

Impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique annuelle d'adaptation d'une population de Zymoseptoria tritici à un gène de résistance qualitative récemment contourné

Carolina Orellana Torrejon

▶ **To cite this version:**

Carolina Orellana Torrejon. Impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique annuelle d'adaptation d'une population de Zymoseptoria tritici à un gène de résistance qualitative récemment contourné. Agronomie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB031 . tel-03708743

HAL Id: tel-03708743
https://pastel.hal.science/tel-03708743

Submitted on 29 Jun 2022

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

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

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2022UPASB031

Impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique annuelle d'adaptation d'une population de *Zymoseptoria tritici* à un gène de résistance qualitative récemment contourné

Impact of wheat cultivar mixtures on the annual adaptation dynamics of a Zymoseptoria tritici population to a recently broken down qualitative resistant gene

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 : Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Agro-écologie
Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans les unités de recherche **ECOSYS** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech) et **BIOGER** (Université Paris-Saclay, INRAE),
sous la direction de **Sébastien SAINT-JEAN**, Maître de conférences (ADR),
la co-direction de **Frédéric SUFFERT**, Ingénieur de recherche (HDR),
et le co-encadrement de **Tiphaine VIDAL**, Chargée de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 24 mai 2022, par

Carolina ORELLANA-TORREJON

Composition du Jury

Thierry LANGIN Directeur de recherche, CNRS (Clermont-Ferrand)	Président
Élisabeth FOURNIER Directrice de recherche, INRAE (Montpellier)	Rapporteure & Examinatrice
Christophe LE MAY Maître de conférences, Institut Agro – AgroCampus Ouest	Rapporteur & Examinateur
Hélène FREVILLE Directrice de recherche, INRAE (Montpellier)	Examinatrice
Jacqui SHYKOFF Directrice de recherche, CNRS (Université Paris-Saclay)	Examinatrice
Sébastien SAINT-JEAN Maître de conférences (ADR), AgroParisTech (Université Paris-Saclay)	Co-directeur de thèse
Frédéric SUFFERT Ingénieur de recherche (HDR), INRAE (Université Paris-Saclay)	Co-directeur de thèse
Tiphaine VIDAL Chargée de recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)	Co-encadrante

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique annuelle d'adaptation d'une population de *Zymoseptoria tritici* à un gène de résistance qualitative récemment contourné

Mots clés : épidémiologie végétale, adaptation fongique, durabilité de la résistance, diversité des cultures, mélange variétal, transmission de virulence

Résumé : Accroître l'efficacité et la durabilité de gènes de résistance à des agents phytopathogènes est un enjeu majeur pour la protection des cultures. Augmenter la diversité cultivée intra-parcellaire est un des moyens d'y parvenir. Cela implique de comprendre comment un tel déploiement modifie la population pathogène pendant un cycle épidémique annuel complet, qui s'étend au-delà d'une saison de culture. Pour y répondre, j'ai tout d'abord évalué l'impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique d'adaptation d'une population pathogène de *Zymoseptoria tritici* à un gène de résistance qualitative (*Stb16q*) récemment contourné. J'ai étudié comment l'association de deux variétés porteuses ou non de *Stb16q*, selon différentes proportions (0.25, 0.5, 0.75), a modifié la population pathogène comparativement aux cultures pures au cours de deux années d'expérimentation. Trois phases clé ont été analysées : le début et la fin de la période épidémique (plusieurs cycles successifs de multiplication asexuée pilotés par la dispersion pluviale de pycnidiospores entre variétés) et la période inter-épidémique (production d'ascospores résultant de la reproduction sexuée sur résidus de culture). La fréquence de virulence sur chaque variété des associations (composition de la population) a été estimée par phénotypage sur plantules en serre. La taille de la population a été estimée en mesurant la sévérité de la maladie (période épidémique) et en estimant le nombre d'ascospores éjectées des résidus (période inter-épidémique). À la fin de la période épidémique, une diminution de la sévérité a été constatée dans les associations, à l'échelle du couvert et sur chaque variété, mettant en évidence une "protection" réciproque. Les associations ont eu pour effet une diminution de la fréquence de virulence comparativement à la culture pure de la variété porteuse de *Stb16q* à la fin de la période épidémique et pendant la période inter-épidémique, montrant que la reproduction sexuée n'a pas annulé l'impact "bénéfique" des associations.La fréquence de virulence sur cette variété a même légèrement diminué pour certaines proportions, mettant en évidence la capacité des associations à maintenir des souches avirulentes dans la population recombinante. Dans un second temps, j'ai exploré en conditions semi-contrôlées différentes combinaisons de croisements entre souches virulentes et/ou avirulentes, susceptibles de s'être produits sur chaque variété dans les associations. La descendance a été quantifiée et la parentalité de souches recombinantes correspondant à chaque type de combinaison a été vérifiée par génotypage. Il en est ressorti que des croisements avirulent × virulent, et même avirulent × avirulent, ont pu se produire sur la variété porteuse du gène *Stb16q*. Ce résultat démontre qu'une infection allant jusqu'à l'apparition de symptômes n'est pas indispensable pour qu'une souche se reproduise sexuellement. Enfin, j'ai proposé un cadre conceptuel de modélisation pour étudier plus en détail l'influence de la fréquence de virulence et de la proportion des variétés sur l'impact d'une association à l'échelle de la parcelle et annuelle. Pour conclure, j'ai montré qu'en plus de diminuer la sévérité d'une maladie, les associations peuvent être utiles pour réduire la transmission d'une virulence. La reproduction sexuée peut faire persister cet effet jusqu'à l'épidémie suivante du fait de l'implication de souches avirulentes, conduisant à une "dilution" de la virulence dans la population de descendants. Tous ces éléments font que les associations variétales, déployées à des échelles spatio-temporelles plus larges, pourraient être à la base de stratégies efficaces pour améliorer la durabilité – c'est-à-dire maintenir, voire rehausser – l'efficacité d'un gène de résistance qualitatif déjà contourné.

Title : Impact of wheat cultivar mixtures on the annual adaptation dynamics of a *Zymoseptoria tritici* population to a recently broken down qualitative resistant gene

Keywords : plant disease epidemiology, fungal adaptation, resistance durability, crop diversity, varietal mixture, virulence transmission

Abstract : Improving the efficacy and the durability of resistance genes against plant pathogens is a major challenge for farming systems. Increasing the cultivated genetic diversity within a field is a lever to achieve this goal. We need to understand how such deployment of the resistance affects pathogen populations during the whole cropping season including the post-epidemic period. To address this question, first I investigated the impact of wheat cultivar mixtures on the adaptation dynamics of a population of the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* to the recently broken down qualitative resistant gene (*Stb16q*). I assessed how two wheat cultivars, carrying *Stb16q* or not and cultivated in mixtures in different proportions (0.25, 0.5, 0.75), modified the pathogen population over two annual field epidemics compared to pure stands. Three key moments were considered in the whole pathogen life cycle: the epidemic period, which involves successive asexual multiplication cycles driven by rain-splash dispersal of pycnidiospores between growing plants of both cultivars (two dates: early and late epidemic stages), and the inter-epidemic period, which involves sexual reproduction in wheat residues releasing ascospores. The frequency of virulent strains in each cultivar and mixture (population composition) was assessed by phenotyping in seedling assays under greenhouse conditions. Population size was assessed by measuring disease severity (epidemic period) or estimating the number of ascospores discharged from residues (inter-epidemic period). At the end of the epidemic period, severity reductions were observed in mixtures at the whole canopy scale and on both cultivars, highlighting a reciprocal "protective" effect. Mixtures decreased the frequency of virulent strains relative to the pure stand of the cultivar carrying *Stb16q* at the end of the epidemic period and at the inter-epidemic period, showing that sexual reproduction did not counter the "beneficial" impact of mixtures. Even so, the frequency of virulent strains on this cultivar slightly decreased after sexual reproduction for some mixture proportions, highlighting the capacity of cultivar mixtures to actively maintain avirulent strains in the offspring population through specific epidemiological mechanisms. Secondly, I investigated in semi-controlled conditions different combinations of sexual crosses that may have occurred in field conditions between virulent and/or avirulent strains, in both cultivars. The offspring were quantified, and the parenthood of recombinant strains from each type of cross was checked by genotyping. I established that avirulent × virulent crosses, and even avirulent × avirulent, can occur on the cultivar carrying *Stb16q*. This result demonstrates that the expression of symptoms on living plant tissues are not essential for a *Z. tritici* strain to subsequently reproduce sexually. Finally, I suggested a conceptual modeling framework to further investigate the impact of the initial frequency of virulent strains and the proportion of cultivars on the mixture efficacy at the field and annual scales. To conclude, I showed that, besides disease reductions, cultivar mixtures may be used to restrict the overall propagation of a virulence. Sexual reproduction can make these mixture effects persist over the subsequent epidemic and avirulent strains can take part in it, allowing to "dilute" the virulence within recombinant populations. For these reasons, cultivar mixtures, when deployed at larger spatio-temporal scales, could be an efficient strategy to improve the durability – (*i.e.* maintain, even slightly re-increase, the efficacy) – of a broken down qualitative resistance gene.

A mis padres y a mi infancia,

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaiterais remercier très sincèrement mes trois encadrants de thèse Sébastien Saint-Jean, Frédéric Suffert et Tiphaine Vidal. Merci d'avoir cru en moi pour ce projet, vous m'avez permis de grandir tout au long de ces quatre années, que ce soit professionnellement et humainement. La pluralité de vos approches d'encadrement et vos différents points de vues sur le sujet de thèse a fortement enrichi ce travail. Merci pour votre disponibilité malgré vos emplois du temps chargés. Et de m'avoir épaulée pendant le Covid. Sébastien, merci de m'avoir initiée à la modélisation, pour ta rigueur et grande pédagogie, et aussi pour ton humour. Tiphaine, merci pour ton soutien, pour tes relectures attentives et décryptages en réunion, bien clairs, des différentes options à ma disposition. Frédéric, merci pour ton enthousiasme et ta bienveillance, d'avoir été aussi investi au cours de ces années, toujours disponible pour faire un point, et de m'avoir appris tant de choses. Et pour ces réunions stimulantes de « relecture d'article », où on a « essoré » nos méninges pour trouver le mot juste.

Je tiens à remercier particulièrement les membres du jury Élisabeth Fournier, Christophe Le May, Jacqui Schykoff, Hélène Fréville et Thierry Langin qui ont accepté de m'accorder leur temps pour évaluer ces travaux. Je suis fière des riches échanges que nous avons eus lors de la soutenance.

J'adresse tous mes remerciements aux membres de mon comité de thèse : Romain Valade, Thies Marten Heick, Cyrille Saintenac, Frédéric Fabre et Claude de Vallavieille-Pope. Pour vos précieux conseils et pour m'avoir fait prendre le recul nécessaire pour mener à bien ce projet.

J'aimerais remercier également l'école doctorale ABIES de m'avoir accordé un prolongement de thèse pour réussir à finir les expérimentations mises en difficulté par le premier confinement.

Un immense merci à tous les collègues (plutôt la famille) du bureau 095: Agathe, Gwilherm, Claire, Emmie, Emma, Safaa, Anne-Lise et Lydie, et à tous ceux qui passaient par là régulièrement pour partager un bonbon, un potin, une blague ou une séance de gym le midi avec nous. Merci pour leur écoute, soutien et bonne humeur qui donnait grande envie de se lever le matin. Qu'est-ce qu'on a ri ! Qu'est-ce qu'on a mangé aussi ! Cette complicité, qui s'est très vite transformée en amitié, m'a beaucoup poussé. J'espère qu'on saura garder ces liens forts dans les années à venir. Et merci encore à Agathe et Anne-Lise pour leur coaching en analyse de données et de m'avoir accordé votre temps malgré tout le travail que vous aviez à faire.

Merci aux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Jérôme, Miléna, Lucas, Auriane et Emilie. Pour votre sérieux et investissement dans vos missions respectives. Et aussi

d’avoir su gérer parfois ma mauvaise humeur matinale (« je grogne mais je ne mords pas » comme l’a bien résumé Claire).

Je tiens à remercier également les équipes de BIOGER et ECOSYS pour leur accueil au sein des deux unités. Merci pour cet environnement de travail chaleureux et stimulant. Une mention spéciale pour Thierry et Henriette qui avaient toujours réponse à mes questions. Et un grand merci à toutes les personnes qui ont travaillé de près ou de loin dans ce projet, sans qui tout ce travail n’aurait pas vu le jour : Sandrine, Nathalie, Martin, Laurent, Marie-Pierre, John, Béatrice, Isabelle, Nicolas, Brigitte, Josiane, Fabrice, Christophe et j’en oublie sûrement.

Merci à JBL pour son travail et écoute si précieux, essentiels même, notamment pendant la rédaction.

Merci Damien pour ta patience, ton soutien et ton écoute. Je suis impatiente de vivre avec toi d’autres grandes aventures, même « en terrain hostile » ;).

Gracias a mi familia por su apoyo permanente a pesar de la distancia que nos separa. Por los momentos intensos y cariñosos cuando nos pudimos ver. A mi papá por su ironía y humor. Y a mi mamá por su apoyo incondicional, nuestras llamadas y cenas analíticas, las risas nerviosas, los recuerdos ocultos y tus “poooobreeeeciiiita” :P.

TABLE DES MATIERES

Synthèse bibliographique 15

1 La gestion de l'immunité végétale dans les agrosystèmes 16
1.1 La résistance variétale, pilier de systèmes agricoles productifs mais vulnérables 16
1.2 La résistance qualitative 18
1.3 Le contournement des résistances qualitatives 20
1.4 Quelles stratégies de déploiement d'une résistance qualitative permettraient de faire durer son efficacité ? 23

2 Impact des caractéristiques biologiques des champignons phytopathogènes sur les dynamiques adaptatives de leurs populations : conséquences potentielles sur l'immunité de l'hôte 26
2.1 Diversité des interactions plante-pathogène : modes de développement et types trophiques 26
2.2 Caractéristiques des populations pathogènes favorisant leur adaptation aux résistances variétales qualitatives 29
2.3 La reproduction sexuée, source de diversité chez les ascomycètes 32
2.4 Comment évoluent les populations pathogènes entre deux saisons épidémiques ? 34

3 La régulation des populations de pathogènes fongiques dans les associations variétales de céréales a paille 36
3.1 Associer des variétés afin de bénéficier de traits complémentaires 36
3.2 Ralentissement des dynamiques épidémiques et réduction de la taille des populations pathogènes dans les associations 37
3.3 Mécanismes expliquant l'efficacité des associations à l'échelle annuelle 40
3.4 Facteurs affectant la performance des associations 42
3.5 Quel impact de l'utilisation d'associations variétales sur la dynamique évolutive des populations pathogènes ? 45

4 Cas d'étude : le pathosystème Zymoseptoria tritici-Triticum aestivum 47
4.1 Impact économique des épidémies de septoriose sur blé tendre 47
4.2 Cycle de vie de *Z. tritici* et interaction avec l'hôte 48
4.3 Modes de reproduction, diversité et capacités d'adaptation des populations de *Z. tritici* 53
4.4 Méthodes de protection du blé et adaptation de *Z. tritici* 53
4.5 Contrôle d'épidémies de septoriose dans les associations variétales de blé tendre 56

5 Problématique de la thèse et stratégie de recherche 58
5.1 Problématique de la thèse 58
5.2 Stratégie de recherche 59
5.3 Stratégie expérimentale 59

Chapitre I 63

Dynamique annuelle des populations de Z. tritici dans une association variétale de blé : Existe-t-il un compromis entre l'efficacité et la durabilité d'un gène de résistance récemment contourné ? 63

Chapitre II 107

L'impact d'une association variétale de blé sur la dynamique de la virulence dans les populations de Z. tritici persiste-t-il après la reproduction sexuée, et entre deux saisons de culture ? 107

Chapitre III 137

Des scénarios multiples de croisements sexués chez Z. tritici sur résidus de culture : Quelles conséquences potentielles sur la transmission d'une virulence à l'échelle populationnelle ? 137

Discussion générale **181**

1 Impact de l'hétérogénéité génétique du peuplement végétal sur la dynamique d'adaptation d'une population de Zymoseptoria tritici : retour sur les résultats expérimentaux *182*

1.1 Effet des associations sur la dynamique épidémique et évolutive de la population pathogène pendant la période épidémique : réduction de la sévérité de la septoriose et du nombre d'individus virulents 183

1.2 Persistance et amplification de l'effet des associations sur la dynamique épidémique et évolutive de la population pathogène post reproduction sexuée pendant la période inter-épidémique 183

1.3 Des scénarios multiples de croisements entre individus virulents et avirulents expliquant l'amplification de l'impact des associations pendant la période inter-épidémique 184

2 Les associations variétales : une stratégie de déploiement des résistances impliquant de prendre en compte le compromis entre « efficacité » et « durabilité » ? *186*

2.1 Les associations variétales, un moyen approprié pour comprendre la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale 186

2.2 La reproduction sexuée, un mécanisme à exploiter au sein des associations pour contrôler ou ralentir la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale 187

2.3 En dépit de la capacité déjà démontrée des associations variétales à réduire la sévérité des maladies, que sont les freins à leur utilisation ? 189

2.4 Les associations variétales, une stratégie pertinente de déploiement des résistances : Oui, mais à quelles échelles ? 190

Perspectives **193**

Cadre conceptuel de modélisation mécaniste permettant de simuler l'impact de la « fréquence de virulence » et des « proportion de variétés » sur la dynamique de la virulence dans les populations pathogènes *193*

1 Objectifs et caractéristiques de l'approche proposée *194*

1.1 Modéliser les processus identifiés pour mieux comprendre l'influence de paramètres d'intérêt .. 194

1.2 Intégrer les phases asexué et sexuée pour représenter l'évolution d'une population pathogène sur un pas de temps annuel complet 195

2 Proposition d'une structure de modèle et des hypothèses intégrées *196*

2.1 Module épidémique (phase asexuée) 197

2.1.1 Représentation du couvert en association variétale 197

2.1.2 Modélisation de la dynamique quantitative et qualitative de la population pathogène 198

2.1.3 Modélisation de la dynamique temporelle de la population pathogène 201

2.2.1 Simulation des flux d'individus à l'origine de la population parentale 204

2.2.2 Simulation des croisements entre individus parentaux à l'origine de la population de descendants 205

Conclusion **207**

Références **210**

Annexes **233**

Annexe 1 : Paramètres et variables du module épidemique *234*

Annexe 2 : Liste des publications *235*

Articles de revues à comité de lecture 235

Preprints 235

Dataset 235

Communications orales 236

Stages co-encadrés 236

LISTE DES FIGURES

Synthèse bibliographique

Figure 1 : Phénotypes et déterminants génétiques associés au modèle gène-pour-gène de la résistance qualitative. 19
Figure 2 : Dynamique de contournement de deux résistances qualitatives de type « *boom and bust* ». 22
Figure 3 : Étapes du contournement d'une virulence dans une population pathogène à l'échelle de la parcelle et processus évolutifs impliqués. 23
Figure 4 : Stratégies de déploiement des résistances variétales à différentes échelles spatiotemporelles. 25
Figure 5 : Triangle épidémiologique et cycle d'infection d'un champignon phytopathogène. 27
Figure 6 : Modes de colonisation des tissus de l'hôte selon le type trophique des champignons phytopathogènes et la phase/stade de leur développement. 28
Figure 7 : Modèles de sélection de la population pathogène modifiant la fréquence et la distribution des phénotypes. 31
Figure 8 : Phase sexuée du cycle de vie général des Pezizomycotina filamenteux, principale sous-classe des ascomycètes. 33
Figure 9 : Évolution de la proportion de la surface totale de blé tendre cultivée en France métropolitaine avec des associations variétales entre 1995 et 2019. 39
Figure 10 : Différents mécanismes impliqués dans la réduction d'une maladie dans les associations variétales. 41
Figure 11 : Symptômes de septoriose sur blé tendre et fructifications de *Zymoseptoria tritici*. 48
Figure 12 : Cycle de vie de *Zymoseptoria tritici*. 50
Figure 13 : Chronologie de l'infection du blé par *Zymoseptoria tritici*. 51
Figure 14 : Évolution du pourcentage de la surface de blé française et francilienne semée avec treize variétés porteuses de *Stb16q* entre 2005 et 2020. 56
Figure 15 : Représentation schématique de la dynamique annuelle d'une population de *Z. tritici* pathogène en cultures pures et en association variétale. 61

Chapitre I

Figure I.1. **(a)** Overview of the development of a Septoria tritici blotch epidemic adapted to **(b, c)** two pure stands and to **(d)** a mixture of the two wheat cultivars, one carrying the *Stb16q* resistance gene, and the other lacking this gene (cv. Cellule in proportion p_C and cv. Apache in proportion $1 - p_C$). 67
Figure I.2. Changes in the percentage of the area under wheat sown with **(a)** cv. Apache, **(b)** cv. Cellule, and **(c)** the 13 cultivars carrying *Stb16q* in France (black dots) and in the Parisian basin (Région Ile-de-France 'IdF'; white dots) from 2005 to 2020. 69
Figure I.3. **(a)** Example of two 102-strain batches, one obtained just after inoculation (right) and the other one week later (left). **(b-e)** Typical incompatible-compatible interaction between the FS1804 (avirulent against *Stb16q*) and FS2034 (virulent against *Stb16q*) strains on six Cellule and Apache leaves (three second leaves on the left and three third leaves on the right). 73
Figure I.4. Mean disease severity index SEV_v (mean percentage of the leaf area covered by pycnidia on cultivar v) according to the proportion of cv. Cellule (p_C) in the canopy. 77
Figure I.5. Frequency of *Z. tritici* strains considered virulent (grey bars) against *Stb16q* (i.e., causing sporulating area on cv. Cellule) and avirulent (white bars) among the populations collected on cv. Apache in pure stands ($p_C = 0$) and mixtures ($p_C = 0.25$, 0.5 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late (t2) stages of the 2018 and 2019 epidemics. 79

Figure I.6. Frequency of *Z. tritici* strains considered virulent (grey bars) against *Stb16q* (i.e., causing sporulating area on cv. Cellule) and avirulent (white bars) among the populations collected on cv. Cellule in pure stands (p_C = 1) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late (t2) stages of the 2018 and 2019 epidemics. 80
Figure I.7. Impact of mixtures on different indicators of the *Z. tritici* virulent subpopulations and their relationships at whole-canopy scale. 83

Figure I.S1. Design of the field experiment performed at the INRAE experimental station in Grignon (Yvelines, France, 48°51'N, 1°58'E) in 2018 and repeated in 2019 93
Figure I.S2. Overview of field conditions during disease assessments and sampling at the early (t1) and late (t2) stages of the epidemic. 94
Figure I.S3. Simplified method of inoculation developed for 'population-phenotyping', estimated to be twice as efficient as the classical method (30 isolates per half day x 36 days vs. 100 isolates per half day x 22 days). 95
Figure I.S4. Variability of *Z. tritici* blastospore concentration in the non-adjusted suspensions used for 'population-phenotyping'. 96
Figure I.S5. Thermal conditions to which the 32 batches of *Z. tritici* strains were exposed during population-phenotyping in the greenhouse. 96
Figure I.S6. Frequency of *Z. tritici* strains considered 'pathogenic' (i.e., causing sporulating area on Apache; grey bar) and non-pathogenic (white bar) among the populations collected on Cellule in pure stands (p_C = 1) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late stages (t2) of the 2018 and 2019 epidemics. 97
Figure I.S7. Frequency of *Z. tritici* strains considered pathogenic (i.e., causing sporulating area on Apache in the greenhouse; grey bars) and non-pathogenic (white bars) among the populations collected on Apache in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.50 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late stages (t2) of the 2018 and 2019 epidemics. 98
Figure I.S8. Comparison of the aggressiveness (AG for aggressiveness and AGc for conditional aggressiveness) of 2886 pathogenic strains according to their virulence status with respect to *Stb16q*. 99
Figure I.S9. Aggressiveness of the 47 *Z. tritici* strains on Cellule (C) and on the isogenic line Chinese Spring with Stb16q (CS-*Stb16q*) assessed during confirmatory individual phenotyping. 100
Figure I.S10. Analysis of disease severity data leading to the fixing at 10% of the relevant threshold (dashed line) for determining the virulence status of *Z. tritici* strains with respect to *Stb16q* 20 days post inoculation (dpi) in confirmatory individual phenotyping. 101
Figure I.S11. Impact of treatment (pure stands and mixtures) on the *Z. tritici* virulent subpopulation on each cultivar at the late stage of the epidemic (t2). 102

Chapitre II

Figure II.1. *Zymoseptoria tritici* populations on wheat tissues at the late stage of the epidemic (t2) and after interseason sexual reproduction (t3). 112
Figure II.2. Mean ascospore discharge index, ADIv (mean number of *Zymoseptoria tritici* ascospores collected from 1 g of residues of cultivar v), according to the proportion of cv. Cellule (p_C) in the canopy at t3, in 2018 and 2019. 117
Figure II.3. Change in the frequency of *Zymoseptoria tritici* strains considered virulent against *Stb16q* in the populations collected **(a, b)** from cv. Apache ($f_{t3,A,vir}$) and **(c, d)** cv. Cellule ($f_{t3,C,vir}$) in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5, and 0.75 for C1A3, C1A1, and C3A1, respectively) from t2 (wheat plants at the late epidemic stage) to t3 (wheat residues after interseason sexual reproduction) in 2018 and 2019. 118
Figure II.4. Impact of mixtures on the size of the *Zymoseptoria tritici* virulent subpopulation after sexual reproduction (t3) on wheat residues from each cultivar and at the whole-canopy scale. 120

Figure II.5. Comparison of the conditional aggressiveness (AGc) of 3563 strains collected on Apache and Cellule in the field trial, by sampling period: early epidemic stage (t1), late epidemic stage (t2) and after interseason sexual reproduction (t3). 122

Figure II.S1. Change in the frequency of *Zymoseptoria tritici* strains considered pathogenic in the populations collected **(a, b)** on cv. Apache and **(c, d)** cv. Cellule in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5, and 0.75 for C1A3, C1A1, and C3A1, respectively) from t2 (wheat plants at the late epidemic stage) to t3 (wheat residues after interseasonal sexual reproduction) in 2018 and 2019. 132
Figure II.S2. Relationship between the intensity of *Zymoseptoria tritici* sexual reproduction (ADI_V) on wheat residues during the interseason period (t3) and disease severity at the late stage of the epidemic (t2). 133

Chapitre III

Figure III.1. Design of the three-year experiment (2018, 2019, 2020) involving *Zymoseptoria tritici* strains virulent ('vir') and avirulent ('avr') against *Stb16q*. 144
Figure III.2. Management of sets of wheat residues, from the induction of *Zymoseptoria tritici* pseudothecia to the assessment of sexual reproduction intensity. 147
Figure III.3. Impact of virulence status with respect to Stb16q of the *Zymoseptoria tritici strains* used for co-inoculation ('avr × avr', 'avr × vir', 'vir × vir') on the intensity of asexual multiplication (expressed as disease severity) and the intensity of sexual reproduction (expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues; ADI) by cultivar (Apache, Cellule) and the arrangement of the different sets of residues ('arrangement A' in Figure 2A; 'arrangement B' in Figure 2B) during the three-year experiment. 151
Figure III.4. Contrasted timing of lesion appearance on adult wheat plants of cv. Cellule in 2020: five vs. eight weeks after co-inoculation. Flag leaves of Cellule were co inoculated with either two virulent strains (Leaf A, FS6503 × FS619) or with two avirulent strains (Leaf B, FS6176 × FS6191). 151
Figure III.5. Impact of the type of inoculation (single inoculations, co-inoculations) on the intensity of *Zymoseptoria tritici* sexual reproduction (expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues; ADI), by cultivar (Apache, Cellule) and the arrangement of the different sets of residues ('arrangement A' in Figure 2A; 'arrangement B' in Figure 2B) during the three-year experiment. 152
Figure III.6. Epidemiological processes, including spore transfers, leading to sexual crosses on wheat residues according to the origin of the *Zymoseptoria tritici* parental strains and their virulence status, **(a**, **b)** in the conditions of the three-year experiment and **(c)** in field conditions. 161

Figure III.S1. Clusters of *Zymoseptoria tritici* ascospore-derived colonies photographed seven days after ascospore ejection. 171
Figure III.S2. Decision trees used for investigation of the parenthood of *Zymoseptoria tritici* offspring strains based on the comparison of alleles for 12 SSR markers (m_i) in the cases of (**a**) co-inoculation and (**b**) single inoculation. 172
Figure III.S3. Intensity of *Zymoseptoria tritici* sexual reproduction (expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues of the same plant; ADI) and asexual multiplication (expressed as disease severity), by cultivar (Apache, Cellule) and type of inoculation during the three-year crossing experiment. 174

Perspectives

Figure IV.1 : Structure et étapes de calcul du modèle.....197
Figure IV.2 : Processus de dispersion des gouttelettes de pluie et des spores d'un agent pathogène dans un couvert en 3D.....199
Figure IV.3 : Exemple de représentation en 3D d'une plante à quatre feuilles, élément de base du couvert simplifié (à gauche) et de répartition des compartiments (type SIR) dans une feuille (à droite). 200
Figure IV.4 : Représentation schématique **(a)** de l'initialisation de l'état sanitaire d'une feuille de blé dans le couvert (feuille « source ») et **(b)** du transfert d'unités de contamination (gouttelettes) depuis cette feuille vers une feuille « puits » suite à l'impact d'une goutte de pluie sur la feuille source. 202
Figure IV.5 : Représentation des différents mécanismes impliqués dans la reproduction sexuée. Les schémas du bas illustrent les différents modes développement d'un couple parental de *Z. tritici* au cours d'un cycle infectieux.....203
Figure IV.6 : Représentation des interactions et processus impliqués dans la modélisation de la reproduction sexuée, de la fin d'une épidémie l'année n au début de l'épidémie de l'année n + 1.....205

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Table I.1. Number of *Z. tritici* strains sampled on each cultivar ('A' for Apache, 'C' for Cellule) for each treatment (C0A1, C1A3, C1A1, C3A1 and C1A0), at the early (t1) and late (t2) stages of the 2018 and 2019 epidemics, and phenotyped to determine virulence status. 71

Table I.S1. Actual proportion of wheat plants of cv. Apache (A) and cv. Cellule (C) in microplots in pure stands (C0A1 and C1A0) and in mixtures (C1A3, C1A1, and C3A1) at the late stage of epidemics in 2018 and 2019. 103
Table I.S2. The origin (treatment, from the following list: C1A3, C1A1, C3A1, C1A0; period, t1 or t2, in 2018) of the 47 *Z. tritici* strains shown to be avirulent against *Stb16q* established in the first population-phenotyping, for which virulence status was validated by confirmatory individual phenotyping. The total number of strains tested is indicated in brackets. 104
Table I.S3. Main sources of uncertainty and benefit-disadvantage analysis of the 'population phenotyping' method compared to the classical 'confirmatory individual phenotyping' method (see also Figure S3). 104

Chapitre II

Table II.1. Number of *Zymoseptoria tritici* strains sampled on each cultivar ('A' for Apache, 'C' for Cellule) for each treatment (C0A1, C1A3, C1A1, C3A1 and C1A0) after interseason sexual reproduction (t3) following the 2018 and 2019 epidemics, with phenotyping to determine virulence status. 114

Table II.S1. Impact of the various experimental factors (year, cultivar, treatment, and block) on the intensity of *Zymoseptoria tritici* sexual reproduction estimated by the ascospore discharge index (ADI; mean number of ascospores collected per 1 g of residues), according to ANOVA. 134
Table II.S2. Impact of the various experimental factors (year, period, cultivar, treatment, and block) on the number of strains virulent against *Stb16q* (i.e., causing sporulating lesions on cv. Cellule) and pathogenic strains (i.e., causing sporulating lesions on cv. Apache) in *Zymoseptoria tritici* populations collected on Apache and Cellule in the field trial, estimated with a generalised linear model. 135

Chapitre III

Table III.1. Identification of 17 *Zymoseptoria tritici* strains causing late lesions on wheat plants of cv. Cellule, 8 weeks after (co-)inoculation (June 15th, 2020), based on the comparison of their genotyping profiles with those of the 8 strains used for co-inoculation. 152
Table III.2. Parenthood of 278 *Zymoseptoria tritici* offspring strains sampled from ascospore-derived colonies obtained after nine single inoculations and 11 co-inoculations (a subset of all the inoculations performed in the three-year experiment). 156

Table III.S1. List of the 24 *Zymoseptoria tritici* strains used as parental strains in the three-year experiment. 175
Table III.S2. Intensity of asexual multiplication (disease severity) assessed for each type of co-inoculation and single inoculation in the three-year experiment. 176
Table III.S3. Genotyping data set (see Excel file in the INRAE Dataverse online data repository (https://data.inrae.fr/) at https://doi.org/10.15454/IPMIOX.). 176

Table III.S4. Intensity of sexual reproduction (ADI) assessed for each type of co-inoculation and single inoculation in the three-year experiment. ADI is expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues. 177
Table III.S5. Intensity of sexual reproduction (ADI) according to the proportion of the *Zymoseptoria tritici* virulent strain in the biparental inoculum suspension ('avr × vir'). 178
Table III.S6. Intensity of asexual multiplication (disease severity) according to the proportion of the *Zymoseptoria tritici* virulent strain in the biparental suspension ('avr × vir'). 179

Annexes

Tableau A.1. Liste des paramètres du module épidémique (phase asexuée) 234
Tableau A.2. Liste des variables du module épidémique (phase asexuée) 234

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 LA GESTION DE L'IMMUNITE VEGETALE DANS LES AGROSYSTEMES

1.1 La résistance variétale, pilier de systèmes agricoles productifs mais vulnérables

Afin d'augmenter les capacités de production après la seconde guerre mondiale, et grâce aux avancées techniques de la seconde moitié du XX siècle, les systèmes agricoles se sont organisés autour de quatre piliers : la mécanisation, l'amélioration variétale, l'utilisation d'intrants pour la fertilisation et la protection des cultures, et la simplification du système de culture (rotation courte, augmentation de la taille des parcelles, spécialisation des exploitations etc.). Cette intensification de l'agriculture a permis d'atteindre des objectifs de production ambitieux en Europe, mais la sécurité et l'autonomie alimentaire restent inégales selon les continents (Hazell & Wood, 2008). Le système a montré également plusieurs limites : diminution de la diversité des espèces cultivées, appauvrissement des sols, adaptation des populations de bioagresseurs (insectes, virus, bactéries, champignons, adventices) aux méthodes utilisées, dépendance aux intrants, impacts environnementaux etc. (Altieri, 1999). À cela s'ajoute un plafonnement des rendements du blé, voire une légère diminution, qui pourrait être plus prononcée sous les effets du changement climatique (Brown & Rosenberg, 1999 ; Launay *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, la méthode la plus utilisée pour protéger une culture contre les bioagresseurs reste l'application de produits phytosanitaires (fongicides, insecticides, herbicides). En raison des conséquences sur l'environnement et sur la santé humaine (Matson *et al.*, 1997 ; Bonnefoy, 2012), et en réponse aux attentes sociétales, les politiques agricoles européennes incitent à ce que l'immunité végétale et donc l'utilisation de sources de résistance variétale deviennent le premier pilier de protection des plantes (*e.g.* plan Ecophyto I et II). Les plantes cultivées sont sélectionnées afin de combiner dans une même variété des caractéristiques agronomiques d'intérêt (rendement, qualité organoleptique, caractéristiques morphologiques etc.) et une forte résistance aux bioagresseurs. Dans le cas des agents pathogènes (virus, bactéries, champignons), cette résistance peut être totale (résistance qualitative) sans développement de symptômes sur les plantes, ou partielle (résistance quantitative) avec le développement de symptômes légers ne compromettant pas, ou peu le rendement dès lors qu'ils restent sous le seuil de nuisibilité. Les gènes de résistance qualitative (voir 1.2) empêchent les agents pathogènes d'infecter, de se développer et de se reproduire sur les tissus de la plante hôte (Dodds & Rathjen, 2010).

