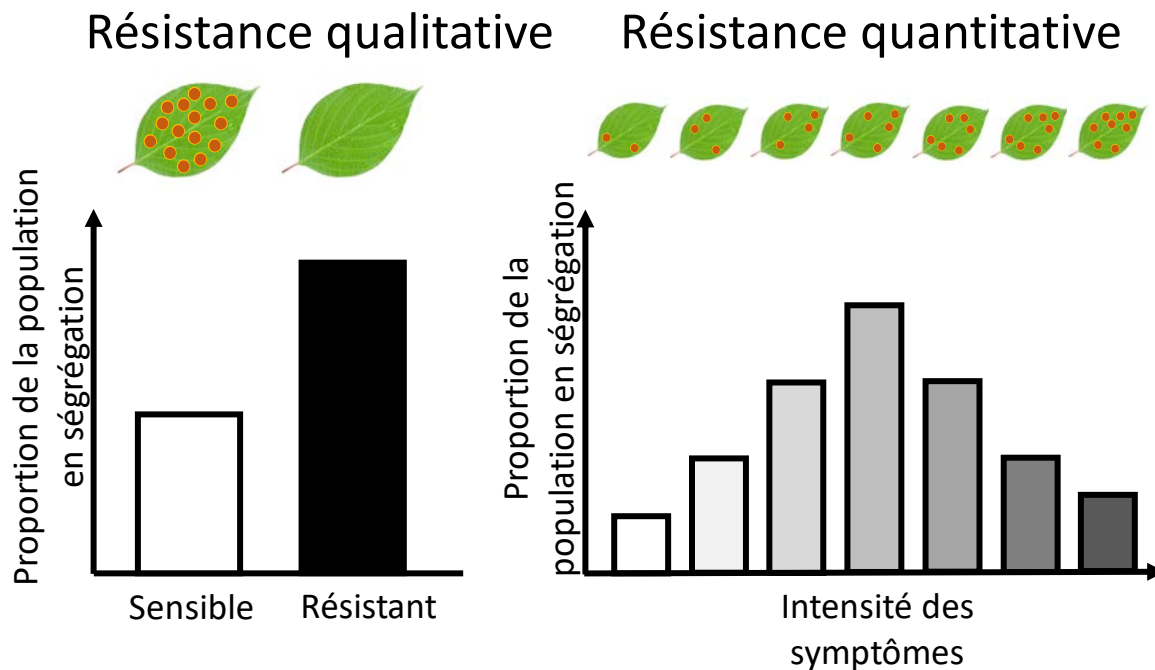
## **B. ADAPTATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES A LEUR HOTE**

### **1. Résistance des plantes**

La résistance d'une plante hôte est sa capacité à limiter voire empêcher totalement la colonisation de ses tissus par un parasite, dans le cas présent un champignon phytopathogène. Cette capacité à « résister », spécifique de chaque individu et donc d'un peuplement végétal, influence le développement d'une maladie (quantité de symptômes) mais aussi la composition de la population pathogène (McDonald & Linde, 2002b). Il existe deux grands types de résistance chez les plantes hôtes, la résistance spécifique (dite résistance qualitative) et la résistance partielle (dite résistance quantitative) (Miedaner, 2016; Kushalappa et al., 2016). La résistance spécifique se base sur la reconnaissance entre le produit d'un gène d'avirulence de l'agent pathogène et un gène de résistance spécifique de la plante (Jones & Takemoto, 2004). Contrairement à la résistance spécifique, la résistance partielle est une forme de défense ayant un effet incomplet, donc quantitatif, contre l'agent pathogène. Elle agit sur les composantes de la résistance, se traduisant par exemple par une réduction de la sévérité des symptômes ou un allongement de la période de latence de l'agent pathogène, ralentissant ainsi le développement de la maladie, malgré une interaction compatible (Niks et al., 2015).

La résistance qualitative est très majoritairement utilisée dans les programmes de sélection pour faire face aux maladies fongiques (Brown et al., 2015; Nelson et al., 2018). Ce type de résistance confère une protection complète à la plante, avec une réponse immunitaire de type « tout ou rien » : la plante est soit complètement résistante soit complètement sensible selon qu'elle est confrontée à un individu pathogène avirulent ou virulent, respectivement (Figure 1). La résistance qualitative est basée sur le concept d'interaction gène-pour-gène (Flor, 1971). Il s'agit d'une interaction spécifique entre un gène d'avirulence (*Avr*) côté agent pathogène, et un gène de résistance (*R*) correspondant chez la plante (Dangl & Jones, 2001). Les produits des gènes *Avr* sont appelés effecteurs ou facteurs de virulence (Keen, 1992; Staskawicz et al., 1995). Il existe cinq classes de protéines produites par les gènes *R*, dont la plus grande est la classe des protéines NB-LRR qui contiennent un site de fixation nucléotidique ainsi qu'un motif de répétition riche en leucine (Mcdowell & Simon, 2006; Jones & Dangl, 2006). L'effecteur peut être reconnu de façon directe ou indirecte. Cette reconnaissance directe passe par liaison avec la protéine NB-LRR, c'est ce qu'on appelle le modèle ligand-récepteur (Biezen & Jones, 1998). La reconnaissance indirecte de l'effecteur est également possible, pour cela il existe plusieurs modèles. Le modèle de garde correspond à la modification d'une cible végétale par l'effecteur, c'est cette cible végétale qui sera détectée par la protéine de résistance plutôt que l'effecteur lui-même (Jones & Dangl, 2006). Deux autres modèles de reconnaissance indirecte ont été mis en évidence, le modèle du leurre et le modèle

du leurre intégré. Dans ces modèles la cible de l'effecteur est un leurre, et son interaction avec celui-ci est détecté par la protéine de résistance (Dangl & Jones, 2001; Cesari et al., 2014). Cette reconnaissance de l'effecteur par la protéine de résistance entraîne le déclenchement d'une réaction immunitaire de la plante appelée ETI ("effector-triggered immunity") qui conduit à une suite de réponses cellulaires rapides entraînant une réaction d'hypersensibilité de la plante, provoquant la mort des cellules proches du site d'infection. La plante est alors dite résistante.



**Figure 1.** Comparaison de la résistance qualitative et quantitative. Figure adaptée de Nelson et al., 2018.

Contrairement à la résistance qualitative, qui est le résultat d'une interaction gène majeur-pour-gène majeur entraînant une résistance totale, la résistance quantitative est une résistance partielle reposant sur plusieurs loci appelés QTL pour Quantitative Trait Loci (Niks et al., 2015). Il s'agit d'une résistance incomplète qui entraîne une réduction de l'intensité des symptômes sans toutefois bloquer complètement l'infection. Les phénotypes d'hôtes infectés suivent en général une distribution continue, qui ne suivent pas les ratios d'une ségrégation Mendélienne (Figure 1) (St.Clair, 2010). Le déterminisme de la résistance quantitative est polygénique, reposant sur des gènes dont les effets individuels sont faibles ou modérés, qui interagissent avec l'environnement et entre eux, et influencent l'expression de différents traits. Cependant, certains gènes considérés comme majeurs et ayant une ségrégation Mendélienne, peuvent entraîner un phénotype de type quantitatif (Niks et al., 2015). Les interactions impliquées dans la résistance quantitative sont souvent dites non-spécifiques, cependant, des cas de spécificité de l'isolat ont été montrés (González et al., 2012). Ainsi, la résistance quantitative peut être basée sur des interactions spécifiques gène mineur-pour-gène mineur (Parlevliet, 1978; Marcel et al.,

2008; St.Clair, 2010). Les mécanismes moléculaires responsables de la résistance quantitative restent peu connus, mais plusieurs gènes impliqués dans la résistance quantitative ont été clonés ces dernières années (Niks et al., 2015; French et al., 2016). Ces gènes peuvent coder pour un transporteur ABC, un récepteur kinase membranaire, ou encore une protéine NB-LRR comme pour les gènes *R* de la résistance qualitative (Krattinger et al., 2009; Fukuoka et al., 2014; Hurni et al., 2015; Moore et al., 2015).

L'utilisation de la résistance qualitative par introduction de gènes *R* majeurs dans les variétés cultivées est la pratique la plus courante. Plusieurs de ces gènes peuvent être combinés dans une même variété par « pyramidage ». On considère que la probabilité pour qu'un agent pathogène contourne la résistance d'une variété portant plusieurs gènes de résistance est réduite par rapport à l'utilisation d'une seule résistance (Fuchs, 2017; Pilet-Nayel et al., 2017), mais la pratique a montré qu'une telle stratégie n'empêche pas l'apparition de souches multivirulentes (Brown et al., 1997). D'autres stratégies de déploiement spatial et/ou temporel des gènes de résistance existent.

L'utilisation de mélanges variétaux portant différents gènes de résistance ou QTL est une solution pour lutter contre les agents pathogènes de manière plus durable en diminuant la pression de sélection (Mundt, 2002; Sapoukhina et al., 2013; Orellana-Torrejon et al., 2022). La diversification temporelle de l'utilisation des gènes de résistances est aussi une stratégie de déploiement de ces gènes de résistance (Caffier & Vallavieille-Pope, 1996), les gènes de résistance majeurs contournés pouvant ainsi être recyclés dans le temps. Le croisement entre des variétés possédant un gène majeur contourné de résistance à la rouille brune, et une variété possédant un gène mineur, a contribué à l'expression d'une résistance résiduelle, résultant d'une interaction entre le gène majeur contourné et le gène mineur/QTL (Singh et al., 2022). Les gènes de résistance majeurs contournés peuvent également être modifiés par génie génétique, grâce aux différentes techniques d'édition du génome, afin de les rendre de nouveau efficaces (Mushtaq et al., 2019).

## 2. Virulence et agressivité des agents pathogènes

La virulence d'un agent phytopathogène est définie comme sa capacité à infecter et coloniser un hôte sensible. Il s'agit donc d'un caractère qualitatif (Welz, 1988; Sacristán & García-Arenal, 2008; Figueroa et al., 2020; Duplessis et al., 2021). La virulence repose sur l'ensemble des facteurs de virulence ou effecteurs. Ces effecteurs sont des protéines ou métabolites sécrétés qui manipulent la structure et/ou la fonction de la cellule hôte à l'avantage de l'agent pathogène, afin de permettre l'infection (Sperschneider et al., 2015).

L'agressivité est définie comme la capacité d'un agent pathogène à causer des dommages quantitatifs chez un hôte sensible dans un environnement donné (Van der Plank, 1968; Milus et al., 2006; Pariaud et al., 2009a; Suffert et al., 2018; Malbrán et al., 2018). L'agressivité est déterminée par différentes composantes caractéristiques



du cycle de vie de l'agent pathogène, telles que l'efficacité d'infection, la période de latence, la capacité de sporulation ou encore la taille des lésions (Pariaud et al., 2009a; Lannou, 2012; Azzimonti et al., 2013). Ces différentes composantes de l'agressivité peuvent être mesurées en évaluant les traits quantitatifs correspondants, exprimés au cours de l'interaction hôte-pathogène.

L'efficacité d'infection correspond à la probabilité qu'une spore, lorsqu'elle est déposée sur les tissus d'un hôte compatible, produise une lésion (Sache, 1997). Elle fait partie des principales composantes qui affectent le taux de reproduction de l'agent pathogène, et ainsi la sévérité de l'épidémie (Parlevliet, 1979). L'efficacité d'infection est complexe à estimer en raison de difficultés techniques. En effet, il est nécessaire d'être précis sur le processus de dépôt des spores, et donc sur l'inoculation, si on veut connaître la quantité exacte de spores déposées sur la plante. De plus, il est aussi important que la distribution spatiale des spores soit homogène sur la plante car la densité de spores peut avoir un effet et donc biaiser la mesure de l'efficacité d'infection (Lehman & Shaner, 1997). Plusieurs méthodes d'inoculation sont utilisées pour évaluer cette composante, les plus courantes étant : inoculation dans une suspension aqueuse de spores (Bruns et al., 2012; Ghatak et al., 2013; Karisto et al., 2019), inoculation par dépôt des spores à l'aide d'un pinceau (Pariaud, et al., 2009b; Azzimonti et al., 2013), ou inoculation d'un mélange sec, avec du talc par exemple, déposé par gravité à l'aide d'une tour d'inoculation (de Vallavieille-Pope et al., 1995; Calonnec et al., 1996). Toutefois ces méthodes d'inoculation génèrent un dépôt de spores hétérogène dans les zones où la densité de symptômes (nombre de lésions sur une surface de feuille donnée) est estimée (Azzimonti et al., 2013). Les mesures précises de l'efficacité d'infection sont rares (Denissen, 1993) car ce trait quantitatif est très souvent écarté de par son manque de précision (Pariaud et al., 2009b).

La période de latence correspond au temps écoulé entre deux générations successives d'un agent pathogène, c'est-à-dire entre le début du processus d'infection par une propagule infectieuse et le début de la production de nouvelles propagules infectieuses issues de cette infection (Parlevliet, 1979 ; Madden et al., 2007 ; (Shearer & Zadoks, 1972; Lannou, 2012). D'un point de vue opérationnel, cette définition peut poser problème lorsque l'on veut estimer une période de latence expérimentalement, si cet intervalle de temps n'est pas exactement le même pour toutes les lésions. Pour pallier ce problème, Shaner (1980) a mis au point une méthode basée sur une approche statistique portant sur une « population » de lésions. La dynamique d'émergence des lésions est ajustée à une courbe sigmoïde, la période de latence étant définie comme l'intervalle de temps entre l'inoculation et l'apparition de 50% des lésions sporulantes (Parlevliet, 1975; Pfender, 2001; Pariaud et al., 2012). La période de latence est fortement dépendante de la température, c'est pourquoi il est recommandé de l'exprimer en temps thermique afin de permettre la comparaison entre les essais en faisant abstraction de l'effet de la température (Xu, 1999; Lovell et al., 2004; Suffert et Thompson, 2018). En pathologie végétale, la période de latence est un des traits d'agressivité les plus couramment mesurés et étudiés. En effet, ce trait

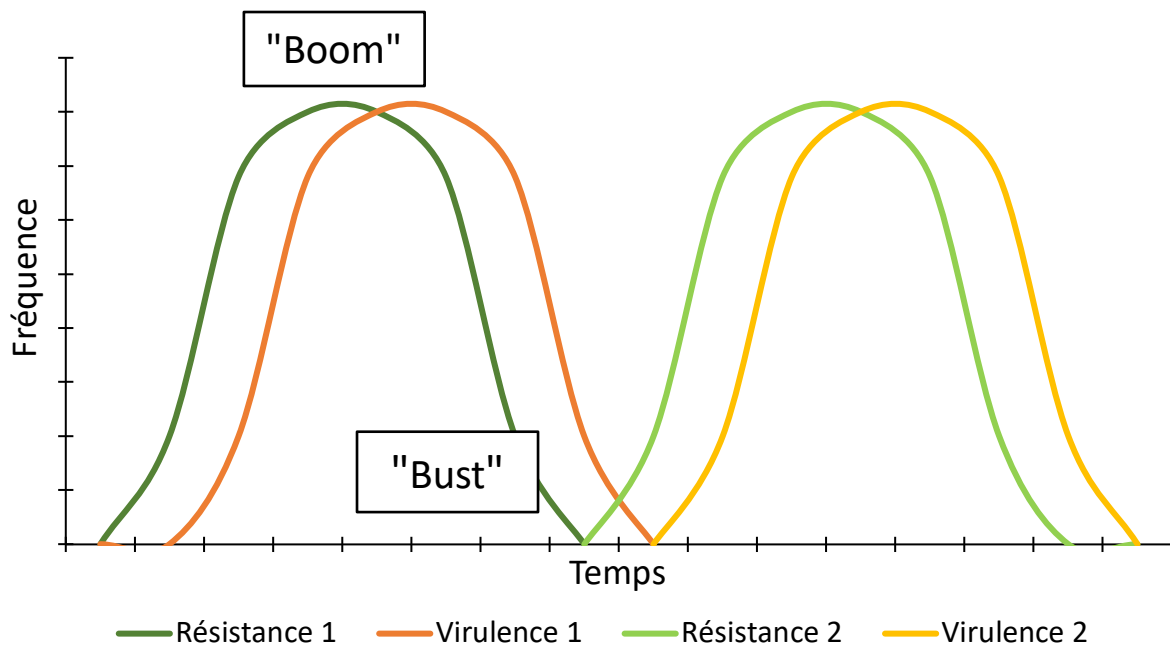
peut être très variable entre espèces mais aussi entre individus appartenant à une même espèce et il a un fort impact sur la dynamique d'une épidémie étant donné qu'il conditionne le nombre de cycles qu'est capable de réaliser un agent pathogène au cours d'une saison (Pringle & Taylor, 2002; Milus et al., 2006; Lannou, 2012).

La capacité de sporulation est définie comme la quantité de spores produites par unité sporulante et par unité de temps (Sache, 1997; Pariaud et al., 2009a; Bruns et al., 2012). Ce trait d'agressivité est dépendant de la densité et de l'âge des lésions (Sache, 1997; Robert et al., 2002), variables qu'il est donc nécessaire de prendre en compte lorsque l'on cherche à l'estimer (Lannou & Soubeyrand, 2017). La capacité de sporulation peut être mesurée directement, en collectant des spores puis en effectuant un comptage après leur mise en suspension dans un liquide à l'aide d'un compteur à particule (Delmotte et al., 2014), ou indirectement en les pesant à sec (Imhoff, 1982; Robert et al., 2004). La sporulation est un processus continu, ce qui signifie que la capacité de sporulation dépend du temps écoulé entre le début du processus de sporulation et la collecte des spores. Ce trait d'agressivité, comme plusieurs autres d'ailleurs, n'est donc pas indépendant de la période de latence. Pour réduire la corrélation entre les traits, la capacité de sporulation doit être mesurée à partir d'un point de temps normalisé entre isolats.

Contrairement au grand nombre d'études portant sur la résistance de l'hôte, celles sur les bases génétiques de l'agressivité des agents pathogènes sont très limitées. Il est nécessaire de combler ce manque de connaissances sur les déterminants génétiques et environnementaux de l'agressivité afin d'émettre des hypothèses sur les mécanismes d'adaptation des agents pathogènes à la résistance quantitative de l'hôte.

### 3. Efficacité et durabilité des résistances

Dans les interactions gène-pour-gène, la coévolution entre l'hôte et l'agent pathogène entraîne une adaptation réciproque constante, de l'hôte pour activer ses défenses immunitaires lors d'une tentative d'infection, et de l'agent pathogène pour contourner ces défenses et permettre l'infection. Cette adaptation se traduit donc par le contournement des gènes de résistance majeurs. Ce phénomène peut s'illustrer par le cycle « *boom-and-bust* » qui caractérise les dynamiques populationnelles chez les rouilles des céréales et le mildiou dans le cas d'une interaction gène-pour-gène avec l'hôte. Ce cycle se traduit par le déploiement d'un nouveau gène de résistance à une large échelle (*boom*) suivi de l'adaptation de la population pathogène à ce nouveau gène de résistance suite à l'apparition de la virulence correspondante. L'augmentation de la fréquence de cette virulence dans la population jusqu'à sa généralisation à l'échelle d'un vaste territoire, marque alors le contournement du gène de résistance (*bust*). Ces cycles se succèdent au rythme de l'introduction de nouvelles résistances dans les variétés (Figure 2).



**Figure 2.** "Boom-and-bust" cycles

La durée d'un cycle peut être plus ou moins longue. *Rpv3*, un gène de résistance majeure introduit dans la variété Bianca de l'espèce *Vitis vinifera*, qui protège celle-ci contre le mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola*, peut être pris en exemple. En 2005, après 4 ans d'efficacité, ce gène a été contourné par un isolat alors qu'il n'était pas déployé à grande échelle (Peressotti et al., 2010). *Rlm1*, un gène de résistance majeur contre le phoma du colza, causé par *Leptosphaeria maculans*, a été contourné 9 ans après son introduction dans le paysage, mais 4 ans après que ce gène ait été présent à une fréquence d'au moins 20% dans le paysage (Rouxel et al., 2003; Balesdent et al., 2015). Ce phénomène est aussi courant chez *Zymoseptoria tritici*, responsable de la septoriose du blé. Le gène *Stb4* a été introduit dans la variété Gene en 1992, largement déployée aux Etats-Unis à partir de 1994 et 1995. L'apparition d'individus virulents vis-à-vis de *Stb4* est survenu dès 1995, générant un contournement très rapide de ce gène de résistance (Cowger et al., 2000). Ces exemples montrent la rapidité d'adaptation des agents pathogènes aux résistances majeures, dont la durabilité est généralement limitée (McDonald & Linde, 2002a; Pink, 2002). La durabilité de ce type de résistances peut toutefois être plus élevée, avec un phénomène de « boom-and-bust » s'échelonnant sur plusieurs années et étant de plus faible intensité. Cela s'explique par le mode de reproduction principal de l'agent pathogène (Kema et al., 2018; Phan et al., 2020) : la dynamique de contournement peut être ralentie par le maintien de l'avirulence dans la population de l'agent pathogène, notamment s'il existe une reproduction sexuée entre isolats virulents et avirulents (Kema et al., 2018). Cette dynamique est qualifiée d'« érosion » de la résistance. Le phénomène de « boom-and-bust » est plus propre aux agents pathogènes ayant une reproduction clonale, qui favorise la généralisation rapide et à grande échelle de la virulence.

Les agents pathogènes ont donc la capacité de s'adapter rapidement aux résistances qualitatives. Néanmoins, cette adaptation peut présenter un « coût » pour l'agent pathogène, expression d'un compromis entre sa capacité d'infection et sa « fitness », c'est-à-dire entre sa capacité à infecter (virulence) et sa capacité à se développer dans les tissus et à se reproduire (agressivité) (Brown, 2003). Par exemple, il a déjà été montré chez *L. maculans* que la souche virulente avrLm4 produisait des lésions plus petites et en moins grand nombre que la souche avirulente AvrLm4, sur une variété de colza exempte du gène de résistance *RLm4* (Huang et al., 2006). Ce coût a également été mis en évidence chez *Phytophthora infestans* pour des isolats virulents sur le gène de résistance *R10*, avec une production de spores plus faible lorsqu'ils sont testés sur une variété ne portant aucun gène de résistance (Montarry et al., 2010). Toutefois, en pratique, la baisse de fitness est difficile à mettre en évidence expérimentalement (Burdon et Thrall, 2003; Laine et Barrès, 2013). En effet, la plupart des expériences qui ont tenté d'estimer les coûts à la virulence en comparant des génotypes avec et sans gènes de résistance se sont heurtées à des problèmes du fond génétique et d'effets environnementaux (Bergelson, 1994; Clay & Kover, 1996).

Une résistance est dite durable si elle reste efficace pendant une longue période alors qu'elle est déployée sur une surface significative dans un environnement favorable au développement de la maladie (Johnson, 1984). Les résistances quantitatives sont supposées plus durables que les résistances qualitatives, et cela pour plusieurs raisons. Cela peut être dû à la différence dans le déterminisme génétique, généralement monogénique pour la résistance qualitative et polygénique pour la résistance quantitative. La probabilité pour un agent pathogène de contourner plusieurs QTL simultanément est plus faible que de contourner un seul facteur de résistance. La pression de sélection exercée par la résistance quantitative, qui permet une transmission de l'agent pathogène avec la présence de symptômes, est en outre moins élevée comparé à la résistance qualitative, qui repose sur le principe du tout ou rien (St.Clair, 2010; Mundt, 2014; Pilet-Nayel et al., 2017; Cowger & Brown, 2019). Néanmoins des cas d'adaptation aux résistances quantitatives ont été observés dans de nombreux pathosystèmes, démontrant que toute variété résistante peut *in fine* être contournée et que la durabilité de cette résistance n'est qu'une fonction de temps. Au champ, l'érosion de la résistance quantitative d'une variété s'accompagne d'une augmentation du niveau d'agressivité d'une population naturelle de l'agent pathogène (Cowger & Brown, 2019). Une étude portant sur *P. viticola* a mis en évidence l'impact d'une résistance quantitative déployée en vignoble sur l'évolution de l'agressivité de souches récoltées sur différents cultivars de vigne, sensibles et partiellement résistants : les isolats récoltés sur les cultivars les moins sensibles présentaient une agressivité plus élevée (période de latence plus courte et sporulation plus élevée ; Delmas et al., 2016). Des isolats de *Venturia inaequalis* récoltés sur des variétés de pommier partiellement résistants ont exprimé une agressivité plus élevée (sporulation et densité de lésion plus élevée) que des isolats récoltés sur des variétés sensibles (Caffier et al., 2016). Ces deux exemples illustrent le fait que des variétés partiellement résistantes peuvent entraîner la sélection d'isolats plus agressifs, et que les agents

pathogènes sont donc aussi capables de s'adapter à ce type de résistance. De telles adaptations peuvent également être mises en évidence par des approches d'évolution expérimentale au cours desquelles des ré-inoculations en série peuvent montrer qu'une population d'agent pathogène est capable d'évoluer vers une agressivité moyenne plus élevée (Cowger & Brown, 2019). Chez *Fusarium oxysporum*, par exemple, 50 souches virulentes ont été réinoculées 10 fois sur la plante hôte de coton et sur milieu agar. Une seule souche a réussi à survivre aux 10 séries sur le coton, les autres ayant perdu leur virulence au cours de l'expérimentation. Des mutants identifiés après le passage en série sur le coton ou sur le milieu agar, ainsi que la souche d'origine, ont été inoculés sur 15 plantes d'une même variété. Une augmentation significative du nombre de plantes malades a été mise en évidence pour les mutants générés sur coton et non pour les mutants générés sur milieu agar, suggérant que le passage sur l'hôte a induit ce gain d'agressivité (Wang et al., 2008). Une autre expérience d'évolution expérimentale a été menée sur le virus de la pomme de terre Y (PVY) et deux variétés de poivron, respectivement quantitativement résistante et sensible : 3 populations ont été obtenues après 8 cycles de ré-inoculations, une population issue de la variété sensible 'Y', une population issue de la variété résistante 'H' et une population issue d'un mélange des deux 'YH'. Chacune de ces populations ainsi que la souche ancestrale, ont été inoculées sur les deux variétés de poivrons, puis leur concentration a été mesurée. Sur la variété quantitativement résistante, la population 'H', issue de cette variété, était plus performante, comparée aux populations 'Y', 'YH' et ancestrale. En revanche, sur la variété sensible, les populations 'Y', 'YH' et ancestrale sont en concentration similaire, et performent mieux que la population 'H', qui présentait une concentration 30 fois supérieure sur la variété résistante. Ce cas montre une adaptation à la résistance quantitative, mais également la possibilité d'une dégradation complète, plutôt que d'une érosion, de cette résistance (Montarry et al., 2012).

#### 4. Epidémiosurveillance des populations d'agent pathogène

Le suivi des populations d'agents pathogènes, au travers de l'épidémiosurveillance, est essentiel afin de détecter l'émergence d'isolats adaptés aux résistances variétales et de pouvoir mettre en place des stratégies de lutte les plus efficaces possible. De tels suivis sont réalisés en Chine mais aussi en France depuis 1981, pour la surveillance de *Puccinia striiformis*, l'agent pathogène de la rouille jaune des céréales (Wellings & McIntosh, 1990; Chen et al., 2009; de Vallavieille-Pope et al., 2011). Ils sont également réalisés dans plusieurs pays d'Europe pour *Puccinia triticina*, l'agent pathogène de la rouille brune du blé (Mesterházy et al., 2000; Park et al., 2001; Goyeau et al., 2006; Kolmer, 2019), et pour l'oïdium de l'orge (Hovmøller et al., 2000). Ces suivis peuvent également être réalisés au niveau mondial, comme c'est le cas depuis plusieurs décennies pour *P. infestans*, l'agent du mildiou de la pomme de terre (Andrison, 1994). Ces suivis consistent à collecter des tissus infectés sur les variétés cultivées à une échelle spatiale définie, à isoler des souches de l'agent pathogène, et à caractériser le comportement de ces souches vis-à-vis des gènes de résistance

connus. La caractérisation du « pathotype » consiste à déterminer le spectre de virulence des souches, c'est-à-dire la combinaison des virulences de chacune d'elle vis-à-vis des gènes de résistance connus, et à en analyser la fréquence. Pour réaliser ce pathotypage, les souches sont généralement inoculées individuellement sur une « gamme différentielle », qui consiste en un ensemble de lignées et/ou variétés portant les différents gènes de résistance (généralement un seul gène de résistance par lignée).

Idéalement, la caractérisation du pathotype des souches collectées est complétée par leur génotypage à l'aide de marqueurs moléculaires, tels que les marqueurs SSR (SSR, Single Sequence Repeat) ou encore SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Ce génotypage permet de déterminer avec plus de précision la variabilité génétique existant au sein de la population d'un agent pathogène (Wei et al., 2014; Ziya Motalebipour et al., 2016). Des isolats peuvent en effet posséder des virulences identiques sans pour autant partager le même génotype. Par exemple, une étude sur *P. striiformis* a révélé que 19 isolats appartenant au même pathotype (ou « race »), et possédant donc les mêmes virulences, présentaient une diversité génotypique microsatellites avec 5 génotypes multi-locus différents (Zhang et al., 2017). Depuis quelques années les techniques de séquençage à haut débit permettent de caractériser de manière quasi exhaustive la variabilité génétique présente au sein des populations d'agents pathogènes, et de comprendre l'origine d'une nouvelle race/pathotype par des analyses phylogénétiques (Tollenaere et al., 2012; Hubbard et al., 2015; Liu et al., 2021). Une analyse SNP des souches issues des différents pays a par exemple permis de confirmer l'hypothèse émise selon laquelle les souches de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, responsable de la bactériose du kiwi, apparue en Europe en 2008 et au Chili et en Nouvelle-Zélande en 2010, étaient originaires de Chine où la maladie a été découverte dans les années 1980 (Butler et al., 2013). Le recours au génotypage haut-débit de marqueurs SNP a également permis de mettre en évidence l'origine exotique des nouvelles races de *P. striiformis* apparues en Europe dans les années 2011 (Hubbard et al., 2015).

## **C. LES FORCES EVOLUTIVES MOTRICES DE L'ADAPTATION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES**

### **1. Modes de reproduction sexuée et asexuée**

Le mode de reproduction des champignons phytopathogènes est une source majeure de variabilité génétique et phénotypique. La plupart des champignons ont recours aux deux modes de reproduction sexuée et asexuée, à différentes étapes de leur cycle de vie, en fonction des conditions environnementales, de la disponibilité des nutriments, ou encore de la présence ou non d'un hôte alternant (ou hôte secondaire) dans le cas des espèces hétéroïques (Drenth et al., 2019).

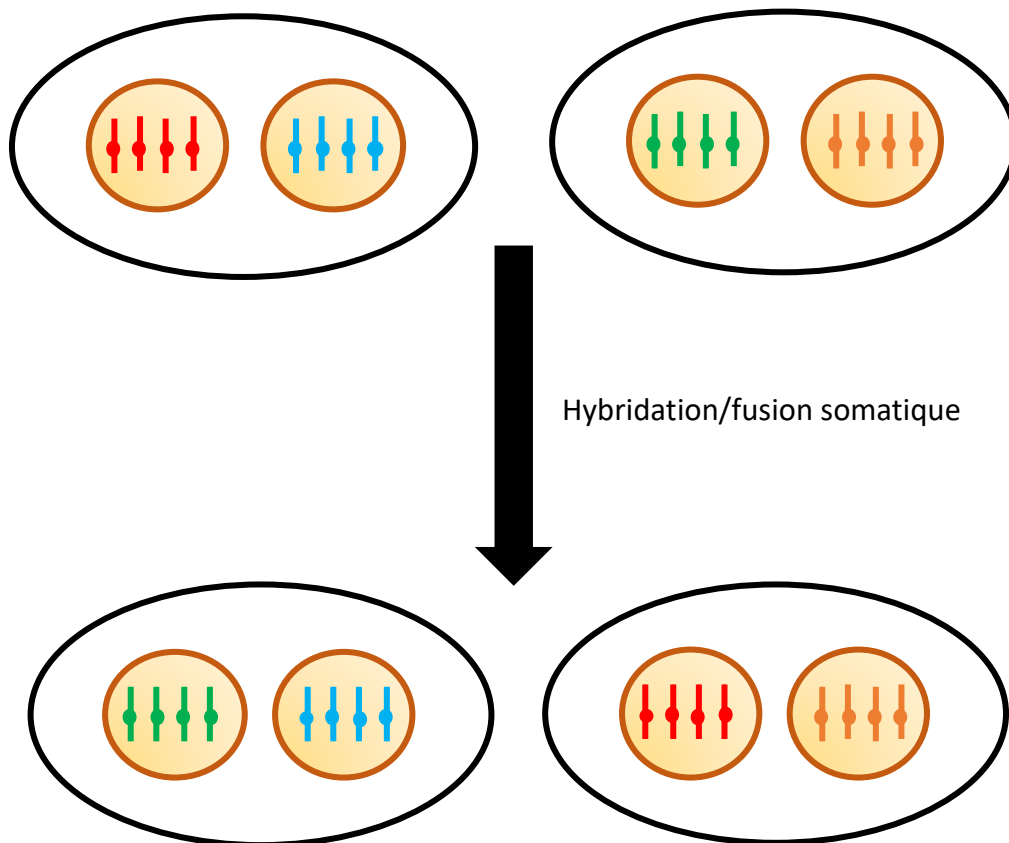
La reproduction sexuée a plusieurs conséquences évolutives. Elle permet d'éliminer les mutations délétères et génère des descendants potentiellement mieux adaptés

(Aanen & Hoekstra, 2007; McDonald et al., 2016). D'un point de vue écologique, la reproduction sexuée permet ainsi aux populations de s'adapter aux fluctuations de l'environnement (Tagg et al., 2005) du fait de la création de nouvelles combinaisons de gènes, ce qui entraîne un degré élevé de diversité génotypique et des individus qui pourront ensuite être sélectionnés (McDonald & Linde, 2002a; Tagg et al., 2005; Möller & Stukenbrock, 2017). Cependant, la reproduction sexuée a également des inconvénients d'un point de vue évolutif. La durée du cycle sexué est en moyenne deux fois plus longue que la durée du cycle asexué (Bremermann, 1980). Dans le cas de l'apparition d'une combinaison de gènes avantageuse chez un individu, cette combinaison ne pourra généralement pas être transmise aux descendants par ce mode de reproduction suite aux recombinaisons génétiques qu'il impose (McDonald & Linde, 2002a).

La reproduction asexuée ou clonale est très répandue chez les champignons phytopathogènes (Milgroom, 1996). Elle repose sur la reproduction d'un parent unique qui entraîne une descendance constituée de clones possédant un génome identique à celui du parent. Différents mécanismes peuvent intervenir : fission binaire, fragmentation, bourgeonnement ou formation de spores (Alexopoulos et al., 1996). La reproduction clonale confère un avantage à la fois épidémiologique et évolutif à une population d'agent pathogène, qui est capable de produire rapidement un grand nombre de spores asexuées, et ainsi de maintenir les génotypes les mieux adaptés, c'est-à-dire ayant les combinaisons de gènes les plus avantageuses (McDonald & Linde, 2002a; Möller & Stukenbrock, 2017). Malgré une diversité génétique plus limitée, une population clonale issue de la reproduction asexuée peut provoquer des épidémies particulièrement dommageables dans le cas de populations hôtes conduites en monocultures génétiquement homogènes (Kohn, 1995; Taylor et al., 2015).

## 2. Hybridation somatique

Il existe d'autres mécanismes qui permettent de générer de la diversité génétique au sein des populations d'agent pathogène, même si celles-ci sont exclusivement asexuées. Notamment, l'hybridation ou fusion somatique qui, dans sa forme la plus simple, implique l'échange de noyaux entre des hyphes fongiques anastomosés. Ce phénomène est retrouvé majoritairement chez les rouilles qui possèdent deux noyaux génétiquement différents ( $n+n'$ ). Ce processus d'échange permet de générer des nouvelles combinaisons de caractères (Burdon & Silk, 1997) (Figure 3). Un cas d'hybridation somatique a été mis en évidence chez *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, l'agent pathogène de la rouille noire du blé. Li et al. (2019) ont montré que la nouvelle race Ug99 partageait un noyau en commun avec une ancienne lignée africaine (similarité de 99,5%), sans qu'aucun réarrangement chromosomique n'ait été constaté. Cet exemple illustre que l'hybridation somatique peut être une source de diversité génétique et avoir des conséquences importantes sur la dynamique adaptative des populations d'agents pathogènes, et donc sur leur capacité à contourner les résistances variétales.



**Figure 3.** Hybridation/fusion somatique d'un basidiomycète dikaryote (adapté de Figueroa et al., 2020)

### 3. Mutation

Les mutations spontanées, délétion, insertion et transposition, sont une source importante de diversité génétique chez de nombreux champignons phytopathogènes (Burdon & Silk, 1997). La rapidité avec laquelle les mutations peuvent apparaître dans les populations d'agent pathogène dépend du taux de mutation dans le génome, du niveau de ploïdie de l'agent pathogène, de la taille de la population (McDonald et al., 2022), et bien évidemment de l'avantage sélectif conféré par cette mutation (Burdon, 1993). Pour les agents pathogènes possédant des spores haploïdes, une seule mutation peut être responsable d'un changement de virulence, alors que pour les agents pathogènes diploïdes ou dicaryotiques le changement de virulence dépend de la récessivité/dominance du gène. Les mutations ponctuelles entraînent le remplacement d'un nucléotide par un autre ou l'insertion/délétion d'un nucléotide. Cette mutation peut être soit silencieuse en n'entraînant pas de changement d'acide aminé dans la séquence protéique si elle a lieu dans la partie codante d'une protéine. Une mutation non-synonyme dans un gène d'avirulence peut avoir pour conséquence de permettre à l'agent pathogène d'échapper à la reconnaissance par le gène de résistance correspondant dans la plante, et donc de contourner celui-ci (Arenas et al., 2018). Des mutations successives peuvent également entraîner l'apparition de nouveaux génotypes, au sein des populations d'agents pathogènes, qui sont tous issus d'une même souche d'origine. Cela a déjà été mis en évidence chez *P. striiformis*



f. sp. *tritici* grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires (Steele et al., 2001).

#### 4. Sélection

La sélection est le mécanisme qui guide l'évolution des espèces et qui implique que les individus d'une espèce les mieux adaptés vont survivre et se reproduire. La sélection intervient dans une population de champignons phytopathogènes lorsqu'on constate : (i) une variation des traits phénotypiques ; (ii) des différences de fitness liées à l'expression de ces traits ; et (iii) l'héritabilité de ces traits. La sélection détermine si un mutant persistera ou non dans une population d'agents phytopathogènes. Concrètement, elle peut expliquer la fixation rapide d'un allèle avantageux, par rapport aux allèles moins avantageux qui n'atteignent jamais une fréquence élevée dans la population (Zhan, 2016).

#### 5. Migration et flux de gènes

Le flux de gènes, conséquence de la migration, est un processus par lequel des allèles (gènes) ou des individus (génotypes) particuliers sont échangés entre des populations géographiquement éloignées. Pour les organismes sexués et asexués, des migrations de génotypes entiers peuvent avoir lieu entre les populations. On peut s'attendre à ce que les populations de champignons phytopathogènes qui présentent un degré élevé de flux de gènes/génotypes expriment une plus grande diversité génétique que les populations présentant un faible degré de flux de gène/génotype (Burdon & Silk, 1997; McDonald & Linde, 2002a). L'intensité des flux de gènes dépend de la capacité de dispersion de l'agent pathogène. Ainsi, le flux de gènes des agents pathogènes exclusivement telluriques est très faible comparé à ceux qui se dispersent dans l'air, puisque ces derniers sont capables d'être transportés sur de longues distances. Il est parfois postulé que les flux de gènes impliquant des spores asexuées, correspondant à des génotypes présentant un ensemble de gènes coadaptés (par exemple déjà sélectionnés par une ou plusieurs infections de plantes hôtes, expression d'un « effet filtre »), présentent un risque plus élevé que ceux impliquant des spores sexuées résultant d'une recombinaison allélique aléatoire (McDonald & Linde, 2002a). En pratique, dans les systèmes agricoles, migrations et flux de gènes favorisent la diffusion de nouvelles combinaisons de virulences et de résistances aux produits phytosanitaires sur une vaste zone géographique (Brasier, 2008; Zhan, 2016; Garnault et al., 2019). Ces phénomènes de migrations à l'échelle mondiale ont par ailleurs été décrits au niveau spécifique pour de nombreux agents pathogènes, avec par exemple celle de *P. infestans* du Mexique vers l'Amérique du Nord et l'Europe (Fry et al., 1992), de *Z. tritici* du Moyen-Orient et de l'Europe vers les continents du "Nouveau Monde" (Banke et al., 2004), ou de *P. striiformis* de l'Europe de l'Ouest vers l'Australie en 1979 (Wellings & McIntosh, 1990; Ali et al., 2014).

### III. LA ROUILLE BRUNE DU BLE

#### A. GENERALITES

Les Pucciniales, un ordre des champignons basidiomycètes, représentent environ 7000 espèces biotrophes obligatoires. Cet ordre est considéré comme le plus grand groupe de champignons pathogènes des plantes, responsables de maladies appelées « rouilles » (Oberwinfler, 2012; Aime et al., 2017). Trois espèces de Pucciniales sont très connues pour les attaques qu'elles provoquent sur le blé : *P. striiformis* f. sp. *tritici* responsable de la rouille jaune du blé, *P. graminis* f. sp. *tritici* responsable de la rouille noire, et *Puccinia triticina* responsable de la rouille brune qui fait l'objet de cette thèse. Ces trois rouilles causent des dommages aux cultures de blé depuis l'antiquité. On peut retrouver des références à ces maladies dans les littératures Grecque et Romaine, et également dans la Bible (Gregory, 1948).

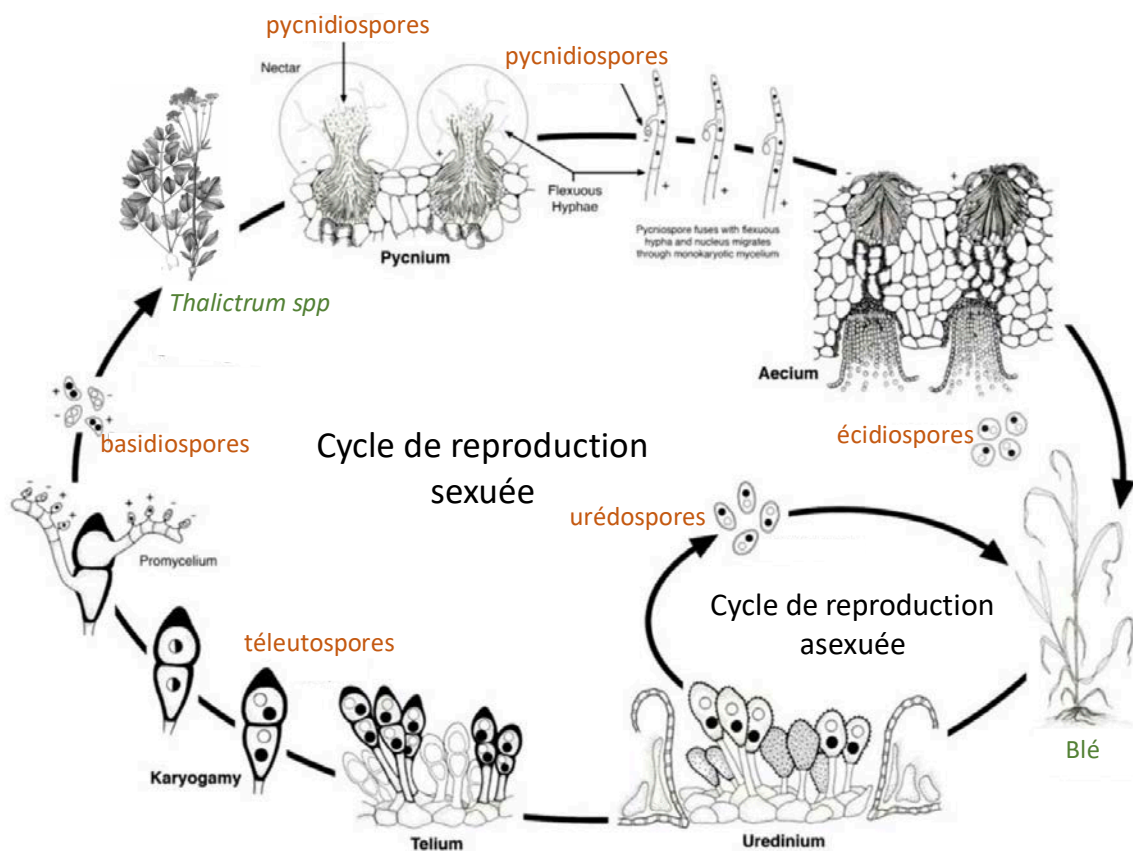
La rouille brune du blé cause des pertes de rendement qui peuvent atteindre plus de 50% dans le cas d'épidémies sévères (Savary et al., 2019). La rouille brune est présente dans toutes les régions du monde où le blé pousse, à savoir en Amérique du Nord et du Sud, en Asie, en Europe, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et en Australie (Mesterházy et al., 2000; Park et al., 2002; McVey et al., 2004; Germán et al., 2007; Huerta-Espino et al., 2008; Bhardwaj, Prashar, Jain, Kumar, & Sharma, 2010; Pretorius & Bender, 2010; Liu & Chen, 2012; Kolmer, 2019). Même si la rouille brune entraîne des dommages moins importants et moins spectaculaires que les rouilles jaune ou noire, les dommages peuvent être localement élevés, notamment en cas de conditions climatiques favorables à la fin du printemps au moment du remplissage des grains (Huerta-Espino et al., 2011; Savary et al., 2019). Les pertes économiques ont été estimées à 3 millions de tonnes entre 2000 et 2004 aux Etats-Unis (Huerta-Espino et al., 2011), ce qui représente 350 millions de dollars. Au Mexique, les épidémies de rouille brune ont engendré entre 2000 et 2003 des pertes estimées à 32 millions de dollars (Singh et al., 2004).

Deux principaux moyens de lutte sont utilisés pour faire face à cette maladie : d'un côté la lutte chimique avec l'utilisation de fongicides, et de l'autre côté la lutte génétique avec l'utilisation de variétés de blé résistantes ou tolérantes. Il existe plusieurs matières actives de fongicides permettant de lutter efficacement contre la rouille brune du blé, parmi lesquelles des inhibiteurs de la quinone extérieure (Qols) qui agissent en inhibant la chaîne respiratoire des inhibiteurs de la 14 $\alpha$ -déméthylation (DMI) et bloquent la synthèse d'ergostérol, constituant essentiel de la membrane des champignons, et des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI), une enzyme impliquée dans la respiration cellulaire (Oliver, 2014). Même si à ce jour aucune résistance à ces fongicides n'est apparue dans les populations de rouilles, contrairement à de nombreux autres champignons phytopathogènes tels que *Z. tritici*, l'utilisation de fongicides peut s'avérer très coûteuse et est de plus en plus controversée à cause de son impact sur l'environnement (Momas et al., 2004).

L'utilisation des résistances variétales est une bonne alternative à l'utilisation des fongicides, et est très répandue pour la rouille brune. Les deux types de résistances variétales qui sont exploitées dans les programmes de sélection sont, la résistance qualitative, majoritairement, et la résistance quantitative, souvent appelée résistance plante adulte dans le cas de l'utilisation contre la rouille brune (Ellis et al., 2014). Les sélectionneurs introduisent régulièrement dans les variétés de nouveaux gènes de résistance, ou gènes *Lr*. Il est alors important de suivre l'efficacité de ces gènes de résistance via le suivi des populations de *P. triticina* afin de détecter l'apparition des virulences correspondantes. L'identification de ces nouvelles virulences est réalisée chaque année en France depuis la fin des années 1990 grâce à un suivi annuel des populations (Goyeau et al., 2006).

## B. BIOLOGIE

*P. triticina* est un champignon macrocyclique et hétéroïque qui possède un cycle de reproduction comportant une phase sexuée et asexuée. Ce cycle est caractérisé par la formation de cinq types de spores, et implique une alternance sur deux hôtes, le blé (*Triticum aestivum*) en tant qu'hôte télien sur lequel se déroule la phase asexuée, et *Thalictrum* spp en tant qu'hôte alternatif écidien sur lequel se déroule la phase sexuée (Figure 4).



**Figure 4.** Cycle de reproduction de *P. triticina*, adapté de Kolmer (2013).

La phase d'infection du blé par la rouille brune commence avec le dépôt et la

germination d'une urédospore (Figures 4 et 6). Les urédospores sont dicaryotiques, c'est-à-dire possédant deux noyaux génétiquement distincts. L'appressorium se forme au niveau de l'entrée d'un stomate puis un tube germinatif pénètre dans la feuille via ce stomate où il va se différencier en vésicule sous-stomatale. Les hyphes d'infection primaire se propagent dans la feuille et, une fois en contact avec les cellules du mésophylle, se différencient en haustorium. Cet haustorium pénètre la paroi de la cellule végétale infectée mais reste séparé du cytoplasme par une matrice et une membrane extracellulaire qui entourent l'haustorium. Après l'apparition du premier haustorium, des hyphes secondaires se développent, colonisent les espaces intercellulaires, et entraînent la formation de nouveaux haustoria. Environ 8 jours après le début de l'infection, la durée du cycle étant dépendante de la période de latence (Lannou, 2012; Azzimonti et al., 2022), le cycle s'achève avec la formation des cellules produisant les urédospores, libérées après la rupture de l'épiderme de la feuille (Garnica et al., 2014). Ces urédospores, disséminées par la pluie et le vent, réinfectent l'hôte tant que les conditions restent favorables, ce qui explique la nature polycyclique des épidémies de rouille brune. Les infections causées par les urédospores de *P. triticina* forment une lésion de couleur orange-brun dont la surface est comprise entre 0,1 et 0,3 mm<sup>2</sup> (Pariaud et al., 2009b; Azzimonti et al., 2013).

