

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	IX
REMERCIEMENTS	XI
AVANT-PROPOS	XIII
INTRODUCTION	1
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	3
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
LA POURRITURE PHYTOPHTHOREENNE ET SA REPRESSION	7
COMPOSANTES.....	7
L'HÔTE : LE SOYA	7
LE PARASITE : PHYTOPHTHORA SOJAE	7
FONCTIONNEMENT DU PATHOSYSTEME: DEVELOPPEMENT DE LA MALADIE	8
CYCLE INFECTIEUX.....	8
MANIFESTATION DE LA MALADIE AU CHAMP	10
METHODES DE LUTTE UTILISEES ET A L'ETUDE	10
LA RESISTANCE CHEZ LE SOYA ET SON EXPLOITATION: LA LUTTE GENETIQUE.....	12
PRINCIPES DE LA RESISTANCE CHEZ LE SOYA.....	12
TESTS DE PHYTOPATHOGENICITE, IDENTIFICATION DES RESISTANCES ET LIMITES.....	14
EVALUATION DE LA RESISTANCE TOTALE	14
EVALUATION DE LA RESISTANCE PARTIELLE	19
NOUVELLE APPROCHE	22
CHAPITRE 2 : MANUSCRIT	23
EVALUATION OF SOYBEAN CULTIVARS RESISTANCE AGAINST DIFFERENT RACES OF <i>PHYTOPHTHORA SOJAE</i> IN A HYDROPONIC SYSTEM.....	25
RÉSUMÉ	25
ABSTRACT.....	27
INTRODUCTION	28
MATERIALS AND METHODS.....	31
PLANT MATERIAL.....	31
CULTURE OF <i>P. SOJAE</i> AND ZOOSPORE PRODUCTION.....	32
EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS	32
RESULTS	33
DISCRIMINATING POTENTIAL OF THE BIOASSAY	33
QUANTITATIVE MEASURES TO PHENOTYPE RESISTANCE	35
CLASSIFICATION OF CULTIVARS.....	39
DISCUSSION.....	41
ACKNOWLEDGEMENTS	43
REFERENCES	44
CHAPITRE 3 : CONCLUSIONS GENERALES	47

CONCLUSIONS GENERALES	49
REFERENCES.....	55
ANNEXES	61
ANNEXE 1: MORTALITE ET MASSE SECHE OBTENUES AVEC LES RACES 1 ET 9 DE <i>PHYTOPHTHORA SOJAE</i> POUR LES CULTIVARS DE REFERENCES DE SOYA	63
ANNEXE 2 : MORTALITE ET MASSE SECHE OBTENUES AVEC LES RACES 1 ET 9 DE <i>PHYTOPHTHORA SOJAE</i> POUR 15 CULTIVARS DE SOYA	64
ANNEXE 3 : CLASSIFICATION DES CULTIVARS.....	65

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1. Virulence des races de <i>Phytophthora sojae</i> réalisée avec un différentiel de huit cultivars de soya possédant chacun un unique gène <i>Rps</i> (d'après Sugimoto, 2012)	17
Tableau 2 : Principaux tests conçus pour détecter la résistance race-spécifique de cultivars de soya à <i>Phytophthora sojae</i>	18
Tableau 3 : Principaux tests conçus à des fins de dépistage de la résistance partielle chez le soya à <i>Phytophthora sojae</i>	20

CHAPITRE 2

Table 1: Cases of mortality among eight plants from 12 soybean cultivars with known resistance inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25.	37
Table 2: Cases of mortality among eight plants from five soybean cultivars inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25.	37
Table 3 : Comparison of the phenotypic response obtained in a hydroponic bioassay for 12 soybean cultivars inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25 with that of the phenotypic response expected as per their respective genotype.	40

ANNEXES

Tableau 1 : Événements de mortalité recensés chez quatre plantes des cultivars de référence Williams et Haro15 inoculées avec les races 1 ou 9 de <i>Phytophthora sojae</i>	65
Tableau 2 : Événements de mortalité recensés chez six plantes de 15 cultivars initiaux de soya inoculées avec les races 1 ou 9 de <i>Phytophthora sojae</i>	64
Tableau 3 : Comparaison des réponses phénotypiques attendues avec les réponses phénotypiques obtenues pour dix des 12 cultivars de soya dont le génotype est connu avec les races 1 et 9 de <i>Phytophthora sojae</i>	65
Tableau 4 : Réponses phénotypiques obtenues pour les cinq cultivars de soya de génotype inconnu inoculés avec les races 1 ou 9 de <i>Phytophthora sojae</i>	66

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1 : Cycle infectieux de <i>Phytophthora sojae</i>	9
---	---

CHAPITRE 2

Figure 1: Phenotypic responses of reference soybean cultivars Williams and Haro15 inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25 in hydroponic systems.	34
Figure 2: Average dry weight of plants from two reference soybean cultivars inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25.	35
Figure 3: Phenotypic responses of two soybean cultivars inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4,7 or 25 in hydroponic systems.	36
Figure 4: Average dry weight of plants from 12 soybean cultivars inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25.	37
Figure 5: Average dry weight of plants from five soybean cultivars inoculated with <i>Phytophthora sojae</i> races 4, 7 or 25.	39

ANNEXES

Figure 1: Histogramme des masses sèches moyennes (en grammes) des cultivars de référence Williams et Haro15 inoculés avec les races 1 ou 9 de <i>Phytophthora sojae</i>.	63
Figure 2: Histogramme des masses sèches moyennes (en grammes) pour 15 des 17 cultivars de soya inoculés avec les races 1 ou 9 de <i>Phytophthora sojae</i>.	64

REMERCIEMENTS

En premier lieu, mes remerciements vont à mon directeur, M. Richard Bélanger. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, guidée et encouragée dans cette reprise d'études. Je lui suis aussi reconnaissante d'avoir agrémente cette enrichissante expérience en m'offrant l'opportunité d'intervenir comme auxiliaire de recherche dans les laboratoires de phytopathologie de premier cycle aux côtés de M. Daniel Dostaler, que je salue.

Je remercie M. François Belzile pour ses conseils et son éclairage complémentaire à celui de M. Richard Bélanger lors nos discussions sur le projet.

Caroline, merci pour ton aide, ton soutien dans les moments de doute et pour ta patience à répondre au milliard de questions que je n'ai cessé de te poser !

Un clin d'œil très spécial à ma collègue de maîtrise, Julie Anne, confidente et colocataire de bureau. Merci pour ta gentillesse, ta générosité, ton accueil chaleureux et j'en passe car la liste pourrait être longue...qui ont rendu cette expérience vraiment agréable.

Dans le même temps, je remercie aussi l'équipe du labo : Rupesh, Julien, François, Bastien, Samuel, Huma, Gowsica, Aliyeh... Je n'oublie pas les stagiaires dont l'aide a été bien précieuse, particulièrement Stéphanie durant l'été 2014. Marc-Olivier et Sarah qui ont fait leurs débuts sur la récolte de ma dernière expérience au printemps 2015 !

Je tiens à remercier les partenaires de ce projet, l'organisme CRSNG pour les soutiens financiers, la société Semences Prograin Inc. avec laquelle j'ai collaboré, particulièrement Mme Christiane Ménard et M. Eric Gagnon ainsi que le laboratoire de M. Allan Xue et notamment Geneviève Marchand pour avoir fourni et caractérisé les races nécessaires à cette étude.

Une pensée très particulière adressée à ma famille au sens large, à mes parents plus spécialement pour leur soutien indéfectible. A Maël et Elina pour votre proximité malgré la

distance, pour toutes les marques de soutien, d'encouragement et d'amour fraternel dont vous n'avez cessé de faire preuve toutes ces années et encore plus ces deux dernières !

Une dédicace spéciale aux Rémus-Borel, Wilfried et Julie, vous m'avez fait partager avec tellement d'enthousiasme votre propre expérience Outre-Atlantique qu'il n'a pas fallu bien longtemps pour être piquée par la curiosité. Sans vous je n'aurais vraisemblablement jamais eu cette idée saugrenue d'aller reprendre mes études au pays des Caribous !

Enfin je ne pouvais conclure sans citer ma coloc' Lisa sans qui cette expérience n'aurait pu être ce qu'elle a été. Merci à toi !

Plus généralement, merci à tous d'avoir rendu cette expérience aussi riche scientifiquement et humainement parlant.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comprend une revue de littérature qui fait un tour d'horizon des connaissances acquises sur le pathosystème soya/*Phytophthora sojae* et les méthodes actuellement disponibles ou à l'étude pour lutter contre cette maladie. Dans ce cadre, l'accent est porté sur la résistance totale, ou résistance médiée par les gènes *Rps*, qui est jusqu'à présent le principal levier d'action dans la lutte génétique. Une revue critique des différents tests de pathogénicité permettant d'identifier les différentes formes de résistance des cultivars aux races de *P. sojae* met en lumière les points forts et les faiblesses de ces méthodes.

Le second chapitre de ce mémoire aborde l'optimisation du test d'inoculation de zoospores en système hydroponique à des fins de caractérisation de la résistance à différentes races de *P. sojae*. Ce chapitre qui reprend les résultats de mes travaux de maîtrise a été rédigé sous la forme d'un manuscrit en vue d'une soumission pour publication dans une revue scientifique.

Enfin le troisième et dernier chapitre de ce mémoire conclut avec les questions soulevées par ces travaux et les perspectives d'utilisation de ce nouveau bioessai.

Ce projet est réalisé en partenariat avec la compagnie Semences Prograin Inc., société privée spécialisée dans le développement, le conditionnement, la transformation et la commercialisation de cultivars de soya. Semences Prograin Inc. a fourni une partie du matériel génétique végétal ayant servi aux études.

INTRODUCTION

Le soya cultivé est le nom vernaculaire de *Glycine max* (L.) Merr., une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des fabacées. Cette dernière, cultivée depuis des millénaires en Asie pour sa graine et ses propriétés oléo (20 %) protéagineuses (40 %) a été introduite sur le continent nord-américain au XIX^e siècle. Il faut ensuite attendre les années 1970 et le développement de variétés très hâtives pour qu'il y ait une véritable expansion des zones de production à l'échelle du Canada. Avec un peu plus de 5 millions de tonnes produites annuellement, le soya se place au 3^e rang des cultures produites au Canada en 2013 derrière le blé et le canola (FAOSTAT 2015/ Statistics Canada).

En 2013, la production mondiale annuelle de soya atteignait 280 millions de tonnes (FAOSTAT 2015) dont les trois quarts étaient utilisés à des fins d'alimentation animale sous forme de tourteau. Les 25% restant étaient destinés à l'alimentation humaine (farine, huile, tofu, sauces et plats préparés) et à l'industrie pour la composition d'encres, de fibres textiles, de paraffine, d'adhésifs et plus récemment dans celle de biocarburants (Dorff, 2007).

Du fait de la polyvalence de son utilisation et donc à l'essor du marché du soya, on assiste depuis quelques décennies à une véritable intensification et uniformisation de sa culture. Les phytogénéticiens travaillent à produire des variétés aux qualités agronomiques toujours plus performantes et spécialisées selon l'usage auquel elles sont destinées. Malgré ces efforts constants de recherche et d'amélioration de la productivité, les producteurs doivent chaque année faire face à des pertes de récoltes chiffrées en milliards de dollars (Tyler, 2007). Ces pertes sont principalement imputables à deux types de facteurs. Le soya est une culture de saison chaude donc relativement intolérante au froid ; aussi des composantes abiotiques telles que les basses températures et le gel fréquemment rencontrés notamment au Canada compromettent grandement le bon développement des plants. Du fait de ces contraintes saisonnières, un intérêt particulier est porté au développement de variétés hâtives (Dorff, 2007). Toutefois ce sont les ravageurs, mauvaises herbes ainsi que les maladies virales, bactériennes, fongiques et à nématodes, regroupés sous le terme de stress biotique qui sont la principale source incriminée dans la baisse de rendement et de santé d'une culture établie.

Selon un rapport d'Agriculture Canada publié en 2006, parmi les principales maladies établies au Canada on retrouve le rhizoctone commun, la pourriture à sclérotés, le syndrome de la mort subite et le nématode à kystes du soya, sans oublier la mosaïque du soya. Identifiée comme « maladie fongique » bien qu'elle ne soit pas causée par un champignon à proprement parler, la pourriture phytophthoréenne est une des maladies les plus destructrices à l'échelle du globe et demeure un problème constant spécialement dans les aires de production d'Amérique du Nord (Wrather et Koenning, 2009).

Les producteurs et phytopathologistes se retrouvent donc face à un véritable défi qui consiste à contrer la progression de cette pourriture. Pour pouvoir la combattre efficacement, il est nécessaire dans un premier temps d'en connaître clairement la cause, l'agent(s) responsable(s), le cycle et les conditions environnementales favorables à son développement ainsi que les symptômes occasionnés. De fait, l'ensemble de ces informations sont connues et disponibles depuis la fin des années 50, période durant laquelle on a identifié de façon formelle l'oomycète *Phytophthora sojae* M. J. Kaufmann & J. W. Gerdemann comme agent responsable de la pourriture phytophthoréenne. Dans un second temps, il s'agit de passer à la phase offensive en proposant différentes méthodes de lutte. Le « tout chimique » très utilisé dans un premier temps est depuis de plus en plus délaissé au profit d'autres solutions (Zhang et Xue, 2010). La découverte de marqueurs de résistance aux maladies a permis l'essor d'une lutte d'un tout autre genre dite « lutte génétique ». Dans le cas du soya, les acteurs majeurs de la résistance ont été identifiés comme étant les gènes de résistance *Rps* (Resistance to *Phytophthora sojae*), responsables de la résistance totale. Elle confère une immunité face à certaines races alors que la résistance partielle est quant à elle une forme incomplète de résistance qui résulte en une colonisation réduite par l'agent pathogène compromettant moins la stabilité des rendements.

Depuis leur découverte, les gènes *Rps* sont régulièrement introgressés dans de nouveaux cultivars afin de développer des variétés commerciales résistantes à *P. sojae*. Mais c'est sans compter sur ce dernier qui, selon les principes de la coévolution plante-agent pathogène, réussit à s'adapter et contourner le gène de résistance dernièrement introduit (Ferro et al., 2006). C'est donc une véritable « course à l'armement » qui est engagée entre les sélectionneurs qui cherchent à prendre de court l'oomycète et ce dernier qui parvient à terme,

à contourner les armes de résistance génétique. L'introduction d'un nouveau gène de résistance exerce en effet une forte pression, sélectionnant au fil du temps les races résistantes. Il en résulte l'aggravation d'épidémies au champ.

Ainsi l'objectif des sélectionneurs est de disposer d'un moyen rapide, efficace et fiable d'identifier les niveaux de résistance présents dans un cultivar afin de pouvoir orienter leur prise de décision quant au choix d'un cultivar par rapport à une région géographique donnée, c'est-à-dire dépendamment de la population, de la race de l'agent pathogène présente localement.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

C'est dans le contexte de l'optimisation de la lutte génétique que ce projet vise à évaluer la résistance de différents cultivars de soya face à plusieurs races de *P. sojae*. En se basant sur des travaux précédemment réalisés au sein de notre laboratoire, et en optimisant la méthode pré-existante d'inoculation par zoospores en culture hydroponique, nous émettons l'hypothèse qu'il sera possible de déterminer le niveau de résistance/susceptibilité de cultivars de soya en fonction des différentes races de *P. sojae* auxquelles ils seront confrontés. Pour ce faire, les objectifs sont les suivants : 1) améliorer la technique de production de zoospores afin de synchroniser leur disponibilité avec le stade phénologique précis du développement du soya ; 2) établir le pouvoir discriminant du test mis en place par l'utilisation de cultivars de référence au niveau de résistance défini pour les races utilisées ; 3) développer une mesure quantitative permettant d'établir la résistance complète ou partielle d'un cultivar à une race donnée afin de pouvoir dresser à terme, un profil le plus complet possible de chaque cultivar.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTERATURE

LA POURRITURE PHYTOPHTHORÉENNE ET SA RÉPRESSION

Composantes

L'hôte : Le soya

Le soya cultivé ou *Glycine max* L. (Merr.) tire son origine de la domestication du type sauvage *Glycine soja* dont les traces les plus anciennes sont recensées il y a plusieurs millénaires en Asie du sud-est. Cette plante herbacée annuelle appartient à la famille des Fabacées et est connue pour son association symbiotique avec des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique au niveau des nodosités.