La sélection de traits d'intérêt agronomique chez les plantes cultivées a commencé dès le début de l'agriculture. Historiquement, cette sélection se faisait par les agriculteurs avec l'observation au champ des phénotypes des plantes et aboutissait à l'obtention de variétés-population (sélection massale ; Bonneuil & Thomas, 2009 ; Bonnin *et al.*, 2014). La sélection s'est professionnalisée à la fin du XIX siècle : les premières variétés ont été créées et commercialisées, à partir de croisements spécifiques et de l'évaluation des caractéristiques des descendants obtenus. Après la seconde guerre mondiale, le passage d'une agriculture traditionnelle à une agriculture productiviste a favorisé l'utilisation de variétés modernes à haut potentiel de rendement (hybrides, lignées pures ou clones), adaptées à un système agricole simplifié et dépendant d'intrants (Malezieux, 2012). La faible variabilité génétique dans le panel de variétés modernes commercialisées et leur déploiement sous forme de couverts monovariétaux sur des vastes territoires a contribué à une érosion généralisée de la diversité génétique (Bonneuil & Thomas, 2009). Dans le cas du blé tendre en France, cette homogénéisation génétique est allée de pair avec la diminution du nombre de variétés cultivées (Bonnin *et al.*, 2014; Perronne *et al.*, 2017). La grande majorité des variétés de blé cultivées aujourd'hui est homozygote et homogène génétiquement (lignées pures). Or, l'intensification des pratiques agricoles et l'homogénéisation spatiale des variétés utilisées accélère l'évolution des populations pathogènes, qui s'adaptent aux résistances déployées (voir 1.3), rendant ce type de système vulnérable à certaines épidémies.

Dans ce contexte, les systèmes agricoles sont confrontés à plusieurs défis majeurs : répondre à la croissance démographique et à la sécurité alimentaire mondiale, réduire l'utilisation et la dépendance aux intrants de synthèse, préserver les ressources et assurer la résilience du système face aux aléas climatiques et sanitaires. Une des pistes actuellement explorée est de développer des systèmes de culture dont les pratiques s'inscrivent dans les principes de l'agroécologie, en pensant la parcelle agricole comme un écosystème (agroécosystème) et en favorisant les processus écologiques de régulation des bioagresseurs (voir 3.1) en s'appuyant sur l'interaction entre les différentes composantes de cet écosystème (Altieri, 1995 ; Malezieux, 2012). En ce qui concerne la protection des cultures, il s'agit de prendre exemple sur, voire d'exploiter, la coévolution entre les plantes et les bioagresseurs (voir 1.3) dans les systèmes naturels (Zhan *et al.*, 2015). Dans cette synthèse, je me focaliserai sur l'adaptation d'un agent pathogène fongique à la résistance génétique qualitative d'une céréale à paille.

1.2 La résistance qualitative

Les plantes cultivées mobilisent plusieurs stratégies de défense contre les agents pathogènes. La première est l'évitement du contact avec l'agent pathogène, grâce à des particularités morphologiques, phénologiques ou métaboliques de l'hôte. Si le contact a lieu, l'immunité ou la résistance de la plante, définie comme sa capacité à réduire et/ou arrêter la croissance, le développement et la reproduction de l'agent pathogène (Niks *et al.*, 2011), se met en place. Dans la majorité des cas, une première réponse immunitaire spécifique a lieu, conduisant à une réaction d'hypersensibilité qui provoque l'apoptose (mort cellulaire) à proximité du site de contact avec l'agent pathogène. Il existe d'autres réponses immunitaires plus sophistiquées, comme l'expression de la résistance qualitative. Une autre stratégie est la tolérance de l'agent pathogène, dont la présence n'altère pas ou peu le métabolisme de l'hôte (Niks *et al.*, 2011). Dans la littérature, il existe plusieurs terminologies pour décrire la réponse de l'agent pathogène face à la résistance de son hôte. Dans cette thèse, la « pathogénicité » (*pathogenicity*) correspond à la capacité globale d'un agent pathogène à se développer et se reproduire dans les tissus de l'hôte, en dépit de ses mécanismes de défense. L'aptitude de l'agent pathogène à infecter (ou non) l'hôte correspond à la composante qualitative de cette pathogénicité appelée « virulence » (*virulence*). Sa capacité à provoquer une quantité de symptômes plus ou moins grande correspond à sa composante quantitative appelée « agressivité » (*agressiveness* ; Lannou, 2012). Parmi les traits d'agressivité qui varient entre individus pathogènes il faut mentionner la période de latence, la capacité de sporulation, la taille et le nombre de lésions au cours d'une infection, et l'efficacité d'infection (Pariaud *et al.*, 2009). En principe, la résistance qualitative assure une protection totale, permettant ainsi de distinguer deux phénotypes de l'hôte vis-à-vis d'un individu pathogène : résistant ou sensible (Figure 1).

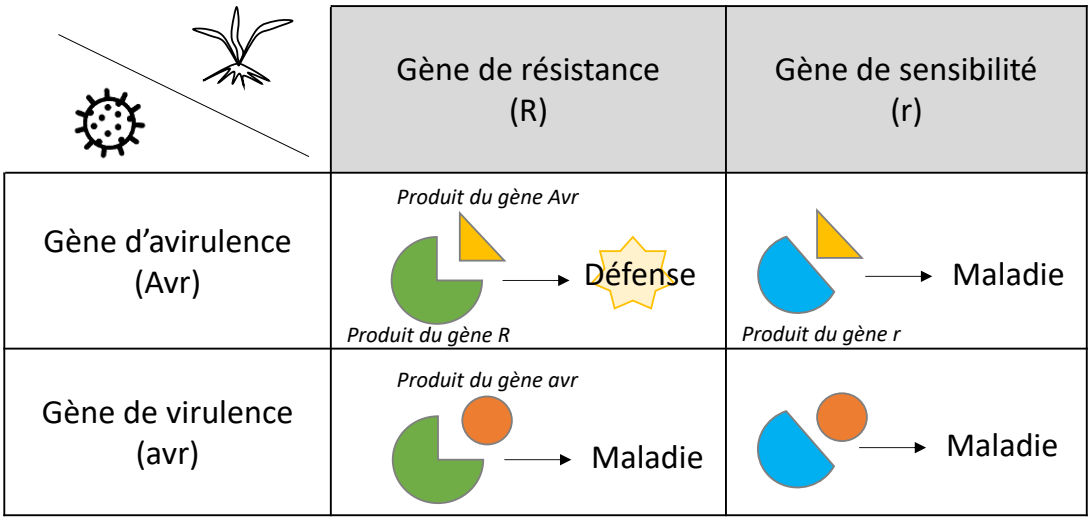


***Figure 1** : Phénotypes et déterminants génétiques associés au modèle gène-pour-gène de la résistance qualitative.* La plante possède un gène de résistance (R) ou non (r) déterminant la nature de son phénotype (sain ou malade) face à l'agent pathogène dont la possession (avr) ou l'absence (Avr) du gène de virulence correspondant détermine son phénotype (virulent ou avirulent). Les produits des gènes R et r (récepteurs) sont respectivement représentés par les formes vertes et bleues, et ceux des gènes Avr et avr (effecteurs) sont respectivement représentés par un triangle jaune et un cercle orange. Le résultat de la reconnaissance entre récepteurs et effecteurs est indiqué par une flèche : si elle a lieu il y a défense (interaction plante-pathogène incompatible), et dans le cas contraire il y a infection et maladie (interaction plante-pathogène compatible).

À l'échelle moléculaire, les mécanismes mis en place lors de la résistance qualitative ont été proposé dans le modèle gène-pour-gène (Flor, 1956 ; Dangl & Jones, 2001 ; Jones & Dangl, 2006). Lorsque l'immunité échoue, il y a infection, c'est-à-dire pénétration et colonisation des tissus de l'hôte par l'agent pathogène jusqu'à l'apparition de symptômes (Agrios, 2005) . Au cours de l'infection, l'agent pathogène sécrète des molécules appelées effecteurs, suite à l'activation d'un gène d'avirulence (gène Avr). Ces effecteurs modifient le métabolisme de la plante, soit pour stimuler l'infection, soit pour supprimer la réponse immunitaire primaire (Lo Presti *et al.*, 2015). Si la plante possède un gène de résistance (gène R), elle sécrète de façon systémique des récepteurs membranaires capables de reconnaître les effecteurs, ce qui déclenche la réponse immunitaire secondaire de la plante (Cook *et al.*, 2015 ; Kanyuka & Rudd, 2019). La résistance qualitative est spécifique d'une espèce pathogène mais également du génotype de l'individu pathogène car elle dépend des combinaisons alléliques des gènes Avr et R (Figure 1). Lorsque la reconnaissance des effecteurs a lieu, l'interaction plante-pathogène est dite incompatible et l'infection est bloquée : la plante est de phénotype sain et peut être qualifiée de résistante et l'individu pathogène d'avirulent. Dans le cas contraire, l'interaction est dite compatible et l'infection a lieu : la plante est

de phénotype malade et peut être qualifiée de sensible et l'individu pathogène de virulent. Un individu pathogène peut acquérir sa virulence suite à une mutation ponctuelle de l'allèle du gène Avr modifiant son expression (délétion complète, inactivation ou sous-expression) ou sa fonction, ce qui empêche la reconnaissance de l'effecteur par l'hôte (Jones & Dangl, 2006 ; Guttman *et al.*, 2014). Au-delà de ces connaissances, les découvertes récentes montrent que la relation plante-pathogène décrite dans le modèle gène-pour-gène est complexe, à la fois dans les mécanismes de reconnaissance des effecteurs et dans les interactions entre gènes R et gènes Avr (Petit-Houdenot & Fudal, 2017). Le déterminisme monogénique de ce type de résistance en fait un atout pour la sélection variétale car elle est a priori plus simple à intégrer dans les nouvelles variétés que des résistances quantitatives, contrôlées par plusieurs régions du génome (QTL : Quantitative trait loci ; McDonald & Linde, 2002).

Une résistance et sa virulence peuvent être instables et leur expression évoluer au cours s'une saison culturale. Une résistance peut ainsi être « ontogénique », c'est-à-dire qu'elle s'exprime de manière différente selon le stade de développement de l'hôte, conduisant par exemple une variété à être sensible au stade plantule mais résistance au stade adulte (Kema & van Silfhout, 1997; Brown *et al.*, 2015). De plus, dans l'agroécosystème, la relation plante-pathogène est à considérer à l'échelle populationnelle, entre une population de plantes cultivées et une population d'individus pathogènes. Les processus démogénétiques adaptatifs qui induisent une diversification au sein de ces populations modifient l'expression quantitative de cette relation. Dans la suite de cette thèse, je m'intéresserai à la dynamique d'évolution d'une population pathogène dans une population hétérogène d'hôtes, portant ou non une résistance qualitative. La taille de la population pathogène est définie comme étant le nombre d'individus qui la constituent et sa composition comme la fréquence d'individus virulents vis-à-vis de la résistance déployée dans une parcelle. Ces deux caractéristiques décrivent la structure de la population pathogène.

1.3 Le contournement des résistances qualitatives

La population pathogène et sa population hôte sont dans une dynamique co-évolutive antagoniste permanente (Dawkins & Krebs, 1979 ; Kaltz & Shykoff, 1998 ; Bergelson *et al.*, 2001), qui peut conduire à une sélection plus ou moins rapide favorisant les phénotypes les plus adaptés à l'hôte. Dans un écosystème naturel, les populations pathogènes font face à une variabilité importante des conditions environnementales et de présence des hôtes, à la fois spatiale et temporelle, conduisant à une co-évolution complexe et un impact généralement modéré des maladies (Keesing *et al.*, 2006 ; Laine & Hanski, 2006 ; Ravigné *et al.*, 2021). Dans un

agroécosystème, l'organisation spatiale et temporelle du peuplement végétal (couvert constitué de plusieurs plantes hôtes) est standardisée et simplifiée (Zhan *et al.*, 2015) : le choix de plantes cultivées, homogènes dans leur morphologie et dans leur génétique (critère pour l'inscription au catalogue officiel des variétés) affecte fortement la dynamique évolutive des populations pathogènes associées. Par ailleurs, une variété très résistante et de bonne qualité agronomique aura tendance à être utilisée à grande échelle, créant alors une pression de sélection forte et unidirectionnelle sur les populations pathogènes, ce qui pourra mener à une sélection rapide des individus virulents dans la population et donc à un contournement de la résistance (Cowger *et al.*, 2000 ; Hovmøller & Justesen, 2007 ; de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012). En général, la variété devenue sensible est remplacée par une variété portant une nouvelle résistance qualitative, si elle est disponible. Ce cycle d'adaptation de la population pathogène face à une résistance variétale est communément appelé « *boom and bust* » (Figure 2 ; Brown & Tellier, 2011 ; Goyeau *et al.*, 2021). Chez les céréales à pailles, les cas de contournement sont régulièrement décrits dans la littérature, à la fois chez des organismes à reproduction clonale – comme l'adaptation de populations de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, responsable de la rouille jaune, au gène Yr17 (Bayles *et al.*, 2000 ; de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012) – et dans une moindre mesure chez des organismes à reproduction sexuée – comme l'adaptation de populations de *Zymoseptoria tritici* à la variété Gene, très résistante, aux États-Unis (Cowger *et al.*, 2000).

Théoriquement, l'avantage évolutif de la virulence est limité par une réduction de l'agressivité chez les individus les plus adaptés (Van der Plank, 1975 ; Tian *et al.*, 2003 ; Laine & Barrès, 2013), ce que l'on appelle « coût de fitness à la virulence ». En effet, le gain d'une virulence peut affecter des allèles d'avirulence associés à d'autres fonctions du métabolisme du pathogène, dont ses capacités d'infection (Montarry *et al.*, 2010 ; Goyeau *et al.*, 2021). Ainsi, les individus virulents sont théoriquement attendus moins agressifs, ce qui peut contribuer à limiter la généralisation de la virulence dans la population pathogène dès lors que ce désavantage compétitif est important. Cependant, de tels coûts de fitness à la virulence peuvent être faibles, voire ne pas exister, notamment dans le cas de populations pathogènes génétiquement très diversifiées et des recombinaisons alléliques permanentes. En pratique, ces coûts de fitness à la virulence ont rarement été mis en évidence expérimentalement (*e.g.* Montarry *et al.*, 2010), d'une part parce que les traits affectés ne sont pas forcément identifiés ou sont difficilement quantifiables, et d'autre part parce que des conditions particulières, comme un stress, peuvent être nécessaires à leur expression (Tellier & Hamelin, 2021).

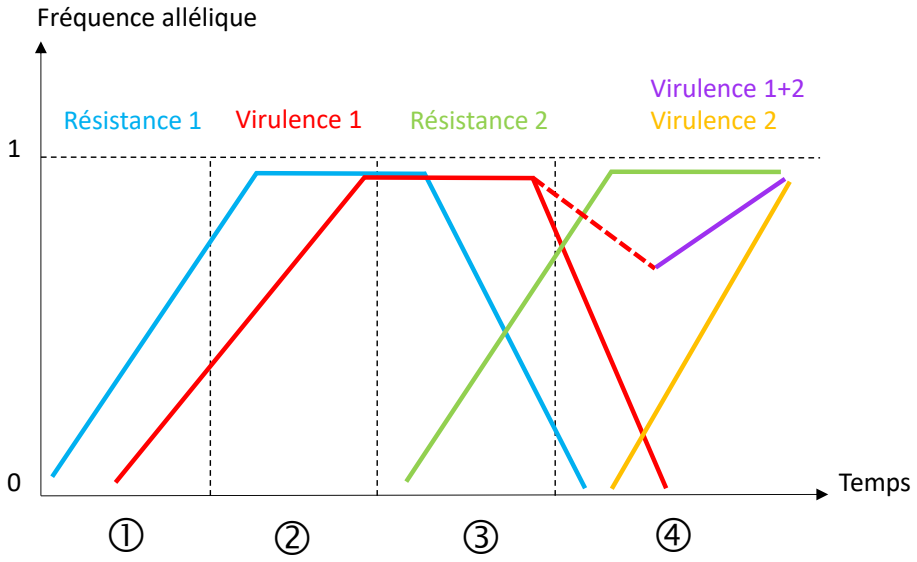


Figure 2 *: Dynamique de contournement de deux résistances qualitatives de type « boom and bust ».* Les quatre étapes de cette dynamique (traits en pointillés), suite au changement de la fréquence allélique de deux virulences dans une population pathogène dans le temps, sont les suivantes : ① une nouvelle variété contenant la résistance qualitative 1 (courbe bleue) est largement déployée dans le paysage agricole ; ② l'allèle de virulence 1 (courbe rouge) augmente en fréquence dans la population pathogène locale jusqu'à sa quasi généralisation ; ③ la variété résistante 1 est contournée et perd son efficacité entraînant son remplacement par une variété contenant la résistance qualitative 2 (courbe verte) ; ④ le fort déploiement de la résistance 2 augmente la fréquence de l'allèle de virulence 2 (courbe jaune) ; l'allèle de virulence 1 diminue en fréquence selon son coût de fitness (faible : pointillées, fort : trait plein) ; si ce coût est faible, la pression de sélection exercée par la résistance 2 sélectionne dans la population pathogène des individus cumulant les virulences 1 et 2 (courbe violette ; d'après Tellier & Hamelin, 2021).

À l'échelle d'une parcelle, le contournement d'une résistance est un processus évolutif dynamique qui peut être divisé en trois étapes : l'émergence, la multiplication et la dispersion des individus virulents dans la population pathogène locale (Figure 3). La fixation d'une virulence dans une population pathogène survient lorsque la fréquence des individus virulents se stabilise à des niveaux élevés. À l'échelle populationnelle, la dynamique de contournement d'un gène de résistance peut alors être assimilée à une « érosion » immunitaire. Lorsque la diversité génétique de l'agent pathogène en question est très élevée, comme dans le cas de *Z. tritici* (McDonald *et al.*, 2022), on peut considérer que la probabilité qu'un variant virulent préexiste dans une parcelle est très élevée (voir 2.4). Le phénomène de contournement est souvent détecté au cours de la dernière étape, lorsque la perte d'efficacité de la résistance commence à être quantifiable à l'échelle d'une parcelle cultivée avec l'apparition de quelques symptômes sur des plantes jusqu'alors totalement résistantes (*e.g.* Kildea *et al.*, 2020).

La mise au point de marqueurs moléculaires permettant de suivre les virulences associées aux résistances qui sont déployées implique de connaître la ou les sources de résistance portées par les variétés (gènes majeurs ou QTL), ce qui n'est pas souvent le cas (techniquement difficile et/ou absence de volonté de partager l'information).

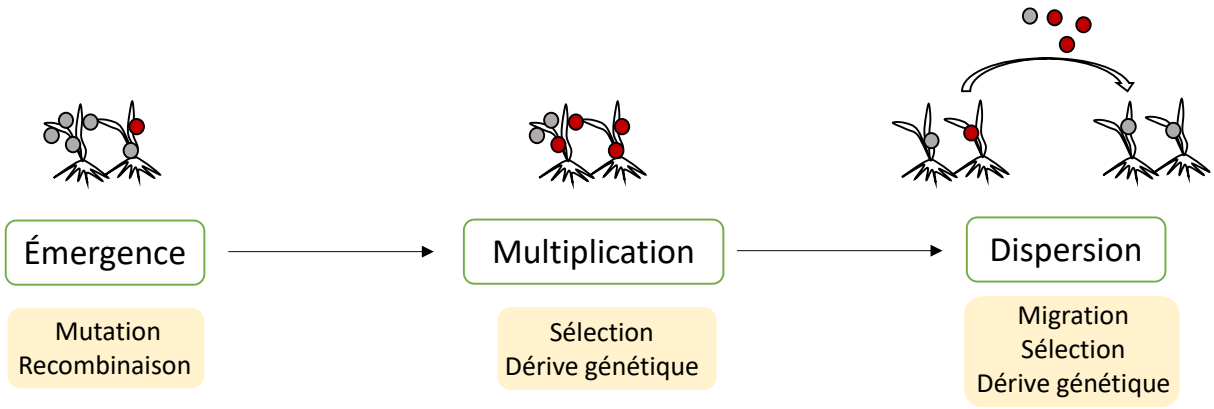


Figure 3 *: Étapes du contournement d'une virulence dans une population pathogène à l'échelle de la parcelle et processus évolutifs impliqués.* Les cercles rouges et gris représentent les individus virulents et avirulents respectivement dans la population pathogène. Les étapes du contournement de la virulence sont encadrées en vert et les processus évolutifs impliqués encadrés en jaune (d'après Gómez *et al.*, 2009 ; Goyeau *et al.*, 2021).

1.4 Quelles stratégies de déploiement d'une résistance qualitative permettraient de faire durer son efficacité ?

La rapidité de contournement d'une résistance dépend de plusieurs facteurs : le cycle de vie de l'agent pathogène et sa biologie (voir partie 2) ; la pression de sélection qui s'exerce, en partie déterminée par le niveau d'utilisation et le mode de déploiement de la résistance ; la pression de maladie liée au contexte épidémique. Comme le nombre de résistances qualitatives connues et efficaces est restreint, l'enjeu est d'identifier et d'optimiser les techniques culturales permettant de moduler le déploiement des résistances et ainsi arriver à prolonger leur durée de vie. Par « prolonger » il faut entendre le fait de retarder l'évolution de la population pathogène vers la fixation d'une virulence en ralentissant la dynamique de contournement de la résistance à une ou plusieurs des trois étapes décrites dans le paragraphe précédent (Figure 3). Mais cela peut également signifier « recycler » des résistances déjà contournées. Johnson (1984) a défini la durabilité d'une résistance comme étant le fait de pouvoir conserver son efficacité dans le temps, malgré une utilisation intense dans des conditions propices aux maladies. La résistance qualitative est réputée moins durable que la résistance quantitative car il suffit d'une mutation du

gène Avr pour qu'un individu virulent émerge dans la population pathogène. Mais l'efficacité de la résistance quantitative peut également s'éroder suite à la sélection d' individus plus agressifs dans les populations (Lannou, 2012). La recherche de stratégies de déploiement de la résistance permettant d'en concilier l'efficacité et la durabilité est aujourd'hui un front de science (Burdon *et al.*, 2014 ; Mundt, 2018 ; Rimbaud *et al.*, 2018a ; Créte *et al.*, 2020). Un des objectifs communs à plusieurs travaux de recherche actuels est de s'appuyer sur les connaissances de l'écologie évolutive des populations en réintroduisant un certain niveau de diversité (Stuthman *et al.*, 2007 ; Beillouin *et al.*, 2021), conjointement à l'utilisation de méthodes spécifiques de protection des plantes (voir 3.1). Ces travaux partent du principe que cette diversité permettrait de se rapprocher de la dynamique de coévolution entre une population hôte et une population pathogène qui prévaut dans les écosystèmes naturels, ce qui permettrait de limiter l'occurrence et l'ampleur des épidémies (Laine & Hanski, 2006). Le but est de proposer un déploiement des sources de résistance dans les agrosystèmes qui limiterait les capacités d'adaptation de la population pathogène dans un contexte épidémiologique précis.

Plusieurs échelles et modes de déploiement de la résistance dans des systèmes diversifiés dans le temps et dans l'espace ont été explorés (Figure 4 ; Papaïx *et al.*, 2018; Rimbaud *et al.*, 2021b) : le cumul de plusieurs sources de résistance à l'échelle de la plante (pyramidage de gènes ; Mundt, 2018), de la parcelle (associations entre espèces ou entre variétés, multi-lignées, variétés populations) ou du paysage (mosaïques), ainsi que l'alternance des espèces cultivées (rotations, cultures intercalaires ou cultures déphasées). Quelques auteurs ont comparé et hiérarchisé par modélisation ces stratégies selon la durabilité obtenue de la résistance qualitative (Djidjou-Demasse *et al.*, 2017 ; Lof *et al.*, 2017 ; Rimbaud *et al.*, 2018a). Si l'individu virulent n'est pas présent dans la population initiale, le pyramidage apparaît comme la stratégie la plus efficace à court terme, avec une durabilité qui dépendrait du nombre de mutations nécessaires à l'émergence de la virulence et des coûts de fitness associés (Fabre *et al.*, 2009). Si l'individu virulent préexiste dans la population initiale, alors les mosaïques semblent plus efficaces et les rotations plus durables. Comme souligné par ces mêmes auteurs, définir un unique déploiement optimal est difficile car il dépend de plusieurs critères parmi lesquels la finalité de la culture, le pathosystème, le contexte épidémique et évolutif, et la connectivité entre les parcelles. Compte tenu de la multiplicité des effets obtenus à différentes échelles, il est probable que le meilleur compromis soit obtenu en combinant plusieurs stratégies de déploiement.

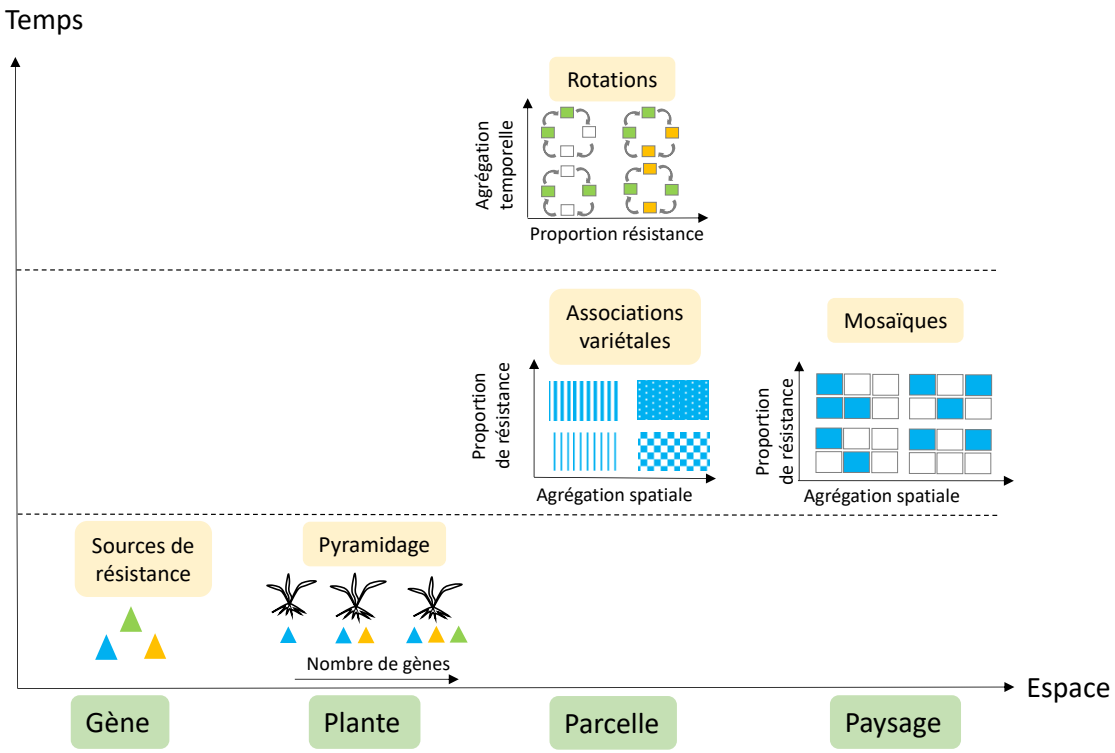


***Figure 4** : Stratégies de déploiement des résistances variétales à différentes échelles spatiotemporelles.* Une stratégie de déploiement résulte de la combinaison de différentes sources de résistance à l'échelle de la plante (pyramidage), qui peut être cultivée en association avec d'autres variétés de la même espèce (association variétale), sous différentes formes d'agrégation spatiale, ou en rotation avec ces variétés, dans une parcelle qui se situe elle-même dans une mosaïque à l'échelle du paysage. Les différentes stratégies peuvent se combiner et cohabiter au sein d'un même système de culture. Par soucis de simplicité, les mélanges et mosaïques proposés comportent une variété sensible représentée en blanc et une variété résistante représentée en bleu (d'après Vidal, 2017 ; Rimbaud *et al.*, 2021b).