Les téléutospores, premières spores de la phase sexuée du cycle de reproduction, sont produites en fin d'épidémie, lorsque les feuilles de blé entrent en sénescence. Ces téléutospores sont de couleur noire, indéhiscentes, et se trouvent sur la face inférieure des feuilles (Figure 5). Au début de leur développement, les deux noyaux fusionnent (caryogamie), pour former un noyau diploïde. Les téléutospores sortent de dormance après avoir subi une période de froid et d'humidité, et peuvent ensuite germer.

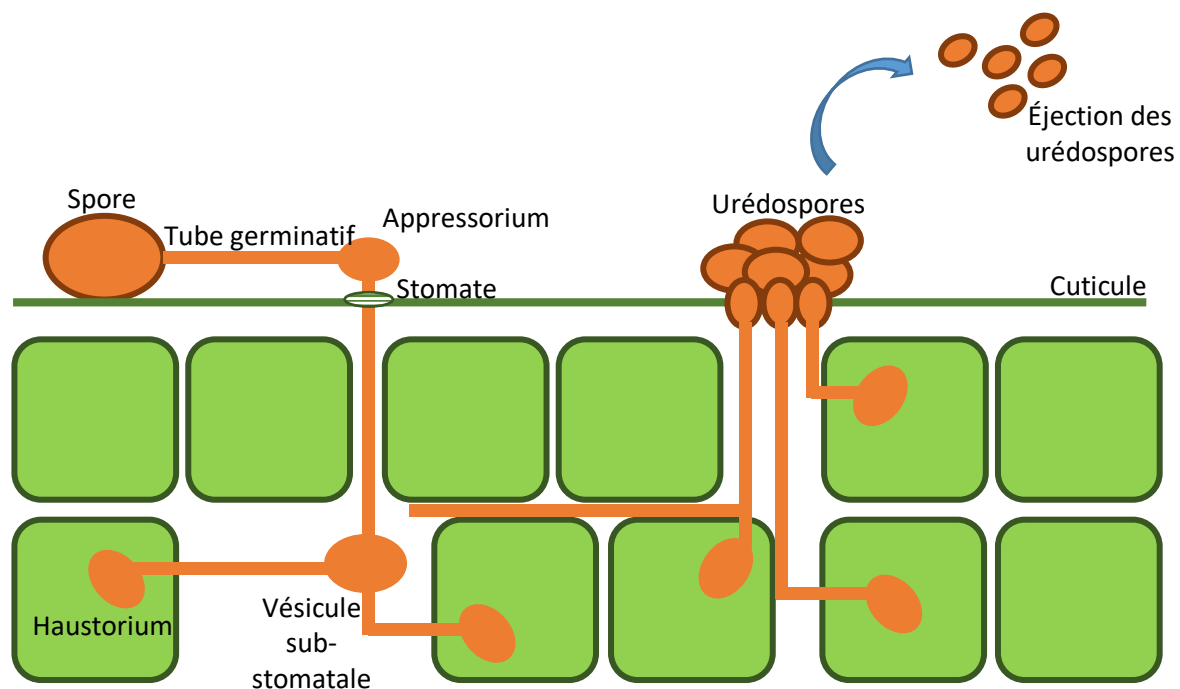


**Figure 5.** Téléutospores de *P. triticina* sur feuille de blé (photo Anne-Lise Boixel)

Par la suite, ces téléutospores subissent une méiose conduisant à la production de 4 basidiospores haploïdes par le promycelium. Les basidiospores, grâce à un mécanisme d'éjection, atterrissent sur l'hôte alternatif, *Thalictrum spp.* Environ douze jours après l'infection de la feuille par les basidiospores, chaque basidiospore germée donne naissance, à la surface supérieure de la feuille, à un pycnium qui contient d'une part des hyphes flexueuses (réceptives) et d'autre part des pycniospores haploïdes, émises dans un nectar attirant les insectes qui sont nécessaires à la fécondation. En effet, *P. triticina* est un champignon hétérothallique, c'est-à-dire que la fécondation se produit lorsque des pycniospores et des hyphes flexueuses de types sexuels opposés rentrent en contact et fusionnent, ce qui donne lieu à la plasmogamie et rétablit l'état

dicaryotique du noyau. Le mycélium du dicaryote se développe dans les tissus foliaires, et au bout d'environ deux semaines les écidies apparaissent à la surface inférieure de la feuille, contenant des écidiospores ensuite disséminées par le vent. Lorsque les écidiospores rentrent en contact avec du blé, elles germent et initient un nouveau cycle de reproduction (Bolton et al., 2008; Kolmer, 2013).

L'hôte alternant indispensable à la reproduction sexuée de *P. triticina* est naturellement absent de la majeure partie du monde (Bolton et al., 2008). En Europe, il est présent dans la péninsule ibérique mais son rôle est considéré comme négligeable (Zadoks & Bouwman, 1985). Cela explique la nature essentiellement clonale des populations européennes et françaises de rouille brune, confirmée par l'échantillonnage et le génotypage des isolats de *P. triticina* (Mesterházy et al., 2000; Goyeau et al., 2006). Concrètement, cette espèce se retrouve quasi-exclusivement sur blé aux stades urédospores et téléutospores (Kolmer, 2005, 2013; Bolton et al., 2008). Dans le cas des rouilles, la reproduction clonale s'effectue par bourgeonnement ou formation de spores, le rôle prépondérant de la reproduction clonale peut être mis en évidence par la proportion élevée de génotypes répétés, ainsi qu'un excès d'hétérozygotes (Goyeau et al., 2007; Cheng & Chen, 2014). Compte tenu du caractère biotrophe obligatoire de *P. triticina*, on considère que les repousses de blé à l'origine d'un « *green bridge* » expliquent, au moins en partie, la récurrence annuelle des épidémies (Soubeyrand et al., 2017).



**Figure 6.** Différentes étapes d'infection d'une feuille de blé à partir d'une urédospore de *P. triticina*. Adaptée de Garnica et al. (2014).

### C. INTERACTION ENTRE *Puccinia triticina* ET *Triticum aestivum*

Pour contrôler les épidémies, le déploiement des gènes de résistance dans les variétés cultivées est une méthode largement utilisée. A ce jour, 82 gènes de résistance qualitative et quantitative, gènes *Lr*, ont été identifiés chez le blé (Bariana et al., 2022). La grande majorité de ces gènes entraînent une résistance totale. Toutefois, la plupart de ces gènes *Lr* peuvent être contournés ou érodés plus ou moins rapidement par les populations de *P. triticina*, de par la forte pression de sélection qu'ils exercent. Ces contournements résultent des cycles de « boom-and-bust » précédemment décrits (McIntosh & Brown, 1997), et qui sont une caractéristique de la dynamique évolutive des populations de *P. triticina* à une échelle pluriannuelle. Les premiers contournement de gènes *Lr* ont été observés depuis 1918, notamment pour les gènes *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a* et *Lr11* (Mains & Jackson, 1926). Depuis, de nombreux autres cas de contournement ont été observés, parfois très rapides. Ainsi, les gènes *Lr3ka*, *Lr11* et *Lr24* ont été contournés seulement deux ans après leur introduction dans les variétés de blé cultivées en Amérique du Nord (Kolmer, 1996), tout comme le gène *Lr28* après son introduction dans les variétés de blé françaises. En Inde et en Russie, les variétés portant le gène *Lr28* ont été modérément résistantes de 2008 à 2014 avant de devenir sensibles à partir de 2015 (Bhardwaj et al., 2010; Skolotneva et al., 2018).

Certains gènes *Lr* confèrent plutôt une résistance partielle, de type « résistance plantes adultes » (« *Adult Plant Resistance* », APR). C'est le cas des gènes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67*, *Lr68*, *Lr74*, *Lr77* et *Lr78* (Drijepontd, 1989; Herrera-Foessel et al., 2012, 2014; El-Orabey et al., 2019; McIntosh et al., 2020; Huerta-Espino et al., 2020). Le plus ancien gène APR utilisé contre la rouille brune est *Lr34*, qui confère également une résistance partielle contre la rouille jaune et l'oïdium. Il est présent dans les variétés commerciales depuis plus de 50 ans au Canada, en Chine, Amérique du Sud et Italie (Ellis et al., 2014), mais pas dans les variétés françaises. Ce gène est exprimé au stade adulte durant le moment critique du remplissage des grains et est plus efficace au niveau de la feuille drapeau (Drijepontd, 1989). Il a également été montré que *Lr34* pouvait entraîner une baisse de rendement comparé à une variété exempte de ce gène, ce qui constitue un frein à son introgression par les sélectionneurs étant donné que le critère de sélection majeur pour les variétés de blé est le rendement (Singh & Huerta-Espino, 1997).

En France, les variétés de blé portent dans la majorité des cas une combinaison de gènes de résistance majeurs, ce qui leur confère une résistance relativement efficace au moment de leur mise sur le marché mais finalement assez peu durable compte tenu du potentiel adaptatif de *P. triticina* (Goyeau et al., 2007). Les combinaisons de gènes de résistances majeurs avec un gène de résistance APR ont fait preuve d'une plus grande durabilité (Singh et al., 2005; Vanzetti et al., 2011). Par exemple, la combinaison des gènes *Lr16*, *Lr23* et *Lr34* est restée relativement efficace pendant 30 ans (Kolmer et al., 2007). La capacité des populations de *P. triticina* à s'adapter aux

résistances quantitatives de type APR est peu documentée. Néanmoins, des travaux ont mis en évidence une spécificité des isolats de *P. triticina* dans le cas de la résistance quantitative du blé tendre. Huit variétés de blé présentant des niveaux de résistance quantitative contrastés ont été inoculées avec trois isolats de *P. triticina* portant différentes combinaisons de virulence par Azzimonti et al. (2013). La mesure de cinq composantes de la résistance/agressivité (efficacité d'infection, période de latence, taille des lésions, production de spores par lésion et production de spores par unité de surface sporulante) a mis en évidence la grande variabilité de ces composantes entre toutes les combinaisons hôte x pathotype testées, et des spécificités d'isolat pour chacune des composantes mesurées. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'effet de la spécificité des isolats sur la durabilité de la résistance quantitative varie en fonction du nombre et du niveau de composantes d'agressivité présentant une spécificité. Quelques années auparavant, une adaptation quantitative d'un pathotype de *P. triticina* (appelé P1) à la variété de blé tendre Soissons, la plus cultivée dans le paysage Français dans les années 1990, avait été mise en évidence (Pariaud et al., 2009b). L'agressivité du pathotype P1 sur Soissons a été comparée avec celle de deux autres pathotypes présents dans le paysage. Les résultats ont montré que le pathotype P1 était toujours plus agressif qu'au moins un des deux autres pathotypes testés. Cette adaptation du pathotype P1 et l'augmentation de sa fréquence dans le paysage semblent expliquer l'érosion de la résistance de la variété Soissons. La baisse de fréquence de cette variété dans le paysage cultivé en France s'est ensuite accompagnée d'une très forte baisse de la fréquence du pathotype P1, qui ne possédait pas les virulences nécessaires pour infecter les autres variétés cultivées. La baisse de fréquence du pathotype P1 s'est accompagnée d'une ré-augmentation du niveau de résistance de la variété Soissons au champ, telle qu'évaluée par les instituts techniques (Papaïx et al., 2011).

Des cas de spécificité ou d'adaptation aux résistances quantitatives ont été mis en évidence dans d'autres pathosystèmes, soit en démontrant une agressivité plus élevée des individus récoltés sur les variétés partiellement résistantes (notamment chez *Z. tritici* ou *P. viticola* ; Cowger & Mundt, 2002; Delmas et al., 2016), soit en démontrant que certains isolats sont plus agressifs (et donc mieux adaptés) sur un cultivar partiellement résistant (notamment chez *Puccinia hordei* et *Z. tritici* ; Marcel et al., 2008; Krenz et al., 2008).

#### **D. ÉVOLUTION ET SUIVI DES POPULATIONS**

En dépit d'une reproduction clonale *a priori* exclusive en Europe, les populations françaises de *P. triticina* sont diversifiées (Mesterházy et al., 2000). Cette diversité génétique peut résulter d'évènements de mutations (Hovmoller et al., 2012), d'hybridation somatique (Park et al., 1999; Park & Wellings, 2012), ou encore à des flux de migration (Ali et al., 2014; Li et al., 2019). Kolmer et al. (2019) ont montré à l'aide d'une analyse par génotypage SSR la forte proximité génotypique des populations d'Amérique du Nord et du Sud, de Russie et d'Asie-Centrale, et du Moyen-

Orient et d’Afrique du Sud, suggérant que les populations mondiales ont été façonnées par des événements de migrations entre continents. Toutefois, la première cause de diversité au sein des populations de rouille brune est l’adaptation à l’hôte. Comme décrit précédemment, l’évolution de ces populations est très largement influencée par les gènes *Lr* présents dans les variétés et la façon dont ils sont déployés à l’échelle du territoire.

Les suivis annuels des populations de rouilles mis en place dans plusieurs pays permettent de concevoir des stratégies de déploiement des variétés les plus pertinentes possibles pour limiter l’impact des épidémies (Mesterházy et al., 2000; Park et al., 2002; McVey et al., 2004; Germán et al., 2007; Huerta-Espino et al., 2008; Bhardwaj, 2010; Pretorius & Bender, 2010; Liu & Chen, 2012; Kolmer, 2019). Ces suivis consistent notamment à suivre l’évolution des phénotypes de virulence (pathotypes) au sein des populations, et de les mettre en relation avec les gènes *Lr* présents dans les variétés cultivées. A ce jour la méthode de pathotypage utilisée dans la plupart des suivis nationaux repose sur l’utilisation de lignées isogéniques de la variété Thatcher, chaque lignée ne comportant qu’un seul gène *Lr* déjà identifié (Dyck & Samborski, 1970; Samborski & Dyck, 1976; Dyck, 1979). La disponibilité de ces lignées isogéniques a permis d’homogénéiser l’identification des virulences pour les suivis réalisés dans les différents pays (McIntosh et al., 1995). Regroupées au sein d’une « gamme différentielle », ces lignées isogéniques permettent d’identifier le pathotype d’un isolat en déterminant son profil de virulences.

Le pathotypage permet d’obtenir une vue d’ensemble sur la diversité des virulences présentes dans les populations de *P. triticina* mais ne permet pas de caractériser sa diversité génétique. Pour cela, des marqueurs SSR spécifiques de la rouille brune ont été développés (Duan et al., 2003; Kolmer et al., 2007), ce qui a permis d’étudier la corrélation entre phénotype de virulence et génotype, et de révéler l’existence d’une diversité génétique présente entre et à l’intérieur d’un même groupe de pathotypes (Goyeau et al., 2007; Kolmer, 2013). Depuis quelques années les approches de génotypage à haut débit, notamment via l’identification de marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism), sont de plus en plus utilisées pour le suivi des populations de rouilles (Bueno-Sancho et al., 2017; Fellers et al., 2021). Ces approches permettent de mieux définir la diversité génétique à l’échelle du génome et de mieux comprendre la dynamique des populations pathogènes et des causes possibles de la diversité génétique observée.

#### **IV. PROBLEMATIQUE ET QUESTIONS DE THESE**

En France, les populations de rouille brune sont suivies annuellement depuis plus de 20 ans (Goyeau et al., 2006). Ces suivis ont suggéré que les résistances qualitatives présentes dans les variétés déployées à l’échelle du territoire étaient fortement structurantes pour les populations de l’agent pathogène. En effet, lorsqu’un gène de résistance majeur est présent à une forte fréquence dans le paysage, comme le gène



*Lr14a* avec une fréquence d'environ 35% en France sur la période 1999-2002, la quasi-totalité des pathotypes retrouvés sur le blé tendre à cette même période possèdent la virulence 14a (Goyeau et al., 2006). Néanmoins, les gènes de résistance majeurs ne semblent pas expliquer entièrement la distribution des pathotypes dans le paysage. Des résultats expérimentaux ont suggéré que la plus grande agressivité du pathotype (P1) sur la variété de blé majoritaire (Soissons) lui conférait un avantage sur cette variété, comparativement à des souches ayant le même profil de virulences (Pariaud et al., 2009b; Papaïx et al., 2011). Ces résultats expérimentaux ont permis d'alimenter des modèles suggérant que les aspects quantitatifs de la relation hôte-agent pathogène jouaient également un rôle important et devaient être pris en compte dans les approches d'épidémiologie à l'échelle du paysage (Papaïx, 2011).

A partir de 2006, le paysage variétal a commencé à se diversifier, avec un plus grand nombre de variétés cultivées. Curieusement, cette diversification variétale n'a pas eu pour conséquence une diversification des pathotypes de *P. triticina* présents dans les populations, et les informations disponibles sur les résistances des variétés les plus cultivées ne permettaient pas d'expliquer complètement la dynamique observée dans les populations de *P. triticina* (Goyeau & Lannou, 2011). Au-delà du cas particulier de la variété Soissons analysé par Pariaud et al. (2009b), il a semblé pertinent de se demander si, sous l'influence du paysage variétal considéré dans sa globalité, se produisaient des phénomènes d'adaptation au sein des groupes de pathotypes majoritaires se traduisant par des agressivités différentielles sur les variétés cultivées.

Pour traiter cette problématique et expliquer la dynamique pluriannuelle d'évolution des populations de rouille brune à l'échelle du paysage français, j'ai soulevé trois questions complémentaires auxquelles j'ai tenté de répondre. Ces trois questions correspondent aux trois chapitres scientifiques qui structurent ma thèse :

### **Les gènes *Lr* expliquent-ils à eux seuls la distribution des pathotypes de *P. triticina* en France ?**

L'objectif de ce chapitre a été de tester si la distribution des gènes *Lr* dans les variétés du paysage était responsable à elle seule de la prédominance des pathotypes ou si d'autres types d'interactions étaient en jeu. Pour cela, j'ai déterminé l'impact de la composition du paysage variétal sur l'évolution des populations françaises de *P. triticina* à partir de jeux de données acquis dans le cadre du suivi national piloté par Henriette Goyeau entre 2006 et 2016 à INRAE BIOGER. J'ai ainsi pu exploiter des données d'épidémiosurveillance comprenant (i) la postulation des gènes de résistance à la rouille brune (*Lr*) présents dans les variétés hôtes et (ii) la dynamique de fréquence des pathotypes (profils de virulences) de *P. triticina* échantillonnés sur les variétés les plus présentes dans le paysage.

## **Peut-on mettre en évidence une évolution de l'agressivité au sein d'un même pathotype de *P. triticina* au cours du temps ?**

L'objectif de ce deuxième chapitre a été de mettre en évidence le rôle de l'agressivité dans l'évolution de fréquence d'un pathotype donné dans le paysage. Pour cela, je me suis focalisée sur les deux pathotypes dominants - 106 314 0 et 166 317 0 – qui ont été les plus fréquemment identifiés entre 2006 et 2016. L'agressivité de plusieurs isolats, représentatifs de la diversité des sous-populations des deux pathotypes, a été estimée en mesurant trois composantes d'agressivité : (i) l'efficacité d'infection, (ii) la période de latence et (iii) la capacité de sporulation. J'ai préalablement réalisé un génotypage des isolats à l'aide de marqueurs microsatellites afin de révéler une éventuelle diversité génétique au sein de chaque pathotype. Ainsi, cette diversité génétique a pu être prise en compte dans le plan d'expérience et l'analyse des résultats. J'ai mis au point et validé un nouveau protocole permettant de réaliser les mesures d'agressivité sur de jeunes plantes en conditions contrôlées. Ce protocole a été utilisé pour mesurer les composantes d'agressivité des isolats sur une variété de blé considérée « neutre » (n'ayant pas d'effet apparent sur l'évolution des populations de l'agent pathogène, tel que mis en évidence dans le premier chapitre) et sur certaines des variétés françaises les plus cultivées. Ce chapitre a été l'occasion d'introduire le concept de « pathogénotype », défini comme une combinaison unique d'un pathotype et d'un génotype.

## **L'avantage sélectif que constitue une agressivité supérieure peut-il expliquer la domination d'un pathogénotype de *P. triticina*, au-delà de l'avantage conféré par les virulences ?**

L'objectif de ce troisième chapitre a été de déterminer dans quelle mesure l'agressivité pouvait effectivement expliquer la domination d'un pathotype au sein du paysage, en dépit de la présence de pathotypes également adaptés aux résistances majeures, de type *Lr*, présentes dans les variétés. Pour cela je me suis focalisée sur les deux pathogénotypes - 106 314 0-G2 et 166 317 0-G1 - les plus fréquents dans le paysage entre 2012 et 2014. L'agressivité de ces deux pathogénotypes a été comparée en mesurant les trois composantes d'agressivité précédentes (efficacité d'infection, période de latence et capacité de sporulation) sur certaines des variétés françaises les plus cultivées. Une analyse préalable a montré que 106 314 0-G2 et 166 317 0-G1 ont un profil de virulences quasiment identique, excepté pour la virulence *Lr3* qui confère un avantage théorique à 166 317 0-G1 (virulente 3) étant donné la fréquence élevée du gène de résistance *Lr3* dans les variétés cultivées en 2012-2014.

## REFERENCES

- Aanen DK, Hoekstra RF (2007) Why sex is good: on fungi and beyond. In: *Sex in Fungi*, pp. 527–534. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555815837.ch32>
- Adams RM, Hurd BH, Lenhart S, Leary N (1998) Effects of global climate change on agriculture: an interpretative review. *Climate Research*, **11**, 19–30.
- Agriculture : vers une récolte de pommes de terre catastrophique en France (2022) *Les Echos*.
- Aime MC, McTaggart AR, Mondo SJ, Duplessis S (2017) Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. In: *Advances in Genetics*, pp. 267–307. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.011>
- Ainsworth EA, Ort DR (2010) How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiology*, **154**, 526–530. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161349>
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) Introductory mycology. *Introductory mycology*.
- Ali S, Gladieux P, Leconte M, Gautier A, Justesen AF, Hovmøller MS, Enjalbert J, Vallavieille-Pope C de (2014) Origin, migration routes and worldwide population genetic structure of the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. *PLOS Pathogens*, **10**, e1003903. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003903>
- Andrabi M, Vaid A, Razdan VK (2011) Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. *Journal of Plant Protection Research*. <https://doi.org/10.2478/v10045-011-0010-3>
- Andrison D (1994) Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans*. *Canadian Journal of Botany*, **72**, 1681–1687. <https://doi.org/10.1139/b94-206>
- Arenas M, Araujo NM, Branco C, Castelhana N, Castro-Nallar E, Pérez-Losada M (2018) Mutation and recombination in pathogen evolution: Relevance, methods and controversies. *Infection, Genetics and Evolution*, **63**, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.029>
- Artz DR, Pitts-Singer TL (2015) Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PLOS ONE*, **10**, e0135688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135688>
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12029>
- Azzimonti G, Papaix J, Lannou C, Goyeau H (2022) Contribution of the life-history traits of a plant pathogen to the development of field epidemics. *Plant Pathology*, **71**, 1344–1354. <https://doi.org/10.1111/ppa.13567>

Bailey KL, Lazarovits G (2003) Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research*, **72**, 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00086-2)

Balesdent M-H, Plissonneau C, Coudard L, Daverdin G, Meur LL, Leflon M, Pinochet X, Ermel M, Brun H (2015) Résistance du colza au phoma : où en est l'efficacité de Rlm7 ? , 5.

Banke S, Peschon A, McDonald BA (2004) Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.09.006>

Bariana HS, Babu P, Forrest KL, Park RF, Bansal UK (2022) Discovery of the new leaf rust resistance gene *Lr82* in wheat: molecular mapping and marker development. *Genes*, **13**, 964. <https://doi.org/10.3390/genes13060964>

Bergelson J (1994) The effects of genotype and the environment on costs of resistance in lettuce. *The American Naturalist*, **143**, 349–359.

Bhardwaj SC, Prashar M, Jain SK, Kumar S, Sharma YP (2010) Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat (*Triticum* species) in India. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, **80**.

Bhardwaj SC, Prashar M, Jain SK, Kumar S, Sharma YP, Sivasamy M, Kalappanavar IK (2010) Virulence of *Puccinia triticina* on *Lr28* in wheat and its evolutionary relation to prevalent pathotypes in India. *Cereal Research Communications*, **38**, 83–89. <https://doi.org/10.1556/CRC.38.2010.1.9>

Biezen EAVD, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 454–456. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01311-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01311-5)

Bock WJ (1980) The definition and recognition of biological adaptation<sup>1</sup>. *American Zoologist*, **20**, 217–227. <https://doi.org/10.1093/icb/20.1.217>

Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF (2008) Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>

Brasier CM (2008) The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology*, **57**, 792–808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x>

Bremermann HJ (1980) Sex and polymorphism as strategies in host-pathogen interactions. *Journal of Theoretical Biology*, **87**, 671–702. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(80\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(80)90111-3)

Brown JKM (2003) Little else but parasites. *Science*, **299**, 1680–1681. <https://doi.org/10.1126/science.1083033>

Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C (2015) Genetics of resistance

to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology*, **79**, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.017>

Brown JKM, Foster EM, O'Hara RB (1997) Adaptation of powdery mildew populations to cereal varieties in relation to durable and non-durable resistance. *The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions.*, 119–138.

Bruns E, Carson M, May G (2012) Pathogen and host genotype differently affect pathogen fitness through their effects on different life-history stages. *BMC Evolutionary Biology*, **12**, 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-135>

Bueno-Sancho V, Persoons A, Hubbard A, Cabrera-Quio LE, Lewis CM, Corredor-Moreno P, Bunting DCE, Ali S, Chng S, Hodson DP, Madariaga Burrows R, Bryson R, Thomas J, Holdgate S, Saunders DGO (2017) Pathogenomic analysis of wheat yellow rust lineages detects seasonal variation and host specificity. *Genome Biology and Evolution*, **9**, 3282–3296. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx241>

Bullock DG (1992) Crop rotation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **11**, 309–326. <https://doi.org/10.1080/07352689209382349>

Burdon JJ (1993) Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. *Durability of Disease Resistance Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. (eds Jacobs Th, Parlevliet JE), pp. 41–56. Springer Netherlands, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2004-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2004-3_4)

Burdon JJ, Silk J (1997) Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*®, **87**, 664–669. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.7.664>

Butault J-P, Dedryver C-A, Gary C, Guichard L, Jacquet F, Meynard JM, Nicot PC, Pitrat M, Reau R, Sauphanor B, Savini I, Volay T Écophyto R&D: Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides? Résumé de l'étude. , 9.

Butler MI, Stockwell PA, Black MA, Day RC, Lamont IL, Poulter RTM (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PLOS ONE*, **8**, e57464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057464>

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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.016>

Caffier V, Vallavieille-Pope C de (1996) Regional distribution of resistances to powdery mildew in winter and spring barley cultivars grown in the northern part of France. *Plant Breeding*, **115**, 94–100. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00881.x>

Calonnec A, Burie J-B, Langlais M, Guyader S, Saint-Jean S, Sache I, Tivoli B (2013) Impacts of plant growth and architecture on pathogen processes and their consequences for epidemic behaviour. *European Journal of Plant Pathology*, **135**, 479–497. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0111-5>

- Calonnec A, Goyeau H, de Vallavieille-Pope C (1996) Effects of induced resistance on infection efficiency and sporulation of *Puccinia striiformis* on seedlings in varietal mixtures and on field epidemics in pure stands. *European Journal of Plant Pathology*, **102**, 733–741. <https://doi.org/10.1007/BF01877147>
- Casalegno S (2011) *Global Warming Impacts: Case Studies on the Economy, Human Health, and on Urban and Natural Environments*. BoD – Books on Demand.
- Cesari S, Bernoux M, Moncuquet P, Kroj T, Dodds P (2014) A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the ‘integrated decoy’ hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, **5**. 606.doi: 10.3389/fpls.2014.00606.
- Chen WQ, Wu LR, Liu TG, Xu SC, Jin SL, Peng YL, Wang BT (2009) Race dynamics, diversity, and virulence evolution in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust in China from 2003 to 2007. *Plant Disease*, **93**, 1093–1101. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1093>
- Cheng P, Chen XM (2014) Virulence and molecular analyses support asexual reproduction of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the U.S. Pacific Northwest. *Phytopathology*®, **104**, 1208–1220. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0314-R>
- Chester KS (1946) *The nature and prevention of the cereal rusts as exemplified in the leaf rust of wheat*. Chronica Botanica Co.
- Cizelj I, Glavan G, Božič J, Oven I, Mrak V, Narat M (2016) Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **128**, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.015>
- Clay K, Kover PX (1996) The Red Queen Hypothesis and plant/pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 29–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.29>
- Cowger C, Brown JKM (2019) Durability of quantitative resistance in crops: greater than we know? *Annual Review of Phytopathology*, **57**, 253–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100016>
- Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology*, **49**, 445–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00472.x>
- Cowger C, Mundt CC (2002) Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology*, **92**, 624–630. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.6.624>
- Crute IR, Pink DAC (1996) Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *The Plant Cell*, **8**, 1747–1755. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1747>
- Curl EA (1963) Control of plant diseases by crop rotation. *The Botanical Review*, **29**, 413–479. <https://doi.org/10.1007/BF02860813>
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to

infection. *Nature*, **411**, 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>

Dedieu F, Jouzel J-N, Prete G (2015) Les bénéfiques du doute : les usages politiques de la sous évaluation des intoxications professionnelles liées aux pesticides en France et en Californie. *Dossiers de l'Environnement de l'INRA*, 77–88.

Degrandi-Hoffman G, Chen Y, Watkins Dejong E, Chambers ML, Hidalgo G (2015) Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. *Journal of Economic Entomology*, **108**, 2518–2528. <https://doi.org/10.1093/jee/tov251>

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. <https://doi.org/10.1111/eva.12368>

Delmotte F, Mestre P, Schneider C, Kassemeyer H-H, Kozma P, Richart-Cervera S, Rouxel M, Delière L (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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.017>

Denissen CJM (1993) Components of adult plant resistance to leaf rust in wheat. *Euphytica*, **70**, 131–140. <https://doi.org/10.1007/BF00029650>

Dorrance AE, Kurle J, Robertson AE, Bradley CA, Giesler L, Wise K, Concibido VC (2016) Pathotype diversity of *Phytophthora sojae* in eleven states in the United States. *Plant Disease*, **100**, 1429–1437. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0879-RE>

Drenth A, McTaggart AR, Wingfield BD (2019) Fungal clones win the battle, but recombination wins the war. *IMA Fungus*, **10**, 18. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0020-8>

Drijepondt SC (1989) Greenhouse evaluation of adult-plant resistance conferred by the gene *Lr34* to leaf rust of wheat. *Plant Disease*, **73**, 669. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0669>

Duan X, Enjalbert J, Vautrin D, Solignac M, Giraud T (2003) Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 65–67. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00350.x>

Duplessis S, Lorrain C, Petre B, Figueroa M, Dodds PN, Aime MC (2021) Host adaptation and virulence in heteroecious rust fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **59**, 403–422. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-121149>

Dyck PL (1979) Identification of the gene for adult-plant leaf rust resistance in thatcher. *Canadian Journal of Plant Science*, **59**, 499–501. <https://doi.org/10.4141/cjps79-078>

Dyck PL, Samborski DJ (1970) The genetics of two alleles for leaf rust resistance at the *Lr14* locus in wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, **12**, 689–694. <https://doi.org/10.1139/g70-091>

- Eijsackers H, Beneke P, Maboeta M, Louw JPE, Reinecke AJ (2005) The implications of copper fungicide usage in vineyards for earthworm activity and resulting sustainable soil quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.017>
- Ellis JG, Lagudah ES, Spielmeier W, Dodds PN (2014) The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*, **5**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641>
- El-Orabey WM, Hamwieh A, Ahmed SM (2019) Molecular markers and phenotypic characterization of adult plant resistance genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* and *Lr68* and their association with partial resistance to leaf rust in wheat. *Journal of Genetics*, **98**, 82. <https://doi.org/10.1007/s12041-019-1122-1>
- FAO I (2022) *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022: Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable*. FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, Rome, Italy. <https://doi.org/10.4060/cc0639en>
- Fedoroff NV (2015) Food in a future of 10 billion. *Agriculture & Food Security*, **4**, 11. <https://doi.org/10.1186/s40066-015-0031-7>
- Fellers JP, Sakthikumar S, He F, McRell K, Bakkeren G, Cuomo CA, Kolmer JA (2021) Whole-genome sequencing of multiple isolates of *Puccinia triticina* reveals asexual lineages evolving by recurrent mutations. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, **11**, jkab219. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab219>
- Figuroa M, Dodds PN, Henningsen EC (2020) Evolution of virulence in rust fungi — multiple solutions to one problem. *Current Opinion in Plant Biology*, **56**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.007>
- Fisher A, Coleman C, Hoffmann C, Fritz B, Rangel J (2017) The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) forager survival. *Journal of Economic Entomology*, **110**, 802–808. <https://doi.org/10.1093/jee/tox031>
- Fisher MC, Henk DanielA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, **484**, 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- French E, Kim B-S, Iyer-Pascuzzi AS (2016) Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **56**, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.05.015>
- Fry WE, Goodwin S, Matuszak J, Spielman L, Milgroom MG, Drenth A (1992) Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora Infestans*. *Annual Review of Phytopathology*, **30**, 107–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.000543>
- Fuchs M (2017) Pyramiding resistance-conferring gene sequences in crops. *Current Opinion in Virology*, **26**, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.004>



Fukuoka S, Yamamoto S-I, Mizobuchi R, Yamanouchi U, Ono K, Kitazawa N, Yasuda N, Fujita Y, Thi Thanh Nguyen T, Koizumi S, Sugimoto K, Matsumoto T, Yano M (2014) Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Scientific Reports*, **4**, 4550. <https://doi.org/10.1038/srep04550>

Gandon S, Michalakis Y (2000) Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Royal Society*, **267**, 985–990. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1100>

Garnault M, Duplaix C, Leroux P, Couleaud G, Carpentier F, David O, Walker A-S (2019) Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Management Science*, **75**, 1794–1807. <https://doi.org/10.1002/ps.5360>

Garnica DP, Nemri A, Upadhyaya NM, Rathjen JP, Dodds PN (2014) The ins and outs of rust haustoria. *PLOS Pathogens*, **10**, e1004329. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004329>

Germán S, Barcellos A, Chaves M, Kohli M, Campos P, Viedma L de, Germán S, Barcellos A, Chaves M, Kohli M, Campos P, Viedma L de (2007) The situation of common wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. *Australian Journal of Agricultural Research*, **58**, 620–630. <https://doi.org/10.1071/AR06149>

Ghatak A, Willocquet L, Savary S, Kumar J (2013) Variability in aggressiveness of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) isolates originating from rice leaves and necks: a case of pathogen specialization? *PLOS ONE*, **8**, e66180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066180>

Ghorbani R, Wilcockson S, Koocheki A, L Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants. *Sustainable Agriculture Reviews*. (ed Lichtfouse E), pp. 177–201. Springer Netherlands, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9654-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9654-9_10)

González AM, Marcel TC, Niks RE (2012) Evidence for a minor gene-for-minor gene interaction explaining nonhypersensitive polygenic partial disease resistance. *Phytopathology*, **102**, 1086–1093. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-12-0056-R>

Goyeau H, Berder J, Czerepak C, Gautier A, Lanen C, Lannou C (2012) Low diversity and fast evolution in the population of *Puccinia triticina* causing durum wheat leaf rust in France from 1999 to 2009, as revealed by an adapted differential set. *Plant Pathology*, **61**, 761–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02554.x>

Goyeau H, Halkett F, Zapater M-F, Carlier J, Lannou C (2007) Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genetics and Biology*, **44**, 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.02.006>

Goyeau H, Park R, Schaeffer B, Lannou C (2006) Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology*, **96**, 264–273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0264>

Gregory P (1948) The nature and prevention of cereal rusts as exemplified in the leaf rust of wheat. *Nature*, **161**, 220–221. <https://doi.org/10.1038/161220a0>

Hahn M (2014) The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *Journal of Chemical Biology*, **7**, 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>

Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Rosewarne GM, Periyannan SK, Viccars L, Calvo-Salazar V, Lan C, Lagudah ES (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **124**, 1475–1486. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>

Herrera-Foessel SA, Singh RP, Lillemo M, Huerta-Espino J, Bhavani S, Singh S, Lan C, Calvo-Salazar V, Lagudah ES (2014) *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **127**, 781–789. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2256-9>

Hovmøller M, Caffier V, Jalli M (2000) The European barley powdery mildew virulence survey and disease nursery 1993-1999. *Agronomie*, **20**, 729–743. <https://doi.org/10.1051/agro:2000172>

Hovmoller M, Walter S, Ali SS, Justesen AF, Hansen J, Lassen P, Bayles R, Flath K, Pope de Vallavieille CC (2012) The influence of mutation, recombination and exotic incursions on the recent dynamics of *Puccinia striiformis* in Europe. In: *Disease risk and food security. Proceedings of the 13th International cereal rusts and powdery mildews conference Session 2: population genetics and pathogen diversity.*, p. np. Wan-Quan CHEN, Beijing, China.

Hovmøller MS, Walter S, Bayles RA, Hubbard A, Flath K, Sommerfeldt N, Leconte M, Czembor P, Rodriguez-Algaba J, Thach T, Hansen JG, Lassen P, Justesen AF, Ali S, de Vallavieille-Pope C (2016) Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near-Himalayan region. *Plant Pathology*, **65**, 402–411. <https://doi.org/10.1111/ppa.12433>

Huang Y-J, Li Z-Q, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL, Balesdent M-H (2006) Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 Avirulence Function in *Leptosphaeria maculans* (Phoma Stem Canker of Oilseed Rape). *European Journal of Plant Pathology*, **114**, 77–89. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2643-4>

Hubbard A, Lewis CM, Yoshida K, Ramirez-Gonzalez RH, de Vallavieille-Pope C, Thomas J, Kamoun S, Bayles R, Uauy C, Saunders DG (2015) Field pathogenomics reveals the emergence of a diverse wheat yellow rust population. *Genome Biology*, **16**, 23. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0590-8>

Huerta-Espino J, Singh R, Crespo-Herrera LA, Villaseñor-Mir HE, Rodriguez-Garcia MF, Dreisigacker S, Barcenas-Santana D, Lagudah E (2020) Adult plant slow rusting genes confer high levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico. *Frontiers in Plant Science*, **11**, 824. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00824>

Huerta-Espino J, Singh RP, Germain S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, Bhardwaj

SC, Goyeau H (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, **179**, 143–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>

Huerta-Espino J, Singh RP, Reyna-Martinez J (2008) First detection of virulence to genes *Lr9* and *Lr25* conferring resistance to leaf rust of wheat caused by *Puccinia triticina* in Mexico. *Plant Disease*, **92**, 311–311. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0311A>

Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, Breen J, Prestler T, Ouzunova M, Keller B (2015) The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 8780–8785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502522112>

Imhoff MW (1982) Patterns of Bean Rust Lesion Size Increase and Spore Production. *Phytopathology*, **72**, 441. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-441>

Janzen DH (1980) When is it coevolution? *Evolution*, **34**, 611–612. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1980.tb04849.x>

Johnson R (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annual review of phytopathology*, **22**, 309–330. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PY.22.090184.001521>

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Jones DA, Takemoto D (2004) Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology*, **16**, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.016>

Karisto P, Dora S, Mikaberidze A (2019) Measurement of infection efficiency of a major wheat pathogen using time-resolved imaging of disease progress. *Plant Pathology*, **68**, 163–172. <https://doi.org/10.1111/ppa.12932>

Keen NT (1992) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Gene*, **24**, 447–463.

Kema GHJ, Mirzadi Gohari A, Aouini L, Gibriel HAY, Ware SB, van den Bosch F, Manning-Smith R, Alonso-Chavez V, Helps J, Ben M'Barek S, Mehrabi R, Diaz-Trujillo C, Zamani E, Schouten HJ, van der Lee TAJ, Waalwijk C, de Waard MA, de Wit PJGM, Verstappen ECP, Thomma BPHJ, Meijer HJG, Seidl MF (2018) Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector *AvrStb6* and strobilurin resistance. *Nature Genetics*, **50**, 375–380. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0052-9>

Kohn LM (1995) The clonal dynamic in wild and agricultural plant–pathogen populations. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 1231–1240. <https://doi.org/10.1139/b95-383>

Kolmer JA (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 435–455. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.435>

Kolmer JA (2005) Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.001>

Kolmer JA (2013) Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host hesistance. *Forests*, **4**, 70–84. <https://doi.org/10.3390/f4010070>

Kolmer JA (2019) Virulence of *Puccinia triticina* , the wheat leaf rust Fungus, in the United States in 2017. *Plant Disease*, **103**, 2113–2120. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1638-SR>

Kolmer JA, Jin Y, Long DL, Kolmer JA, Jin Y, Long DL (2007) Wheat leaf and stem rust in the United States. *Australian Journal of Agricultural Research*, **58**, 631–638. <https://doi.org/10.1071/AR07057>

Kolmer JA, Ordoñez ME, German S, Morgounov A, Pretorius Z, Visser B, Goyeau H, Anikster Y, Acevedo M (2019) Multilocus genotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in worldwide regions indicate past and current long-distance migration. *Phytopathology*®, **109**, 1453–1463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-18-0411-R>

Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, **323**, 1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>

Krenz JE, Sackett KE, Mundt CC (2008) Specificity of incomplete resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*®, **98**, 555–561. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0555>

Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S (2016) Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **35**, 38–55. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1148980>

Lannou C (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **50**, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173031>

Lannou C, Soubeyrand S (2017) CHAPTER 19: Measure of life-cycle traits of a biotrophic pathogen. In: *Exercises in Plant Disease Epidemiology, Second Edition* Epidemiology. (eds Samuel S, Christian L), pp. 149–152. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544426.019>

Leridon H (2020) World population outlook: explosion or implosion? *Population Societies*, **573**, 1–4.

Li F, Upadhyaya NM, Sperschneider J, Matny O, Nguyen-Phuc H, Mago R, Raley C, Miller ME, Silverstein KAT, Henningsen E, Hirsch CD, Visser B, Pretorius ZA, Steffenson BJ, Schwessinger B, Dodds PN, Figueroa M (2019) Emergence of the Ug99 lineage of the wheat stem rust pathogen through somatic hybridisation. *Nature Communications*, **10**, 5068. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12927-7>

Lindig-Cisneros R, Dirzo R, Espinosa-García FJ (2002) Effects of domestication and

agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in Phaseolus beans. *Ecological Research*, **17**, 315–321. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2002.00491.x>

Liu T, Bai Q, Wang M, Li Y, Wan A, See DR, Xia C, Chen X (2021) Genotyping *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* isolates with SSR and SP-SNP markers reveals dynamics of the wheat stripe rust pathogen in the United States from 1968 to 2009 and identifies avirulence-associated markers. *Phytopathology*, **111**, 1828–1839. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-21-0010-R>

Liu T-G, Chen WQ (2012) Race and virulence dynamics of *Puccinia triticina* in China during 2000–2006. *Plant Disease*, **96**, 1601–1607. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0460-RE>

Liu T, Wan A, Liu D, Chen X (2017) Changes of races and virulence genes in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the wheat stripe rust pathogen, in the United States from 1968 to 2009. *Plant Disease*, **101**, 1522–1532. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1786-RE>

Lovell DJ, Powers SJ, Welham SJ, Parker SR (2004) A perspective on the measurement of time in plant disease epidemiology. *Plant Pathology*, **53**, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01097.x>

Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA (2015) Chapter Two - The evolution of fungicide resistance. In: *Advances in Applied Microbiology* (eds Sariaslani S, Gadd GM), pp. 29–92. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

Mains E, Jackson H (1926) Physiologic specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology*, **16**, 89–120.

Malbrán I, Mourellos CA, Balatti PA, Lori GA (2018) Aggressiveness and genetic variability of *Fusarium graminearum* populations from the main wheat production area of Argentina. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.10.014>

Malhi GS, Kaur M, Kaushik P (2021) Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A Review. *Sustainability*, **13**, 1318. <https://doi.org/10.3390/su13031318>

Marcel TC, Gorguet B, Ta MT, Kohutova Z, Vels A, Niks RE (2008) Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *The New Phytologist*, **177**, 743–755. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02298.x>

Marinho M da C, Diogo BS, Lage OM, Antunes SC (2020) Ecotoxicological evaluation of fungicides used in viticulture in non-target organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 43958–43969. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10245-w>

Massi F, Torriani SFF, Borghi L, Toffolatti SL (2021) Fungicide resistance evolution and detection in plant pathogens: *Plasmopara viticola* as a case study. *Microorganisms*, **9**, 119. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010119>

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

- McDonald BA, Linde C (2002b) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 349–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- McDonald MJ, Rice DP, Desai MM (2016) Sex speeds adaptation by altering the dynamics of molecular evolution. *Nature*, **531**, 233–236. <https://doi.org/10.1038/nature17143>
- McDonald BA, Suffert F, Bernasconi A, Mikaberidze A (2022) How large and diverse are field populations of fungal plant pathogens? The case of *Zymoseptoria tritici*. *Evolutionary Applications*. <https://doi.org/10.1111/eva.13434>
- Mcdowell JM, Simon SA (2006) Recent insights into R gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, **7**, 437–448. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00342.x>
- McIntosh RA, Brown GN (1997) Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 311–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.311>
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Xia XC, Raupp WJ (2020) Catalogue of gene symbols for wheat : 2020 supplement. *Annual wheat newsletter*, **66**, 20.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) *Wheat rusts: an Atlas of resistance genes*. CSIRO Publishing. <https://doi.org/10.1071/9780643101463>
- McVey DV, Nazim M, Leonard KJ, Long DL (2004) Patterns of virulence diversity in *Puccinia triticina* on wheat in Egypt and the United States in 1998–2000. *Plant Disease*, **88**, 271–279. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.3.271>
- Mesterházy Á, Bartoš P, Goyeau H, Niks RE, Csösz M (2000) European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie*, **20**, 793–804. <https://doi.org/10.1051/agro:2000104>
- Miedaner T (2016) Breeding strategies for improving plant resistance to diseases. *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits* (eds Al-Khayri JM, Jain SM, Johnson DV), pp. 561–599. Springer International Publishing, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22518-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22518-0_15)
- Milgroom MG (1996) Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 457–477. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.457>
- Milus EA, Seyran E, McNew R (2006) Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Isolates in the South-Central United States. *Plant Disease*, **90**, 847–852. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0847>
- Möller M, Stukenbrock EH (2017) Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 756–771. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.76>
- Momas I, Caillard J-F, Lesaffre B (2004) Rapport de la Commission d'orientation du Plan national santé-environnement. *Environnement, Risques & Santé*, **3**, 141–144.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02600.x>

Montarry J, Hamelin FM, Glais I, Corbi R, Andrivon D (2010) Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-283>

Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, Huerta-Espino J, Lillemo M, Viccars L, Milne R, Periyannan S, Kong X, Spielmeier W, Talbot M, Bariana H, Patrick JW, Dodds P, Singh R, Lagudah E (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics*, **47**, 1494–1498. <https://doi.org/10.1038/ng.3439>

Mundt CC (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 381–410. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.011402.113723>

Mundt CC (2014) Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution*, **27**, 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.011>

Mushtaq M, Sakina A, Wani SH, Shikari AB, Tripathi P, Zaid A, Galla A, Abdelrahman M, Sharma M, Singh AK, Salgotra RK (2019) Harnessing genome editing techniques to engineer disease resistance in plants. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 150.

Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wisser R, Balint-Kurti P (2018) Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics*, **19**, 21–33. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.82>

Niks RE, Qi X, Marcel TC (2015) Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Annual Review of Phytopathology*, **53**, 445–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-115928>

Noel ZA, Longley R, Benucci GMN, Trail F, Chilvers MI, Bonito G (2022) Non-target impacts of fungicide disturbance on phyllosphere yeasts in conventional and no-till management. *ISME Communications*, **2**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00103-w>

Oberwinfler F (2012) Evolutionary trends in Basidiomycota. *STAFFIA*, 45–104.

Oliver RP (2014) A reassessment of the risk of rust fungi developing resistance to fungicides. *Pest Management Science*, **70**, 1641–1645. <https://doi.org/10.1002/ps.3767>

Orellana-Torrejón C, Vidal T, Boixel A-L, Gélisse S, Saint-Jean S, Suffert F (2022) Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: A compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology*, **71**, 289–303. <https://doi.org/10.1111/ppa.13458>

Papaix J (2011) Structure du paysage agricole et risque épidémique, une approche

démo-génétique. These de doctorat. Paris, AgroParisTech.