Le soya est une culture qui a des besoins en eau limités mais qui requiert des températures chaudes pour sa croissance. Sous nos conditions, les semis s'effectuent généralement au cours du mois de mai et la récolte a lieu en septembre.

Le parasite : *Phytophthora sojae*

Observé pour la première fois en Indiana en 1948 (Schmitthenner, 1985), la présence de *Phytophthora sojae* M. J. Kaufmann & J. W. Gerdemann a depuis été recensée à l'échelle du globe dans la plupart des régions productrices de soya : Canada (Buzzell et al., 1977), Australie (Drenth et al., 1996), Argentine (Barreto et al., 1995), Brésil (Costamilan et al., 2012), Chine (Kyle et al., 1998), Japon (Sugimoto et al., 2012), Europe (Kövics, 1981).

D'abord identifié comme *P. sojae* en 1958 par Kaufmann & Gerdemann, plusieurs profils de classification se sont ensuite succédés, associés ou non à des changements de nomenclature qui ont généré quelques confusions (Hansen et Maxwell, 1991). Toutefois, le nom et la description faite initialement par Kaufmann et Gerdemann en 1958 demeurent le moyen le plus approprié de reconnaître le statut de cette espèce (Erwin, 1983).

Bien qu'il soit couramment assimilé à un champignon de par ses stratégies de nutrition, d'un point de vue phylogénique, *P. sojae* est un oomycète. La paroi cellulaire de ce pseudo-champignon diffère de celle des Eumycètes en ce sens qu'elle est constituée de cellulose et

non de chitine, principale composante de la paroi des champignons et cible privilégiée des fongicides (Tyler, 2007).

Les espèces de *Phytophthora* sont classées dans l'ordre des Pythiales au même titre que celles appartenant au genre *Pythium*. Leur proche parenté, leur ressemblance morphologique et la similarité des symptômes qu'elles causent, en particulier la fonte de semis, sont une source de confusion fréquente entre ces deux oomycètes phytopathogènes. Les espèces de *Pythium*, principalement nécrotrophes, s'attaquent aux structures vulnérables et comportent une large gamme d'hôtes. Pour leur part les espèces de *Phytophthora* sont généralement hémibiotrophes. L'infection est initiée de façon biotrophe, phase asymptomatique et relativement courte puisqu'elle ne dure que quelques heures dans le cas de *P. sojae* avant sa transition vers un état nécrotrophe accompagné de l'apparition de symptômes au niveau des tissus de l'hôte (Jiang et Tyler, 2012).

Fonctionnement du pathosystème: développement de la maladie

Cycle infectieux

Phytophthora sojae est un agent pathogène tellurique dont la forme de conservation à long terme est l'oospore (Figure 1). Cette cellule ronde à paroi épaisse que l'on retrouve dans les sols et les débris végétaux sert d'inoculum primaire l'année suivante sa production pour initier la maladie. Lorsque les conditions deviennent plus favorables au développement de l'agent pathogène c'est-à-dire que la température du sol augmente (15-20°C) et qu'il y a présence d'une eau stagnante résiduelle, la dormance est levée et l'oospore germe. Des sporanges sont produits et libèrent une dizaine de spores, biflagellées et nageuses, les zoospores. Ce sont les propagules les plus infectieuses dans le sol. Une fois libérées, elles sont attirées par les exsudats racinaires, en particulier des isoflavones qui favorisent l'enkystement à la surface des racines, la germination des cystes, l'émission et la croissance du tube germinatif puis la formation d'un appressorium à son extrémité (Morris et Ward, 1992). S'il y a compatibilité hôte-agent pathogène alors les hyphes se développent aussi bien en surface du cortex racinaire qu'au niveau inter- et intracellulaire, où ils établissent des structures spécialisées invaginées dans les cellules végétales, les haustoria, dont la fonction est de puiser les nutriments nécessaires au développement de l'oomycète.

Considéré comme biotrophe dans les premières phases de l'infection du fait de son mode de nutrition sur des tissus vivants, *P. sojae* est en réalité un hémibiotrophe car il finit par tuer les cellules et vit ensuite aux dépens des tissus morts de son hôte (Qutob et al., 2002).

Le cycle de reproduction asexuée est le plus répandu et il est surtout privilégié par l'oomycète car moins coûteux en énergie. La production de zoospores secondaires permet d'entretenir le processus d'infection. La boucle du cycle s'achève lorsque l'environnement devient impropre à la croissance du thalle de l'oomycète : appauvrissement des ressources nutritives, ou dégradation des conditions thermiques et hydriques qui contraignent l'agent pathogène à différencier des structures reproductives femelle, l'oogone, et mâle, l'anthéridie, dont la fusion conduit à la formation de l'oospore qui permet le maintien sous forme latente de l'espèce (Tyler, 2007 ; Schmitthenner, 2000).

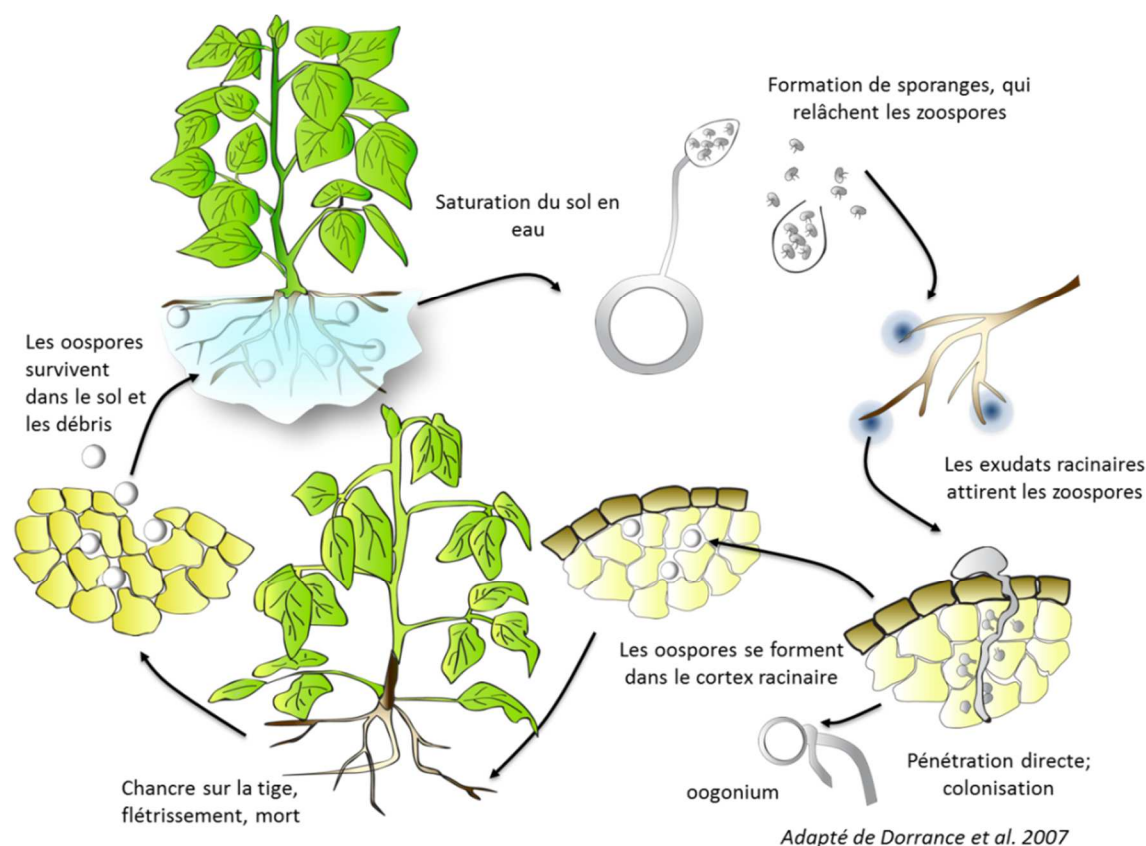


Figure 1 : Cycle infectieux de *Phytophthora sojae*

Manifestation de la maladie au champ

Phytophthora sojae a la particularité de s'attaquer à n'importe quel stade de développement du plant de soya. L'infection se produit principalement dans les sols lourds et saturés en eau et se traduit par un certain nombre de symptômes visibles sur la partie aérienne mais aussi présents sous la surface du sol, au niveau racinaire. Ceux-ci diffèrent selon le stade phénologique du plant de soya et de ses caractéristiques de résistance/susceptibilité à la race de *P. sojae* rencontrée.

Le stade graine, s'il est atteint, peut faire apparaître des symptômes de fonte des semis pré- et post-levée. Les plants parvenus au stade plantule et confrontés à la maladie présentent quant à eux des symptômes de chlorose, dépérissement, de tissus gorgés d'eau pouvant aller jusqu'à la mort du plant. Les cultivars dotés d'une meilleure résistance ne seront atteints à ce stade que d'un léger ralentissement de croissance. Sur des plants adultes, on peut observer des symptômes de chlorose, de flétrissement, de destruction des racines latérales, de décoloration des tissus, des chancres allant jusqu'à des lésions circulaires au niveau de la tige, symptômes plus ou moins prononcés selon le degré de résistance pouvant aller jusqu'à la mort chez les plus susceptibles (Schmitthenner, 2000).

Méthodes de lutte utilisées et à l'étude

Afin de pallier au développement et à l'expansion de la maladie au champ, différentes méthodes prophylactiques sont disponibles ou sont encore à l'étude.

La modification des pratiques culturales est un premier levier d'action mis en place. L'intervention se fait par le drainage et le travail du sol afin de limiter la compaction et la saturation des sols en eau, principal facteur conditionnant l'intensité de la maladie (Schmitthenner, 1985). Par ailleurs, *P. sojae* possède une gamme d'hôtes relativement étroite ; en somme le soya est son seul hôte d'importance économique. C'est pourquoi, une rotation avec une culture non-hôte, même si elle n'abolit pas totalement la maladie, est néanmoins un moyen de prévenir l'augmentation de population de l'agent pathogène (Zhang et Xue, 2010). Pour avoir un réel impact sur l'incidence de la maladie, une rotation dite prolongée est requise car les oospores, propagules de résistance de l'oomycète, peuvent subsister plusieurs années dans le sol (Schmitthenner, 1985).

La lutte chimique est apparue rapidement comme une seconde option dans la lutte contre la pourriture phytophthoréenne. Une des matières actives les plus largement utilisées dans cette optique est le métalaxyl. Cette molécule appartient à la famille chimique des phénylamides et agit de manière systémique en inhibant la synthèse d'ARN. Elle est principalement utilisée dans le traitement des semences ou soit sous forme de granules soit en pulvérisation dans les sillons (Zhang et Xue, 2010). Le problème de rentabilité lié au changement des pratiques culturales notamment la réduction de la largeur des rangs rendant l'application trop coûteuse (Dorrance 2013) s'ajoutant à une récente prise de conscience de l'impact des produits chimiques sur la santé et l'environnement ont encouragé la recherche d'autres stratégies de lutte (Sugimoto et al., 2012).

Ainsi, plusieurs articles relatent des recherches portant sur des bactéries, des champignons hyperparasites ou antagonistes de l'oomycète en question. On peut ainsi citer les travaux de Hsu et Lockwood (1984) sur un pseudo-champignon *Hyphochytrium catenoides*, de Filonow et Lockwood en 1985 sur les actinomycètes en enrobage de semences ou en application liquide dans le sol. Osburn et al. (1995) ont quant à eux exploré les propriétés de *Bacillus cereus* souche UW85 initialement identifiée pour sa capacité à réduire la fonte des semis sur la luzerne. Enfin en 2002, Xiao et al. ont testé les propriétés inhibitrices de plusieurs molécules antibiotiques produites par *Streptomyces*.

Le développement de nouveaux axes de recherche en remplacement de la chimie dans la lutte contre les maladies se traduit aussi par l'essor des études portant sur les propriétés de certains éléments inorganiques. Sugimoto et al. (2005) ont d'abord testé l'effet du calcium sous forme de CaCl_2 ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; ces travaux ont montré une réduction importante de l'impact de la maladie selon le cultivar et la concentration utilisés. Ils ont ensuite évalué la portée de différentes teneurs ou doses de potassium sous forme KNO_3 sur la croissance du mycélium et dans l'amélioration de la résistance des plantes (Sugimoto et al., 2009). Plus récemment, Guérin et al. (2014) ont mis en lumière les propriétés prophylactiques du silicium dans la lutte contre *P. sojae*.

LA RÉSISTANCE CHEZ LE SOYA ET SON EXPLOITATION: LA LUTTE GÉNÉTIQUE

Principes de la résistance chez le soya

Encouragée par l'avènement des outils de biologie moléculaire, la stratégie de lutte qui est à l'heure actuelle la plus utilisée est la lutte génétique. Cette approche vise à exploiter les propriétés de résistance inhérentes à la plante et se base donc principalement sur le déploiement de cultivars possédant des gènes de résistance spécifique (*Rps*).

Deux types de résistance ont été définis chez les plantes par Vanderplank en 1963. Dans un premier temps, ce dernier a défini la résistance horizontale, également rencontrée dans la littérature sous les termes de résistance partielle, tolérance, « field resistance » ou « rate-reducing resistance » comme étant héritée et s'exprimant quantitativement. Dans un souci de clarté de l'exposé nous n'utiliserons ici que le terme de résistance partielle pour référer à ce type de résistance. Plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci), régions géniques conférant une résistance à l'ensemble des races de *P. sojae*, ont été identifiés mais le nombre exact de gènes impliqués et les modalités de leur action additive sont encore méconnus (Mideros et al., 2007).

De fait, cette résistance « partielle » confère une protection incomplète contre toutes les races de l'oomycète et tous les degrés de résistance peuvent être observés sur une échelle continue.

Pour sa part, la résistance verticale, résistance totale, complète ou « race-specific resistance », confère une protection dirigée uniquement contre certaines des races de l'agent pathogène. Afin de simplifier la lecture, nous n'y ferons référence qu'en termes de résistance totale. Il s'agit de l'absence de développement de l'agent pathogène au-delà des stades précoces de l'infection ce qui empêche définitivement sa propagation (Heitefuss 1997 cité par Mideros et al., 2007).

Cette résistance est monogénique c'est-à-dire gouvernée par un gène majeur dont le premier a été découvert en 1957 et nommé gène *Rps1* (Resistance to *Phytophthora sojae*). Depuis cette découverte, 10 gènes *Rps* distribués sur cinq chromosomes différents ont été identifiés : *Rps1* et ses cinq allèles (a, b, c, d, k), *Rps7* et *Rps9* sur le chromosome 3 (MLG N), *Rps2* sur le chromosome 16 (MLG J), et le gène *Rps3* et ses trois allèles a, b et c sur le chromosome

13 (MLG F). Le chromosome 18 (MLG G) compte jusqu'à présent les gènes *Rps4*, *Rps5* et *Rps6*, le chromosome 8 (MLG A2) le *Rps8* et le chromosome 17 (MLG D2) porte *Rps10*. Une dizaine d'allèles ou loci supplémentaires potentiels ont été recensés plus récemment : *RpsYu25* (*RpsYD25*), *RpsWaseshiroge*, *RpsYD29* et *RpsUN1*, potentiellement liés à *Rps1* sur le chromosome 3, *RpsYB30* sur le chromosome 19 (MLG L), *RpsZS18* sur le chromosome 2 (MLG D1b), *RpsSN10* sur le chromosome 13 (MLG F), *RpsUN2* sur le chromosome 16 (MLG J) et *RpsJS* sur le chromosome 18 (MLG G) (Tyler et Gijzen, 2013).