Caractériser les effets de la diversification génétique à l'échelle du paysage sur l'évolution de la structure des populations vis-à-vis des résistances qualitatives permet de formaliser leur dynamique de contournement, en tout cas de manière théorique. À l'échelle de la parcelle, il existe peu d'études expérimentales permettant de d'estimer cet impact, les études se focalisant généralement sur le risque d'apparition d'individus cumulant plusieurs virulences ou plus agressifs (Chin & Wolfe, 1984 ; Dileone & Mundt, 1994 ; Villaréal & Lannou, 2000 ; Cowger & Mundt, 2002a ; Lannou *et al.*, 2005). Les dynamiques d'émergence et de généralisation d'une virulence dans la population pathogène sont expérimentalement peu explorées (voir 3.5). Or, il est essentiel d'identifier et de découpler les mécanismes conduisant à l'adaptation de la population pathogène à l'échelle de la parcelle et au-delà d'une saison culturale (voir 2.4) en englobant l'ensemble du cycle de développement de l'agent pathogène à un pas de temps annuel.

2 IMPACT DES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES SUR LES DYNAMIQUES ADAPTATIVES DE LEURS POPULATIONS : CONSEQUENCES POTENTIELLES SUR L'IMMUNITE DE L'HOTE

Pour comprendre la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale, il est nécessaire d'identifier les processus biologiques au cours de son cycle de vie susceptibles de modifier l'interaction avec son hôte. Il faut d'abord bien connaître les modalités d'interactions avec l'hôte au cours de l'épidémie, avant de recenser les caractéristiques et/ou étapes du cycle de vie qui pourraient accélérer l'adaptation, en particulier les conditions de transmission d'une adaptation aux générations suivantes et au-delà de l'épidémie.

2.1 Diversité des interactions plante-pathogène : modes de développement et types trophiques

Pour comprendre comment fonctionne une épidémie, il faut revenir aux concepts qui décrivent son développement dans le temps et dans l'espace (Zadoks & Schein, 1979). Le triangle épidémiologique présente les interactions entre un peuplement hôte, son environnement et une population pathogène (Figure 5). Une maladie se développe sur une plante hôte sensible lorsque celle-ci entre en contact avec un agent pathogène, qui l'infecte dès lors que les conditions sont favorables à l'infection. Chez les champignons phythopathogènes, il existe une grande diversité de cycles de vie avec des modalités d'infection, des modes de développement et des types trophiques différents je détaillerai ci-dessous. Cette diversité rend parfois difficile la catégorisation des champignons phythopathogènes sur la base des processus infectieux et épidémiologiques, d'autant plus que leurs caractéristiques ne sont pas toujours univoques (Lo Presti *et al.*, 2015). Il est toutefois possible de proposer un schéma général et simplifié du cycle de vie (Figure 5 et Figure 6). En premier lieu, différentes modalités d'infection ont été décrites dans la littérature : elles dépendent du site de pénétration dans les tissus de l'hôte et des structures spécialisées que les champignons forment après la germination des spores (Mendgen & Deising, 1993 ; Mendgen *et al.*, 1996 ; Tucker & Talbot, 2001).

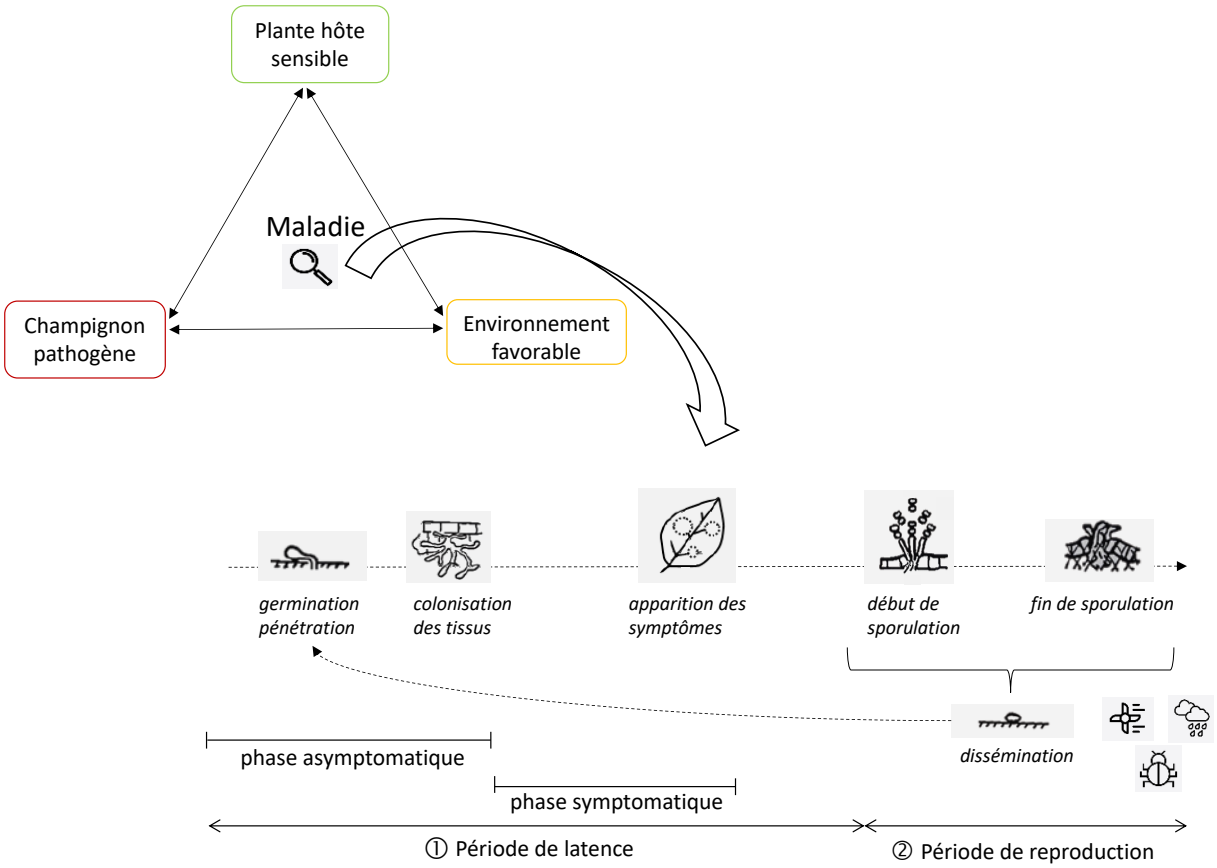


Figure 5 : Triangle épidémiologique et cycle d'infection d'un champignon phytopathogène. Les flèches doubles illustrent l'interaction entre la population d'hôtes sensibles et la population d'individus pathogènes virulents dans des conditions environnementales favorables à la maladie qui conduisent à une épidémie. L'épidémie peut se diviser en deux périodes : ① la période de latence pendant laquelle la spore du champignon pathogène germe, avant que celui-ci ne pénètre et colonise les tissus de l'hôte, provoquant des symptômes ; ② une période infectieuse au cours de laquelle le champignon pathogène produit de nouvelles spores capable de transmettre la maladie à d'autres hôtes par différents modes de dispersions tels que le vent, la pluie ou les insectes (d'après Zadoks & Schein, 1979 et Boixel, 2020).

Les champignons phytopathogènes se différencient également par leur type trophique, c'est-à-dire leur façon de puiser dans les ressources de l'hôte afin d'assurer leur croissance pendant la phase de colonisation des tissus (feuilles, racines, graines etc.). Les organismes biotrophes prélèvent des nutriments dans les tissus de l'hôte en vie, certains se développant alors uniquement dans l'espace inter-cellulaire (apoplaste), tandis que les nécrothropes dégradent ces tissus pour en prélever les ressources nécessaires. Les organismes hémibitrophes passent successivement par chacun de ces types trophiques au cours de leur cycle de vie. Enfin, les organismes saprothrophes se développent sur les tissus morts de végétaux (pas forcément considérés comme leurs « hôtes » étant donné l'absence de spécificité), sans avoir besoin d'infecter préalablement les tissus.

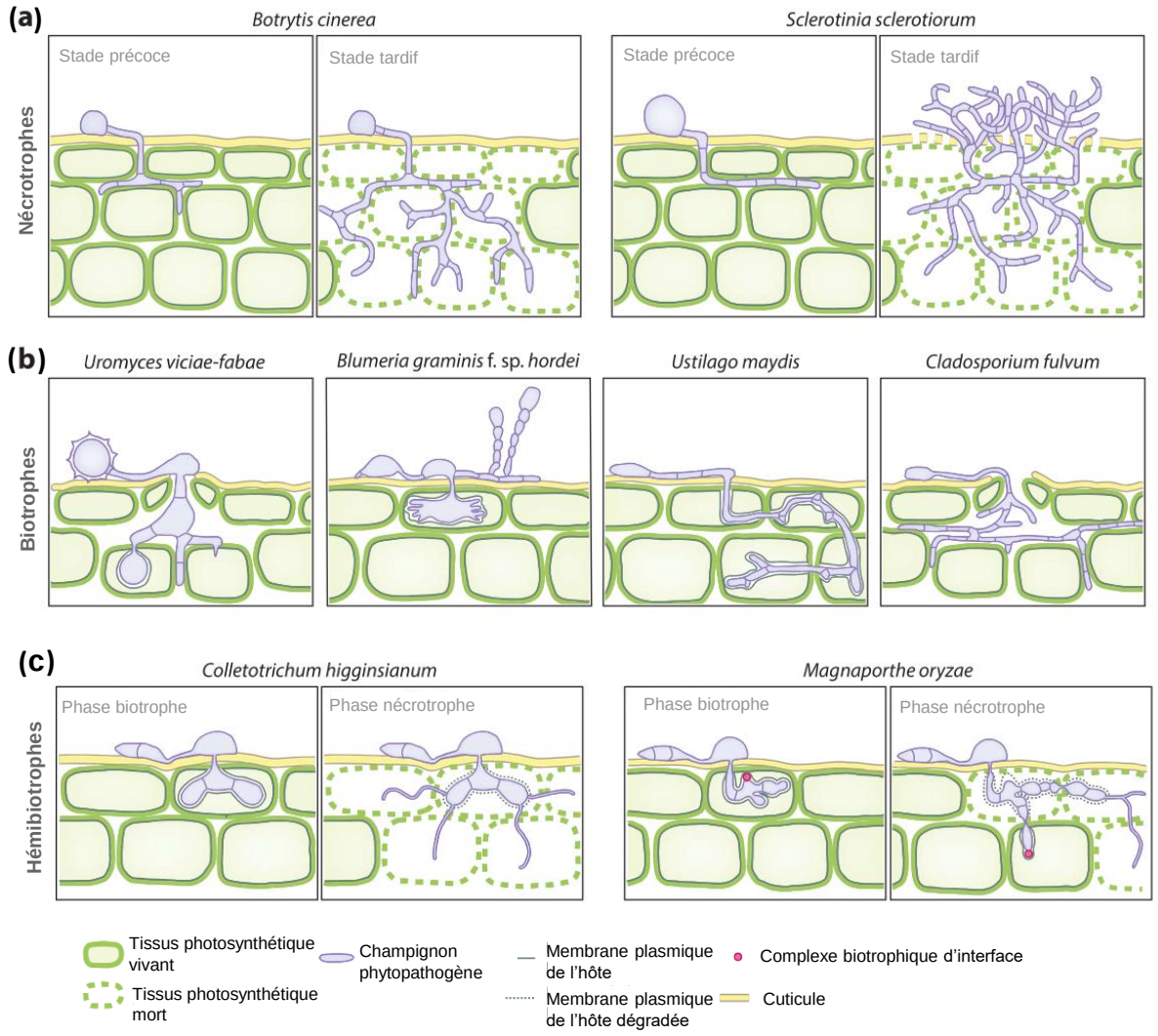


***Figure 6** : Modes de colonisation des tissus de l'hôte selon le type trophique des champignons phytopathogènes et la phase/stade de leur développement.* **(a)** Les champignons nécrotrophes tels que *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* se développent en général sous la cuticule et tuent les cellules végétales en sécrétant des métabolites toxiques et des protéines. **(b)** Les champignons biotrophes tels que *Uromyces viciae-fabae* et *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* forment un haustorium, une structure alimentaire, suite à plusieurs étapes de spécialisation cellulaire. Après une colonisation intracellulaire, des champignons comme *Ustilagos maydis* se développent plus tardivement dans l'apoplaste, induisant des excroissances végétatives. *Cladosporium fulvum*, quant à lui, colonise d'abord l'apoplaste et produit des fructifications asexuées (conidiophores) provoquant une mort cellulaire suite au blocage des stomates. **(c)** Les champignons hémibiotrophes tels que *Colletotrichum* spp. et *Magnaporthe oryzae* développent dans un premier temps des hypes invasives qui dégradent tardivement les tissus de l'hôte, pendant la phase nécrotrophe (d'après Lo Presti *et al.*, 2015).

Ce type trophique est caractéristique des champignons dits « décomposeurs », mais certains champignons phythopathogènes comme *Zymoseptoria tritici*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Leptosphaeria maculans* et *Botrytis cinerea*, capables de coloniser des résidus

de culture, présentent aussi une phase que l'on peut qualifier de saprotrophe (Halama & Lacoste, 1992 ; West *et al.*, 2001 ; Elad *et al.*, 2007 ; Steinberg, 2015). Certaines espèces de champignons peuvent se développer à l'intérieur des tissus végétaux sans causer des symptômes, puis en causer, sous l'influence de différents facteurs environnementaux biotiques ou abiotiques (*e.g.* Wheeler *et al.*, 2019). Ces espèces sont à rapprocher des microorganismes exclusivement endophytes qui se développent à l'intérieur des tissus végétaux, dans lesquels s'établit alors un équilibre entre les mécanismes d'immunité de l'hôte et de colonisation du champignon (Hardoim *et al.*, 2015). D'autres espèces ont un comportement épiphyte et se développent pendant une période plus ou moins longue à la surface du végétal. À ce jour, il existe peu d'observations de ce type de croissance chez les champignons phytopathogènes (*e.g.* Fones *et al.*, 2017), qui est en revanche assez courant chez les bactéries phytopathogènes (Wilson & Lindow, 1994; Hirano & Upper, 2000). Pour les premiers, on peut observer plutôt une élongation d'hyphes à la recherche de nutriments (Markham, 1992 ; Biswas & Morschhäuser, 2005).

En conclusion, au cours de son cycle de vie, un champignon phytopathogène peut engager différentes type d'interactions avec son hôte, dans des conditions environnementales fluctuantes, qui le mènent à privilégier certains mode de développement, de façon parfois transitoire (Schulz & Boyle, 2005; Kogel *et al.*, 2006). Le caractériser par un seul type trophique est donc réducteur et les connaissances à ce sujet sont régulièrement repensées et discutées au gré de nouvelles connaissances acquises, généralement issues de résultats expérimentaux (Sanchez-Vallet *et al.*, 2015 ; Selosse *et al.*, 2018 ; Brennan *et al.*, 2019).

2.2 Caractéristiques des populations pathogènes favorisant leur adaptation aux résistances variétales qualitatives

L'évolution des populations pathogènes mobilise différentes forces évolutives, parmi lesquelles la mutation (voir 1.3), la migration et la dérive génétique. La dérive génétique induit un changement aléatoire de la fréquence allélique pouvant entraîner la disparition ou la fixation d'un caractère, indépendamment de l'avantage sélectif qu'il confère, par exemple en termes de survie ou reproduction (Choudhuri, 2014 ; Halkett *et al.*, 2021). La dérive dépend de la taille de la population : plus il y a d'individus, plus la dérive est faible et plus la population est diversifiée. Un événement aléatoire qui réduirait fortement cette taille pourrait changer radicalement les fréquences alléliques dans la population en peu de temps (notion de goulot d'étranglement ; Charlesworth, 2009). La migration, définie comme le déplacement d'individus d'une population vers une autre, s'accompagne d'un flux de gènes, notamment des gènes de virulence

transmis à longue distance par des spores (Halkett *et al.*, 2021). La sélection naturelle, la force évolutive probablement la plus connue, s'opère lorsqu'un caractère phénotypique quantitatif héritable confère un avantage compétitif aux individus, par exemple une capacité de reproduction accrue ou la possibilité d'infecter certaines variétés de plantes hôtes très répandues. Cette sélection favorise les phénotypes les mieux adaptés à l'environnement biotique et abiotique, ce qui augmente leur fréquence et finalement affecte la composition de la population.

Il est possible de distinguer quatre types de sélection dans une population (Figure 7 ; Choudhuri, 2014). La sélection stabilisatrice favorise des individus exprimant un phénotype intermédiaire (généraliste), souvent adaptés à des environnements fluctuant (Hallsson & Bjorklund, 2012). La sélection directionnelle se caractérise par une « radicalisation » de la population, les phénotypes avantagés par les conditions extrêmes (spécialistes) étant favorisés et/ou les phénotypes délétères étant contre-sélectionnés, en fonction des pressions de sélection auxquelles les individus sont exposés. La sélection disruptive conduit à une diversification de la population car elle avantage simultanément plusieurs phénotypes extrêmes au détriment des phénotypes intermédiaires. Si aucun changement ne s'opère dans la composition de la population, la sélection est dite d'équilibre. Dans le cas du contournement d'une résistance qualitative de l'hôte utilisée à grande échelle, sans pour autant être généralisée, et dont le déterminisme est simple (par exemple monogénique), la sélection qui s'exerce sur la population pathogène peut être à la fois directionnelle et disruptive. Elle aboutit à la différenciation de la population selon deux phénotypes extrêmes, virulent ou avirulent, dont les fréquences respectives se stabilisent, mais avec un phénotype virulent dont la fréquence peut augmenter rapidement dans la population pathogène si la pression de sélection augmente, par exemple via le déploiement du gène de résistance sur de vastes territoires. À niveau de déploiement égal, la manière dont le gène est utilisé (alternance à différentes échelles spatiales et temporelles) peut aussi modifier cette pression de sélection et donc l'équilibre entre les différents phénotypes.

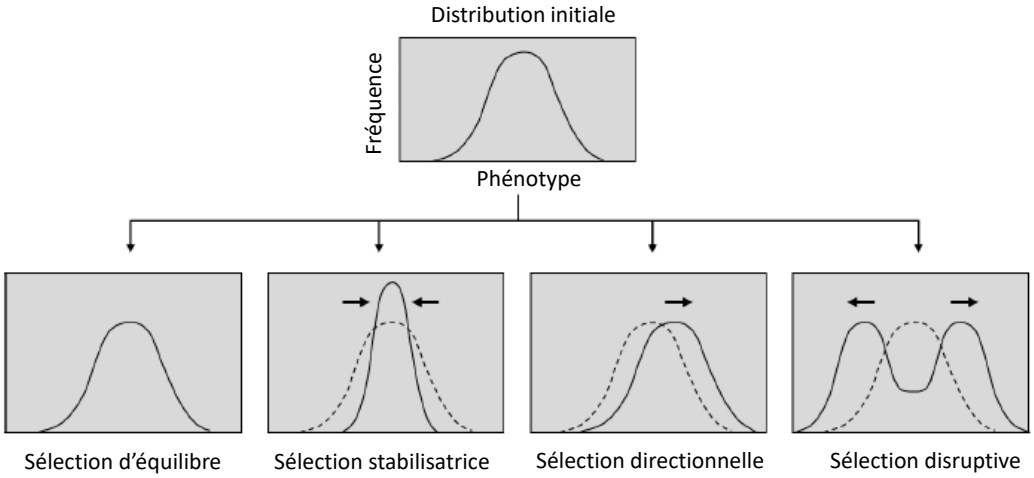


***Figure 7** : Modèles de sélection de la population pathogène modifiant la fréquence et la distribution des phénotypes.*Les différents types de sélection sont classés en fonction de leur impact sur la distribution initiale (courbe pleine) des phénotypes. Les flèches illustrent la direction dans laquelle la sélection modifie la distribution de la nouvelle population (courbe en pointillée), c'est-à-dire les valeurs des caractères qui sont sélectionnés positivement (d'après Choudhuri, 2014 ; Boixel, 2020).

Au regard de ces forces évolutives, certains traits d'histoire de vie des agents pathogènes peuvent évoluer, par exemple en réponse au déploiement d'une résistance qualitative. Il faut d'abord s'intéresser à la première étape du contournement de la résistance, qui correspond à l'émergence d'un ou plusieurs individus virulents (voir 1.3). La dynamique de contournement diffère selon que ce type d'individus est présent ou non dans la population pathogène initiale (van den Bosch & Gilligan, 2003). Si ce type d'individu n'existe pas, le temps nécessaire à son émergence dépend de la taille de la population et des taux de mutation. Une fois la virulence apparue, les mécanismes qui régulent la multiplication des individus virulents dans la population sont les moteurs de cette dynamique de contournement. Parmi les déterminants, il faut mentionner les éventuels « coûts de fitness » associés à ces virulences (Fabre *et al.*, 2009), une forte plasticité du génome (Bertazzoni *et al.*, 2018), un haut potentiel de flux de gènes avec des migrations multi-échelles et une taille de population importante en effectifs ou stable génétiquement (McDonald & Linde, 2002 ; Barrett *et al.*, 2008).

Enfin, le processus de dispersion de la population est également un facteur important à prendre en compte, car il détermine le type de pression de sélection (Thrall & Burdon, 1997). La dispersion de l'inoculum à longue distance peut aboutir à la migration entre populations, comme mentionné plus haut. Dans les cas de dispersion à faible distance, lorsque la spore d'un individu entre en contact avec un hôte ayant le même génotype

que l'hôte d'origine, celle-ci a déjà la capacité de l'infecter (autoinfection), ce qui maintient la pression de sélection et peut même tendre à terme vers une augmentation du niveau d'agressivité de la population pathogène (Lannou, 2012 ; Burdon *et al.*, 2014), ce que confirme des modèles théoriques (Lannou, 2001 ; Marshall *et al.*, 2009). Si la spore d'un individu rencontre un hôte ayant un autre génotype (alloinfection), et donc un niveau de résistance potentiellement différent de celui de son hôte d'origine, l'infection peut ne pas avoir lieu. À l'échelle populationnelle cela peut être assimilé à un effet « filtre » variétal. Enfin, cela pourrait contribuer à diversifier la composition de la population pathogène, notamment si le nombre de sources de résistance rencontrées est important, ce qui peut être le cas dans les associations variétales (voir partie 3).

2.3 La reproduction sexuée, source de diversité chez les ascomycètes

Les champignons phytopathogènes présentent plusieurs modes de reproduction qui contribuent différemment à leur capacité d'adaptation à un environnement (Otto, 2009 ; Ni *et al.*, 2011). De manière générale la reproduction sexuée accroît la diversité génotypique (diversité de combinaison d'allèles) des champignons phytopathogènes, et des ascomycètes en particulier : d'une part elle et permet l'apparition de nouvelles combinaisons d'allèles, qui seront favorisées si elles procurent un avantage sélectif par rapport aux contraintes environnementales, et d'autre part elle fait disparaître ces mêmes combinaisons par le jeu du brassage. En revanche, l'impact de la reproduction sexuée est moindre sur la diversité allélique, qui est plutôt modifiée par les processus de sélection sur lesquels la multiplication asexuée peut avoir un impact plus important, en particulier dans le cas des épidémies polycycliques.

Les champignons se distinguent selon leur capacité à se reproduire avec n'importe quel autre thalle y compris eux-mêmes (homothallisme), ou exclusivement avec un autre thalle (hétérothallisme ; *e.g.* Alby *et al.*, 2009). Chez les champignons ascomycètes filamenteux hétérothalliques, il existe un système d'accouplement basé sur les « types sexuels » (*mating type*) qui détermine la compatibilité des partenaires sexuels (Debuchy & Turgeon, 2006 ; Ni *et al.*, 2011). Pour que la reproduction sexuée ait lieu, chaque partenaire doit développer des organes sexuels (Figure 8) : un ascogone pour le partenaire « femelle » et une anthéridie pour le partenaire « mâle » (Bennett & Turgeon, 2016). De nombreux champignons filamenteux sont capables de développer ces deux types d'organes, indépendamment de leur type sexuel. La cellule hyphale femelle se spécialise en un trichogyne. La fécondation a lieu lorsque le noyau d'une cellule mâle s'introduit dans le trichogyne. Les deux noyaux se divisent en formant une

fructification sexuée (*e.g.* périthèce) avant de fusionner suite à la détection du noyau compatible. La reconnaissance d'individus de types sexuels compatibles repose sur l'émission et la réception de phéromones (Ni *et al.*, 2011), dont l'identification réciproque est rendue possible par la simple proximité physique des deux parents (Debuchy *et al.*, 2010). Chez *Neurospora crassa* l'anthéridie secrète constitutivement des phéromones qui attirent le trichogyne d'un partenaire compatible vers la cellule mâle (Bistis, 1983 ; Brun *et al.*, 2021).

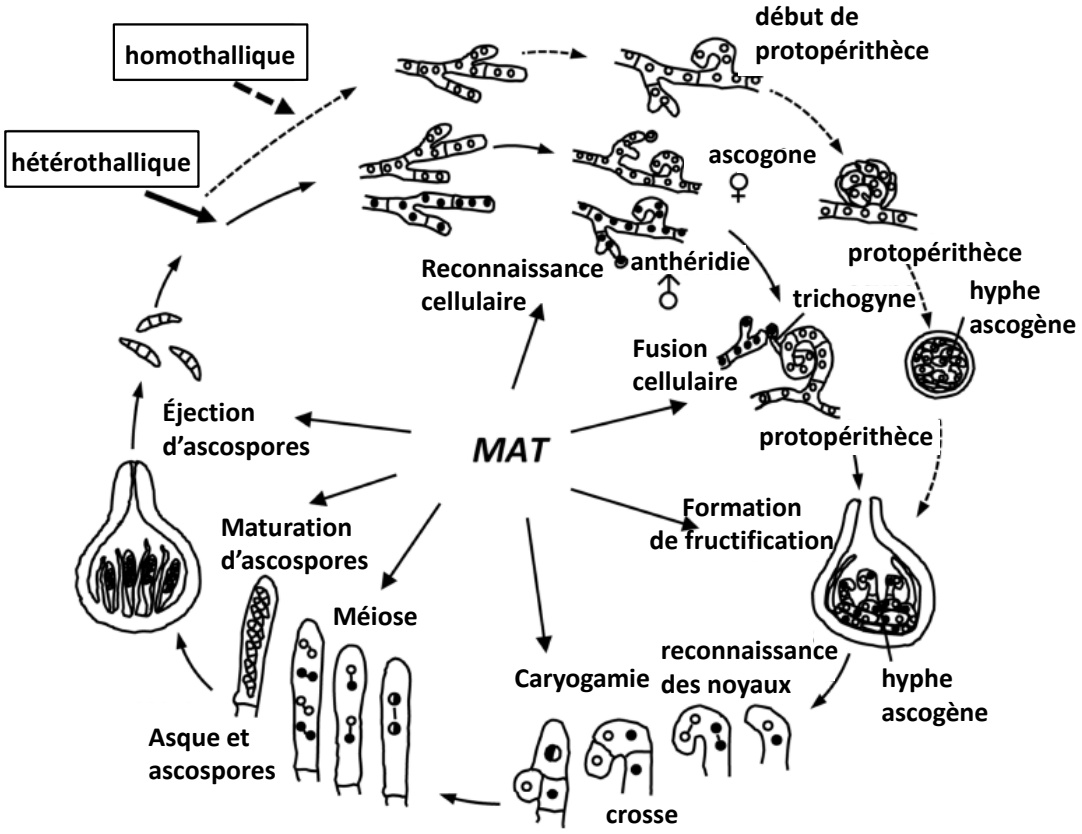


Figure 8 *: Phase sexuée du cycle de vie général des Pezizomycotina filamenteux, principale sous-classe des ascomycètes.* Les gènes MAT gouvernent tous les stades de la formation d'ascospores indiqués par des flèches. Espèces hétérothalliques, cycle intérieur (trait plein) ; espèces homothalliques, cycle extérieur (trait en pointillés ; Bennett & Turgeon, 2016).

Si les mécanismes cellulaires et physiologiques impliqués dans la reproduction sexuée sont bien décrits chez un certain nombre d'ascomycètes modèles, l'interaction avec la plante hôte au cours de ce processus est mal documentée chez les champignons phytopathogènes. On peut identifier plusieurs raisons à ce manque de connaissances. La reproduction sexuée nécessite des conditions environnementales particulières, à la fois difficiles à identifier et à reproduire, qui diffèrent selon les espèces. Pour *L. maculans,* agent de la nécrose du collet du colza, la reproduction sexuée a récemment été obtenue *in planta* (Bousset *et al.*, 2018), bien après les premières reproductions *in vitro* (Shoemaker & Brun, 2001). Au contraire, les premières observations de la reproduction sexuée chez *Venturia inaequalis* ont été faites *in planta* (Keitt & Palmiter, 1937), puis en conditions contrôlées (Ross & Hamlin, 1962 ; Sierotzki & Gessler, 1998). Parfois, la forme sexuée n'a jamais été observée en conditions naturelles alors qu'elle peut être obtenue en conditions axéniques. C'est le cas de *M. oryzae*, responsable de la pyriculariose du riz, pour lequel des indices de reproduction sexuée ont été identifiées par des approches de génétique des populations, loin des zones agricoles, indiquant une potentielle perte partielle de ce mode de reproduction par la domestication (Saleh *et al.*, 2012). Enfin, il se peut que la phase de reproduction sexuée ait été moins étudiée simplement car elle concerne plus rarement la période d'intérêt pour la protection de la culture hôte, contrairement à la phase asexuée.

2.4 Comment évoluent les populations pathogènes entre deux saisons épidémiques ?

Pour comprendre comment évolue une population pathogène à l'échelle d'une parcelle on s'intéresse généralement à sa dynamique temporelle et spatiale pendant la période épidémique, qui correspond à la période de culture. D'un point de vue écologique et évolutif, pour comprendre cette dynamique, il serait pertinent d'élargir le champ d'étude et de considérer l'ensemble du cycle de vie de l'agent pathogène, donc plusieurs modes de reproduction.