Papaix J, Goyeau H, Du Cheyron P, Monod H, Lannou C (2011) Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: an assessment based on wheat leaf rust epidemics. *New Phytologist*, **191**, 1095–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03764.x>

Pariaud B, Goyeau H, Halkett F, Robert C, Lannou C (2012) Variation in aggressiveness is detected among *Puccinia triticina* isolates of the same pathotype and clonal lineage in the adult plant stage. *European Journal of Plant Pathology*, **134**, 733–743. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0049-7>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-7-0869>

Park RF, Bariana HS, Wellings CR, Wallwork H (2002) Detection and occurrence of a new pathotype of *Puccinia triticina* with virulence for *Lr24* in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, **53**, 1069. <https://doi.org/10.1071/AR02018>

Park RF, Burdon JJ, Jahoor A (1999) Evidence for somatic hybridization in nature in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, the leaf rust pathogen of wheat. *Mycological Research*, **103**, 715–723. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007631>

Park RF, Goyeau H, Felsenstein FG, Bartoš P, Zeller FJ (2001) Regional phenotypic diversity of *Puccinia triticina* and wheat host resistance in western Europe, 1995. *Euphytica*, **122**, 113–127. <https://doi.org/10.1023/A:1012603500686>

Park RF, Wellings CR (2012) Somatic hybridization in the uredinales. *Annual Review of Phytopathology*, **50**, 219–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095405>

Parlevliet JE (1975) Partial resistance of barley to leafrust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. *Euphytica*, **24**, 21–27. <https://doi.org/10.1007/BF00147164>

Parlevliet JE (1978) Race-specific aspects of polygenic resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **84**, 121–126. <https://doi.org/10.1007/BF01976300>

Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, **17**, 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.17.090179.001223>

Parlevliet JE (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, **124**, 147–156.

Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin



R, Merdinoglu D, Mestre P (2010) Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology*, **10**, 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-147>

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. <https://doi.org/10.1111/mec.13980>

Pfender WF (2001) A temperature-based model for latent-period duration in stem rust of perennial ryegrass and tall fescue. *Phytopathology*®, **91**, 111–116. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.111>

Phan HTT, Jones DAB, Rybak K, Dodhia KN, Lopez-Ruiz FJ, Valade R, Gout L, Lebrun M-H, Brunner PC, Oliver RP, Tan K-C (2020) Low amplitude boom-and-bust cycles define the *Septoria Nodorum Blotch* interaction. *Frontiers in Plant Science*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01785>

Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M-C, Fournet S, Durel C-E, Delourme R (2017) Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, **8**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01838>

Pink DAC (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 227–236. <https://doi.org/10.1023/A:1015638718242>

Pretorius ZA, Bender CM (2010) First report of virulence for the wheat leaf rust (*puccinia triticina*) resistance gene *Lr32* in South Africa. *Plant Disease*, **94**, 381. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0381A>

Pringle A, Taylor J (2002) The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, **10**, 474–481. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02447-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02447-2)

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.7.762>

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.712>

Rosenthal JP, Dirzo R (1997) Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: Evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology*, **11**, 337–355. <https://doi.org/10.1023/A:1018420504439>

Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent M-H (2003) A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 871–881.

Russell PE (2005) A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*,

143, 11–25. <https://doi.org/10.1017/S0021859605004971>

Sache I (1997) Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). *Plant Pathology*, **46**, 581–589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-33.x>

Sacristán S, García-Arenal F (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 369–384. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x>

Samborski DJ, Dyck PL (1976) Inheritance of virulence in *Puccinia recondita* on six backcross lines of wheat with single genes for resistance to leaf rust. *Canadian Journal of Botany*, **54**, 1666–1671. <https://doi.org/10.1139/b76-179>

Sapoukhina N, Paillard S, Dedryver-Person F, Pope de Vallavieille CC (2013) Quantitative plant resistance in cultivar mixtures: wheat yellow rust as a modelling case study. *New Phytologist*, **200**, 888–897. <https://doi.org/10.1111/nph.12413>

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, **3**, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Sharma HC, Ortiz R (2002) Host plant resistance to insects: an eco-friendly approach for pest management and environment conservation. *Journal of Environmental Biology*, **23**, 111–135.

Shearer BL, Zadoks JC (1972) The latent period of *Septoria nodorum* in wheat. 1. The effect of temperature and moisture treatments under controlled conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **78**, 231–241. <https://doi.org/10.1007/BF01976431>

Singh RP, Huerta-Espino J (1997) Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on grain yield and agronomic traits of spring wheat. *Crop Science*, **37**, crops1997.0011183X003700020014x. <https://doi.org/10.2135/crops1997.0011183X003700020014x>

Singh R, Huerta-espino J, William H (2005) Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **29**, 121–127.

Singh H, Kaur J, Bala R, Srivastava P, Sharma A, Grover G, Dhillon GS, Singh RP, Chhuneja P, Bains NS (2022) Residual effect of defeated stripe rust resistance genes/QTLs in bread wheat against prevalent pathotypes of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *PLOS ONE*, **17**, e0266482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266482>

Singh RP, William HM, Huerta-Espino J, Rosewarne G (2004) Wheat rust in Asia: meeting the challenges with old and new technologies. In: 'New directions for a diverse planet', Proceedings of the 4th international crop science congress, 26 Sep–1 Oct 2004, Brisbane Australia, pp 1–13

Skolotneva ES, Leonova IN, Bukatich EY, Boiko NI, Piskarev VV, Salina EA (2018) Effectiveness of leaf rust resistance genes against *Puccinia triticina* populations in

Western Siberia during 2008–2017. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **125**, 549–555. <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0191-3>

Soubeyrand S, Garreta V, Monteil C, Suffert F, Goyeau H, Berder J, Moinard J, Fournier E, Tharreau D, Morris CE, Sache I (2017) Testing differences between pathogen compositions with small samples and sparse data. *Phytopathology*, **107**, 1199–1208. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0070-FI>

Sperschneider J, Dodds PN, Gardiner DM, Manners JM, Singh KB, Taylor JM (2015) Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLOS Pathogens*, **11**, e1004806. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004806>

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**, 661–667.

St.Clair DA (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, **48**, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081904>

Steele KA, Humphreys E, Wellings CR, Dickinson MJ (2001) Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* by use of molecular markers. *Plant Pathology*, **50**, 174–180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00558.x>

Steinberg G, Gurr SJ (2020) Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genetics and Biology*, **144**, 103476. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103476>

Sturz AV, Christie BR (2003) Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and Tillage Research*, **72**, 107–123. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00082-5](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00082-5)

Suffert F, Goyeau H, Sache I, Carpentier F, Gélisse S, Morais D, Delestre G (2018) Epidemiological trade-off between intra- and interannual scales in the evolution of aggressiveness in a local plant pathogen population. *Evolutionary Applications*, **11**, 768–780. <https://doi.org/10.1111/eva.12588>

Tagg N, Doncaster CP, Innes DJ (2005) Resource competition between genetically varied and genetically uniform populations of *Daphnia pulex* (Leydig): does sexual reproduction confer a short-term ecological advantage? *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 111–123. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00475.x>

Taylor JW, Hann-Soden C, Branco S, Sylvain I, Ellison CE (2015) Clonal reproduction in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 8901–8908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503159112>

Tollenaere C, Susi H, Nokso-Koivisto J, Koskinen P, Tack A, Auvinen P, Paulin L, Frilander MJ, Lehtonen R, Laine A-L (2012) SNP design from 454 sequencing of *Podosphaera plantaginis* Transcriptome reveals a genetically diverse pathogen metapopulation with high levels of mixed-genotype infection. *PLOS ONE*, **7**, e52492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052492>

Valen LV (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*. <https://doi.org/10.7208/9780226115504-022>

de Vallavieille-Pope C, Ali S, Leconte M, Delos M (2011) Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009. *Plant Disease*, **91**, 131-140. doi: 10.1094/PDIS-02-11-0078. PMID: 30731861

de Vallavieille-Pope C, Huber LL, Leconte M, Goyeau H (1995) Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* and *P. striiformis* on wheat seedlings. *Phytopathology*, **85**, 409–415.

Van der Plank JE (1968) *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York.

Vanzetti LS, Campos P, Demichelis M, Lombardo LA, Aurelia PR, Vaschetto LM, Bainotti CT, Helguera M (2011) Identification of leaf rust resistance genes in selected Argentinean bread wheat cultivars by gene postulation and molecular markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, **14**, 9–9.

Vidal T, Boixel A-L, Durand B, Vallavieille-Pope C de, Huber L, Saint-Jean S (2017) Reduction of fungal disease spread in cultivar mixtures: Impact of canopy architecture on rain-splash dispersal and on crop microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology*, **246**, 154. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.06.014>

Wang B, Brubaker CL, Tate W, Woods MJ, Burdon JJ (2008) Evolution of virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* using serial passage assays through susceptible cotton. *Phytopathology*®, **98**, 296–303. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-3-0296>

Water and agriculture - OECD

Wei X, Wang L, Zhang Y, Qi X, Wang X, Ding X, Zhang J, Zhang X (2014) Development of simple sequence repeat (SSR) markers of sesame (*Sesamum indicum*) from a genome survey. *Molecules*, **19**, 5150–5162. <https://doi.org/10.3390/molecules19045150>

Wellings CR, McIntosh RA (1990) *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first 10 years. *Plant Pathology*, **39**, 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02509.x>

Welz G (1988) Analysis of virulence in pathogen populations. In: *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology* (eds Kranz J, Rotem J), pp. 165–178. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-95534-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-95534-1_12)

Xu XM (1999) Effects of temperature on the latent period of the rose powdery mildew pathogen, *Sphaerotheca pannosa*. *Plant pathology*, **48**, 662–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00385.x>

Yates F (1954) The analysis of experiments containing different crop rotations. *Biometrics*, **10**, 324–346. <https://doi.org/10.2307/3001589>

Zadoks JC, Bouwman JJ (1985) 11 - Epidemiology in Europe. In: *Diseases*,

*Distribution, Epidemiology, and Control* (eds Roelfs AP, Bushnell WR), pp. 329–369. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-148402-6.50019-5>

Zhan J (2016) Population genetics of plant pathogens. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021269.pub2

Zhan J, Thrall PH, Burdon JJ (2014) Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. *Trends in Plant Science*, **19**, 570–575. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.010>

Zhang Y, Wang J, Yao Y, Jin X, Correll J, Wang L, Pan Q (2019) Dynamics of race structures of the rice blast pathogen population in Heilongjiang Province, China from 2006 through 2015. *Plant Disease*, **103**, 2759–2763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1741-RE>

Zhang J, Zhang P, Karaoglu H, Park RF (2017) Molecular characterization of Australian isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* supports long-term clonality but also reveals cryptic genetic variation. *Phytopathology*®, **107**, 1032–1038. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0334-R>

Ziya Motalebipour E, Kafkas S, Khodaeiaminjan M, Çoban N, Gözel H (2016) Genome survey of pistachio (*Pistacia vera* L.) by next generation sequencing: Development of novel SSR markers and genetic diversity in Pistacia species. *BMC Genomics*, **17**, 998. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3359-x>

# CHAPITRE 2: IS VIRULENCE PHENOTYPE EVOLUTION DRIVEN EXCLUSIVELY BY LR GENE DEPLOYMENT IN FRENCH *Puccinia triticina* POPULATIONS?

Ce chapitre est présenté sous forme d'article qui a été publié dans Plant Pathology le 10 juin 2022. Dans ce chapitre, les données du Survey national de la rouille brune issus des années 2006 à 2016 ont été analysées afin d'observer si l'influence des gènes *Lr* des variétés, permet à elle seule d'expliquer l'évolution et la prévalence de certains pathotypes de *P. triticina* dans le paysage.



Received: 16 March 2022 | Accepted: 26 May 2022  
DOI: 10.1111/ppa.13599

ORIGINAL ARTICLE



## Is virulence phenotype evolution driven exclusively by *Lr* gene deployment in French *Puccinia triticina* populations?

Cécilia Fontyn | Anne-Catherine Zippert | Ghislain Delestre | Thierry C. Marcel | Frédéric Suffert | Henriette Goyeau

Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Thiverval-Grignon, France

**Correspondence**  
Henriette Goyeau and Frédéric Suffert, Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France.  
Email: henriette.goyeau@inrae.fr; frederic.suffert@inrae.fr

**Funding information**  
European Commission, Grant/Award Number: RUSTWATCH773311-2; GNIS, Grant/Award Number: FSOVGrant; INRAE SPE, Grant/Award Number: PhD Fellowship; MESRI, Grant/Award Number: PhD Fellowship; Saclay Plant Science / ANR, Grant/Award Number: SPSSupportANR-17-EUR-007

### Abstract

*Puccinia triticina* is a highly damaging wheat pathogen. The efficacy of leaf rust control by genetic resistance is mitigated by the adaptive capacity of the pathogen, expressed as changes in its virulence combinations (pathotypes). An extensive *P. triticina* population survey has been carried out in France over the last 30 years, describing the evolutionary dynamics of this pathogen in response to cultivar deployment. We analysed the data set for the 2006–2016 period to determine the relationship between the *Lr* genes in the cultivars and virulence in the pathotypes. Rust populations were dominated by a small number of pathotypes, with variations in most of the virulence frequencies related to the corresponding *Lr* gene frequencies in the cultivated landscape. Furthermore, the emergence and spread of a new virulence matched the introduction and use of the corresponding *Lr* gene (*Lr28*), confirming that the deployment of qualitative resistance genes is an essential driver of evolution in *P. triticina* populations. However, principal component analysis (PCA) revealed that certain pathotype–cultivar associations cannot be explained solely by the distribution of *Lr* genes in the landscape. This conclusion is supported by the predominance of a few pathotypes on some cultivars, with the persistence of several other compatible pathotypes at low frequencies. Specific interactions are not, therefore, sufficient to explain the distribution of virulence in rust populations. The hypothesis that quantitative interactions between *P. triticina* populations and bread wheat cultivars—based on differences in aggressiveness—is also a driver of changes in pathotype frequencies deserves further investigation.

### KEYWORDS

aggressiveness, *Lr* gene, pathotype distribution, *Puccinia triticina*, varietal landscape, virulence

## 1 | INTRODUCTION

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* is one of the most damaging wheat diseases, with high yield losses worldwide (Savary et al., 2019). This pathogen is a heteroecious biotrophic fungus that can infect bread wheat (*Triticum aestivum*) and durum wheat (*T. durum*) as primary hosts. *P. triticina* requires an alternative host, *Thalictrum speciosissimum*, for its sexual

reproduction, and thus for completion of its life cycle (Kolmer, 2013). The alternative host is not naturally present in most places worldwide (including France), and *P. triticina* is therefore generally found exclusively in its uredinal and telial stages on wheat (Kolmer, 2013). The proportion of repeated genotypes is high and there is an excess of heterozygotes in European and French leaf rust populations, confirming the principal role of clonal reproduction (Goyeau et al., 2007; Kolmer et al., 2013).

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Plant Pathology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Society for Plant Pathology.

*Plant Pathology*, 2022, 71: 1511–1524.

wileyonlinelibrary.com/journal/ppa | 1511



## Is virulence phenotype evolution driven exclusively by *Lr* gene deployment in French *Puccinia triticina* populations?

### Authors:

Cécilia Fontyn, Anne-Catherine Zippert, Ghislain Delestre, Thierry C. Marcel, Frédéric Suffert, Henriette Goyeau

### Affiliations:

Université Paris Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France

### Abstract:

*Puccinia triticina* is a highly damaging wheat pathogen. The efficacy of leaf rust control by genetic resistance is mitigated by the adaptive capacity of the pathogen, expressed as changes in its virulence combinations (pathotypes). An extensive *P. triticina* population survey has been carried out in France over the last 30 years, describing the evolutionary dynamics of this pathogen in response to cultivar deployment. We analysed the data set for the 2006–2016 period to determine the relationship between the *Lr* genes in the cultivars and virulence in the pathotypes. Rust populations were dominated by a small number of pathotypes, with variations in most of the virulence frequencies related to the corresponding *Lr* gene frequencies in the cultivated landscape. Furthermore, the emergence and spread of a new virulence matched the introduction and use of the corresponding *Lr* gene (*Lr28*), confirming that the deployment of qualitative resistance genes is an essential driver of evolution in *P. triticina* populations. However, principal component analysis (PCA) revealed that certain pathotype–cultivar associations cannot be explained solely by the distribution of *Lr* genes in the landscape. This conclusion is supported by the predominance of a few pathotypes on some cultivars, with the persistence of several other compatible pathotypes at low frequencies. Specific interactions are not, therefore, sufficient to explain the distribution of virulence in rust populations. The hypothesis that quantitative interactions between *P. triticina* populations and bread wheat cultivars—based on differences in aggressiveness—is also a driver of changes in pathotype frequencies deserves further investigation.

**Keywords:** aggressiveness, *Lr* gene, pathotype distribution, *Puccinia triticina*, varietal landscape, virulence



## Introduction

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* is one of the most damaging wheat diseases, with high yield losses worldwide (Savary et al., 2019). This pathogen is a heteroecious biotrophic fungus that can infect bread wheat (*Triticum aestivum*) and durum wheat (*T. durum*) as primary hosts. *P. triticina* requires an alternative host, *Thalictrum speciosissimum*, for its sexual reproduction, and thus for completion of its life cycle (Kolmer, 2013). The alternative host is not naturally present in most places worldwide (including France), and *P. triticina* is therefore generally found exclusively in its uredinial and telial stages on wheat (Kolmer, 2013). The proportion of repeated genotypes is high and there is an excess of heterozygotes in European and French leaf rust populations, confirming the principal role of clonal reproduction (Goyeau et al., 2007; Kolmer et al., 2013).

Genetic resistance is the cheapest and most effective means of limiting leaf rust epidemics. Eighty *Lr* genes, most displaying gene-for-gene (qualitative) interactions, have been identified in wheat cultivars (Kumar et al., 2021). The gene-for-gene relationship depends on the presence of an avirulence (*Avr*) gene in the pathogen (Flor, 1971). A virulence phenotype, also called 'pathotype' or 'race', is defined by a virulence profile: two pathogenic strains are considered to belong to the same pathotype if they have the same combination of virulences. Some *Lr* genes express a partial type of resistance (quantitative or partial) at the adult plant stage. A large proportion of these adult plant resistance (APR) genes, which may have a minor to intermediate effect, appear to be 'race-nonspecific', that is their effect is independent of the virulence phenotype of the pathogen (Lagudah, 2011). However, adult plant resistance genes might express through a strain-specific interaction (Niks et al., 2015). Such resistance reduces disease symptoms, as shown, for example for *Lr34*, which increases the latency period and decreases the production of uredinia (Drijepontd & Pretorius, 1989), or for *Lr46*, *Lr67*, *Lr68*, *Lr74*, *Lr77* and *Lr78* (Huerta-Espino et al., 2020; McIntosh et al., 2020), which increase the latency period and result in the production of fewer, smaller pustules.

Host genetic resistance can be overcome or eroded as a result of the evolution of pathogen populations. Indeed, despite their clonality, *P. triticina* populations are characterized by high diversity, achieved through a combination of asexual reproduction, mutation and migration between wheat-growing areas via the long-distance dispersal of urediniospores. Somatic exchanges in *P. triticina* can also be a significant source of diversity and allelic rearrangements, leading to new combinations of virulence genes (Figueroa et al., 2020). The evolution of *P. triticina* populations is heavily influenced by gene-for-gene interactions, expressed as 'boom-and-bust' cycles of resistance (McDonald & Linde, 2002). Typically, a wheat cultivar with a new single resistance gene is introduced widely into the landscape (boom), and the selection pressure imposed by this resistant cultivar then leads to adaptation of the pathogen population, by mutation, from avirulence to virulence. The new resistance gene loses efficacy as the new virulent population of the pathogen increases (bust) by

host resistance gene selection (McDonald & Linde, 2002). In this way, the pathogen has developed virulence towards most of the existing *Lr* genes, but the frequencies and combinations of avirulence genes in pathogen populations vary over space and time (Kolmer, 2013).

The adaptation dynamics of *P. triticina* populations within the varietal landscape result in a rapid, continuous turnover of the predominant virulence phenotypes. Surveys of both host and pathogen populations in the main wheat-growing areas are therefore essential to increase the efficacy and durability of genetic resistances. Leaf rust populations have been monitored for a number of years through field surveys performed around the world (Kosman et al., 2019; Liu & Chen, 2012; Prasad et al., 2017). These surveys aim to evaluate changes in the prevalence and landscape distribution of virulence phenotypes, and to detect any new pathotypes (new virulences and combinations of virulences) that might pose a threat to wheat cultivars with effective leaf rust resistance genes. The data sets generated by these surveys are valuable resources that can help breeders and extension services to propose cultivar deployment strategies both to control leaf rust and to improve the durability of the resistance genes used. Thatcher near-isogenic lines (NILs) were developed to standardize the comparison of virulences between *P. triticina* populations of different geographical origins (McIntosh et al., 1995) and have been used in diverse surveys around the world since 1993.

Most surveys have described only virulence combinations in *P. triticina* populations. Others have linked the virulences in the pathogen population to the *Lr* genes in the cultivars deployed, thereby highlighting the influence of cultivar landscape on the evolution of *P. triticina* populations at large spatiotemporal scales. Such surveys were conducted at the European scale for the 1996–1999 period (Mesterházy et al., 2000), and more recently, from 2018 to 2021, in the European RustWatch research programme (<http://rustwatch.au.dk/>). Virulence frequencies mostly depend on the leaf rust resistance genes present in the most common varieties in the landscape. Similar results were also obtained in the United States (Kolmer, 2019). In France, the *Lr* gene content of newly released varieties is postulated each year, making it possible to provide a comprehensive and continuous snapshot of the frequency of these genes at landscape level. The *Lr* gene composition of two-thirds of the cultivars present in the French landscape under wheat from 1983 to 2007 has been analysed, with the *Lr13* gene predominating, being found in 67% of cultivars (Goyeau & Lannou, 2011). French leaf rust populations have been monitored for the last 30 years. The populations of strains collected over the 1999–2002 period had highly diverse *P. triticina* virulence phenotypes, with 104 different pathotypes identified (Goyeau et al., 2006). However, the survey revealed domination by a single pathotype (073 100 0) coinciding with a period during which the cultivar landscape was dominated by the cultivar Soissons (up to 40% in 1993). Pathotype 073 100 0 was found to be more aggressive on this cultivar than other virulent pathotypes (Pariaud, et al., 2009b). This adaptation to Soissons, probably due to the absence of an effective *Lr* gene, greater aggressiveness and the high frequency of this cultivar in the

landscape, led to the domination of pathotype 073 100 0 from 1999 to 2002. The French wheat landscape tended to diversify thereafter, and the frequency of pathotype 073 100 0 decreased following the decline of Soissons in the landscape (Papaix et al., 2011). The impact of host quantitative resistance on the evolution of the aggressiveness spectrum of pathogen populations is much less well documented than the impact of *Lr* genes on the prevalence of virulence phenotypes. However, it has been shown that fungal pathogens can evolve and adapt to quantitative resistance through selection for greater aggressiveness (Delmas et al., 2016; Frézal et al., 2018).

The objective of this study was to investigate whether *Lr* gene distribution in the varietal landscape accounts for the prevalence of most of the pathotypes, and/or whether some pathotype–cultivar associations cannot be explained solely by this *Lr* gene distribution. To this end, we determined the impact of the overall composition of the varietal landscape on the evolution of *P. triticina* populations over a decade. We gathered data on (a) host, based on postulation of the leaf rust resistance (*Lr*) genes in the cultivars, and (b) pathogen, based on annual surveys over the 2006–2016 period of *P. triticina* virulence phenotypes (pathotypes) across France.

## **Materials and methods**

### ***Pathogen population sampling***

*P. triticina* isolates were sampled annually during the 2006–2016 period from a network of nurseries not sprayed with fungicide at about 50 different sites in wheat-growing areas of France. Samples were collected by breeders (the French Wheat Breeders group Recherches Génétiques Céréales, CETAC) and extension services (ARVALIS-Institut du Végétal). The sampling effort focused on the most widely grown bread wheat cultivars, hereafter referred to as major cultivars (i.e., 35 cultivars, each grown on at least 2% of the French wheat-growing area; Table 1), planted in small plots (10–20 m<sup>2</sup>) in all nurseries. The cumulative area under wheat planted with these cultivars accounted for between 42.9% and 56.0% of the total bread wheat landscape, depending on the year. For each plot, a few infected leaves of each major cultivar were collected in May or June of each year. A single pustule (uredinium) was selected and urediniospores were collected to obtain one isolate per cultivar and site. Leaf rust samples were also collected from minor bread wheat cultivars (i.e., cultivars grown on less than 2% of the French wheat-growing area) growing in the same nurseries. These minor cultivars were not necessarily present at all sites. The sample obtained from minor cultivars was therefore generally smaller than the sample from major cultivars. Between 75% (2016) and 95% (2010) of the total number of isolates were collected from major cultivars (Table 2).

**Table 1.** Bread wheat area (as a percentage) under various cultivars in France during the 2006-2016 period<sup>a</sup>. Only bread wheat cultivars accounting for at least 2% of the wheat-growing area for at least one year are indicated<sup>b</sup>, with their year of registration and postulated leaf rust resistance genes

Cultivar	Registration year	Postulated resistance genes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Sponsor	1995	<i>Lr13</i>	2										
Charger	1997	<i>Lr10, Lr13</i>	5										
Autan	2001	<i>Lr37</i>	3										
Nirvana	2002	<i>Lr13, Lr37</i>	4	2.3									
Orvantis	2000	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	4	3.2									
Isengrain	1997	<i>Lr14a</i>	4	3.4	3								
Soissons	1988	<i>Lr14a</i>	4	3.8	3	2							
Sankara	2004	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	3	8	9	5	3						
Caphorn	2001	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	13	<b>13</b>	<b>12</b>	8	5	2.5					
Rosario	2004	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>		2.9									
Toisondor	2004	<i>Lr2a, Lr3ka, Lr13</i>		2.6	4	3							
Mendel	2004	<i>Lr13</i>		3.6	4								
PR22R58	UE	<i>Lr1, (Lr2c)<sup>c</sup>, (Lr14a)</i>			2								
Mercato	2002	<i>(Lr14a), Lr37</i>			3	5	2						
Aubusson	2002	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>			3								
Koreli	2007	<i>Lr14a, Lr37</i>				2	2	2.7					
Premio	2007	<i>Lr14a, Lr37</i>				6	8	7.6	3.2				
Apache	1998	<i>Lr13, Lr37</i>	<b>14</b>	11	11	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>10.1</b>	<b>9.3</b>	<b>8</b>	6.2	5	3.5
Bermude	2007	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>				3	5	4.3	4.2	3			
Alixan	2005	<i>Lr13, Lr14a</i>				2	3	2.9	2.9	2.9	2.8		
Altigo	2007	<i>Lr3, Lr13, Lr37</i>					4	6.7	7.5	6.3	4.6		
Arezzo	2008	<i>Lr10, Lr14a, Lr37</i>					2	5.6	6.4	7.9	<b>6.6</b>	4.7	3.8
Euclide	2007	-						2.9	3.2				
Expert	2008	<i>Lr1, Lr13</i>						2.7	3.7	3.6	3.1	1.9	
Barok	2009	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>							2.2	2.3	2.4		
Boregar	2008	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>							2.6	2.8	4.3	4.5	3.8
Solehio	2009	<i>Lr14a, Lr37</i>								2.5			
Pakito	2011	<i>Lr13, Lr37</i>								3.6	4.3	3.4	2.3
Cellule	2011	<i>Lr3</i>									3.1	6.3	7.9
Rubisko	2012	<i>(Lr14a), Lr28, (Lr37)</i>									6.5	<b>11.9</b>	<b>12.8</b>
Trapez	2009	<i>Lr13, Lr37</i>										2	
Bergamo	2012	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>										2.1	2.2
Oregrain	2012	<i>Lr13, Lr28, Lr37</i>										2	3.8
Terroir	2012	<i>Lr28</i>											2
Fructidor	2014	<i>Lr13, Lr14a</i>											5
Cumulated area			56	53.8	54	48	45	48	45.2	42.9	43.9	43.8	47.1

<sup>a</sup> Data from FranceAgrimer.

<sup>b</sup> The percentage of the area under the most widely grown cultivar for each year is indicated in bold typeface.

<sup>c</sup> Postulations given between brackets would need further validation with appropriate isolates.

**Table 2.** Number of isolates collected from the 35 major French wheat cultivars during the 2006-2016 period. Only bread wheat cultivars accounting for at least 2% of the wheat-growing area for at least one year are indicated, with their year of registration and postulated leaf rust resistance genes

Cultivar	Registration year	Postulated resistance genes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Sponsor	1995	<i>Lr13</i>											
<b>Charger</b>	1997	<i>Lr10, Lr13</i>	26	24	8	1	1						
Autan	2001	<i>Lr37</i>		2									
Nirvana	2002	<i>Lr13, Lr37</i>		1	1								
<b>Orvantis</b>	2000	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	39	48	16	1	2	1					
<b>Isengrain</b>	1997	<i>Lr14a</i>	13	22	10	3	4	4	2				
<b>Soissons</b>	1988	<i>Lr14a</i>	37	44	31	23	21	29	8	4	5	4	
<b>Sankara</b>	2004	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	10	21	18	18	6	6	1				
<b>Caphorn</b>	2001	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	45	64	41	33	27	18	1				
Rosario	2004	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	1										
Toisonдор	2004	<i>Lr2a, Lr3ka, Lr13</i>			2			2					
<b>Mendel</b>	2004	<i>Lr13</i>	4	13	18								
PR22R58	UE	<i>Lr1, (Lr2c)<sup>a</sup>, (Lr14a)</i>		8	2	1	1				1		
Mercato	2002	<i>(Lr14a), Lr37</i>		2									
<b>Aubusson</b>	2002	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>	11	28	18	23	29	33	21	1			
Koreli	2007	<i>Lr14a, Lr37</i>	1		1	1		1	1				
<b>Premio</b>	2007	<i>Lr14a, Lr37</i>			1	29	34	55	45				
Apache	1998	<i>Lr13, Lr37</i>	47	71	43	44	38	62	50	39	46	45	21
<b>Bermude</b>	2007	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>					16	38	35	24	31	30	
Alixan	2005	<i>Lr13, Lr14a</i>	1			1		1	1				
<b>Altigo</b>	2007	<i>Lr3, Lr13, Lr37</i>		1			2	3	35	26	11		
<b>Arezzo</b>	2008	<i>Lr10, Lr14a, Lr37</i>					25	47	49	37	50	60	28
Euclide	2007	-						1					
<b>Expert</b>	2008	<i>Lr1, Lr13</i>						2	21	16	16	16	5
Barok	2009	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>					1						
Boregar	2008	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>											
<b>Solehio</b>	2009	<i>Lr14a, Lr37</i>							37	31	36	41	26
<b>Pakito</b>	2011	<i>Lr13, Lr37</i>							34	33	38	28	
<b>Cellule</b>	2011	<i>Lr3</i>							2	5	45	38	35
<b>Rubisko</b>	2012	<i>(Lr14a), Lr28, (Lr37)</i>							1	7	14	34	18
Trapez	2009	<i>Lr13, Lr37</i>										1	
Bergamo	2012	<i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>											
<b>Oregrain</b>	2012	<i>Lr28</i>							4	9	17	39	26
Terroir	2012	<i>Lr28</i>									13	17	8
<b>Fructidor</b>	2014	<i>Lr13, Lr14a</i>										1	16
Others minor cultivars			71	69	28	14	10	28	63	63	54	62	62
Total			306	418	238	192	217	331	411	295	377	416	245
% of isolates collected on major wheat cultivars			77	83	88	93	95	92	85	79	86	85	75

<sup>a</sup> Postulations given between brackets would need further validation with appropriate isolates.

Cultivars accounting for more than 2% of the pathogen samples in a given year are shown in bold typeface.

### **Pathotype determination**

The pathotype of each *P. triticina* isolate (i.e., its virulence combination) was determined in planta, by inoculating a differential set of wheat lines as described by Goyeau et al. (2006). Before inoculation, all healthy plant material was grown in cabinets with filtered air, in a glasshouse at temperatures between 15 and 20°C and with a 14-h photoperiod (daylight supplemented with light from 400 W sodium lamps). Infected leaves collected in the field were wiped gently on 7-day-old seedlings of the wheat cv. Michigan Amber treated with 15 ml maleic hydrazide solution (0.25 g/L) to prevent the emergence of secondary leaves and to increase the size of uredinia. Inoculated seedlings were placed for 24 h in a dew chamber at 15°C, then in the glasshouse. One week after inoculation, the seedlings were trimmed so that only one plant with one uredinium remained in each pot. Cellophane bags were then placed over the pots to prevent contamination between isolates. Spores from a single uredinium were then multiplied to produce batches of spores for storage and/or inoculation of a differential set of plant lines. To this end, the spores were collected in a gelatin capsule (size 00) with a cyclone collector 10 days after inoculation. The collected spores were then diluted by adding 0.5 ml of light mineral oil to each capsule, and the resulting spore suspension was sprayed onto 7-day-old Michigan Amber seedlings. The differential sets were sown in pressed-peat pots (3 × 3 cm<sup>2</sup>) containing a commercial compost (peat substrate; Gebr. Brill Substrate), with four seedlings per pot and two pots per line (eight seedlings for each differential line). The differential set consisted of 20 lines (18 Thatcher NILs carrying *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26* and *Lr37*; CS2A/2 M carrying *Lr28*; and the Australian wheat cv. Harrier carrying *Lr17b*; Singh et al., 2001) and the susceptible wheat cultivar Morocco as a control. After inoculation with each spore suspension, the sets were placed in a dew chamber for 24 h at 15°C and then in a greenhouse compartment maintained at a temperature between 18 and 22°C with a 16-h photoperiod (daylight supplemented with 400 W sodium lamps). The infection type on the differential lines was scored visually 11 days after inoculation, based on the 0–4 scale described by Stakman et al. (1962). Each isolate was assigned a seven-digit code adapted from the scoring system proposed by Gilmour (1973). The 20 lines of the differential set (18 NILs, CS2A/2 M and Harrier) were arranged in six sets of three lines, and one set of two *Lr* genes, with each tested isolate assigned an octal pathotype code.

### **Postulation of resistance genes present in the major wheat cultivars**

We postulated the *Lr* genes present in the 35 major French wheat cultivars (Table 1) by performing multipathotype tests in a growth chamber under the conditions described above for pathotype determination. The set of standard *P. triticina* isolates used was changed over time, according to the availability of new virulence combinations, to improve the reliability of postulations. Over the 2006–2016 period, this set consisted of 24 isolates (Table S1). A spore suspension (3 mg of spores per ml of mineral oil)

was sprayed onto the first leaves of 12 seedlings of each cultivar, with 0.7 ml suspension applied per tray of 20 cultivars. We included a set of 23 differential cultivars in each test, to check the identity and purity of each isolate and the infection type (Table S2). Infection types were scored with the scale described by Stakman et al. (1962).

### **Data analysis**

The diversity of virulence phenotypes in the population was estimated with the Shannon-Weaver index ( $H'$ ):

$$H' = - \sum (p_i \ln(p_i))$$

where  $p_i$  is the frequency of the  $i^{\text{th}}$  phenotype.

As  $H'$  depends on phenotype frequency, and also on the number of phenotypes (richness), confidence intervals were calculated with the Jackknife procedure of the Species-Richness Prediction and Diversity Estimation packages of R software (Zahl, 1977). Evenness was assessed by calculating the  $E_5$  index, also known as the modified Hill's ratio (i.e. the ratio of the number of abundant phenotypes to the number of rarer phenotypes):

$$E_5 = \frac{(G - 1)}{(N_1 - 1)}$$

with  $G = 1/\sum p_i^2$  and  $N_1 = e^{H'}$ .

The Stoddart and Taylor index  $G$  represents the number of abundant phenotypes and  $N_1$  represents the number of rarer phenotypes. This index is less dependent on phenotype richness than other evenness indices.  $E_5$  approaches 0 as a single phenotype begins to predominate (Alatalo, 1981).

We first estimated the correlation between the frequency of five of the most abundant pathotypes over the entire 2006-2016 period and their frequency on each of eight of the most widely grown French wheat cultivars during the same period, by calculating Pearson's correlation coefficient:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

where  $x$  represents the pathotype frequency in the landscape and  $y$  its frequency on the eight most widely grown cultivars. Only compatible interaction between pathotypes and cultivars were considered.

We then performed a principal component analysis (PCA) for each year from 2006 to 2016, for: (a) major cultivars, defined as a cultivar accounting for more than 2% of the pathogen samples in a given year, i.e. 19 of the 35 cultivars presented in Table 2, and (b) the most abundant pathotypes, defined as pathotypes with a frequency on the 35 major cultivars exceeding 2% in a given year. The data used for this PCA regrouped only compatible interactions between pathotypes and cultivars. The cultivar Apache was not included in this analysis, because it was considered to display “neutral” behavior, based on the results of the previous overall correlation analysis (see the Results and Discussion sections). The PCA of the association between these two components was visualized with the FactoMinerR package (v.2.4) of R software.

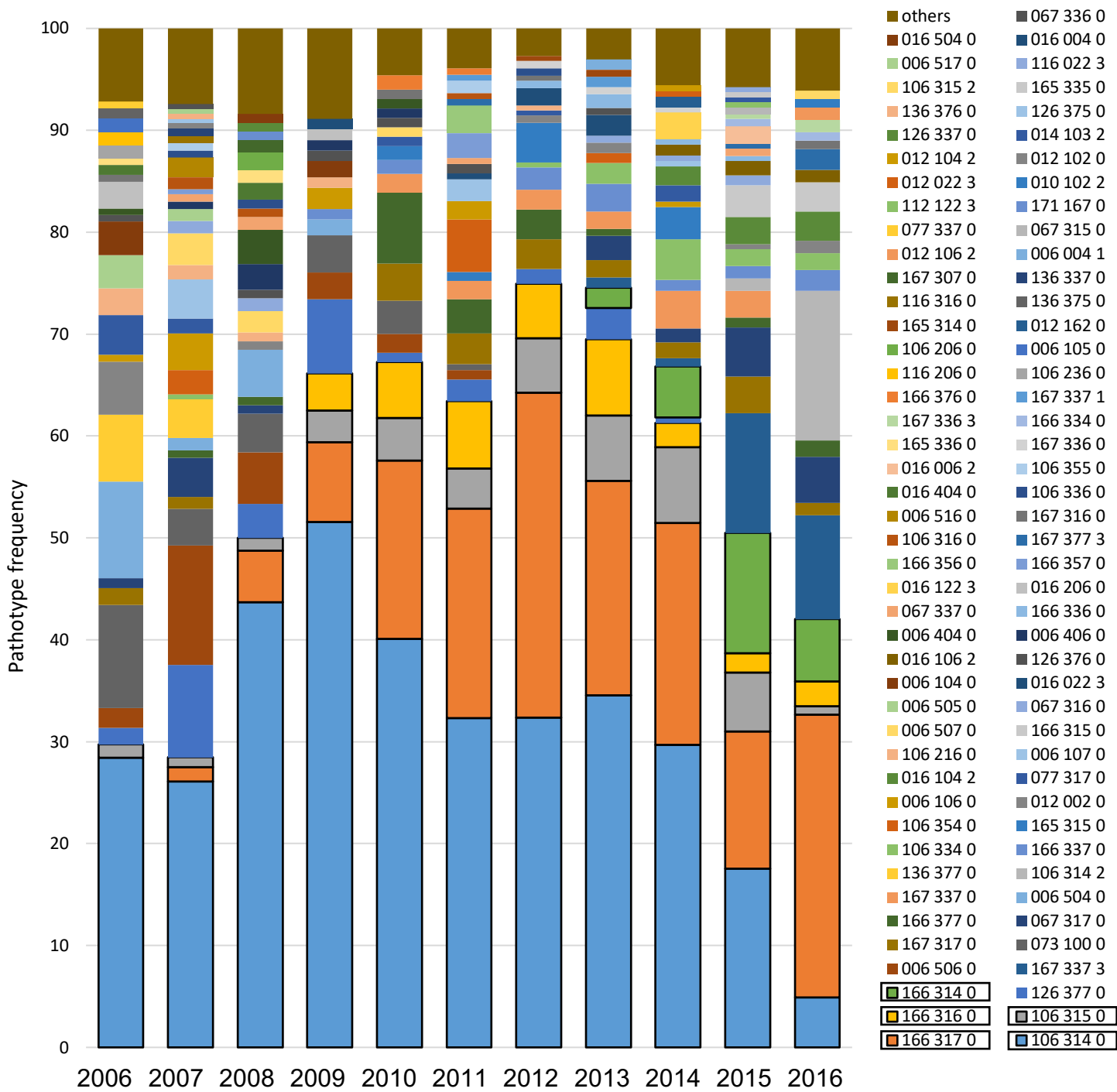
## Results

### ***Diversity of the P. triticina population***

Two pathotypes dominated the 2006–2016 period in France: 106 314 0 (virulences 1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37) and 166 317 0 (virulences 1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37) (Figure 1). From 2006 to 2015, 106 314 0 was the most frequent pathotype, increasing from 28% in 2006 to 51% in 2009, and then decreasing slightly in frequency to reach a plateau at 30%–33% from 2011 to 2014. In 2016, its frequency declined sharply to less than 5%. The other dominant pathotype, 166 317 0, appeared in the landscape in 2007 at a very low frequency (1.4%), then gradually increased to peak at a frequency of 32% in 2012. From 2013 to 2015, the frequency of 166 317 0 decreased to 13%, before increasing to 28% in 2016. Moreover, in 2015, two new pathotypes virulent against *Lr28* appeared (Figure 1): 106 314 2, which had an initial frequency of 1% in 2015, increasing to 14% in 2016; and 167 337 3, which had an initial frequency of 12% in 2015, staying at 10% in 2016. Taken together, these two pathotypes accounted for 24% of the total *P. triticina* population in 2016.

With the exception of the four abovementioned pathotypes, the frequency of individual pathotypes never exceeded 11% annually. The overall proportion of all other pathotypes decreased from 73% in 2006 and 2007 to 36% in 2012, before increasing again to 50% over the last 2 years of the time period studied (see Table S3 for details). This overall trend was formalized by a decrease in pathotype diversity from 2009 to 2014, with richness (31) and Shannon–Weaver index ( $H' = 2.15$ ) values lowest in 2012 (Figure 1), subsequently increasing until 2015 (richness = 53 and  $H' = 3.04$ ), before declining again in 2016 (richness = 38 and  $H' = 2.83$ ). The evenness of pathotype distribution, represented by the  $E_5$  index, remained stable over the 2006–2016 period (ranging from 0.38 to 0.54), but with a transient decrease in 2008 (0.26) and 2009 (0.29).





Sample size	306	418	238	192	217	331	411	295	377	416	245
Richness	48	65	46	33	29	37	31	32	46	53	38
Diversity (H')	2.99	3.19	2.75	2.27	2.35	2.57	2.15	2.44	2.67	3.04	2.83
Confidence interval	2.80-3.17	3.01-3.37	2.54-2.95	1.98-2.56	2.15-2.55	2.41-2.73	2.01-2.30	2.27-2.61	2.50-2.84	2.91-3.17	2.62-3.04
Evenness (E <sub>5</sub> )	0.41	0.38	0.26	0.29	0.41	0.43	0.48	0.44	0.54	0.52	0.45

**Figure 1.** Frequency of *Puccinia triticina* pathotypes during the 2006-2016 period and associated indexes of richness (number of virulent phenotypes), diversity (H'), and evenness (E<sub>5</sub>). Confidence interval was calculated for the Shannon-Weaver diversity index (H') using the Jackknife procedure. Pathotypes were characterized on a differential set of 20-*Lr* genes. Five of the most prevalent pathotypes during the period, including 106 314 0 and 166 317 0, are framed. "Others" corresponds to pathotypes found annually only once.

## **Changes in virulence frequencies in the pathogen population and prevalence of the corresponding resistance *Lr* genes in the varietal landscape**

Virulences could be categorized into three groups according to the pattern of change in their frequencies in the French *P. triticina* population during the 2006–2016 period. The first group (Figure 2a, represented in blue) included virulences against *Lr14a*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr37*, *Lr17*, *Lr15* and *Lr1*, with the frequency in the pathogen population increasing rapidly to more than 80% from 2009 to 2016. In terms of the frequency of the corresponding *Lr* genes in the host population (Figure 2b), *Lr13* and *Lr37* were the most represented, with a frequency above 56%, peaking at 72% for *Lr13* in 2006. The frequency of *Lr14a* was initially 16% in 2006 and increased to 46% in 2016. The frequency of *Lr1* was stable at 6% over the 11 years. *Lr10* was the only resistance gene for which a decrease in frequency was observed, from 40% in 2006 to 15% in 2016.

The second group (Figure 2a, represented in green) included virulences against *Lr17b*, *Lr3*, *Lr3bg* and *Lr26*, with a first peak in frequency at the start of the study period (e.g., virulence 17b at 60% in 2007), followed by a transient decrease and then a gradual increase in frequency to between 57% (virulence 26) and 80% (virulence 17b) in 2016. Two of these four genes, *Lr17b* and *Lr3bg*, were never postulated in the cultivars, whereas the frequency of *Lr26* remained stable over the entire period, at less than 3%, and that of *Lr3* increased steadily, from 1% in 2006 to 16% in 2016 (Figure 2b), making *Lr3* the fifth most frequent *Lr* gene in 2016.

The third group (Figure 2a, represented in brown) comprised four virulences against *Lr20*, *Lr3ka*, *Lr2c* and *Lr23*, with frequencies that remained below 30%. Of the four corresponding *Lr* genes, only *Lr3ka* and *Lr2c* were postulated in the cultivars, at a very low frequency: less than 7% for *Lr2c* and 3% for *Lr3ka* (Figure 2b).

Virulence against *Lr16*, which had a frequency of about 16% at the start of the study period (Figure 2a), was no longer detected after 2011, and *Lr16* was never postulated in the cultivars.

New virulences emerged in 2011 (Figure 2a, represented in red), increasing in frequency until 2016, to values of 15% for virulence 24 and 37% for virulence 28. The frequency of *Lr24* in the cultivars remained very low, at less than 1% (data not shown). The frequency of *Lr28* in the cultivars increased steadily, from 1% in 2012 to 19% at the end of the study period (Figure 2b, represented in red).

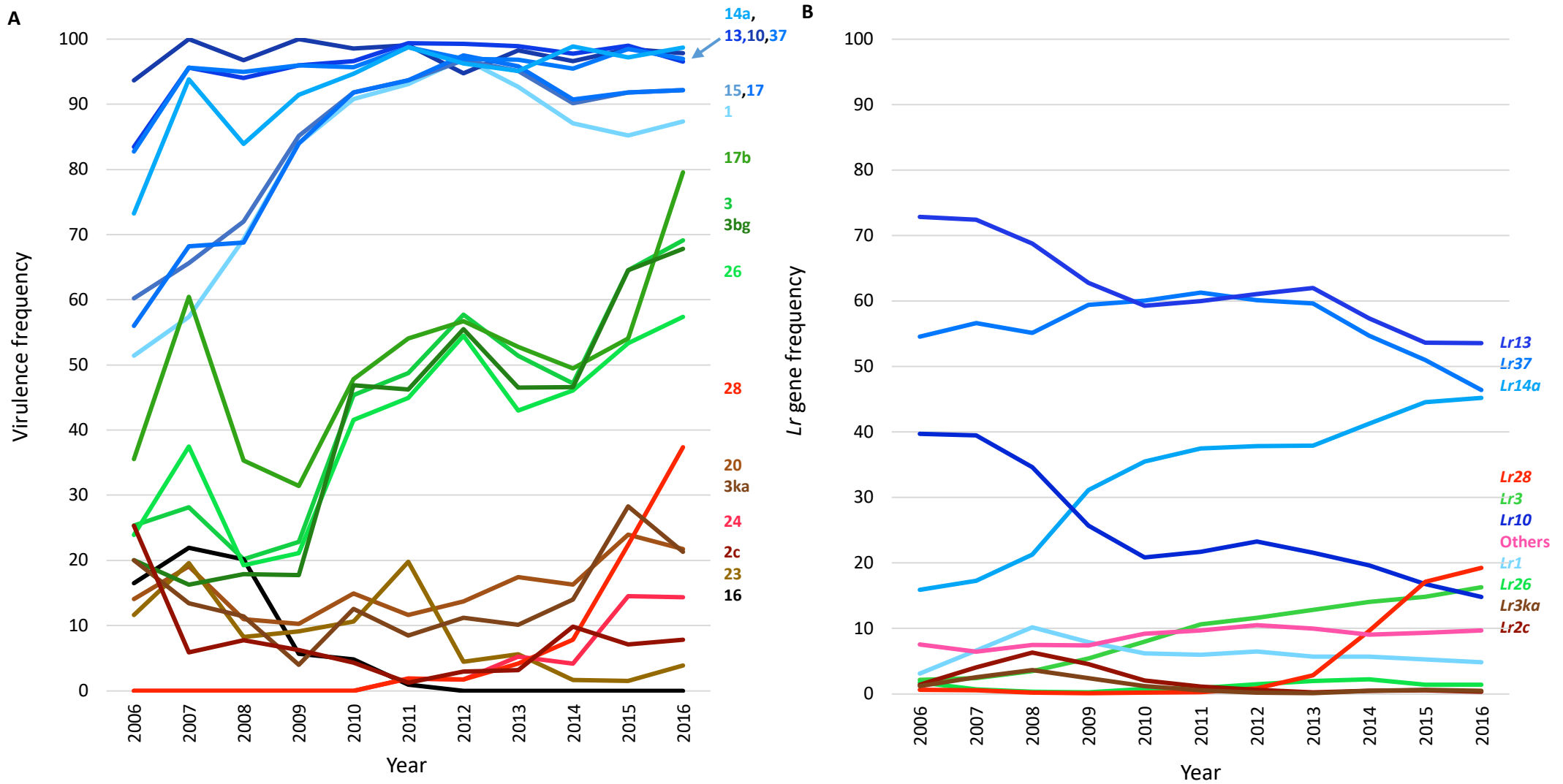
Part of the landscape, consistently about 10% over the 2006–2016 period, was planted with cultivar mixtures, unidentified cultivars, or cultivars carrying unidentified genes (Figure 2b). Over the 2006–2016 period, more than 81% of the pathotypes, including the major pathotypes 106 314 0 and 166 317 0, carried virulences 10, 13, 14a and 37 (Table S4). Thus, these pathotypes were virulent on the most frequent *Lr*

genes, and consequently on 28 of the 35 most widely grown cultivars (Table 1). In addition, pathotype 166 317 0 carried virulence 3, leading to a compatible interaction with 30 of the 35 most widely grown cultivars.