De façon générale, les gènes *Rps* (sauf *Rps2*) arrêtent le développement de *P. sojae* via une réaction d'hypersensibilité (HR). Ce type de réponse est régi par le concept de Flor reposant sur la relation gène pour gène c'est-à-dire qu'à un gène de résistance de l'hôte correspond un gène d'avirulence de l'agent pathogène. La reconnaissance du gène d'avirulence par le gène de résistance aboutit à une réaction incompatible et l'absence de développement de la maladie. Ainsi les gènes *Rps* semblent gouverner pour la majorité d'entre eux la production de protéines cytoplasmiques (récepteurs de type NLR) impliquées dans la reconnaissance des protéines effectrices Avr correspondantes de l'agent pathogène et l'initiation des réactions de défenses (Lin et al., 2014).

Ces gènes de résistance race spécifique, en particulier *Rps1a*, *1c*, *1k*, *3a*, *6* ont été largement utilisés dans les cultivars commerciaux de soya (Costamilan et al., 2012). *Rps1a* a été le premier à être introgressé mais son efficacité a décliné de façon draconienne au bout de huit ans. *Rps1k* est le plus répandu depuis les années 1980 car il semble être le plus stable et confère la résistance à un plus large spectre contre les différents pathotypes c'est-à-dire les différents phénotypes de virulence (Tableau 1) de *P. sojae* (Sugimoto et al., 2012). Globalement, la pérennité de l'efficacité des gènes *Rps* lorsqu'ils sont introgressés varie de 8 à 15 ans selon la population de l'agent pathogène et les conditions environnementales présentes localement (Schmitthenner, 1985).

La popularité de l'utilisation de cette méthode de lutte est liée à deux avantages dont Schmitthenner (1985) fait état : d'une part, une répression efficace de la maladie et d'autre part la facilité d'incorporation des gènes de résistance.

Hormis le temps requis pour réaliser les rétrocroisements et une légère perte de rendement lors de l'incorporation de la résistance, c'est surtout le cycle « boom and bust » qui demeure

la problématique majeure des semenciers. La distribution importante d'un cultivar possédant un gène de résistance introgressé à travers une zone géographique constitue le « boom ». Le « bust » est la sélection des mutants ou de recombinants capables de contourner le gène de résistance au sein de la population de l'agent pathogène (McDonald et Linde, 2002). Ce phénomène contribue à l'émergence de nouvelles populations et races de l'oomycète. Au début des années 2000, on dénombrait 55 races de *P. sojae*, également définies par leur profil de virulence (vis-à-vis des gènes *Rps*) et qu'on qualifie dans ce cas de pathotypes. Depuis lors, le nombre de nouveaux pathotypes recensés dépasserait la centaine. Leur adaptation à l'utilisation continue de cultivars possédant les gènes *Rps* résulte en une détérioration de l'efficacité de la résistance à *P. sojae* (Ferro et al., 2006).

Enfin il est à noter que pour le pathosystème soya/*P. sojae* comme pour quelques autres pathosystèmes, un autre type de résistance a été décrit. Il s'agit d'une forme incomplète de résistance. Elle est gouvernée par un gène majeur de résistance, *Rps2*, identifié dans les années 1970 par Kilen et al. (1974). Cette résistance s'exprime uniquement au niveau racinaire. Elle présente une réaction intermédiaire avec un test d'inoculation de l'hypocotyle alors qu'elle aboutit à une réaction hypersensible dans le cas d'une inoculation racinaire (Mideros et al., 2007).

Tests de phytopathogénicité, identification des résistances et limites

Dans "*Useful Methods for Studying Phytophthora in Laboratory*", Schmitthenner et Bhat (1994) font état des nombreux tests de pathogénicité existant pour identifier aussi bien la résistance totale que la résistance partielle. Nous allons passer en revue quelques-uns d'entre eux en insistant particulièrement sur les tests dits « tests de référence » utilisés de façon routinière dans le dépistage de la résistance totale et partielle du soya contre *P. sojae*.

Evaluation de la résistance totale

Dorrance et al. (2008) reprennent de façon détaillée les étapes d'un des premiers bioessais mis au point dans les années 60 et qui demeure, à l'heure actuelle, le test de référence utilisé pour l'identification de la résistance totale, il s'agit du test d'inoculation de l'hypocotyle.

Ces essais peuvent être réalisés en laboratoire ou en serre pour identifier le gène *Rps* présent dans un cultivar donné. La technique couramment utilisée en serre consiste à planter une dizaine de graines en pot par race testée. Après la levée des cotylédons, les plantules sont inoculées avec une bouillie mycélienne. L'oomycète, parasite facultatif cultivé sur milieu gélosé, est inséré dans une incision faite au niveau de l'hypocotyle. Les plants sont couverts pendant plusieurs heures pour conserver l'humidité et favoriser le développement de l'infection. Les observations sont réalisées après une semaine et consistent en un dénombrement des individus morts. L'échelle de notation est la suivante : moins de 25% de plants morts, le cultivar est considéré comme résistant à la race en question, de 26 à 75% d'individus morts, il a un statut d'intermédiaire et au-delà de 75% de plants morts, il est clairement susceptible.

Dans la littérature on trouve différentes variantes de ce test, tant par le nombre de graines semées (généralement de 8 à 10), par la nature de l'inoculum, que par les procédés de réalisation de l'incision ou les durées des différentes étapes. Le panel de races utilisées pour ce test doit permettre de couvrir l'ensemble des gènes *Rps* identifiables tels que dans le Tableau 1. Ainsi en fonction des réponses de susceptibilité /résistance d'un cultivar à chacune des races sélectionnées, on peut identifier le gène *Rps* présent chez le cultivar testé.

D'autres bioessais ont suivi la première version du test d'inoculation de l'hypocotyle établie dans les années 60, reprise par Dorrance et al. (2008) et décrite ci-dessus et proposent soit des variantes, soit des méthodes innovant tant sur le support, la nature de l'inoculum ou les organes végétaux ciblés. Ces méthodes partagent un procédé commun d'évaluation finale qui repose sur un décompte de la mortalité ou le recensement de symptômes de type nécroses ou lésions observées sur les tissus concernés. Le Tableau 2 recense un ensemble de ces techniques développées à des fins d'identification de la résistance totale. En aucun cas, il ne s'agit d'une liste exhaustive.

Le test d'inoculation de l'hypocotyle est utilisé comme test de référence car il présente les caractéristiques essentielles d'un test de phénotypage, en termes - de temps, - de coût et - de rapidité d'exécution. Il en est de même pour la reproductibilité et la fiabilité des résultats obtenus par le biais de cette approche. Cependant, même si elle demeure unanimement reconnue comme l'approche de référence dans la détection de la résistance totale à *P. sojae* pour toutes les raisons précitées, l'inoculation de l'hypocotyle présente certaines limites. Le caractère artificiel de la méthode qui repose sur un inoculum atypique, puisqu'il s'agit d'une culture de *P. sojae* sur milieu gélosé réduite en bouillie en est sûrement le premier critère. L'incision faite au niveau de l'hypocotyle constitue un autre point critique de cette approche ; en plus de porter atteinte à l'intégrité du plant et de créer une porte d'entrée favorable à d'éventuels agents pathogènes opportunistes, ce procédé d'inoculation contourne le site naturel d'infection. Wagner et Wilkinson (1992) rapportent que pour déterminer la résistance hôte, les parties aériennes telles que l'hypocotyle, les cotylédons ou les feuilles sont souvent les organes privilégiés pour l'inoculation malgré le fait que ce soit une maladie d'origine tellurique et ce, surtout par souci de commodité. Cependant la résistance à *P. sojae* dans les parties aériennes et racinaires n'est pas toujours corrélée.

Tableau 1. Virulence des races de *Phytophthora sojae* réalisée avec un différentiel de huit cultivars de soya chacun possédant un unique gène *Rps* (d'après Sugimoto et al., 2012)

Race	Pathotype	Gènes de résistance <i>Rps</i>								
		<i>rps</i>	<i>Rps1a</i>	<i>Rps1b</i>	<i>Rps1c</i>	<i>Rps1d</i>	<i>Rps1k</i>	<i>Rps3a</i>	<i>Rps6</i>	<i>Rps7</i>
1	7	S	R	R	R	R	R	R	R	S
2	1b, 7	S	R	S	R	R	R	R	R	S
3	1a, 7	S	S	R	R	R	R	R	R	S
4	1a, 1c, 7	S	S	R	S	R	R	R	R	S
5	1a, 1c, 6, 7	S	S	R	S	R	R	R	S	S
6	1a, 1d, 3a, 6, 7	S	S	R	R	S	R	S	S	S
7	1a, 3a, 6, 7	S	S	R	R	R	R	S	S	S
8	1a, 1d, 6, 7	S	S	R	R	S	R	R	S	S
9	1a, 6, 7	S	S	R	R	R	R	R	S	S
10	1b, 3a, 7	S	R	S	R	R	R	S	R	S
11	1b, 6, 7	S	R	S	R	R	R	R	S	S
12	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a	S	S	S	S	S	S	S	R	R
13	6,7	S	R	R	R	R	R	R	S	S
14	1c, 7	S	R	R	S	R	R	R	R	S
15	3a, 7	S	R	R	R	R	R	S	R	S
16	1b, 1c, 1k	S	R	S	S	R	S	R	R	R
17	1b, 1d, 3a, 6, 7	S	R	S	R	S	R	S	S	S
18	1c	S	R	R	S	R	R	R	R	R
19	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a	S	S	S	S	S	S	S	R	R
20	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 7	S	S	S	S	R	S	S	R	S
21	1a, 3a, 7	S	S	R	R	R	R	S	R	S
22	1a, 1c, 3a, 6, 7	S	S	R	S	R	R	S	S	S
23	1a, 1b, 6, 7	S	S	S	R	R	R	R	S	S
24	1b, 3a, 6, 7	S	R	S	R	R	R	S	S	S
25	1a, 1b, 1c, 1k, 7	S	S	S	S	R	S	R	R	S
26	1b, 1d, 3a, 6, 7	S	R	S	R	S	R	S	S	S
27	1b, 1c, 1k, 3a, 6, 7	S	R	S	S	R	S	S	S	S
28	1a, 1b, 1k, 7	S	S	S	R	R	S	R	R	S
29	1a, 1b, 1k, 6, 7	S	S	S	R	R	S	R	S	S
30	1a, 1b, 1k, 3a, 6, 7	S	S	S	R	R	S	S	S	S
31	1b, 1c, 1d, 1k, 6, 7	S	R	S	S	S	S	R	S	S
32	1b, 1k, 6, 7	S	R	S	R	R	S	R	S	S
33	1a, 1b, 1c, 1d, 1k	S	S	S	S	S	S	R	R	R
34	1a, 1k, 7	S	S	R	R	R	S	R	R	S
35	1a, 1b, 1c, 1d, 1k	S	S	S	S	S	S	R	R	R
36	3a, 6	S	R	R	R	R	R	S	S	R
37	1a, 1c, 3a, 6, 7	S	S	R	S	R	R	S	S	S
38	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a, 6, 7	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 6, 7	S	S	S	S	R	S	S	S	S
40	1a, 1c, 1d, 1k, 7	S	S	R	S	S	S	R	R	S
41	1a, 1b, 1d, 1k, 7	S	S	S	R	S	S	R	R	S
42	1a, 1d, 3a, 7	S	S	R	R	S	R	S	R	S
43	1a, 1c, 1d, 7	S	S	R	S	S	R	R	R	S
44	1a, 1d, 7	S	S	R	R	S	R	R	R	S
45	1a, 1b, 1c, 1k, 6, 7	S	S	S	S	R	S	R	S	S
46	1a, 1c, 3a, 7	S	S	R	S	R	R	S	R	S
47	1a, 1b, 1c, 7	S	S	S	S	R	R	R	R	S
48	7	S	R	R	R	R	R	R	R	S
49	1a, 1c, 6, 7	S	S	R	S	R	R	R	S	S
50	6, 7	S	R	R	R	R	R	R	S	S
51	1c, 6, 7	S	R	R	S	R	R	R	S	S
52	7	S	R	R	R	R	R	R	R	S
53	1a, 1b, 1c, 3a, 7	S	S	S	S	R	R	S	R	S
54	1d, 7	S	R	R	R	S	R	R	R	S
55	1d, 3a, 6, 7	S	R	R	R	S	R	S	S	S

Tableau 2 : Principaux tests conçus pour détecter la résistance totale de cultivars de soya à *Phytophthora sojae*

Auteur et année de publication	Technique	Echelle	Inoculation
Haas et Bussell (1976)	Inoculation de l'hypocotyle (modifiée de Kaufmann 1958)	Serre	Bouillie mycélienne injectée dans une blessure de l'hypocotyle
Kilen & Keeling (1977)	Système hydroponique	Serre	Bouillie mycélienne dans la solution nutritive
Eye et al. (1978a)	Inoculation de zoospores dans sol/ sur graines en germination	Laboratoire	Suspension zoospores
Ward et al. (1979)	En plateau sur plante étiolée	Chambre de croissance	Suspension de zoospores
Morrison & Thorne (1978)	Cotylédons détachés	Laboratoire	Bouillie mycélienne
Schwenk et al. (1979)	Version rapide de la méthode d'inoculation de l'hypocotyle	Serre ou chambre de croissance	Suspension de zoospores injectées dans une blessure de l'hypocotyle
Wagner & Wilkinson (1992)	Système aéroponique	Serre	Suspension de zoospores
Pazdernik et al. (1997)	Sur cotylédons	Serre	Disques de mycélium déposés sur les cotylédons

Par ailleurs Keeling (1982) et Ward et Buzzell (1983) rapportent que plusieurs paramètres comme la température, la lumière jouent un rôle crucial dans le type de réponse obtenue avec la méthode d'inoculation de l'hypocotyle.

Eye et al. (1978a) ont proposé d'inoculer une suspension de zoospores directement dans la vermiculite afin de s'affranchir de cette étape de blessure, mais cette alternative semble présenter un nombre fréquent de faux négatifs. Deux autres méthodes reproduisant le processus d'infection racinaire via des zoospores sont proposées d'une part par Kilen et Keeling (1977) dans un système en hydroponie et d'autre part par Wagner et Wilkinson (1992) par un système en aéroponie mais ces deux tentatives ne semblent pas avoir été reprises par la suite.

De façon générale on assiste à deux courants assez différents dans le développement des méthodes d'identification de la résistance. D'une part une volonté de faciliter la méthode par gain : - de temps proposé par Schwenk et al. (1979) avec injection de zoospores au niveau

de l'hypocotyle, - d'espace avec la méthode de Morrison et Thorne (1978) sur cotylédons détachés - de manipulation ou - d'uniformisation dans l'optique finale de pouvoir tester un nombre plus important de cultivars. D'autre part, une autre tendance vise plutôt à proposer des approches qui reproduiraient le plus fidèlement possible le processus d'infection naturelle afin que le phénotypage de la résistance à *P. sojae* fait à petite échelle en serre ou en chambre de croissance soit transférable lors des semis au champ et limite ainsi les situations « d'escapes » ou de faux positifs encore rencontrées avec la méthode de référence.

Evaluation de la résistance partielle

McBlain et al. (1991) ont recensé un certain nombre de méthodes publiées dans les années 1980 visant à évaluer différents génotypes de soya pour leur résistance partielle à la pourriture phytophthoréenne. Ils établissent que le criblage au champ de la résistance partielle à *P. sojae* est la méthode prédominante même si elle présente un certain nombre d'inconvénients : non uniformité de la densité de l'agent pathogène et de la fréquence des races, limite à une seule expérience par an, pour n'en citer que quelques-uns. Ces problèmes ont poussé les chercheurs à développer des méthodes d'évaluation en laboratoire et en serre. Ces tests sur plantules sont généralement bien corrélés avec les réactions à la pourriture phytophthoréenne et les performances de rendement dans des conditions au champ (Tooley et Grau, 1984 ; Walker et Schmitthenner, 1984)

Le Tableau 3 recense quelques-uns de ces tests proposés à des fins de dépistage de la résistance partielle.