Dans un agroécosystème, la saisonnalité des cultures impose une temporalité qui peut interférer fortement avec celle du cycle de vie des agents pathogènes, et donc structurer les dynamiques épidémique et l'évolutive de la population (Hamelin *et al.*, 2011 ; Halkett *et al.*, 2021). Le début d'une épidémie coïncide généralement avec l'arrivée d'un inoculum primaire permettant à la population pathogène de s'établir dans le peuplement végétal, si elle n'est pas déjà présente localement. Cette arrivée peut être unique en début d'épidémie, ou être relativement continue, et un ou plusieurs cycles d'infections secondaires (épidémie monocyclique vs. polycyclique)

peuvent faire suite aux infections initiales (Bousset & Chèvre, 2012). La dynamique épidémique qui en résulte est spécifique de chaque agent pathogène. Elle est décrite de manière plus détaillée dans le cas de *Z. tritici* dans la partie 4.2. Entre deux saisons épidémiques (période inter-épidémique), c'est-à-dire entre deux saisons de culture de l'hôte, la population pathogène a la capacité de survivre selon plusieurs stratégies. Certains champignons phytopathogènes, comme les rouilles, infectent des hôtes alternants tels que l'épine-vinette (*Berberis vulgaris*) pour ce qui concerne la rouille noire (*Puccinia graminis* ; Roelfs, 1985). Certains peuvent survivre sur une gamme d'hôtes sauvages (hôtes alternatifs ou secondaires) élargie, en dehors de la phase de culture de l'hôte principal cultivé. D'autres champignons forment des structures différenciées permettant de survivre à des conditions environnementales moins favorables, comme les sclérotes de *B. cinerea* (Elad *et al.*, 2007). Enfin, certains peuvent changer de mode de développement et de type trophique pour survivre, comme *Z. tritici* (Steinberg, 2015) et *L. maculans* (West *et al.*, 2001), chez lesquelles une phase nécrotrophe et saprotrophe sur les résidus de culture succèdent à une phase biotrophe. Toutes ces stratégies assurent la récurrence pluriannuelle des épidémies dans les systèmes cultivés (Burdon & Laine, 2019).

Les processus reproductifs qui se déroulent pendant la période inter-épidémique, parce qu'ils sont susceptibles de modifier non seulement la taille d'une population pathogène mais aussi sa composition, ont aussi des conséquences évolutives. De nombreux champignons phytopathogènes réalisent leur reproduction sexuée majoritairement pendant cette période (Burdon & Laine, 2019). Cela conduit à la redistribution de caractères adaptatifs par recombinaison ou ségrégation (voir 2.3) tout en assurant la transmission de ceux acquis au cours de l'épidémie (*e.g.* nouvelles virulences) à la population qui initie l'épidémie suivante. La reproduction sexuée peut aussi contrebalancer certaines dynamiques évolutives s'étant exprimées pendant la saison épidémique, par exemple la sélection d'individus plus agressifs (Suffert *et al.*, 2018b). La population pathogène peut aussi passer par un « goulot d'étranglement », lié à la réduction drastique de sa taille (*e.g.* par enfouissement de résidus de culture, dont le maintien à la surface du sol serait le seul moyen pour une espèce pathogène de survivre). Pourtant, cette période reste relativement peu étudiée expérimentalement. Des modèles épidémiologiques incluent une phase de reproduction sexuée permettant de prendre en compte l'émergence d'individus caractérisés par des traits phénotypiques complexes, par exemple cumulant plusieurs virulences (Sapoukhina *et al.*, 2009 ; Lô-Pelzer *et al.*, 2010 ; Xu, 2012 ; Rimbaud *et al.*, 2021b). D'autres modèles simulent explicitement un goulot d'étranglement dans la population (*e.g.* Xu, 2012 ; Papaïx *et al.*, 2018) ou font appel à des paramètres

intermédiaires, comme la taille du compartiment hôte infecté (Lo Iacono *et al.*, 2013). Certains champignons phytopathogènes dit holomorphes alternent des phases asexuée et sexuée au cours de leur cycle de vie (*e.g. L. maculans* ou *Z. tritici*), ce qui leur confère un avantage évolutif majeur. En effet, la composition de leur population est ainsi modifiée par des processus cumulatifs (McDonald & Linde, 2002). Les études écologiques soulignent l'importance d'éclaircir la relation entre la période épidémique et inter-épidémique des agents pathogènes pour en connaître les conséquences épidémiologiques et évolutives (*e.g.* Numminen *et al.*, 2019). L'existence de corrélations positives ou négatives entre traits caractérisant les cycles d'infections pendant la période épidémique et la survie ou la transmission de l'inoculum primaire pendant la période inter-épidémique ont déjà été identifiées expérimentalement. Par exemple, une corrélation entre sévérité de la maladie et quantité d'inoculum primaire produit a été mise en évidence pour *L. maculans* (Lo-Pelzer *et al.*, 2009 ; Fortune *et al.*, 2021) et pour *Z. tritici* (Suffert *et al.*, 2018b). Pour toutes ces raisons, il est important de mieux connaître les modes de reproduction des agents pathogènes et leur occurrence dans leur cycle de vie lorsqu'il s'agit d'étudier la durabilité des résistances (Zeyl, 2009 ; Saleh *et al.*, 2012).

3 LA REGULATION DES POPULATIONS DE PATHOGENES FONGIQUES DANS LES ASSOCIATIONS VARIETALES DE CEREALES A PAILLE

Les associations de variétés figurent parmi les stratégies de déploiement de la résistance variétale à la parcelle. Dans cette partie, leur capacité à limiter la progression des populations pathogènes fongiques dans les systèmes céréaliers et les mécanismes biophysiques associés sont étayés, puis les conséquences potentielles sur la structure de ces populations sont examinées.

3.1 Associer des variétés afin de bénéficier de traits complémentaires

La réintroduction de diversité dans les systèmes de culture apparaît comme une solution à la simplification et la standardisation des agroécosystèmes (Hajjar *et al.*, 2008 ; Kremen, 2020 ; Beillouin *et al.*, 2021). S'inspirant des systèmes naturels, la diversification des cultures à l'échelle de la parcelle agricole s'appuie sur la complémentarité de niches entre espèces et leurs relations de dépendances. Elle est capable de générer de multiples services pour une gestion de l'agroécosystème moins dépendante d'intrants et plus résiliente (Altieri, 1999; Hooper *et al.*, 2005; Savary *et al.*, 2012; Tamburini *et al.*, 2020). C'est le cas notamment des associations ou mélanges

variétaux, qui consistent à cultiver dans une même parcelle différentes variétés d'une même espèce. Cette pratique culturale est qualifiée de diversification intraspécifique et intraparcellaire. Dans la littérature, une place importante est dévolue à l'étude de l'utilisation des associations variétales dans le but de contrôler les maladies (Finckh *et al.*, 2000; Barot *et al.*, 2017; Wuest *et al.*, 2021). Les associations rendent possible l'assemblage de différentes résistances (contrastées et donc complémentaires), à un ou plusieurs agent pathogènes à l'échelle de la parcelle, plus faciles à mettre en œuvre que le pyramidage au sein d'une même variété (Pilet-Nayel *et al.*, 2017). À l'échelle d'une saison culturale, on définit l'efficacité d'une association variétale (ou performance) comme sa capacité à limiter les dégâts à la parcelle (sévérité), c'est-à-dire ralentir dans le temps et dans l'espace la progression d'une population pathogène dans le peuplement végétal et diminuer sa nuisibilité. On évalue généralement cette efficacité en la comparant à chacune de ces composantes en culture pure (ou à leur moyenne), en termes de réduction de la sévérité et/ou d'augmentation du rendement. L'utilisation d'associations pour réduire la nuisibilité des maladies fongiques des céréales est détaillée dans la partie suivante (voir 3.2). Plusieurs méta-analyses portant sur les systèmes céréaliers montrent que le sur-rendement est en moyenne globalement positif dans des associations variétales (Kiær *et al.*, 2009 ; Borg *et al.*, 2018 ; Reiss & Drinkwater, 2018) comparativement à la moyenne des cultures pures. Ce résultat peut néanmoins être très variable selon les conditions. Par exemple, des expérimentations au champ ont montré une augmentation du rendement dans les associations : +15% dans le cas de l'échaudure de l'orge causée par *Rhyncosporium secalis* (Newton *et al.*, 1997), +80 à 90% dans le cas de la pyriculariose du riz causée par *Magnaporthe oryzae (*par rapport à la culture pure de la variété sensible; Zhu *et al.*, 2005), et +1,4% en moyenne sur 19 ans dans le cas de la septoriose du blé causée par *Z. tritici* (Kristoffersen *et al.*, 2020b).

3.2 Ralentissement des dynamiques épidémiques et réduction de la taille des populations pathogènes dans les associations

La capacité des associations variétales de céréales à pailles à réduire la progression de maladies fongiques a largement été documentée par des approches expérimentales. Les approches expérimentales se sont focalisées dans un premier temps sur l'association de variétés portant des résistances qualitatives contre des agents pathogènes biotrophes à dispersion éolienne, comme l'oïdium de l'orge et les rouilles du blé (Finckh *et al.*, 2000 ; Mundt, 2002 ; Borg *et al.*, 2018). Ces approches expérimentales des vingt dernières années montrent que de telles associations sont également efficaces pour réduire la progression d'agents pathogènes à dispersion

pluviale (Gigot *et al.*, 2013 ; Vidal *et al.*, 2017a ; Kristoffersen *et al.*, 2020b). Cette efficacité est donc aujourd'hui avérée, en zone tempéré comme en milieu tropicaux et subtropicaux, dans le cas des principales maladies des céréales à paille, à savoir :

(i) La rouille jaune du blé à *P. striiformis* (Dileone & Mundt, 1994 ; Lannou *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2011, 2012)

(ii) La septoriose du blé *Z. tritici* (Cowger & Mundt, 2002b ; Gigot *et al.*, 2013 ; Vidal *et al.*, 2017a ; Montazeaud *et al.*, 2020 ; Kristoffersen *et al.*, 2020b ; Ben M'Barek *et al.*, 2020)

(iii) L'oïdium de l'orge à *B. graminis* (Newton & Guy, 2011; Tratwal & Bocianowski, 2018)

(iv) La pyriculariose du riz à *M. oryzae* (Zhu *et al.*, 2000; Castilla *et al.*, 2010; Raboin *et al.*, 2012; Hondrade *et al.*, 2017)

Les associations variétales de céréales à pailles ont été utilisées à grande échelle pour limiter les épidémies fongiques, par exemple aux États-Unis (Finckh & Wolfe, 1997 ; Newton, 2009) et en Chine (Zhu *et al.*, 2000). Deux exemples historiques sont souvent décrits dans la littérature pour illustrer le potentiel de cette pratique. En ex-RDA, le gouvernement a promu dans les années 1980 la culture d'orge de printemps en association à l'échelle nationale (360 000 ha, soit 90% des surfaces cultivées en orge ; Wolfe, 1992 ; Østergård & Jensen, 2005). Les infestations d'oïdium ont baissé de 80% en sept ans avec une stabilisation du rendement et une diminution de l'utilisation de fongicides de 80%. En Chine, pour contrôler les épidémies de pyriculariose, une variété de riz sensible est souvent associée avec une variété hybride résistante dans différentes communes. L'association permet une réduction significative de la sévérité (de 20% à 1% de sévérité en moyenne en deux ans ; Zhu *et al.*, 2000) avec une augmentation de 10% de rendement sans utilisation de fongicides. En France, la part des associations variétales de blé tendre dans la sole nationale est en croissance continue depuis dix ans (Figure 9 ; Perronne *et al.*, 2021). Elle a triplé ces cinq dernières, passant de 5% en 2017 à 17% en 2021 (FranceAgriMer, https://www.franceagrimer.fr). Cette augmentation s'est accompagnée d'une évolution de la législation en 2018 qui autorise la commercialisation de mélanges de semences de céréales (arrêté du 26 juin 2018, Légifrance, 2018). Ainsi, il apparaît essentiel de déterminer le rôle des associations variétales dans l'adaptation des populations pathogènes par rapport aux résistances qui y sont déployées.

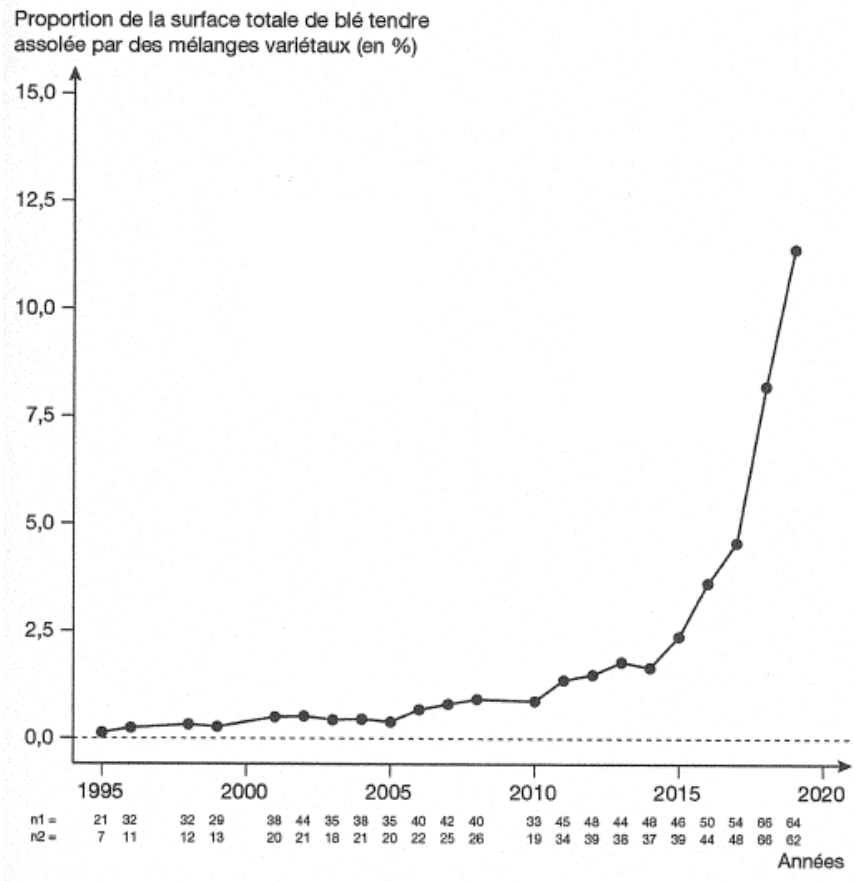


Figure 9 *: Évolution de la proportion de la surface totale de blé tendre cultivée en France métropolitaine avec des associations variétales entre 1995 et 2019.* Les valeurs n1 et n2 correspondent respectivement au nombre de départements dans lesquels des associations variétales ont été déclarées et au nombre de départements pour lesquels elles ont représenté plus de 0.5% de l'assolement (Perronne *et al.*, 2021).

Assembler des variétés de céréales présentant des niveaux de résistance différents est un levier significatif pour contrôler les épidémies fongiques. C'est pourquoi le niveau de résistance variétale est largement étudié dans les recherches sur les associations variétales et privilégié comme critère de choix des variétés (Garrett & Mundt, 1999 ; Cox *et al.*, 2004 ; Gigot *et al.*, 2014). La plupart des études expérimentales ont abordé la question de l'efficacité des associations à l'échelle du couvert dans le but de « protéger » les variétés plus sensibles par des variétés résistantes. À l'exception des travaux de Cowger & Mundt (2002), Zhan *et al.*, (2002) et Zhu *et al.* (2005), très peu d'études ont réalisé une mesure directe de la sévérité sur chaque variété. Il est donc rarement possible de comprendre la façon dont la maladie progresse et la population pathogène évolue en tenant compte de chaque composante résistante de l'association, alors que des processus intéressants pourrait s'y dérouler. En limitant la progression des épidémies, les associations réduisent la quantité d'inoculum présent dans le couvert par rapport à une parcelle cultivée en culture pure. Les associations contribuent

ainsi à réduire la taille des populations pathogènes fongiques, au moins pendant la période de culture.

Les travaux cités précédemment se focalisent sur la saison de culture de l'hôte. Or, comme vu précédemment, la population pathogène peut se maintenir dans la parcelle au-delà de cette période et des processus important de son cycle de vie peuvent avoir lieu entre deux épidémies. Il serait donc également intéressant de comprendre l'impact des associations au-delà de la saison culturale.

3.3 Mécanismes expliquant l'efficacité des associations à l'échelle annuelle

Les mécanismes des associations variétales sont le résultat de la diversité des génotypes et phénotypes des hôtes cultivés et de leur distribution spatiale dans la parcelle. Cette diversification a un impact sur la façon dont les populations pathogènes se développent. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et opèrent quel que soit le mode de dispersion de l'agent pathogène (Mundt *et al.*, 1995a).

Des mécanismes théoriques ont été formalisés pour expliquer la diminution de la maladie dans les mélanges, à commencer par ceux qui limitent la dispersion de l'agent pathogène dans le couvert. Par exemple, une majorité d'individus pathogènes ne peuvent pas infecter les variétés porteuses de résistances qui forment alors un obstacle (effet barrière ; Figure 10b ; Chin & Wolfe, 1984) : la distance à parcourir par un individu pathogène pour atteindre une plante sensible est plus grande car un plus grand nombre de plantes résistantes s'interposent. La maladie affecte alors surtout les variétés de moindre résistance, ce qui améliore l'état sanitaire moyen du couvert (effet dilution ou effet densité ; Figure 10a ; Wolfe, 1985 ; Finckh *et al.*, 2000 ; Mundt, 2002). D'autre part, la diversification génétique des variétés associées conduit à une augmentation de la diversité de la population pathogène, marquée notamment par une coexistence d'individus virulents et avirulents. Le contact de certaines variétés avec des spores avirulentes pourrait déclencher la mise en place précoce du système de défense de ces mêmes variétés (effet prémunition ; Figure 10c ; Lannou *et al.*, 1995 ; Calonnec *et al.*, 1996). Des mécanismes de prémunition pourraient ainsi concerner différents tissus d'une même plante, l'infection d'un organe agissant comme un signal pour d'autres organes (Seybold *et al.*, 2020), en plus de stimuler la défense des plantes voisines (Pélissier *et al.*, 2021b). Cette « communication » bénéfique entre plantes semble dépendre des espèces concernées et même des variétés associées (Montazeaud *et al.*, 2020 ; Pélissier *et al.*, 2021a).

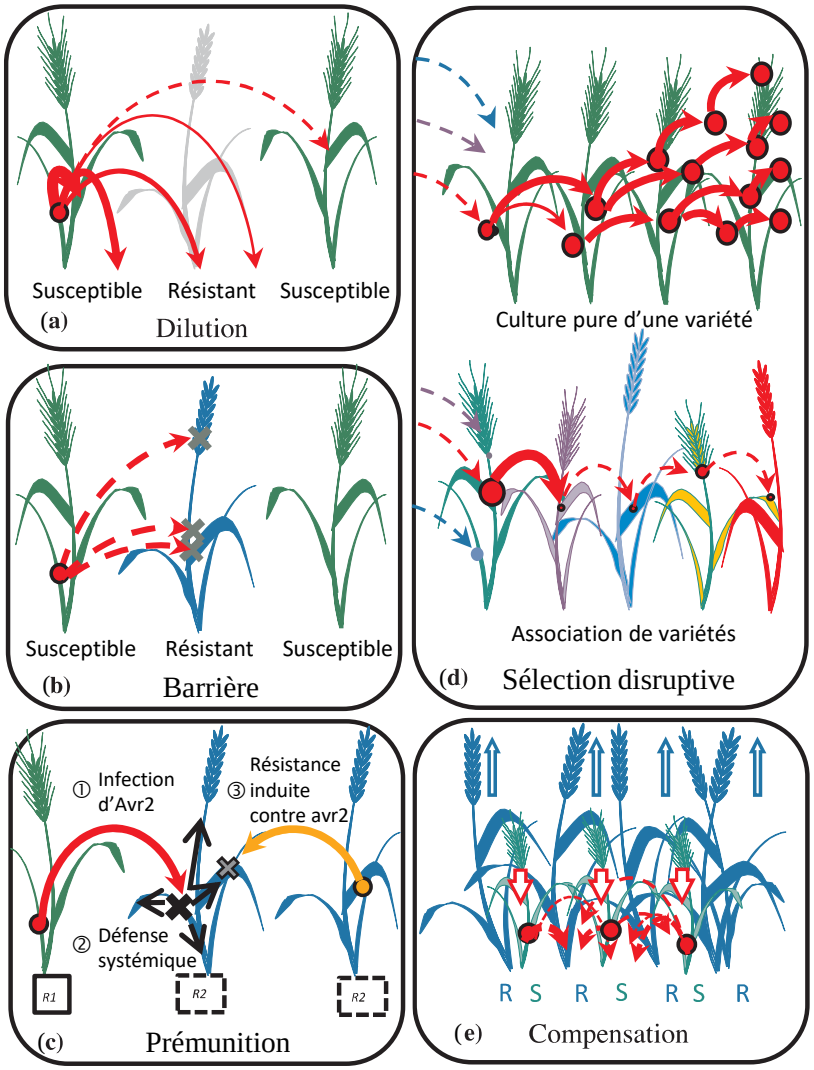


***Figure 10** : Différents mécanismes impliqués dans la réduction d'une maladie dans les associations variétales.* Le contrôle de la progression d'une maladie dans les associations variétales peut résulter de cinq mécanismes : **(a)** la densité plus faible des plantes sensibles entraîne une probabilité plus faible pour les spores de trouver un hôte sensible (effet dilution) ; **(b)** la présence de plantes résistantes parmi les plantes sensibles constitue une barrière physique, limitant la dispersion des individus pathogènes virulents (effet barrière) ; **(c)** l'interception d'une spore avirulente (Avr2) provenant de la plante R1 par la plante R2 stimule ses défenses, notamment la réponse systémique, permettant de prévenir ou limiter les infections ultérieures par des spores virulentes (avr2 ; effet prémunition) ; **(d)** dans la culture pure d'une variété, les individus virulents sont « filtrés » dans la population initiale et peuvent se multiplier rapidement, alors que dans l'association les différentes pressions de sélection ralentissent l'adaptation (effet sélection disruptive) ; **(e)** dans une association, les plantes sensibles ont un rendement ou une croissance moindre, ce qui est compensé par les plantes résistantes qui font un meilleur usage des ressources disponibles (effet compensation ; Borg *et al.*, 2018).

Parmi les différents effets des associations, on distingue également la sélection disruptive (Figure 10d ; Garrett & Mundt, 1999). Dans un couvert monovariétal la pression de sélection exercée par la résistance variétale sur la population pathogène est directionnelle : seuls les individus portant l'allèle de virulence correspondant peuvent infecter les plantes (effet filtre) et se multiplier dans le couvert. Dans une association variétale, la population pathogène est soumise à de multiples pressions de sélection, exercées par les différentes résistances ou niveaux de résistances des variétés, ce qui diminue globalement le nombre d'individus pouvant infecter plusieurs variétés et réduit finalement le niveau de maladie. Ce mécanisme limite la capacité l'adaptation de la population.

Un autre mécanisme est l'effet compensation (Figure 10e). Dans un couvert en association, les plantes sensibles pourraient se développer moins que les plantes résistantes à cause de la maladie : les plantes résistantes compenseraient alors les pertes occasionnées par les dégâts sur les plantes sensibles.

Enfin, l'architecture contrastée des variétés associées modifie les conditions d'humidité, de température et de luminosité dans lesquelles les populations pathogènes évoluent (voir 3.4). Cet effet sur le microclimat peut être défavorable au développement des épidémies (Zhu *et al.*, 2005 ; Vidal *et al.*, 2017c).

3.4 Facteurs affectant la performance des associations

Plusieurs critères liés aux caractéristiques biologiques de l'agent pathogène, de l'hôte et des pratiques culturales expliquent la capacité des associations à réduire la pression des maladies. Parmi ces facteurs, il faut mentionner ceux liés aux propriétés intrinsèques des variétés utilisées, basées sur la nature de l'interaction entre l'agent pathogène et la plante hôte, défini par des aspects qualitatifs (« compatibilité », modèle gène pour gène, voir 1.2), et quantitatifs (agressivité, traits de fitness et capacité à se reproduire). Ainsi, une association constituée de deux variétés très sensibles présentera un intérêt relativement limité. Les facteurs les plus influents sont ceux qui permettent de limiter le développement de l'agent pathogène à l'échelle populationnelle. Concevoir une association performante nécessite de tenir compte de la combinaison de ces facteurs dans un contexte pédoclimatique donné.

Le niveau de résistance

Un niveau de résistance génétique contrasté et donc complémentaire entre les variétés associées est un facteur important pour augmenter l'efficacité de l'association. Ceci a été démontré par des approches de modélisation (Jeger *et al.*, 1981a ; Sapoukhina *et al.*, 2013 ; Gigot *et al.*, 2014) et expérimentales (Mundt *et al.*, 1995b ; Kiær *et al.*, 2009). Historiquement, les associations ont été utilisées pour protéger les variétés plus sensibles des attaques d'agents pathogènes en introduisant des variétés plus résistantes (voir 3.2).

L'agencement spatial et la distribution de la résistance

Il existe plusieurs façons d'agencer les variétés en association dans une parcelle : (i) en lignes, où chaque rang de la parcelle comporte une variété distincte (Zhu *et al.*, 2005) ; (ii) en blocs, où la parcelle est découpée en blocs comportant une variété différente ; (iii) sans motif particulier, où les variétés sont déployées de façon aléatoire dans la parcelle. D'après une étude *in silico* sur la progression des maladies dans les associations variétales, la répartition spatiale la plus efficace dépendrait du mode de dispersion de l'agent pathogène (Sapoukhina *et al.*, 2010), bien que d'autres études montrent que la distribution aléatoire des variétés semblerait la plus efficace (Mundt & Leonard, 1986 ; Gigot *et al.*, 2014).

Le nombre de variétés

L'efficacité d'une association n'est pas toujours reliée au nombre de variétés associées (Leonard, 1969 ; Vidal *et al.*, 2020). Les associations de 3 à 5 variétés d'orge d'hiver sont apparues plus efficaces que les associations binaires pour freiner les épidémies de *R. secalis* (Newton *et al.*, 1997). Dans cette même étude, l'augmentation du rendement est positivement corrélée au nombre de variétés dans le mélange, ce qui a été confirmée par des récentes méta-analyse (Borg *et al.*, 2018 ; Reiss & Drinkwater, 2018). D'autres études consacrés à la rouille jaune du blé ont montré que la capacité à réduire l'épidémie et augmenter le rendement ne s'amplifie pas au-delà de deux variétés associées (Huang *et al.*, 2012 ; Vidal *et al.*, 2020) mais que les associations permettent de stabiliser ce rendement sur plusieurs années (Vidal *et al.*, 2021). L'efficacité dépendrait plus du niveau de résistance globale du couvert que du nombre de variétés dans l'association (Finckh *et al.*, 2000), ce qui est cohérent avec le modèle développé par Mikaberidze *et al.* (2015) suggérant que la relation entre rendement, réduction de maladie et nombre de variétés cultivées dépendrait davantage de la spécialisation du pathogène vis-à-vis de son hôte.

La proportion des variétés

L'efficacité d'une association variétale est également conditionnée par la proportion dans le couvert de variétés sensibles et résistantes à un agent pathogène donné (Garrett & Mundt, 1999 ; Finckh *et al.*, 2000), bien que toutes les études expérimentales ne précisent pas les proportions utilisées (Borg *et al.*, 2018). Les proportions des variétés sensibles/résistantes les plus souvent testées sont les suivants : 1:3, 1:1 et 3:1 (Calonnec *et al.*, 1996 ; Cox *et al.*, 2004 ; Gigot *et al.*, 2013 ; Vidal *et al.*, 2017b). Plus il y a de plantes résistantes ou moyennement résistantes dans le couvert, plus la sévérité des maladies à l'échelle du couvert est faible, confirmant les résultats obtenus par la modélisation (Mundt & Leonard, 1986 ; Xu & Ridout, 2000 ; Sapoukhina *et al.*, 2013 ; Gigot *et al.*, 2014).

L'architecture des variétés

Dans un soucis de performance et homogénéité agronomique, les variétés utilisées dans les associations ont souvent des caractéristiques morphologiques similaires (Wolfe, 1985). Or des traits tels que la hauteur ou la longueur et la largeur des feuilles ont un impact sur les processus de production, dispersion et d'interception de l'inoculum (Zhu *et al.*, 2005 ; Calonnec *et al.*, 2008 ; Robert *et al.*, 2008 ; Vidal *et al.*, 2018). De plus, les différences architecturales entre variétés ont des effets sur le microclimat (température, humidité, lumière ; Vidal *et al.*, 2017) ce qui peut influencer le développent des populations pathogènes dans le couvert (Huber *et al.*, 2006).

La pression de la maladie et l'intensité épidémique

Il est difficile de généraliser les conditions abiotiques qui maximisent l'efficacité des associations. Selon la synthèse de Reiss & Drinkwater (2018), le gain de rendement est plus important pour des fortes pressions de maladies. Le même résultat a été obtenu dans la synthèse de Borg *et al.* (2018), dont la moitié des essais recensés ont été artificiellement inoculés. Par exemple, dans le cas de la septoriose du blé, l'effet des associations a été plus marqué lorsque les essais n'ont pas été traités avec des fongicides (Borg *et al.*, 2018 ; Kristoffersen *et al.*, 2020a). Les résultats expérimentaux sur la réduction de la sévérité en fonction de l'intensité épidémique (faible, intermédiaire ou sévère) peuvent être contradictoires selon l'agent pathogène considéré et les conditions environnementales des essais. Si des niveaux élevés de maladie résultent d'une pression forte d'inoculum (capacité de dispersion élevée ou source d'inoculum extérieur importante), alors les associations sont plus efficaces lors des épidémies de faible intensité (Mundt, 2002). En revanche, s'ils résultent d'un temps de génération de l'agent pathogène particulièrement court (courte période de latence), alors les associations sont plus efficaces lors des épidémies de forte intensité.

3.5 Quel impact de l'utilisation d'associations variétales sur la dynamique évolutive des populations pathogènes ?

L'utilisation d'associations de variétés ayant des sources de résistance contrastées est efficace pour réduire la sévérité des épidémies et donc la taille de la population pathogène à travers plusieurs mécanismes biophysiques à l'échelle de la parcelle (Wolfe, 1985 ; Finckh *et al.*, 2000 ; Mundt, 2002 ; Borg *et al.*, 2018). Cette diversité influence également la composition génétique et phénotypique de la population pathogène, expression de son impact sur sa trajectoire évolutive locale (*e.g.* Zhan *et al.*, 2002). Cela peut se manifester sur la fréquence d'individus virulents dans la population pathogène vis-à-vis des gènes de résistance utilisés dans l'association et/ou sur leur niveau d'agressivité moyen, en particulier si un coût de fitness est associé à certaines virulences ou combinaisons de virulences (Laine & Barrès, 2013).

La « régulation » de la population pathogène constatée et/ou attendue dans les associations variétales consiste en une modification de sa taille mais aussi de sa composition. Ces modifications peuvent constituer des opportunités de gestion de la résistance variétale, notamment si les associations ralentissent l'émergence ou la généralisation de certaines virulences, mais peuvent aussi présenter des risques si elles contribuent au cumul de certaines virulences. Le risque principal est de voir apparaître des individus « multi-virulents » adaptés à une gamme plus large de variétés, et donc paradoxalement à des couverts où ces variétés sont associées. Cette problématique a été abordée dans plusieurs études théoriques et dans de plus rares études expérimentales que je détaillerai ci-dessous, sans qu'aucun réel consensus ne soit trouvé (Mundt, 2002 ; Burdon *et al.*, 2014).