### ***Pattern of association between P. triticina pathotypes and wheat cultivars***

The frequency of four of the five most frequent pathotypes in the landscape (106 314 0, 106 315 0, 166 314 0 and 166 317 0) was correlated with their frequency on Apache over the entire 2006–2016 period ( $p < 0.01$ ; Table 3), meaning that their frequencies evolved in the same way and proportion in the landscape and on this cultivar. Apache was the only cultivar for which this was the case over the whole period. This result justified a PCA excluding Apache, which was considered to display neutral behaviour (see Discussion section), to make it possible to detect associations.

The frequency in the landscape of pathotype 106 314 0, which is avirulent on cultivars Altigo and Cellule carrying *Lr3*, was significantly correlated with its frequency on cultivars Arezzo, Apache and Premio, but not with its frequency on Expert, Aubusson or Bermude, over the entire 2006–2016 period (Table 3). The PCA refined the association between the major cultivars and the most abundant pathotypes for each year of the 2006–2016 period separately, and thus independently of changes in the pathogen population that could potentially alter or hide such a relationship in an overall analysis of the whole data set. The first dimension of the PCA explained at least 48.9% and, at most, 79.1% of the variability, depending on the year considered (Figure 3). Based on the PCA results, we distinguished a group of cultivars associated with pathotype 106 314 0 (virulences 1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37) from a group of cultivars associated with 166 317 0 (virulences 1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37). Pathotype 106 314 0 was always associated with several cultivars, the precise identity of which depended on the year: Aubusson (*Lr10*, *Lr13*, *Lr37*), Sankara (*Lr10*, *Lr13*, *Lr37*) and Charger (*Lr10*, *Lr13*), from 2006 to 2009, then Arezzo (*Lr10*, *Lr14a*, *Lr37*) in 2010 and 2011, and subsequently Bermude (*Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr37*) and Aubusson until 2015. In 2015, new associations with cultivars Pakito (*Lr13*, *Lr37*), Solehio (*Lr14a*, *Lr37*) and Expert (*Lr1*, *Lr13*) were highlighted. In 2016, 106 314 0 (virulences 1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37) was weakly associated with only one cultivar, Expert.



**Figure 2.** Changes in virulence frequencies (A) in the *Puccinia triticina* population and (B) in the frequencies of the corresponding *Lr* resistance genes in the host population in the French landscape during the 2006–2016 period. Pathotypes were identified on a differential set of 20 *Lr* genes, and *Lr* gene combinations in the cultivars were postulated based on a set of standard isolates. 'Others' corresponds to cultivar mixtures, unidentified cultivars, and cultivars carrying unidentified genes.

**Table 3.** Pearson's correlation coefficient between the frequency of the five most prevalent pathotypes in the landscape during the period 2006-2016, and their frequency on eight of the major cultivars.

Pathotype	Virulences (against the corresponding Lr genes)	Cultivar							
		Arezzo (Lr10, Lr14a, Lr37)	Apache (Lr13, Lr37)	Expert (Lr1, Lr13)	Aubusson (Lr13, Lr14a, Lr37)	Premio (Lr14a, Lr37)	Bermude (Lr13, Lr14a, Lr37)	Altigo (Lr3, Lr13, Lr37)	Cellule (Lr3)
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	<b>0.88*</b>	<b>0.86*</b>	0.76	0.16	<b>1.00*</b>	0.57		
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	0.57	<b>0.90*</b>	-0.53	0.44	-0.48	<b>0.93*</b>		
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	0.87	<b>0.92*</b>	0.87	-	-	-	0.78	1.00
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0.12	0.67	0.70	0.73	0.46	-0.23	0.96	1.00
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0.61	<b>0.82*</b>	0.89	0.85	0.98	0.66	0.69	0.85

Note: *Lr* gene combination: Arezzo (*Lr10*, *Lr14a*, *Lr37*), Apache (*Lr13*, *Lr37*), Expert (*Lr1*, *Lr13*), Aubusson (*Lr13*, *Lr14a*, *Lr37*), Premio (*Lr14a*, *Lr37*), Bermude (*Lr13*, *Lr14a*, *Lr37*), Altigo (*Lr3*, *Lr13*, *Lr37*), Cellule (*Lr3*). –, Pathotype never found on the cultivar.

\* Significant coefficient,  $p < 0.01$ .

The frequency of pathotype 166 317 0 (virulences 1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37) in the landscape was correlated with its frequency on only one cultivar, Apache, over the entire 2006–2016 period (Table 3). PCA showed that pathotype 166 317 0 was mostly associated with a single cultivar in each year (Figure 3), but that this cultivar differed between years during the 2006–2016 period: Caphorn (*Lr10*, *Lr13*, *Lr37*) from 2008 to 2011, then Altigo (*Lr3*, *Lr13*, *Lr37*) in 2012–2013, and finally, Cellule (*Lr3*) in 2014–2015. In 2016, unlike other years, this pathotype was associated with several cultivars, Cellule, Fructidor (*Lr13*, *Lr14a*), Arezzo (*Lr10*, *Lr14a*, *Lr37*) and Solehio (*Lr14a*, *Lr37*).

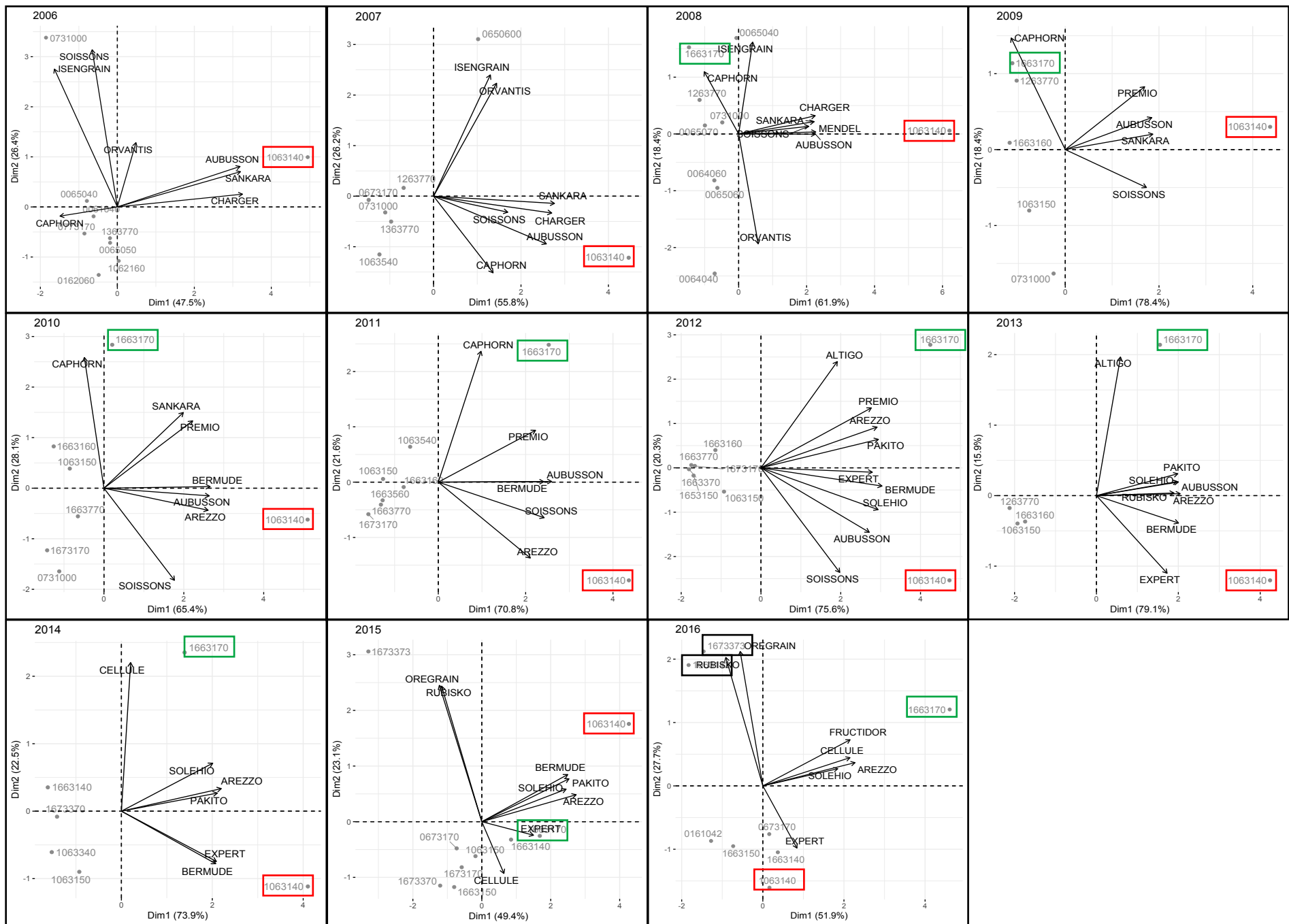
Pathotypes 167 337 3 and 106 314 2 emerged in 2015 and appeared to be strongly associated with new cultivars carrying the *Lr28* resistance gene—Oregrain (*Lr13*, *Lr28*, *Lr37*) and Rubisko (*Lr28*)—in 2015 and 2016 (Figure 3).

Others pathotypes presented in the PCA almost never showed any association with any cultivars despite compatible interactions with the majority of tested cultivars, except for interactions involving *Lr28*.

## Discussion

In this study, we analysed the changes in pathotypes in the French *P. triticina* population over an 11-year period. We found that changes in pathotype distribution depended on the *Lr* genes present in the cultivar landscape, consistent with previous findings. However, we also found that *Lr* genes were not sufficient to fully account for the observed pathotype distribution. This conclusion, which may appear counterintuitive, is robust, given the extensive nature of our survey; samples of *P. triticina* were collected from the most common wheat cultivars in a network of about 50 nurseries distributed throughout the main wheat-growing areas in France. The diversity and pathotype frequency found in such nurseries are known to reflect the situation in the commercial wheat-field landscape (Kolmer, 1992).

Changes in the frequency of pathotypes in the *P. triticina* population appeared to depend on the changes in and prevalence of *Lr* genes in the varietal landscape. An analysis of the distribution of pathotypes frequencies revealed that one pathotype, 106 314 0, virulent against *Lr1*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr17* and *Lr37*, predominated in France from 2006 to 2016. Three of these virulences matched the most prevalent *Lr* genes in the French landscape: *Lr13*, *Lr14a* and *Lr37*. This finding suggests that this virulent pathotype was subject to active selection due to the presence of these three *Lr* genes in the cultivars, and thus the frequency of these cultivars in the landscape. It has already been shown that *Lr* genes drive the selection of pathotypes. For instance, *Lr39* was widely used in the United States, leading to the selection of *P. triticina* populations in which more than 50% of the strains were virulent against this gene (Kolmer, 2019). Older data sets available in France suggest that the *Lr* genes present in the varietal landscape drive the selection of pathotypes; from 1999 to 2002, *Lr13* and *Lr14a* were the two most frequent resistance genes, and corresponding virulences were the two most common in the *P. triticina* population. (Goyeau et al., 2006).



**Figure 3.** Principal component analysis (PCA) representing 19 of the 35 most widely grown cultivars (Table 1) as variables and *Puccinia triticina* pathotypes as individuals for each year between 2006 and 2016. The two most prevalent pathotypes, 106 314.0 and 166 317 0, are boxed in red and green, respectively. The two pathotypes that emerged in 2015, 167 337 3 and 106 314 2, are boxed in black.

The group of pathotypes carrying virulence against *Lr3*, including about 30 different pathotypes, steadily increased in frequency over the 2006–2016 period. This may reflect the strong pressure imposed by the increasing frequency of the *Lr3* resistance gene in the varietal landscape. As this virulence was carried by pathotype 166 317 0 (virulences 1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37), but not by 106 314 0 (virulences 1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37), the presence of *Lr3* in the landscape probably conferred an advantage on 166 317 0. This finding is consistent with the outputs of the PCA for 2012 data, which highlighted an association of pathotype 166 317 0 with cultivars Altigo and Cellule carrying *Lr3*. *Lr3* was deployed for the first time in France in two cultivars registered in 1988, Génial and Louvre, and subsequently in six other cultivars registered in 1998 (Goyeau & Lannou, 2011). This deployment of cultivars carrying *Lr3* resistance was followed by a gradual increase in the frequency of virulent pathotypes, including 166 317 0.

New virulences against *Lr24* and *Lr28* appeared in 2011. *Lr24* had been present in the varietal landscape since 2006, but at a very low frequency, remaining below 1% until 2012. The increase in the frequency of virulence against *Lr28* immediately followed the registration of cultivars carrying *Lr28* but began before the widespread deployment of these cultivars (<1% in 2011 and 2012; >9% in 2014), suggesting that this resistance gene acted as a strong selective driver of the evolution of the *P. triticina* population. *Lr28* resistance was overcome within 2 years (2014–2015), with a large decrease of its efficacy in France. A similar pattern was observed in the Czech Republic, where *Lr28* conferred high levels of resistance (rated 7.0) to cultivars widely deployed in 2013, but displayed a rapid loss of efficacy, with resistance levels falling to 2.7 for these cultivars in 2015 (Hanzalová et al., 2021). *Lr* genes are generally rapidly overcome in wheat-growing areas worldwide. For example, *Lr3ka*, *Lr11* and *Lr24* were overcome within 2 years of their introduction in North American cultivars (Kolmer, 1996).

Some virulences, such as those directed against *Lr15* and *Lr16*, were detected in the *P. triticina* populations sampled despite the absence of the corresponding *Lr* genes from the cultivars used during the 2006–2016 period. These examples illustrate the general conclusion recently drawn by Kolmer (2019) that resistance genes select strains with specific virulence, but that this virulence may already exist in the pathogen population. The indirect selection, or at least an absence of counterselection, of these virulence phenotypes considered unnecessary for the pathogen, may come under a hitchhiking effect, due to the clonality of *P. triticina* (de Vallavieille-Pope et al., 2011).

This survey clearly showed that the frequency of pathotypes is strongly influenced by *Lr* gene prevalence in the French varietal landscape. However, our extensive data set analysis could not fully account for the observed patterns within the pathogen population, suggesting that there is selection pressure on traits other than virulence.

The frequencies of four of the five most prevalent pathotypes were correlated



with the frequency of Apache, which was the only cultivar involved in a significant correlation with more than one pathotype. The five other tested cultivars (Arezzo, Expert, Aubusson, Premio, and Bermude) were, like Apache, susceptible to nearly every pathotype, but involved in a correlation with at most one pathotype. The overall prevalence of these four pathotypes in the French varietal landscape was thus quite similar to their frequency on Apache, meaning that their frequencies evolved in the same way in the landscape and on this cultivar. This is consistent with the previous finding that no pathotype was preferentially associated with Apache in French wheat-growing areas generally (Papaix et al., 2011). Unlike the other cultivars considered, Apache did not exert the significant selective pressure that could be expected from the *Lr* genes it carries. This cultivar was thus considered neutral and was not included in the PCA.

Two pathotypes predominated in France during the 2006–2016 period. First, 106 314 0 alone, then 106 314 0 in codominance with 166 317 0, and finally, 166 317 0 alone. Overall population diversity decreased when these two pathotypes were codominant in the varietal landscape (together accounting for more than half the sampled isolates). These dynamics for the 2006–2016 period differ from those in France between 1999 and 2002 described in a previous study (Goyeau et al., 2006), suggesting that *P. triticina* diversity is greater when there are two codominant pathotypes rather than a single dominant pathotype.

PCA revealed that pathotype 106 314 0 was associated, almost always alone, with different cultivars (11 in total) each year from 2006 to 2014, despite the presence of other compatible pathotypes. This pattern reflects generalist behaviour, that is, an adaptation of this pathotype to several host genetic backgrounds. Other pathotypes carrying virulence genes theoretically enabling them to attack the same cultivars were identified through the annual survey but were never present at a meaningful frequency (Table S3). For instance, while pathotype 166 317 0 predominated at the end of the 2006–2016 period, other pathotypes virulent against *Lr3* were found at a much lower frequency on cultivars carrying *Lr3*. The higher prevalence of 106 314 0 and 166 317 0 cannot, therefore, be explained exclusively by their combination of virulences. Biases due to the focusing of sampling on specific cultivars (the most widely grown) may partly account for such effects but are unlikely to provide a full explanation. Thus, the selective pressure exerted by *Lr* genes is not the only evolutionary force driving the dynamics of the adaptation of *P. triticina* populations to their host populations at large spatial scales.

A previous study, over the 1999–2008 period in France, demonstrated that some *P. triticina* pathotypes were preferentially associated with certain cultivars while being compatible with most of the cultivars deployed in the landscape (Papaix et al., 2011). In this previous study, the resistance level of a cultivar was linked to the frequency of the most aggressive pathotype of all the compatible pathotypes present in the *P. triticina* population. During the period considered by this previous study, the rust population was dominated by one pathotype, 073 100 0, associated with the

wheat cultivar Soissons, which was the most widely grown cultivar in France until 1999 (reaching a maximum of 40% of the total area under wheat in 1993). Pathotype 073 100 0 was more aggressive on Soissons than other common virulent pathotypes able to infect this cultivar. This difference in aggressiveness, characterized by a larger uredinium size and higher level of spore production per square millimetre of sporulating tissue, explained this preferential cultivar- pathotype association (Pariaud, et al., 2009b). Accordingly, as Soissons was the most widely grown cultivar, the high frequency of the pathotype 073 100 0 on this cultivar was considered likely to account for its overall prevalence at the landscape scale. A study involving pathotype 106 314 0, similar to the study conducted on pathotype 073 100 0, would be needed to establish if pathotype 106 314 0 is more aggressive on susceptible cultivars, as compared to other compatible pathotypes.

Moreover, Papaïx et al. (2011) highlighted an association of pathotype 106 314 0 with the wheat cultivar Caphorn, even though this pathotype is considered avirulent on this cultivar at the adult plant stage (unpublished data). This illustrates that during a severe epidemic, uredinia of an incompatible pathotype can, indeed, be found on a cultivar (Table S3). We did not consider interactions of this type, between incompatible pathotypes and cultivars, in this study.

At the start of this century, the 10 most widely grown cultivars in France accounted for about 70% of the total area under wheat. This percentage dropped between 43% and 56% during the 2006–2016 period (Table 1). The varietal landscape has thus tended to become more diversified, potentially accounting for the predominance of a more generalist pathotype. The generalist behaviour of such a pathotype could be related to its aggressiveness, the quantitative component of pathogenicity (Lannou, 2012; Pariaud, et al., 2009a). Aggressiveness is considered less dependent on host genetic background. Thus, a *P. triticina* pathotype with a higher aggressiveness on a range of cultivars would be fitter in a diversified or heterogeneous biotic environment (Kröner et al., 2017). The association between pathotype 106 314 0 and the most widely grown cultivars was not related to the compatibility of its virulence profile with the combination of *Lr* genes in these cultivars. It therefore seems likely that aggressiveness traits (i.e., latency period, sporulating capacity and infection efficiency) played a significant role. The selection of groups of strains with higher aggressiveness, as a mechanism driving the evolution of pathogen populations, has been demonstrated in other pathosystems, through empirical evidence of local adaptation (Delmas et al., 2016; Kröner et al., 2017). For instance, in the *Phytophthora infestans* population, a detached-leaflet assay showed that the most aggressive genotypes on a potato cultivar (genotype with the shortest latency period or highest infection efficiency) tended to be those selected by the same cultivar in the field. Moreover, differences in aggressiveness between isolates were amplified on cultivars with the highest levels of partial resistance (Young et al., 2018). In *Plasmopora viticola*, strains collected from resistant grapevine cultivars were more aggressive than isolates collected from susceptible hosts, demonstrating the occurrence of selection for greater aggressiveness (Delmas et al., 2016).

The hypothesis of dual selection, based on both qualitative and quantitative interactions between *P. triticina* and bread wheat populations, is consistent with the dynamics described here. Unlike pathotype 106 314 0, pathotype 166 317 0 was associated with only one cultivar each year (except in 2016), first with Caphorn, then with Altigo and finally with Cellule. The pathotype 166 317 0 is virulent against *Lr3*, *Lr10*, *Lr13* and *Lr37*, and would therefore theoretically be able to overcome the *Lr* genes carried by Caphorn and Altigo. Even if these cultivars carry *Lr* resistance genes not yet identified, the pathotype 166 317 0 is also virulent to these putative genes, as its interaction observed with Caphorn and Altigo is compatible. However, these two cultivars have high levels of resistance to leaf rust (and, indeed, the leaves sampled from these two cultivars carried only a few uredinia). We therefore hypothesize that the isolates found on these two cultivars had undergone selection for greater aggressiveness (relative to other strains, when expressed on susceptible cultivars) and that the selective dynamics had turned to their advantage not only at the field scale, but also at the landscape scale. Further experimental studies based on tests of local adaptation (isolate × cultivar cross-inoculations) by comparing aggressiveness traits would be useful to validate this hypothesis and to quantify its potential effects on population evolutionary dynamics. The neutral status of Apache renders this cultivar particularly interesting for comparisons of pathotype aggressiveness without a selection effect of the tested cultivar.

This study demonstrated that *Lr* genes impact *P. triticina* populations. Indeed, as was the case for *Lr28*, new pathotypes adapted to *Lr* genes appeared in fungal populations shortly after the introgression of these genes into cultivars. However, the *Lr* genes in the most frequently grown cultivars could not explain the prevalence of only two pathotypes in the landscape, despite the presence of other compatible pathotypes.

## Acknowledgments

We thank Nicolas Lecutier (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for technical assistance in the growing of plant material and Dr Florence Dubs (INRAE UMR GQE-Le Moulon, Gif-sur-Yvette, FR) and Dr Anne-Lise Boixel (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for discussions on statistical analyses. We thank the French Wheat Breeders groups Recherches Génétiques Céréales and CETAC, and ARVALIS-Institut du Végétal for their help collecting strains of *P. triticina* in their nurseries and field trials. We thank Dr Julie Sappa for her help correcting our English. This research was supported by a PhD fellowship from the INRAE department Santé des Plantes et Environnement (SPE) and from the French Ministry of Education and Research (MESRI) awarded to C.F. for the 2018–2022 period. It was also supported by several French FSOV (Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale) grants (FSOV 2004, 2008, 2012) and by the European Commission, Research and Innovation under the Horizon 2020 programme (RUSTWATCH 2018–2022, grant agreement no. 773311-2). The INRAE BIOGER laboratory also benefits from the support of Saclay

Plant Science-SPS (ANR- 17-EUR-0007). Open access funding enabled and organized by ProjektDEAL.

### Conflicts of Interest

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

- Alatalo, R.V. (1981) Problems in the measurement of evenness in ecology. *Oikos*, 37, 199.
- Delmas, C.E.L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I.D., Cervera, S.R., Delière, L. 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.
- Drijepondt, S.C. & Pretorius, Z.A. (1989) Greenhouse evaluation of adult plant resistance conferred by the gene *Lr34* to leaf rust of wheat. *Plant Disease*, 73, 669–671.
- Figuroa, M., Dodds, P.N. & Henningsen, E.C. (2020) Evolution of virulence in rust fungi—multiple solutions to one problem. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 20–27.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275–296.
- Frézal, L., Jacqua, G. & Neema, C. (2018) Adaptation of a fungal pathogen to host quantitative resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1554.
- Gilmour, J. (1973) Octal notation for designating physiologic race of plant pathogens. *Nature*, 242, 620.
- Goyeau, H., Halkett, F., Zapater, M.-F., Carlier, J. & Lannou, C. (2007) Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 474–483.
- Goyeau, H. & Lannou, C. (2011) Specific resistance to leaf rust expressed at the seedling stage in cultivars grown in France from 1983 to 2007. *Euphytica*, 178, 45–62.
- Goyeau, H., Park, R., Schaeffer, B. & Lannou, C. (2006) Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology*, 96, 264–273.
- Hanzalová, A., Dumalasová, V. & Zelba, O. (2021) Virulence in the *Puccinia triticina* population in the Czech Republic and resistance genes in registered cultivars 1966–2019. *Euphytica*, 217, 4.
- Huerta-Espino, J., Singh, R., Crespo-Herrera, L.A., Villaseñor-Mir, H., Rodríguez-García, M.F., Dreisigacker, S. et al. (2020) Adult plant slow rusting genes confer high levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico. *Frontiers in Plant*

*Science*, 11, 824.

Kolmer, J.A. (1992) Diversity of virulence phenotypes and effect of host sampling between and within populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada. *Plant Disease*, 76, 618–621.

Kolmer, J.A. (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 435–455.

Kolmer, J.A. (2013) Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests*, 4, 70–84.

Kolmer, J.A. (2019) Virulence of *Puccinia triticina*, the wheat leaf rust fungus, in the United States in 2017. *Plant Disease*, 103, 2113–2120.

Kolmer, J.A., Hanzalova, A., Goyeau, H., Bayles, R. & Morgounov, A. (2013) Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. *Plant Pathology*, 62, 21–31.

Kosman, E., Ben-Yehuda, P., Manisterski, J. & Sela, H. (2019) Diversity of virulence phenotypes among annual populations of *Puccinia triticina* originating from common wheat in Israel during the period 2000–15. *Plant Pathology*, 68, 1741–1748.

Kröner, A., Mabon, R., Corbière, R., Montarry, J. & Andrivon, D. (2017) The coexistence of generalist and specialist clonal lineages in natural populations of the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans* explains local adaptation to potato and tomato. *Molecular Ecology*, 26, 1891–1901.

Kumar, S., Bhardwaj, S.C., Gangwar, O.P., Sharma, A., Qureshi, N., Kumaran, V.V. et al. (2021) *Lr80*: a new and widely effective source of leaf rust resistance of wheat for enhancing diversity of resistance among modern cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 134, 849–858.

Lagudah, E.S. (2011) Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. *Euphytica*, 179, 81–91.

Lannou, C. (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 319–338.

Liu, T.-G. & Chen, W.Q. (2012) Race and virulence dynamics of *Puccinia triticina* in China during 2000–2006. *Plant Disease*, 96, 1601–1607.

McDonald, B.A. & Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349–379.

McIntosh, R.A., Dubcovsky, J., Rogers, W.J., Xia, X.C. & Raupp, W.J. (2020) Catalogue of gene symbols for wheat: 2020 supplement. *Annual Wheat Newsletter*, 66, 20.

McIntosh, R.A., Wellings, C.R. & Park, R.F. (1995) *Wheat rusts: an atlas of resistance*

*genes*. Melbourne, Australia: CSIRO Publishing.

Mesterházy, Á., Bartoš, P., Goyeau, H., Niks, R.E. & Csösz, M. (2000) European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie*, *20*, 793–804.

Niks, R.E., Qi, X. & Marcel, T.C. (2015) Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 445–470.

Papaïx, J., Goyeau, H., Du Cheyron, P., Monod, H. & Lannou, C. (2011) Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: an assessment based on wheat leaf rust epidemics. *New Phytologist*, *191*, 1095–1107.

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.

Prasad, P., Bhardwaj, S.C., Gangwar, O.P., Kumar, S., Khan, H., Kumar, S. et al. (2017) Population differentiation of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in South Asia. *Current Science*, *112*, 2073.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N. & Nelson, A. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, *3*, 430–439.

Singh, D., Park, R.F. & McIntosh, R.A. (2001) Inheritance of seedling and adult plant resistance to leaf rust of selected Australian spring and English winter wheat varieties. *Plant Breeding*, *120*, 503–507.

Stakman, E.C., Stewart, D.M. & Loegering, W.Q. (1962) Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *USDA-ARS Bulletin*, *617*, 1–53.

de Vallavieille-Pope, C., Ali, S., Leconte, M. & Delos, M. (2011) Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009. *Plant Disease*, *96*, 131–140.

Young, G.K., Cooke, L.R., Watson, S., Kirk, W.W., Perez, F.M. & Deahl, K.L. (2018) The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, *67*, 1539–1551.

Zahl, S. (1977) Jackknifing an index of diversity. *Ecology*, *58*, 907–913.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1.** Standard isolates of *Puccinia triticina* used in multipathotype tests for the postulation of resistance genes

Isolate	Pathotype <sup>a</sup>	Virulence expressed at the seedling stage <sup>b</sup>
B9201-2C3	014 103 0	<i>Lr2c, Lr13, Lr14a, Lr17b, Lr26</i>
B9407-1CA3	050 124 0	<i>Lr2c, Lr3bg, Lr14a, Lr20, Lr37</i>
B9833-B	077 317 0	<i>Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr26, Lr37</i>
FSA9	150 104 0	<i>Lr1, Lr2c, Lr3bg, Lr14a, Lr37</i>
B9506-2B	014 103 0	<i>Lr2c, Lr13, Lr14a, Lr17b, Lr26</i>
B950506A	106 232 0	<i>Lr1, Lr10, Lr13, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20</i>
B950019-A	012 026 0	<i>Lr2c, Lr10, Lr17b, Lr20, Lr37</i>
B950365-D	073 100 0	<i>Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr10, Lr14a</i>
B01M196-D	016 206 0	<i>Lr2c, Lr10, Lr13, Lr15, Lr17b, Lr37</i>
B03M041	116 226 0	<i>Lr1, Lr2c, Lr10, Lr13, Lr15, Lr20, Lr17b, Lr37</i>
B03M007	077 310 0	<i>Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17</i>
B00M057-A	166 336 0	<i>Lr1, Lr3, Lr3bg, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20, Lr37, Lr27 + Lr31</i>
B9384-1C1	075 337 0	<i>Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20, Lr26, Lr37</i>
FS01-D17	016 100 0	<i>Lr2c, Lr10, Lr13, Lr14a</i>
B77SABA	775 237 0	<i>Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr13, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20, Lr26, Lr37</i>
BT06M140	126 377 0	<i>Lr1, Lr3, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20, Lr23, Lr26, Lr37, Lr27 + Lr31</i>
BT08M111	775 715 0	<i>Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr16, Lr17, Lr26, Lr37</i>
BT09M168	167 337 1	<i>Lr1, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20, Lr24, Lr26, Lr37, Lr27 + Lr31</i>
BT11M182-A	016 022 2	<i>Lr2c, Lr10, Lr13, Lr17b, Lr20, Lr28</i>
BT12M097	012 022 3	<i>Lr2c, Lr10, Lr17b, Lr20, Lr24, Lr28</i>
BT12M413-3	002 004 2	<i>Lr10, Lr28, Lr37</i>
BT14M228	016 122 3	<i>Lr2c, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr17b, Lr20, Lr24, Lr28</i>
BT16M051	167 337 3	<i>Lr1, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr10, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr17b, Lr20, Lr24, Lr26, Lr28, Lr37, Lr27 + Lr31</i>
BT16M225	012 106 2	<i>Lr2c, Lr10, Lr14a, Lr17b, Lr28, Lr37</i>

<sup>a</sup> Seven-digit triplet code (Gilmour, 1973) based on a 20-*Lr* gene differential set arranged as follows: [*Lr1, Lr2a, Lr2b*], [*Lr2c, Lr3, Lr3bg*], [*Lr3ka, Lr10, Lr13*], [*Lr14a, Lr15, Lr16*], [*Lr17, Lr20, Lr23*], [*Lr26, Lr17b* (the Australian cv. 'Harrier'), *Lr37*] and [*Lr24, , Lr28* (line CS2A/2M)].

<sup>b</sup> Tested for pathogenicity on the 18 Thatcher NILs, the Australian cv. Harrier (*Lr17b*), CS2A/2M (*Lr28*), the lines with the resistance genes *Lr9, Lr19*, and the Australian cv. Gatcher (*Lr10, Lr27+Lr31*).

**Table S2.** Infection types of the standard isolates of *Puccinia triticina* used in multipathotype tests for postulation of resistance genes, on the differential set.

isolate	Pathotype*	Differential line												
		Lr 1	Lr 2a	Lr 2b	Lr 2c	Lr 3	Lr 3bg	Lr 3ka	Lr 9	Lr10	Lr13	Lr 14a	Lr 15	Lr 16
B9201-2C3	014 103 0	;-	;1+C	X++	33+	;	;	;		;12	3+	3+	;1c	2++3
B9407-1CA3	050 124 0	0;	;12	X-	3+	XX+	3+	;1	0;	;12-	X	3+	;1C	;12-
B9833-B	077 317 0	;	;12	X=	3+	3+	3+	3+	0;	3+	3+	3+	3+	2++C
FSA9	150 104 0	3+	;12	X	3+	X-	3+	;	0;	;12	X	3+	;1	2+
B9506-2B	014 103 0	0;	;12-	X++	33+	;	;1	;=	;	;1	3+	3+	;C	23C
B950506-A	106 232 0	33+	0;	;	;1	0;	0;	;-	0;	;12	X++C	X++3	3+	12-C
B950019-A	012 026 0	0;	;1	X-	3	;=	;	;-	0;	3	;12CC	X++	;1	1C
B950365-D	073 100 0	0;	;	X=	3+	3+	3+	3+	0;	Y++3	XC	3+	;1	2C
B01M196-D	016 206 0	0;	;12	X	3+	;-	;-	;-	0;	3+	3+	X++3	3+	1C
B03M041	116 226 0	3+	;12-	X	33+	;	;=	;-	0;	X-	3+	X++	3+	1C
B03M007	077 310 0	;-	;12-	X=	33+	3+	3+	3+	0;	23	X++3+	3+	3+	12-
B00M057-A	166 336 0	3+	0;	;	;12	3+	3+	;1++	0;	3+	3+	3+	3+	2C
B9384-1C1	075 337 0	0;	;12-	X	3+	3+	3+	3+	0;	;1+	3+	3+	3+	2C
FS01-D17	016 100 0	0;	;12-	X-	3+	;	;1	;	0;	3+	3+	3+	;1	3C
B77SaBa	775 237 0	3+	3+	3+	3+	3+	X++3	3+	0;	;12	X++3	X++	3+	12C
BT06M140	126 377 0	3+	;12	X	X++	X++3	23-	;1	0;	3+	3+	3+	3+	12C
BT08M111	775 715 0	3+	3+	3+	3+	3+	X++3	3+	0;	;1	3+	3+	3+	3C
BT09M168	167 337 1	3+	0;	;1	X=	3+	3+	3+	0;	3+	3+	3+	3+	2C
BT11 M182-A	016 022 2	;=	X++3	X++3	3+	;1++	;	3=	0;	3+	3+	3+	;1+	12C
BT12M097	012 022 3	;=	;12	X++	33+	;	;	;1++	0;	3+	X++	X++3	;12	;12-C
BT12M413-3	002 004 2	;=	;12	X-	X++	;	;1	;1	;=	3+	2C3+	X++3	;12-C	12C
BT14M228	016 122 3	;=	X++	X++3	3+	;1	;	13=	0;	3+	3+	X++	;1	2-C
BT16M051	167 337 3	3+	;=	;-	;	3+	3+	3+	;=	3+	X++3+	3+	3+	12-
BT16M225	012 106 2	0;	X=	X++	3+	;1	;1	;13=	0;	3+	23C	X++3	12C	12C



isolate	Pathotype*	Differential line												
		Lr 17	Lr19	Lr 20	Lr 23	Lr 24	Lr 26	Gatcher	CS2A/2M	Harrier	Morocco	Renan	VPM	Lr37
B9201-2C3	014 103 0	3+	;	N	;12	;1	3+	;12+	0;	3+	3+	Y-	Y=	3+
B9407-1CA3	050 124 0	;12	;	3+	Y=	;	;12	;1	0;	Y++3	3+	Y++3	Y++3	Y++3
B9833-B	077 317 0	3+	;-	;N	;12	;1	3+	X++3C	;	3+	3+	3+	3+	3+
FSA9	150 104 0	;12	;	;N	;12	;	;12	;1	;-	Y+	3+	X+	X++	X++3
B9506-2B	014 103 0	Y	;	;N	;1	;	3+	;C	;	3+	3+	;	;1+	;12
B950506-A	106 232 0	33+	0;	X++	;	0;	0;	X=CC	0;	3+	3+	;-	;1	;1+
B950019-A	012 026 0	;1	0;	33+	X++	;-	0;	;	;12-	33+	X++	X++	X	X++3+
B950365-D	073 100 0	Y++3	0;	;N	X-	;	0;	X+C	0;	X++	3+	X=	X++	X++3
B01M196-D	016 206 0	;12	0;	;N	;	;	0;	X++C	0;	3+	3+	3+	3+	3+
B03M041	116 226 0	Y	0;	3+	;12-	;	0;	;12-	0;	3+	3+	3+	3+	3+
B03M007	077 310 0	3+	0;	;N	;12	;-	0;	3+	0;	Y++3	3+	X	X++3+	X-
B00M057-A	166 336 0	3+	0;	3+	X++3	;	X++3	3+	0;	X++3	3+	3+	3+	3+
B9384-1C1	075 337 0	3+	0;	3+	X++	0;;=	3+	;1-	;	3+	3+	3+	3+	3+
FS01-D17	016 100 0	X---	0;	;N	;12	;	0.	;	0;	.1C	X++	;12-	;1+	;12-
B77SaBa	775 237 0	3+	0;	3+	;C	;	33+	;	;	3+	3+	X++	X	3+
BT06M140	126 377 0	3+	0;	3+	3+	0;;	3+	X++3	0;	3+	3+	3+	3+	3+
BT08M111	775 715 0	3+	0;	;N	;1	0;	3+	;	;	;	3+	3+	X++3	3+
BT09M168	167 337 1	3+	0;	33+	;12	3+	X++	X++3+	0;	3+	3+	X++3+	3+	X++3
BT11 M182-A	016 022 2	Y---	0;	3+	;12	;1C	0;	X++3C	3+	3+	3+	;12	X++	3+
BT12M097	012 022 3	;12-C	0;	3+	;12-C	X++3+	;12	X++C	3+	3+	3+	Y++3	Y++	Y++
BT12M413-3	002 004 2	Y+	;	;N	;1	;	0.	;1	3+	;12-	3+	Y++3	X+	Y++
BT14M228	016 122 3	;12	0;	3+	X++3	3+	0;	X++3	3+	3+	3+	X++	X++3	X++3
BT16M051	167 337 3	3+	;-;	3+	;12+	33+	3+	3+	Y++3	3+	3+	3+	3+	3+
BT16M225	012 106 2	Y=	0;	;N	;1	0;	0;	X++C	3+	3+	3+	3+	3+	3+

\* Seven-digit triplet code based on a 18-Lr genes differential set (Thatcher isogenic lines *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr37*), the Australian cv. 'Harrier' (*Lr17b*) and CS2A/2M (*Lr28*).

**Table S3.** Number of *Puccinia triticina* isolates collected from wheat during the period 2006-2016, by pathotype, as determined with a differential set of 20 *Lr* genes

Pathotype <sup>a</sup>	Virulences (against the corresponding <i>Lr</i> genes)	Year											Total
		2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	87	109	104	99	87	107	133	102	112	73	12	1025
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37		6	12	15	38	68	131	62	82	56	68	538
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	4	4	3	6	9	13	22	19	28	24	2	134
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37				7	12	22	22	22	9	8	6	108
126 377 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	5	38	8	14	2	7	6	9	2			91
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37								6	19	49	15	89
167 337 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24, 28								3	3	49	25	80
006 506 0	10, 13, 14a, 16, 17b, 37	6	49	12	5	4	3						79
073 100 0	2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a	31	15	9	7	7	2						71
167 317 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	5	5			8	10	12	5	6	15	3	69
067 317 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	3	16	2					7	5	20	11	64
166 377 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37		3	2		15	11	12	2		4	4	53
006 504 0	10, 13, 14a, 16, 37	29	5	11	3								48
167 337 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37					4	6	8	5	14	11		48
106 314 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37, 28										5	36	41
136 377 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	20	16										36
166 337 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37				2	3		9	8	4	5	5	36
106 334 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37		2					2	6	15	7	4	36
165 315 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 26, 37					3	3	16		12			34
106 354 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 37		10				17		3				30
012 002 0	2c, 3, 17b	16		2				3	3		2	3	29

006 106 0	10, 13, 14a, 17b, 37	2	15	4	6	2	29
077 317 0	2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	12	6	2	2	6	28
016 104 2	2c, 10, 13, 14a, 37, 28					7	11 7 25
006 107 0	10, 13, 14a, 26, 17b, 37		16		7	2	25
106 216 0	1, 10, 13, 15, 17, 17b, 37	8	6	2	2	2	20
166 315 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37						13 7 20
006 507 0	10, 13, 14a, 16, 26, 17b, 37		13	5	2		20
067 316 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37		5	3		2	2 4 16
006 505 0	10, 13, 14a, 16, 26, 37	10	5				15
016 022 3	2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28					2	7 6 15
006 104 0	10, 13, 14a, 37	10		3			13
126 376 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	2		2	2	3	2 13
016 106 2	2c, 10, 13, 14a, 17b, 37, 28						4 6 3 13
006 406 0	10, 13, 16, 17b, 37		3	6	2	2	13
006 404 0	10, 13, 16, 37	2		8	2		12
166 336 0	1, 3, 3BG, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37					3	4 2 2 11
067 337 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37		3	3		2	3 11
016 206 0	2c, 10, 13, 15, 17b, 37	8		2			10
016 122 3	2c, 10, 13, 14a, 20, 17b, 24, 28						10 10
166 357 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 17b, 37		2			8	10
166 356 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 17b, 37					9	9
167 377 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37, 24, 28					2	2 5 9
106 316 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37		5	2		2	9
167 316 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 20	2			2	2	2 8
006 516 0	10, 13, 14a, 16, 17, 17b, 37		8				8
106 336 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37		3	2		3	8
016 404 0	2c, 10, 13, 23, 37	3		4			7

106 355 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 37		3		4				7
016 006 2	2c, 10, 13, 17b, 37, 28							7	7
167 336 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 17, 20, 17b, 37					3	2	2	7
165 336 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	2	3						5
166 334 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 37							3	2
167 336 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37, 24, 28							2	3
167 337 1	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24				2		3		5
166 376 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37				3	2			5
106 236 0	1, 10, 13, 15, 17, 20, 17b, 37	4							4
116 206 0	1, 2c, 10, 13, 15, 17b, 37	4							4
006 105 0	10, 13, 14a, 26, 37	4							4
106 206 0	1, 10, 13, 15, 17b, 37		4						4
012 162 0	2c, 10, 14a, 20, 23, 17b							4	4
165 314 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 37					2	2		4
136 375 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 37	3							3
116 316 0	1, 2c, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37		3						3
136 337 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37		3						3
167 307 0	1, 2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 26, 17b, 37		3						3
006 004 1	10, 13, 37, 24						3		3
012 106 2	2c, 10, 14a, 17b, 37, 28								3
067 315 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37							3	3
077 337 0	2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	2							2
171 167 0	1, 2c, 3, 3bg, 3ka, 14a, 20, 23, 26, 17b, 37		2						2
112 122 3	1, 2c, 10, 14a, 20, 17b, 24, 28							2	2
010 102 2	2c, 14a, 17b, 28								2
012 022 3	2c, 10, 20, 17b, 24, 28							2	2
012 102 0	2c, 10, 14a, 17b	2							2

012 104 2	2c, 10, 14a, 37, 28									2			2
014 103 2	2c, 3bg, 13, 14a, 26, 37, 28										2		2
126 337 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37			2									2
126 375 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 37			2									2
136 376 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37			2									2
165 335 0	1, 2c, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 37										2		2
106 315 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37, 28											2	2
116 022 3	1, 2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28										2		2
006 517 0	10, 13, 14a, 16, 17, 26, 17b, 37			2									2
016 004 0	2c, 10, 13, 37										2		2
016 504 0	2c, 10, 13, 14a, 16, 37			2									2
067 336 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37			2									2
Number of other pathotypes <sup>b</sup>		22	31	20	17	10	13	11	9	21	24	15	
Total number of isolates		306	418	238	192	217	331	411	295	377	416	245	
Total number of pathotypes		48	65	46	33	29	37	31	32	46	53	38	

<sup>a</sup> Seven-digit code based on the 20-*Lr* genes differential set (Thatcher lines *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr37*, CS2A/2M carrying *Lr28*, and the Australian cv. Harrier carrying *Lr17b*) according to by Gilmour (1973) and Stakman et al. (1962).

<sup>b</sup> Pathotype found annually only once were pooled and their virulence profiles is not indicated.