Tableau 3 : Principaux tests conçus à des fins de dépistage de la résistance partielle chez le soya à *Phytophthora sojae*

Auteur et année de publication	Technique	Echelle	Inoculation
Jimenez & Lockwood (1980)	Test sur plantules en pot	Chambre de croissance ou serre	Inoculation d'une suspension de zoospores dans le terreau
Tooley & Grau (1982)	Sur cotylédons	Serre	Inoculation de zoospores enkystées dans une blessure
Buzzell & Anderson (1982)	« Yield Test »	Champ	Infection naturelle/ ajout de sol infecté
Olah & Schmitthenner (1985)	« Slant board test » Test en plateau	Chambre de croissance	Inoculation bouillie mycélienne dans une blessure sous l'hypocotyle
Walker & Schmitthenner (1984)	« Inoculum layer test »	Serre	Couche de mycélium placée sous les graines en germination
McBlain & al (1991)	« Field test »	Champ	Infection naturelle
Stewart & Robertson (2011)		Serre ou chambre de croissance	Grains de riz infectés placés sous les graines en germination

Certaines de ces méthodes font encore appel à un processus d'inoculation directe via une blessure au niveau d'un organe cible (hypocotyle, cotylédons) alors que d'autres s'en affranchissent en infectant le sol par le biais d'une suspension de zoospores ou d'une couche de gélose recouverte de mycélium. Par ailleurs, les variables mesurées diffèrent suivant les tests utilisés. Aussi les essais en champ s'appuient généralement sur des mesures de la vigueur/mortalité des plants et du rendement (poids des grains), alors que les tests en plateau se basent sur des longueurs de lésion. D'autres types de mesures sont rapportés de façon moins systématique comme le poids sec des plants (Jimenez et Lockwood, 1980), la longueur des entrenœuds (Olah et Schmitthenner, 1985) ou la hauteur des plants (McBlain et al., 1991).

L'« *inoculum layer test* » est l'essai le plus largement accepté et il est ainsi devenu une méthode standardisée pour évaluer la résistance partielle du soya à *P. sojae* en conditions de serre (Stewart et Robertson, 2011). Dans leur article de revue, Dorrance et al. (2008)

décrivent cette méthode actuellement utilisée en routine. Elle fait nécessairement suite à la réalisation d'un test d'inoculation de l'hypocotyle car le choix de la souche de *P. sojae* est primordial : tous les cultivars/génotypes de soya testés doivent être confrontés à une race de *P. sojae* compatible, donc pour laquelle il y a eu une réaction de susceptibilité. Dans le cas contraire, la présence d'un gène *Rps* compromet les résultats en masquant les réponses liées de résistance partielle. Pour ce faire une culture mycélienne de *P. sojae* sur milieu gélosé âgée de 14 jours est déposée 5 cm sous les graines dans des pots contenant de la vermiculite. Le diamètre de la culture doit correspondre parfaitement au diamètre du pot afin que toutes les racines formées soient en contact avec la source d'inoculum. Les observations sont réalisées trois semaines après semis selon une échelle de notation visuelle de 1 à 9 qui évalue l'étendue de la pourriture au niveau racinaire ainsi que la vigueur du plant en général.

L'*inoculum layer test* apparaît comme un test peu onéreux et relativement rapide (28 jours) pour évaluer la résistance partielle. L'avantage qu'il présente par rapport aux tests aux champs est qu'il permet l'utilisation de races connues dans un environnement contrôlé (McBlain et al., 1991). En revanche, cette méthode comporte une logistique un peu lourde et contraignante en termes de production d'inoculum puisqu'elle requiert de disposer d'une gélose pour chaque pathotype et pour chaque génotype à tester (Stewart et Robertson, 2011).

Le test en plateau est une solution plus rapide mais l'inoculation directe au niveau d'une blessure engendre les mêmes désavantages que ceux cités précédemment dans le criblage de la résistance totale.

De façon générale, McBlain et al. (1991) soulèvent le fait que les tests sur plantules ne criblent que pour une partie des mécanismes de résistance liés à l'âge de la plante.

Enfin Stewart et Robertson proposent en 2011 une nouvelle variante de l'*inoculum layer test* dans laquelle la gélose représentant la couche d'inoculum est remplacée par des grains de riz infectés. L'avantage conféré par cette méthode résiderait surtout dans la possibilité de pouvoir combiner plusieurs pathotypes ensemble et donc de s'affranchir du test d'inoculation de l'hypocotyle si le mélange de pathotypes couvre bien tous les gènes *Rps*.

Nouvelle approche

Une méthode d'inoculation indirecte (sans blessure) innovante a été mise au point au laboratoire en 2013. Elle a été développée afin d'évaluer l'effet prophylactique du silicium dans la lutte contre la pourriture phytophthoréenne du soya. Pour ce faire, des plants de soya sont cultivés en système hydroponique et inoculée avec une suspension de zoospores de *P. sojae*. Les résultats prometteurs obtenus concernant l'établissement homogène de l'infection par le biais de ce bioessai nous ont donc encouragés à optimiser cette approche à des fins de test de phytopathogénicité pour le phnéotypage de la (des) résistance(s) et fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 2 : MANUSCRIT

EVALUATION OF SOYBEAN CULTIVARS RESISTANCE AGAINST DIFFERENT RACES OF *PHYTOPHTHORA SOJAE* IN A HYDROPONIC SYSTEM

Résumé

La pourriture phytophthoréenne causée par *Phytophthora sojae* est une des maladies les plus dommageables pour la culture du soya et le meilleur moyen de réprimer la maladie réside dans l'introgression de gènes *Rps* dans des lignées et cultivars élites de soya. Le test d'inoculation de l'hypocotyle est la méthode couramment employée pour tester la résistance des cultivars à *Phytophthora sojae*. L'objectif de notre étude était de proposer une nouvelle façon d'évaluer le phénotype de résistance en se basant plutôt sur un processus naturel d'infection. Pour ce faire, 17 cultivars (12 portant des gènes *Rps* connus et cinq dont la résistance était indéterminée) ont été simultanément testés pour leur résistance à trois races de *P. sojae*, soit les races 4, 7 et 25, en culture hydroponique. Cette nouvelle méthode s'affranchit de l'étape de blessure pratiquée pour le test d'inoculation de l'hypocotyle, et utilise les zoospores comme source d'inoculum. Deux cultivars de référence, Williams (susceptible à l'ensemble des races) et Haro15 (portant le gène *Rps1k* qui confère la résistance aux races 4 et 7 et la susceptibilité à la race 25), ont été ajoutés pour établir le pouvoir discriminant du test. Leurs réponses ont permis de confirmer d'une part le succès de l'infection et d'autre part que les réponses obtenues étaient bien spécifiques à une race donnée. Par ailleurs, deux variables quantitatives, le taux de mortalité et le poids sec moyen de la partie aérienne, ont été utilisées pour classer les cultivars inconnus comme susceptibles ou résistants. Nos résultats ont démontré que le taux de mortalité permet une classification fiable pour l'ensemble des réponses des cultivars sauf un. Pour sa part, le poids sec donne une bonne prédiction pour les 36 interactions de résistance connue testées. En se basant sur ce dernier, les réponses phénotypiques obtenues ont confirmé celles attendues quand elles étaient connues et ont permis de donner une idée des gènes *Rps* présents dans les cultivars pour lesquels on ne disposait d'aucune information. Ainsi, cette méthode offre la possibilité

d'apporter une recommandation aux sélectionneurs quant au(x) cultivars à utiliser aux champs selon la (les) race(s) de *P. sojae* qui y sont présentes.

Abstract

Phytophthora root rot, caused by *Phytophthora sojae*, is one of the most damaging diseases of soybean and the introgression of *Rps* (Resistance to *P. sojae*) genes into elite soybean line and cultivars is arguably the best way to manage this disease. Currently, the hypocotyl inoculation test is the method routinely used to assess a cultivar's resistance to *P. sojae*. The aim of our study was to investigate a new way of phenotyping resistance that bypassed the injection of mycelium into a wound inherent to the hypocotyl inoculation test and rather relied on zoospores inoculated directly into a hydroponic system. To this end, 17 soybean cultivars, 12 with known *Rps* genes and five with unknown resistance, were simultaneously screened for their resistance to three races of *P. sojae* (4, 7 and 25). Two reference cultivars, Williams (susceptible to all three races) and Haro15 (carrying *Rps1k* and therefore resistant to races 4 and 7, but susceptible to 25), were added to establish the discriminating potential of the bioassay. Their reactions allowed confirming if an infection indeed took place and if they followed the expected pattern. Two quantitative measures, mortality rate and mean dry weight of aerial parts, were used to classify all tested cultivars of either known or unknown resistance into two classes: resistant and susceptible. Our results demonstrated that mortality rate accurately classified the cultivars' response in all but one instance. For its part, dry weight gave an accurate prediction in all 36 interactions tested of known resistance. Based on these responses corroborating the phenotypes of cultivars of known resistance, we were able to propose a prediction of the *Rps* genes present in cultivars of unknown resistance. This method offers a robust and reproducible assay to guide soybean breeders and growers in the selection of soybean lines resistant to specific races of *P. sojae*.

Introduction

Over the last decade, the demand for soybean has increased steadily, particularly in Canada, because of its diversity of use and application in animal and human food, as well as in different sectors of manufacturing. As a result of this intensified production, soybean crops have become the target of many diseases affecting yield. Among them, *Phytophthora* root rot (PRR) caused by the oomycete *Phytophthora sojae* M. J. Kaufmann & J. W. Gerdemann. is one of the most important and widespread pathogens leading to annual losses estimated at well over one billion dollars worldwide (Tyler, 2007). This pathogen is particularly devastating because it can attack plants at all stages of development causing pre- and post-emergence damping-off, leaf chlorosis or wilting, and root rot often leading to death of seedlings and mature plants (Schmitthenner, 2000).

Since the emergence and identification of *P. sojae* in the 1950s (Schmitthenner, 1985), many efforts have been undertaken to manage its presence. Initially, the proposed strategy was to modify cultural practices by tillage as to ensure proper drainage of fields to prevent flooding and saturated soil that the oomycete favors. The use of crop rotation with non-host plants was also suggested as a solution to reduce the presence of the pathogen (Workneh et al., 1998; Schmitthenner, 1985; Zhang et Xue, 2010). However, cultural practices only succeeded partially in controlling the disease.

Then, with the increasing popularity of fungicides and advent of new chemistry, metalaxyl became routinely used as seed or in-furrow treatment because of its great and specific efficacy against oomycetes (Guy et al., 1989). But some issues directly linked with its application as in-furrow treatment such as reducing space between rows (Dorrance, 2013) and concerns about health and environment (Sugimoto et al., 2012) led to abandon this strategy in favor of more economical and environmentally safe methods.

Throughout the years, a number of alternative methods to control PRR were tried or proposed including biological control with antagonistic bacteria, fungi or fungal-like pathogens (Osburn et al. 1995; Hsu and Lockwood, 1984; Xiao et al., 2002). The effects of several inorganic elements hindering the development of *P. sojae* such as CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 (Sugimoto et al. 2005 ; 2009) and more recently Si (Guérin et al., 2014) were also reported.

Notwithstanding the relative efficacy of all the previously mentioned methods, the most efficient and reliable way to prevent PRR is through genetic resistance. This approach has been greatly facilitated by the discovery of disease resistance markers. Two types of disease resistance in soybean have been identified: horizontal and vertical resistance (Sugimoto et al., 2012). Horizontal, or partial resistance is quantitatively inherited and governed by numerous genes named QTL (Quantitative Trait Loci). The exact number of genes involved and their interaction are not yet known (Mideros et al., 2007). Plants with partial resistance are less colonized or affected and can survive regardless of *P. sojae* races present in the field.

Vertical, or total resistance is associated to “immunity”. It leads to complete protection against specific races of *P. sojae* owing to the presence of single resistance genes called *Rps* genes (Resistance to *Phytophthora sojae*), which were first reported in 1957 (Bernard et al., 1957). As of now, ten such genes have been characterized (*Rps1* to *Rps10* and their different alleles), and some others of unknown specificity against pathotypes of *P. sojae* have recently been found and reported as *RpsYu25* (*RpsYD25*), *RpsWaseshiroge*, *RpsYD29*, *RpsUN1*, *RpsYB30*, *RpsZS18*, *RpsSN10*, *RpsUN2* and *RpsJS* (Tyler and Gijzen, 2013).

Currently, the use of *Rps* genes is the most commonly exploited method for the management of PRR through their introgression into elite soybean cultivars. Initially, a single *Rps* gene, *Rps1a*, was widely deployed in commercial cultivars leading to the release of genetically uniform crops in terms of resistance. This approach contributed to the emergence of new races of *P. sojae* that were able to adapt and overcome this *Rps* gene within 8-15 years. This process based on a « boom and bust cycle » is still ongoing, leading to an arms race between breeders/phytopathologists on the one hand, and *P. sojae* on the other hand (McDonald and Linde, 2002). In this context, breeders need an effective, fast and reliable way to identify resistance genes and the corresponding phenotypes in order to adapt their choice of resistant cultivars carrying the *Rps* genes associated to the specific races/pathotypes of *P. sojae* present in a given area of production.

Over the last few years, several phenotyping methods have been developed and proposed to characterize soybean cultivars for partial or total resistance against *P. sojae* races. Phenotyping for total resistance is mainly carried out in a growth chamber or a greenhouse with a test called the *hypocotyl inoculation test*. This method is well described by Dorrance



et al. (2008) and known as a reference test. Briefly, this method consists in injecting mycelium of a given race of *P. sojae* into the stem of plantlets of a cultivar of unknown resistance and in determining whether or not it carries the specific *Rps* genes conferring resistance against the tested race by analyzing the phenotypic response. For partial resistance, this method is less reliable. Some will favour screening for partial resistance in field tests (McBlain et al., 1991), and others prefer the *inoculum layer test* conducted in a greenhouse (Dorrance et al., 2008) where more parameters can be controlled.

Whether testing for vertical or horizontal resistance, the current methods have limitations that can lead to identification of false positives or negatives. For instance, in the hypocotyl inoculation test, the inoculation process bypasses the root system and the natural infection process by zoospores. This can lead to the manifestation of a susceptible phenotype in an otherwise resistant one, or prevent the observation of root resistance controlled by *Rps2*, for instance. For their part, fields tests are highly variable and difficult to reproduce with the same conditions, and the layer test is a cumbersome procedure because it is necessary to first proceed with a hypocotyl inoculation test to ensure a compatible race should be used that will not hide the response with any *Rps* gene.

In this context, the aim of our study was to evaluate the reliability of a test in hydroponics recently developed by Guérin et al. (2014) for the simultaneous screening of many soybean cultivars for their resistance against several races of *P. sojae*. From the start, this approach is unique as it offers the distinct advantage of relying on zoospores for inoculation of the root system. The specific objectives of this study were: 1) to establish the discriminating potential of the bioassay by using cultivars with known resistance to selected *P. sojae* races; 2) to develop a quantitative measure to accurately phenotype resistance of a cultivar toward a given race; and 3) to classify soybean cultivars based on their phenotypic response to different *P. sojae* races.

Materials and methods

Plant material

Soybean seeds of 17 cultivars, provided by Semences Prograin Inc. (St-Césaire QC), were tested against *P. sojae* in two different experiments. Upon reception, the cultivars to be tested were only identified by a number (1-17) and no information was provided with respect to their genetic background or resistance to *P. sojae*. At the end of the experiment, we were informed that 12 cultivars had known *Rps* genes and five were uncharacterized. In addition, cultivars with known susceptibility to *P. sojae* or with known *Rps* genes were added as checks. These included: Williams, with no known resistance to *P. sojae* and therefore susceptible to all races, and Haro15, carrying *Rps1k* a gene conferring resistance to races 4 and 7 but not to race 25.