Les modèles simulant des épidémies sur céréales suggèrent que les individus multi-virulents finiraient par se généraliser après plusieurs générations dans la population pathogène (Lannou, 2001 ; Mundt, 2002), ce qui ne serait pas forcément le cas pour des cultures pérennes (Xu, 2012). L'adaptation serait plus ou moins rapide selon le coût de fitness associé aux virulences concernées, la distribution spatiale de l'inoculum primaire (*e.g.* Lannou & Mundt, 1997), la distribution spatiale des résistances associées (*e.g.* Sapoukhina *et al.*, 2009) et le taux d'allo- ou d'autoinfection dans le couvert (*e.g.* Marshall *et al.*, 2009).

Les résultats d'études expérimentales suggèrent que les associations ont plutôt tendance à réduire la fréquence d'individus multi-virulents, en tout cas pour les agents pathogènes à multiplication clonale. Sur orge, Chin & Wolfe, 1984 ont ainsi montré que la fréquence absolue d'apparition de souches de *P. striiformis* multi-virulentes était

inférieure à celle en culture pure. Sur blé, cette limitation a également été observée (Dileone & Mundt, 1994), mais pas toujours vérifiée (Lannou *et al.*, 2005), avec des populations de rouille jaune plus diverses génétiquement sur les plantes sensibles (Chu *et al.*, 2021). Des résultats similaires ont été obtenus dans les populations d'*Erysiphe graminis* (Villaréal & Lannou, 2000). Pour d'autres type d'agents pathogènes comme *Z. tritici*, le mélange d'une variété de blé sensible avec une variété partiellement résistante n'a pas réduit la capacité d'adaptation de la population par rapport à la culture pure moyenne résistante, aboutissant à une population génétiquement moins diverse en fin d'épidémie (Zhan *et al.*, 2002b). En outre, certains travaux montrent une plus faible fitness (agressivité, taux de reproduction) des populations pathogènes dans les associations comparativement aux populations des cultures pures, théoriquement (Lannou *et al.*, 2005) et expérimentalement (Chin & Wolfe, 1984 ; Zhan *et al.*, 2002b). Dans le cas de la rouille brune du blé, Kolmer (1995) a constaté que des populations constituées d'individus avec des niveaux d'agressivité intermédiaires pouvaient être obtenues dans les associations. Dans le cas de la septoriose du blé, dont les populations sont façonnées par des cycles de multiplication asexuée fréquents (voir partie 4.2), Cowger & Mundt (2002) ont rapporté une augmentation ou une diminution de l'agressivité moyenne de la population pathogène selon les années, voire une absence d'effet, dans des associations variétales exprimant une résistance partielle. Compte tenu de la diversité de ces résultats, il est difficile de conclure quant au sens des effets d'associations sur la dynamique épidémiologique et évolutive d'une population pathogène à l'échelle d'une parcelle à une échelle annuelle.

Dans un contexte socio-politique qui encourage les pratiques agroécologiques, il est crucial de comprendre les effets des pratiques culturales sur la durée d'efficacité des résistances qui sont déployées. Dans le cas des associations variétales, il serait intéressant d'évaluer plus finement, sur les bases mécanistiques qui font actuellement défaut, leur capacité à modifier le potentiel évolutif des populations pathogènes (Zhan *et al.*, 2015). Cette pratique culturale pourrait avoir un impact sur la dynamique d'émergence d'une virulence vis-à-vis d'un gène qualitatif (et donc le début de contournement d'une résistance) et d'autre part, une fois cette virulence apparue et présente à bas bruit, retarder ou à accélérer sa généralisation dans la population pathogène, et donc à long terme modifier sa durabilité.

4 CAS D'ETUDE : LE PATHOSYSTEME *ZYMOSEPTORIA TRITICI*-*TRITICUM AESTIVUM*

4.1 Impact économique des épidémies de septoriose sur blé tendre

Le blé tendre (*Triticum aestivum*) est une des céréales les plus cultivées et consommées dans le monde. Avec une production de 131 millions de tonnes sur plus de 21 millions d'hectares (estimation campagne 2020-2021, Commission européenne), l'Europe est l'une des principales régions productrices et exportatrices de blé tendre dans le monde, dont la France est un acteur majeur. L'importance économique de cette culture font de sa protection contre les maladies un enjeu crucial. La septoriose du blé (STB ; *septoria tritici blotch*), l'une des principales maladies foliaires sur cette culture (Eyal *et al.*, 1987 ; Shaw & Royle, 1989a), est causée par le champignon phytopathogène *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg *et al.*, 2011), ascomycète appartenant à l'ordre des Dothideales (Orton *et al.,* 2011). Les épidémies de septoriose sont préjudiciables du fait de leur endémicité dans la quasi-totalité des régions céréalières dans le monde et de leur impact sur le développement du blé, notamment dans les pays tempérés, où les conditions climatiques (printemps humides et températures clémentes) sont favorables au développement de la maladie. Dans le nord-ouest de l'Europe, les pertes de rendement potentielles sont estimées entre 30% à 50% lorsque des variétés de blé sensibles sont utilisées et en l'absence de traitement fongicide (Fones & Gurr, 2015). En France, la nuisibilité moyenne est estimée à 17 $q \cdot ha^{-1}$ (Arvalis - Institut du Végétal, 2013), pouvant aller jusqu'à 50 $q \cdot ha^{-1}$, pour un rendement moyen en blé de 70 $q \cdot ha^{-1}$ (FranceAgriMer). *Z. tritici* provoque des lésions foliaires caractérisées par des tâches nécrotiques, transitoirement entourées de chloroses, au sein desquelles des ponctuations noires (pycnides ; fructifications asexuées) sont visibles à l'œil nu (Figure 11). Ces symptômes, en diminuant la surface verte, réduisent de manière significative la photosynthèse. Ils sont particulièrement problématiques en fin de saison culturale lorsque la maladie atteint les deux derniers étages foliaires des plants de blé qui contribuent fortement au remplissage des grains (Brokenshire, 1976 ; El Wazziki *et al.*, 2015).

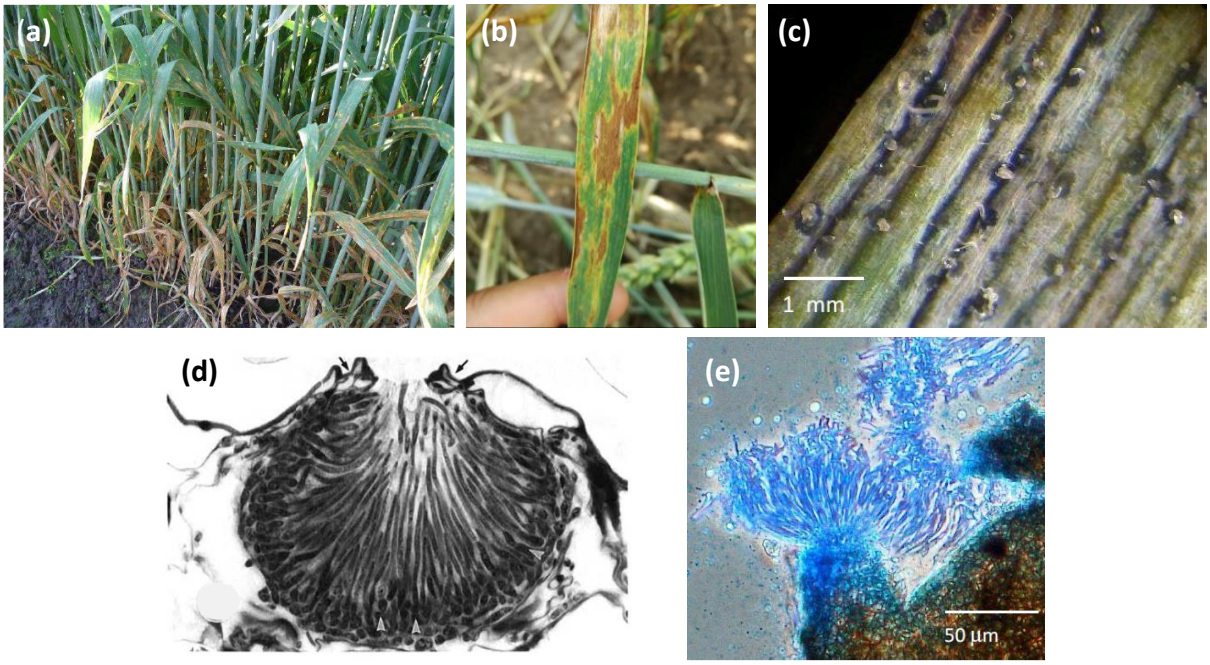


Figure 11 *: Symptômes de septoriose sur blé tendre et fructifications de Zymoseptoria tritici.* **(a)** Attaque de septoriose dans une parcelle agricole illustrée par l'état partiellement nécrosé des feuilles basses des plantes adultes de blé tendre (Suffert, 2015). **(b)** Feuille de blé infectée par *Z. tritici* présentant plusieurs lésions sporulantes avec des chloroses et nécroses (M. Bonnard, com. pers.). **(c)** Pycnides matures avec exsudation de cirrhes (serpentins blancs) contenant des pycnidiospores (Suffert, 2015). **(d)** Coupe d'une pycnide mature s'étant développée dans la cavité sous-stomatique, 14 jours après inoculation, observée au microscope électronique à transmission (Kema *et al.*, 1996a). **(e)** Périthèce (marron) et asques contenant des ascospores (bleu) présents sur des résidus de blé, observés au microscope optique (Suffert, 2015).

4.2 Cycle de vie de *Z. tritici* et interaction avec l'hôte

La dynamique épidémique d'une population de *Z. tritici* peut être représentée comme étant la juxtaposition (Figure 12) d'une période épidémique où la multiplication asexuée est majoritaire, pendant la saison culturale du blé (hiver-été), et une période inter-épidémique pendant laquelle la reproduction sexuée a lieu. À l'échelle d'une saison culturale, la période épidémique débute avec l'infection des plantules de blé par l'inoculum primaire. L'épidémie se développe ensuite via des contaminations secondaires par l'éclaboussement de gouttelettes suite à l'impact de gouttes de pluies sur les lésions foliaires, dispersant des pycnidiospores (spores asexuées) sur des courtes distances (Sanderson *et al.*, 1985 ; Shaw, 1987 ; Royle *et al.*, 1995 ; Saint-Jean *et al.*, 2004). La progression de la maladie se fait du bas vers le haut du couvert (Lovell *et al.*, 2004b) et horizontalement sur les plantes voisines (Karisto *et al.*, 2021). L'épidémie est polycyclique : on estime qu'en moyenne six cycles complets et non chevauchants de multiplication asexuée peuvent avoir lieu au cours d'une épidémie (Karisto *et al.*, 2018). Ce chiffre dépend des conditions de température (Hess

& Shaner, 1987; Bernard *et al.*, 2013; Boixel *et al.*, 2022b) déterminant en particulier la latence et du nombre d'épisodes pluvieux (Shaw & Royle, 1993). Après la récolte, pendant la période inter-épidémique, *Z. tritici* survit dans les résidus de blés sur lesquels sa phase sexuée est particulièrement active (Brown *et al.*, 1978 ; Shaw & Royle, 1989b ; Suffert & Sache, 2011). Le champignon y forme des périthèces qui libèrent des ascospores qui constituent la principale source d'inoculum primaire (Sanderson, 1972 ; Suffert & Sache, 2011), dont la quantité au cours de l'épidémie est peu limitante (Morais *et al.*, 2016b). Disséminées par le vent, elles peuvent parcourir plusieurs dizaines voire centaines de kilomètres (Sanderson *et al.*, 1985 ; Shaw & Royle, 1989b ; Kema *et al.*, 1996a).

Une telle juxtaposition entre phase asexuée et phase sexuée dans le cycle de vie de *Z. tritici* est une représentation simplifiée, les deux étant en réalité chevauchantes. D'une part, les infections par les ascospores et par les pycnidiospores peuvent avoir lieu simultanément à différents stades de l'épidémie, et, d'autres part, la reproduction sexuée, si elle a majoritairement lieu sur résidus de cultures entre deux épidémies, peut aussi se dérouler sur les feuilles sénescences des étages foliaires et parties de tiges inférieures pendant la saison culturale (Chen & McDonald, 1996 ; Eriksen *et al.*, 2001; Duvivier *et al.*, 2013). Il est vrai que la proportion de chaque phase diffère : en début d'épidémie, les lésions présentes sur les premières feuilles sont causées par des ascospores tandis que celles sur les suivantes le sont majoritairement par des pycnidiospores au fur et à mesure que les cycles d'infection secondaires se mettent en place (Hunter *et al.*, 1999 ; Suffert & Sache, 2011). Il a ainsi été estimé dans une parcelle expérimentale que 66% des lésions sporulantes au cours d'une épidémie ont été causées par des pycnidiospores, environ 24% par des ascospores issues du couvert de la même parcelle, et 10% d'ascospores provenant de cultures voisines (Zhan *et al.*, 1998, 2000).

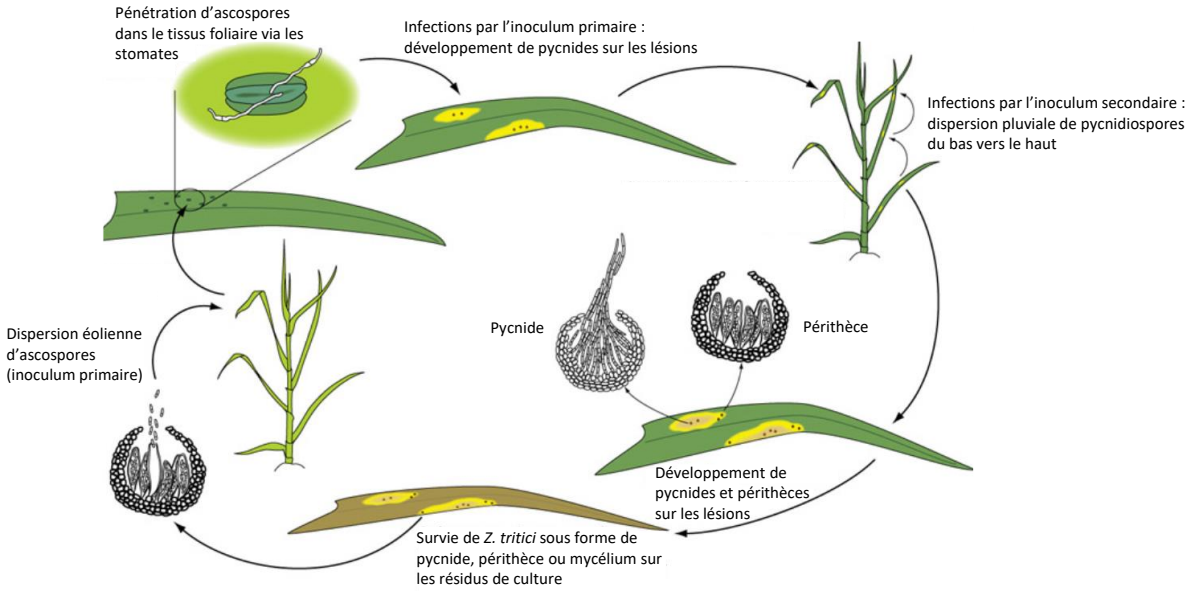


Figure 12 *: Cycle de vie de Zymoseptoria tritici.* La dynamique annuelle de développement du champignon phytopathogène est illustrée pendant la période épidémique, au cours la saison culturale du blé, et la période inter-épidémique sur résidus de culture (Ponomarenko *et al.*, 2011).

Z. tritici est un champignon hémibiotrophe. Son développement dans les tissus foliaires est habituellement décomposé en deux phases physiologiques : d'abord une phase biotrophe (germination, pénétration et colonisation) qui s'achève avec l'apparition des premiers symptômes, puis une phase nécrotrophe, marquée par la mort et la dégradation des tissus hôtes qui se manifeste par le développement de nécroses (Figure 13). La phase biotrophe débute par la germination d'une ascospore ou une pycnidiospore à la surface de la feuille et le développement d'hyphes qui pénètrent les tissus foliaires à travers les stomates, sans développement d'appressorium (Cohen & Eyal, 1993 ; Kema *et al.*, 1996b ; Duncan & Howard, 2000). Le champignon progresse dans l'espace intracellulaire (apoplaste). Dans le cas d'une interaction compatible, il pénètre ensuite dans les cellules végétales et forme des pycnides à la base des cavités sous-stomatiques. La phase biotrophe dont la durée varie de 5 à 10 jours (période d'incubation) précède la phase nécrotrophe qui se manifeste 10 à 21 jours après la contamination (période de latence) et au cours de laquelle le champignon produit ses premières pycnides (Kema *et al.*, 1996b ; Steinberg, 2015). Au laboratoire, *Z. tritici* peut être cultivé *in vitro* dans un milieu liquide ou solide. Le champignon développe deux isomorphes : une forme levure (bastospores) ou une forme mycélienne (hyphes) en fonction de la richesse du milieu de culture (Kema & Annone, 1991). *Z. tritici* est un champignon hétérothallique (Kema *et al.*, 1996a) : la reproduction sexuée s'effectue

par la rencontre d'organes reproducteurs de deux individus de types sexués opposés et sexuellement compatibles (MAT 1.1 et MAT 1.2) qui sont équitablement distribués dans les populations (Zhan *et al.*, 2002a ; Siah *et al.*, 2010 ; Morais *et al.*, 2019). Un même individu de *Z. tritici* peut former à la fois des organes « mâle » (anthéridie) ou « femelle » (ascogone). Des données cytologiques récentes suggèrent que le partenaire femelle se développe dans les tissus de l'hôte mais que ce développement est facultatif pour le partenaire mâle (Kema *et al.*, 2018). Les périthèces, résultat de la fécondation (Kema *et al.*, 1996a), une fois arrivés à maturité libèrent des ascospores, dont une partie initie l'épidémie suivante (Sanderson, 1972 ; Eyal *et al.*, 1987).

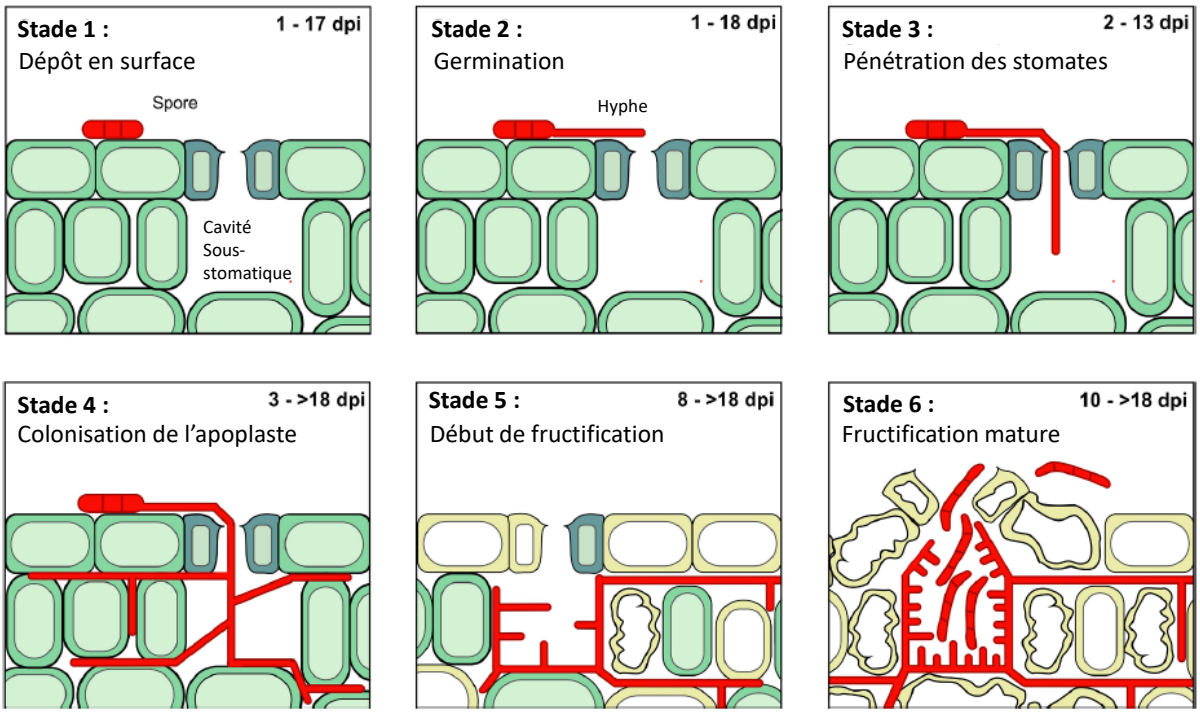


Figure 13 *: Chronologie de l'infection du blé par Zymoseptoria tritici.* Chaque individu pathogène (représenté par un hyphe) passe d'un stade à l'autre indépendamment du reste de la population. On peut trouver jusqu'à cinq stades simultanément dans une même feuille de blé après une infection (« dpi » : jours après inoculation; Fantozzi *et al.*, 2021).

Des travaux récents portant sur la biologie de *Z. tritici*, notamment sur l'interaction entre le pathogène et son hôte à l'échelle tissulaire, ont montré que le champignon peut survivre à la surface de la feuille, sous forme épiphyte, et former des hyphes jusqu'à 10 jours avant de pénétrer dans les tissus foliaires (Fones *et al.*, 2017). Les premières étapes de la phase biotrophe ne se dérouleraient pas au même rythme pour tous les individus, avec une durée variable en fonction des souches (Brennan *et al.*, 2019 ; Seybold *et al.*, 2020 ; Fantozzi *et al.*, 2021). De plus, il a été constaté que les

premières étapes de l'infection, à savoir la germination et la pénétration dans les tissus (colonisation limitée à l'apoplaste), pouvaient avoir lieu et s'arrêter avant l'apparition des symptômes (Cohen & Eyal, 1993 ; Shetty *et al.*, 2003). La distinction entre ce comportement et un développement strictement endophyte n'est pas aisée à faire (Sanchez-Vallet *et al.*, 2015). Des « blocages » précoces de l'infection ont été observés dans des cas d'interaction incompatible entre des variétés de blé porteuses du gène de résistance *Stb16q* des souches avirulentes (Saintenac *et al.*, 2021a). Il n'est pas encore certain que ce type de processus soit identique pour tous les gènes majeurs *Stb*. Une étude récente a par ailleurs montré que le champignon peut produire des chlamydospores, spores connues pour leur résistance aux conditions environnementales extrêmes, par exemple des conditions de sécheresse et de températures stressantes (Francisco *et al.*, 2019). Une synthèse sur les premières étapes de l'infection par *Z. tritici* révèle plusieurs zones d'ombre qui restent à élucider (Brennan *et al.*, 2019). La question des infections multiples a ainsi été soulevée : il est possible que des individus ne pouvant pas infecter seuls (interaction incompatible) ou dont le développent serait moindre (faible agressivité) puissent le faire lors des co-infections, c'est-à-dire lors d'infections simultanées par plusieurs individus (Dutt *et al.*, 2021). L'étude des mécanismes impliqués constitue actuellement un front de science. Ces mécanismes pourraient résulter d'une interaction entre individus pathogènes, par exemple le fait qu'individu avirulent ou très peu agressif « profite » de l'infection d'un autre individu virulent ou plus agressif pour pénétrer les tissus et aller jusqu'à provoquer des symptômes (« passager clandestin » ; Seybold *et al.*, 2020). Ces mécanismes pourraient aussi résulter d'une interaction plante-plante (sensibilisation ou prémunition ; Pélissier *et al.*, 2021). De telles co-infections pourraient être plus nombreuses dans les associations variétales, où les individus virulents et avirulents vis-à-vis d'une résistance sont susceptibles de rentrer plus fréquemment en contact avec des plantes résistantes. D'une part, elles pourraient avoir des conséquences épidémiologiques à court terme, par exemple modulation des attaques, à la hausse (sensibilisation) ou à la baisse (prémunition) (voir 3.3 ; Schürch & Roy, 2004 ; Barrett *et al.*, 2021). D'autre part, ces conséquences pourraient être évolutives et à long terme, par exemple sur la transmission d'allèles de virulence suite à la reproduction sexuée (Sofonea *et al.*, 2017 ; Barrett *et al.*, 2021).

4.3 Modes de reproduction, diversité et capacités d'adaptation des populations de *Z. tritici*

La reproduction sexuée est à l'origine de la grande diversité génétique des populations de *Z. tritici* (Zhan *et al.*, 2003), de sa plasticité et capacité d'adaptation (Chen & McDonald, 1996). Cette diversité est stable dans le temps et dans l'espace : à des échelles larges d'une région, pays ou continent (Zhan *et al.*, 2003 ; El Chartouni *et al.*, 2011) et à des échelles plus petites d'une parcelle (Singh *et al.*, 2021) ou de la plante (Siah *et al.*, 2018), ainsi qu'au cours d'une épidémie et entre plusieurs épidémies (Chen *et al.*, 1994 ; Zhan *et al.*, 2001 ; Morais *et al.*, 2019). Linde *et al.* (2002) ont rapporté qu'il est possible de trouver dans une unique parcelle de blé environ 90% de la variabilité génétique des populations détectable à l'échelle continentale. Après une sélection locale de la population pathogène par le peuplement hôte et l'environnement dans lequel elle se développe de manière asexuée, le brassage génétique induit par la reproduction sexuée et les migrations à plus longues distances (flux génétiques ; Zhan *et al.*, 2003) maintien un niveau de diversité très important. La dualité des modes de reproduction de *Z. tritici* confère à la population pathogène sa capacité d'adaptation (Suffert & Sache, 2011 ; Singh *et al.*, 2021) à des pressions abiotiques (Leroux *et al.*, 2005 ; Garnault *et al.*, 2019 ; Boixel *et al.*, 2022a,b) ou biotiques, telles que les résistances variétales (Cowger *et al.*, 2000). L'adaptation finale de la population de l'année n, transmise à l'année n+1, résulte de la dynamique démogénétique épidémique et inter-épidémique (voir 2.3). Un compromis dans le niveau d'agressivité d'une population locale de *Z. tritici* a été mis en évidence à l'échelle de l'année (Suffert *et al.*, 2015, 2018b), révélant une interdépendance de la composition de la population entre les deux périodes et des effets évolutifs à court terme. Ces caractéristiques font de *Z. tritici* un cas d'étude particulièrement intéressant pour comprendre l'adaptation des populations pathogènes, notamment la transmission d'allèles de virulence, aux stratégies de déploiement de la résistance variétale.

4.4 Méthodes de protection du blé et adaptation de *Z. tritici*

La protection du blé contre les attaques de *Z. tritici* repose sur la combinaison de plusieurs leviers de protection des cultures : chimique, agronomique et génétique (Eyal, 1999), dont les principales sont l'application de produits phytosanitaires fongicides (O'Driscoll *et al.*, 2014) et l'introgression de gènes de résistance dans les variétés cultivées. Le recours aux fongicides est aujourd'hui une solution considérée de plus en plus coûteuse, avec de externalités environnementales fortement négatives, en perte d'efficacité à cause de l'émergence voire la généralisation de souches résistantes à plusieurs matières actives (voir ci-dessous), et en contradiction avec les attentes

sociétales de protection de l'environnement et de biodiversité (voir 1.1). En 2015, certains auteurs ont estimé à 1 milliard d'euros le budget alloué au contrôle des épidémies de septoriose sur blé par des fongicides, soit 70% des dépenses européennes en fongicides sur blé (Fones & Gurr, 2015 ; Torriani *et al.*, 2015). Les fongicides ont plusieurs modes d'action, avec une cible unique (unisite) ou multiples (multisites) dans la cellule fongique : les benzimidazoles, inhibiteurs externes (QoIs) ou interne (QiIs) de la quinone, les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) et les inhibiteurs de la déméthylation (DMI). Les populations françaises de *Z. tritici* ont développé une résistance à la plupart de ces modes d'actions (Leroux *et al.*, 2005 ; Garnault *et al.*, 2019). Actuellement, les plus efficaces sont les SDHI qui perturbent la respiration cellulaire, les DMI qui interviennent dans la synthèse des stérols, et les multisites comme le folpet (Torriani *et al.*, 2015). Les restrictions réglementaires limitent le nombre de produits disponibles sur le marché européen, à cause de leur toxicité, avec par exemple le retrait du chlorothalonil en 2020 et du mancozèbe en 2021 (Arvalis - Institut du Végétal).

Des méthodes de prophylaxie sont utilisées dans le cadre d'une gestion agronomique raisonnée, comme par exemple semer tardivement pour désynchroniser le cycle végétatif du blé du cycle de développement de *Z. tritici*, réduire la densité du couvert pour limiter l'humidité et réduire l'intensité des infections secondaires, ou encore travailler le sol pour enfouir les résidus sources d'inoculum primaire (Eyal *et al.*, 1987 ; Kerdraon *et al.*, 2019 ; Arvalis - Institut du Végétal, 2020). Il existe quelques solutions de biocontrôle commercialisées en France, dont l'efficacité au champ reste modérée (Arvalis - Institut du Végétal, 2020). Les produits utilisés sont des éliciteurs de la défense des plantes (Stadnik & de Freitas, 2014) et des métabolites secondaires antifongiques (Hernandez-Jerez *et al.*, 2020), combinés à des substances minérales telles que le soufre.

Le contrôle des épidémies de septoriose par l'immunité végétale, basée sur l'utilisation de variétés de blé plus résistantes ou tolérantes est encouragé. Au cours des dix dernières années en France, le niveau de résistance à la septoriose des variétés déployées a significativement augmenté, passant en moyenne d'une note de résistance de 5.2 en 2015 à 6.0 en 2019 (sur une échelle de 1 à 9, 9 étant une variété entièrement résistante ; Arvalis - Institut du Végétal, 2019). À ce jour 22 gènes qualitatifs (*Stb*) et 89 régions du génome portant des QTL ont été identifiés et cartographiés (Brown *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018). La résistance à *Z. tritici* apparaît globalement comme étant quantitative, avec une sensibilité très variable entre variétés, qui expriment une gamme très large d'intensité de symptômes (Karisto *et al.*, 2018). La résistance qualitative

confère une protection théoriquement élevée, mais des cas de contournement ont été observés suite au large déploiement de certains gènes *Stb* (Cowger *et al.*, 2000). Des résultats récents suggèrent que la résistance qualitative et quantitative à STB ne sont pas mutuellement exclusives (Niks *et al.*, 2015). Les déterminants génétiques de la résistance à *Z. tritici* sont complexes, marqués par des gènes *Stb* co-localisés dans des régions du génome qui portent des QTL, résultant en une résistance dans son ensemble polygénique et quantitative (Meile *et al.*, 2018 ; Langlands-Perry *et al.*, 2022).

Stb6 est le premier gène qualitatif à avoir été cloné et pour lequel le modèle gène pour gène a été validé (Brading *et al.*, 2002 ; Saintenac *et al.*, 2018). Les études sur *Stb6* suggèrent que ce gène est présent dans les variétés de blé depuis sa domestication (Chartrain *et al.*, 2005) et qu'il est aujourd'hui répandu à hauteur de 50% dans les variétés commerciales de blé utilisées en Europe (Arraiano & Brown, 2006 ; Saintenac, com. pers.). Pour autant, les populations de *Z. tritici,* globalement adaptées à ce gène, conservent une fraction d'individus avirulents (Saintenac *et al.*, 2018), dont la diversité allélique continue d'évoluer (Stephens *et al.*, 2021). La dynamique d'adaptation des populations de *Z. tritici* face à la pression de sélection que représente la généralisation d'une résistance dans le paysage semble plus complexe que d'autres cas de contournement et les processus épidémiques permettant le maintien d'une fraction avirulente, potentiellement lié à la reproduction sexuée (Kema *et al*. 2018), sont encore mal connus.