**Table S4.** . Frequency of virulence phenotypes of *Puccinia triticina* (representing at least 0,2% of the sample) identified in samples collected from major cultivars

Virulence phenotype	Virulences ( <i>Lr</i> genes)	'Apache' <i>Lr13, Lr37</i>	'Arezzo' <i>Lr10, Lr14a, Lr37</i>	'Caphorn' <i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	'Soissons' <i>Lr14a</i>	'Aubusson' <i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>	'Bermude' <i>Lr13, Lr14a, Lr37</i>	'Soleho' <i>Lr14a, Lr37</i>
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	34,3	34,6	41,5	32,1	65,6	43,4	35,4
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	13,3	24,2	11,3	4,7	12,9	20,2	24,4
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	5,3	6,6	2,4	4,1	2,2	6,4	4,3
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	3,4	3,8	3,3	1,6	3,2	5,8	3,7
126 377 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	3,8	1,0	5,7	2,1	2,7	1,2	0,6
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	2,7	4,5	0,0	0,0	0,5	0,6	3,7
167 337 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24, 28	0,8	0,3	0,0	0,0	0,5	0,0	1,2
006 506 0	10, 13, 14a, 16, 17b, 37	4,4	0,0	1,4	4,1	1,6	0,0	0,0
167 317 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	1,7	5,2	1,4	2,1	0,5	2,3	3,0
073 100 0	2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a	0,6	0,0	1,4	21,8	0,0	0,6	0,0
067 317 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	4,4	2,1	1,4	1,0	2,2	1,2	7,9
166 377 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	1,7	2,8	0,9	2,6	1,1	2,3	0,0
167 337 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,8	3,8	0,5	1,6	0,0	1,7	3,7
006 504 0	10, 13, 14a, 16, 37	2,7	0,0	4,7	1,6	0,0	0,0	0,0
106 314 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
136 377 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	1,1	0,0	3,8	0,5	1,1	0,0	0,0
106 334 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	1,3	1,0	0,0	0,5	1,1	0,0	4,3
166 337 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,8	1,4	0,0	0,0	0,5	1,7	1,8
165 315 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	1,3	0,3	0,0	1,6	0,0	0,6	0,6
006 106 0	10, 13, 14a, 17b, 37	1,5	0,3	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
106 354 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 37	0,4	1,4	5,7	0,0	1,1	3,5	0,0
006 107 0	10, 13, 14a, 26, 17b, 37	0,8	0,7	0,5	2,1	0,0	0,0	0,0

077 317 0	<i>2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37</i>	1,3	0,7	0,9	4,7	0,0	0,0	0,6
016 104 2	<i>2c, 10, 13, 14a, 37, 28</i>	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 216 0	<i>1, 10, 13, 15, 17, 17b, 37</i>	0,6	0,0	2,4	0,0	0,5	0,0	0,0
166 315 0	<i>1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37</i>	0,6	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
006 507 0	<i>10, 13, 14a, 16, 26, 17b, 37</i>	0,6	0,3	1,9	1,0	0,0	0,0	0,0
067 316 0	<i>3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37</i>	0,2	0,3	0,0	1,0	0,0	1,2	1,2
006 505 0	<i>10, 13, 14a, 16, 26, 37</i>	0,2	0,0	3,3	0,5	0,0	0,0	0,0
016 022 3	<i>2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
106 316 0	<i>1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37</i>	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
126 376 0	<i>1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37</i>	0,6	0,0	0,5	0,0	0,5	0,6	0,0
006 104 0	<i>10, 13, 14a, 37</i>	1,1	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0
006 404 0	<i>10, 13, 16, 37</i>	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 406 0	<i>10, 13, 16, 17b, 37</i>	1,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
166 336 0	<i>1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37</i>	0,2	0,3	0,5	0,5	0,5	1,7	0,0
166 357 0	<i>1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 17b, 37</i>	0,2	0,0	0,9	0,5	0,0	1,2	0,0
016 106 2	<i>2c, 10, 13, 14a, 17b, 37, 28</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
067 337 0	<i>3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37</i>	0,8	0,3	0,0	1,0	0,5	0,0	0,0
167 316 0	<i>1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 20</i>	0,2	1,4	0,0	0,5	0,0	0,0	0,6
167 377 3	<i>1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37, 24, 28</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 336 0	<i>1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37</i>	0,6	0,3	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0
166 356 0	<i>1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 17b, 37</i>	0,2	0,3	0,5	1,0	0,5	1,2	0,0
016 122 3	<i>2c, 10, 13, 14a, 20, 17b, 24, 28</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 206 0	<i>2c, 10, 13, 15, 17b, 37</i>	0,4	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
166 376 0	<i>1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37</i>	0,6	0,0	0,0	0,0	0,5	0,6	0,6
167 336 0	<i>1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 17, 20, 17b, 37</i>	0,2	0,0	0,0	0,5	0,0	0,6	0,6
016 404 0	<i>2c, 10, 13, 23, 37</i>	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 516 0	<i>10, 13, 14a, 16, 17, 17b, 37</i>	0,6	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
106 355 0	<i>1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 37</i>	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	1,2	0,0
016 006 2	<i>2c, 10, 13, 17b, 37, 28</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Total</b>		<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

Virulence phenotype	Virulences (Lr genes)	'Premio'	'Pakito'	'Cellule'	'Orvantis'	'Oregrain'	'Sankara'	'Altigo'
		<i>Lr14a, Lr37</i>	<i>Lr13, Lr37</i>	<i>Lr3</i>	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	<i>Lr13, Lr28, Lr37</i>	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	<i>Lr3, Lr13, Lr37</i>
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	31,3	32,6	4,1	11,3	15,7	59,5	5,2
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	33,8	28,0	37,4	2,1	9,0	6,8	50,6
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	3,1	6,1	0,0	2,1	3,4	2,7	2,6
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	12,5	5,3	4,1	0,0	1,1	0,0	6,5
126 377 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	3,8	3,0	0,0	8,2	0,0	4,1	2,6
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	0,0	6,8	18,7	0,0	6,7	0,0	3,9
167 337 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	34,8	0,0	1,3
006 506 0	10, 13, 14a, 16, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	18,6	0,0	5,4	0,0
167 317 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	1,9	0,8	8,1	3,1	0,0	0,0	2,6
073 100 0	2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a	0,6	0,0	0,0	3,1	0,0	1,4	0,0
067 317 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	3,9
166 377 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	4,4	1,5	1,6	0,0	2,2	1,4	2,6
167 337 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	2,3	7,3	0,0	0,0	0,0	1,3
006 504 0	10, 13, 14a, 16, 37	0,0	0,0	0,0	5,2	0,0	1,4	0,0
106 314 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	10,1	0,0	0,0
136 377 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,6	0,0	0,8	5,2	0,0	1,4	0,0
106 334 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	5,3	0,0	0,0	1,1	0,0	1,3
166 337 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	1,9	2,3	4,1	0,0	0,0	0,0	5,2
165 315 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	1,9	0,8	3,3	0,0	0,0	0,0	6,5
006 106 0	10, 13, 14a, 17b, 37	0,0	0,8	0,0	6,2	0,0	2,7	0,0
106 354 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 37	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
006 107 0	10, 13, 14a, 26, 17b, 37	0,0	0,8	0,0	2,1	0,0	1,4	0,0
077 317 0	2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
016 104 2	2c, 10, 13, 14a, 37, 28	0,0	0,0	0,8	0,0	1,1	0,0	0,0
106 216 0	1, 10, 13, 15, 17, 17b, 37	0,6	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0



166 315 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	0,0	0,0	3,3	0,0	1,1	0,0	0,0
006 507 0	10, 13, 14a, 16, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	5,4	0,0
067 316 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,8	0,0	1,0	0,0	0,0	1,3
006 505 0	10, 13, 14a, 16, 26, 37	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	1,4	0,0
016 022 3	2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 316 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
126 376 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,6	0,8	0,0	2,1	1,1	0,0	0,0
006 104 0	10, 13, 14a, 37	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
006 404 0	10, 13, 16, 37	0,0	0,0	0,0	5,2	0,0	1,4	0,0
006 406 0	10, 13, 16, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
166 336 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,8	0,8	0,0	1,1	0,0	1,3
166 357 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 17b, 37	1,3	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,3
016 106 2	2c, 10, 13, 14a, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
067 337 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,8	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
167 316 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 20	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
167 377 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0
106 336 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 356 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 17b, 37	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
016 122 3	2c, 10, 13, 14a, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
016 206 0	2c, 10, 13, 15, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
166 376 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,6	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
167 336 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	2,4	0,0	1,1	0,0	0,0
016 404 0	2c, 10, 13, 23, 37	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	1,4	0,0
006 516 0	10, 13, 14a, 16, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
106 355 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
016 006 2	2c, 10, 13, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Virulence phenotype	Virulences (Lr genes)	'Expert' <i>Lr1, Lr13</i>	'Rubisko' ( <i>Lr14a</i> ), <i>Lr28, (Lr37)</i>	'Charger' <i>Lr10, Lr13</i>	'Isengrain' <i>Lr14a</i>	'Tremie' <i>Lr10, Lr13</i>	'Terroir' <i>Lr28</i>	'Mendel' <i>Lr13</i>
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	43,2	17,6	42,9	9,6	44,7	6,3	50,0
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	14,9	11,8	0,0	5,8	7,9	12,5	0,0
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	13,5	5,9	1,8	1,9	2,6	0,0	3,3
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	2,7	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0
126 377 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	1,4	1,5	1,8	3,8	7,9	0,0	3,3
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	8,1	2,9	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0
167 337 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	22,1	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0
006 506 0	10, 13, 14a, 16, 17b, 37	0,0	0,0	8,9	13,5	0,0	0,0	6,7
167 317 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	1,4	2,9	1,8	1,9	2,6	0,0	0,0
073 100 0	2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a	0,0	0,0	0,0	13,5	2,6	0,0	0,0
067 317 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0
166 377 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,0	1,5	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
167 337 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	4,1	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 504 0	10, 13, 14a, 16, 37	0,0	0,0	5,4	7,7	5,3	0,0	3,3
106 314 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37, 28	0,0	11,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
136 377 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	7,1	1,9	7,9	0,0	3,3
106 334 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	1,5	1,8	0,0	2,6	3,1	0,0
166 337 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0
165 315 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	1,4	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 106 0	10, 13, 14a, 17b, 37	0,0	1,5	1,8	1,9	0,0	0,0	3,3
106 354 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 107 0	10, 13, 14a, 26, 17b, 37	0,0	0,0	1,8	5,8	0,0	0,0	6,7
077 317 0	2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	1,8	3,8	0,0	0,0	0,0
016 104 2	2c, 10, 13, 14a, 37, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,9	0,0
106 216 0	1, 10, 13, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,0	7,1	0,0	5,3	0,0	0,0

166 315 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 507 0	10, 13, 14a, 16, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0
067 316 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	1,5	0,0	5,8	0,0	0,0	0,0	3,3
006 505 0	10, 13, 14a, 16, 26, 37	0,0	0,0	1,8	1,9	2,6	0,0	0,0	0,0
016 022 3	2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 316 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	1,4	1,5	3,6	0,0	2,6	0,0	0,0	3,3
126 376 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3
006 104 0	10, 13, 14a, 37	0,0	0,0	1,8	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0
006 404 0	10, 13, 16, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 406 0	10, 13, 16, 17b, 37	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3
166 336 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3
166 357 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
016 106 2	2c, 10, 13, 14a, 17b, 37, 28	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
067 337 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	3,3
167 316 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 20	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0
167 377 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0
106 336 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 356 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 122 3	2c, 10, 13, 14a, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,4	0,0	0,0
016 206 0	2c, 10, 13, 15, 17b, 37	0,0	0,0	3,6	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0
166 376 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 336 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 404 0	2c, 10, 13, 23, 37	0,0	0,0	1,8	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0
006 516 0	10, 13, 14a, 16, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 355 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 006 2	2c, 10, 13, 17b, 37, 28	0,0	4,4	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Virulence phenotype	Virulences (Lr genes)	'Dinosor'	'Nemo'	'Tobak'	'Aerobic'	'Fructidor'	'Hybery'	PR22R58
		<i>Lr13,Lr37</i>	<i>Lr28, Lr37</i>	<i>Lr28</i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr13, Lr14a</i>	<i>Lr28</i>	<i>Lr1, (Lr2c), Lr14a</i>
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	15,4	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	66,7
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	11,5	0,0	5,9	0,0	81,3	0,0	0,0
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	6,7	8,3
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0
126 377 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0
167 337 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	4,5	23,5	0,0	0,0	20,0	0,0
006 506 0	10, 13, 14a, 16, 17b, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3
167 317 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
073 100 0	2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
067 317 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	7,7	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
166 377 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
167 337 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 504 0	10, 13, 14a, 16, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 314 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37, 28	0,0	72,7	5,9	0,0	0,0	13,3	0,0
136 377 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 334 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0
166 337 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	8,3
165 315 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 106 0	10, 13, 14a, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 354 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 107 0	10, 13, 14a, 26, 17b, 37	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
077 317 0	2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

016 104 2	2c, 10, 13, 14a, 37, 28	0,0	22,7	11,8	0,0	0,0	6,7	0,0
106 216 0	1, 10, 13, 15, 17, 17b, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 315 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 507 0	10, 13, 14a, 16, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
067 316 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 505 0	10, 13, 14a, 16, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 022 3	2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	0,0	83,3	0,0	0,0	0,0
106 316 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	3,8	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0
126 376 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 104 0	10, 13, 14a, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 404 0	10, 13, 16, 37	11,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 406 0	10, 13, 16, 17b, 37	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 336 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 357 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0
016 106 2	2c, 10, 13, 14a, 17b, 37, 28	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0	26,7	0,0
067 337 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 316 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 377 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37, 24, 28	3,8	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0
106 336 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 356 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 122 3	2c, 10, 13, 14a, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	17,6	8,3	0,0	6,7	0,0
016 206 0	2c, 10, 13, 15, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 376 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 336 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 404 0	2c, 10, 13, 23, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 516 0	10, 13, 14a, 16, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 355 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 37	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 006 2	2c, 10, 13, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Total</b>		<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

Virulence phenotype		'Buster'	'Bologna'	'Galibier'	'Matheo'	'Belepi'	'Stadium'	'Boregar'	'Waximum'
Virulences ( <i>Lr</i> genes)		NA	<i>Lr14a</i> , <i>Lr37</i>	<i>Lr14a</i>	<i>Lr28</i>	<i>Lr28</i>	<i>Lr28</i>	<i>Lr13</i> , <i>Lr14a</i> , <i>Lr37</i>	NA
106 314 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	41,7	40,0	20,0	11,1	10,0	12,5	55,6	14,3
166 317 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	8,3	20,0	10,0	0,0	10,0	12,5	11,1	14,3
106 315 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	8,3	10,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0
166 316 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
126 377 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3
166 314 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0
167 337 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	37,5	0,0	0,0
006 506 0	10, 13, 14a, 16, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 317 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0
073 100 0	2c, 3a, 3bg, 3ka, 10, 14a	0,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
067 317 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 377 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	8,3	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 337 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0
006 504 0	10, 13, 14a, 16, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 314 2	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	33,3	10,0	0,0	0,0	0,0
136 377 0	1, 2c, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 334 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 337 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0
165 315 0	1, 3, 3bg, 3ka, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,6
006 106 0	10, 13, 14a, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3
106 354 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 107 0	10, 13, 14a, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
077 317 0	2c, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3
016 104 2	2c, 10, 13, 14a, 37, 28	0,0	0,0	0,0	33,3	10,0	0,0	0,0	0,0
106 216 0	1, 10, 13, 15, 17, 17b, 37	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

166 315 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 37	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0
006 507 0	10, 13, 14a, 16, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
067 316 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 505 0	10, 13, 14a, 16, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 022 3	2c, 10, 13, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
106 316 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
126 376 0	1, 3, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 104 0	10, 13, 14a, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 404 0	10, 13, 16, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 406 0	10, 13, 16, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 336 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 357 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 106 2	2c, 10, 13, 14a, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0
067 337 0	3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 26, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 316 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 17b, 20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 377 3	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 26, 17b, 37, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 336 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 17b, 37	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 356 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 122 3	2c, 10, 13, 14a, 20, 17b, 24, 28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 206 0	2c, 10, 13, 15, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
166 376 0	1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 20, 23, 17b, 37	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
167 336 0	1, 3, 3bg, 3ka, 10, 13, 17, 20, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 404 0	2c, 10, 13, 23, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
006 516 0	10, 13, 14a, 16, 17, 17b, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
106 355 0	1, 10, 13, 14a, 15, 17, 23, 26, 37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
016 006 2	2c, 10, 13, 17b, 37, 28	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Total		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

### CHAPITRE 3: EVOLUTION WITHIN A GIVEN VIRULENCE PHENOTYPE (PATHOTYPE) IS DRIVEN BY CHANGES IN AGGRESSIVENESS: A CASE STUDY OF FRENCH WHEAT LEAF RUST POPULATIONS

---

Ce chapitre est présenté sous forme d'article qui a été déposé sur bioRxiv le 29 août 2022 et sera soumis à PCI journal.

Le chapitre précédent a mis en évidence que les gènes *Lr* ne permettent pas à eux seuls d'expliquer la domination de deux pathotypes majoritaires - 106 314 0 et 166 317 0 - au cours de la période étudiée 2006-2016. L'hypothèse selon laquelle l'agressivité des isolats jouerait un rôle significatif dans l'adaptation des populations de *P. triticina* au paysage variétal a été émise. Les deux pathotypes dominants ont en effet vu leur fréquence évoluer dans le paysage, avec des changements de fréquence (baisse ou augmentation) qui ne sont pas expliqués par la fréquence des gènes *Lr* dans les variétés les plus cultivées. Ce troisième chapitre analyse les différences d'agressivité entre isolats de *P. triticina* appartenant à un même pathotype (106 314 0 et 166 317 0) qui pourrait expliquer l'évolution de leur fréquence dans le paysage au cours de la période étudiée. Pour cela plusieurs traits d'agressivité d'isolats appartenant à chacun des deux pathotypes dominants, issus de trois périodes représentatives de l'évolution de leur fréquence relative dans le paysage, ont été mesurés sur des variétés parmi les plus cultivées, puis comparés.



## **Evolution within a given virulence phenotype (pathotype) is driven by changes in aggressiveness: a case study of french wheat leaf rust populations**

### **Authors:**

Cécilia Fontyn, Kevin JG Meyer, Anne-Lise Boixel, Ghislain Delestre, Emma Piaget, Corentin Picard, Frédéric Suffert, Thierry C Marcel, Henriette Goyeau

Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France

### **Abstract**

Plant pathogens are constantly evolving and adapting to their environment, including their host. Virulence alleles emerge, and then increase, and sometimes decrease in frequency within pathogen populations in response to the fluctuating selection pressures imposed by the deployment of resistance genes. In some cases, these strong selection pressures cannot fully explain the evolution observed in pathogen populations. A previous study on the French population of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust, showed that two major pathotypes — groups of isolates with the same combinations of virulences — predominated but then declined over the 2005-2016 period. The relative dynamics of these two pathotypes — 166 317 0 and 106 314 0 — relative to the others present in the population could not be explained solely by the frequency of *Lr* genes in the landscape. Within these two pathotypes, we identified two main genotypes that emerged in succession. We assessed three components of aggressiveness — infection efficiency, latency period and sporulation capacity — for 44 isolates representative of the four *P. triticina* pathotype-genotype combinations. We showed, for both pathotypes, that the most recent genotypes were more aggressive than the older ones. Our findings were highly consistent for the various components of aggressiveness for pathotype 166 317 0 grown on Michigan Amber — a ‘naive’ cultivar never grown in the landscape — or on Apache — a ‘neutral’ cultivar, which does not affect the pathotype frequency in the landscape and therefore does not have a selection effect. For pathotype 106 314 0, the most recent genotype had a shorter latency period on several of the cultivars most frequently grown in the landscape, but not on ‘neutral’ and ‘naive’ cultivars. We conclude that the quantitative components of aggressiveness can be significant drivers of evolution in pathogen populations. A gain in aggressiveness stopped the decline in frequency of a pathotype and the maintenance of this pathotype at a stable frequency, and even, subsequently, an increase in frequency of this pathotype in the pathogen population, providing evidence that adaptation to a changing varietal landscape will not only affect virulence but will also lead to change in aggressiveness.

### **Keywords**

Aggressiveness, quantitative phenotyping, genotype evolution, host adaptation, leaf rust

## Introduction

Plant diseases and pests cause crop damage accounting for up to 40% of yield losses (Boonekamp, 2012). Pathogenicity, or the ability of plant pathogens, especially fungi, to cause disease, is generally broken down into a qualitative term, 'virulence', and a quantitative term, 'aggressiveness' (Lannou, 2012). Virulence is defined as the capacity of the pathogen to infect its host (compatible interaction), as opposed to avirulence, which expresses the resistance of the host (incompatible interaction), according to the gene-for-gene model (Flor, 1971). A virulence phenotype, also known as a pathotype or race, is defined by a virulence profile: two pathogenic isolates are considered to belong to the same pathotype if they have the same combination of virulence genes. Aggressiveness, the quantitative variation of pathogenicity on a compatible host (Pariaud *et al.*, 2009a), can be viewed as the detrimental impact of a pathogen on its host, leading to damage to the crop plant and, thus, yield losses (Shaner *et al.*, 1992; Pariaud *et al.*, 2009a; Lannou, 2012). Aggressiveness also determines the rate at which a given disease intensity is reached. Its assessment is intrinsically complex because it is related to various life-history traits of the pathogen specific to its biology and the nature of the symptoms that it produces. The different components of aggressiveness can be measured by evaluating several of these complementary quantitative traits expressed during the host–pathogen interaction. The most widely assessed aggressiveness components for rust pathogens are infection efficiency, latency period and sporulation capacity (Pariaud *et al.*, 2009a; Lannou, 2012; Azzimonti *et al.*, 2013). The quantitative resistances of cultivars can affect the pathogen aggressiveness by acting on several life history of its traits (Azzimonti *et al.*, 2013). For a given pathotype, this lead to the selection of more aggressive isolates (Frézal *et al.*, 2018) causing more damages to the host and the reduction of the resistance level of these cultivars measured in field conditions, as it has been shown with the wheat cv. Soissons in France (Pariaud *et al.*, 2009b)

Infection efficiency is calculated by determining the proportion of spores able to cause a new infection when deposited on compatible host plant tissues (Sache, 1997). The estimation of this component is complex due to technical issues, particularly the need for great precision in the spore deposition process (Lehman & Shaner, 1997), which involves placing a fixed and known number of spores — ideally one by one — on the leaf.

The latency period is the length of time between the initiation of the infection process by a unit of inoculum and the start of infectious unit production (Parlevliet, 1979; Madden *et al.*, 2007). In rusts, it is often defined as the length of time between inoculation and the appearance of 50% of the sporulating structures (e.g. uredinia),

also known as ‘pustules’ (Parlevliet, 1975; Johnson, 1980; Pfender, 2001). Latency period estimations therefore require counts of uredinia on at least a daily basis. The latency period is highly temperature-dependent, and its expression in thermal time is therefore recommended, to allow comparisons between trials (Lovell *et al.*, 2004).

Sporulation capacity is assessed as the number of spores produced per individual sporulating structure and per unit time (Sache, 1997; Pariaud *et al.*, 2009a). Spores can be collected and counted directly (e.g. with a cell counter) or indirectly (e.g. weighed) (Imhoff, 1982; Robert *et al.*, 2004; Delmotte *et al.*, 2014). However, in rusts, pustule density affects the number of spores produced (Robert *et al.*, 2004) and must, therefore, be taken into account in some analysis (Lannou & Soubeyrand, 2017). Moreover, sporulation is a continuous process, so sporulation capacity is time-dependent. This trait, like several others, is, thus, dependent on latency period. The interdependence of traits can be reduced by measuring sporulation capacity at a normalized time point.

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* is one of the most damaging wheat diseases, causing high yield losses worldwide (Huerta-Espino *et al.*, 2011; Savary *et al.*, 2019). Qualitative resistance is the easiest and most effective means of limiting leaf rust epidemics. Eighty-two *Lr* genes have been identified in wheat cultivars, most displaying qualitative interactions (Bariana *et al.*, 2022). It has been shown that the deployment of qualitative resistance genes in the landscape exerts a strong selective pressure, acting as an essential driver of evolution in *P. triticina* populations (Goyeau *et al.*, 2006). This effect was highlighted by surveys of virulence phenotypes (pathotypes), which showed that the corresponding virulence can emerge rapidly after the introduction of a new *Lr* gene into cultivars. For example, in France, virulence against *Lr28* appeared within only two years of the release of cultivars carrying *Lr28* (Fontyn *et al.*, 2022). Adaptation to qualitative resistances occurs rapidly, despite the clonality of the population, through ‘boom-and-bust’ cycles of resistance (McDonald & Linde 2002).

However, qualitative resistance alone cannot fully explain pathogen population dynamics. Indeed, the quantitative resistance genes introgressed into new wheat cultivars at the same time as qualitative resistance genes may also exert a selection pressure in favor of more aggressive pathotypes. The occurrence of selection for greater aggressiveness has already been established for various pathogens (Delmas *et al.*, 2016; Frézal *et al.*, 2018). Milus *et al.* (2009) showed that the replacement of an ‘old’ *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* population by a ‘new’ population could be explained by the greater aggressiveness of isolates from this new population. A survey of the French *P. triticina* population from 1999-2002 (Goyeau *et al.*, 2006) revealed the domination of a single pathotype (073 100 0), coinciding with a period in which the cultivar landscape was dominated by the cultivar Soissons. Pathotype 073 100 0 was found to be more aggressive on this cultivar than other virulent pathotypes present in the *P. triticina* population during this period (Pariaud *et al.*, 2009b). Fontyn *et al.* (2022)

recently showed that the domination of the French landscape by two pathotypes — 106 314 0 and 166 317 0 — during the 2005-2016 period could not be fully attributed to the deployment of *Lr* genes. Indeed, several other compatible pathotypes virulent against the *Lr* genes carried by the most widely grown cultivars were present in the landscape, but never reached substantial frequencies. The authors suggested that aggressiveness might drive the evolution of *P. triticina* populations, modifying pathotype frequencies at large spatiotemporal scales. The variation of aggressiveness over time, during the complete life history of a pathotype, corresponding to the stages of emergence, domination and replacement, has never been investigated.

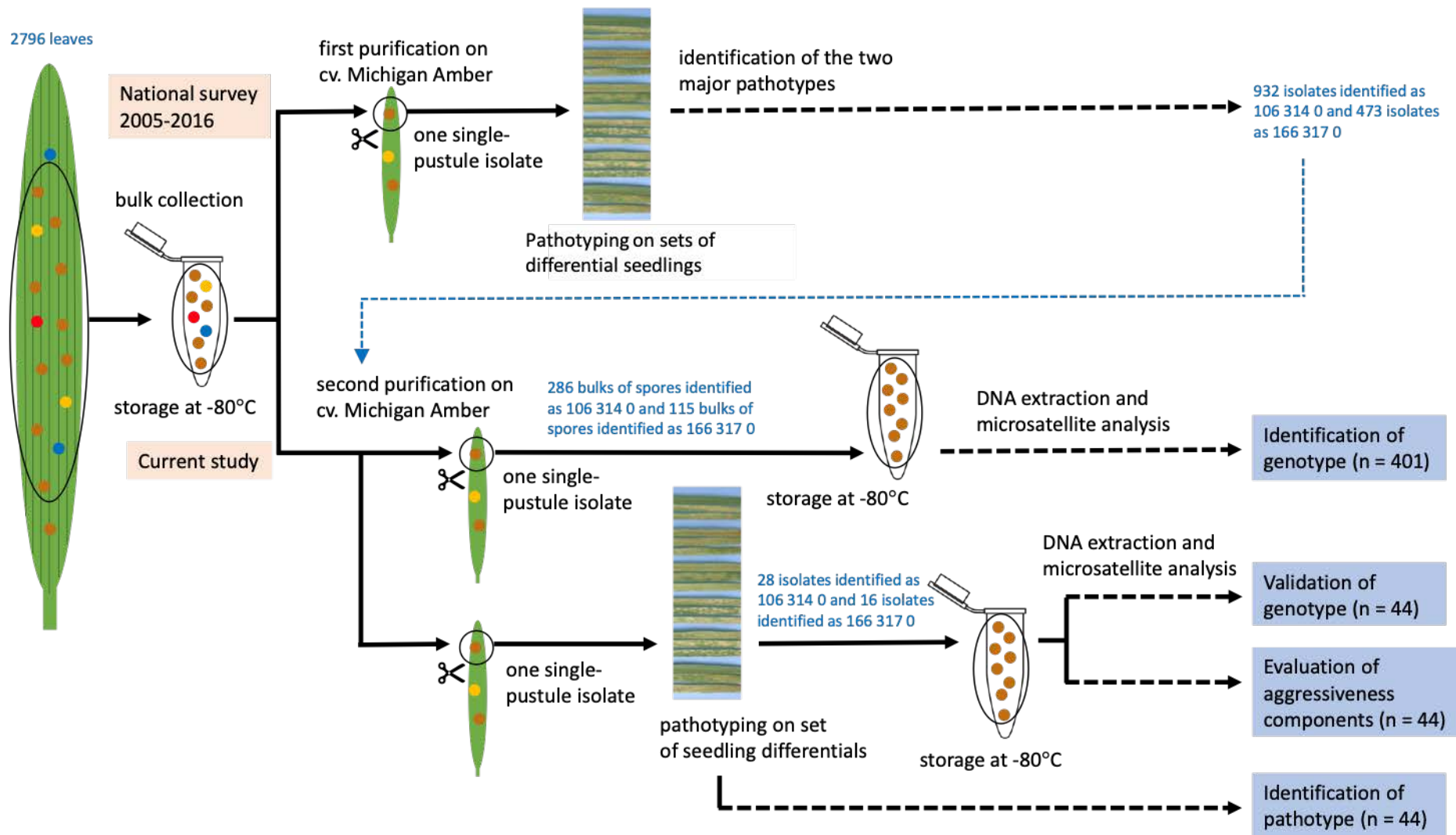
The objective of this study was to determine whether changes in aggressiveness can occur within a *P. triticina* pathotype over a large temporal scale during their life history, and whether information on aggressiveness allows us to predict changes in pathotypes frequency in the landscape. To this end, we focused on two major pathotypes, 166 317 0 and 106 314 0, identified as good experimental case studies for this purpose on the basis of investigations of frequency dynamics over the 2005-2016 period in France. We first characterized isolates of these two pathotypes genotypically with microsatellite markers, to identify potential ‘subpopulations’. Within each of the two pathotypes, we then compared the aggressiveness components of isolates from the most frequent genotypes (i) on ‘neutral’ cultivars, i.e. cultivars with no apparent effect on the frequencies of these pathotypes (166 317 0 and 106 314 0), and, when relevant, (ii) on five cultivars widely grown in France over the study period (pathotype 106 314 0 only).

## **Materials and methods**

### ***Selection and purification of isolates***

Annual surveys of *P. triticina* populations have been carried out at INRAE BIOGER over the last two decades. These surveys involve the collection of leaf samples from field (micro)plots sown with a single variety in a network of assays and nurseries throughout the wheat-growing areas of France (Goyeau *et al.*, 2006; Fontyn *et al.*, 2022). In total, 2796 leaves were collected from the 10 most cultivated varieties during the 2006-2016 period in the framework of the national survey. Urediniospores were bulk-harvested from each leaf and stored at -80°C. One single-pustule isolate was selected from each bulk and its pathotype was determined as described by Goyeau *et al.* (2006). In total, 932 isolates were identified as pathotype 106 314 0 and 473 isolates were identified as pathotype 166 317 0. For the purposes of this study, we selected 286 urediniospore bulks of pathotype 106 314 0 and 115 from pathotype 166 317 0, as identified during the national survey (Table S1 and S2). The bulks were defrosted and repurified by the re-inoculation of seven-day-old cv. Michigan Amber wheat seedlings, to obtain 401 new single-pustule isolates. Before inoculation, the plants were grown in cabinets with air filters in a greenhouse at temperatures between 15 and 20°C, under a 14-h photoperiod (daylight supplemented with 400 W sodium lamps). Plants were treated with 15 mL maleic hydrazide solution (0.25 g maleic hydrazide per

liter of H<sub>2</sub>O) to prevent the emergence of secondary leaves and to increase spore production. Inoculated seedlings were placed in a dew chamber at 15°C for 24 h and were then transferred to the greenhouse. One week after inoculation, the seedlings were trimmed such that only one plant with one uredinium remained in each pot.



**Figure 1.** Overview of the purification, selection, pathotyping, and genotyping steps for the *P. tritricina* isolates for which aggressiveness components were evaluated

Before sporulation, cellophane bags were placed over the pots to prevent contamination between isolates. Ten days after inoculation, 401 leaf segments, each carrying only one uredinium, were collected for DNA extraction and genotyping with microsatellite markers. Other single-pustule isolates were also selected from 28 and 16 bulks initially identified as pathotypes 106 314 0 and 166 317 0, respectively. Each of these isolates was pathotyped (Goyeau *et al.*, 2006) and one of these isolates, after confirmation that its virulence phenotype was as expected, was selected for DNA extraction and genotyping with microsatellite markers. Spores from these 44 isolates were stored at -80°C for further assessments of aggressiveness (Table S3). The various stages in the purification, selection, pathotyping and genotyping of *P. triticina* isolates for which aggressiveness components were evaluated are summarized in Figure 1.

### **Genotyping of isolates with microsatellite markers**

#### DNA extraction

DNA was extracted from all the purified isolates in 96-well extraction plates, with Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit buffers (Qiagen, Hilden, Germany). To this end, each leaf segment carrying a single uredinium was placed in a Qiagen collection microtube with a tungsten bead and 100 µL of hot AP1 buffer (65°C). Leaf segments were ground by shaking the microtubes in a Retsch® MM400 ball mill twice, for 30 seconds each, at 25 Hz. The tubes were then centrifuged for 1 minute at 3000 x *g*. AP1 buffer supplemented with RNase A and Reagent DX was then added to each tube (300 µL). After mixing, we added 130 µL P3 buffer to the tube, which was then incubated for 10 minutes at -20°C and centrifuged at 4°C for 10 minutes at 20 000 x *g*. The supernatant (200 µL) was transferred to a new tube, to which we added 1 volume of sodium acetate (3 M pH 5) and 3 volumes of isopropanol (100%). After mixing, the tubes were placed at -20°C for 30 minutes and then centrifuged for 20 minutes at 6000 x *g*. The supernatant was removed and 3 volumes of 70% ethanol were added. The tube was placed at -20°C for 5 minutes and was then centrifuged at 4°C for 15 minutes at 6000 x *g*. The pellet containing the DNA was allowed to dry overnight, and was then resuspended in 100 µL ultra-purified water. We transferred 20 µL of the resulting suspension to Qiagen elution microtubes RS in a 96-tube rack, which was sent to Eurofins (Eurofins, Luxembourg) for genotyping. The DNA suspensions had concentrations of between 1 and 25 ng/µL.

#### Microsatellite genotyping and analyses

The 401 and 44 single-pustule isolates were genotyped for 19 microsatellite markers: RB8, RB11, RB12, RB17, RB25, RB26, PtSSR13, PtSSR50, PtSSR55, PtSSR61, PtSSR68, PtSSR91, PtSSR92, PtSSR152, PtSSR154, PtSSR158, PtSSR164, PtSSR173, and PtSSR186 (Duan *et al.*, 2003; Szabo & Kolmer, 2007). The microsatellite markers were assembled into two multiplexes of 9 and 10 markers and

labeled with four fluorochromes (Table S4) to prevent overlaps between markers with the same range of allele sizes. PCR amplification was performed by Eurofins (Eurofins, Luxembourg), with the following amplification program: 95°C for 5 min and 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 30 s, and then 60°C for 30 min. Each reaction contained 5 µL DNA solution and PCR mixture with Taq Type-it (Qiagen®). PCR products were analyzed by capillarity electrophoresis on an ABI3130xl sequencer. The two-multiplex PCR system was tested and validated on eight reference *P. triticina* DNA extracts from isolates obtained from bread and durum wheat. Chromatograms were visually inspected for all markers and for all individuals with Peak Scanner software version 2.0, before the final assignment of SSR alleles. The chromosome position of SSR markers was determined by performing a blastn analysis (with default parameter values) of the sequence of each primer against the two genome sequences of the Australian isolate Pt76 (Duan *et al.*, 2021) with the NCBI blast tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The genotyping of the 401 isolates revealed two major genotypes within each pathotype: 106 314 0-G1 and 106 314 0-G2 for pathotype 106 314 0, and 166 317 0-G1 and 166 317 0-G2 for pathotype 166 317 0. These genotypes were taken into account in the design of subsequent experiments.

### ***Evaluation of aggressiveness components***

#### Experimental design

Three components of aggressiveness were assessed for 28 isolates of pathotype 106 314 0 and 16 isolates of pathotype 166 317 0 that had been purified, pathotyped and genotyped (Table S3): latency period, infection efficiency and sporulation capacity. These aggressiveness components were measured in the greenhouse on seedlings of two wheat varieties: (i) Apache, a commercial French cultivar characterized as ‘neutral’ in a previous study (Fontyn *et al.*, 2022), i.e. with no selection effect on the landscape-pathotype pattern, and (ii) Michigan Amber, considered intrinsically ‘naive’ or ‘neutral’, both because it carries no known leaf rust resistance gene and because it has never been cultivated in France and cannot, therefore, have played any significant role in the evolutionary trajectory of *P. triticina* in France.

It was not possible to perform a large single trial at our facilities, so the 44 isolates were characterized in five successive series, according to the same protocol and under the same experimental conditions. In series 1 and 2, we investigated the variation of aggressiveness in pathotypes 106 314 0 and 166 317 0, distinguishing the two genotypes of each pathotype (106 314 0-G1 and 106 314 0-G2, 166 317 0-G1 and 166 317 0-G2, respectively) on Apache and Michigan Amber. The isolates used for these two series were collected between 2005 and 2016 on Apache (Table 1). Series 3, 4 and 5 were performed to investigate the variation of aggressiveness in 106 314 0 only. Again, the two genotypes (106 314 0-G1 and 106 314 0-G2) were distinguished, this time on three additional cultivars from the following list — Aubusson, Premio,



Michigan Amber, Sankara, Expert and Bermude — all of which, except Michigan Amber, were among the 35 most frequently grown cultivars in the French landscape during the 2006-2016 period. The isolates used in these three series were collected in 2012 and 2013, on Aubusson, Premio and Apache (Table 2). The isolates used in series 3 were collected on cultivars Aubusson and Premio and were tested on these two cultivars and Michigan Amber. The isolates used in series 4 were collected on cultivar Apache and were tested on Apache and Michigan Amber. The isolates used in series 5 were collected on cultivar Apache and were tested on cultivars Sankara, Expert and Bermude. In all five series, each isolate × cultivar interaction was replicated eight times, on eight wheat seedlings. Three replicates of the experimental design, including the five series, were established.

**Table 1.** Experimental design, with the allocation of isolates to series 1 and 2, for assessments of the aggressiveness of pathotypes 106 314 0 and 166 317 0. Isolates were collected during the 2005-2016 period, from cultivar Apache, and were tested on Apache and Michigan Amber.

Pathotype	Genotype <sup>a</sup>	Year of sampling	Number of isolates	Series
106 314 0	106 314 0-G1	2005-2006	6	1
		2012-2013	3	1
		2015-2016	0	1
	106 314 0-G2	2005-2006	0	1
		2012-2013	2	1
		2015-2016	6	1
166 317 0	166 317 0-G1	2012	6	2
		2014	6	2
		2016	0	2
	166 317 0-G2	2012	0	2
		2014	0	2
		2016	4	2

<sup>a</sup>genotyping with 19 SSRs specific to leaf rust (see Table 3)

### Assessment of aggressiveness

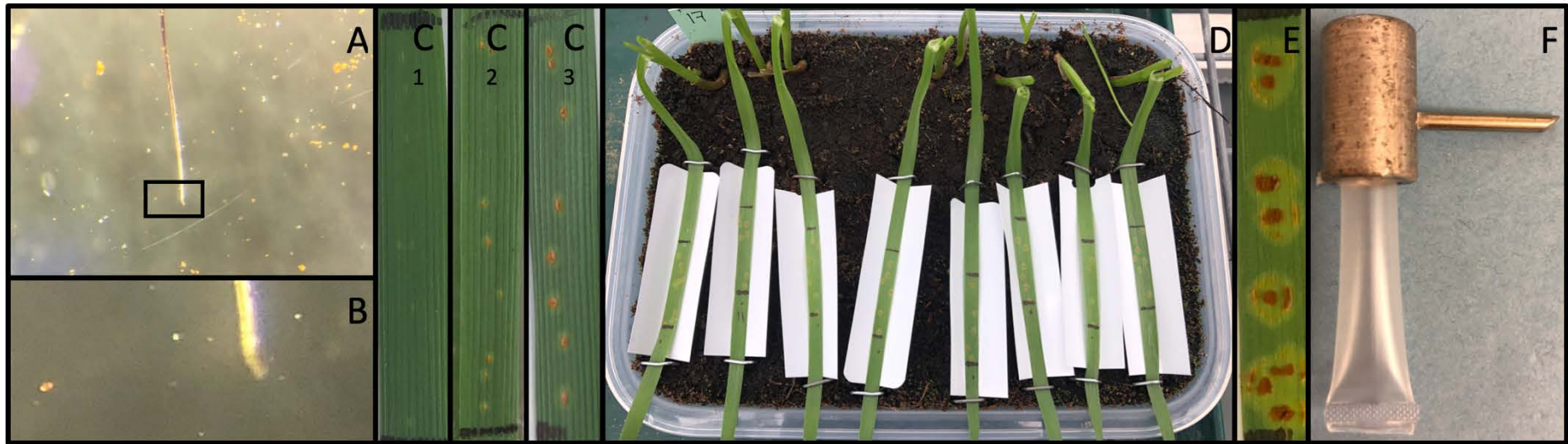
All the phenotyping tests were performed in a greenhouse on eight-day-old wheat seedlings grown in a 21 x 15 x 6 cm plastic box containing potting soil placed under standardized conditions (18°C at night and 22°C during the day, with a 16-h photoperiod). The second leaf of each seedling was maintained, with double-sided tape, on a rigid plate coated with aluminum foil and a 3 cm-long segment of this leaf was inoculated with the fungus. Inoculation was performed with 10 fresh (two-week-old) spores, picked one by one with a human eyelash under binocular magnifier and

deposited on the leaf (Figure 2A and 2B). The plants were then placed in a dew chamber, in the dark, at 15°C, for 18 to 24 h. They were then returned to the greenhouse and the rigid plate was removed. When the first uredinia (pustules) began to break through the leaf epidermis, generally six days after inoculation, they were counted at 10- to 14-hour intervals (twice daily) until no new pustules appeared (Figure 2C). Infection efficiency (IE) was estimated for each leaf as the ratio between the final number of uredinia and the number of spores deposited (10 spores). Latency period (LP), estimated as the time between inoculation and the appearance of 50% of the total number of uredinia, was expressed in degree-days, based on the air temperature measured in the greenhouse every ten minutes. Sporulation capacity (SP) was estimated, once the number of uredinia had stabilized, as the number of spores produced per uredinium over a four-day period. Once the final number of uredinia had been reached (i.e. 9 days after inoculation) the spores that had already been produced were removed from the leaf with a small brush. Slightly incurved aluminum gutters (2 x 7cm) made from blind slats were then positioned under each inoculated leaf, which was attached to the gutter with clips (Figure 2D). After four days, all the newly produced spores (Figure 2E) were removed by suction with a cyclone collector into a portion of plastic straw sealed at one end (Figure 2F). Each portion of straw was weighed before and after spore harvesting. SP was calculated by dividing the total weight of the spores collected from a single leaf by the number of uredinia on that leaf.

**Table 2.** Experimental design, with the allocation of isolates to series 3, 4 and 5, for assessments of the aggressiveness of pathotype 106 314 0. Isolates were collected in 2012-2013, from Aubusson, Premio or Apache.

Genotype <sup>a</sup>	Number of isolates	Cultivar tested	Series
106 314 0-G1	5	Aubusson	3+4
		Premio	3+4
		Michigan Amber	3+4
	1	Sankara	5
		Expert	5
		Bermude	5
106 314 0-G2	11	Aubusson	3+4
		Premio	3+4
		Michigan Amber	3+4
	2	Sankara	5
		Expert	5
		Bermude	5

<sup>a</sup>genotyping with 19 SSRs specific to leaf rust (see Table 3)



**Figure 2.** Experimental steps for the assessment of aggressiveness components of *Puccinia triticina* on wheat seedlings. Inoculation: (A) and (B), collection of a spore with a human eyelash and its deposition on a leaf. Latency period (C): (C1) onset of chlorosis, (C2) counting of the uredinia (pustules) that have broken through the leaf, (C3) end of the latency period, when all the pustules have emerged. Sporulation: (D) incurved aluminum gutters positioned under the leaves for spore collection, (E) end of sporulation, (F) spores retrieved with a cyclone collector into a sealed portion of plastic straw.

## Statistical analyses

For each of the three aggressiveness traits (the response variable  $Y$ ), two ANOVA models were used: model (1) for series 1 and 2; model (2) for pooled data from series 3 and 4 (without a series factor, as a preliminary analysis showed that the interactions of the series factor with other factors were never significant) and for series 5, for each cultivar, as the cultivars tested were not the same in the three series:

$$(1) Y_{ijklm} = \mu + R_i + G_j + C_k + G_j/I_l + \varepsilon_{ijklm}$$

$$(2) Y_{ijkl} = \mu + R_i + G_j + G_j/I_k + \varepsilon_{ijkl}$$

where  $Y_{ijklm}$  and  $Y_{ijkl}$  are the values of the studied trait in replicate ( $R$ )  $i$ , of genotype ( $G$ )  $j$  and isolate ( $I$ )  $l$  or  $k$ , nested within genotype, on cultivar ( $C$ )  $k$  (when this occurred).  $\mu$  is the overall mean value for this trait and  $\varepsilon$  is the residual, representing the measurement error, with  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$

Log,  $\sqrt{\quad}$  or  $1/x$  transformation was applied to IE, LP and SP when necessary, to obtain a normalized distribution of residuals. When the distribution of residuals could not be normalized by any transformation, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed to analyze the effect of genotype on the aggressiveness components and also the cultivar effect in series 1 and 2. Nevertheless, the Kruskal-Wallis analysis gave the same results as the ANOVA analysis even if the data could not be normalized.

All the analyses were performed with R software version 4.1.0.

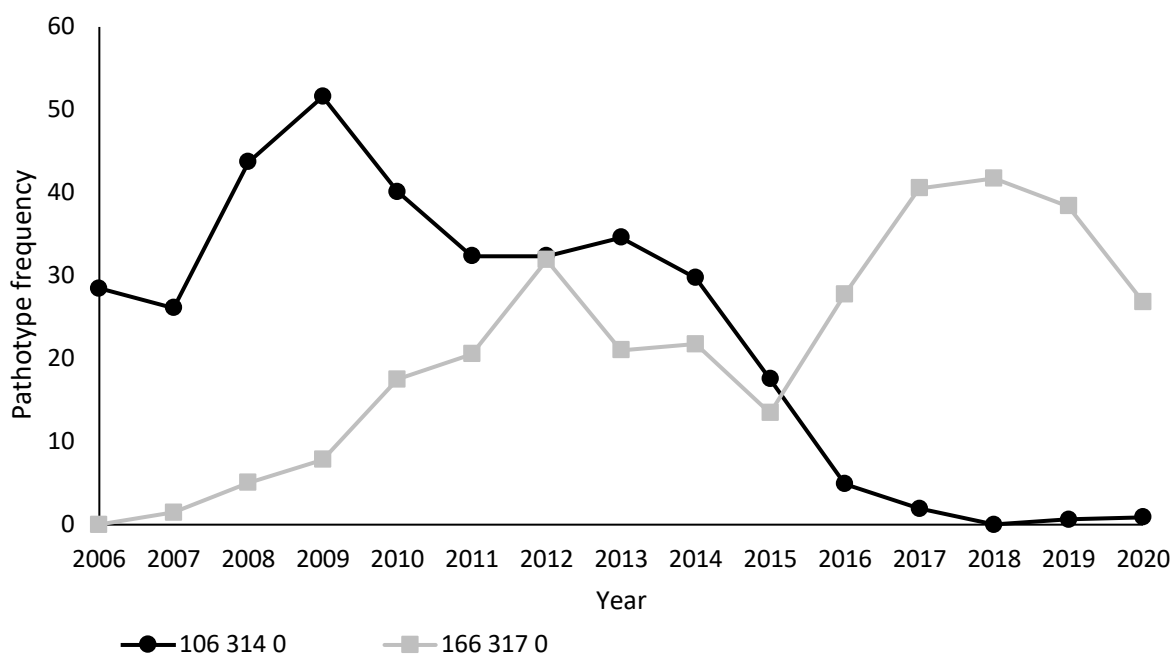
## Results

### ***Frequency dynamics of two major *P. triticina* pathotypes in the French landscape in the 2006-2020 period***

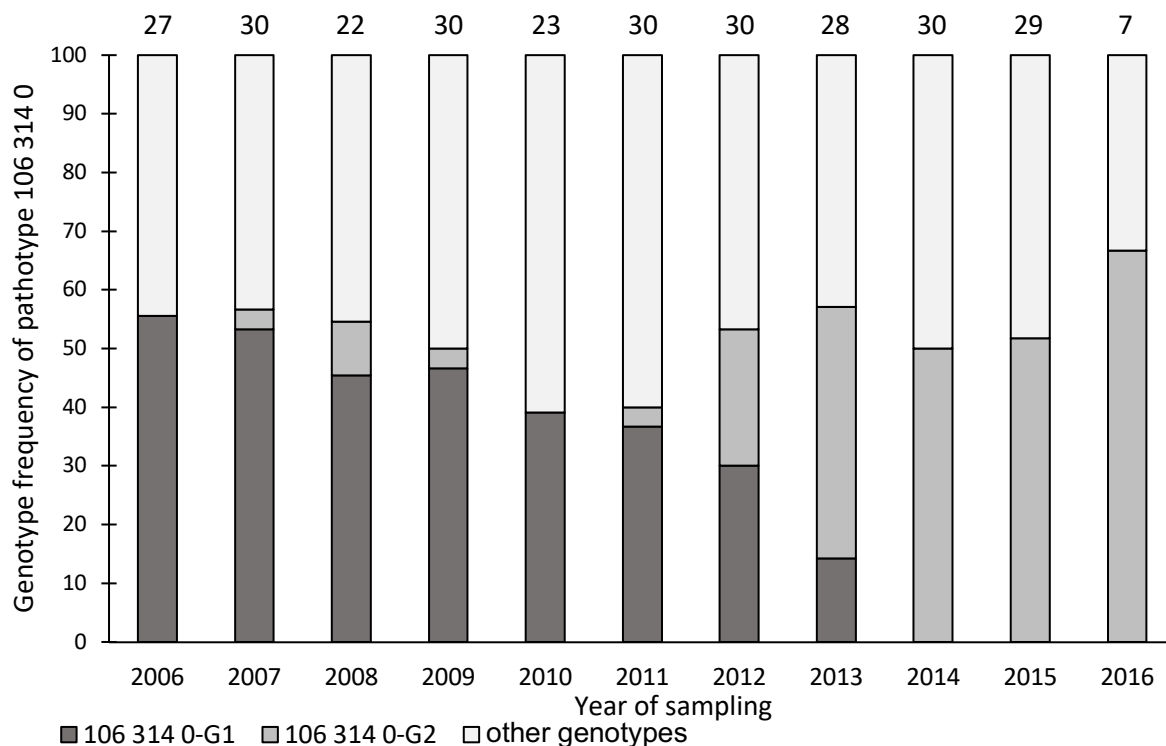
The frequency of pathotype 106 314 0 in the French *P. triticina* population increased from 30% in 2006 to 51% in 2009 (Figure 3). After a plateau at 30-33% from 2011 to 2014, the frequency of this pathotype decreased strongly, to less than 1% in 2018. Within pathotype 106 314 0, two main genotypes, G1 and G2, were identified and were considered to be dominant as their cumulative frequency ranged from 40% to 65% during the 2006-2016 period (Figure 4). These two genotypes differed at five of the 19 SSR loci studied (RB8, RB11, PtSSR68, PtSSR92 and PtSSR164; Table 3). Genotype 106 314 0-G1 was the most frequent from 2006 to 2012, but it decreased in frequency thereafter (Figure 4). Genotype 106 314 0-G2 was present at a very low frequency from 2007 to 2011. In 2012, the frequencies of the two genotypes were fairly similar, at 23% for 106 314 0-G1 and 30% for 106 314 0-G2. Genotype 106 314 0-G1 then continued to decrease in frequency, eventually disappearing completely from the sampled population in 2014. Conversely, genotype 106 314 0-G2 continued to increase in frequency. It accounted for 42% of the total 106 314 0 pathotype population in 2013 and 66% in 2016. Over the entire period, genotypes other than G1 and G2 were also identified (detailed data not shown) within pathotype 106 314 0. Their

cumulative frequency ranged from 40% to 60% from 2006 to 2016.