Seeds were surface-sterilized by immersion for 1 min in 5% hypochlorite, 1 min in 70% ethanol and rinsed 3 min in distilled sterilized water. As previously described in Guérin et al (2014), seeds were germinated in Petri dishes on moistened filter paper in darkness at room temperature. After five days, when radicles and hypocotyls were well developed, seedlings were transferred to plastic pots filled with rockwool in a hydroponic system in the greenhouse. The hydroponic solution was in circulation for 30 minutes every hour throughout the experiment.

Plants were fertilized at days 2 (d2), 12 (d12) and 21 (d21) with day 1 referring to the first day plants were placed in the hydroponic system. The nutrient solution used was as described by Imsande and Ralston (1981) and Guérin et al. (2014) with the modification that salts were separated into three different solutions: macronutrients (KNO_3 , KCl , CaCl_2 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were prepared as a 30X solution; micronutrients (H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) as a 5000X solution; and FeNa-EDTA (13.2%) was separately prepared as a 3000X solution. A specific volume of each solution (2 L for macronutrients, 12 ml for micronutrients and 19.8 ml for Fe-EDTA) was added to 50-L black polystyrene tanks so that a complete solution was distributed to growing plants. All experiments were conducted in a greenhouse with

controlled parameters: temperature maintained at 20 to 25°C, 70% relative humidity and a 14-h photoperiod.

Culture of P. sojae and zoospore production

Three races of *P. sojae* were used in this study: 4 (pathotype : 1a, 1c, 7), 7 (pathotype : 1a, 3a, 6, 7) and 25 (pathotype : 1a, 1b, 1c, 1k, 7). All races were characterized and kindly provided by Dr. Allan Xue at Agriculture and Agri-Food Canada in Ottawa (Xue et al., 2015). They were maintained on V8 (20%) - phytagel [200ml clarified V8 - 4g phytagel (Sigma) - 800 ml of distilled water]. Zoospore production was based on the methods of Eye et al. (1978) and Guérin et al. (2014) with some modifications. Ten plates of V8-phytagel culture were used per race of *P. sojae*. Sixty mycelial plugs of 6-day-old cultures were immersed in a Petri dish (15*15mm) in 60 ml of sterile water added to 15 ml of sterile soil extract [10 g Agromix in 1 L of distilled water, homogenized 10 min, filtered under vacuum, sterilized 20 min at 120°C and stored at 4°C]. Five plates of that mixture were sealed with parafilm and gently shaken on an orbital shaker at room temperature during 18h.

Zoospores were observed with a microscope, and swimming and encysted zoospores were counted using the method of Ko et al. (1973). A 1-μl drop was placed on a glass slide, which was then observed under a 10X microscopic field. Ten observations were used to determine the zoospores concentration in suspension and cultures ranging between 10^3 to 10^4 zoospores/ml were used for inoculation. Five plates of mycelial plugs provided almost 350 ml of zoospore suspension that was collected in a 500-ml bottle and added directly to the 50-L tanks. Inoculation was repeated twice on two consecutive days and was performed 7 days after the transfer of seedlings to the hydroponic system (d7).

Experimental design and statistical analysis

The experiment was performed with races 4, 7 or 25 as well as a control solution without *P. sojae* and repeated twice. For each experiment and each treatment (race), the protocol included four plastic tunnels supplied by two 50-L containers. For each cultivar, four plants per treatment per replicate were used. The cultivars were randomized in each tunnel of each system.

The root system and aerial portion of each plant were recorded digitally one week after inoculation and at the end of the experiment, corresponding to the flowering stage (R1 on Fehr and Cavines scale) (21 to 28 dpi following the season).

At harvest, dead plants were recorded, and all plants were cut at the base of the cotyledon scar and separated from the roots. The aerial parts of the plants were dried at 50°C for 18-24h before measuring dry weight. Root weight was not included in the analysis because the root systems overlapped with each other in the canals and could not be separated.

Disease assessment was made based on the total number of dead plants for each cultivar and on the average dry weight of shoots.

Statistical analyses were performed with JMP11 software comparing each treated cultivar with its control by performing Dunnett's test.

Results

Discriminating potential of the bioassay

As a first objective, we wanted to evaluate the reliability of the infection process on cultivars of known resistance. For this purpose, Williams and Haro15 were used. In the case of compatible (susceptible) interactions, roots presented symptoms as early as 7 dpi with a brown discoloration of the main root, and necrotic lesions on the secondary roots. In the case of incompatible (resistant) interactions, roots were free of obvious symptoms and similar to roots of non-inoculated control plants. At the end of the experiments, when plants were at the flowering stage, all plants from compatible interactions i.e. cv. Williams with races 4, 7, and 25, and cv. Haro15 with race 25, presented a discolored and reduced root system compared to controls or were either dead or stunted in their development. For their part, plants from incompatible interactions i.e. Haro15 with races 4 and 7, were similar to control plants at both the root and foliar levels (Figure 1).

When dead plants were recorded, only race 25 ultimately killed plants within the experimental period with 1 and 3 cases for Williams and Haro15, respectively. However, plant dry weight offered a clearer discrimination (Figure 2). In the case of cv. Williams, all inoculated plants with races 4, 7 or 25 were significantly lighter than their control

counterparts, thus confirming their expected susceptibility to all three races. By contrast, only plants inoculated with race 25 for cv. Haro15 were significantly reduced in weight. Interestingly, Haro15 plants inoculated with races 4 or 7 were not only free of symptoms but were significantly heavier than control plants. This unexpected observation facilitated classification of the phenotype as resistant.

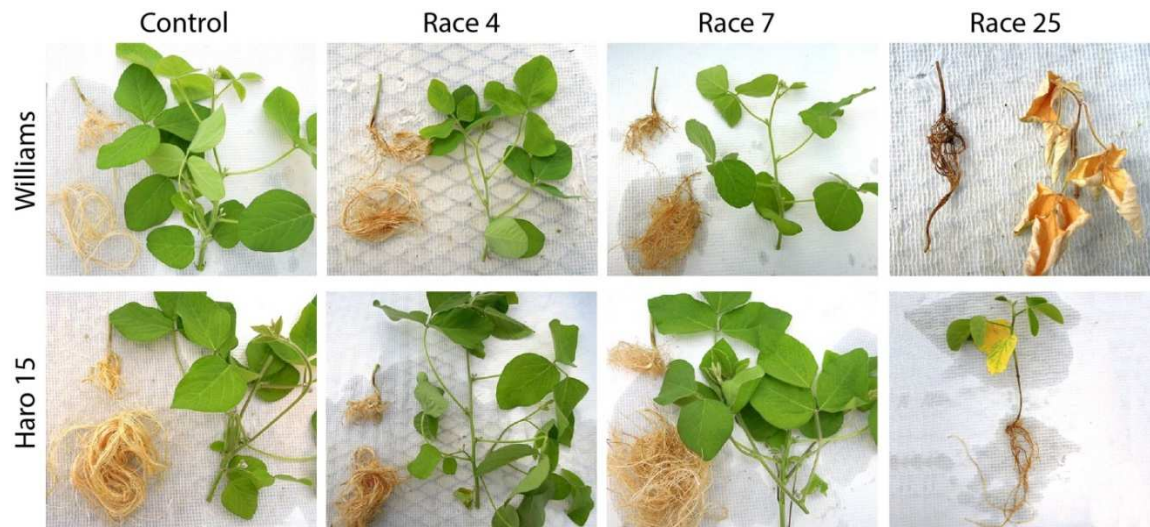


Figure 1: Phenotypic responses of reference soybean cultivars Williams and Haro15 inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25 in hydroponic systems.

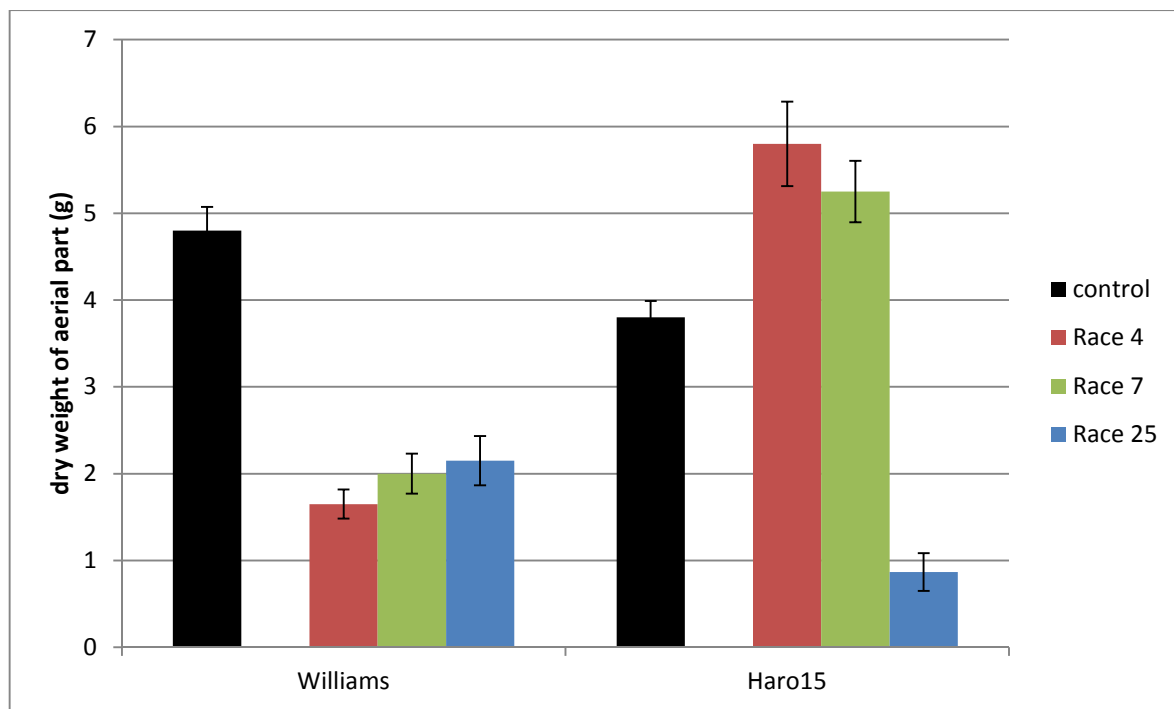


Figure 2: Average dry weight of plants from two reference soybean cultivars inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25. (N=4± standard error)

Quantitative measures to phenotype resistance

Results for the 12 cultivars with known resistance background

As with the reference cultivars, the 17 tested cultivars were observed throughout the experiments for symptoms of infection, while mortality and dry weight were recorded at the end. As the experiment progressed, the different cultivars displayed a wide range of symptoms against the three races confirming clear cases of both compatibility and incompatibility. For instance, plants from cv. 1 displayed resistance against both races 4 and 25 and susceptibility against race 7 while plants from cv. 10 exhibited opposite phenotypes (Figure 3).

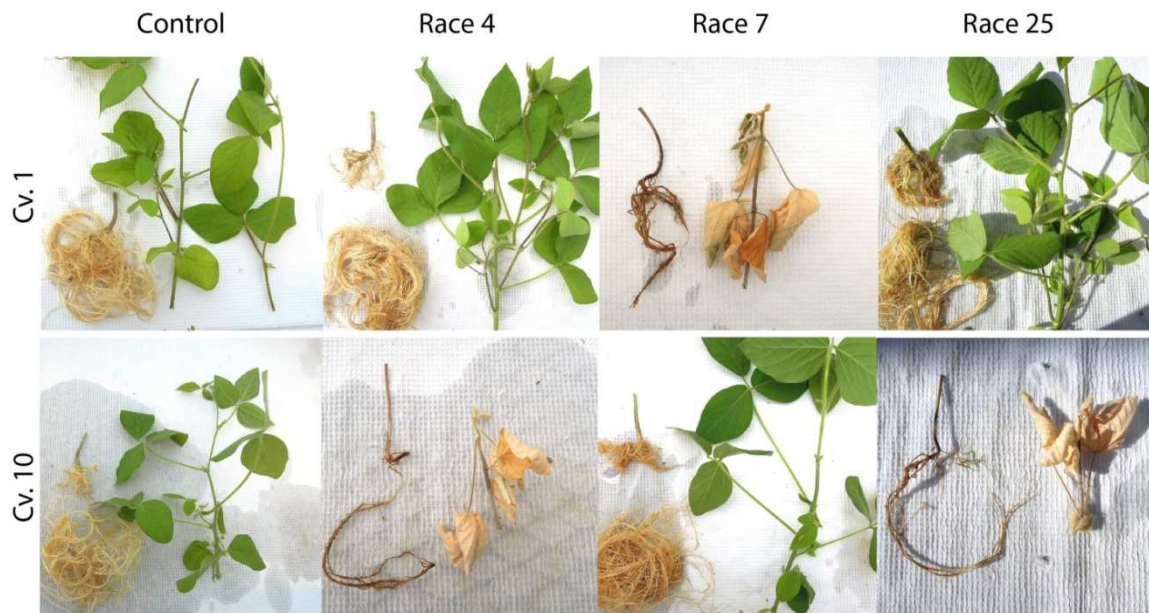


Figure 3: Phenotypic responses of two soybean cultivars inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25 in hydroponic systems.

Several cases of mortality were recorded across the races and cultivars, and in most instances, several dead plants were observed within the same interaction (Table 1). When plant dry weight was assessed, clear patterns emerged as with the reference cultivars (Figure 4). Plants were either significantly lighter than the controls, which signified susceptibility, or heavier than the controls, which signified resistance. In a few instances, the average weight of inoculated plants was not significantly different than that of controls, and this interaction was classified as incompatible. Cultivars 1, 11, 16 and 17 presented the same pattern of interactions while cvs. 4, 7, 8 and 10 also presented similar phenotypic responses. Cultivar 3 seemed to be susceptible to all three races whereas cv. 5 appeared to be resistant to all races.

Table 1: Cases of mortality among eight plants from 12 soybean cultivars with known resistance inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25.

	Cultivars (lines)											
	1	3	4	5	6 ¹	7	8	9	10	11	16	17
	Mortality											
Race 4	0 R ²	3 S	0 R	0 R	0 R	3 S	0 R	3 S	3 S	0 R	0 R	0 R
Race 7	7 S	3 S	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	1 R	4 S	4 S
Race 25	0 R	5 S	0 R	0 R	0 R	4 S	1 R	5 S	3 S	1 R	0 R	0 R

¹Only four plants were tested for this cultivar

²R or S indicate an observed resistant or susceptible phenotype respectively based on mortality events where two events or more is considered susceptible.

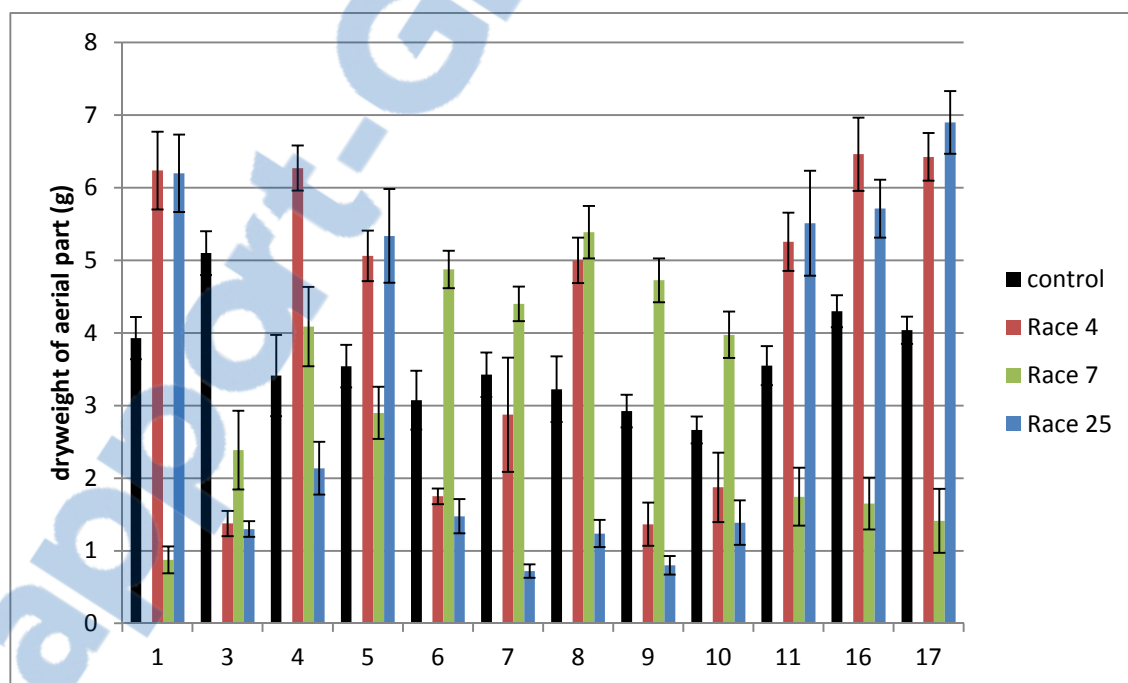


Figure 4: Average dry weight of plants from 12 soybean cultivars (1, 3-11, 16 and 17) inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25. (N= 8 ±standard error).