Le gène *Stb16q*, issu d'un blé synthétique, a initialement été efficace contre un large panel d'isolats de *Z. tritici* testés tout au long du stade végétatif du blé (Ghaffary *et al.*, 2012). Comme d'autres gènes *Stb*, il inhibe la formation de pycnides et de nécrose en empêchant la pénétration de *Z. tritici* dans la cavité sous-stomatique des tissus foliaires et sa progression dans l'apoplaste (Saintenac *et al.*, 2021a). *Stb16q* a été récemment intégré à treize variétés françaises enregistrées de 2012 à 2018, dont la variété Cellule (Florimond Desprez, France ; Ghaffary *et al.*, 2012 ; Figure 14). Cellule a été largement déployé en France à partir de 2012 et est devenue la troisième variété la plus cultivée, occupant 8% de la sole en 2016. Des premiers symptômes de septoriose ont été observés à bas bruit sur Cellule dès 2015 en France (Romain Valade, ARVALIS-Institut du Végétal, com. pers.) et en 2019 en Irlande (Kildea *et al.*, 2020). L'année 2015 a ainsi marqué le début du contournement de la résistance *Stb16q* et qui pourrait expliquer, en partie, le remplacement progressif de Cellule au profit de variétés présentant un meilleur profil immunitaire et agronomique.

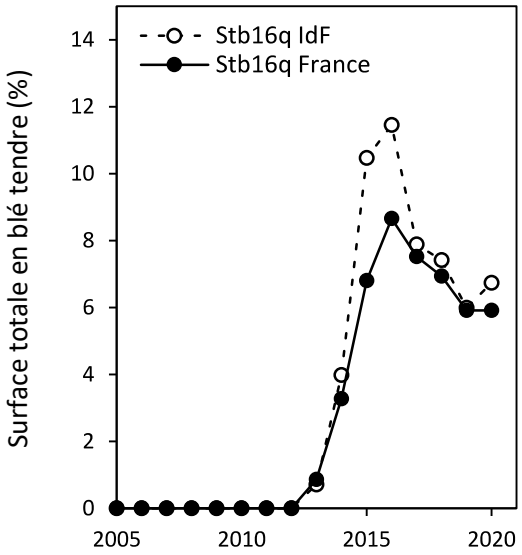


Figure 14 *: Évolution du pourcentage de la surface de blé française et francilienne semée avec treize variétés porteuses de Stb16q entre 2005 et 2020.* Les variétés porteuses de *Stb16q* cultivées en France sont représentées par des point noirs et celles cultivées dans le Bassin parisien par des points blancs (Île-de-France ; d'après FranceAgriMer).

4.5 Contrôle d'épidémies de septoriose dans les associations variétales de blé tendre

Les travaux de modélisation de Jeger *et al.* (1981a) ont été les premiers à évaluer le potentiel des associations à contrôler des maladies à dispersion pluviale. Les résultats expérimentaux et théoriques convergent et montrent que les associations ont tendance à réduire la sévérité de la maladie par rapport à la moyenne des cultures pures, mais que cette réduction est variable.

Plusieurs études expérimentales ont évalué au champ l'efficacité des associations vis-à-vis de plusieurs pathogènes simultanément, dont *Z. tritici* (Jeger *et al.*, 1981b ; Mundt *et al.*, 1995b ; Mille & Jouan, 1997). Sont résumés ci-dessous les principaux résultats des études ayant porté spécifiquement sur *Z. tritici*. Cowger & Mundt (2002) ont étudié des associations de deux variétés en proportions égales, composées d'une variété moyennement résistante (résistance quantitative) et une variété sensible. Ils ont obtenu des résultats variables selon les années et l'intensité des épidémies : une diminution de l'aire sous la courbe de progression épidémique (AUDPC) de 10% dans les associations par rapport aux cultures pures pour une forte intensité épidémique, une réduction similaire lorsque l'intensité épidémique était faible et une augmentation de 15% de l'AUDPC lorsque l'intensité était modérée. Mille *et al.*, (2006) ont comparé la réduction de la maladie en mélange équi-proportionnel de variétés associées par quatre et par

deux, avec la moyenne obtenue dans les cultures pures correspondantes. La résistance des variétés vis-à-vis de *Z. tritici* était diversifiée, comprise entre 3 et 8 (9 étant la note de la plus résistante, Arvalis - Institut du Végétal), voire inconnue pour certaines d'entre elles. Avec des intensités épidémiques faibles les deux années d'étude, la majorité des associations ont été plus efficaces que leurs cultures pures respectives. Gigot *et al.*, (2013) ont mis en évidence l'efficacité d'une association de deux variétés, composée à 25% d'une variété sensible et 75% d'une variété fortement résistante (7 sur 9), pour des épidémies de faible à moyenne intensité. En moyenne sur quatre années, le nombre de lésions foliaires a été réduit de 45 % sur les trois dernières feuilles des plantes sensibles. Vidal *et al.*, (2017) ont également constaté une diminution de la sévérité dans le cas d'associations similaires : une réduction de 30% en moyenne de l'AUDPC des plantes sensibles, comparativement à la culture pure de la variété sensible, une année où la pression de maladie était faible, et de 68% lorsque l'association comportait des variétés de différentes hauteurs. Dans une synthèse regroupant 19 années d'expérimentations au Danemark, Kristoffersen *et al.* (2020) ont conclu à une réduction de 17% de la sévérité par rapport à la moyenne des cultures pures en l'absence de traitement fongicide. Enfin, le modèle *Pathosplash*, conçu par Saint-Jean *et al.* (2004) puis modifié par Gigot *et al.* (2014) et Vidal *et al.* (2018), a permis de préciser des paramètres permettant d'optimiser l'efficacité d'associations de deux variétés de blé contre des agents pathogènes à dispersion pluviale, tels que l'agencement spatial des variétés associées, leurs proportions, le différentiel des résistances portées.

Jusqu'à présent les études théoriques et expérimentales des épidémies de septoriose dans des associations de blé tendre se sont focalisées sur leur capacité à limiter la sévérité au travers de deux processus : la limitation de la dispersion de *Z. tritici* dans le couvert et la capacité de l'association à réduire les dégâts qui en résultent. L'impact des associations sur les populations de *Z. tritici* est ainsi caractérisé d'un point de vue quantitatif. Or, la diversification du couvert, dont on a vu qu'il pouvait être à l'origine de processus de sélection au fur et à mesure du développement de l'épidémie au cours d'une saison de culture, pourrait affecter la façon dont la population pathogène s'adapte aux résistances variétales (voir 3.5), voire modifier la dynamique de cette adaptation.

5 PROBLEMATIQUE DE LA THESE ET STRATEGIE DE RECHERCHE

Répondre au problème que représente le contournement de résistances qualitatives consiste à identifier des stratégies de déploiement susceptibles d'augmenter leur durabilité, même seulement partiellement. Le rôle que pourrait jouer la diversification du peuplement végétal dans la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale mérite d'être étudié plus en détail, au-delà des objectifs plus classiques de réduction de sévérité d'une maladie et de stabilité du rendement. Les mécanismes épidémiologiques et évolutifs induits par la diversification des pressions de sélection dans une association variétale font de ce qui est souvent seulement vu comme une pratique agronomique un objet d'étude, voire un « outil de recherche », particulièrement intéressant pour comprendre comment l'hétérogénéité génétique d'un couvert modifie la population pathogène et affecte sa dynamique évolutive à l'échelle de la parcelle. Le haut potentiel d'adaptation des populations de *Z. tritici,* combiné à la dualité de ses modes de reproduction, font de cet agent pathogène un bon candidat pour analyser la transmission de virulences à l'échelle annuelle. L'objectif de cette thèse est d'identifier et quantifier l'effet des associations variétales sur la dynamique épidémiologique et évolutive des populations pathogènes à l'échelle annuelle, ainsi que la modulation de cet effet par la proportion des variétés associées.

5.1 Problématique de la thèse

Quel est l'impact d'un couvert hétérogène sur la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale qualitative à l'échelle annuelle ?

Les associations variétales en tant que stratégie de déploiement d'une résistance variétale pourraient-elles permettre de concilier son efficacité et sa durabilité ?

5.2 Stratégie de recherche

Pour répondre aux deux questions précédentes, le manuscrit est divisé en plusieurs parties et sous-questions qui ont défini ma stratégie de recherche :

Chapitre I – Dynamique annuelle des populations de *Z. tritici* dans une association variétale de blé : Existe-t-il un compromis entre l'efficacité et la durabilité d'un gène de résistance récemment contourné ? *[Article 1 en anglais ; manuscrit publié dans Plant Pathology)]*

Chapitre II – L'impact d'une association variétale de blé sur la dynamique de la virulence dans les populations de *Z. tritici* persiste-t-il après la reproduction sexuée, et entre deux saisons de culture ? *[Article 2 en anglais ; manuscrit accepté avec modifications mineures dans Plant Pathology]*

Chapitre III – Des scénarios multiples de croisements sexués chez *Z. tritici* sur résidus de culture : Quelles conséquences potentielles sur la transmission d'une virulence à l'échelle populationnelle ? *[Article 3 en anglais ; manuscrit soumis à Fungal Genetics and Biology]*

Discussion générale – Analyse intégrative des processus susceptibles d'expliquer l'impact d'associations variétales sur la dynamique épidémiologique et évolutive de *Z. tritici* à l'échelle annuelle.

Perspectives – Cadre conceptuel de modélisation mécaniste permettant de simuler l'impact de la « fréquence de virulence » et des « proportion de variétés » sur la dynamique de la virulence dans les populations pathogènes.

Conclusion – Vers une utilisation des associations variétales à des échelles plus larges ?

5.3 Stratégie expérimentale

L'impact des associations sur les sous-populations virulentes et avirulentes de *Z. tritici* vis-à-vis d'un gène de résistance qualitative (*Stb16q*) a été étudié au travers de deux expérimentations complémentaires : (i) la caractérisation de la taille et de la composition de ces sous-populations dans des conditions agronomiques (Chapitre I et II) et (ii) l'identification de croisements sexués possibles entre souches virulentes et avirulentes sur les variétés associées en conditions semi-contrôlées (Chapitre III).

Dans une première expérimentation, les sous-populations pathogènes ont été examinées à des phases clés (Figure 15a) : la période épidémique (du début t1 à la fin t2 d'une épidémie ; Chapitre I) ou phase asexuée, et la période inter-épidémique (t3) ou phase sexuée (Chapitre II). Pour cela, un essai en micro-parcelles a été mis en place

en 2018 et répété en 2019 avec des associations de deux variétés, l'une porteuse ('résistante') et l'autre non-porteuse ('sensible') du gène *Stb16q*, en différentes proportions : 0.25, 0.50 et 0.75. Afin de quantifier l'impact des associations à ces moments clés, j'ai déterminé les modifications de la taille des sous-populations ($\bar{n}$; sévérité de maladie ou nombre d'ascospores sur résidus) et de leur composition ($\bar{f}$; fréquence de souches virulentes). L'essai au champ a permis de tester les hypothèses selon lesquelles cultiver deux variétés en association différant par leur résistance (Figure 15d), dans des proportions variables, conduit à une modulation : ① de l'effet filtre du couvert vis-à-vis des souches virulentes ('vir) et avirulentes ('avr') à t1 ; ② des processus liés à la dispersion de spores asexuées à l'origine de contaminations croisées entre variétés à t2 ; ③ de la transmission d'allèles de virulence à l'issue de la reproduction sexuée à t3.

Dans une seconde expérimentation (Chapitre III), j'ai exploré la diversité des scenarios conduisant à la reproduction sexuée de *Z. tritici* et leur potentielle mise en œuvre dans les associations variétales (voir ③ dans la figure 15). Pour cela, différentes situations de croisement impliquant des souches virulentes et avirulentes ont été testées en conditions semi-contrôlées. Ces situations ont été générées par trois types de co-inoculation ('vir × vir', 'avr × vir' et 'avr × avr'), complétés par des inoculations simples, réalisées sur plantes adultes de chaque variété en serre, dont les résidus ont ensuite été exposés aux conditions extérieures. Les hypothèses testées ont été les suivantes : (i) les souches qui ne parviennent pas à infecter les tissus de blé pendant la phase asexuée peuvent se reproduire sexuellement ; (ii) la reproduction sexuée peut avoir lieu même si l'une des souches parentales arrive sur les tissus de la plante après sa sénescence complète.

Enfin, en s'appuyant sur l'ensemble de résultats expérimentaux acquis, j'ai proposé un cadre conceptuel pour une approche de modélisation qui s'intègre dans les perspectives de cette thèse. Le modèle imaginé devrait permettre de tester l'hypothèse selon laquelle la capacité d'une association à retarder – ou à accélérer – le contournement d'une résistance variétale dépend : (i) de la proportion des deux variétés associées ; (ii) de la fréquence de souches virulentes au sein du pool d'inoculum primaire, et donc du stade de contournement lié à l'historique d'utilisation du gène de résistance.

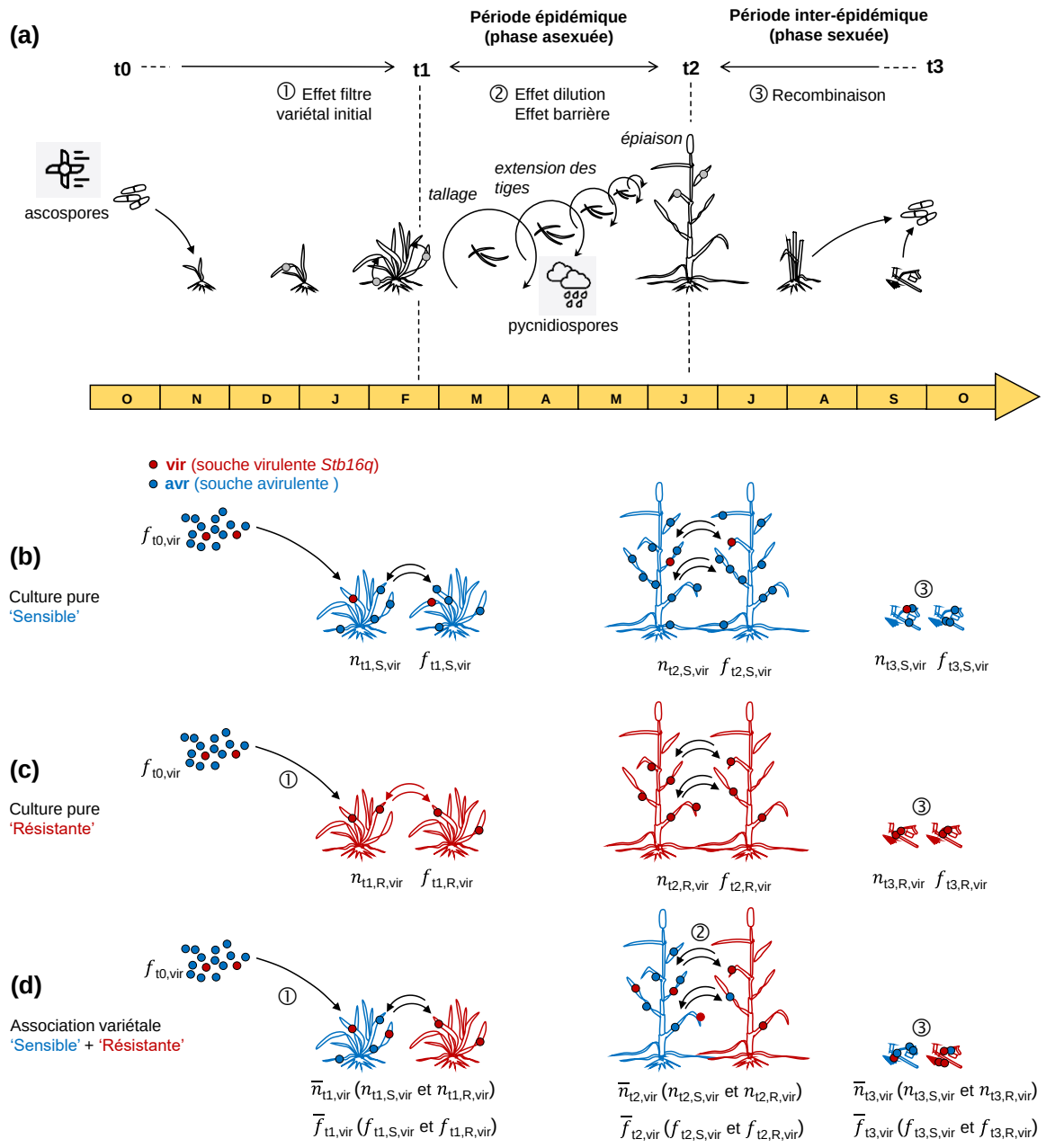


Figure 15 *: Représentation schématique de la dynamique annuelle d'une population de Z. tritici pathogène en cultures pures et en association variétale.* **(a)** Deux phases sont distinguées, après l'infection du couvert par l'inoculum primaire (t0) : une période épidémique (t1 : début et t2 : fin) impliquant plusieurs cycles de multiplication asexuée sur les plants de blé et une période inter-épidémique (t2 : début et t3 : fin) pendant laquelle la reproduction sexuée a lieu sur résidus de culture. Les principaux processus susceptibles de modifier la taille (n) et la composition (f) de la population pathogène sont numérotés. L'évolution des sous-populations virulentes (points rouges ; vir) et avirulentes (points bleus ; avr) et les processus impliqués sont illustrés dans différents couverts : **(b)** en culture pure de la variété dite 'sensible' (S ; non porteuse de *Stb16q*), **(c)** en culture pure de la variété dite 'résistante' (R ; porteuse de *Stb16q*), **(d)** en association variétale de la variété sensible et résistante.

CHAPITRE I

Dynamique annuelle des populations de *Z. tritici* dans une association variétale de blé : Existe-t-il un compromis entre l'efficacité et la durabilité d'un gène de résistance récemment contourné ?

Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: a compromise between the efficiency and durability of a recently broken-down resistance gene?*

* *article publié dans la revue Plant Pathology :*

Orellana-Torrejon C[1,2], Vidal T[1], Boixel A-L[1], Gélisse S[1], Saint-Jean S[2], Suffert F[1], 2022. Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: A compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology* 71, 289–303. https://doi.org/10.1111/ppa.13458

[1]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UR BIOGER, Thiverval-Grignon, France
[2]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, Thiverval-Grignon, France

Abstract

Cultivar mixtures slow polycyclic epidemics but may also affect the evolution of pathogen populations by diversifying the selection pressures exerted by their plant hosts at field scale. We compared the dynamics of natural populations of the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* in pure stands and in three binary mixtures of wheat cultivars (one susceptible cultivar and one cultivar carrying the recently broken-down *Stb16q* gene) over two annual field epidemics. We combined analyses of population 'size' based on disease severity, and of population 'composition' based on changes in the frequency of virulence against Stb16q in seedling assays with more than 3000 strains. Disease reductions were observed in mixtures late in the epidemic, at the whole canopy scale and on both cultivars, suggesting the existence of a reciprocal 'protective' effect. The three cultivar proportions in the mixtures (0.25, 0.5 and 0.75) modulated the decrease in (i) the size of the pathogen population relative to the two pure stands, (ii) the size of the virulent subpopulation, and (iii) the frequency of virulence relative to the pure stand of the cultivar carrying *Stb16q*. Our findings suggest that optimal proportions may differ slightly between the three indicators considered. We argued potential trade-offs that should be taken into account when deploying a resistance gene in cultivar mixtures: between the dual objectives 'efficacy' and 'durability', and between the 'size' and 'frequency' of the virulent subpopulation. Based on current knowledge, it remains unclear whether virulent subpopulation size or frequency has the largest influence on interepidemic virulence transmission.

Keywords

Cultivar mixture, resistance breakdown, *Stb16q*, virulence, wheat disease epidemics, *Zymoseptoria tritici*.

Introduction

The industrialisation of agrosystems has greatly simplified the implementation of crop protection. In conventional cereal farming, fungal disease control is based on two major pillars: phytosanitary products and disease-tolerant or resistant cultivars. Most fields are planted with a single cultivar, in which effective resistance usually depends on the combination of a few qualitative resistance genes rather than diversified quantitative genetic components. The strong resistance conferred by a single gene is simpler for breeders to handle, but may be easily overcome by pathogens (McDonald & Linde, 2002).

The number of wheat cultivars grown in North-Western Europe is small (Perronne *et al.*, 2017). This leads to the exertion of unidirectional selection pressures on plant pathogen populations, fostering the breakdown of qualitative resistances, and resulting in an increase in the frequency of virulent strains just after their emergence (Brown & Tellier, 2011). Host homogeneity thus limits the 'durability' of qualitative resistance, defined as its efficacy over a prolonged period of widespread use under conditions conducive to the disease (Johnson, 1984). Pathogen evolution, which occurs at a variable rate, usually results in the replacement of the 'oldest' cultivars grown with others carrying 'new' sources of resistance. These dynamics have been widely described in publications on wheat diseases as a response to the common 'boom-and-bust' cycles observed in clonal pathogen populations (*e.g.* McIntosh & Brown, 1997) and to the more gradual breakdown of resistance in diversified sexual populations (*e.g.* Cowger *et al.*, 2000). In this context, one of the most striking issues currently facing us is the need to reconcile the efficiency and durability of the resistances available to farmers, by identifying optimal strategies for their deployment over different space-time scales (Fabre *et al.*, 2015).

Increasing crop diversity at field scale has been widely reported to result in more efficient control over plant disease epidemics. This is the case for cultivar mixtures (Wolfe, 1985), in which cultivars of the same species with complementary traits, including those relating to plant immunity, are grown together. Cultivar mixtures have long been considered particularly effective against airborne fungal pathogens (Cowger & Mundt, 2002b; Borg *et al.*, 2018) and were widely used at the end of the last century in some European countries. The use of wheat mixtures has increased in Europe in recent years, reflecting a growing interest in the beneficial effects of mixtures. In France, for instance, the percentage of the national area occupied by mixtures of bread wheat cultivars has doubled over the last four years (4.8% in 2017, 8.6% in 2018, 11.9% in 2019, and 12.2% in 2020; FranceAgriMer). The factors affecting the efficacy of cultivar

mixtures against splash-dispersed diseases, such as Septoria tritici blotch (STB) on bread wheat, have also been investigated, with a combination of experimental and modelling approaches (Gigot *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2017a; Kristoffersen *et al.*, 2019). The proportions of susceptible and resistant cultivars in the mixture are known to have a determinant effect on disease reduction (Finckh *et al.*, 2000; Gigot *et al.*, 2014; Borg *et al.*, 2018). Nevertheless, most of the experimental approaches focused on the impact of mixtures on the overall canopy, with the aim of using the most resistant plants to 'protect' the susceptible plants, and little is known about the consequences for the most resistant cultivar. The value of cultivar mixtures for controlling diseases lies in the complementarity of the cultivar phenotypes, providing a guarantee of efficacy. However, cultivar mixtures may affect the evolution of pathogen populations, by diversifying the selection pressures exerted by their plant hosts at field scale, potentially with different effects on the different cultivars in the mixture. Little is known about pathogen evolution (changes in virulence gene frequencies) in cultivar mixtures, particularly during the early stages of resistance gene breakdown, *i.e.* when the frequency of virulent strains remains low.

The heterothallic ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici*, which causes STB, is responsible for yield losses averaging 20% on susceptible bread wheat cultivars in North-Western Europe (Fones & Gurr, 2015). The development of epidemics is dependent on both splash-dispersed asexual pycnidiospores during the wheat growing period and wind-dispersed ascospores from sexual reproduction on crop residues (Figure I.1a; Suffert *et al.*, 2011). The potential intra-annual selective dynamics and strong genetic recombination within *Z. tritici* populations make STB a good candidate model for investigating the issues described above. Cultivars carrying qualitative and quantitative resistances have been developed and used to control STB, leading to an overall increase in the mean resistance of commercial wheat cultivars registered in France in the last decade (from 5.2 in 2015 to 6.0 in 2019, on a scale of 1 to 9, with 9 corresponding to the most resistant cultivar; ARVALIS-Institut du Végétal/CTPS). In total, 21 *Stb* genes and 89 QTLs have been identified and mapped (Brown *et al.*, 2015). *Stb16q*, one of the most recent major resistance genes to have been incorporated into several cultivars by breeders, initially provided high levels of resistance against STB in both seedlings and adult plants (Ghaffary *et al.*, 2012). *Stb16q* is present in 13 wheat cultivars registered in France between 2012 and 2018, including cv. Cellule (Florimond Desprez, France). Cellule was widely used in France, becoming the third most frequent cultivar grown (8% of the area under wheat in 2016), but its use then declined following a decrease in its resistance to STB. Indeed, STB symptoms

were first observed on Cellule in 2015 in France (Romain Valade, ARVALIS-Institut du Végétal, pers. com.) and in 2019 in Ireland (Kildea *et al.*, 2020), highlighting the beginning of a breakdown of *Stb16q* resistance.

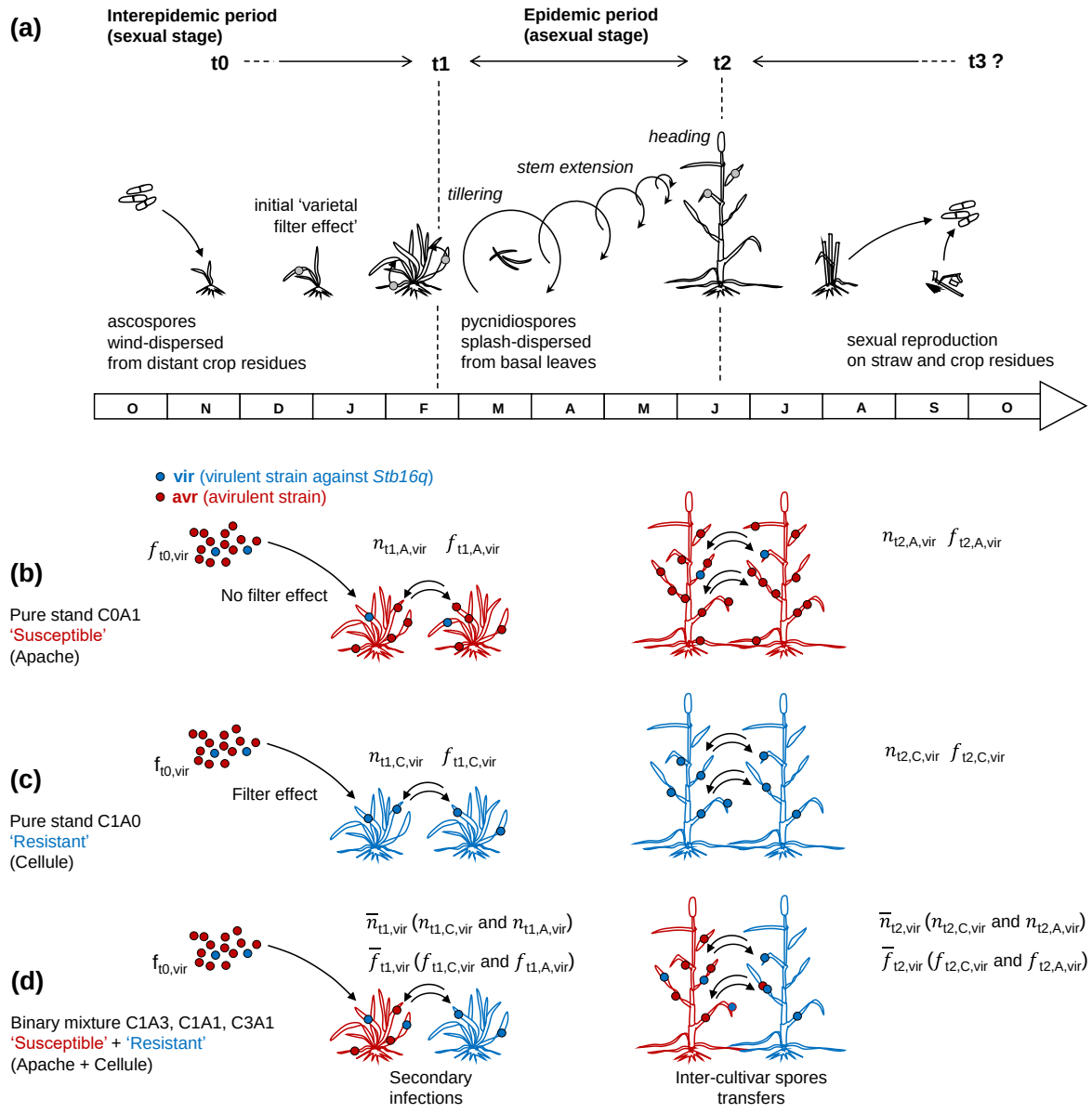


Figure I.1. ***(a)*** *Overview of the development of a Septoria tritici blotch epidemic adapted to* ***(b, c)*** *two pure stands and to* ***(d)*** *a mixture of the two wheat cultivars, one carrying the Stb16q resistance gene, and the other lacking this gene (cv. Cellule in proportion p_C and cv. Apache in proportion 1 – p_C).*The size of the pathogen population can be expressed as $n_{t,v,vir}$ (size of the virulent subpopulation on the cultivar $v \in$ [A; C] at time $t \in$ [t1; t2]) and $\overline{n}_{t,vir}$ (size of the virulent subpopulation on the whole canopy at time t). The composition of the pathogen population is expressed as $f_{t,v,vir}$ (frequency of virulent strains on cultivar v at t) and $\overline{f}_{t,vir}$ (frequency of virulent strains on the whole canopy at time t), with $f_{t0,vir}$ the initial frequency of virulent strains in the local pathogen population.

In this epidemiological study, our goal was to investigate the capacity of mixtures to reduce disease, as a short-term epidemiological outcome, and to interfere with the resistance breakdown process, as an evolutionary outcome. In field experiments, we analysed the effect of the proportion of wheat plants carrying the qualitative resistance gene *Stb16q* within a binary wheat mixture on the size (disease severity) and composition (frequency of virulent strains) of *Z. tritici* pathogen populations during an annual epidemic.

Materials and methods

Overall strategy

We compared the two-year dynamics of natural *Z. tritici* populations in pure stands and in binary mixtures of wheat cultivars, from the early to late stages of a field epidemic (Figure I.1a). We combined analyses of population 'size' based on disease severity in the field as a proxy, and of population 'composition' based on estimations of the proportion of virulence against *Stb16q* obtained by screening several thousands of field-collected strains in seedling assays. To this end we developed and applied an *in planta* 'population-phenotyping' strategy in a greenhouse. We then reinforced this strategy by 'confirmatory individual phenotyping' in more suitable climatic conditions in growth chamber than in greenhouse (Table I.S3), to increase the reliability of characterisation for some of the strains.

Cultivars studied

This study focused on two bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars: Apache ('A'; Limagrain, France) was chosen for its moderate susceptibility to STB (rated 4.5, stable over time, on a scale of 1 to 9, where 9 corresponds to the most resistant cultivar, ARVALIS-Institut du Végétal/CTPS), and Cellule ('C'; Florimond Desprez, France), which carries the *Stb16q* resistance gene (rated 7 in 2016 vs. 5 in 2020, ARVALIS-Institut du Végétal/CTPS). Apache was the predominant cultivar in France from 2000 to 2010, accounting for 24% of the area under wheat in 2003, subsequently falling to less than 5% after 2015 (Figure I.2a). Cellule, registered in 2012, became the third most frequently used French cultivar, but the area under this cultivar rapidly decreased after 2016 (Figure I.2b). Both cultivars were well represented in the Parisian basin and, thus, probably played a significant role in the evolutionary trajectory of the local pathogen populations collected in 2018 and 2019.