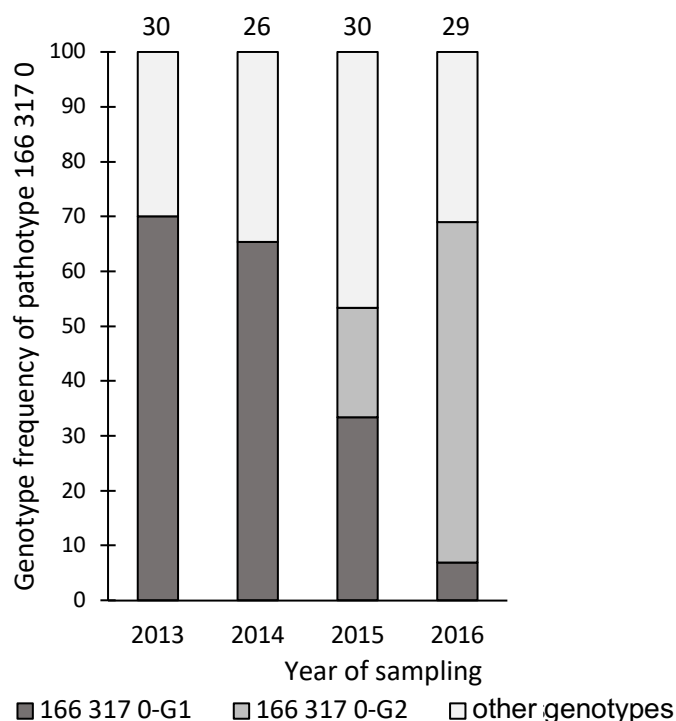
Pathotype 166 317 0 first appeared in 2007, initially at a very low frequency (less than 2%). Its temporal evolution in the French *P. triticina* population was characterized by two peaks, at 32% in 2012 and 41% in 2018, with a decrease in frequency to 13% in 2015 (Figure 3). The frequency of this pathotype decreased after 2018 reaching 27% in 2020. Within pathotype 166 317 0, two genotypes, differing by only one of the 19 SSR loci used (RB8; Table 3), were identified and considered to be predominant during the 2013-2016 period. In 2013 and 2014, genotype 166 317 0-G1 dominated, as it accounted for more than 65% of the total 166 317 0 pathotype population (Figure 5). In 2015, the 166 317 0-G2 genotype emerged and became co-dominant with 166 317 0-G1. In 2016, 166 317 0-G2 sharply increased in frequency, to 62%, whereas the frequency of 166 317 0-G1 decreased to 7%. Over the four-year period considered, several other genotypes were identified (detailed data not shown). Their cumulative frequencies reached 46% during the co-dominance of the two major genotypes, and 30% when a single genotype dominated.



**Figure 3.** Frequency dynamics of two of the major *Puccinia triticina* pathotypes, 106 314 0 and 166 317 0, in the French landscape during the 2006-2020 period. Pathotype frequency was determined with data from the national survey (see Fontyn *et al.*, 2022).



**Figure 4.** Changes in genotype frequencies within pathotype 106 314 0 in the French landscape during the 2006-2016 period, as determined with 19 SSR markers. The numbers on top of the bars are the numbers of isolates genotyped.



**Figure 5.** Changes in genotype frequencies within pathotype 166 317 0 in the French landscape during the 2013-2016 period, as determined with 19 SSR markers. Numbers on top of the bars represent the numbers of isolates genotyped.

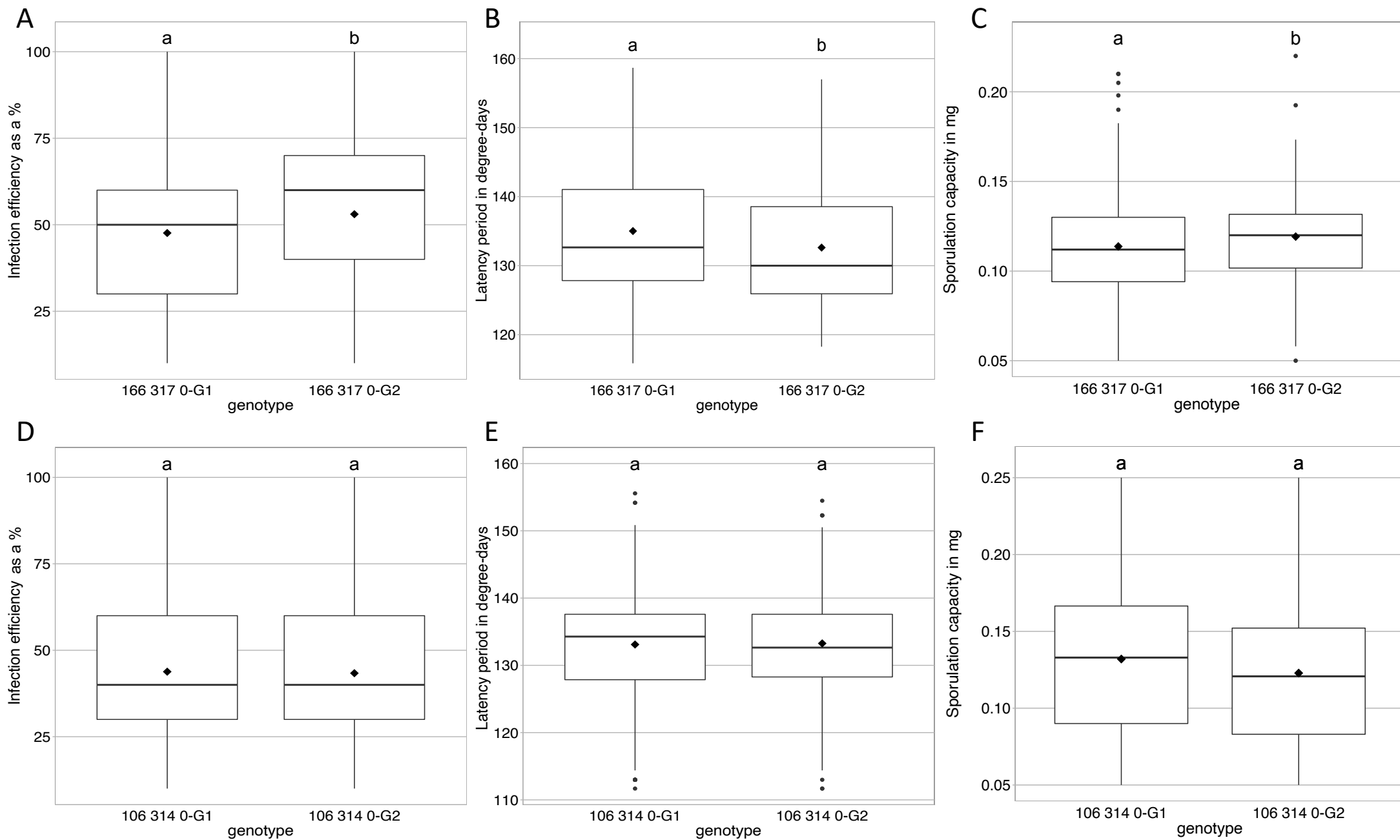
**Table 3.** Genotypic characteristics of the two main genotypes, G1 and G2, identified for isolates of pathotypes 166 317 0 and 106 314 0, collected from 2005-2016 for 19 SSR loci. Allele sizes differing between genotypes of the same pathotype are shown in bold typeface.

Locus	166 317 0 <sup>a</sup>				106 314 0 <sup>a</sup>			
	166 317 0-G1		166 317 0-G2		106 314 0-G1		106 314 0-G2	
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
RB8	<b>143</b>	<b>146</b>	<b>146</b>	<b>152</b>	<b>143</b>	<b>143</b>	<b>143</b>	<b>152</b>
RB11	200	200	200	200	<b>200</b>	<b>204</b>	<b>175</b>	<b>204</b>
RB12	282	290	282	290	282	290	282	290
RB17	190	190	190	190	190	190	190	190
RB25	230	230	230	230	230	230	230	230
RB26	352	352	352	352	352	352	352	352
PtSSR13	129	131	129	131	129	131	129	131
PtSSR50	365	371	365	371	365	371	365	371
PtSSR55	308	308	308	308	308	308	308	308
PtSSR61	296	302	296	302	296	300	296	300
PtSSR68	309	311	309	311	<b>309</b>	<b>317</b>	<b>309</b>	<b>323</b>
PtSSR91	380	382	380	382	382	382	382	382
PtSSR92	246	246	246	246	<b>246</b>	<b>246</b>	<b>246</b>	<b>248</b>
PtSSR152	389	393	389	393	389	393	389	393
PtSSR154	247	267	247	267	247	267	247	267
PtSSR158	235	238	235	238	232	238	232	238
PtSSR164	219	219	219	219	<b>219</b>	<b>225</b>	<b>219</b>	<b>219</b>
PtSSR173	213	221	213	221	213	221	213	221
PtSSR186	341	341	341	341	341	341	341	341

<sup>a</sup> Seven-digit triplet code (Gilmour, 1973) based on a 20-*Lr* gene differential set: Thatcher lines [*Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*], [*Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*], [*Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*], [*Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*], [*Lr17*, *Lr20*, *Lr23*], [*Lr26*, *Lr17b* (the Australian cv. 'Harrier'), *Lr37*] and [*Lr24*, , *Lr28* (*line CS2A/2M*)].

### ***Differences in aggressiveness between genotypes of the two major P. triticina pathotypes expressed on 'neutral' and 'naive' cultivars***

Genotype 166 317 0-G2 was more aggressive than genotype 166 317 0-G1 in assessments of all three aggressiveness components on a 'neutral' cultivar, Apache, and a 'naive' cultivar Michigan Amber (in analyses of the pooled dataset for the two cultivars; Figure 6A, B and C). The data for assessments of aggressiveness components on both cultivars are provided in the supplementary data (Figure S1), in addition, all the p-value for each component are provided in table S5. Infection efficiency (IE) was higher for genotype 166 317 0-G2 (53.1 %) than for genotype 166 317 0-G1 (47.6%). Sporulation capacity (SP) was also higher for genotype 166 317 0-G2, with 0.120 mg/lesion versus 0.114 mg/lesion for genotype 166 317 0-G1. Latency period (LP) differed significantly between the two genotypes; it was shorter for genotype 166 317 0-G2 (132.6 vs 135.0 degree-days). Significant differences were found between isolates of the two genotypes.



**Figure 6.** Comparison of genotype aggressiveness within the two major *Puccinia triticina* pathotypes. Infection efficiency (IE) as a %, latency period (LP) in degree-days and sporulation capacity (SP) in mg for pathotypes 166 317 0 (A, B, C) and 106 314 0 (D, E, F) were assessed on cultivars Apache and Michigan (pooled data, see Figures S1 and S2 for results by cultivar). Isolates were sampled from Apache in 2012, 2014, and 2016 for pathotype 166 317 0, and in 2005-2006, 2012-2013 and 2015-2016 for pathotype 106 314 0. Within a box plot, the black diamond represents the mean value and the bar indicates the median value. Letters indicate significant differences between genotypes in Kruskal-Wallis tests (A, C, E, F) or ANOVA (B and D).



Infection efficiency (IE), latency period (LP) and sporulation capacity (SP) did not differ between genotypes 106 314 0-G1 and 106 314 0-G2 assessed on cultivars Apache and Michigan Amber (in analyses of the pooled dataset for the two cultivars; Figure 6D, E and F). The data for assessments of aggressiveness components on both cultivars are provided in the supplementary data (Figure S2). The IE for genotype 106 314 0-G1 was 43.8%, which is not significantly different from the value of 43.4% obtained for genotype 106 314 0-G2. SP was 0.128 mg/lesion for genotype 106 314 0-G1, which is not significantly different from the value of 0.124 mg/lesion obtained for genotype G2. Finally, LP differed by less than one degree-day between the two genotypes, at 133.1 degree-days for genotype 106 314 0-G1 and 133.3 degree-days for genotype 106 314 0-G2. By contrast to our findings for pathotype 166 317 0, we observed no significant difference between genotypes of the same pathotype for 106 314 0. This singularity justified our decision to perform phenotypic characterization by comparing the aggressiveness of isolates of pathotype 106 314 0 on other cultivar sets with a view to detecting potential differences.

### ***Difference in aggressiveness between the two major genotypes of pathotype 106 314 0 on Michigan Amber and major cultivars present in the French varietal landscape***

The two major genotypes of pathotype 106 314 0 had significantly different latency periods (LP) on five of the six cultivars tested (Table 4), all the p-value for each aggressiveness components are provided in table S6. These differences were significant on the cultivar Michigan Amber, whereas no difference was found in analyses of the data for series 1, as described above. The infection efficiency (IE) of genotype 106 314 0-G2 was higher than that of 106 314 0-G1 (48.7% versus 39.1%) on cultivar Expert, but no differences were found on the other cultivars. Genotype 106 314 0-G2 had a shorter LP than 106 314 0-G1 on five of the six cultivars tested. This difference in LP ranged from 2.1 degree-days on Premio to 4.8 degree-days on Expert. A difference of 5 degree-days is equivalent to 8 h at 15°C. Bermude was the only cultivar on which LP did not differ significantly between the two pathogen genotypes. No significant differences in sporulation capacity (SP) were observed between the two genotypes on any of the cultivars tested. SP varied between cultivars, ranging from 0.099 mg on Michigan Amber to 0.134 mg on Sankara, with slightly higher values for 106 314 0-G2 than for 106 314 0-G1. It was not possible to detect significant differences between cultivars because different cultivars were analyzed in different series.

Within genotypes, there was a significant isolate effect for LP, but no significant isolate effect for IE or SP, on Aubusson, Premio and Expert.

For LP, IE and SP, the replication factor (number of repetition x3) was almost always significant. The interaction between replication factor and the three aggressiveness components was significant for some aggressiveness component measurements (Table 4).

**Table 4.** Comparison of the aggressiveness of the two major genotypes of pathotype 106 314 0 on five of the mostly widely grown cultivars in the French landscape during the 2005-2016 period. Letters indicate a significant difference between genotypes on the same cultivar after a Tukey multiple-comparison test or a Wilcoxon-Mann-Whitney test. Numbers in bold typeface indicate a significant difference between isolates within genotypes.

Cultivar	Genotype	Aggressiveness components		
		Infection efficiency <sup>z</sup>	Latency period <sup>z</sup>	Sporulation capacity <sup>z</sup>
Aubusson	106 314 0-G1	48.5*	<b>141.0 a</b>	0.105
	106 314 0-G2	49.8*	<b>137.3 b</b>	0.106
Premio	106 314 0-G1	52.6*	<b>134.5 a</b>	0.102
	106 314 0-G2	49.8*	<b>132.4 b</b>	0.105
Bermude	106 314 0-G1	43.9*	143.4	0.114*
	106 314 0-G2	47.0*	142.1	0.121*
Expert	106 314 0-G1	39.1 a	<b>143.0 a</b>	0.120*
	106 314 0-G2	48.7 b	<b>138.2 b</b>	0.132*
Sankara	106 314 0-G1	45.0*	143.9 a*	0.134*
	106 314 0-G2	46.9*	140.7 b*	0.134*
Michigan	106 314 0-G1	51.6*	131.7 a	0.099
Amber	106 314 0-G2	52.2*	129.3 b	0.102

<sup>z</sup> Infection efficiency (IE) was measured as a %, latency period (LP) in degree-days, and sporulation capacity (SP) in mg of spores/uredinia.

\* indicates a significant interaction between genotype and replication factors

## Discussion

Focusing on two major pathotypes from the French *P. triticina* population, we found that several genotypes were present within each pathotype, and that the frequency of the most common genotypes changed over time. The initially dominant genotypes representative of pathotypes 166 317 0 and 106 314 0 were replaced, in each pathotype, by another genotype over the period 2006-2016. The most recent dominant genotype was more aggressive than the older one in both pathotypes.

### **Methodological aspects of aggressiveness measurement at the wheat seedling stage**

The mean values used to characterize the aggressiveness of different *P. triticina* isolates on wheat seedlings revealed significant variation for each of the three aggressiveness components measured — infection efficiency, latency period and sporulation capacity — at the seedling stage. Aggressiveness and its variation can be measured on seedlings (Milus *et al.*, 2006; de Vallavieille-Pope *et al.*, 2018) or on adult plants (Lehman & Shaner, 1997; Pariaud *et al.*, 2009b; Azzimonti *et al.*, 2013). Plant stage is known to affect the aggressiveness components of *P. triticina* (Pariaud *et al.*, 2009b). We decided to assess aggressiveness components on wheat seedlings in this study, because the use of seedlings in a semi-controlled environment results in more homogeneous physiological properties of the plant at inoculation and because this approach requires less space and time than studies on adult plants.

With the phenotyping method developed and used in this study, we were able to estimate the three aggressiveness components simultaneously on the same inoculated plant. We measured infection efficiency (IE) more precisely here than in previous studies, in which the variability was sometimes very high. For instance, Pariaud *et al.* (2009b) applied a 1:10 mixture of *P. triticina* urediniospores and *Lycopodium* spores to the leaf surface with a soft brush; they reported IE values ranging from 18% to 80% for the same genotype. This high level of variation resulted from difficulty controlling the number of urediniospores deposited with this method, resulting in differences between experimental series. Although fastidious, the deposition of urediniospores one-by-one on the leaf surface resulted in a much more accurate estimation of IE than other methods based on the dilution of *P. triticina* urediniospores among *Lycopodium* spores or in liquids, such as mineral oils (Pariaud *et al.*, 2009; Sørensen *et al.*, 2016). Nevertheless, the interaction between IE and the replication factor was almost always significant, indicating an impact of environmental conditions on this component of aggressiveness. This interaction reflects the difficulty ensuring uniform dew quality in the dew chamber just after inoculation, as the success of urediniospore germination and penetration depends on the presence of a water film on the leaf surface (Bolton *et al.*, 2008).

Sporulation capacity (SP) was measured by collecting urediniospores produced between 9 and 12 days after inoculation, and differences in SP between genotypes

were detected for only one experimental series. Pariaud *et al.* (2009b) found differences in SP between pathotypes of *P. triticina* in a study in which urediniospores were collected 15 to 23 days after the inoculation of adult plants. They also found that the difference in SP between isolates increased with the regular collection of urediniospores until 59 days after inoculation. The collection of urediniospores more than 13 days after inoculation is of potential relevance for future experiments with our method, to maximize differences and reveal small differences in this component of aggressiveness between isolates.

Latency period (LP) was the component that differed most between pathogen genotypes and was the least affected by the replication factor. The calculation of LP in degree-days made it possible to take the temperature-dependence of both infection processes and pathogen development in the leaf into account (Lovell *et al.*, 2004). In most pathosystems, latency period is a component of choice for studies of quantitative interactions (aggressiveness, partial resistance) because time is a variable that is much easier to fractionate and, therefore, to quantify precisely, than any biological trait, making it possible to highlight extremely small differences between isolates repeatedly. This is almost an epistemological issue for experimental epidemiology and phytopathometry (Suffert & Thompson, 2018; Bock *et al.*, 2022).

### ***Evolution of greater aggressiveness in two P. triticina pathotypes***

In the case of pathotype 166 317 0, genotype G2, which replaced genotype G1, was more aggressive than its predecessor, with highly consistent results obtained for the different components of aggressiveness. Following this switch between genotypes, the frequency of pathotype 166 317 0 increased considerably over a period of three years, whereas the proportion of compatible host cultivars in the landscape decreased (data not shown). Severe *P. triticina* epidemics have been shown to be associated with a high sporulation capacity, a high infection efficiency and a short latency period (Azzimonti *et al.*, 2022). In pathotype 106 314 0, comparisons of aggressiveness on a 'neutral' cultivar revealed no significant difference between the most recent and oldest genotypes. A comparison of the aggressiveness of these two genotypes on some of the cultivars mostly frequently grown in the landscape revealed that 106 314 0-G2 was more aggressive than 106 314 0-G1 only in terms of its latency period. This change in predominant genotype coincided with a halt in the decline of pathotype 106 314 0 frequency in the landscape. The shorter latency period of genotype 106 314 0-G2 seems to have an effect on the frequency of this pathotype in the landscape, consistent with the assertions of several studies that latency period is the aggressiveness component with the largest effect on pathogen dynamics in field conditions (Lannou, 2012). In modeling studies, this also appeared to be the trait with the largest impact on the intensity of *P. triticina* epidemics, as it determined the number of reproductive cycles (i.e. from inoculation to the spore dispersion) of the pathogen possible in a single season (Rimbaud *et al.*, 2018). Although only latency period differed significantly between 106 314 0-G2 and 106 314 0-G1, the data for the other aggressiveness

components also supported the notion that 106 314 0-G2 was more aggressive, for every component, on all cultivars, except for infection efficiency on Premio. Measurements of aggressiveness components on seedlings in controlled conditions (only one reproductive cycle of the pathogen) have a limited capacity for the detection of small phenotypic variations.

The competitive advantage of one particular genotype within a pathotype, expressing a difference in fitness for the same virulence profile, may account for the replacement of one genotype with another. This hypothesis is particularly realistic here as the emergence of the more aggressive genotype in each pathotype, 106 314 0 and 166 317 0, coincided with a short-term change in the mid-term trend in frequency changes: (i) the decrease in the frequency of pathotype 106 314 0 in the landscape observed from 2009 to 2011 was temporarily halted during the 2011-2014 period, when the frequency of this pathotype reached a plateau (Figure 2), coinciding with the replacement of the less aggressive genotype 106 314 0-G1 with the more aggressive genotype 106 314 0-G2 in 2012 and 2013 (Figure 3); (ii) the decrease in the frequency of pathotype 166 317 0 in the landscape observed from 2012 to 2015 was halted over the 2015-2018 period, resulting in a new peak frequency (Figure 2) coinciding with the replacement of the less aggressive 166 317 0-G1 genotype with the more aggressive 166 317 0-G2 genotype in 2012 and 2013 (Figure 3).

These results suggest that the replacement of some pathotypes by others, driven by changes in the frequencies of resistance genes in the varietal landscape, may be slowed, to various extents, by increases in the aggressiveness of certain genotypes or 'lineages' (defined as genetically related genotypes of the same group of pathotypes, i.e. with the same close ancestor), consistent with the recent analysis by Fontyn *et al.* (2022). It is even possible, as for pathotype 166 317 0, for the pathotype to gain a 'second life' — for a period of three to four years — due to an increase in the aggressiveness of a new genotype, as long as it remains adapted (or at least not maladapted) to the resistance genes present in the varieties deployed in the landscape. This empirical study shows that differences in aggressiveness can be expressed on a 'neutral' cultivar (for pathotype 166 317 0), but sometimes (for pathotype 106 314 0) only on 'non-neutral' cultivars representative of a varietal landscape. This finding clearly complicates the experimental approach (difficulty determining the most appropriate experimental design without making assumptions), but also the data analysis. The magnitude of the differences in aggressiveness probably depends on the type of cultivars tested ('neutral' or 'non-neutral'). Indeed, we found that the intensity of the mid-term trend in the change in frequencies highlighted above was variable, with either a simple slowing of a trend towards a decrease (plateau, as for pathotype 106 314 0), or a change in direction, with a new increase (peak, as for pathotype 166 317 0).

### ***Greater aggressiveness as a selective advantage within plant pathogen populations***

Increases in aggressiveness have already been proposed as an explanation for the shifts observed in rust populations. Milus *et al.* (2009) measured five aggressiveness components for *P. striiformis* f. sp. *tritici* isolates with similar virulence profiles collected in the U.S. before or after 2000. Isolate aggressiveness was assessed on a susceptible cultivar, and comparisons revealed that the most recent isolates were more aggressive than the older ones (Milus *et al.*, 2009). Studies on host quantitative resistance effects on pathogen populations have revealed directional selection toward an increase in pathogen aggressiveness on host cultivars (Andrison *et al.*, 2007; Frézal *et al.*, 2018). Isolates of *Phytophthora infestans* collected on a partially resistant potato cultivar at the end of the epidemic produced larger lesions and had higher sporulation rates than those collected at the beginning of the epidemic (Andrison *et al.*, 2007). *Z. tritici* isolates collected from a partially resistant wheat cultivar were found to be more aggressive than isolates collected from a susceptible wheat cultivar (Cowger & Mundt, 2002). Isolates of *Venturia inaequalis* collected from an apple cultivar carrying a QTL for resistance had higher lesion densities and sporulation rates than isolates collected from a susceptible variety (Caffier *et al.*, 2016). Isolates of *Plasmopara viticola* collected from partially resistant varieties were found to have shorter latency periods and higher rates of spore production than isolates collected from susceptible cultivars (Delmas *et al.*, 2016). Many studies have shown that the use of quantitative sources of resistance affects the evolution of pathogen population by leading to the selection of more aggressive isolates. Quantitative interactions based on partial resistance in the host and aggressiveness in the pathogen are a significant driver of evolution in pathogen populations. We show here that increases in aggressiveness were associated with genotype replacement in two major *P. triticina* pathotypes, consistent with all the examples of selection based on quantitative plant-pathogen interactions cited above.

### **Putative origin of the more aggressive genotypes**

All surveys in wheat-growing areas to date have provided evidence for continual evolution of *P. triticina* populations, with rapid changes in pathotype frequencies (Goyeau *et al.*, 2012; Kosman *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Fontyn *et al.*, 2022; Kolmer & Fajolu, 2022). These changes can be explained intrinsically by the acquisition of new virulence genes, by mutations, somatic exchanges or, more rarely, genetic recombination. A study on the Australian *P. striiformis* f. sp. *tritici* population showed that it had evolved due to mutation events (Steele *et al.*, 2001). Whole-genome sequencing has detected similar recurrent mutations in *P. triticina*, suggesting that such events play a major role in genetic variability within clonal lineages (Fellers *et al.*, 2021). Somatic exchange may also have played a role, as in the emergence of the Ug99 lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, which had one identical haploid nucleus in common with an old African lineage, with no sign of recombination (Li *et al.*, 2019). A similar situation has been described in *P. triticina*, with the Australian isolate Pt64 resulting from somatic exchange between two parental isolates (Wu *et al.*, 2019). More rarely, genetic recombination may also underlie the emergence of new genotypes with

new virulence genes. Indeed, *P. triticina* is a heteroecious fungus that requires an alternative host, *Thalictrum speciosissimum* (not naturally present in most places worldwide, including France), for sexual reproduction. The high proportion of repeated genotypes and the heterozygosity rates of European and French leaf rust populations confirmed the very dominant role of clonal reproduction (Goyeau *et al.*, 2007; Kolmer *et al.*, 2013). Genetic changes do not necessarily result in different virulence profiles, so isolates with identical or very similar pathotypes may have different origins. In a previous study on *P. triticina* nine microsatellite markers were used to analyze the genotypes of 33 pathotypes (Goyeau *et al.*, 2007). This analysis highlighted the presence of different genotypes, differing by only one of the nine SSRs tested, in five of the pathotypes. Another study on 121 European *P. triticina* isolates with 21 SSR markers revealed a significant correlation between phenotype and genotype, but the same phenotype could, nevertheless, be associated with several genotypes (Kolmer *et al.*, 2013). The results of our study raise questions as to the genetic relationship between the most recent genotypes, 166 317 0-G2 and 106 314 0-G2, and the oldest genotypes, 166 317 0-G1 and 106 314 0-G1, respectively. Can the most recent and the oldest genotypes be considered to belong to the same 'lineage', as previously defined? A mutation event during asexual reproduction probably led to the emergence of the most recent genotype (G2) of pathotype 166 317 0, which differs from the older genotype (G1) by only one SSR allele (Table 3). By contrast, genotypes G1 and G2 of pathotype 106 314 0 displayed a higher degree of genetic diversity, differing by five SSR alleles (Table 3). Genotype 106 314 0-G2 may, therefore, be the result of several mutation events occurring in the same lineage and conferring greater aggressiveness than for 106 314 0-G1. Alternatively, the presence of 106 314 0-G2 in France may reflect the introduction from an exotic source of a different (more aggressive) lineage that had acquired the same virulence genes and, therefore, belonged to the same pathotype, 106 314 0. Migration events are frequent in cereal rust populations, as already shown for yellow rust (Ali *et al.*, 2014; Bueno-Sancho *et al.*, 2017), for which there is a famous example of migration in the form of an introduction into Australia from northwest Europe in 1979 (Wellings & McIntosh, 1990). Studies on *P. triticina* in wheat-growing areas worldwide have revealed a broad geographic distribution of identical and highly related multilocus genotypes, highlighting the potential of leaf rust for long-distance migration (Kolmer *et al.*, 2019) and the possibility of new genotypes resulting from exotic introduction.

### ***Additional approaches for detecting genetic variation related to aggressiveness***

Pathotypes of *P. triticina*, defined on the basis of their virulence profiles, appear to be represented by several genotypes, the distribution of which changes over time. An analysis of genotypes within the two major pathotypes collected in France in 2006-2020, 166 317 0 and 106 314 0, revealed the presence in each pathotype of two main genotypes, one of which replaced the other over time.

This study was not designed to characterize overall pathotypic or genotypic

changes in the *P. triticina* population, so our data should be extrapolated with caution, as any attempt to use them for such purposes would be subject to multiple sampling biases. In addition to the four genotypes on which we focused here, several other genotypes (with cumulative frequencies of 31% to 61%, depending on the year) were identified. This is due to the initial pathotyping performed annually for the national survey and the genotyping for this study being performed on different isolates, purified from a bulk of urediniospores collected from a single leaf, which may well have been infected with several pathotypes and/or genotypes. This highlights the imperfections of the protocol linked to the constraints of working on datasets and biological material acquired over several decades with ever-changing techniques. It would have been better to pathotype and phenotype the 401 isolates from the same purified batch of urediniospores, as we did later on for the 44 isolates for which aggressiveness was characterized (Figure 1). However, given the size of the sample, this limitation did not prevent us from obtaining a correct overview of changes for the most common genotypes.

Our results revealed rapid genotype evolution within the pathotypes that was not detectable if only virulence phenotypes were considered. These findings demonstrate the value of analyzing population dynamics not only from the pathotype standpoint, but also with genotype data, to obtain a more informative picture of pathogen diversity. For leaf rust, as for many fungal pathogens that are commonly described by their virulence profile, there is no univocal link between the pathotypic and the genotypic characterization. In practice, pathotypic characterization and naming has been favoured because of the importance of virulence in the structure of populations. Our results show that different genotypes (defined here by differences in the combination of SSR markers, that have the same virulence profile can nevertheless express differences in the quantitative component of pathogenicity (aggressiveness). Such differences are potentially related to interactions with sources of quantitative resistance, not characterized. Conversely, identical genotypes may differ in one or several virulences. There is currently no nomenclature for the designation of a unique association between one genotype and one pathotype and we propose to define a unique association with the term 'pathogenotype', exemplified here with 106 314 0-G1 and 106 314 0-G2, this term has rarely been used in the scientific literature (Macoris et al., 2006). The use of a small number of SSR markers is not sufficient for the detection of genetic variations in *P. triticina* populations. Genome-wide genotyping approaches are required to characterize the genetic diversity of leaf rust populations more precisely and to explain the emergence of new genotypes. As an illustration of this approach, a combined genome and transcriptome analysis has been performed on 133 *P. striiformis* f. sp. *tritici* isolates collected in 16 European countries. This analysis provided more precise information about the origin of the new emerging races, and showed that SNP analysis was an effective approach for the detection of pathogen diversity and for pathogen surveillance (Bueno-Sancho et al., 2017). Similarly, Fellers et al. (2021) genotyped 121 *P. triticina* isolates with 121 907 SNP markers, and showed that recurrent mutation and selection had played a major role in differentiation within



clonal lineages. The results of our study highlight the importance of combining genome-wide genotyping tools with precise pathotyping and aggressiveness phenotyping to detect the emergence of new variants and to improve our understanding of population dynamics.

## Acknowledgments

We thank Nathalie Retout for technical assistance in the preparation of aggressiveness experiments. We thank the French Wheat Breeders groups 'Recherches Génétiques Céréales' and 'CETAC', and 'ARVALIS-Institut du Végétal' for their help collecting strains of *P. triticina* from their nurseries and field trials. We thank Dr. Julie Sappa for editing the manuscript.

## Funding

This research was supported by a PhD fellowship from the INRAE department 'Santé des Plantes et Environnement' (SPE) and from the French Ministry of Education and Research (MESRI) awarded to Cécilia Fontyn for the 2018-2022 period. It was also supported by several French FSOV ('Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale') grants (FSOV 2004 K, 2008 G, 2012 Q) and by the European Commission, Research and Innovation under the Horizon 2020 program (RUSTWATCH 2018-2022, Grant Agreement no. 773311-2).

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are openly available in the INRAE Dataverse online data repository (<https://data.inrae.fr/>) at <https://doi.org/10.57745/MZ8TDK>

## Conflicts of Interest

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

Ali S, Gladieux P, Leconte M, Gautier A, Justesen AF, Hovmøller MS, Enjalbert J, Vallavieille-Pope C de (2014) Origin, migration routes and worldwide population genetic structure of the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. *PLoS Pathogens*, **10**, e1003903. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003903>

- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-3-0338>
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12029>
- Azzimonti G, Papaix J, Lannou C, Goyeau H (2022) Contribution of the life-history traits of a plant pathogen to the development of field epidemics. *Plant Pathology*, **71**, 1344–1354 <https://doi.org/10.1111/ppa.13567>
- Bariana HS, Babu P, Forrest KL, Park RF, Bansal UK (2022) Discovery of the new leaf rust resistance gene *Lr82* in wheat: molecular mapping and marker development. *Genes*, **13**, 964. <https://doi.org/10.3390/genes13060964>
- Bock CH, Barbedo JGA, Mahlein A-K, Del Ponte EM (2022) A special issue on phytopathometry — visual assessment, remote sensing, and artificial intelligence in the twenty-first century. *Tropical Plant Pathology*, **47**, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00498-w>
- Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF (2008) Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>
- Boonekamp PM (2012) Are plant diseases too much ignored in the climate change debate? *European Journal of Plant Pathology*, **133**, 291–294. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9934-8>
- Bueno-Sancho V, Persoons A, Hubbard A, Cabrera-Quio LE, Lewis CM, Corredor-Moreno P, Bunting DCE, Ali S, Chng S, Hodson DP, Madariaga Burrows R, Bryson R, Thomas J, Holdgate S, Saunders DGO (2017) Pathogenomic analysis of wheat yellow rust lineages detects seasonal variation and host specificity. *Genome Biology and Evolution*, **9**, 3282–3296. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx241>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.016>
- Cowger C, Mundt CC (2002) Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* Isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology*, **92**, 624–630. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.6.624>
- 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. <https://doi.org/10.1111/eva.12368>
- Delmotte F, Mestre P, Schneider C, Kassemeyer H-H, Kozma P, Richart-Cervera S,

Rouxel M, Delière L (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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.017>

Duan X, Enjalbert J, Vautrin D, Solignac M, Giraud T (2003) Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 65–67. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00350.x>

Duan H, Jones AW, Hewitt T, Mackenzie A, Hu Y, Sharp A, Lewis D, Mago R, Upadhyaya NM, Rathjen JP, Stone EA, Schwessinger B, Figueroa M, Dodds PN, Periyannan S, Sperschneider J (2022) Physical separation of haplotypes in dikaryon allows benchmarking of phasing accuracy in Nanopore and HiFi assemblies with Hi-C data. *Genome biology*, **23**, 84. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02658-2>

Fellers JP, Sakthikumar S, He F, McRell K, Bakkeren G, Cuomo CA, Kolmer JA (2021) Whole-genome sequencing of multiple isolates of *Puccinia triticina* reveals asexual lineages evolving by recurrent mutations. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, **11**, jkab219. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab219>

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

Fontyn C, Zippert A-C, Delestre G, Marcel TC, Suffert F, Goyeau H (2022) Is virulence phenotype evolution driven exclusively by Lr gene deployment in French *Puccinia triticina* populations? *Plant Pathology*, **71**, 1511-1524. <https://doi.org/10.1111/ppa.13599>

Frézal L, Desquilbet L, Jacqua G, Neema C (2012) Quantification of the aggressiveness of a foliar pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, responsible for water yam (*Dioscorea alata*) anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, **134**, 267–279. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9986-4>

Frézal L, Jacqua G, Neema C (2018) Adaptation of a fungal pathogen to host quantitative resistance. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01554>

Goyeau H, Berder J, Czerepak C, Gautier A, Lanen C, Lannou C (2012) Low diversity and fast evolution in the population of *Puccinia triticina* causing durum wheat leaf rust in France from 1999 to 2009, as revealed by an adapted differential set. *Plant Pathology*, **61**, 761–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02554.x>

Goyeau H, Halkett F, Zapater M-F, Carlier J, Lannou C (2007) Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Fungal Genetics and Biology*, **44**, 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.02.006>

Goyeau H, Park R, Schaeffer B, Lannou C (2006) Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology*, **96**, 264–273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0264>

Huerta-Espino J, Singh RP, Germain S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, Bhardwaj

- SC, Goyeau H (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, **179**, 143–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>
- Imhoff MW (1982) Patterns of bean rust lesion size increase and spore production. *Phytopathology*, **72**, 441. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-441>
- Johnson DA (1980) Effect of low temperature on the latent period of slow and fast rusting winter wheat genotypes. *Plant Disease*, **64**, 1006. <https://doi.org/10.1094/PD-64-1006>
- Kolmer JA, Fajolu O (2022) Virulence phenotypes of the wheat leaf rust pathogen, *Puccinia triticina*, in the United States from 2018 to 2020. *Plant Disease*, **106**, 1723–1729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2321-RE>
- Kolmer JA, Hanzalova A, Goyeau H, Bayles R, Morgounov A (2013) Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. *Plant Pathology*, **62**, 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02626.x>
- Kolmer JA, Ordoñez ME, German S, Morgounov A, Pretorius Z, Visser B, Goyeau H, Anikster Y, Acevedo M (2019) Multilocus genotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Worldwide regions indicate past and current long-distance migration. *Phytopathology*, **109**, 1453–1463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-18-0411-R>
- Kosman E, Ben-Yehuda P, Manisterski J, Sela H (2019) Diversity of virulence phenotypes among annual populations of *Puccinia triticina* originating from common wheat in Israel during the period 2000–15. *Plant Pathology*, **68**, 1741–1748. <https://doi.org/10.1111/ppa.13078>
- Lannou C (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **50**, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173031>
- Lannou C, Soubeyrand S (2017) CHAPTER 19: Measure of life-cycle traits of a biotrophic pathogen. *Exercises in Plant Disease Epidemiology, Second Edition*, pp. 149–152. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544426.019>
- Lehman JS, Shaner G (1997) Selection of populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology*, **87**, 170–176. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.2.170>
- Li F, Upadhyaya NM, Sperschneider J, Matny O, Nguyen-Phuc H, Mago R, Raley C, Miller ME, Silverstein KAT, Henningsen E, Hirsch CD, Visser B, Pretorius ZA, Steffenson BJ, Schwessinger B, Dodds PN, Figueroa M (2019) Emergence of the Ug99 lineage of the wheat stem rust pathogen through somatic hybridisation. *Nature Communications*, **10**, 5068. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12927-7>
- Lovell DJ, Powers SJ, Welham SJ, Parker SR (2004) A perspective on the measurement of time in plant disease epidemiology. *Plant Pathology*, **53**, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01097.x>

Macoris S a. G, Sugizaki MF, Peraçoli MTS, Bosco SMG, Hebeler-Barbosa F, Simões LB, Theodoro RC, Trinca LA, Bagagli E (2006) Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 331–334. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000300019>

Madden LV, Hughes G, van den Bosch F (2007) CHAPTER 2: Measuring plant diseases. *The study of plant disease epidemics*. pp. 11-31. St Paul, MN, USA.

Milus EA, Kristensen K, Hovmøller MS (2009) Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology*, **99**, 89–94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0089>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-7-0869>

Parlevliet JE (1975) Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. *Euphytica*, **24**, 21–27. <https://doi.org/10.1007/BF00147164>

Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, **17**, 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.17.090179.001223>

Pfender WF (2001) A temperature-based model for latent-period duration in stem rust of perennial ryegrass and tall fescue. *Phytopathology*, **91**, 111–116. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.111>

Rimbaud L, Papaix J, Rey J-F, Barrett LG, Thrall PH (2018) Assessing the durability and efficiency of landscape-based strategies to deploy plant resistance to pathogens. *PLOS Computational Biology*, **14**, e1006067. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006067>

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.712>

Sache I (1997) Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). *Plant Pathology*, **46**, 581–589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-33.x>

Savary S, Willcoquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, **3**, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Shaner G, Stromberg EL, Lacy GH, Barker KR, Pirone TP (1992) Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, **30**, 47–

66. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.000403>

Sørensen CK, Thach T, Hovmøller MS (2016) Evaluation of spray and point inoculation methods for the phenotyping of *Puccinia striiformis* on wheat. *Plant Disease*, **100**, 1064–1070. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1477-RE>

Steele KA, Humphreys E, Wellings CR, Dickinson MJ (2001) Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* by use of molecular markers. *Plant Pathology*, **50**, 174–180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00558.x>

Suffert F, Thompson RN (2018) Some reasons why the latent period should not always be considered constant over the course of a plant disease epidemic. *Plant Pathology*, **67**, 1831–1840. <https://doi.org/10.1111/ppa.12894>

Szabo LJ, Kolmer JA (2007) Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina*: PRIMER NOTE. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 708–710. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01686.x>

Van Der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 454–456. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01311-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01311-5)

Wellings CR, McIntosh RA (1990) *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first 10 years. *Plant Pathology*, **39**, 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02509.x>

Wu JQ, Dong C, Song L, Cuomo CA, Park RF (2019) Dissecting the first phased dikaryotic genomes of the wheat rust pathogen *Puccinia triticina* reveals the mechanisms of somatic exchange in nature. *bioRxiv*, 705475. <https://doi.org/10.1101/705475>

Zhang L, Shi C, Li L, Li M, Meng Q, Yan H, Liu D (2020) Race and virulence analysis of *Puccinia triticina* in China in 2014 and 2015. *Plant Disease*, **104**, 455–464. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1051-RE>

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1.** Number of isolates identified as pathotype 106 314 0 collected on 14 of the most frequently grown bread wheat cultivars during the 2006-2016 period and genotyped with 19 SSRs (see Table 3).

Cultivar	Registration year	Postulated resistance genes <sup>a</sup>	Year of sampling											Total	
			2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016		
Charger	1997	<i>Lr10, Lr13</i>	4												4
Tremie	1992	<i>Lr10, Lr13</i>	5												5
Sankara	2004	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	4	5	3	5									17
Aubusson	2002	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>	5	5	3	5	3	5	5						31
Apache	1998	<i>Lr13, Lr37</i>	9	10	9	10	8	10	10	9	10				85
Orvantis	2000	<i>Lr10, Lr13, Lr37</i>		5											5
Soissons	1988	<i>Lr14a</i>		5	4	5									14
Mendel	2004	<i>Lr13</i>			3										3
Premio	2007	<i>Lr14a, Lr37</i>				5	4	5							14
Bermude	2007	<i>Lr10, Lr13, Lr14a, Lr37</i>					4	5	5	5			7		26
Arezzo	2008	<i>Lr10, Lr14a, Lr37</i>					4	5	5	5	5	8	1		33
Expert	2008	<i>Lr1, Lr13</i>							5	4	5			3	17
Pakito	2011	<i>Lr13, Lr37</i>									5	5	7		17
Solehio	2009	<i>Lr14a, Lr37</i>										5	7	3	15
Number of isolates			27	30	22	30	23	30	30	28	30	29	7		286

<sup>a</sup> *Lr* genes were postulated by performing multipathotype tests with standard isolates with known virulence genes (Fontyn *et al.*, 2022)

**Table S2.** Number of isolates identified as pathotype 166 317 0 collected on eight of the most frequently grown bread wheat cultivars during the 2013-2016 period and genotyped with 19 SSRs (see Table 3).

Cultivar	Registration year	Postulated resistance genes <sup>a</sup>	Year of Sampling				Total
			2013	2014	2015	2016	
Altigo	2007	<i>Lr3, Lr13, Lr37</i>	8				8
Bermude	2007	<i>Lr10, Lr13, Lr14a, Lr37</i>	5		5		10
Arezzo	2008	<i>Lr10, Lr14a, Lr37</i>	7	9	5	10	31
Pakito	2011	<i>Lr13, Lr37</i>	5	4	5		14
Solehio	2009	<i>Lr14a, Lr37</i>	5	5		5	15
Cellule	2011	<i>Lr3</i>		8	10	9	27
Apache	1998	<i>Lr13, Lr37</i>			5		5
Fructidor	2014	<i>Lr13, Lr14a</i>				5	5
Number of isolates			30	26	30	29	115

<sup>a</sup> *Lr* genes were postulated by performing multipathotype tests with standard isolates (Fontyn *et al.*, 2022)



**Table S3.** Experimental design for assessments of the aggressiveness of the two main genotypes (G1 and G2) of each of the two major pathotypes (106 314 0 and 166 317 0) of *Puccinia triticina* collected in France during 2005-2016: distribution of the isolates over five experimental series, cultivar from which the isolate was collected, and cultivars on which the aggressiveness of the isolate was assessed.