Results for the five soybean cultivars with unknown resistance

Regarding the five cultivars for which no information was available about their resistance to *P. sojae*, cases of mortality were recorded for all interactions except for cv. 2 with races 4 and 7 (Table 2).

Table 2: Cases of mortality among eight plants from five soybean cultivars (2, 12-15) inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25.

	Cultivars (lines)				
	2	12	13	14	15
	Mortality				
Race 4	0	6	1	8	3
	R ¹	S	R	S	S
Race 7	0	5	1	6	2
	R	S	R	S	R
Race 25	6	7	4	6	4
	S	S	S	S	S

¹R or S indicate a classification as resistant or susceptible based on mortality events where two events or more is considered susceptible

Dry weight data correlated with mortality as four of the five cultivars had significantly lighter plants than their controls against all races and only cv. 2 had plants significantly heavier than controls with races 4 and 7 (Figure 5).

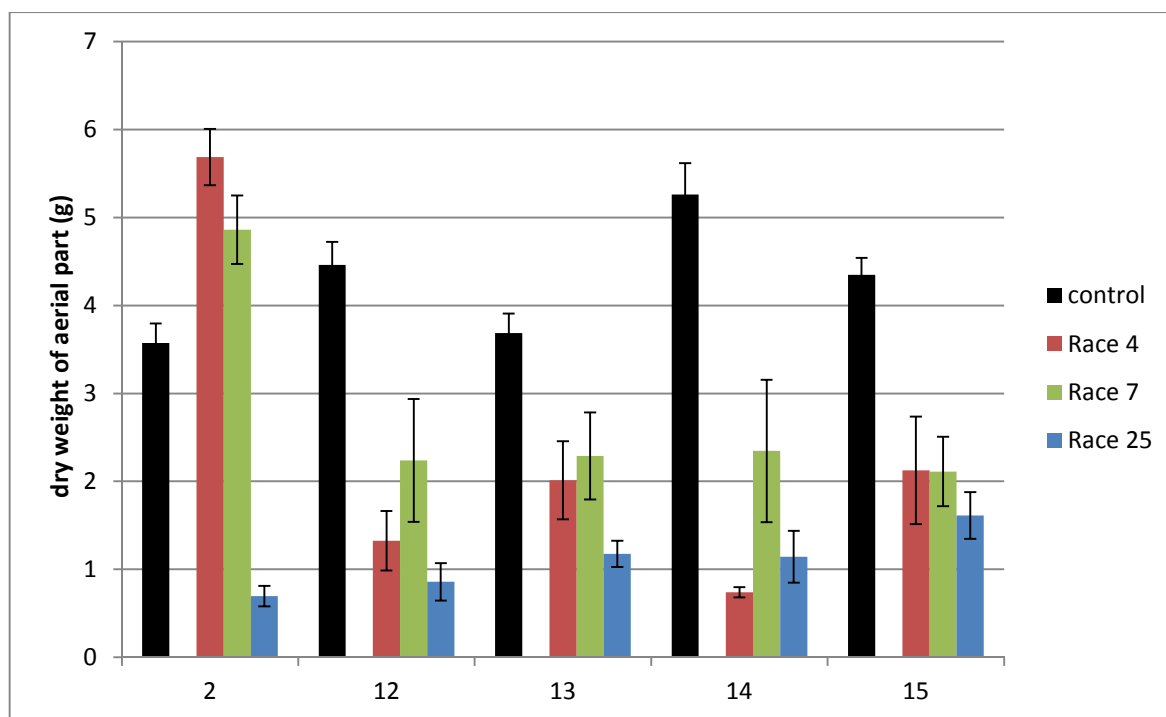


Figure 5: Average dry weight of plants from five soybean cultivars (2, 12-15) inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25. (N=8±standard error).

Classification of cultivars

Based on mortality rate and dry weight data, we were able to propose a compatibility table (resistant or susceptible) for all cultivars against all races (Table 3). We were then informed by our collaborators (Semences Prograin Inc.) of the expected phenotype for each cultivar, which we compared to our results. For all 36 interactions, our results (based on average dry weight data) matched perfectly the expected phenotypes (Figure 4 and Table 3).

In the case of the five cultivars for which Semences Prograin Inc. had no knowledge of the resistance, the classification was straightforward, as only cv. 2 displayed a resistant phenotype against races 4 and 7 on the basis of average dry weight data (Figure 5).

Table 3: Comparison of the phenotypic response obtained in a hydroponic bioassay for 12 soybean cultivars inoculated with *Phytophthora sojae* races 4, 7 or 25 with the phenotypic response expected as per their respective genotype.

Cultivars	Reported genotype	Expected Phenotypic Response			Observed Phenotypic Response		
		Race 4	Race 7	Race 25	Race 4	Race 7	Race 25
Cv1	<i>Rps6</i>	R ¹	S	R	R	S	R
Cv3	<i>Rps1a</i>	S	S	S	S	S	S
Cv4	<i>Rpsk</i>	R	R	R	R	R	S
Cv5	<i>Rps1c</i> , <i>Rps3a</i>	S	R	S	R	R	R
		R	S	R			
Cv6	<i>Rps1c</i>	S	R	S	S	R	S
Cv7	<i>Rps1k</i>	R	R	S	R	R	S
Cv8	<i>Rps1k</i>	R	R	S	R	R	S
Cv9	<i>Rps1c</i>	S	R	S	S	R	S
Cv10	<i>Rps1c</i>	S	R	S	S	R	S
Cv11	<i>Rps6</i>	R	S	R	R	S	R
Cv16	<i>Rps3a</i>	R	S	R	R	S	R
Cv17	<i>Rps6</i>	R	S	R	R	S	R

¹ R or S indicate a classification as resistant or susceptible based on average dry weight data (Figure 4)

Discussion

This work presents convincing evidence that inoculation of zoospores through a hydroponic system gives accurate and expected phenotypic responses of soybean cultivar resistance to different races of *Phytophthora sojae*. As such, this hydroponic assay offers a reliable alternative to evaluate simultaneously many soybean cultivars against different races of *P. sojae* for the identification of *Rps* genes and pathotypes through complex interactions.

Over the years, the hypocotyl inoculation test has been widely employed to evaluate total resistance and establish the presence of *Rps* genes in soybean cultivars confronted to *P. sojae*. As reported by Wagner and Wilkinson (1992), the latter test and other variations favor the inoculation of the aerial part of the plant such as the hypocotyl, cotyledon and leaves with a mycelial slurry despite the fact that *P. sojae* is a soilborne pathogen. Incidentally, other approaches have suggested new ways of screening that would rely on the natural process of infection, zoospores infecting roots, (Kilen and Keeling, 1977 ; Wagner and Wilkinson, 1992) but the hypocotyl inoculation test remains the method most commonly used because of its convenience, rapidity and low cost.

In this context, the recently proposed procedure based on zoospores inoculated in a hydroponic system (Guérin et al., 2014) appeared to circumvent some of the limitations associated with the hypocotyl inoculation test, namely in terms of inoculum uniformity, reproduction of the natural process of infection, and optimal conditions for *P. sojae* development.

Our results showed that the bioassay could predict with perfect accuracy, within the confines of our experiments, soybean resistance to *P. sojae*. In other studies, mortality rate is often used as the only variable to evaluate the interaction between *P. sojae* races and soybean cultivars namely in the hypocotyl inoculation test and its derivatives. (Dorrance et al., 2008; Slaminko et al., 2010). In general, a cultivar is considered susceptible when mortality rate is greater than 75-80%. In our study, this proportion was rarely reached, although two cases of mortality out of eight plants were usually indicative of a compatible interaction. As a matter of fact, if two cases of mortality had been used as a variable to assess susceptibility or resistance, our results would have predicted the phenotype accurately in 10 out of 12 cases, with one false positive (cv.7) and one false negative (cv 4). In our preliminary experiments,

cv Williams presented no cases of mortality against races 4 and 7 even if it is well known that it contains no *Rps* genes. Its eventual classification as susceptible was unequivocal based on dry weight.

Indeed, dry weight was the most reliable variable to classify cultivars on the basis of their phenotypic resistance to *P. sojae* in the context of this bioassay. Whether testing the reference cultivars or cultivars of unknown resistance, dry weight predicted the expected phenotypes in all 36 cases. Interestingly, on the basis of dry weight measurements, the contrasts were quite clear with very few if any data giving ambiguous results. Compatible interactions gave systematically significantly lower dry weight than control plants with differences that were usually quite important. Perhaps one of the most surprising observations was the fact that incompatible interactions resulted in most cases in plants that were significantly heavier than control plants, a phenomenon that made the classification all the more obvious. Reasons for this unexpected, yet useful, result are still unclear. On the one hand, this may be attributed to a growth-promoting effect often reported with microorganisms (e.g. Plant Growth Promoting Rhizobacteria PGPR, Plant Growth Promoting Fungi PGPF) that are not considered plant-pathogens, a situation that would apply in the case of incompatible interactions. On the other hand, this may be the result of higher nutrient availability in inoculated treatments where there is less competition for nutrients in canals where many plants have been killed by *P. sojae*.

Of all the interactions studied, plants of cv. 7 inoculated with race 4 presented the most extreme phenotypes. Considering its reported genotype *Rps1k*, one would assume a resistant phenotype against race 4. However, three out of eight plants were killed by *P. sojae*, a result that should have classified this interaction as compatible. Surprisingly, the five remaining surviving plants presented no symptoms of infection and outgrew control plants so that average dry weight of all eight plants was statistically similar to control plants leading to its classification as resistant. It would therefore be interesting to analyze more plants of this genotype to determine if these extreme phenotypes were the result of loss or absence of *Rps1k* in certain individuals or other factors such as a mixed seed lot.

In the course of this project, the main focus was on resistance mediated by *Rps* genes because introgression of such genes is the best strategy to manage Phytophthora root rot. As a result, the objective was to obtain an eventual classification of susceptible or resistant for all the interactions tested that could serve as a basis for breeders/growers to select cultivars of interest. As previously mentioned two other kinds of resistance to Phytophthora root rot are known in soybean: root resistance which is a particular form of incomplete resistance conferred by the *Rps2* gene, and partial resistance. The hydroponic bioassay should be a valid alternative way to detect both forms. In the case of root resistance, one would expect that the bioassay will be suitable to detect it since it is based on zoospores attacking directly the root system without wounding. To this end, it would be interesting to obtain and test reference cultivars L82-1449 or L76-1988 reported to carry *Rps2* (Dorrance et al., 2004). As for partial resistance, the hydroponic assay offers the rather unique possibility to infect a given cultivar with multiple races at once as shown by Guérin et al. (2014). Considering that cultivars such as 'Conrad' are theoretically expressing partial/incomplete resistance against multiple *P. sojae* isolates (Wang et al., 2012), it would certainly be informative to test it with this bioassay to further our understanding of partial resistance along with identification and/or confirmation of QTL for partial resistance.

Acknowledgements

This work was supported by NSERC and Semences Prograin Inc. We thank Allan Xue and Geneviève Marchand from Agriculture and Agro-food Canada for providing us with isolates of *P. sojae* races and their characterization.

References

- Bernard, R.L., P.E. Smith, M.J. Kaufmann, and A.F. Schmitthenner. 1957. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean. *Agron. J.* 49:391.
- Dorrance, A. E., Jia, H., and Abney, T. S. 2004. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. Online. Plant Health Progress DOI:10.1094/PHP-2004-0309-01-RS.
- Dorrance, A. E., Berry, S. A., Anderson, T. R., and Meharg, C. 2008. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. Online. Plant Health Progress. DOI:10.1094/PHP-2008-0118-01-DG.
- Dorrance A. 2013. *Phytophthora sojae* on soybean in Lamour, K. (ed.), *Phytophthora: A Global Perspective* (p. 79-86). Oxfordshire, UK: CAB International.
- Eye, L.L., Sneh, B., and Lockwood, J.L. 1978. Inoculation of soybean seedlings with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* for pathogenicity and race determination. *Phytopathology*. 68:1769-1773.
- Guérin, V., Lebreton, A., Cogliati, E. E., Hartley, S. E., Belzile, F., Menzies, J. G., and Bélanger, R. R. 2014. A zoospore inoculation method with *Phytophthora sojae* to assess the prophylactic role of silicon on soybean cultivars. *Plant Dis.* 98:1632-1638.
- Hsu, S.C., and Lockwood, J.L. 1984. Biological control of *Phytophthora* root rot of soybean by *Hyphochytrium catenoides* in greenhouse tests. *Phytopathology* 109:139-146.
- Imsande, J., and Ralston E.J. 1981. Hydroponic growth and the nondestructive assay for dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 68:1380-1384.
- Kilen, T.C., and Keeling, B. L. 1977. Simultaneous screening of soybeans against three races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Crop Sci.* 17: 185-186.
- Ko, W.H., Chase, L.L., and Kunitomo, R.K. 1973. Microsyringe method for determining concentration of fungal propagules. *Phytopathology* 63:1206-1207.

- McBlain, B.A., Hacker, J.K., Zimmerly, M.M, and Schmitthenner, A.F. 1991. Tolerance to *Phytophthora* rot in soybean: II. Evaluation of three tolerance screening methods. *Crop Sci.* 31:1412-1417.
- McDonald, B.A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2002. 40:349-79
- Mideros, S., Nita, M., and Dorrance, A. E. 2007. Characterization of components of partial resistance, *Rps2*, and root resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Phytopathology* 97:655-662.
- Osburn, R.M., Milner, J.L., Oplinger, E.S., Smith, R.S., and Handelsman, J. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. *Plant Dis.* 79:551-556.
- Schmitthenner, A.F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69:362-368.
- Schmitthenner, A.F. 2000. *Phytophthora* rot of soybean. Plant health progress. Reproduced, with permission, from *Compendium of Soybean Diseases, 4th Edition*, p. 39-42. APS.
- Slaminko, T. L., Bowen, C. R., and Hartman, G. L. 2010. Multi-year evaluation of commercial soybean cultivars for resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Dis.* 94:368-371.
- Sugimoto, T., Aino, M., Sugimoto, M., and Watanabe, K. 2005. Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. *J. Phytopathology.* 153:536-543.
- Sugimoto, T., Watanabe, K., Furiki, M., Walker, D.R., Yoshida, S., Aino, M., Kanto, T., and Irie, K. 2009. The effect of potassium nitrate on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybeans, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. *J. Phytopathol.* 157:379-389.
- Sugimoto, T., Kato, M., Yoshida, S., Matsumoto, I., Kobayashi, T., et al. 2012. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* and breeding strategies to develop *Phytophthora*-resistant soybeans. *Breed Sci.* 61:511-522.