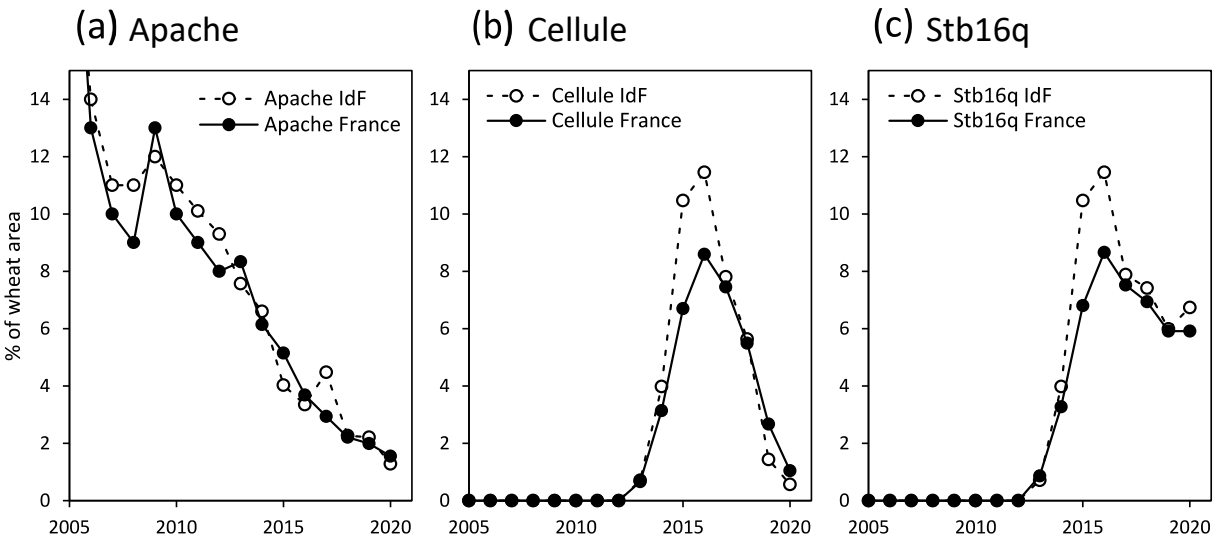


***Figure I.2**. Changes in the percentage of the area under wheat sown with **(a)** cv. Apache, **(b)** cv. Cellule, and **(c)** the 13 cultivars carrying Stb16q in France (black dots) and in the Parisian basin (Région Ile-de-France 'IdF'; white dots) from 2005 to 2020.* (FranceAgriMer datasets).

Design of the field experiment

We carried out a field experiment at the INRAE experimental station at Thiverval-Grignon (France) in the 2017-2018 and 2018-2019 seasons. A field plot was divided into three blocks (a, b and c), each consisting in five microplots (3.5 m wide x 8 m long, with an inter-row spacing of 0.175 m; Figure I.S1 and I.S2). These microplots corresponded to five randomly distributed treatments: a pure stand of wheat cv. Apache (C0A1; Figure I.1b), a pure stand of wheat cv. Cellule (C1A0; Figure I.1c), and three binary mixtures, with sowing proportions of Cellule (p_C) of 0.25, 0.5 and 0.75 (C1A3, C1A1 and C3A1; Figure I.1d). The wheat was sown on October 17, 2017, and November 15, 2018, at a density of 220 seeds·m^{-2}. The seeds were treated with the insecticide tefluthrin at a dose of 0.2 g·kg^{-1} (Attack®, Syngenta France SAS) to minimize early attacks of aphids, known to transmit yellow dwarf viruses, especially BYDV. The seed lots were prepared by considering the specific weight of seeds for each cultivar (thousand-kernel-weight) to obtain the proportions of seeds required for each treatment. The sowing was performed using the different seed lots leading to a 'randomly cultivar mixture' at the microplot scale. Differentiation between the two cultivars — a key point of the experiment — was adapted to each growth stage: (i) at seedling stage, the identification was made according to a dye included in the seed coating (red for Cellule, green for Apache; Figure I.S2b); (ii) later in the season, the identification was made according to the bearded (Cellule) or unbearded (Apache) nature of the inflorescence (Figure I.S2e). We estimated the actual proportions of each

cultivar late in the growing season, at heading, by counting spikes of each cultivar along three 1-m lines in each microplot (Figure I.S1, Table I.S1). Nitrogen fertiliser applications were adjusted by the balance-sheet method with a target yield of 7 $t \cdot ha^{-1}$. A single herbicide treatment was applied in the early spring. No fungicide treatment was applied.

Characterisation of the pathogen population size

We used disease severity (*i.e.*, diseased leaf area) as a proxy for the size of the pathogen population (*i.e.*, the number of asexual offspring), assuming the two traits to be correlated (Suffert *et al.*, 2013). Disease severity was measured at leaf scale as the percentage of leaf area covered by pycnidia (sporulating or not). For the sake of simplicity, this measure is hereafter called "sporulating area". Sporulating area was scored 0, 1%, 3%, 5%, 10% and then increments of 5% up to 100%. It was assessed visually early in the epidemic (time t1; Zadoks stage 15), before the expression of most of the secondary infections, and then late in the epidemic (time t2; Zadoks stage 70), just after the disease had reached the upper leaves (Figure I.S2). The t1 assessments of disease severity were performed on various dates (from March 5 to March 12 in 2018 and February 27 to March 18 in 2019), due to experimental constraints. We collected 10 seedlings of each cultivar from each microplot, on which disease severity was scored for the five lowest leaves. At t2, similar disease severity assessments were performed for the five upper leaves (L1 to L5 from the top to the bottom of the plant) of 10 plants of each cultivar per microplot, on May 11, 2018 and June 18, 2019. The optimal scoring window varies with epidemic dynamic. Scoring was therefore performed earlier in 2018 (intense early epidemic) than in 2019 (moderately intense late epidemic). The flag leaves (L1) were assessed a second time, in all microplots, on June 15, 2018 and June 26, 2019. The complete data set is presented in supplementary files F1-3.

A disease severity index (SEV) was calculated at the plant scale. At t1, SEV was calculated as the mean sporulating area over all non-senescent leaves. At t2, SEV was calculated as the mean sporulating area of representative leaf layers (L4 and L3 in 2018, and L3 and L2 in 2019), excluding those with a mean severity below 1% or completely senescent on more than two microplots.

A mean disease severity index (SEV_v) was then calculated for each cultivar *v* for each treatment. An overall mean disease severity index ($\overline{SEV}$) was also calculated at the whole-canopy scale for each treatment, using SEV_v weighted by the proportions of the cultivars (p_C for Cellule and $1 - p_C$ for Apache), as follows:

$$\overline{SEV} = p_C \times SEV_C + (1 - p_C) \times SEV_A \qquad \text{eq. 1}$$

We assessed the effect of treatment on the disease severity index (SEV) at t1 and t2, and analysed changes in this effect over the course of each epidemic. To this end, SEV was transformed by ordered quantile normalisation (*bestNormalize* R package). Its variance was partitioned into sources attributable to the following factors and their interactions, in pairs: cultivars (A; C), treatments (C0A1; C1A3; C1A1; C3A1; C1A0), blocks (a; b; c), epidemic stages (t1; t2) and years (2018; 2019), according to the generalised linear model. The model was adjusted by removing non-significant interactions one-by-one. For SEV_v and $\overline{SEV}$, standard errors were corrected by taking into account the error propagation of formulas.

The effect of treatment on SEV_A and SEV_C at each stage of each year was first assessed with a Tukey HSD post-hoc test for multiple pairwise comparisons on estimated marginal means (*emmeans* and *multcomp* packages of R). The variance of the overall disease severity index $\overline{SEV}$ was then estimated by calculating the standard error. The effect of cultivar mixtures on $\overline{SEV}$ was evaluated by plotting the 'expected' $\overline{SEV}$ (assuming an absence of mixture effect) as a linear function of the severity in each pure stand weighted by Cellule proportions. All data analyses were performed with R software (v4.0.2 R Core Team 2012).

Table I.1. *Number of Z. tritici strains sampled on each cultivar ('A' for Apache, 'C' for Cellule) for each treatment (C0A1, C1A3, C1A1, C3A1 and C1A0), at the early (t1) and late (t2) stages of the 2018 and 2019 epidemics, and phenotyped to determine virulence status.*

Year	Stage	C0A1	C1A3		C1A1		C3A1		C1A0	Total
		A	C	A	C	A	C	A	C	
2018	t1 [1]	179	90	90	90	90	90	87	90	806
	t2 [2]	90	90	90	89	90	90	90	90	719
2019	t1 [3]	180	82	88	88	84	90	89	90	791
	t2 [4]	90	90	90	90	90	90	89	90	719

[1] collected from March 5th to 12th; [2] June 13th; [3] from February 27th to March 13th; [4] June 25th.

Characterisation of the pathogen population composition

Sampling of strains in the field — Strains of *Z. tritici* were collected at t1 and t2 in 2018 and 2019, to constitute groups of 30 strains per cultivar and per microplot (total of 3060 strains; Table 1 and supplementary file F4). The sampling effort was doubled in the pure stands of the susceptible cultivar at t1 in 2018 and 2019 (2 x 180 strains). The population present on cv. Apache early in the epidemic (t1), which may be considered a representative sample of the primary inoculum population, was used to estimate the initial (t0) frequency of virulent strains ($f_{t0,vir}$; Figure I.1b).

We ensured that 30 strains were obtained per cultivar from each microplot, by sampling the 40 lowest leaves of seedlings at t1 and the flag leaves of adult plants at t2. These samples were placed in a humid chamber to promote the extrusion of cirrhi. One cirrhus per leaf was picked with a pin and streaked onto a Petri dish containing PDA (potato dextrose agar, 39 $g \cdot L^{-1}$), which was then incubated at 18°C for more than five days in the dark. A few blastospores from a single colony were then picked and spread on a new plate. This operation was repeated twice to obtain pure single-spore strains. Each strain was finally scraped off the plate, to obtain a substantial mass of blastopores (150 mg), which was deposited at the bottom of cryotubes and stored at -80°C. At t1 in 2018, we sometimes had to collect more than one strain per leaf to counterbalance the low level of severity on certain microplots or the degradation/senescence of the diseased leaves. In both situations, we picked cirrhi from two to three distinct, distant lesions present on the same leaf.

Phenotyping strategy — We characterised the *Z. tritici* strains for 'virulence' (defined by Niks *et al.* (2011) as "the capacity of a pathogen to infect a plant with one or more major genes for resistance") against *Stb16q* and their 'aggressiveness' (the quantitative term of pathogenicity on a susceptible host; Lannou, 2012). We developed a 'population-phenotyping' method for use on cv. Cellule and cv. Apache seedlings in the greenhouse (Figure I.S3), which allowed us to characterise individually a large number of strains while accepting some imprecisions or individual errors quantified *a posteriori*. This approach was complemented by 'confirmatory individual phenotyping' in growth chambers, in which we characterised several dozens of strains that were collected from sporulating lesions on Cellule in the field but appeared avirulent during population-phenotyping. This made it possible to determine the rate of type II error (false avirulence) for population-phenotyping.

Population-phenotyping — Population-phenotyping was performed from April 2018 to August 2020, by splitting the 3060 strains into 32 batches of 102 (t1) or 93 (t2) strains, which were simultaneously tested in the greenhouse (Figure I.3). Each batch was balanced to contain similar numbers of strains from each cultivar, treatment, and block. Eight virulent strains were added to each batch as control strains. Wheat seeds (cv. Apache or Cellule) were sown in 0.4-litre pots, to obtain three 18-day-old seedlings per pot. The pots were kept in the greenhouse under natural daylight supplemented with 400 W sodium vapour lamps to homogenise the lighting conditions. The temperature was kept below 20°C during the 15-h light period and above 15°C during the 9-h dark period. Relative humidity was kept at a mean value of 68 ± 9%. The thermal time at which disease severity was assessed was calculated for each batch (Figure I.S5).

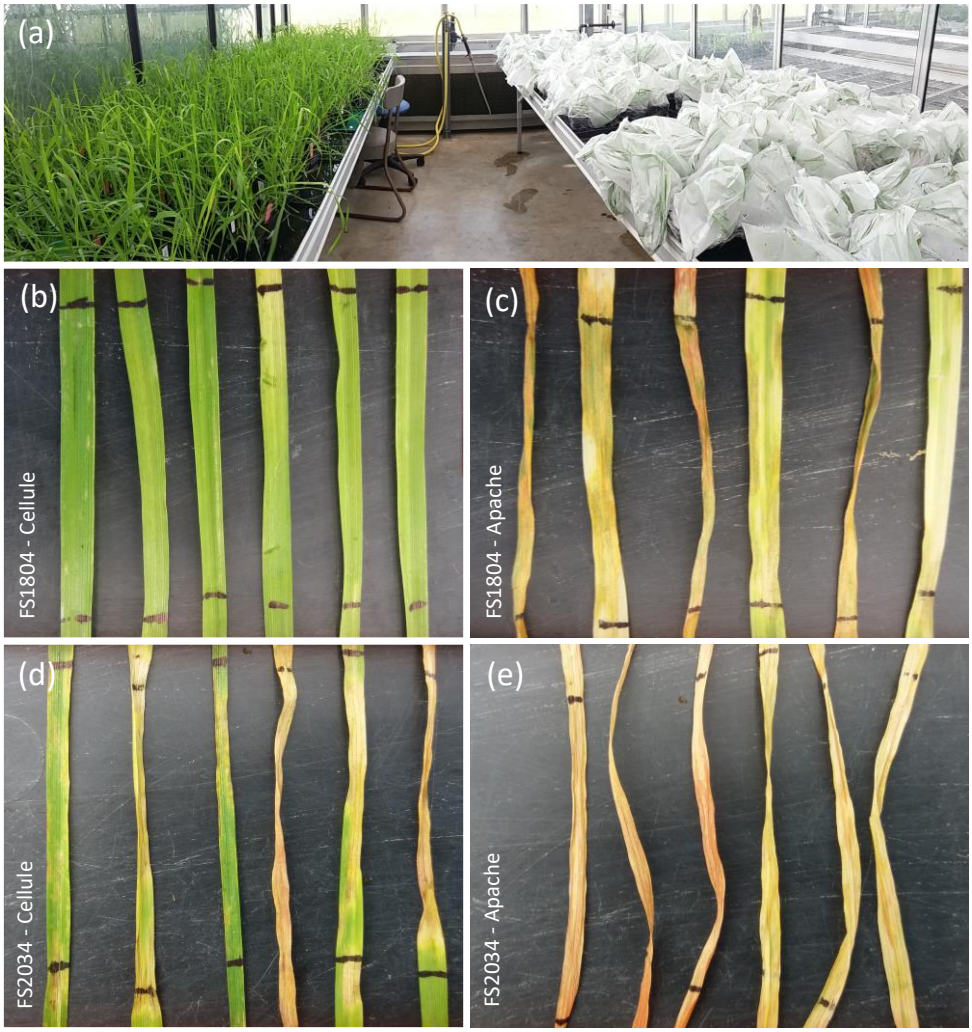


***Figure I. 3**. **(a)** Example of two 102-strain batches, one obtained just after inoculation (right) and the other one week later (left). **(b-e)** Typical incompatible-compatible interaction between the FS1804 (avirulent against Stb16q) and FS2034 (virulent against Stb16q) strains on six Cellule and Apache leaves (three second leaves on the left and three third leaves on the right).*

We simplified the classical method based on accurate adjustment of a blastospore suspension, by considering that the differences in disease severity induced by the differences in concentration within the range 10^5 to 5.0 10^5 spores·mL^{-1} (see Figure 8 in Suffert *et al.*, 2018) were acceptable for our objective. We thus used non-adjusted suspensions in this range of concentrations. For each strain, we diluted the blastospores recovered directly with a 10 µL inoculating loop (about 10 mg in the half-filled central ring; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) from the freshly thawed content of the cryotube preserved at -80°C, in 30 mL of water. Two series of independent tests showed that this process provided a good compromise between robustness and repeatability (Figure I.S4). Two drops of surfactant (0.1% v/v of Tween 20; Sigma, France) were added to each suspension, to increase its adhesion to leaves. All suspensions were prepared the day before inoculation and stored at 5°C. A cotton bud was used to inoculate a 5 cm mid-length leaf section by two back-and-forth passages over the second and third leaves from the bottom on seedlings previously described. This way, each strain was tested individually on two leaves of the three seedlings of the pot (6 replicates), for each cultivar. Each pot was then enclosed in sealed transparent polyethylene bags moistened with distilled water for 72 h, to promote infection.

Disease severity was assessed visually 21 days post inoculation (mean thermal time 434.8°C·days for the 32 batches; Figure I.S5), as the percentage of the inoculated leaf surface covered by pycnidia (sporulating area assessed, from 0 to 100%, in increments of 5%). The complete data set is presented in supplementary file F5. A strain was considered virulent ('vir') against *Stb16q* when pycnidia were observed on at least one of the six leaves of Cellule (at least 5% of sporulating area on the leaf, the minimum for visual quantification in our experimental conditions). The strains were otherwise considered avirulent ('avr'). The frequency of virulent strains $f_{t,v,vir}$ (t ∈ [t1; t2], v ∈ [A; C]) was calculated for each cultivar in each treatment (Figure I.1b-d). The effect of the treatment on the number of virulent individuals was assessed with a χ^2 test, or with Fisher's exact test when the expected numbers were small, with Bonferroni correction for pairwise comparison. We analysed the changes in $f_{t,v,vir}$ from t1 to t2, assessing the year effect with a test of equal or given proportions (*stats* package of R). The initial frequency of virulent strains in the local pathogen population ($f_{t0,vir}$; Figure I.1b-d) in 2018 and 2019 was estimated by characterising the 180 strains from the pure stand of cv. Apache. We postulated that in this treatment the initial 'filter effect' exerted on a strain according to its virulence status with respect to *Stb16q* was negligible ($f_{t1,A,vir}$ = $f_{t0,vir}$ in C0A1; Figure I.1b).

We calculated the aggressiveness (AG) and conditional aggressiveness (AGc), defined as the amount of disease "conditional on the individuals being infected" (McRoberts *et al.*, 2003). AG was estimated as the mean sporulating area on all leaves of the susceptible cultivar, whereas AGc was calculated on symptomatic leaves only, to take into account the absence of symptoms on some leaves (due to the less suitable climatic conditions in greenhouse than in growth chamber; Table I.S3). For a given strain, AGc was thus calculated under the condition that at least three of the six inoculated leaves presented pycnidia. Furthermore, we assessed the possible fitness cost of virulence against *Stb16q,* by evaluating the effect of virulence on aggressiveness. Because of the non-normality of data and the shape of the distribution curve, we used a generalised linear model adapted to a Poisson distribution, followed by a Tukey HSD post-hoc comparison (*car R package*). The variance of each aggressiveness trait (AG and AGc) was partitioned into sources attributable to the following factors and their interactions, in pairs: the virulence status of the strain (vir; avir), treatment (C0A1; C1A3; C1A1; C3A1; C1A0), the cultivar of origin (A; C), year (2018;2019), epidemic stage (t1; t2), block (a; b; c), and batch (1-32).

Confirmatory individual phenotyping — A second round of phenotyping was applied to 47 strains that did not fulfil the requirement to be considered virulent against *Stb16q* during the population-phenotyping in greenhouse, despite having been isolated from sporulating lesions on Cellule in 2018 (see the Results section). For this purpose, we used Cellule (C) and two isogenic lines of the wheat cultivar Chinese Spring without *Stb6* (naturally present in Chinese Spring, Chartrain *et al.*, 2005), one of which carried *Stb16q* (CS-*Stb16q*) whereas the other did not (CS). The strains were split into three batches and tested individually in a growth chamber (Figure I.S3). A virulent and an avirulent strain were added to each batch as controls. Inoculum suspensions were adjusted to a density of 5.0 10^5 spores·mL^{-1} with a Malassez cell. Leaves were inoculated by applying the suspension with a paintbrush, on the second leaf from the bottom of nine seedlings of each cultivar. The temperature in the growth chamber was kept below 20°C during the 15-h light period and above 15°C during the 9-h dark period. Relative humidity was maintained at a mean of 88.5 ± 1.2%. Disease severity was assessed visually 14, 20 and 26 dpi (day post inoculation), as the percentage sporulating area. The virulent, avirulent or non-pathogenic nature of each strain was determined by calculating the mean aggressiveness (mean percentage of sporulating area on a leaf obtained across the nine replicates) and compared it to a classical 10% of sporulating area threshold (Thierry Marcel, INRAE BIOGER, pers. com.) rather than 5% in greenhouse (less suitable climatic conditions; Table I.S3). A strain was considered (i) virulent against *Stb16q* if the mean aggressiveness was equal or higher than this

threshold on both CS-*Stb16q* and Cellule, (ii) avirulent if it was equal or higher than this threshold on CS only, or (iii) non-pathogenic if it was below this threshold on the three cultivars (Figure I.S10). The mean aggressiveness of strains was compared between CS-*Stb16q* and Cellule with a Wilcoxon test. The effect of treatment on the number of avirulent strains was assessed with Fisher's exact test.

Overall impact of cultivar mixtures on the dynamics of virulent subpopulations

We calculated the percentage of the diseased leaf area occupied by virulent strains at t2 ($n_{t2,v,vir}$; v ∈ [A; C]; Figure I.1b-d), as a proxy for the size of the virulent subpopulations responsible for the last asexual disease cycle. This dimensionless variable was obtained by multiplying the disease severity index (SEV_v) on the flag leaves of each cultivar in each microplot by the frequency of virulent strains estimated at t2 ($f_{t2,v,vir}$). The mean size of the virulent subpopulations ($\overline{n}_{t2,vir}$) and the mean frequency of virulent strains ($\overline{f}_{t2,vir}$) were calculated at the whole-canopy scale for each treatment (Figure I.1b-d), as for overall disease severity index ($\overline{SEV}$, eq. 1). The effect of treatment on $n_{t2,v,vir}$ and $\overline{n}_{t2,vir}$ was assessed in a Kruskal-Wallis test.

Results

Impact of cultivar mixtures on the dynamics of the epidemic and the overall size of pathogen populations

Disease was generally less severe in the mixtures than in the two pure stands late in the epidemic, when the whole canopy was considered, and on both cultivars relative to their pure stands. This can be interpreted as a reciprocal 'protective' effect.

At t1 in 2018, no significant difference in mean disease severity index (SEV_v) was observed between pure stands and mixtures, regardless of the cultivar considered, except for Apache in C1A1 (p = 0.987, p = 0.042 and p = 0.155 for Apache and p = 0.172, p = 0.388, and p = 0.065 for Cellule in C1A3, C1A1, and C3A1, respectively; Figure I.4). In mixtures, Apache was in average 1.6 times more attacked than Cellule, consistent with their resistance ratings. The modelling results showed that the variance of disease severity index (SEV) was not attributable to the block factor (p = 0.090). Overall disease severity index $\overline{SEV}$ decreased with the proportion of Cellule. At t1 in 2019, SEV_A and SEV_C were lower than in 2018. In mixtures, Apache was in average 2.8 times more attacked than Cellule. In pure stands, SEV_A scored 17% and SEV_c scored 4% (data none shown). $\overline{SEV}$ decreased with the proportion of Cellule.

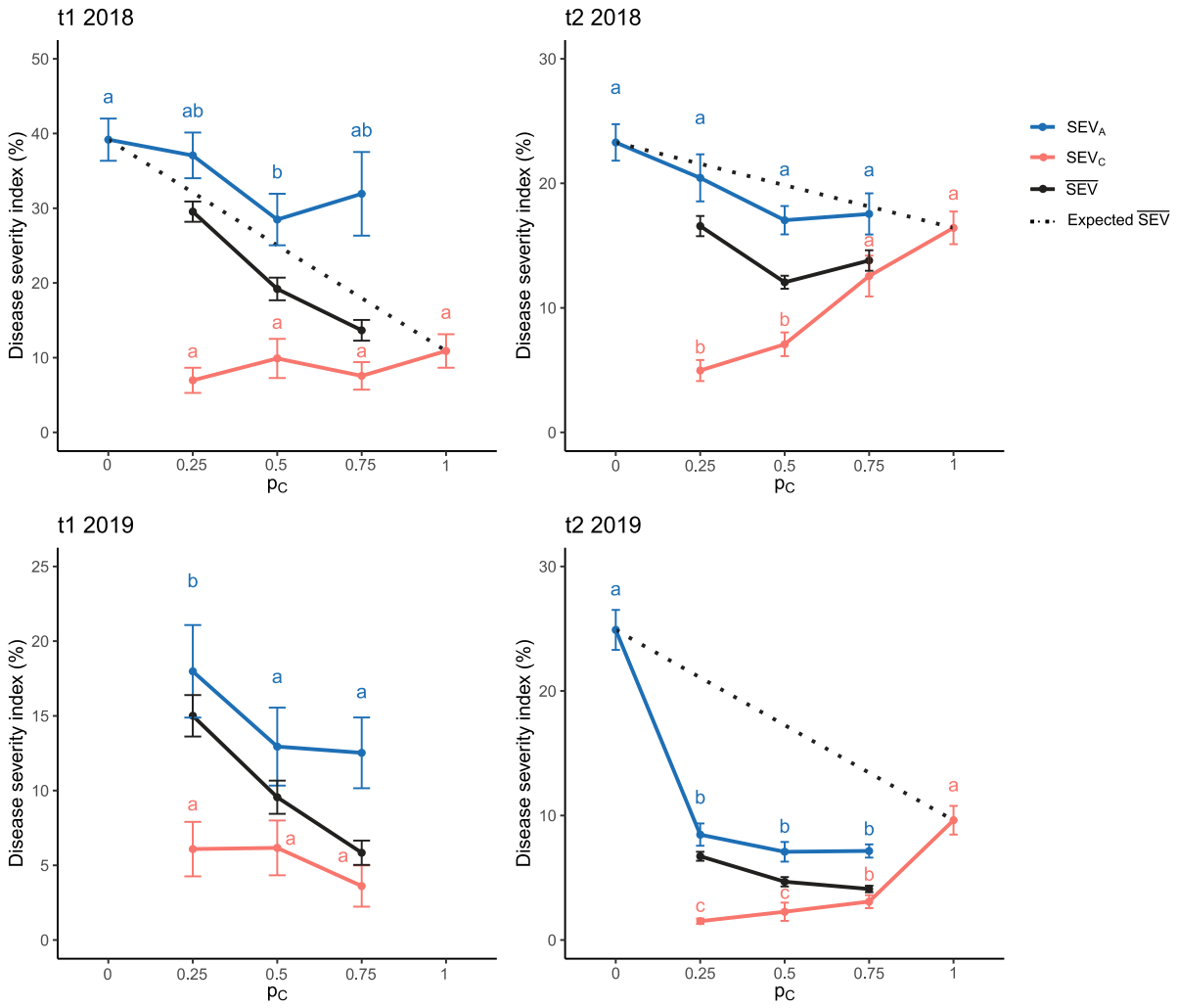


***Figure I.4**. Mean disease severity index SEV_v (mean percentage of the leaf area covered by pycnidia on cultivar v) according to the proportion of cv. Cellule (p_C) in the canopy.*SEV_A (green solid line) and SEV_C (red solid line) were calculated from disease assessments in the field. Bars represent the standard error. Significant differences in SEV_A and SEV_C between p_C are indicated by letters (generalised linear model followed by a Tuckey HSD post-hoc test. The overall severity index $\overline{SEV}$ (black solid line) was calculated at the whole-canopy scale as the mean of SEV_A and SEV_C weighted by the proportion of each cultivar. The 'expected' $\overline{SEV}$ (in the absence of a mixture effect) was plotted as a linear function of the severity in each pure stand weighted by p_C (black dotted lines). SEV_A, SEV_C and the expected $\overline{SEV}$ in pure stands at t1 in 2019 are not shown because disease severity was assessed one week earlier than in mixtures.

At t2 in 2018, SEV_v differed significantly between pure stands and mixtures for Cellule, but not for Apache (p = 0.397, p = 0.148, and p = 0.357 for Apache and p < 0.001, p < 0.001, and p = 0.089 for Cellule in C1A3, C1A1, and C3A1, respectively; Figure I.4). In pure stands, Apache was in average 1.5 times more attacked than Cellule. In mixtures, SEV_A was in average reduced by 20% and SEV_C, to a greater extent, reduced by 48% compared to the respective pure stands. At the whole-canopy scale, $\overline{SEV}$ was lower in the three mixtures than in pure stands. At t2 in 2019, SEV_v differed significantly between

pure stands and mixtures for both cultivars, this difference being more significant than in 2018 (p < 0.0001 for Apache and p < 0.0001 for Cellule in all C1A3, C1A1, and C3A1). In pure stands, Apache was 2.5 times more attacked than Cellule. In mixtures, SEV_A was in average reduced by 69% and SEV_C reduced by 73% compared to the respective pure stands. The decreases in SEV_A, SEV_C, and $\overline{SEV}$ in mixtures relative to pure stands was more pronounced in 2019 than in 2018.

The overall effect of treatment was illustrated by plotting the expected $\overline{SEV}$ as a linear function of the severity in each pure stand weighted by Cellule proportions (p_C; Figure I.4), which accounts only for 'dilution' in mixtures. The actual and expected $\overline{SEV}$ curves were close at t1 in 2018 whereas the actual $\overline{SEV}$ was below the expected $\overline{SEV}$ at t2 for the two years considered. This highlights the overall absence of a mixture effect on disease dynamics at t1, at least in 2018, and the strong mixture effect at t2 for both years. The efficacy of the various treatments relative to pure stands was 19%, 40%, 22% in 2018 and 67%, 71%, 69% in 2019, for C1A3, C1A1, and C3A1, respectively.

Impact of mixtures on the composition of pathogen populations

In total, 3035 of the 3060 *Z. tritici* strains sampled during the two years were characterised for virulence and aggressiveness, by inoculating 36420 leaves of wheat seedlings in the greenhouse. The cultivar mixtures increased the frequency of virulent strains from the early (t1) to late (t2) stages in the two epidemic years.

The frequency of virulence at t1 ($f_{t1,A,vir}$) was estimated on Apache in pure stands at 0.13 in 2018 and 0.14 in 2019 (Figure I.5). These frequencies are not significantly different (χ^2 test, p = 0.791), and the two years may therefore be considered as 'replicates'. The frequency of virulent strains on Apache did not differ significantly between treatments at t1, confirming the absence of a mixture effect early in the epidemic. The frequency of virulent strains on Apache at t2 ($f_{t2,A,vir}$) in pure stands was 0.08 in 2018 and 0.18 in 2019, and was not significantly lower than that at t1 (test of equal or given proportions, p = 0.244). Importantly, in mixtures, $f_{t2,A,vir}$ increased significantly with p_C both years.