Isolate	Pathotype	Genotype	Series	Cultivar sampled	Cultivars tested
BT12M202	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT12M378	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT12M109	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT12M391	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT12M192	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT12M321	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT14M018	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT14M066	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT14M149	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT14M254	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT14M344	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT14M392	166 317 0	166 317 0-G1	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT16M219	166 317 0	166 317 0-G2	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT16M164	166 317 0	166 317 0-G2	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT16M246	166 317 0	166 317 0-G2	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT16M174	166 317 0	166 317 0-G2	2	Apache	Apache, Michigan Amber
BT05M021	106 314 0	106 314 0-G1	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT05M241	106 314 0	106 314 0-G1	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT05M067	106 314 0	106 314 0-G1	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT06M138	106 314 0	106 314 0-G1	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT06M195	106 314 0	106 314 0-G1	1	Apache	Apache, Michigan Amber

BT06M101	106 314 0	106 314 0-G1	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT15M292	106 314 0	106 314 0-G2	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT15M011	106 314 0	106 314 0-G2	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT16V048	106 314 0	106 314 0-G2	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT15M121	106 314 0	106 314 0-G2	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT15M309	106 314 0	106 314 0-G2	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT15M035	106 314 0	106 314 0-G2	1	Apache	Apache, Michigan Amber
BT12M380	106 314 0	106 314 0-G1	3	Aubusson	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M355	106 314 0	106 314 0-G1	3	Premio	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M137	106 314 0	106 314 0-G1	3	Premio	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT13V142	106 314 0	106 314 0-G2	3	Aubusson	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT13M108	106 314 0	106 314 0-G2	3	Aubusson	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT13V026	106 314 0	106 314 0-G2	3	Aubusson	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT13M168	106 314 0	106 314 0-G2	3	Aubusson	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M281	106 314 0	106 314 0-G2	3	Aubusson	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M302	106 314 0	106 314 0-G2	3	Premio	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M379	106 314 0	106 314 0-G2	3	Premio	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M284	106 314 0	106 314 0-G2	3	Premio	Aubusson, Premio, Michigan Amber
BT12M119	106 314 0	106 314 0-G1	1+4	Apache	Aubusson, Premio, Michigan Amber, Apache
BT12M033	106 314 0	106 314 0-G2	1+4	Apache	Aubusson, Premio, Michigan Amber, Apache
BT13V137	106 314 0	106 314 0-G1	1+4+5	Apache	Aubusson, Premio, Michigan Amber, Sankara, Expert, Bermude, Apache
BT13V189	106 314 0	106 314 0-G2	1+4+5	Apache	Aubusson, Premio, Michigan Amber, Sankara, Expert, Bermude, Apache
BT12M326	106 314 0	106 314 0-G2	1+4+5	Apache	Aubusson, Premio, Michigan Amber, Sankara, Expert, Bermude, Apache

**Table S4.** Allocation of 19 SSR markers to two multiplexes, for genotyping *Puccinia triticina* isolates.

	SSR ID	Fluorescence label	Forward primer	Reverse primer	Chromosome position	Allele size range	Repeat size	Reference
Multiplex 1	<b>RB8</b>	Vic	CGCCGTTCCCATCGTTC	TAAAACACTCCACCCACGCC	17A/17B	143-155	3	Duan et al., 2003
	<b>PtSSR173</b>	Vic	CTCAGCGACCTCAAAGAACC	GAGACGACGGATGTCAACAA	2A/2B	213-223	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR186</b>	Vic	GCCACGAGAAATACATAGAAATAAAA	GGTTGTTGATGGGCTTGAGT	10A/10B	338-353	3	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>RB11</b>	Pet	AGCAGTGAGCAGCAGCGTC	ACTACTGTGAGTGTGCGCTTGG	-	175-206	2	Duan et al., 2003
	<b>PtSSR158</b>	6Fam	GACGACTTCGTCACCTGCTGA	GAGGAGAAGCCGTTCTGTTG	3A/3B	226-238	3	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR68</b>	Pet	GACTCAGCCCACTGCTAACC	GATGGCGACGTATTTGGTCT	9A/9B	309-341	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR50</b>	6Fam	CATCGGAATGGTCTGTCTCC	CCAAATGCTATGAGTGGAAAA	12A/12B	365-373	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR164</b>	Ned	GTGGAAGTGAGCGGAAGAAG	GGAGATGGGCAGATGAGGTA	10A/10B	219-233	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR61</b>	Ned	CGAACTGGTACAACGCACTG	CGCAAAAAGGCTGATCTCTG	17A/17B	296-302	2	Szabo & Kolmer, 2007
Multiplex 2	<b>RB17</b>	Vic	CTTCGGTAGGATTTGAGCG	CAGCTCCAAATCCTTTGCC	14A/14B	190-193	3	Duan et al., 2003
	<b>PtSSR92</b>	Pet	CCAAGGAACAGTCCACCAAG	GAGTCGGGTAAGCCATCTGA	1A/1B	246-258	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>RB12</b>	Vic	CCACAAGCAACCACATACCACC	TGGTCCATGAAGAAGTCTCTGAAC	16A/16B	282-290	2	Duan et al., 2003
	<b>RB26</b>	Vic	TCGTCCTGCCTACCTCTGAC	AAAGTGCATGATCTGCATGTG	16A/16B	349-352	3	Duan et al., 2003
	<b>PtSSR91</b>	Ned	ATCTTGCGTCTCAGCCATCT	CGCCGCTCTTCATCTCTTAC	1A/1B	380-384	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR13</b>	6Fam	CGAATTCGCGTTTTATGTCC	TGATCCAATCGAACCTAGCC	2A/2B	129-131	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>RB25</b>	6Fam	ATGTCTGTAGTCGGCAGGGC	GCCTCTGCGGGATCGGT	4A/4B	228-230	2	Duan et al., 2003
	<b>PtSSR55</b>	6Fam	AGCTTACGGTCCTCAATCG	AGTGAAAGGGGCTGGGAGT	18A/18B	308-310	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR152</b>	6Fam	CTCCGTTCTCTTTCTGTGG	CCATCGCAACCAACAAACA	18A/18B	389-393	2	Szabo & Kolmer, 2007
	<b>PtSSR154</b>	Ned	ACGGTCAACAGCCAACACTACC	CCTCGTCATCCTGGTTGAGT	16A/16B	247-276	3	Szabo & Kolmer, 2007

**Table S5.** Anova p-values for series 1 and 2

Series	Pathotype	Components	Repetition	Source of variation							
				df	Genotype	df	Cultivar	df	Isolat/Genotype	df	
1	106 314 0	IE	<0.0001	2	0.9	1	0.1	1	<0.0001	15	
		<u>LP</u>	<0.0001	2	0.7	1	<0.0001	1	0.2	15	
		<u>SP</u>	<0.0001	2	0.05	1	0.03	1	<0.0001	15	
2	166 317 0	<u>IE</u>	<0.0001	2	0.0001	1	0.0002	1	<0.0001	14	
		<u>LP</u>	<0.0001	2	0.0003	1	<0.0001	1	0.01	14	
		SP	0.003	2	0.01	1	0.004	1	0.0002	14	

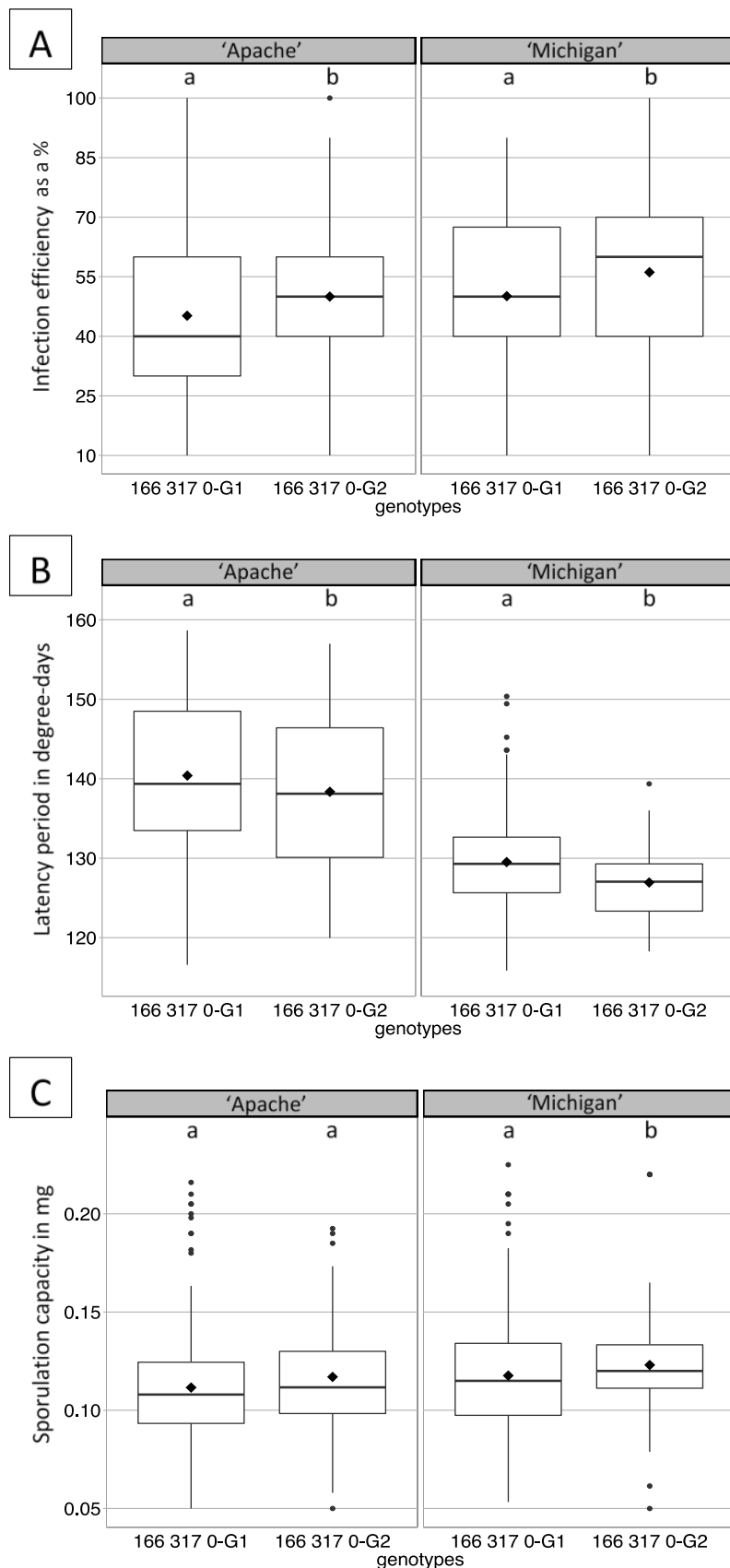
Underlined components means that the data did not follow a normal distribution required for the Anova. For these components a non-parametric test (Kruskal-Wallis) was performed and gave the same results.

**Table S6.** Anova p-values for series 3,4 and 5

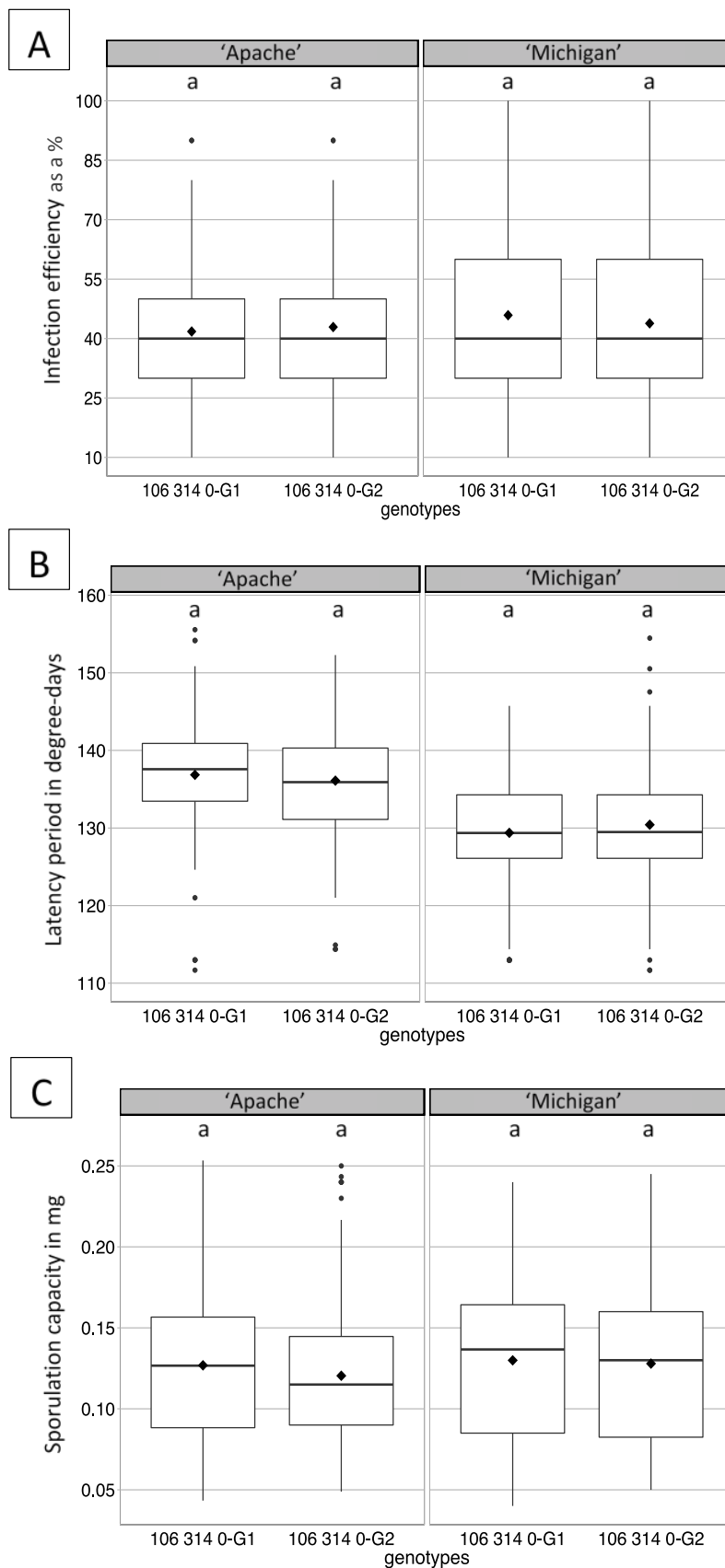
Series	Tested cultivar	Components	Repetition	Source of variation							
				df	Genotype	df	Isolat/Genotype	df			
3+4	Aubusson	IE	<0.0001	2	<b>0.8</b>	1	0.1	14			
		LP	0.001	2	<0.0001	1	<0.0001	14			
		SP	0.03	2	<b>0.9</b>	1	<0.0001	14			
3+4	Premio	IE	<0.0001	2	<b>0.2</b>	1	0.09	14			
		LP	<0.0001	2	0.0006	1	0.001	14			
		<u>SP</u>	0.002	2	<b>0.8</b>	1	<0.0001	14			
3+4	Michigan	IE	<0.0001	2	<b>1</b>	1	0.6	14			
		<u>LP</u>	0.008	2	<0.0001	1	0.2	14			
		SP	<0.0001	2	0.1	1	<0.0001	14			
5	Bermude	IE	0.0005	2	<b>0.5</b>	1	0.2	1			
		LP	0.1	2	0.4	1	1	1			
		SP	<0.0001	2	<b>0.4</b>	1	0.1	1			
5	Expert	IE	0.0001	2	0.02	1	0.6	1			
		LP	0.12	2	0.003	1	0.03	1			
		SP	0.01	2	<b>0.1</b>	1	0.7	1			
5	Sankara	IE	<0.0001	2	<b>0.7</b>	1	0.1	1			
		LP	<0.0001	2	<b>0.002</b>	1	0.2	1			
		SP	<0.0001	2	<b>0.9</b>	1	0.3	1			

Underlined components means that the data did not follow a normal distribution required for the Anova. For these components a non-parametric test (Kruskal-Wallis) was performed and gave the same results.

Genotype p-values with a repetition interaction are reprinted in bold.



**Figure S1.** (A) Infection efficiency (IE) as a %, (B) latency period (LP) in degree-days and (C) sporulation capacity (SP) in mg of spores/uredinia for the two *Puccinia triticina* genotypes 166 317 0-G1 and 166 317 0-G2 assessed on cultivars Apache and Michigan. Isolates were sampled from cv. Apache in 2012, 2014 and 2016. Within a box plot, the black diamond represents the mean value and the bar indicates the median. Letters indicate significant difference between genotypes, in Kruskal-Wallis tests (C) or ANOVA (A and B)



**Figure S2.** Infection efficiency as a %, latency period in degree-days and sporulation capacity in mg of spores/uredinia for *Puccinia triticina* genotypes of pathotype 106 314 0 measured on cultivars Apache and Michigan. Isolates were sampled from cv Apache, in 2005-2006, 2012-2013 and 2015-2016. Within a box plot, the black diamond represents the mean value and the bar represents the median value. Letters indicate significant differences between genotypes in Kruskal-Wallis tests (B and C) or ANOVA (A).

## CHAPITRE 4: HIGHER AGGRESSIVENESS EXPLAINS THE DOMINATION OF CERTAIN *Puccinia triticina* PATHOGENOTYPES IN THE CULTIVATED LANDSCAPE, DESPITE ADVANTAGES CONFERRED TO OTHERS BY THEIR VIRULENCES

---

Ce chapitre est présenté au format d'un article ayant vocation à être soumis à une revue après améliorations de fond et de forme.

Le chapitre 3 a montré que les changements de fréquence d'un pathotype pouvaient être influencés par l'évolution de l'agressivité des isolats appartenant à ce même pathotype. Le genotypage des deux pathotypes dominants - 106 314 0 et 166 317 0 - a par ailleurs montré que de « nouveaux » génotypes pouvait apparaître au cours du temps et devenir dominants, et ce pour chacun des deux pathotypes. La comparaison des traits d'agressivité entre isolats représentatifs de ces nouveaux génotypes et les génotypes antérieurs a montré que les nouveaux étaient plus agressifs, en cohérence avec le fait que leur apparition dans le paysage a coïncidé avec une augmentation (tout au moins une interruption de la diminution) de la fréquence globale du pathotype auquel ils appartiennent. Ce chapitre 4 propose une comparaison d'agressivité non plus « intra-pathotype » (entre isolats d'un même pathotype), comme réalisée dans le chapitre 3, mais une comparaison « inter-pathotypes » (entre isolats représentatifs des deux pathotypes dominants). Concrètement, les traits d'agressivité de « pathotygénotypes » majeurs (terme proposé au chapitre 3 pour désigner la combinaison unique entre un pathotype et un génotype) ont été comparés entre 166 317 0, qui possède la virulence 3, et 106 314 0, qui ne la possède pas. Cette comparaison, réalisée sur les variétés parmi les plus cultivées, visait à tester l'hypothèse selon laquelle l'agressivité peut expliquer le maintien à une fréquence élevée du pathotype 106 314 0, en théorie désavantagé étant donné la présence du gène *Lr3* dans le paysage variétal cultivé.

## **Higher aggressiveness explains the domination of certain *Puccinia triticina* pathogenotypes in the cultivated landscape, despite advantages conferred to others by their virulences**

### **Authors:**

Cécilia Fontyn, Kevin JG Meyer, Anne-Lise Boixel, Corentin Picard, Adrien Destanque, Frédéric Suffert, Thierry C Marcel, Henriette Goyeau

Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France

### **Abstract**

Qualitative resistances are the main selection forces in plant pathogen populations. Thus, plant pathogen populations are constantly evolving and adapting to their host. This evolution results in the emergence of new virulences in response to the pressure imposed by the deployment of major resistance genes. Some plant pathogens might be more qualitatively adapted by having the virulences corresponding to the existing major resistance genes in the global landscape. However, the advantage conferred by the virulences in regards with the strong selection pressure imposed by the major resistance genes cannot fully explain the distribution frequency observed in pathogen populations. Aggressiveness might as well be a driver of the evolution of pathogen populations. A previous study on the French population of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust, showed that two major pathotypes — groups of isolates with the same combinations of virulences — dominated the landscape between the 2006-2016 period. The relative change in the dynamics within this two pathotypes — 166 317 0 and 106 314 0 — was linked to the emergence of new more aggressive genotypes within each of the pathotypes (pathogenotype). However, in the 2013-2014 period, these two pathotypes were represented in the landscape at an equivalent frequency despite the advantage of one pathotype conferred by its virulence combination. We assessed three components of aggressiveness of the two most frequent pathogenotypes within each pathotype — infection efficiency, latency period and sporulation capacity — for 23 isolates representative of the two major *P. triticina* pathotypes. We showed that pathogenotype 106 314 0-G2 was more aggressive than pathogenotype 166 317 0-G1, which carries the advantageous virulence 3. Our findings were highly consistent for the various components of aggressiveness assessed on Michigan Amber — a ‘naive’ cultivar never grown in the landscape — or on Apache — a ‘neutral’ cultivar, with no selection effect on the landscape-pathotype pattern, but also on several cultivars most frequently grown in the landscape. We concluded that the quantitative components of aggressiveness can be significant drivers of evolution in pathogen populations, as the most aggressive pathogenotype was the most frequent, despite the presence of others pathogenotypes advantaged by



their virulence combinations. Here, aggressiveness acted as a selective advantage which even compensated for the disadvantage due to the lack of virulence to a major *Lr* gene combination in the host landscape.

## **Keywords**

Aggressiveness, quantitative phenotyping, pathogenotype, host adaptation, brown rust

## Introduction

Pests, including plant diseases, are a major biotic constraint that causes high crop damage, the average of which in the world has been estimated at 17.2% for potato, 21.4% for soybean, 21.5% for wheat and 30.3% for rice (Savary et al., 2019). Whatever the crop, the use of varietal resistances is an environmentally friendly way to face these threats, allowing to reduce the use of phytosanitary products (Sharma & Ortiz, 2002). Varietal resistances are commonly classified as qualitative or quantitative (Kushalappa et al., 2016). Qualitative resistance has been extensively used in breeding to improve the immunity of most of the cultivated plants varieties. This type of resistance stands on the gene-for-gene model, expressing a specific interaction between an avirulence gene (*Avr*) on the pathogen side and a corresponding resistance gene (*R*) in the plant (Flor, 1971; Dangl & Jones, 2001). The qualitative term for the pathogen, which refers to host resistance, is 'virulence'. The virulence represents the capacity of a pathogen to infect its host in the case of a 'compatible' interaction (Flor, 1971). A pathogen pathotype (or race) is defined by its virulence profile: two pathogenic isolates are considered to belong to the same pathotype if they have the same combination of virulences. Qualitative resistance genes exert a high selection pressure, which contributes to shape pathogen populations. This pressure is all the higher, and results in rapid declines in immunity of the cultivated varieties, as qualitative resistance genes are deployed at high frequency in the landscape, by selecting pathotypes carrying the corresponding virulences (Rouxel et al., 2003). On the other hand, quantitative resistance is based in most cases on several Quantitative Trait Loci, also called QTL (Niks et al., 2015), characterizing an incomplete type of resistance expressed by a reduction in symptoms intensity. This type of resistance has gained a great interest because of the lower selection pressure it exerts on pathogen populations and, consequently, its supposedly higher durability as compared to quantitative resistances (Cowger & Brown, 2019). Nevertheless, maintaining the effectiveness of this type of resistance over time can be compromised by the possible increase of the damage caused by the pathogen to the crop, i.e. the pathogen 'aggressiveness'. This hypothesis is based on observations made in the field, but has not been formally demonstrated.

Aggressiveness is defined from an epidemiological standpoint as the quantitative variation of pathogenicity on a susceptible host, including the detrimental impact of a pathogen on its host plant (Pariaud et al., 2009a; Lannou, 2012). Aggressiveness is related to several life-history traits of the pathogen, specific to its biology and the nature of symptoms. Among these life-history traits, the most widely assessed aggressiveness components for rust pathogens are infection efficiency, latency period and sporulation capacity (Pariaud *et al.*, 2009a; Lannou, 2012; Azzimonti *et al.*, 2013). Infection efficiency is the proportion of spores able to cause a new infection when deposited on compatible host plant tissues (Sache, 1997). Latency period can be defined for rust pathogens as the length of time between inoculation and the appearance of 50% of the sporulating structures (*e.g.* uredinia) (Parlevliet, 1975;

Johnson, 1980; Pfender, 2001). Latency period is highly temperature-dependent, therefore its expression in thermal time is recommended (Lovell et al., 2004). Sporulation capacity can be defined as the number of spores produced per individual sporulation structure and per unit of time (Sache, 1997; Pariaud et al., 2009a). For rust pathogens, the density of lesions affects the spore production and must be taken into account in the experimental design (e.g. reduction of the attack level in order to have a low lesion density) or by taking it into account *a posteriori* in the data analysis when estimating the sporulation capacity (Robert et al., 2004; Lannou & Soubeyrand, 2017).

The pathogen aggressiveness acts on pathogen population dynamics, as it determines the rate at which a given disease intensity is reached, especially if it generates highly polycyclic epidemics (Azzimonti et al., 2022). A more aggressive pathogen will therefore tend to spread more widely in the landscape. Another illustration of this is contained in field studies on *Didymella pinodes*, causing the ascochyta blight on pea, and on *Zymoseptoria tritici*, causing Septoria tritici blotch on wheat: it has been shown that strains collected at the end of epidemics, in spring plots, were more aggressive than strains collected at the beginning of the same epidemics, in winter plots (Laloi et al., 2016; Suffert et al., 2018). The experimentally demonstrated hypothesis that the most aggressive strains tend to be selected as the epidemic progresses highlights that differences in aggressiveness do exist at a local scale and can be a driving force in the evolution of pathogen populations. Several studies performed in controlled conditions have shown that a similar adaptation of plant pathogens, in terms of aggressiveness traits, can occur after repeated cycling on the same host. A heterogeneous population of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* was inoculated on two different oat genotypes for seven asexual generations, and the infection efficiency of each population was assessed on the host on which it had been maintained and on another host genotype. The results showed that the infection efficiency (aggressiveness) of the population increased by the end of the experiment on the host on which it had been maintained (Leonard, 1969). Another evolution experiment on Fusarium head blight has compared the evolution of the aggressiveness of *Fusarium graminearum* after serial infections on susceptible and partially resistant wheat cultivars, and after their growth *in vitro* (on potato dextrose agar) (Sakr, 2022). Increase of aggressiveness was detected after serial infections of the plant but not *in vitro*, highlighting that the change in aggressiveness of the *F. graminearum* isolates (in this case, increase of latency period and AUDPC) was the result of an interaction with the host plant (in this case, wheat).

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* is one of the most damaging wheat diseases, causing high yield losses worldwide (Huerta-Espino et al., 2011; Savary et al., 2019). Eighty-two qualitative resistance genes *Lr* have been identified (Bariana et al., 2022). Both qualitative and quantitative host resistances play a role in the evolution in *P. triticina* populations (Goyeau et al., 2006; Pariaud et al., 2009a). Deployment of a new *Lr* gene in the cultivar landscape is most of the time followed by the rapid

emergence of a pathotype carrying the corresponding virulence, such as *Lr28* in France, which has been overcome within two years (Fontyn et al., 2022a). This rapid adaptation of a population known to be mainly clonal expressed in ‘boom-and-bust’ cycles of resistance (McDonald & Linde, 2002). Moreover, Lehman and Shaner (1997) have suggested that *P. triticina* could adapt to quantitative resistances through an increase of aggressiveness in natural conditions, based on experimental results obtained in controlled conditions: the composition of a *P. triticina* population was modified with the selection of isolates having the shorter latent period after five asexual reproduction cycles on a partially resistant cultivar (Lehman & Shaner, 1997). Also, the evidence of isolate specificity toward quantitative resistance QTLs suggests that adaptation of *P. triticina* isolates to quantitative resistance is possible (Azzimonti et al., 2013). Recently, Fontyn et al. (2022a) showed that the domination in the French landscape of two *P. triticina* pathotypes (106 314 0 and 166 317 0) during a decade (2006-2016) could not be fully explained by the deployment of *Lr* genes. The analysis of epidemiological data collected in field conditions at a large scale showed that several other compatible pathotypes, virulent against the *Lr* genes carried by the most widely grown cultivars, were present in the landscape but never reached substantial frequencies. Moreover, pathotype 166 317 0 has four additional virulences as compared to pathotype 106 314 0, including the advantageous virulence 3, but the frequency of 166 317 0 remained lower than the frequency of 106 314 0 until 2014, while *Lr3* was the fifth most frequent resistance gene in the landscape. The pathogen aggressiveness might be an important driver of the evolution of *P. triticina* populations, modifying pathotype frequencies at large spatiotemporal scales. Indeed, Fontyn et al., 2022 showed that the evolution within a pathotype was driven by changes of aggressiveness, providing evidences that less aggressive ‘old’ genotypes were replaced by more aggressive ‘new’ genotypes within the two major *P. triticina* pathotypes, 106 314 0 and 166 317 0. These results, completed by a genetic characterization of the studied isolates, led them to propose to use the term ‘pathogenotype’, regrouping isolates having the same pathotype x genotype combination, for further analyses.

The objective of this study was to determine the role played by aggressiveness in the maintenance of the *P. triticina* pathotype 106 314 0 at high frequency in the cultivated landscape, during a specific period of the decade previously studied (2013-2014), despite it lacks the virulence on resistance gene *Lr3*, which should be disadvantageous given the frequency of this gene in the varieties grown in France at that time. To this end, we focused on the two major pathogenotypes — 106 314 0-G2 (avirulent on *Lr3*) and 166 317 0-G1 (virulent on *Lr3*) — identified in the annual survey of *P. triticina* population during this period. We compared the aggressiveness components of isolates from these two pathogenotypes on two ‘neutral’ and ‘naïve’ cultivars as defined in Fontyn et al. (2022a), i.e. with no selection effect on the landscape-pathotype pattern, and on five of the mostly grown cultivars during the 2006-2014 period (including cultivars grown before and during the studied period).

## **Material and methods**

### ***Selection and purification of isolates***

Annual surveys of *P. triticina* populations have been carried out at INRAE BIOGER over the last two decades. These surveys involve the collection of leaf samples from field (micro)plots sown with a single variety in a network of assays and nurseries spread throughout the wheat-growing areas in France (Goyeau et al., 2006; Fontyn et al., 2022a). Urediniospores were bulk-harvested from each sampled leaf and pathotypes (i.e. phenotyped on wheat differential lines at the seedling stage) to identify the dominant pathotype, according to the method described in Goyeau et al. (2006). From the bulks of urediniospores sampled in 2012 and 2013, 58 corresponded to the pathotype 106 314 0 and 56 to the pathotype 166 317 0. One isolate from each of these 114 bulks was purified and genotyped with 19 microsatellite markers according to the procedure described by Fontyn et al. (2022b). The microsatellite genotyping of the 114 purified isolates was made in a previous study (Fontyn et al. 2022b). Several genotypes were identified within each pathotype, leading to the distinction of different pathogenotypes (i.e. isolates that have different pathotype x genotype combinations). Eight isolates were selected from pathogenotype 106 314 0-G2 and 15 from pathogenotype 166 317 0-G1, which were identified as the most frequent pathogenotypes within each pathotype during the 2012-2013 period. These isolates were collected on cultivars Apache, Premio, Arezzo and Aubusson. Urediniospores from these 23 purified isolates were stored at -80°C for assessments of aggressiveness components.

### ***Evaluation of aggressiveness components***

#### **Experimental design**

Three aggressiveness components — latency period, infection efficiency and sporulation capacity — were assessed for the 23 selected isolates on wheat seedlings following the method developed by Fontyn et al (2022b). Because of the size of the trial, the aggressiveness components of the isolates were characterized in three successive series, using the same protocol and under the same experimental conditions. In Series 1, we compared the aggressiveness of pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 (collected on cultivars Apache, Arezzo, Premio and Arezzo) on Apache, a 'neutral' cultivar with no selection effect on the landscape-pathotype pattern, and on Michigan Amber, considered as a 'naïve' cultivar as it carries no resistance gene and has never been grown in the landscape (Table 1). In Series 2 and 3, we compared the aggressiveness components of both pathogenotypes on five of the most frequently grown cultivars in the French landscape during the 2006-2014 period (Table 2). The isolates used in Series 2 were collected on cultivars Aubusson and Premio and were tested on these two cultivars. The isolates used in Series 3 were collected on cultivar Apache and were tested on cultivars Sankara, Expert and Bermude. In all three series, each isolate × cultivar interaction was replicated eight

times, on eight wheat seedlings. Three replicates of the experimental design, including the three series, were performed. The experimental data from series 2 and 3 were used in a previous study in which aggressiveness was compared between isolates of the same pathotype. In the current study we reused these data to compare the aggressiveness of isolates representative of different pathotypes to highlight the impact of quantitative traits in the dominance of one of the pathotypes despite the disadvantage conferred by the absence of a virulence.

**Table 1.** Experimental design for comparison of the aggressiveness of pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 in series 1. Isolates were collected from cultivars Apache, Aubusson, Arezzo and Premio during the 2012-2013 period, and were tested on Apache and Michigan Amber.

Pathogenotype	Sampled cultivar	Number of isolates	Series
106 314 0-G2	Apache	1	1
	Aubusson	2	1
	Arezzo	2	1
	Premio	1	1
166 317 0-G1	Apache	3	1
	Aubusson	3	1
	Arezzo	3	1
	Premio	3	1

**Table 2.** Experimental design for comparison of the aggressiveness of pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 in series 2 and 3. Isolates were collected from cultivar Apache during the 2012-2013 period, and were tested in series 2 on Aubusson and Premio and in series 3 on Sankara, Expert and Bermude.

Pathogenotype	Number of isolates	Tested cultivar	Series
106 314 0-G2	3	Aubusson ( <i>Lr10, Lr13, Lr37</i> )	2
		Premio ( <i>Lr14a, Lr37</i> )	2
	2	Sankara ( <i>Lr10, Lr13, Lr37</i> )	3
		Expert ( <i>Lr1, Lr13</i> )	3
		Bermude ( <i>Lr10, Lr13, Lr14a, Lr37</i> )	3
166 317 0-G1	6	Aubusson ( <i>Lr10, Lr13, Lr37</i> )	2
		Premio ( <i>Lr14a, Lr37</i> )	2
	4	Sankara ( <i>Lr10, Lr13, Lr37</i> )	3
		Expert ( <i>Lr1, Lr13</i> )	3
		Bermude ( <i>Lr10, Lr13, Lr14a, Lr37</i> )	3

## Assessment of aggressiveness

Aggressiveness was assessed in a greenhouse on eight-day-old wheat seedlings grown in a plastic box containing potting soil placed under standardized conditions as described in Fontyn *et al.* (2022b). The inoculation was performed with 10 fresh (two-week-old) spores, picked one by one with a human eyelash under binocular magnifier, then deposited on a 3 cm-long segment of the second leaf of each seedling maintained with double-sided tape, on a rigid plate coated. The plants were then placed in a dew chamber. Uredinia were counted twice a day at 10- to 14-hour intervals, after the first uredinia break through the leaf epidermis and until no new uredinia appeared. Once the final number of uredinia had been reached (i.e. 9 days after inoculation) the spores that had already been produced were removed from the leaf with a small brush. Slightly incurved aluminum gutters (2 x 7cm) made from blind slats were positioned under each inoculated leaf and all the newly produced spores after four days were removed by suction with a cyclone collector into a portion of plastic straw. Each portion of straw was weighed before and after spore harvesting.

Infection efficiency (IE) was estimated for each leaf as the ratio between the final number of uredinia and the number of spores deposited (10 spores). Latency period (LP), expressed in degree-days based on the air temperature measured in the greenhouse every ten minutes, was estimated as the time between inoculation and the appearance of 50% of the total number of uredinia. Sporulation Capacity (SP) was calculated by dividing the total weight of the spores collected from a single leaf by the number of uredinia on that leaf.

### **Statistical analyses**

An ANOVA model was used to analyze the three aggressiveness traits (the response variable Y) measured in Series 1, on cultivars Apache and Michigan Amber:

$$Y_{ijklm} = \mu + R_i + G_j + G_j/C_k + G_j/I_l + \varepsilon_{ijklm}$$

where  $Y_{ijklm}$  represents the value of the studied trait in replicate (R)  $i$ , of genotype (G)  $j$ , isolate (I)  $l$ , nested within genotype, and sampled cultivar (C)  $k$  nested within genotype.  $\mu$  is the overall mean value for this trait and  $\varepsilon$  is the residual, representing the measurement error, with  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ .

Data analyses of Series 2 and 3 were performed separately, fitting a linear mixed model using the R package nlme (Pinheiro *et al.*, 2017). The mixed model allows a multiple comparison of two fixed effects simultaneously, and allows to analyze the effect of each cultivar on the two studied *P. triticina* genotypes:

$$Y_{ijklm} = \mu + R_i * G_j * C_k + 1/G_j/I_l + \varepsilon_{ijklm}$$

where  $Y_{ijklm}$  represents the value of the studied trait in replicate (R)  $i$ , of genotype (G)  $j$ , isolate (I)  $l$ , nested within genotype, and tested cultivar (C).  $\mu$  is the overall mean value

for this trait and  $\varepsilon$  is the residual, representing the measurement error, with  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ .

Aggressiveness components were included as the response variable. Repetition (R), genotype (G), cultivar (C) were added as fixed effects, as well as the interaction between each fixed effect. Isolate effect (I) nested in the genotype (G) was included as a random effect. Significance for the fixed effect was calculated using Satterthwaite's method to estimate degrees of freedom and generate  $p$ -values for mixed models. Significance for the random effect was calculated based on the likelihood ratio chi-squared test. *Post hoc* test was performed using the R package emmeans (Lenth *et al.*, 2018) for single effect, and the R package multcomp (Hothorn *et al.*, 2016) for multiple comparisons of two fixed effects.

Logarithmic, square root or reciprocal transformation were applied to IE, LP and SP when necessary, to obtain a normalized distribution of residuals. When the distribution of residuals could not be normalized by any transformation, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed to analyze the effect of genotype on the aggressiveness components. All the analyses were performed with R software version 4.1.0.

## Results

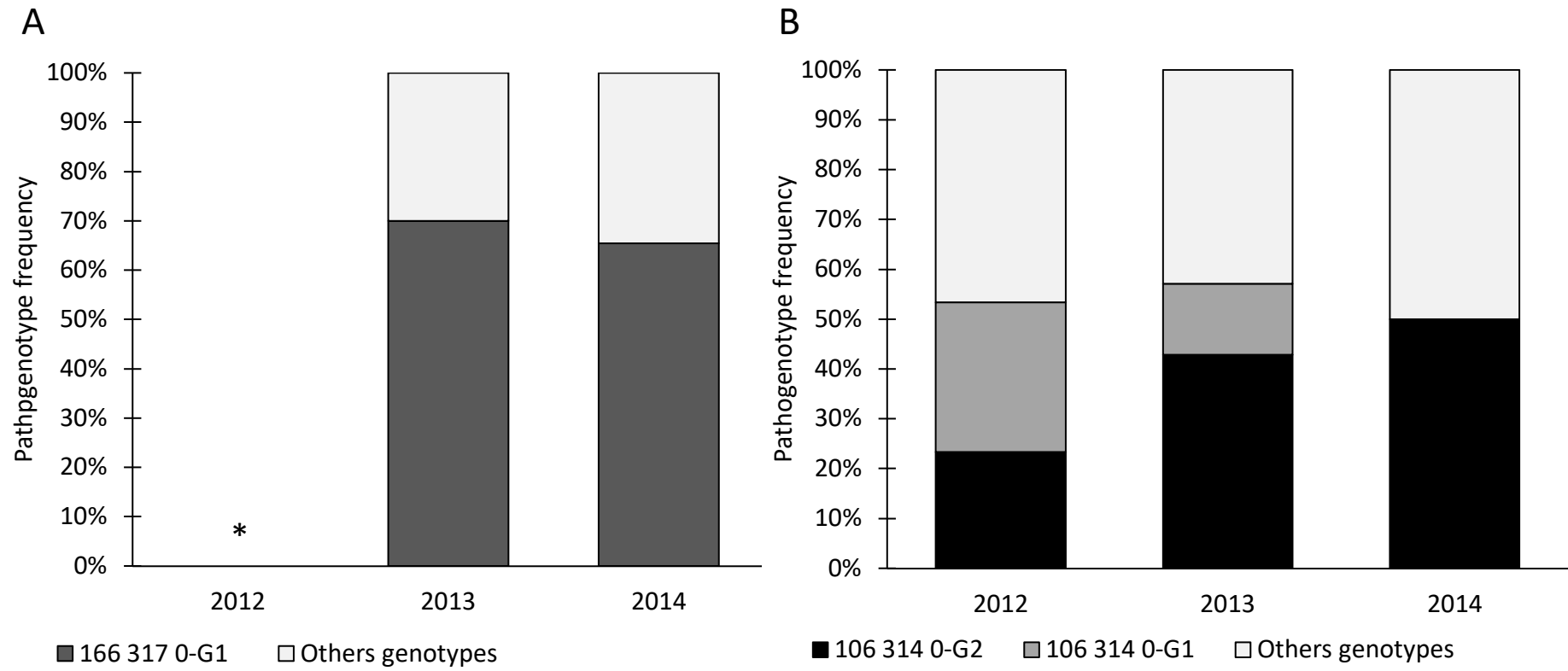
### ***Frequency of genotypes within the two major *P. triticina* pathotypes in 2013-2014***

Within pathotype 106 314 0, 15 genotypes other than 106 314 0-G2 were identified by genotyping with 19 microsatellite markers (Figure 1A). The most frequent pathogenotype was 106 314 0-G2, representing 42% of all isolates from pathotype 106 314 0 in 2013 and 50% in 2014. The pathogenotype 106 314 0-G2 was the most frequent at the landscape scale (all pathotypes and genotypes confounded) representing 14.8% in 2013 and 14.9% in 2014 of the total French *P. triticina* population. In 2012 the pathogenotype 106 314 0-G1 was the most frequent one, with a frequency of 30%, but it was found in the landscape at a frequency of 5% in 2013 and completely disappeared in 2014.

For pathotype 166 317 0, 9 other genotypes were identified by genotyping (Figure 1B). The most frequent pathogenotype was 166 317 0-G1, representing 70% in 2013 and 65% in 2014 of all isolates from this pathotype. We did not genotype isolates of 166 317 0 from 2012 in the present study, as genotyping data from a previous study (not shown) revealed that before 2015, 166 317 0-G1 was the only dominant genotype. At the landscape scale, pathogenotype 166 317 0-G1 represented 14.7% in 2013 and 14.2% in 2014 of the *P. triticina* population, making it the second most frequent pathogenotype in the landscape.

These results explained the reason why we compared the aggressiveness of the two pathogenotypes — 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 — that dominated in the French landscape during the 2012-2014 period on the aforementioned bread wheat cultivars.





**Figure 1.** Frequency dynamics of the major *Puccinia triticina* pathogenotypes within pathotypes 166 317 0 (A) and 106 314 0 (B) in the French landscape during the 2012-2014\* period.

\* no genotyping was made for 166 317 0 for 2012

### ***Differences in aggressiveness between the two most frequent pathogenotypes***

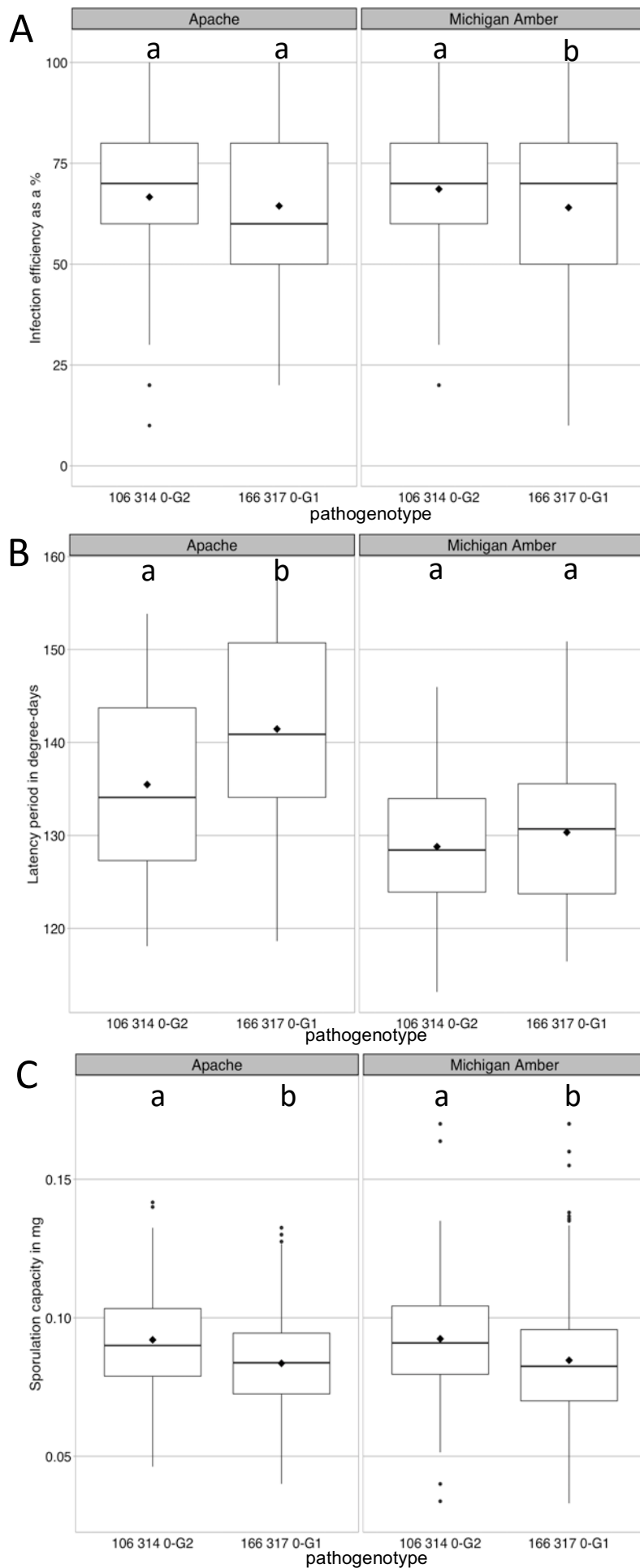
Pathogenotype 106 314 0-G2 was more aggressive than pathogenotype 166 317 0-G1. On the mostly grown but 'neutral' cultivar Apache, this result was obtained for latency period (LP) and sporulation capacity (SP) (Figure 2B and 2C). In addition, all the p-value for each components are provided in Table S1. On the 'naïve' cultivar Michigan Amber, this result was obtained for infection efficiency (IE) and SP (Figure 2A and 2C). IE was higher for pathogenotype 106 314 0-G2 than for pathogenotype 166 317 0-G1 on cultivar Michigan Amber only, with 68,6% for 106 314 0-G2 and 64% for 166 317 0-G1. SP was higher for pathogenotype 106 314 0-G2 than for pathogenotype 166 317 0-G1, with 0.092 mg.lesions<sup>-1</sup> for 106 314 0-G1 and 0.084 mg.lesion<sup>-1</sup> for 166 317 0-G1 on cultivar Apache, and 0.092 mg.lesion<sup>-1</sup> for 106 314 0-G2 and 0.085 mg.lesion<sup>-1</sup> for 166 317 0-G1 on cultivar Michigan Amber. LP was shorter for pathogenotype 106 314 0-G2 than for pathogenotype 166 317 0-G1 on cultivar Apache only, with 135.5 degree-days for 106 314 0-G2 and 141.5 degree-days for 166 317 0-G1.

Within each pathogenotype, we also evidenced a significant isolate effect on Apache and Michigan Amber (Supplementary Table S2). Within pathogenotype 106 314 0-G2, we highlighted an isolate effect for LP and IE on both cultivars. Within pathogenotype 166 317 0-G1, we highlighted an isolate effect for the three aggressiveness components on Apache, and for IE and SP on Michigan Amber.

### ***Aggressiveness of two pathogenotypes on five of the mostly grown cultivars***

On mostly grown cultivars used in Series 3, pathogenotype 106 314 0-G2 was also more aggressive than pathogenotype 166 317 0-G1 (Table 3), but it was statistically significant only for LP on cultivars Aubusson (135.5 vs 138.8 degree-days) and Sankara (140.7 vs. 143.9 degree-days). In Series 2, both pathogenotypes were more aggressive on cultivar Premio than on cultivar Aubusson (Table 3). Pathogenotype 106 314 0-G2 had a significantly shorter LP and higher SP on cultivar Premio, while pathogenotype 166 317 0-G1 was significantly more aggressive on cultivar Premio for all three aggressiveness components.

In Series 3, both pathogenotypes were more aggressive on cultivar Expert as they had a higher IE and shorter LP on this cultivar compared to others, though differences in IE between cultivars were not significant for 106 314 0-G2 (Table 3). For both pathogenotypes, SP was not significantly different between cultivars Expert and Sankara, but was significantly lower for cultivar Bermude. Both pathogenotypes were the least aggressive on cultivar Bermude.



**Figure 2.** Comparison of aggressiveness of *Puccinia triticina* pathogenotypes. Infection efficiency in % (A), latency period in degree-days (B) and sporulation capacity in mg/lesion (C), measured on cultivar Apache. Isolates were sampled on Apache, Aubusson, Arezzo and Premio in 2012-2013. Within a box plot, black diamonds represent the mean value and bars the median value. Letters indicate statistical difference between pathogenotypes, results from Tukey test.

**Table 3.** Comparison of the aggressiveness of the two pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 on five of the mostly widely grown cultivars in the French landscape during the 2006-2016 period. Infection efficiency (IE) was measured as a %, latency period (LP) in degree-days, and sporulation capacity (SP) in mg of spores.uredinia<sup>-1</sup>.

Pathogenotype	Aggressiveness trait	Tested cultivar				
		Series 2		Series 3		
		Premio	Aubusson	Bermude	Expert	Sankara
106 314 0-G2	EI	51.83	51.12	46.96	48.72	46.89
	LP	132.22 a	135.35 b*	142.09 b	138.17 a	140.74 b*
	SP	0.134 a	0.120 b	0.121 a	0.132 ab	0.134 b
166 317 0-G1	EI	54.04 a	47.23 b	41.94 a	52.21 b	45.53 a
	LP	131.23 a	138.80 b*	142.89 b	138.44 a	143.88 b*
	SP	0.127 a	0.113 b	0.119 a	0.129 b	0.132 b

\* indicates a significant difference between the two pathogenotypes on the tested cultivar after a Tukey multiple-comparison test or a Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Letters indicate a significant difference between cultivars within the same pathogenotype and series based on a multiple-comparison test

## Discussion

### ***Two P. triticina pathogenotypes dominated the cultivated landscape in 2012-2014***

In the 2012-2014 period, the two pathotypes that extensively dominated the landscape — 106 314 0 and 166 317 0 — differ for their virulence (Fontyn et al., 2022a): 106 314 0 carries virulences 1, 10, 13, 14a, 15, 17, 37 and 166 317 0 carries virulences 1, 3, 3bg, 10, 13, 14a, 15, 17, 26, 17b, 37. Differences between these two pathotypes thus concerns their interaction with the wheat cultivars having the four resistance genes *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr17b* and *Lr26* (Fontyn et al., 2022a), 166 317 0 being virulent while 106 314 0 being avirulent. *Lr3bg*, *Lr17b* and *Lr26* are not present in French wheat cultivars, while *Lr3* has continuously gained in frequency in the landscape since 2006, reaching 14% in 2014 and thus making it the fifth most present *Lr* gene in the French landscape (Fontyn et al., 2022a). Consequently, the presence of *Lr3* in the cultivars is supposed to confer a selective advantage to the virulent pathotype 166 317 0 compared to the avirulent pathotype 106 314 0. Indeed, *Lr* genes are known to exert a strong selection pressure on *P. triticina* and dominant pathotypes in a landscape are usually consistent with the *Lr* genes found in this landscape (Kolmer, 2019; Zhang et al., 2020). For this reason, pathotype 166 317 0 is expected to be more frequent than 106 314 0 during the 2012-2014 period, but this is not confirmed by the national survey data set.

Within each of the two pathotypes 106 314 0 and 166 317 0, a particular pathogenotype dominated. The pathogenotype 106 314 0-G1 was dominating the landscape between 2006 and 2012, then it was present at a low frequency in 2013, and completely disappeared from 2014 onward. Fontyn et al. (2022b) evidenced that 106 314 0-G2 was more aggressive than 106 314 0-G1, which could explain the replacement of one by the other. Other pathogenotypes — 15 for pathotype 106 314 0 and 9 for pathotype 166 317 0 — were identified from the 114 bulks collected during the national survey in 2012 and 2014. The others pathogenotypes within each pathotypes could be due to the non-correspondence between the isolate purified for genotyping (done in Fontyn et al., 2022b) and the isolate purified a first time for the initial pathotyping each year of the survey (Fontyn et al., 2022a). If we neglect this bias, linked to the constraints of working on datasets and biological material acquired over several decades, the existence of isolates having the same pathotype but being genetically diverse results of mutations or migrations. Despite this diversity, the two pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 were dominating the cultivated landscape in 2013-2014, being present at an about equivalent frequency (14.8% for 106 314 0-G2 vs. 14.5% for 166 317 0-G1) regardless the advantage conferred by the virulence 3 to pathogenotype 166 317 0-G1.

### ***The pathogenotype avirulent on Lr3 has a higher aggressiveness***

The aggressiveness of pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 was assessed on the 'neutral' cultivar Apache (the mostly grown cultivar between 2009 and

2013), the 'naïve' cultivar Michigan Amber (not cultivated), and five of the mostly grown cultivars in France in 2013-2014. Premio, Aubusson, Bermude, Expert and Sankara were widely cultivated at different periods. Aubusson and Sankara were part of the mostly grown cultivars before 2012, Premio before 2013, Bermude before 2014 and Expert before 2015. Taken together, these cultivars accounted for 11,1% of the cultivated landscape in 2012 (20,3% including Apache), 6,6% of the cultivated landscape in 2013 (14,6% including Apache) and 3,0% in 2014 (9% including Apache). Significant differences in aggressiveness components of isolates from the two pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 was established on the 'neutral' cultivar Apache and on the 'naive' cultivar Michigan, shown by Fontyn *et al.* (2022a) to have had no or a limited selection effect on the landscape-pathotype pattern. The pathogenotype 106 314 0-G2 was always more aggressive than the pathogenotype 166 317 0-G1, but the difference between both pathogenotypes was not significant for all the aggressiveness components measured. Indeed, variation in aggressiveness between the two pathogenotypes was different according to the tested cultivar and to the assessed component.