Tyler, B.M. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. Mol. Plant Pathol. 8:1-8.

Tyler, B.M., and Gijzen, M. 2013. The *Phytophthora sojae* genome sequence: foundation for a revolution in genomics of plant-associated fungi and oomycetes: dicot pathogens. R. A. Dean, A. Lichens-Park, C. Kole Eds. p. 133-157.

Wagner, R.E., and Wilkinson, H.T. 1992. An aeroponics system for investigating disease development on soybean taproots infected with *Phytophthora sojae*. Plant Dis. 76:610-614.

Wang, H., Wijeratne, A., Wijeratne, S., Lee, S., Taylor, C.G., St. Martin, S.K., McHale, L. and Dorrance, A.E. 2012. Dissection of two soybean QTL conferring partial resistance to *Phytophthora sojae* through sequence and gene expression analysis. BMC Genomics. 13:428.

Workneh, F., Yang, X. B., and Tylka, G. L. 1998. Effect of tillage practices on vertical distribution of *Phytophthora sojae*. Plant Dis. 82:1258-1263.

Xue, A.E., Marchand, G., Chen, Y., Zhang, S., Cober, E.R., and Tenuta, A. 2015. Races of *Phytophthora sojae* in Ontario, Canada, 2010-2012. 2015. Can. J. Plant Pathol. <http://dx.DOI.org/10.1080/07060661.2015.1052562>.

Xiao, K., Kinkel, L.L., and Samac, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biological Control. 23:285-295. DOI:10.1006/bcon.2001.1015.

Zhang, S., and Xue, A.G. 2010. Population biology and management strategies of *Phytophthora sojae* causing *Phytophthora* root and stem rots of soybean in Management of Fungal Plant Pathogens, Arya A., Perelló A. CABI, United Kingdom, p. 318-328.

CHAPITRE 3 : CONCLUSIONS GENERALES

Conclusions générales

Un certain nombre de tests actuellement disponibles pour la caractérisation de la résistance de lignées de soya à *Phytophthora sojae* ont recours à une étape de blessure dans laquelle un inoculum à base de bouillie mycélienne est injecté. C'est le cas du très populaire test d'inoculation de l'hypocotyle utilisé par les sélectionneurs pour tester la résistance de cultivars face aux différentes races de *P. sojae* connues. Cette méthode, malgré son statut de référence en la matière, comporte néanmoins certaines limites qui compromettent l'identification précise de la résistance. L'objectif général de notre étude était donc de proposer une nouvelle méthode d'évaluation de la résistance de cultivars de soya à *P. sojae* basée sur un processus d'inoculation par les propagules infectieuses naturelles de l'agent pathogène, les zoospores.

Récemment, une méthode a été mise au point au sein de notre laboratoire (Guérin et al., 2014) afin d'évaluer l'effet prophylactique du silicium dans la lutte contre la pourriture phytophthoréenne du soya. Pour ce faire, des plants de soya étaient cultivés en hydroponie et inoculés avec une suspension de zoospores de *P. sojae*. Les résultats prometteurs obtenus concernant l'établissement homogène de l'infection par le biais de ce bioessai nous ont donc encouragés à optimiser cette approche à des fins de test de phytopathogénicité pour le phénotypage de la (des) résistance(s) et a fait l'objet de ce présent mémoire.

Notre premier objectif était avant tout d'améliorer la technique de production de zoospores. Celle utilisée précédemment dans notre laboratoire reposait sur les travaux de Li et al. (2009) et s'avérait particulièrement longue (3 semaines) et fastidieuse. Des essais afin d'ajuster les différents paramètres de culture de *P. sojae* tels milieu de culture, température, durée et conditions d'incubation, composition de la solution d'immersion (Eye et al., 1978b ; Guérin et al., 2014) ont été entrepris afin de réduire le temps nécessaire à l'obtention des zoospores. Nous avons ainsi pu réduire le temps de production de zoospores de 17 à 7 jours. Cela permet de disposer de l'inoculum de façon plus rapide et d'ajuster plus finement l'étape d'inoculation en fonction du stade phénologique de la plante. Cela représente également un avantage non négligeable pour pouvoir répondre aux exigences de rapidité, d'efficacité et de reproductibilité des méthodes de phénotypage utilisées en routine.

Dans un second temps, afin d'établir le pouvoir discriminant du bioessai, nous avons utilisé les cultivars Haro15 et Williams à des fins de validation du bioessai. Les réponses phénotypiques de ces deux cultivars face aux races de *P. sojae* utilisées étant connues, nous avons ainsi pu observer que les réponses obtenues étaient bien spécifiques à chacune des races.

Ces conclusions ont reposé sur des observations qualitatives précoces (croissance, état général du plant et symptômes racinaires) mais surtout sur des mesures prises en fin d'expérience. L'évaluation a en effet porté sur deux variables quantitatives, à savoir le dénombrement des individus morts et la mesure du poids sec moyen de la partie aérienne. La première semble évidente et par conséquent est couramment recensée et utilisée dans les travaux de phénotypage de la résistance totale (Kilen et Keeling, 1977 ; Pazdernik et al., 1997 ; Dorrance et al., 2008 ; Slaminko et al., 2010). Le seuil de susceptibilité est généralement fixé à un minimum de 75-80% de mortalité alors qu'en deçà de 20-25% de mortalité un cultivar est considéré résistant. Il existe entre ces deux extrêmes, une classe intermédiaire. Dans le cadre de notre étude, le seuil de susceptibilité a été fixé à deux événements de mortalité, en lien direct avec les caractéristiques du système et les attentes en termes de recommandations de cultivars.

La seconde variable, le poids sec moyen, est beaucoup plus marginale et recensée dans quelques cas de caractérisation de la résistance partielle (Jimenez et Lockwood, 1980 ; Stewart and Robertson, 2011). Il ne nous a pas été possible de procéder à la mesure du poids sec de la partie racinaire. En effet, les racines des différents cultivars s'entremêlent dans le système hydroponique et le retrait des plants occasionne des pertes au moment de la récolte. L'utilisation de la variable « poids sec de la partie aérienne » pourrait être controversée en ce sens qu'il s'agit dans notre cas de la partie aérienne et non de la partie racinaire, site privilégié de l'infection mais elle nous a semblé être un bon indicateur de croissance générale des plants de soya et donc le reflet potentiel du niveau de résistance face à l'infection. Pour cette variable, trois phénotypes différents ont été obtenus : 1) le poids sec moyen des cultivars inoculés est significativement inférieur à celui des cultivars témoins non-inoculés, 2) le poids sec moyen des cultivars inoculés est significativement supérieur à celui des cultivars témoin non-inoculés, 3) le poids sec moyen des cultivars inoculés n'est pas significativement

différent de celui des cultivars témoins non-inoculés. Dans cette approche basée sur le poids sec, seul le premier phénotype est considéré comme susceptible.

Les données de poids sec moyen ont ainsi permis de valider que le cultivar Williams était bien susceptible à l'ensemble des trois races en dépit d'un seul événement de mortalité tandis que le cultivar Haro15 n'était susceptible qu'à la race 25. Ces résultats nous ont donc rassurés dans la suite des travaux portant sur l'analyse des 17 cultivars fournis par la compagnie Semences Prograin Inc. Ces derniers ont été testés en aveugle puis les informations concernant leurs génotypes face à la résistance à *P. sojae* ne nous ont été fournies qu'une fois les expériences terminées. Pour 12 des 17 cultivars, le génotype était connu. Pour les cinq cultivars restants, aucune information n'était disponible quant à leur résistance.

En comparant les classifications de susceptibilité/résistance basées sur les données de mortalité ou sur les données de poids secs pour ces cultivars étudiés, on a pu constater quelques disparités. Les différences observées révèlent que l'échelle de classification basée sur la mortalité est moins sévère que celle basée sur le poids sec. Cependant une exception est à noter concernant le cultivar 7 avec la race 4 pour lequel un nombre de plants morts élevé le classerait parmi les susceptibles tandis qu'il est considéré résistant de par son poids sec moyen. Cela permet de confirmer qu'utilisée seule, l'échelle de mortalité peut mettre en évidence des cas de faux positifs. Dans une échelle de classification classique, ce cultivar aurait été intégré dans la catégorie intermédiaire. Dans nos deux approches, nous avons délibérément choisi de ne pas créer de classe intermédiaire et de classer les cultivars uniquement en tant que susceptible ou résistant en lien direct avec l'objectif général de l'étude, qui consiste à apporter une recommandation aux sélectionneurs et semenciers quant aux cultivars à utiliser/à écarter en fonction des races endémiques.

Concernant les 12 cultivars dont le génotype était connu, nous avons pu constater que les réponses phénotypiques observées coïncidaient avec les réponses phénotypiques attendues pour l'ensemble des 36 interactions, sur la base des données de poids sec.

Seules deux expériences avec les 17 cultivars étudiés et les races 4, 7 et 25 sont détaillées dans ce manuscrit. Néanmoins deux expériences additionnelles ont été réalisées avec 15 des 17 cultivars initiaux et deux nouvelles races. L'objectif de ces expériences complémentaires

était double. Premièrement valider la méthode avec une nouvelle série d'expériences répétées dans le temps et deuxièmement affiner le profil de résistance des cultivars afin de pouvoir statuer quant aux gènes *Rps* présents. Les deux nouvelles races ont donc été choisies de telle sorte que leurs pathotypes permettaient de discriminer le maximum de profils de résistance possibles. Les races 13 et 17 répondaient parfaitement à cette contrainte en vertu de leurs pathotypes (6, 7) et (1b, 1d, 3a, 6, 7), respectivement. Malheureusement, par la suite, la caractérisation (par le laboratoire d'A. Xue) des cinq races utilisées a révélé quelques surprises. Les pathotypes des races 4 et 25 diffèrent légèrement de leur profil théorique recensé dans la littérature (Sugimoto et al., 2012) en ce sens qu'on y retrouve « 1d » dans la formule de virulence. Cela signifie que les deux isolats des races en notre possession ont acquis la capacité de contourner le gène *Rps1d*. Par ailleurs, les supposées races 13 (pathotype : 6, 7) et 17 (pathotype : 1b, 1d, 3a 6, 7) s'avèrent finalement être respectivement les races 1 (pathotype : 7) et 9 (pathotype : 1a, 6 et 7) dont les pathotypes n'apportent que peu d'informations supplémentaires par rapport aux précédentes races dans le processus de caractérisation des gènes *Rps*. Pour cette raison, ces résultats sont présentés en annexes. De plus, pour des raisons techniques, nous avons été contraints de réduire le nombre total d'individus à 6 au lieu de 8 pour cette seconde série d'expériences. Il faut cependant noter que les races 1, 4, 7 et 9 utilisées ont été recensées sur le territoire canadien (Xue et al., 2015). L'intérêt pour la race 25 est grandissant car elle fait partie des races capables de contourner le gène *Rps1k*. Or *Rps1k* est l'un des gènes les plus durables et stables parmi les principaux gènes introgressés dans des cultivars commerciaux que sont les gènes *Rps1a*, *1c*, et *1k* majoritairement, et *3a* et *6* de façon plus rare (Slaminko et al., 2010 ; Sugimoto et al. 2012).

La méthode optimisée d'inoculation de zoospores en système hydroponique a donné des résultats probants dans la caractérisation de la résistance totale. C'est un préalable indispensable avant d'envisager le phénotypage des autres types de résistance à savoir la résistance racinaire médiée par *Rps2* et la résistance partielle conférée par les "quantitative trait loci" (QTL) de résistance. L'intérêt de cette méthode dans la caractérisation de ces formes de résistance incomplètes semble indéniable puisqu'elle permet un accès en tout temps aux racines, site privilégié de la manifestation de ces formes de résistance. Pour caractériser un phénotype de résistance partielle, il conviendrait d'ajouter conjointement aux systèmes de races indépendantes, un système contenant un mélange de races afin de s'assurer

d'une réaction compatible et donc de s'affranchir de la manifestation d'un gène *Rps* comme le souligne Stewart et Robertson (2011). La résistance racinaire médiée par *Rps2*, pourrait quant à elle être testée par analogie aux réponses phénotypiques obtenues pour les cultivars L76-1988 ou L82-1449, cultivars étiquetés « *Rps2* » (Dorrance et al., 2004).

Par ailleurs, et comme c'est déjà le cas avec le test d'inoculation de l'hypocotyle, la méthode pourrait faire double emploi et servir à caractériser non seulement des lignées/cultivars face à différentes races connues de *P. sojae* mais aussi à caractériser des isolats de *P. sojae* face à un différentiel de cultivars de résistance connue. Pour ce faire, il s'agirait d'utiliser les cultivars du panel de 8 gènes ou 13 gènes dans le système hydroponique confrontés aux zoospores de l'isolat de *P. sojae* en question.

La mise au point de cette méthode de phénotypage située à l'interface entre les méthodes de laboratoire et les essais en plein champ a été conçue comme un outil de sélection à des fins de pouvoir aider les producteurs/sélectionneurs/semenciers dans leur choix de cultivars basé sur la résistance totale dans un premier temps. Le potentiel de cette nouvelle approche offre également des perspectives intéressantes dans la caractérisation de races/pathotypes de *P. sojae* et des différentes formes de résistance partielle des lignées/cultivars de soya.

REFERENCES

- Barreto, D., Gurfinkel, B.S.de, et Fortugno, C. 1995. Races of *Phytophthora sojae* in Argentina and reaction of soybean cultivars. Plant Dis. 79:599-600.
- Buzzell, R. I., Haas J. H., Crawford L. G., et Va artaja' 0.1977. Soybean phytophthora rot in Southwestern Ontario. Canadian Plant Disease Survey. 57:68-70.
- Buzzell, R.I., et Anderson T.R. 1982. Plant loss response of soybean cultivars to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* under field conditions. Plant Dis. 66:1146-1148.
- Costamilan, L.M., Clebsch, C.C., Soares, R.M., Seixas, C.D.S., Godoy, C.V., et Dorrance, A.E. 2012. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* pathotypes from Brazil. Eur. J. Plant Pathol. 135:845-853.
- Dorff, E. 2007. Le soya, la culture « bonne à tout faire » de l'agriculture, gagne du terrain dans tout le Canada. Dans un coup d'œil sur l'agriculture canadienne. Statistique Canada. No 96-325-XIF2007000. 14 p.
- Dorrance A. 2013. *Phytophthora sojae* on soybean in Lamour, K. (ed.), *Phytophthora: A Global Perspective* (p. 79-86). Oxfordshire, UK: CAB International.
- Dorrance, A. E., Jia, H., et Abney, T. S. 2004. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. Online. Plant Health Progress DOI:10.1094/PHP-2004-0309-01-RS.
- Dorrance, A.E., Berry, S.A., Anderson, T.R., et Meharg, C. 2008. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. Online. Plant Health Progress. DOI: 10.1094/PHP-2008-0118-01-DG.
- Drenth, A., Whisson, S.C., Maclean, D.J., Irwin, J.A.G., Obst, N.R., et Ryley, M.J. 1996. The evolution of races of *Phytophthora sojae* in Australia. Phytopathology 86:163-169.
- Erwin, D.C. 1983. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Eye, L.L., Sneh, B., et Lockwood, J.L. 1978a. Inoculation of soybean seedlings with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* for pathogenicity and race determination. *Phytopathology*. 68:1769-1773.

Eye, L.L., Sneh, B., et Lockwood, J.L. 1978b. Factors affecting zoospore production by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 68:1766-1768.

FAOSTAT. Rome (Italie): FAO, 2015 Ressource internet. <http://faostat3.fao.org/home/F>.

Ferro, C.R., Hill, C.B., Miles, M.R., et Hartman, G.L. 2006. Evaluation of soybean cultivars with the Rps1k gene for partial resistance or field tolerance to *Phytophthora sojae*. *Crop Sci.* 46:2427-2436.

Filonow, A.B., et Lockwood, J.L. 1985. Evaluation of several actinomycetes and fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69:1033-1036.