The aggressiveness components that we measured in this study, by acting on the life cycle of the pathogen as quantitative traits of pathogenicity, impact the development of certain pathogenotypes and thus modify their involvement in leaf rust epidemics at the landscape scale (Pringle & Taylor, 2002; Lannou, 2012; Azzimonti *et al.*, 2022). All other things remaining equal, especially virulence profile, each aggressiveness component gives an advantage to a pathogenotype comparatively to other. Latent period (LP), which was the most frequently significantly different between both pathogenotypes, is likely the aggressiveness trait having the strongest impact on epidemic dynamics since it drives the number of cycles that a pathogen is able to perform during one season (Pringle & Taylor, 2002; Milus *et al.*, 2006; Lannou, 2012). Depending on the cultivar, we highlighted a significant difference in aggressiveness between pathogenotypes 106 314 0-G2 and 166 317 0-G1 for two of the three measured components. The more components are concerned by a higher aggressiveness, the more it will be advantageous for a pathogenotype, indeed, severe epidemics are mostly associated with a high spore production, high infection efficiency and a short latency period (Azzimonti *et al.*, 2022).

On cultivar Apache, the difference in LP between the two pathogenotypes was approximately a half day (11 h) at 15°C. As rust spores are mainly dispersed towards the middle of the day (Pady *et al.*, 1965), this difference may almost give a one-day advance in their dispersal dispersion if the environmental conditions (humidity, wind) are favorable. Although Apache was considered as a 'neutral' cultivar and has a relatively high quantitative resistance level, its high proportion in the landscape might have contributed to the selection of the most aggressive isolates, as suggested by the high frequency of the most aggressive pathotype 106 314 0 found on this cultivar. This result exemplified that a cultivar with a good level of quantitative resistance can select for more aggressive isolates, consistently with previous results (Delmas *et al.*, 2016;

Sakr, 2022). It has already been shown that aggressiveness confers a selective advantage resulting in pathotype or race replacement in stripe rust populations (Milus et al., 2009). In leaf rust, it has previously been demonstrated that the *P. triticina* pathotype 073 100 0, which dominated the landscape between the late 1990s and early 2000s, had a higher aggressiveness on the cultivar Soissons as compared to other virulent pathotypes present in minor frequencies (Pariaud et al., 2009b); Soissons was the mostly grown cultivar from 1991 to 1999, with a frequency in the French landscape going from 15,3% in 1999 to 40,5% in 1993. This result was interpreted as an adaptation of pathotype 073 100 0 to Soissons, which explained its domination within the pathogen population during this period. Similarly, the advantage provided by the higher aggressiveness of 106 314 0-G2 is likely to explain the high frequency of pathotype 106 314 0 in the landscape during 2013-2014, despite the disadvantage conferred by the avirulence on *Lr3*.

### ***The higher aggressiveness of pathogenotype 106 314 0-G2 is cultivar independent***

Pathogenotype 166 317 0-G1 was never found more aggressive than 106 314 0-G2 whatever the cultivar on which it was tested and whatever the aggressiveness component considered. This suggests that the higher aggressiveness of pathogenotype 106 314 0-G2, significant on cultivars Apache, Michigan Amber, Aubusson and Sankara, does not depend on the cultivar on which it was tested, which is finally in contradiction with the specific adaptation of the pathotype 073 100 0 to Soissons highlighted by Pariaud *et al.* (2009b). The significant differences in the aggressiveness of both pathogenotypes between the five cultivars tested in Series 2 and 3 suggest that these cultivars differed in their level of quantitative resistance, with the highest level of resistance for cultivar Bermude. Azzimonti *et al.* (2013) showed that quantitative resistance differed between cultivars inoculated in field conditions with a single *P. triticina* pathotype, as based on the comparison of relative AUDPC. These cultivars were inoculated in the greenhouse with three *P. triticina* pathotypes, and five aggressiveness components were assessed. All three pathotypes were less aggressive, with similar values, on the cultivars with the highest quantitative resistance, as measured by the field AUDPC value, but all the others cultivars were at least more susceptible to one of the three pathotypes, which resulted in a variation of aggressiveness between pathotypes (Azzimonti et al., 2013). This suggest that the quantitative resistance level of the cultivars may depend on the tested pathotype, but the results should be treated with caution as pathotypes were represented by only one isolate. However, the efficacy of quantitative resistances in relation with the tested pathotype has been poorly discussed in the scientific literature. We highlighted an isolate effect within a given pathogenotype, using 6 isolates for pathogenotype 106 314 0-G2 (which had a significant effect on IE and LP on Apache and Michigan Amber) and 12 isolates for pathogenotype 166 317 0-G1 (which had a significant effect on the three aggressiveness components, except for LP on Michigan Amber). Pariaud *et al.* (2012) also evidenced the existence of such a variability in the aggressiveness between *P.*

*tritricina* isolates of a given pathotype, despite the clonal structure of the pathogen population. Study on *Phytophthora infestans* revealed similar differences in aggressiveness traits (spore production, latency period, infection efficiency and lesion expansion rate) between isolates sharing an identical multilocus genotype (Carlisle et al., 2002). au

## **Acknowledgments**

We thank Nathalie Retout for her technical help in the preparation of the aggressiveness experiments. We thank the French Wheat Breeders groups 'Recherches Génétiques Céréales' and 'CETAC', and 'ARVALIS-Institut du Végétal' for their help in collecting strains of *P. tritricina* from their nurseries and field trials.

## **Funding**

This research was supported by a PhD fellowship from the INRAE department 'Santé des Plantes et Environnement' (SPE) and from the French Ministry of Education and Research (MESRI) awarded to Cécilia Fontyn for the 2018-2022 period. It was also supported by several French FSOV ('Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale') grants FSOV 2004 K, 2008 G, 2012 Q), and by the European Commission, Research and Innovation under the Horizon 2020 program (RUSTWATCH 2018-2022, Grant Agreement no. 773311-2). INRAE BIOGER benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

## **Conflicts of Interest**

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**

Azzimonti G, Lannou C, Sèche I, Goyeau H (2013) Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant*



*Pathology*, **62**, 970–981. <https://doi.org/10.1111/ppa.12029>

Azzimonti G, Papaix J, Lannou C, Goyeau H (2022) Contribution of the life-history traits of a plant pathogen to the development of field epidemics. *Plant Pathology*, **71**, 1344–1354. <https://doi.org/10.1111/ppa.13567>

Bariana HS, Babu P, Forrest KL, Park RF, Bansal UK (2022) Discovery of the new leaf rust resistance gene *Lr82* in wheat: molecular mapping and marker development. *Genes*, **13**, 964. <https://doi.org/10.3390/genes13060964>

Carlisle DJ, Cooke LR, Watson S, Brown AE (2002) Foliar aggressiveness of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. *Plant Pathology*, **51**, 424–434. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00740.x>

Cowger C, Brown JKM (2019) Durability of quantitative resistance in crops: greater than we know? *Annual Review of Phytopathology*, **57**, 253–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100016>

Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>

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. <https://doi.org/10.1111/eva.12368>

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

Fontyn C, Meyer KJ, Boixel A-L, Delestre G, Piaget E, Picard C, Suffert F, Marcel TC, Goyeau H (2022b) Evolution within a given virulence phenotype (pathotype) is driven by changes in aggressiveness: a case study of French wheat leaf rust populations. , 2022.08.29.505401. <https://doi.org/10.1101/2022.08.29.505401>

Fontyn C, Zippert A-C, Delestre G, Marcel TC, Suffert F, Goyeau H (2022a) Is virulence phenotype evolution driven exclusively by Lr gene deployment in French *Puccinia triticina* populations? *Plant Pathology*, **71**, 1511–1524. <https://doi.org/10.1111/ppa.13599>

Goyeau H, Park R, Schaeffer B, Lannou C (2006) Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology*, **96**, 264–273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0264>

Huerta-Espino J, Singh RP, Germain S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, Bhardwaj SC, Goyeau H (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, **179**, 143–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>

Johnson DA (1980) Effect of low temperature on the latent period of slow and fast rusting winter wheat genotypes. *Plant Disease*, **64**, 1006. <https://doi.org/10.1094/PD-64-1006>

Kolmer JA (2019) Virulence of *Puccinia triticina* , the wheat leaf rust Fungus, in the

United States in 2017. *Plant Disease*, **103**, 2113–2120. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1638-SR>

Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S (2016) Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **35**, 38–55. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1148980>

Laloi G, Montarry J, Guibert M, Andrivon D, Michot D, Le May C (2016) Aggressiveness Changes in Populations of *Didymella pinodes* over Winter and Spring Pea Cropping Seasons. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**, 4330–4339. <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-16>

Lannou C (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **50**, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173031>

Lannou C, Soubeyrand S (2017) CHAPTER 19: Measure of life-cycle traits of a biotrophic pathogen. In: *Exercises in Plant Disease Epidemiology, Second Edition* Epidemiology. (eds Samuel S, Christian L), pp. 149–152. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544426.019>

Lehman JS, Shaner G (1997) Selection of populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology*<sup>®</sup>, **87**, 170–176. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.2.170>

Leonard KJ (1969) Selection in heterogeneous populations of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Phytopathology*.

Lovell DJ, Powers SJ, Welham SJ, Parker SR (2004) A perspective on the measurement of time in plant disease epidemiology. *Plant Pathology*, **53**, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01097.x>

McDonald BA, Linde C (2002) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**, 163–180. <https://doi.org/10.1023/A:1015678432355>

Milus EA, Kristensen K, Hovmøller MS (2009) Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology*, **99**, 89–94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0089>

Milus EA, Seyran E, McNew R (2006) Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Isolates in the South-Central United States. *Plant Disease*, **90**, 847–852. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0847>

Niks RE, Qi X, Marcel TC (2015) Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Annual Review of Phytopathology*, **53**, 445–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-115928>

Pady SM, Kramer CL, Pathak VK, Morgan FL, Bhatti MA (1965) Periodicity in Airborne Cereal Rust Urediospores. *Phytopathology*, **55**, 132–134.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-7-0869>

Parlevliet JE (1975) Partial resistance of barley to leafrust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. *Euphytica*, **24**, 21–27. <https://doi.org/10.1007/BF00147164>

Pfender WF (2001) A temperature-based model for latent-period duration in stem rust of perennial ryegrass and tall fescue. *Phytopathology*®, **91**, 111–116. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.111>

Pringle A, Taylor J (2002) The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, **10**, 474–481. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02447-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02447-2)

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.712>

Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent M-H (2003) A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 871–881.

Sache I (1997) Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust ( *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* ). *Plant Pathology*, **46**, 581–589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-33.x>

Sakr N (2022) Adaptation of phytopathogenic fungi to quantitative host resistance: in vitro selection for greater aggressiveness in *Fusarium Head Blight* species on wheat. *Cytology and Genetics*, **56**, 261–272. <https://doi.org/10.3103/S0095452722030112>

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, **3**, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

Sharma HC, Ortiz R (2002) Host plant resistance to insects: an eco-friendly approach for pest management and environment conservation. *Journal of Environmental Biology*, **23**, 111–135.

Zhang L, Shi C, Li L, Li M, Meng Q, Yan H, Liu D (2020) Race and Virulence Analysis of *Puccinia triticina* in China in 2014 and 2015. *Plant Disease*, **104**, 455–464. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1051-RE>

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Table S1.** Anova p-values for series 1

Series	Cultivar	Components	Source of variation			
			Repetition	Genotype	Isolat/Genotype	Sampled cultivar/Genotype
1	Apache	IE	<0.0001	0.27	<0.0001	0.6
		LP	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.4
		SP	<0.0001	<0.0001	0.002	0.001
	Michigan	IE	<0.0001	<b>0.01</b>	<0.0001	<0.0001
		LP	<0.0001	0.01	<0.0001	0.001
		SP	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.001

Genotype p-values with a repetition interaction are reprinted in bold

**Table S2.** Comparison of aggressiveness variability of *Puccinia triticina* isolates within genotype. Isolates were collected in 2012-2013 and tested on cultivars Apache and Michigan. Infection efficiency (IE) was measured as a %, latency period (LP) in degree-days, and sporulation capacity (SP) in mg of spores.uredinia<sup>-1</sup>.

Pathogenotype	Isolate	Sampled cultivar	Tested cultivars					
			Apache			Michigan		
			LP	SP	IE	LP	SP	IE
106 314 0-G2	BT12M024	Arezzo	141.3 a	0.087 a	69.6 ab	133.5 a	0.091 a	76.4 a
	BT12M302	Premio	135.8 ab	0.096 a	55.7 ab	127.2 bc	0.082 a	63.7 ab
	BT13M108	Aubusson	133.7 ab	0.090 a	72.5 ab	128.5 bc	0.092 a	69.2 ab
	BT13V026	Aubusson	137.1 ab	0.092 a	74.8 a	130.4 ab	0.100 a	76.7 a
	BT13V143	Arezzo	133.7 ab	0.095 a	57.4 b	128.5 bc	0.099 a	60.0 b
	BT13V189	Apache	131.4 b	0.091 a	70.4 ab	124.8 c	0.092 a	64.8 ab
166 317 0-G1	BT12M042	Arezzo	138.8 ab	0.090 a	48.2 c	127.8 a	0.096 a	56.5 cdef
	BT12M079	Premio	139.3 ab	0.079 ab	74.8 a	131.2 a	0.086 a	80.9 a
	BT12M109	Apache	140.9 ab	0.087 a	67.3 ab	132.6 a	0.087 a	70.0 abcd
	BT12M202	Apache	146.3 a	0.083 a	72.7 a	132.1 a	0.089 a	67.9 abcde
	BT12M264	Premio	141.7 ab	0.081 ab	63.8 abc	130.1 a	0.092 a	60.9 bcdef
	BT12M293	Aubusson	141.7 ab	0.086 a	62.2 abc	132.4 a	0.086 a	57.6 bcdef
	BT12M371	Premio	142.2 ab	0.080 ab	71.8 a	128.1 a	0.076 a	75.5 ab
	BT12M378	Apache	143.3 ab	0.067 b	68.7 ab	129.7 a	0.063 b	72.2 abc
	BT12V078	Aubusson	136.8 b	0.091 a	66.7 ab	128.7 a	0.087 a	50.0 ef
	BT13M239	Arezzo	143.4 ab	0.082 a	59.1 abc	132.7 a	0.075 ab	53.68 def
	BT13M259	Arezzo	142.6 ab	0.088 a	52.9 bc	126.6 a	0.096 a	48.18 f
	BT13V066	Aubusson	141.6 ab	0.089 a	66.36 ab	132.6 a	0.087 a	73.0 abc

## CHAPITRE 5: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Cette thèse a permis de mieux de comprendre le rôle joué par l'agressivité dans la dynamique évolutive d'un champignon phytopathogène, en s'appuyant sur le cas d'étude des populations françaises de *Puccinia triticina* responsable de la rouille brune du blé, analysé à l'échelle du paysage sur une décennie.

Les différentes expériences réalisées au cours de cette thèse m'ont permis de mettre en évidence un rôle significatif de l'agressivité sur la dynamique des populations de *P. triticina*. En effet, j'ai pu montrer que les gènes *Lr* présents dans les variétés cultivées n'expliquaient pas à eux seuls la fréquence des pathotypes de *P. triticina* dans le paysage, et particulièrement la domination de deux pathotypes entre 2006 et 2016. Au sein de groupes d'isolats représentatifs de deux pathotypes majeurs, 106 314 0 et 166 317 0, j'ai mis en évidence la coexistence de différents génotypes, caractérisés par des profils SSR différents, ce qui m'a conduit à proposer le terme de 'pathogénotype', défini comme la combinaison unique d'un pathotype et d'un génotype. Un suivi national des populations conduit entre 2006 et 2016 a montré qu'au sein d'un même pathotype, les pathogénotypes dominants se sont succédé. J'ai mis en évidence que des pathogénotypes plus agressifs remplaçaient les anciens pathogénotypes moins agressifs, soulignant ainsi l'importance de l'agressivité en tant que force évolutive des populations de rouille brune. Enfin, la comparaison des niveaux d'agressivité entre différents pathotypes a révélé qu'une agressivité plus élevée d'un pathogénotype dans le paysage variétal pouvait expliquer sa domination sur d'autres pathogénotypes, même si ces autres pathogénotypes portent une combinaison de virulences théoriquement avantageuse compte tenu des gènes *Lr* présents dans les variétés les plus cultivées.

## **I. L'AGRESSIVITE DES AGENTS PATHOGENE, UNE FORCE EVOLUTIVE**

### **A. QU'EST-CE QUE L'AGRESSIVITE ?**

Les termes pathogénicité, virulence et agressivité sont utilisés dans de nombreuses disciplines scientifiques s'intéressant aux relations hôte-parasite, notamment en médecine, épidémiologie, écologie évolutive, microbiologie, entomologie et phytopathologie. Mais la définition de ces termes varie entre ces disciplines mais aussi à l'intérieur de celles-ci (Casadevall & Pirofski, 1999). J'ai abordé cette question dans l'introduction générale de ma thèse et souhaite revenir dessus, sous un angle historique et épistémologique. En effet, entre les phytopathologistes eux-mêmes, les habitudes divergent, et plusieurs auteurs ont tenté de redéfinir ces termes au cours des dernières décennies (Shaner et al., 1992; Bos & Parlevliet, 1995; Sacristán & García-Arenal, 2008). La définition du terme agressivité est ainsi débattue depuis les années 1940. Différentes définitions proposées pour l'agressivité ont été répertoriées par Shaner et al (1992) :

1 : Propriété de l'agent pathogène reflétant la quantité relative de dommages causés à l'hôte sans tenir compte des gènes de résistance.

2 : Quantité de reproduction sur l'hôte sans tenir compte des gènes de résistance.

3 : Quantité de maladie causée par un agent pathogène sur un hôte dont la résistance est non spécifique à la race (gène mineur ou "horizontal") ; les races d'agents pathogènes qui n'interagissent pas de manière différentielle avec les hôtes possédant des gènes *R* (résistance majeure, spécifique à la race ou "verticale") varient en termes d'agressivité.

4 : Description de la vitesse à laquelle une quantité de maladie est atteinte, les agents pathogènes plus agressifs atteignant cette quantité plus rapidement.

5 : Aptitude à la reproduction d'un agent pathogène pendant sa croissance sur un hôte.

Bos et Parlevliet (1995) avaient préconisé l'adoption des définitions inverses de celles que j'ai utilisées dans ma thèse, l'agressivité étant définie comme la capacité de l'agent pathogène à envahir et à s'établir dans l'hôte, et la virulence la gravité de la maladie chez les hôtes infectés (Bos & Parlevliet, 1995; Thomas & Elkinton, 2004). La plupart des phytopathologistes s'accordent actuellement sur la définition de l'agressivité proposée par Van der Plank en 1968, qui correspond à la troisième définition de Shaner et al (1992) (Cowger & Mundt, 2002; Pariaud et al., 2009a; Suffert et al., 2013; Young et al., 2018; Frézal et al., 2018; Azzimonti et al., 2022). Dans le cas d'un gène de résistance majeur impliqué dans une interaction gène-pour-gène avec le produit d'un facteur d'avirulence chez l'agent pathogène, il m'a donc semblé pertinent d'utiliser le terme 'virulence' pour faire référence aux conséquences de la non-reconnaissance de l'agent pathogène par la plante hôte, c'est-à-dire une infection. Le terme virulence renvoie donc aux résistances qualitatives et définit la capacité ou non d'un agent pathogène à infecter un hôte compatible. Inversement, le terme 'agressivité' m'a semblé le mieux adapté pour représenter une distribution continue de phénotypes et ainsi faire référence aux résistances quantitatives. Au final, il ressort que l'utilisation de ces deux termes, virulence et agressivité, permet de faire une distinction claire entre les interactions de types qualitative et quantitative.

## **B. MESURER L'AGRESSIVITE**

Contrairement à la virulence, l'agressivité regroupe différentes composantes ou traits quantitatifs du cycle de vie de l'agent pathogène. Il existe ainsi différentes manières complémentaires de mesurer l'agressivité. Dans ma thèse, trois composantes de l'agressivité ont été utilisées : l'efficacité d'infection, la période de latence et la capacité de sporulation. Le protocole développé pour mesurer ces traits d'agressivité sur plantules de blé a permis de mettre en évidence des variations significatives pour chacun d'eux.

L'efficacité d'infection est une composante qui, souvent, n'est pas prise en compte



dans les expérimentations étant donné la difficulté de contrôler précisément le nombre de spores déposées lors d'une inoculation. En effet, l'efficacité d'infection est le rapport entre le nombre de lésions sporulantes et le nombre de spores déposées sur la plante infectées. Il est donc nécessaire de compter ou d'estimer le nombre de spores déposées par unité de surface. Toutefois, les protocoles d'inoculation utilisés habituellement, en mélange liquide avec une huile minérale ou en mélange solide avec de la poudre de talc ou des spores de lycopodes, aboutissent souvent à une répartition des spores sur la feuille très hétérogène et à des mesures des efficacités d'infection si variables qu'elles peuvent difficilement être prises en compte (Pariaud et al., 2009b). Le protocole expérimental développé pendant ma thèse, consistant à déposer les spores une par une sur les feuilles de blé, a permis de réaliser une estimation beaucoup plus précise de cette composante de l'agressivité. Celle-ci est toutefois restée fortement influencée par l'environnement, ce qui a pu compliquer l'analyse statistique de résultats provenant de séries ou répétitions différentes.

Les mesures de la capacité de sporulation ont également été variables. Le protocole développé pourrait être amélioré en allongeant la durée de sporulation avant la récolte et la pesée des spores. En effet, une étude a déjà mis en évidence des différences de sporulation entre pathotypes de *P. triticina* avec une récolte des spores entre 15 et 23 jours après l'inoculation (Pariaud et al., 2009b). Pendant ma thèse, les spores ont été récoltées seulement 12 jours après inoculation, et allonger cette période pourrait permettre de maximiser les différences observées pour cette composante entre isolats et entre pathotypes.

La période de latence est la composante d'agressivité qui a le plus varié entre pathotypes mais également entre isolats appartenant à des pathotypes différents. Cette variabilité importante a été mise en évidence sur pratiquement toutes les variétés testées, avec des différences semblant parfois légères mais qui se sont finalement révélées statistiquement significatives. De plus, cette composante était la moins impactée par l'effet répétition, et donc par l'environnement. Enfin, l'unité de mesure de la période de latence étant le degré-jour, la dépendance à la température, à la fois du processus d'infection et de l'agent pathogène, a pu être prise en compte dans la globalité, de l'inoculation jusqu'à la fin de la sporulation (Lovell et al., 2004). Ces éléments font de la période de latence une composante de choix pour l'étude des interactions quantitatives (agressivité, résistance partielle). Elle est utilisée dans l'étude de la plupart des pathosystèmes, et si une seule composante d'agressivité devait être conservée, je préconiserais que ce soit celle-ci. En effet, le temps est une variable plus quantifiable que n'importe quel trait biologique, ce qui permet de mettre en évidence des différences faibles entre les isolats, et ce, de manière robuste et répétable.

Développer un protocole expérimental s'appuyant sur de jeunes plantes m'a permis d'optimiser la place prise par les expérimentations ainsi que leur durée. En effet, le gain de place et de temps est considérable avec la mesure des traits d'agressivité sur

plantules comparé à l'utilisation de plantes adultes. Il n'aurait clairement pas été possible d'évaluer toutes les interactions auxquelles je me suis intéressée si le travail avait été réalisé exclusivement sur plantes adultes. La comparaison avec d'autres études laisse penser que les variations d'agressivité entre pathotypes mais aussi entre isolats d'un même pathotype mises en évidence sur certaines variétés pourraient également être confirmées au stade adulte. Priestley et Doling (1974) ont par exemple comparé l'agressivité de deux isolats appartenant à une même race de *P. striiformis* sur des plantules et des plantes adultes de la variété de blé Joss Cambier. Les différences d'agressivité entre les deux isolats mises en évidence sur plantules ont été retrouvées sur plantes adultes. Dans notre cas, il serait intéressant de vérifier que les différences d'agressivité mises en évidence sur plantule de blé sont également retrouvées au stade adulte, en comparant par exemple l'agressivité des pathogénotypes 106 314 0-G2 et 166 317 0-G1 sur la variété Apache au stade plantule et adulte, variété pour laquelle j'ai montré que le nombre de composantes d'agressivité ainsi que leur intensité varie considérablement entre les deux pathogénotypes.

### **C. LE ROLE DE L'AGRESSIVITE DANS L'EVOLUTION DES POPULATIONS D'AGENTS PATHOGENES**

Martens (1985) a montré la persistance de certaines races de *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*, champignon responsable de la rouille noire de l'avoine, en Amérique du Nord, alors que la plupart des cultivars présents dans le paysage étaient résistants. Il en a conclu que des facteurs autres que la virulence déterminent la composition des populations d'agents pathogènes sans pour autant les identifier de manière précise. Je suis arrivée à cette même conclusion dans le deuxième chapitre de ma thèse, où j'ai mis en évidence que les résistances qualitatives, à travers les gènes *Lr* présents dans les variétés cultivées, ne permettaient pas d'expliquer entièrement la dynamique d'évolution des populations de *P. triticina*. Cette observation s'est traduite par la domination de deux pathotypes, 106 314 0 et 166 317 0, dans le paysage cultivé pendant la période allant de 2006 à 2016, alors qu'environ 80% des autres pathotypes identifiés étaient également compatibles avec la plupart des variétés cultivées pendant cette période. J'ai estimé que cette compatibilité était comprise entre 65% et 90% des pathotypes selon l'année considérée. De plus, j'ai mis en évidence des associations préférentielles entre variétés et pathotypes non expliquées par les gènes *Lr*. Dans ce contexte j'ai émis l'hypothèse qu'il existait une sélection double au sein des populations de *P. triticina*, basée sur les interactions qualitatives entre les gènes *Lr* et les gènes d'avirulence correspondants, mais aussi les interactions quantitatives impliquant l'agressivité des souches de *P. triticina*.

Les résultats expérimentaux qui ont fait suite à ce constat ont effectivement montré que l'agressivité pouvait en partie expliquer la dynamique d'évolution des populations de *P. triticina* : dans le troisième chapitre de ma thèse, j'ai montré qu'au sein d'un même pathotype il existait différents génotypes, ce qui m'a amené à proposer le terme de « pathogénotype », regroupant les isolats ayant une combinaison unique d'un

pathotype et d'un génotype. Ce terme n'a que très rarement été utilisé dans la littérature scientifique (Macoris et al., 2006). L'analyse de l'évolution de la fréquence des pathogénotypes a révélé, au sein de chacun des deux pathotypes majoritaires, qu'un 'ancien' pathogénotype était remplacé par un 'nouveau' pathogénotype plus agressif que l'ancien. Ce remplacement d'un pathogénotype par un autre plus agressif a été constaté au niveau de la dynamique de fréquence des pathotypes dans le paysage cultivé. Dans le cas du pathotype 106 314 0, le remplacement de pathogénotype s'est manifesté par un plateau de la courbe de fréquence du pathotype entre 2011 et 2014, avant que celui-ci ne disparaisse progressivement du paysage au cours des années suivantes. Dans le cas du pathotype 166 317 0, le remplacement de pathogénotype s'est manifesté par une nette diminution de la fréquence du pathotype dans le paysage entre 2012 et 2015, suivi d'une nouvelle augmentation du pathotype correspondant à l'apparition du nouveau pathogénotype plus agressif. La différence observée dans la dynamique de ces deux pathotypes, rythmée par les remplacements de pathogénotypes, pourrait s'expliquer par la multiplicité des composantes d'agressivité impliquées. En effet, le nouveau pathogénotype 106 314 0-G2 présentait un gain d'agressivité significatif pour une seule composante (période de latence) tandis que le nouveau pathogénotype 166 317 0-G2 présentait un gain d'agressivité pour les trois composantes.

Dans le quatrième chapitre de ma thèse, j'ai montré que l'agressivité jouait un rôle important non seulement dans la dynamique évolutive des pathogénotypes au sein d'un même pathotype, mais aussi dans la dynamique évolutive entre pathotypes au niveau du paysage cultivé. J'ai mis en évidence qu'une agressivité plus élevée pouvait expliquer la domination d'un pathogénotype dans le paysage, malgré la présence d'autres pathogénotypes possédant l'avantage d'une combinaison de virulences leur permettant de contourner les gènes *Lr* présents dans les variétés cultivées. Ces résultats sont concordants avec ceux d'une précédente étude sur la rouille brune conduite à BIOGER (Pariaud et al., 2009b), dans laquelle le pathotype alors dominant, P1, était plus agressif que deux autres pathotypes compatibles, sur la variété la plus largement cultivée dans le paysage, Soissons. Cette différence d'agressivité sur Soissons a pu expliquer la domination du pathotype P1. Toutefois, le paysage variétal était beaucoup moins diversifié à cette période (1999-2002) que pendant celle qui a suivi (2006-2016), et l'agressivité du pathotype P1 n'a pas été mesurée sur d'autres variétés cultivées. Pendant ma thèse j'ai montré que le pathotype dominant 106 314 0 était plus agressif sur un ensemble de variétés possédant des combinaisons de résistances différentes, soulignant encore un peu plus le rôle significatif joué par l'agressivité sur les populations de *P. triticina* dans un paysage variétal diversifié.

## II. ÉVOLUTION DE L'AGRESSIVITE ET EROSION DES RESISTANCES QUANTITATIVES

Les travaux portant sur l'adaptation des agents pathogènes aux résistances quantitatives sont peu nombreux. Néanmoins, plusieurs études ont déjà montré que les agents pathogènes étaient capables de s'adapter « quantitativement » à ce type de résistance. Chez l'igname ailée, *Dioscorea alata*, une adaptation quantitative du champignon pathogène *Colletotrichum gloeosporioides* a été mise en évidence. Des isolats récoltés sur trois variétés possédant différents niveaux de résistance quantitative ont été réinoculés sur ces mêmes cultivars. Les isolats ont tous exprimé une agressivité plus élevée sur leur hôte d'origine, illustrant ainsi un patron d'adaptation locale (Frézal et al., 2018). Une autre étude portant sur *Plasmopara viticola* a montré que les isolats collectés sur des variétés de vignes partiellement résistantes ont été plus agressifs que les isolats collectés sur des variétés sensibles après avoir été inoculés sur une variété partiellement résistante, avec une période de latence plus courte ainsi qu'une plus grande capacité de sporulation. En revanche, aucune différence d'agressivité n'a été mise en évidence lorsque les isolats ont été inoculés sur une variété sensible (Delmas et al., 2016). Cowger et Mundt (2002), ont étudié l'agressivité d'isolats de *Zymoseptoria tritici* collectés sur des variétés de blé sensibles et partiellement résistantes et mis en évidence que les isolats récoltés à la fin d'une épidémie étaient plus agressifs que ceux récoltés au début, et cela uniquement sur la variété partiellement résistante. Cette dynamique a été confirmée par les travaux conduits à BIOGER (Suffert et al., 2018). D'autres études ont également mis en évidence ce type d'adaptation à la résistance quantitative chez d'autres agents pathogènes, comme *Phytophthora infestans*, (Andrivon et al., 2007) ou *Venturia inaequalis* (Caffier et al., 2016). De telles adaptations illustrent une possible érosion des résistances quantitatives, spécifique à la variété. Cette possible érosion a été analysée à BIOGER dans le cas de la rouille brune du blé par Azzimonti et al. (2013) après que l'agressivité d'isolats de *P. triticina* a été mesurée sur des cultivars possédant des niveaux variables de résistance quantitative. Les auteurs ont mis en évidence une spécificité d'isolat vis-à-vis d'une variété de blé portant de la résistance quantitative : un isolat, P5, est apparu plus agressif sur la variété de blé Balance que les autres isolats testés. Ainsi, une augmentation de fréquence de cet isolat dans le paysage aurait eu pour conséquence une érosion de la résistance quantitative de cette variété. La durabilité de la résistance quantitative chez *P. triticina* a aussi été testée expérimentalement par Lehman & Shaner (2007), avec deux populations de *P. triticina* sélectionnées pour leur courte période de latence après plusieurs cycles de réinoculation sur deux cultivars de blé partiellement résistants (CI\_13227 et Sw\_72469-6). Les populations sélectionnées présentaient une agressivité plus élevée non seulement pour la période de latence mais également pour d'autres composantes d'agressivité, et le niveau d'agressivité a augmenté avec le nombre de cycles de réinoculation. Ces résultats, complémentaires de ceux obtenus dans cette thèse, montrent que les populations de *P. triticina* peuvent évoluer vers une agressivité plus

élevée et par conséquent, entrainer l'érosion des résistances quantitatives.

L'adaptation aux résistances quantitatives peut également être non spécifique de la variété. Quillévéré-Hamard et al. (2021), ont mesuré l'agressivité des populations naturelles françaises d'*Aphanomyces euteiches*, l'agent de la pourriture racinaire du pois, sur des lignées porteuses de différentes combinaisons de QTLs. L'objectif de cette étude était de voir s'il existait au sein des populations naturelles de cet agent pathogène des isolats plus agressifs que d'autres vis-à-vis de ces combinaisons de QTL. Les résultats ont mis en évidence l'existence d'une variabilité d'agressivité sur les QTL de résistance parmi les isolats étudiés, alors même qu'aucun de ces QTLs n'était utilisé dans les variétés cultivées. Les isolats ont été catégorisés en fonction leur agressivité. Si l'étude a montré qu'il existait une variabilité d'agressivité au sein des isolats de la population naturelle qui n'était pas le fruit d'une adaptation vis-à-vis des résistances quantitatives, elle suggère que les populations de *A. euteiches* peuvent éroder les effets des QTL de résistance au fil du temps, par la sélection d'isolats plus agressifs déjà présents dans la population naturelle (Quillévéré-Hamard et al., 2021).

Il est difficile de savoir si le gain d'agressivité constaté chez des pathotypes (et pathogénotypes) dominants au cours de ma thèse correspond à une adaptation spécifique vis-à-vis des résistances quantitatives présentes dans les variétés testées et cultivées entre 2006 et 2016. Parmi les variétés testées, certaines étaient plus sensibles aux deux pathotypes considérés, puisque l'agressivité de ces derniers était plus élevée sur certaines variétés que sur les autres, indiquant un niveau de résistance quantitative différent. Néanmoins, en cas de différence d'agressivité mise en évidence sur une variété, le pathotype le plus agressif était toujours le même (106 314 0), et cela sur plusieurs variétés. A aucun moment, le second pathotype dominant (166 317 0) ne s'est montré plus agressif. Le gain d'agressivité entre les deux pathotypes que j'ai mis en évidence semble donc ne pas correspondre à une adaptation à la résistance quantitative spécifique de la variété. Mes résultats suggèrent donc que cette adaptation non spécifique d'agressivité entraine une érosion du niveau de résistance des variétés du paysage. Cela montre donc que pour un même pathosystème, il peut se produire des phénomènes spécifiques d'adaptation de l'agressivité à la résistance quantitative (Azzimonti et al., 2013), mais également une adaptation générale, non spécifique, qui ne résulte pas d'une sélection par les résistances quantitatives.

### **III. AGRESSIVITE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE**

Lors des suivis nationaux des populations d'agents pathogènes, seule la virulence est prise en compte afin de déterminer le pathotype des souches échantillonnées. Cette surveillance de l'évolution des virulences dans les populations d'agents pathogènes est utile pour optimiser les stratégies de déploiement des résistances qualitatives dans le paysage. En effet, ce type de résistance est majoritairement utilisé par les sélectionneurs, car plus simple à mettre en place et généralement très efficace.

Néanmoins, la faible durabilité que peut présenter ce type de résistance vis-à-vis des agents pathogènes a motivé l'intérêt des sélectionneurs pour l'utilisation des résistances quantitatives, réputées plus durables, dans les variétés cultivées (Lindhout, 2002; Cowger & Brown, 2019). Les travaux de ma thèse ont mis en évidence le rôle significatif de l'agressivité dans l'évolution des populations de *P. triticina*, et donc la possible adaptation des populations d'agent pathogène aux résistances quantitatives pouvant entraîner leur érosion. Afin d'assurer une efficacité de la résistance partielle conférée par l'utilisation des QTL, il serait nécessaire de surveiller la prévalence et la taille des populations d'isolats plus agressifs. La comparaison de l'agressivité des deux pathotypes dominants de la population française de *P. triticina* sur la période 2012-2014 souligne l'importance de caractériser l'agressivité pour comprendre la dynamique de cette population : le pathotype 106 314 0, porteur d'une combinaison de virulences ne lui permettant pas d'attaquer certaines des variétés les plus cultivées, est plus fréquent que le pathotype 166 317 0, possédant lui-même une combinaison de virulences lui permettant d'attaquer la quasi-totalité des variétés cultivées. Toutefois, le pathotype 106 314 0 est apparu plus agressif que 166 317 0 sur un ensemble de variétés parmi les plus cultivées. Ces observations soulignent l'intérêt qu'il y aurait à combiner dans les variétés cultivées, à la fois des résistances qualitatives et quantitatives, afin de pouvoir protéger durablement certaines cultures. Le suivi de l'agressivité des populations naturelles de *P. triticina*, au même titre que le suivi annuel des virulences, se révélerait alors très utile pour introduire les QTLs les plus efficaces dans les variétés. L'identification des QTLs présents dans les variétés apparaît donc également essentielle. L'analyse des virulences des isolats de *P. triticina* repose sur l'utilisation d'une gamme de lignées isogéniques porteuses d'un seul gène de résistance majeur *Lr* identifié. Il serait donc intéressant de pouvoir également utiliser des lignées isogéniques porteuses d'un ou d'une combinaison de QTLs identifiés, comme cela a été développé chez le pois (Lavaud et al., 2015). L'agressivité des pathotypes majeurs de *P. triticina* identifiés dans le cadre du suivi national pourrait ensuite être mesurée sur une telle gamme différentielle de QTLs, à l'aide du protocole qui a été mis au point au cours de ma thèse. Ce type d'étude permettrait d'identifier les résistances les plus efficaces et durables, en fonction des contraintes qu'elles font peser sur la développement de l'agent pathogène.

## 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-3-0338>
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12029>

Azzimonti G, Papaix J, Lannou C, Goyeau H (2022) Contribution of the life-history traits of a plant pathogen to the development of field epidemics. *Plant Pathology*, **71**, 1344–1354. <https://doi.org/10.1111/ppa.13567>

Bos L, Parlevliet JE (1995) Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review of Phytopathology*, **33**, 69–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.000441>

Caffier V, Le Cam B, Al Rifaï 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.016>

Casadevall A, Pirofski L (1999) Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and Immunity*, **67**, 3703–3713. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3703-3713.1999>

Cowger C, Brown JKM (2019) Durability of quantitative resistance in crops: greater than we know? *Annual Review of Phytopathology*, **57**, 253–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100016>

Cowger C, Mundt CC (2002) Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* Isolates from Susceptible and Partially Resistant Wheat Cultivars. *Phytopathology*, **92**, 624–630. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.6.624>

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. <https://doi.org/10.1111/eva.12368>

Frézal L, Jacqua G, Neema C (2018) Adaptation of a fungal pathogen to host quantitative resistance. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01554>

Laloi G, Montarry J, Guibert M, Andrivon D, Michot D, Le May C (2016) Aggressiveness Changes in Populations of *Didymella pinodes* over Winter and Spring Pea Cropping Seasons. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**, 4330–4339. <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-16>

Lavaud C, Lesné A, Piriou C, Le Roy G, Boutet G, Moussart A, Poncet C, Delourme R, Baranger A, Pilet-Nayel M-L (2015) Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, **128**, 2273–2288. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2583-0>

- Lehman JS, Shaner G (2007) Heritability of Latent Period Estimated from Wild-Type and Selected Populations of *Puccinia triticina*. *Phytopathology*, **97**, 1022–1029. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-8-1022>
- Lindhout P (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 217–226. <https://doi.org/10.1023/A:1015686601404>
- Lovell DJ, Powers SJ, Welham SJ, Parker SR (2004) A perspective on the measurement of time in plant disease epidemiology. *Plant Pathology*, **53**, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01097.x>
- Macoris S a. G, Sugizaki MF, Peraçoli MTS, Bosco SMG, Hebelier-Barbosa F, Simões LB, Theodoro RC, Trinca LA, Bagagli E (2006) Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 331–334. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000300019>
- Malbrán I, Mourellos CA, Balatti PA, Lori GA (2018) Aggressiveness and genetic variability of *Fusarium graminearum* populations from the main wheat production area of Argentina. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.10.014>
- Martens JW (1985) 4 - Oat Stem Rust. In: *Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control* (eds Roelfs AP, Bushnell WR), pp. 103–129. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-148402-6.50012-2>
- Milus EA, Kristensen K, Hovmøller MS (2009) Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology*, **99**, 89–94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0089>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-7-0869>
- Priestley RH, Doling DA (1974) Aggressiveness of *Puccinia striiformis* isolates on wheat cultivars. *Transactions of the British Mycological Society*, **63**, 549-IN25. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(74\)80104-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(74)80104-X)
- Quillévéré-Hamard A, Le Roy G, Lesné A, Le May C, Pilet-Nayel M-L (2021) Aggressiveness of Diverse French *Aphanomyces euteiches* Isolates on Pea Near Isogenic Lines Differing in Resistance Quantitative Trait Loci. *Phytopathology*®, **111**, 695–702. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0147-R>
- Sacristán S, García-Arenal F (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 369–384.



<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x>

Shaner G, Stromberg EL, Lacy GH, Barker KR, Pirone TP (1992) Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, **30**, 47–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.000403>

Suffert F, Goyeau H, Sache I, Carpentier F, Gélisse S, Morais D, Delestre G (2018) Epidemiological trade-off between intra- and interannual scales in the evolution of aggressiveness in a local plant pathogen population. *Evolutionary Applications*, **11**, 768–780. <https://doi.org/10.1111/eva.12588>

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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12050>

Thomas SR, Elkinton JS (2004) Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.01.006>

Young GK, Cooke LR, Watson S, Kirk WW, Perez FM, Deahl KL (2018) The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, **67**, 1539–1551. <https://doi.org/10.1111/ppa.12856>

## PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

---

### Articles et preprints

#### PUBLIÉS

Fontyn C, Zippert A-C, Delestre G, Marcel TC, Suffert F, Goyeau H (2022a) Is virulence phenotype evolution driven exclusively by Lr gene deployment in French *Puccinia triticina* populations? *Plant Pathology*, **71**, 1511–1524. <https://doi.org/10.1111/ppa.13599>

Fontyn C, Meyer KJ, Boixel A-L, Delestre G, Piaget E, Picard C, Suffert F, Marcel TC, Goyeau H (2022b) Evolution within a given virulence phenotype (pathotype) is driven by changes in aggressiveness: a case study of French wheat leaf rust populations. bioRxiv, 2022.08.29.505401. <https://doi.org/10.1101/2022.08.29.505401>

#### EN PREPARATION

Fontyn C, Meyer KJ, Boixel A-L, Picard C, Destanque A, Suffert F, Marcel TC, Goyeau H (2022) Higher aggressiveness explains the domination of certain *Puccinia triticina* pathogenotypes in the cultivated landscape, despite advantages conferred to others by their virulences.

### Présentations orales

Fontyn C. Is aggressiveness a significant selective force for the adaptation of *Puccinia triticina* populations to the cultivated wheat landscape? Final meeting H2020 RustWatch project, Cambridge, Royaume-Uni. 30-31 août 2022

Fontyn C. Is aggressiveness a significant selective force for the adaptation of *Puccinia triticina* populations to the cultivated wheat landscape? 16<sup>th</sup> international Cereal Rust and Powdery Mildew, Cambridge, Royaume-Uni. 1-2 septembre 2022

Fontyn C. L'agressivité est-elle une composante significative de l'adaptation au paysage variétal cultivé des populations de *Puccinia triticina*, agent de la rouille brune du blé ? Phloème, Paris. 3-4 novembre 2022

**Title :** Is aggressiveness a significant component of the adaptation of *Puccinia triticina* populations to the cultivated wheat landscape?

**Keywords :** Aggressiveness, leaf rust, *Lr* genes, pathogenotype, quantitative phenotyping, virulence

**Abstract :** The ability of plant pathogens – especially fungi – to cause disease is generally divided into a qualitative term, ‘virulence’, defined as the capacity of the pathogen to infect its host (compatible interaction), and ‘aggressiveness’, defined as the quantitative variation of pathogenicity on a compatible host, which usually refers to the damages caused on this host. Surveys of pathogen populations of *Puccinia triticina*, the causal agent of leaf rust on wheat, were performed in France during the two latest decades. This epidemiological data set revealed that qualitative resistances (*Lr* genes) were strongly structuring for the pathogen populations. Concretely, few years after new *Lr* genes are introduced in the landscape, the corresponding virulences emerge. However, the *Lr* genes present in the wheat cultivars might not fully explain the changes observed in the dynamics of the pathogen population, characterized by the frequency of the different ‘pathotypes’ (virulence phenotypes). The objective of my thesis was to investigate whether, under the influence of the varietal landscape, the aggressiveness can have a role in the adaptation of the *P. triticina* population and, if applicable, to characterize its potential impact. Chapter 1 is an introduction literature review. Chapter 2 links the overall composition of the varietal landscape and the evolution of French pathogen populations over the decade 2006-2016. I showed that the *Lr* genes carried by the most frequently grown cultivars can not explain the prevalence of two pathotypes – 166 317 0 and 106 314 0 – that dominated despite the presence of other compatible pathotypes. In Chapter 3, by comparing in planta the aggressiveness traits (infection efficiency, latency period and sporulation capacity) of *P. triticina* isolates of each dominant pathotype, I highlighted the role of aggressiveness in the changes of the composition of the pathogen population at a large spatio-temporal scale. I showed, for a given pathotype, that the frequency dynamics of a ‘pathogenotype’ – defined as the unique combination of this pathotype and a SSR genotype – was driven by its aggressiveness level. In Chapter 4, using similar experimental methods, I showed that a higher aggressiveness could explain the prevalence of certain pathogenotypes in the cultivated landscape, despite advantages provided to others pathogenotypes by their virulence phenotype.

**Titre :** L'agressivité est-elle une composante significative de l'adaptation au paysage variétal cultivé des populations de *Puccinia triticina*, agent de la rouille brune du blé ?

**Mots-clés :** Agressivité, gènes *Lr*, pathogénotypes, phénotypage quantitatif, rouille brune, virulence

**Résumé :** La capacité des agents phytopathogènes - notamment les champignons - à provoquer des maladies est généralement décomposée en un terme qualitatif, la 'virulence', définie comme la capacité à infecter la plante hôte (interaction compatible), et 'l'agressivité', définie comme étant la variation quantitative du pouvoir pathogène sur un hôte compatible, reflétant généralement les dommages infligés à cet hôte. Des suivis populationnels de *Puccinia triticina*, champignon responsable de la rouille brune du blé, ont été réalisés en France durant les deux dernières décennies. Ces données épidémiologiques ont révélé que les résistances qualitatives (gènes *Lr*) étaient fortement structurantes pour les populations d'agents pathogènes. Concrètement, l'introduction de nouveaux gènes *Lr* dans le paysage variétal précède de seulement quelques années l'émergence des virulence correspondantes. Cependant, les gènes *Lr* présents dans les variétés de blé n'expliquent pas entièrement les changements observés dans la dynamique de la population pathogène, caractérisée par la fréquence des 'pathotypes' (phénotypes de virulences). L'objectif de ma thèse était d'étudier si, sous l'influence du paysage variétal, l'agressivité peut jouer un rôle dans l'adaptation des populations de *P. triticina* et, le cas échéant, de caractériser son impact. Après le Chapitre 1 bibliographique introductif, le chapitre 2 fait le lien entre la composition globale du paysage cultivé et l'évolution des populations pathogènes au cours de la décennie 2006-2016. J'ai mis en évidence que les gènes *Lr* présents dans les variétés françaises les plus cultivées ne peuvent à eux seuls expliquer la prévalence de deux pathotypes - 166 317 0 et 106 314 0 - ayant dominé malgré la présence d'autres pathotypes compatibles. Dans le chapitre 3, en comparant in planta les traits d'agressivité (efficacité d'infection, période de latence et capacité de sporulation) d'isolats de *P. triticina* appartenant à chaque pathotype dominant, j'ai mis en évidence le rôle de l'agressivité dans les changements de la composition de la population pathogène à une échelle spatio-temporelle large. J'ai notamment montré, pour un même pathotype, que la dynamique de fréquence de 'pathogénotype' - défini comme la combinaison unique de ce même pathotype et d'un génotype SSR - est influencée par son niveau d'agressivité. Dans le chapitre 4, en appliquant les mêmes méthodes expérimentales, j'ai montré qu'une agressivité plus élevée pouvait expliquer la prévalence de certains pathogénotypes dans le paysage variétal, malgré les avantages conférés à d'autres pathogénotypes par leur profil de virulences.