Guérin, V., Lebreton, A., Cogliati, E.E., Hartley, S.E., Belzile, F., Menzies, J.G., et Bélanger, R.R. 2014. A zoospore inoculation method with *Phytophthora sojae* to assess the prophylactic role of silicon on soybean cultivars. *Plant Dis.* 98:1632-1638.

Haas, J.H., et Buzzell, R.I. 1976. New races 5 and 6 of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* and differential reactions of soybean cultivars for races 1 and 6. *Phytopathology* 66:1361-1362.

Hansen, E.M., et Maxwell, D.P. 1991. Species of the *Phytophthora megasperma* complex. *Mycologia*. 83:376-381.

Hsu, S.C., et Lockwood, J.L. 1984 Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Soybean by *Hyphochytrium catenoides* in Greenhouse Tests. *Phytopathology*. 109:139-146

Jiang, R.H.Y., et Tyler, B.M. 2012. Mechanisms and evolution of virulence in Oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:295-318.

Jimenez, B., et Lockwood, J.L. 1980. Laboratory method for assessing field tolerance of soybean seedlings to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Dis.* 64:775-778.

- Keeling, B.L. 1982. Factors affecting the reaction of soybeans to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in hydroponic culture. Crop Sci. 22:325-327.
- Kilen, T.C., et Keeling, B.L. 1977. Simultaneous screening of soybeans against three races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Crop Sci. 17:185-186.
- Kilen, T.C., Hartwig, E.E., et Keeling, B.L. 1974. Inheritance of a second major gene for resistance to *Phytophthora* rot in soybeans. Crop Sci. 14:260-262.
- Kyle, D.E., Nickell, C.D., Nelson, R.L., et Pedersen, W.L. 1998. Response of soybean accessions from provinces in Southern China to *Phytophthora sojae*. Plant Dis. 82:555-559.
- Li, Y., Minerdi, A., Garibaldi, A. et Gullino, M. L. 2009. Molecular detection of *Phytophthora cryptogea* on *Calendula officinalis* and *Gerbera jamesonii* artificially inoculated with zoospores. J. Phytopathol. 157:438-445.
- Lin, F., Zhao, M., Baumann, D.D., Ping, J., Sun, L., Liu, Y., Zhang, B., Tang, Z., Hughes, E., Doerge, R.W., Hughes, T.J., et Ma, J. 2014. Molecular response to the pathogen *Phytophthora sojae* among ten soybean near isogenic lines revealed by comparative transcriptomic. BMC Genomics, 15:18. DOI:10.1186/1471-2164-15-18.
- McBlain, B.A., Hacker, J.K., Zimmerly, M.M., et Schmitthenner, A.F. 1991. Tolerance to *Phytophthora* rot in soybean: II. Evaluation of three tolerance screening methods. Crop Sci. 31:1412-1417.
- McDonald, B.A., et Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40:349-79.
- Mideros, S., Nita, M., et Dorrance, A. E. 2007. Characterization of components of partial resistance, Rps2, and root resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. Phytopathology 97:655-662.
- Morris, P.F., et Ward, E.W.B. 1992. Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. Physiol. Mol. P. Pathol. 40:17-22.

Morrison, R.H., et Thorne, J.C. 1978. Inoculation of detached cotyledons for screening soybeans against two races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Crop Sci. 18:1089-1091.

Olah, A.F., et Schmitthenner, A.F. 1985. A growth chamber test for measuring *Phytophthora* root rot tolerance in soybean seedlings. Phytopathology 75:546-548.

Osburn, R.M., Milner, J.L., Oplinger, E.S., Smith, R.S., et Handelsman, J. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. Plant Dis. 79:551-556.

Pazdernik, D.L., Hartman, G.L., Huang, Y.H., et Hymowitz, T. 1997. A greenhouse technique for assessing *Phytophthora* root rot resistance in *Glycine max* and *Glycine soja*. Plant Dis. 81:1112-1114.

Qutob, D., Kamoun, S., et Gijzen, M. 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. Plant J. 32:361-373.

Schmitthenner, A.F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. Plant Dis. 69:362-368.

Schmitthenner, A.F., et Bhat, R.G. 1994. Useful Methods for Studying *Phytophthora* in Laboratory. Ohio Agriculture Research and Development Center. Special Circular 143. 10p.

Schmitthenner, A.F. 2000. *Phytophthora* rot of soybean. Plant Health progress. Reproduced, with permission, from Compendium of Soybean Diseases, 4th Edition, pp. 39-42, 1999. APS.

Schwenk, F. W., Ciaschini, C.A., Nickell, C.D., et Trombold, D.G. 1979. Inoculation of soybean plants by injection with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology 69:1233-1234.

Slaminko, T.L., Bowen, C.R., et Hartman, G.L. 2010. Multi-year evaluation of commercial soybean cultivars for resistance to *Phytophthora sojae*. Plant Dis. 94:368-371.

Stewart, S., et Robertson, A.E. 2011. A modified method to screen for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. Crop Sci. 52:1181-1186.

Sugimoto, T., Aino, M., Sugimoto, M., et Watanabe, K. 2005. Reduction of Phytophthora stem rot disease on soybeans by the application of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. J. Phytopathol. 153:536-543.

Sugimoto, T., Kato, M., Yoshida, S., Matsumoto, I., Kobayashi, T., et al. 2012. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* and breeding strategies to develop Phytophthora-resistant soybeans. Breed Sci. 61:511-522.

Sugimoto, T., Watanabe, K., Furiki, M., Walker, D.R., Yoshida, S., Aino, M., Kanto, T., et Irie, K. 2009. The effect of potassium nitrate on the reduction of Phytophthora stem rot disease of soybeans, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. J. Phytopathol. 157:379-389.

Tooley, P.W. et Grau, C.R. 1982 Identification and quantitative characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean seedlings. Phytopathology 72:727-733.

Tooley, P.W. et Grau, C.R. 1984. Field characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. Phytopathology 74:1201-1208.

Tyler, B.M. 2007. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. Mol. Plant Pathol. 8:1-8.

Tyler, B.M., et Gijzen, M. 2013. The *Phytophthora sojae* genome sequence: foundation for a revolution in genomics of plant-associated fungi and oomycetes: dicot pathogens. R. A. Dean, A. Lichens-Park, C. Kole Eds. p. 133-157.

Wagner, R.E., et Wilkinson, H.T. 1992. An aeroponics system for investigating disease development on soybean taproots infected with *Phytophthora sojae*. Plant Dis. 76:610-614.

Walker, A.K., et A.F. Schmitthenner. 1984. Comparison of field and greenhouse evaluations for tolerance to Phytophthora rot in soybean. Crop Sci. 24:487-489.

Ward, E.W.B., et Buzzell, R.I. 1983. Influence of light, temperature and wounding on the expression of soybean genes for resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Physiol. Plant Pathol. 23:401-409.

Ward, E.W.B., Lazarovits, G., Unwin, C.H., et Buzzell, R.I. 1979. Hypocotyl reactions and glyceollin in soybeans inoculated with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 69:951-955.

Wrather, J.A., et Koenning, S.R. 2009. Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007 *in*: *Plant Health Progress*.

Xiao, K., Kinkel, L.L., et Samac, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*. 23:285-295.

Xue, A.E., Marchand, G., Chen, Y., Zhang, S., Cober, E.R. et Tenuta, A. 2015. Races of *Phytophthora sojae* in Ontario, Canada, 2010-2012. 2015. *Can. J. Plant Pathol.* [http://dx.Doi.org/10.1080/07060661.2015.1052562](http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2015.1052562).

Zhang, S.Z. et Xue, A.G. 2010. « Population biology and management strategies of *Phytophthora sojae* causing *Phytophthora* root and stem rots of soybean. », *in* Arya, A.P. and Perello, A. (dir.) - *Management of Fungal Plant Pathogens*, CABI Publishing, Chapter 24 (Part Six: Alternative Control Strategies). p. 318-328.

Zhang, S.Z., Xue, A.G., Zhang, J.X., Cober, E., Anderson, T.R., Poysa, V. et Rajcan, I. 2010. Reactions of Canadian short-season soybean cultivars to three races of *Phytophthora sojae*. *Can. J. Plant Sci.* 90:207210.

ANNEXES

ANNEXE 1: MORTALITÉ ET MASSE SÈCHE OBTENUES AVEC LES RACES 1 ET 9 DE *PHYTOPHTHORA SOJAE* POUR LES CULTIVARS DE RÉFÉRENCES DE SOYA

Tableau 1 : Événements de mortalité recensés chez quatre plantes des cultivars de référence Williams et Haro15 inoculées avec les races 1 ou 9 de *Phytophthora sojae*.

Mortalité	Williams	Haro15
Race 1	0 R ¹	0 R
Race 9	1 R	0 R

¹ R ou S indique une classification comme résistant ou susceptible basée sur la mortalité ; lorsque deux événements ou plus sont recensés, le cultivar est considéré susceptible

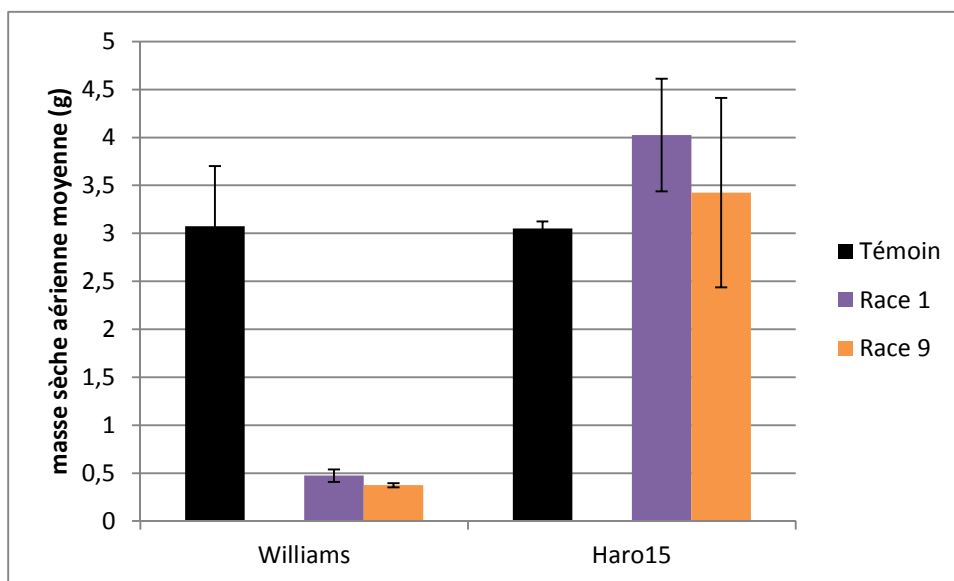


Figure 1: Histogramme des masses sèches moyennes (en grammes) des cultivars de référence Williams et Haro15 inoculés avec les races 1 ou 9 de *Phytophthora sojae*. (N=4±erreur type)

ANNEXE 2 : MORTALITÉ ET MASSE SÈCHE OBTENUES AVEC LES RACES 1 ET 9 DE *PHYTOPHTHORA SOJAE* POUR 15 CULTIVARS DE SOYA

Tableau 2: Événements de mortalité recensés chez six plantes de 15 cultivars initiaux de soya inoculées avec les races 1 ou 9 de *Phytophthora sojae*.

Mortalité	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17
Race 1	0	0	4	0	1	2	0	4	0	6	2	6	3	0	0
	R	R ¹	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R
Race 9	6	0	4	0	0	0	0	0	5	4	1	2	4	0	6
	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S

¹ R ou S indique une classification comme susceptible ou résistant basée sur la mortalité ; lorsque deux événements de mortalité ou plus sont recensés, le cultivar est considéré susceptible

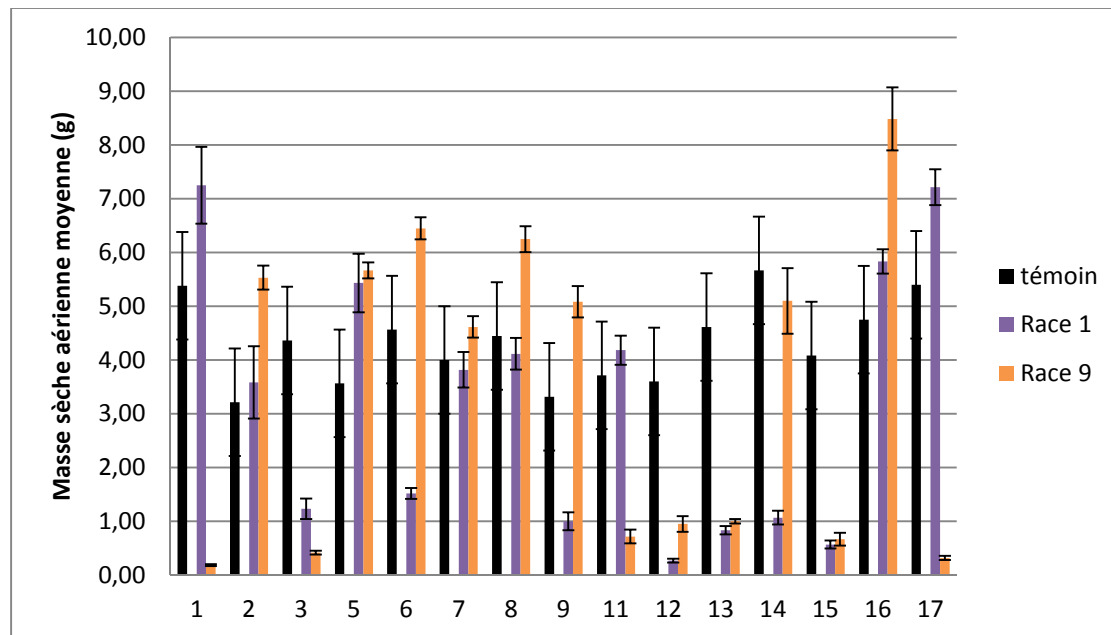


Figure 2: Masses sèches moyennes (en grammes) pour 15 des 17 cultivars de soya inoculés avec les races 1 ou 9 de *Phytophthora sojae*. (N = 6±erreur type).

ANNEXE 3 : CLASSIFICATION DES CULTIVARS

Tableau 3 : Comparaison des réponses phénotypiques attendues avec les réponses phénotypiques obtenues pour dix des douze cultivars de soya dont le génotype est connu avec les races 1 et 9 de *Phytophthora sojae*.

Cultivars	Génotype prédit	Réponse phénotypique attendue		Réponse phénotypique obtenue		Validation réponse obtenue/attendue
		Race 1	Race 9	Race 1	Race 9	
Cv1	<i>Rps6</i>	R ¹	S	R	S	
Cv3	<i>Rps1a</i>	R	S	S	S	
Cv4	<i>Rps1</i>					
Cv5	<i>Rps1c</i> , <i>Rps3a</i>	R	R	R	R	
Cv6	<i>Rps1c</i>	R	R	R	R	
Cv7	<i>Rps1k</i>	R	R	R	R	
Cv8	<i>Rps1k</i>	R	R	R	R	
Cv9	<i>Rps1c</i>	R	R	S	R	
Cv10	<i>Rps1c</i>					
Cv11	<i>Rps6</i>	R	S	R	S	
Cv16	<i>Rps3a</i>	R	R	R	R	
Cv17	<i>Rps6</i>	R	S	R	S	

En vert, les réponses phénotypiques attendues et obtenues sont en adéquation

En rouge la réponse phénotypique obtenue est différente de celle attendue

¹ R ou S indique la classification d'un cultivar comme susceptible ou résistant

Tableau 4 : Réponses phénotypiques obtenues pour les cinq cultivars de soya de génotype inconnu inoculés avec les races 1 ou 9 de *Phytophthora sojae*.

Cultivars	Réponse phénotypique obtenue	
	Race 1	Race 9
Cv2	R ¹	R
Cv12	S	S
Cv13	S	S
Cv14	S	R
Cv15	S	S

¹ R ou S indique la classification d'un cultivar comme susceptible ou résistant