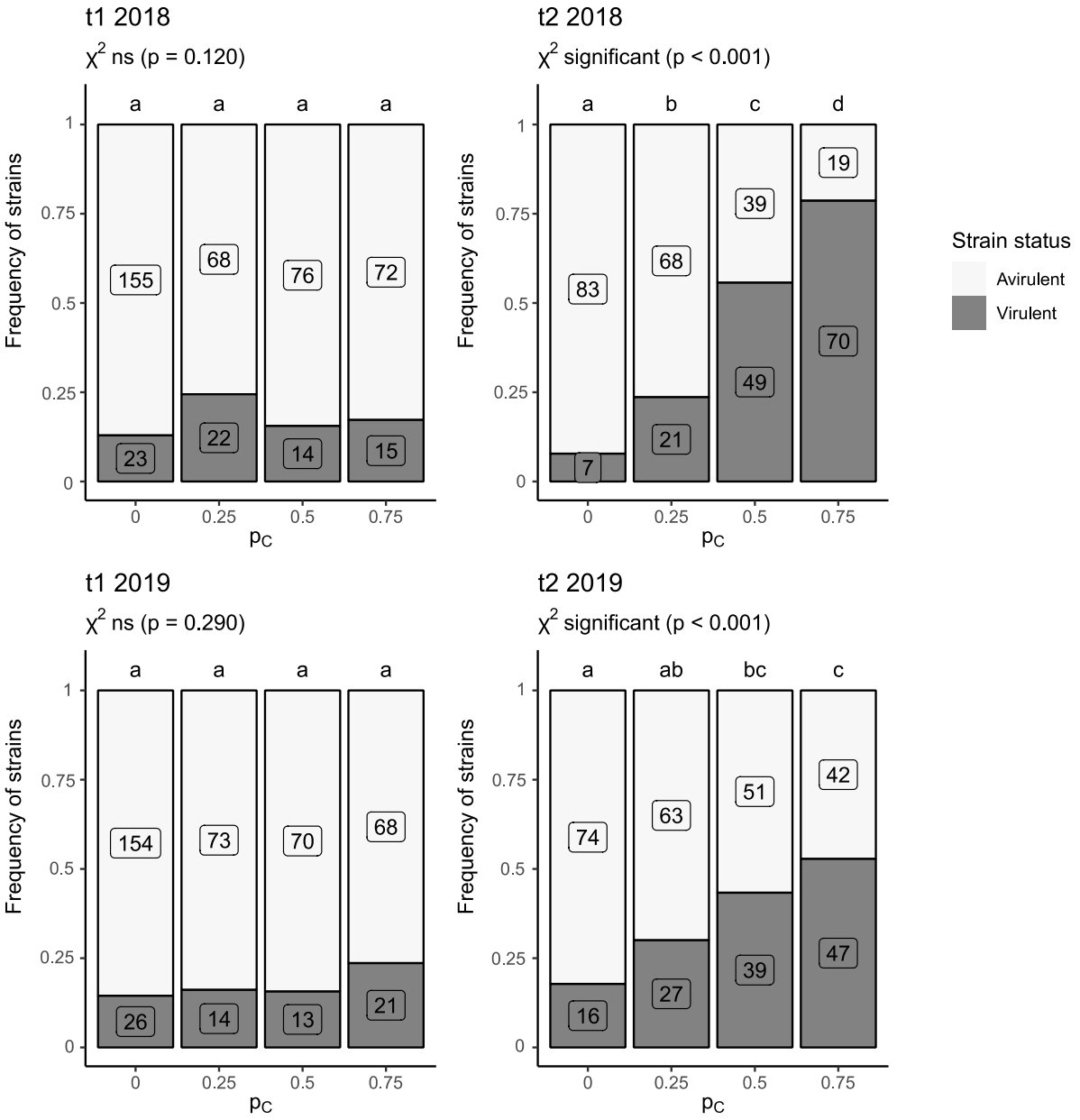


***Figure I.5**. Frequency of Z. tritici strains considered virulent (grey bars) against Stb16q (i.e., causing sporulating area on cv. Cellule) and avirulent (white bars) among the populations collected on cv. Apache in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late (t2) stages of the 2018 and 2019 epidemics.*The number of virulent and avirulent strains are indicated in grey and white boxes, respectively. The effect of treatment (pure stands and cultivar mixtures; letters at the top of each bar) on the number of virulent strains was assessed by performing a χ^2 test with Bonferroni correction for pairwise comparison.

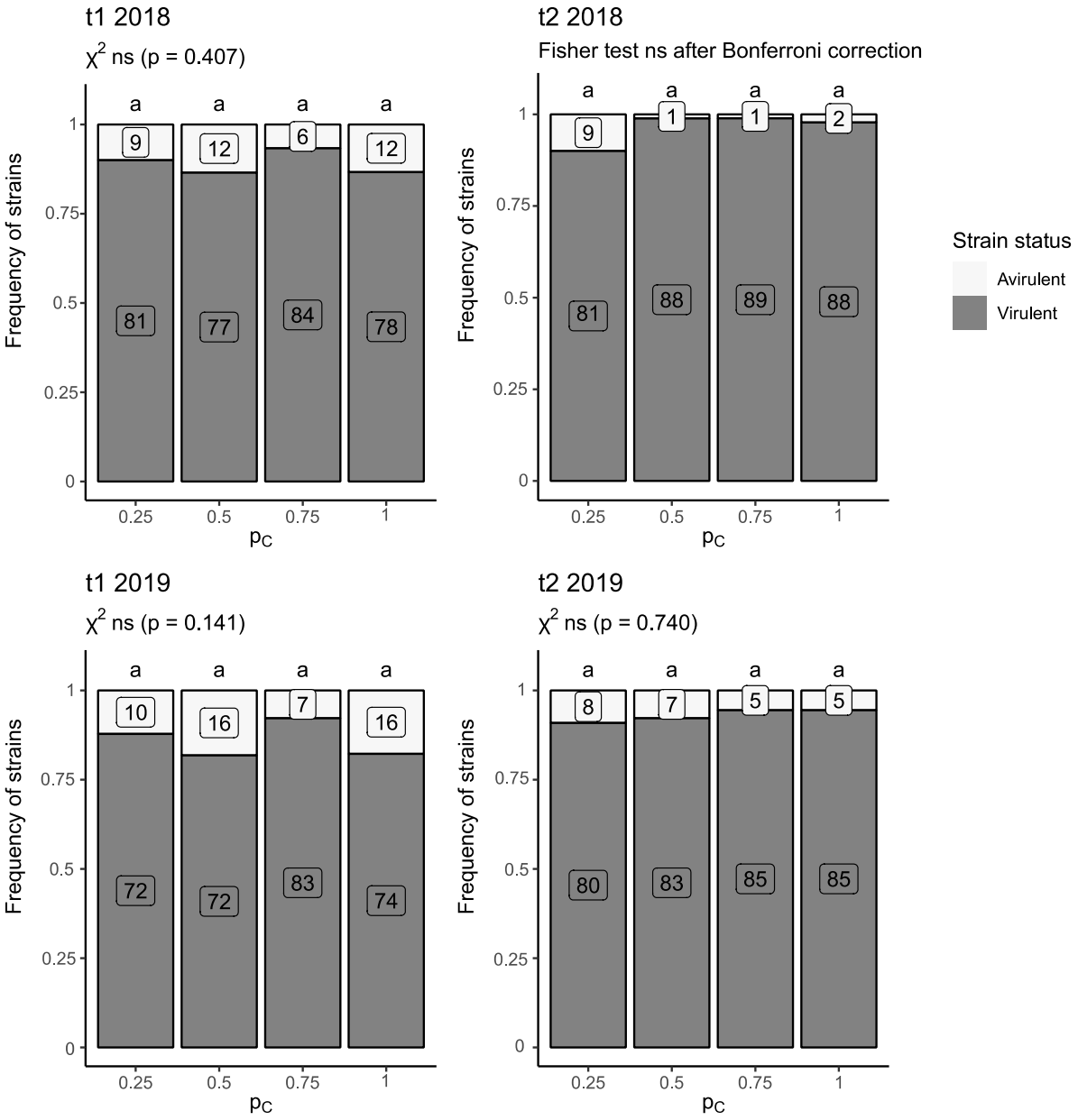


***Figure I.6**. Frequency of Z. tritici strains considered virulent (grey bars) against Stb16q (i.e., causing sporulating area on cv. Cellule) and avirulent (white bars) among the populations collected on cv. Cellule in pure stands (p_C = 1) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late (t2) stages of the 2018 and 2019 epidemics.* The number of virulent and avirulent strains are indicated in grey and white boxes, respectively. The effect of treatment (pure stands and cultivar mixtures; letters at the top of each bar) on the number of virulent strains was assessed by performing a χ^2 test, or a Fisher's exact test when the expected numbers were small, with Bonferroni correction for pairwise comparison.

Very few strains were classified as non-pathogenic: 0.3% (5/1525) in 2018 and 0.1% (2/1510) in 2019 (Figure I.S6 and I.S7). Most of the strains (>95%) induced pycnidia on Apache, with no significant difference between treatments. The percentage of strains that did not induce pycnidia on Apache was low: 4% (31/719) and 3% (23/710) for those collected on Cellule in 2018 and 2019, respectively, and 6% (50/806) and 5% (38/800) for those collected on Apache in 2018 and in 2019, respectively. Strains collected on Cellule were expected to be virulent, as a consequence of the 'filter effect' exerted by *Stb16q* (Figure I.1c). However, 7% of these strains (52/719) in 2018 and 10% (74/710) in 2019 (Figure I.6) did not induce pycnidia on Cellule during phenotyping. The proportion of these strains, considered avirulent after population-phenotyping, did not differ significantly between treatments. Only 2% of the strains (27/1525 in 2018 and 20/1510 in 2019, distributed across all treatments) induced pycnidia on Cellule but not on Apache.

Confirmatory individual phenotyping showed that 51% (24/47) of the strains tested were truly avirulent, 34% (16/47) were virulent, and the results were dubious for 15% (7/47). The overall percentage of 'false avirulent' strains collected on Cellule in 2018 was thus estimated at a maximum of 3% (23/719). All the truly avirulent strains were collected at t1 (Table I.S2). Five of the strains yielding dubious results that induced pycnidia on CS-*Stb16q* were unable to infect Cellule, probably due to another source of resistance not present in CS. Similarly, two strains that induced pycnidia on Cellule were unable to infect CS-*Stb16q*. All 47 strains induced pycnidia on CS, confirming their pathogenicity.

Virulent strains were significantly more aggressive on CS-*Stb16q* than on Cellule (Wilcoxon test, $p < 0.0001$; Figure I.S9). No significant difference in aggressiveness (neither in AG nor AGc; $p = 0.054$ and $p = 0.597$, respectively; Figure I.S8) was detected between the avirulent and virulent strains that were pathogenic on Apache (2886/3035).

Impact of mixtures on the dynamics of the virulent subpopulation

At whole-canopy scale, cultivar proportions modulated the decreases in the size of the virulent subpopulation and in the frequency of virulent strains relative to the pure stand of the cultivar carrying *Stb16q* (Cellule).

In 2018, the mean size of the virulent subpopulation ($\overline{n}_{t2,vir}$) was significantly higher in pure stands of Cellule than in pure stands on Apache. However, $\overline{n}_{t2,vir}$ was not significantly different in mixtures than in pure stands of Cellule or Apache (Figure I.7a). $\overline{n}_{t2,vir}$ tended to increased with the proportion of Cellule (p_C). In 2019, the three mixtures

significantly decreased $\overline{n}_{t2,vir}$ relative to the pure stand of Cellule (Figure I.7b), whereas the difference was not significant relative to the pure stand of Apache. The figure I.7b shows a correlation of means and variances, assuming that mixture may both reduce and stabilize the virulent subpopulation size compare to pure stands. In 2019, $\overline{n}_{t2,vir}$ in mixtures was lower than in pure stand of Cellule by a factor of about 5 and lower than that in the pure stand of Apache by a factor of 2. This difference can be explained by the very low frequency of virulent strains on Apache ($f_{t2,A,vir}$) being compensated in 2018, and, to a greater extent in 2019, by the size of the pathogen population on Apache (SEV_A), resulting in a larger number of virulent strains ($\overline{n}_{t2,vir}$). A dissociated analysis of each varietal component of the mixture can provide insight on this point. On Apache, the size of the virulent subpopulation ($n_{t2,A,vir}$) was not significantly different between pure stands and mixtures in 2018 (p = 0.200, Kruskal-Wallis test; Figure I.S11a) or 2019 (p = 0.578, Kruskal-Wallis test; Figure I.S11c). On Cellule, the size of the virulent subpopulation ($n_{t2,C,vir}$) increased significantly with p_C in 2018 (p = 0.033) and 2019 (p = 0.024). Thus, only $n_{t2,C,vir}$ contributes to the differences at whole-canopy scale.

We examined the relationship between the indicators investigated. We first focused on the relationship between the overall disease severity ($\overline{SEV}$) — an indicator of the efficacy of the mixtures — and the overall size of the virulent subpopulation ($\overline{n}_{t2,vir}$), an indicator of *Stb16q* breakdown dynamics and, thus, a proxy for the impact of the mixtures on resistance durability (Figure I.7c and I.7d). In both years, the overall trend was similar for the virulent subpopulation: $\overline{n}_{t2,vir}$ increased with the proportion of Cellule (p_C) whereas $\overline{SEV}$ decreased. In 2018, two mixtures (C1A1 and C3A1) displayed decreases for both $\overline{n}_{t2,vir}$ and $\overline{SEV}$ relative to the pure stands of Cellule and Apache. In the C1A3 mixture, $\overline{SEV}$ was slightly higher with a lower level of $\overline{n}_{t2,vir}$ than in other mixtures. The impact of mixtures was greater in 2019, with all mixtures decreasing both $\overline{n}_{t2,vir}$ and $\overline{SEV}$, which was, on average, lower than in pure stands of Apache by a factor of 10 and lower than that in pure stands of Cellule by a factor of 5. We then focused on the relationship between the mean frequency of virulent strains ($\overline{f}_{t2,vir}$) and the overall size of the virulent subpopulation ($\overline{n}_{t2,vir}$) (Figure I.7e and I.7f). Both years, $\overline{f}_{t2,vir}$ and $\overline{n}_{t2,vir}$ increased with p_C, whose quantitative impact was generally high for $\overline{f}_{t2,vir}$ but relatively limited for $\overline{n}_{t2,vir}$, especially in 2018 for mixtures (Figure I.7e and I.7f).

Finally, regardless of the indicator considered ($\overline{SEV}$, $\overline{n}_{t2,vir}$ or $\overline{f}_{t2,vir}$) and of relationship trends, the optimal p_C appeared to be about 0.5. However, our results suggest that moving away from this optimal proportion would have different effects on the three indicators.

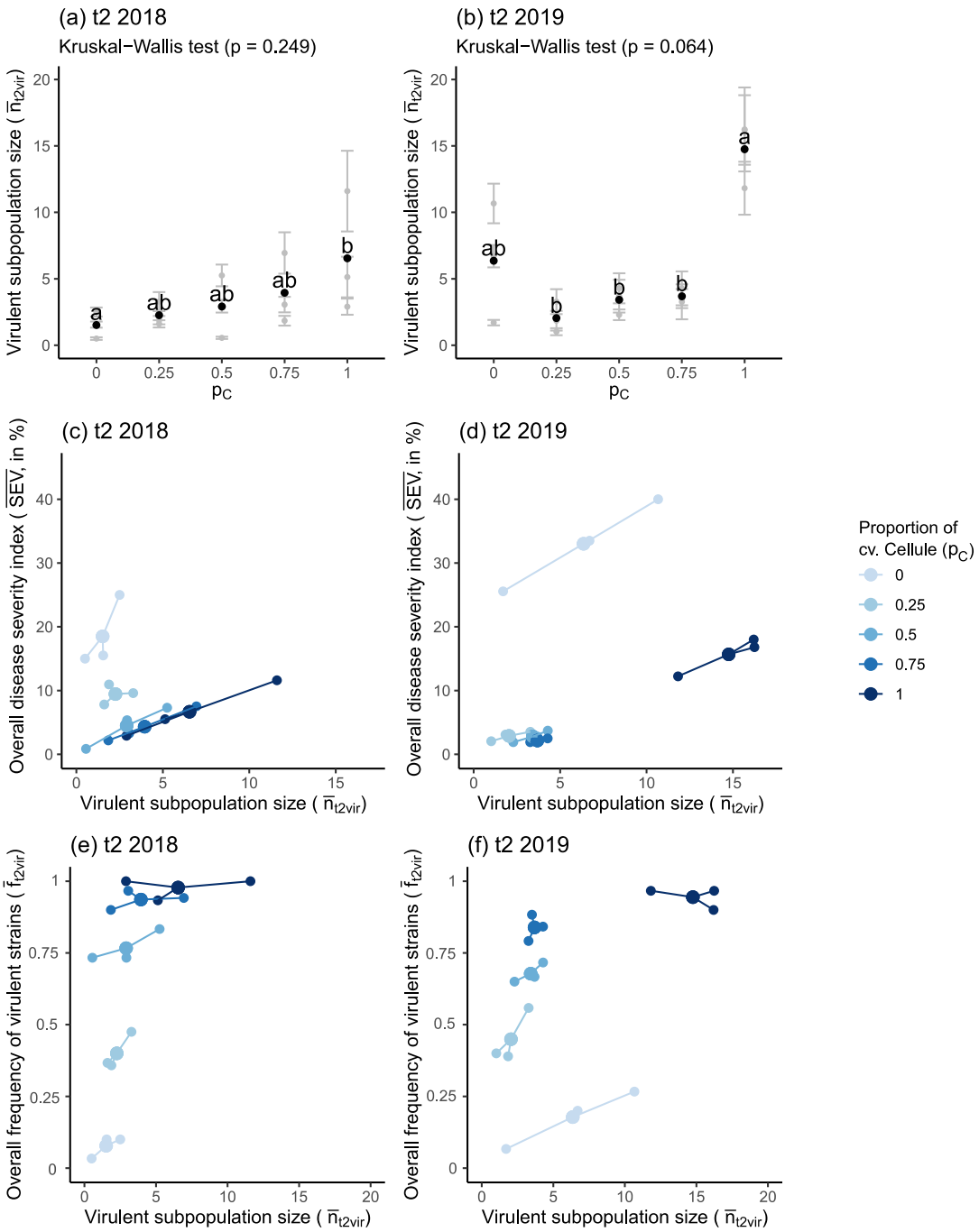


***Figure I.7**. Impact of mixtures on different indicators of the Z. tritici virulent subpopulations and their relationships at whole-canopy scale.* **(a, b)** Size of the virulent subpopulations at t2 ($\overline{n}_{t2,vir}$ dimensionless variable; black dots) according to the proportion of cv. Cellule (p_C) in 2018 and 2019. Grey dots indicate the mean value for each block and black dots the mean for each treatment. Bars represent the standard error within each block. Error propagation was taken into account. **(c, d)** Disease severity assessed at the whole-canopy scale at t2 ($\overline{SEV}$, determined as the percentage of the leaf area covered with pycnidia on flag leaves) according to the size of the virulent subpopulation ($\overline{n}_{t2,vir}$). **(e, f)** Frequency of virulent strains assessed at whole-canopy scale at t2 ($\overline{f}_{t2,vir}$) according to the size of the virulent subpopulations in 2018 and in 2019. Small dots indicate the mean value for each block, and large dots the mean value for each treatment. Different shades of blue represent the proportion of cv. Cellule (p_C).

Discussion

We found that pathogen population size, estimated on each cultivar but also at the whole-canopy scale, was smaller for mixtures than for pure stands at the end of epidemics. In addition, we established that mixtures reduced the size of the virulent subpopulation and increased the frequency of strains displaying virulence against *Stb16q*, relative to pure stands of Cellule (thereafter referred as the 'resistant' cultivar).

A method suitable for studies at population scale — Molecular tools are not always available for monitoring the emergence of virulence. This complicates the quantification of breakdown dynamics for recently deployed resistance genes. Our *in planta* 'population-phenotyping', useful for this purpose, was twice as efficient as the classical method (Figure I.S3). The various experimental adjustments we made to inoculum preparation, climatic conditions in the greenhouse, visual assessments and the small number of biological replicates (Table I.S3) introduced some uncertainty, potentially leading to diagnostic errors concerning virulence status at an individual scale ('false avirulence' rate estimated at 3%). However, this uncertainty had only a small impact at population scale.

Pathogenicity on Cellule vs. virulence against Stb16q — We assumed that a strain pathogenic on cultivar Cellule was virulent against *Stb16q* and that strains non-pathogenic on this cultivar were avirulent. However, as the genetic background of the Cellule cultivar probably includes other sources of resistance, an absence of symptoms on Cellule is not sufficient to demonstrate avirulence against *Stb16q*. The confirmatory individual phenotyping data provide some perspective concerning this approximation: five of the seven strains inducing pycnidia on CS-*Stb16q* were unable to infect Cellule, and two of the strains pathogenic on Cellule were unable to develop sufficient pycnidia on CS-*Stb16q* to exceed the 10% threshold for virulence. The rarity of such situations (<1%) suggests that ability to induce pycnidia on Cellule is a reasonably indicator of virulence against *Stb16q*. Finally, we estimated that the virulence status established based on population-phenotyping of the Cellule response was correct in 97% of cases.

The cultivars displayed reciprocal protection — Early in the epidemic, most of the time, the size of the pathogen population in the whole canopy ($\overline{\mathrm{SEV}}$) and on both susceptible ($\mathrm{SEV_A}$) and resistant ($\mathrm{SEV_c}$) cultivars was not significantly different between mixtures and the corresponding pure stands (Figure I.4). This is an expected result, as mixture effects were reported to increase during asexual cycles (Cowger & Mundt, 2002b; Gigot *et al.*, 2013). Late in the epidemic, cultivar mixtures reduced $\overline{\mathrm{SEV}}$ confirming the

potential of wheat mixtures to limit the dynamics of STB epidemics (Kristoffersen *et al.*, 2019). In our experiment, mixtures reduced $\overline{\mathrm{SEV}}$ by a mean of 27% in 2018 and 69% in 2019. The size of the pathogen population was lower in mixtures than in the corresponding pure stands only on the resistant cultivar in 2018 and on both cultivars in 2019. The relative differences in $\mathrm{SEV_v}$ between mixtures and pure stands ranged from 13% to 26% in 2018 and from 64% to 72% in 2019 for the susceptible cultivar, and from 19% to 69% in 2018 and from 70% to 80% in 2019 for the resistant cultivar. Gigot *et al.* (2013) and Vidal *et al.* (2017) highlighted similar reductions. The resistant cultivar acted as an obstacle to spore dispersal in mixtures and thus induced a barrier effect on the susceptible one (Wolfe, 1985). This 'protective' effect has been reported before (Gigot *et al.*, 2013) and was particularly strong in our study. Conversely, the presence of susceptible plants decreased the number of virulent strains filtered out by resistant plants relative to a pure stand of the resistant cultivar (Figure I.S11b and I.S11c). The susceptible plants did not concentrate more virulent strains in mixtures than in pure stands (Figure I.S11a and I.S11c), thereby decreasing the number of virulent strains at whole-canopy scale. This may explain the 'protective' effect of the susceptible cultivar on the resistant cultivar, which is a counter-intuitive but crucial result.

Estimation of the local frequency of virulent strains — We estimated the local frequency of virulent strains (0.13 in 2018 and 0.14 in 2019) using the pathogen population collected on pure stands of the susceptible cultivar early in the epidemic, which should reflect the founding ascospore population (Figure I.1b). Some of the strains collected from sporulating lesions on Cellule early in the epidemic were avirulent. Two hypotheses may explain this: (i) the ontogeny or temperature-modulation of *Stb16q* expression in field conditions, and (ii) the possibility of an avirulent strain co-infecting a host plant by taking advantage of infection with a virulent strain ('stowaway effect') or following systemic induced susceptibility (Seybold *et al.*, 2020).

Evolution of the frequency of virulent strains in mixtures — Mixtures modified the composition of the initial pathogen population, by affecting strain selection during the epidemic. The frequency of virulent strains collected on the susceptible cultivar did not differ between pure stands and mixtures (Figure I.5) early in the epidemic, when secondary infections were not yet strongly affecting disease dynamics. The differences expressed later, after several cycles of secondary infection, suggest that the mixture effect results from cross-contaminations between cultivars driven by pycnidiospores splash dispersal (Figure I.1d), consistent with previous findings (Gigot *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2017a). In this study, the optimal proportion of the resistant cultivar minimising the size of the virulent subpopulation ($\overline{n}_{\mathrm{t2,vir}}$) and the frequency of virulent strains ($\overline{f}_{\mathrm{t2,vir}}$)

appeared to be about 0.25 (Figure I.7e and I.7f). The overall effect would probably be different for mixtures of cultivars with different combinations of resistance genes. For determining the consequences of multiple virulence-resistance interactions, a parallel could be drawn with studies focusing on the impact of wheat mixtures on the structure of yellow rust and powdery mildew populations (Villaréal & Lannou, 2000; Lannou *et al.*, 2005) and on the emergence of multivirulent strains. It was shown that the frequency of such strains was not necessarily significantly higher in mixtures than in pure stands (Chin & Wolfe, 1984; Dileone & Mundt, 1994).

No evidence of a fitness cost associated with AvrStb16q virulence — In theory, there should be a 'fitness penalty' for pathogen populations with high levels of virulence after adaptation to hosts (Laine & Barrès, 2013). We did not find such a cost of virulence against *Stb16q* related to the aggressiveness trait that we studied (percentage of leaf area covered by pycnidia). This may be because the experimental conditions resulted in small mean sporulating areas (not entirely suitable for such a test), because this virulence has no cost — consistently with the experimental findings of Cowger & Mundt, 2002b — or because the cost concerns another aggressiveness trait (*e.g.* latent period, sporulation capacity of a pycnidia, infection efficacy; Suffert *et al.*, 2013). Further studies, specially designed for this purpose, would help to progress on this issue.

Impact of the proportion of cultivars on mixture effects — We showed that changes on the overall size and composition of the pathogen population depended on the proportions of the two cultivars, consistent with previous findings (Finckh *et al.*, 2000). All the mixtures efficiently decreased the size of the pathogen population ($\overline{\mathrm{SEV}}$), but the decrease in severity relative to expected levels in the absence of a mixture effect (Figure I.4) was greatest for C1A1 in both 2018 (40%) and 2019 (71%). In our experiment, the optimal proportion of the resistant cultivar for reducing $\overline{\mathrm{SEV}}$ seemed to lie between 0.5 and 0.75. This is consistent with simulations performed by Gigot *et al.* (2014), which showed the 'protection' of susceptible plants by resistant plants to be optimal for mixtures with more resistant than susceptible plants.

Impact of the intensity of the epidemic on mixture effects — The intensity of epidemics, driven by climatic conditions, may account for the observed differences in the magnitude of the mixture effect. The epidemic started earlier in 2018 (Figure I.4) and this year was wetter and cooler than 2019. However, STB severity ended up being more intense on flag leaves in 2019 (19% in 2018 vs. 33% in 2019 for $\mathrm{SEV_A}$ in C0A1; data not shown). This apparent contradiction can be explained by late spring rainfall at key moments for the epidemic, while the primary inoculum is rarely a limiting factor (Morais

et al., 2016b). Mixtures decreased the size of the total pathogen population more effectively in 2019. Mixtures also had a greater impact on the frequency of virulent strains on the susceptible cultivar relative to the pure stand (Figure I.5) in 2018 than in 2019, whereas the opposite pattern might have been expected, due to more intense disease dynamics late in the epidemic (Mundt, 2002). Gigot *et al.* (2013) showed that mixtures significantly decreased disease severity in most cases, regardless of disease intensity, whereas Kristoffersen *et al.* (2019) found no correlation with mixture efficacy.

A trade-off between disease control and resistance durability? — The choice of the indicator to analyse and the pure stand of reference is crucial. Our findings suggest that the optimal proportions of cultivars for reducing the size of the virulent subpopulation ($\overline{n}_{t2,vir}$) may differ slightly from those for reducing the size of the total pathogen population ($\overline{SEV}$), and those for reducing the overall frequency of virulent strains ($\overline{f}_{t2,vir}$) (Figure I.7). The potential differences in the optima for these three indicators may conceal a trade-off between disease control and resistance durability. When comparing mixtures to the pure stands of the susceptible cultivar, disease severity can, indeed, be reduced by including a resistant cultivar in the host population (Figure I.4). However, this effect may be counterbalanced by an acceleration of the breakdown dynamics of this resistance, due to an increase in the frequency of virulent strains in susceptible plants. The conclusion would clearly be different if a pure stand of the resistant cultivar is used as the reference: the inclusion of susceptible plants decreased the selection pressure exerted by emerging virulent strains, but also, as shown here, decreased disease severity on the resistant plants. The pathogen population on the susceptible plants of a cultivar mixture may be smaller than that in a pure stand or in a mixture with a high proportion of the susceptible cultivar, without there necessarily being an impact on the number of virulent strains (Figure I.S11). From this perspective, mixtures appeared to slow down the breakdown dynamics of the resistance. Moreover, we did not find a trade-off between the size of the virulent subpopulation and the frequency of virulent strains, but there is no reason why this trend should be the same in other contexts. The 'size' vs. 'frequency' debate is a classical issue in ecology that should not be neglected here, with consequences for genetic diversity and evolution (Brown & Tellier, 2011). Further studies are needed to determine if these dynamics would be different depending on the local frequency of virulent strains, *i.e.* the 'breakdown stage' of the resistance.

Perspectives

Determination of the effects of mixtures on the durability of the resistances deployed requires a consideration of the complete disease cycle, including sexual reproduction, and an extension of this approach to time scales beyond a single annual epidemic. One of the major issues arising from this study and previous studies (*e.g.*, Finckh *et al.*, 2000; Mundt, 2002; Lannou *et al.*, 2005) is whether a cropping system based on cultivar mixtures would be likely to increase the prevalence of virulent strains after several years. This is both a question of the 'reference' used (pure stand of a susceptible or resistant cultivar) and of the objective assigned to the mixture: decreasing disease severity relative to the pure stand of susceptible plants or increasing the durability of resistance by reducing the pressure exerted on the virulent subpopulation of the pathogen. Investigations of the longer-term effects of cultivar mixtures need to consider sexual reproduction, as this process may either amplify or attenuate the demogenetic changes occurring during an annual epidemic. This is all the more relevant because a trade-off between size of pathogen population and frequency of virulence would impact the efficacy and durability, respectively, of the cultivar deployment strategies.

Recent landscape-scale models have investigated the effect of the proportion of fields sown with resistant and susceptible cultivars and their connectivity on the dynamics of resistance breakdown after several generations (*e.g.* Fabre *et al.*, 2015). In comparisons of different strategies for preventing or delaying the appearance of a 'superpathogen', cultivar mixtures appeared to be effective in the long term for pathogens with high mutation rates and high fitness costs (Rimbaud *et al.*, 2018a; Crété *et al.*, 2020). Our experimental findings confirm that cultivar mixtures may also be used to extend the lifetime of resistance sources, this time at within-field scale, through the introduction of heterogeneity.

Acknowledgements

We thank Christophe Montagnier (INRAE Experimental Unit, Thiverval-Grignon, FR), Nathalie Retout, Laurent Gerard, Nicolas Lecutier, Auriane Pinton, Miléna Bonnard, Jérôme Lageyre, Martin Willigsecker and Benjamin Boudier (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for technical assistance. We thank Dr. Cyrille Saintenac (INRAE GDEC, Clermont-Ferrand, FR) for providing us with the Chinese Spring isogenic lines of wheat. We thank Dr. Romain Valade (ARVALIS-Institut du Végétal, Thiverval-Grignon, FR) and Dr. Thierry Marcel (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for sharing information and providing relevant advices throughout this project. We thank Dr. Julie Sappa for her help correcting our English.

Funding

This research was supported by a grant from the 'Fond de Soutien à l'Obtention Végétale' (FSOV PERSIST project; 2019-2022) and by a PhD fellowship from the French Ministry of Education and Research (MESR) awarded to Carolina Orellana-Torrejon for the 2018-2022 period. The BIOGER laboratory also receives support from Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Data Availability Statement

The data and the R scripts that support the findings of this study [Files F1-21, see list below] are freely available from the INRAE Dataverse online data repository (https://data.inrae.fr/) at https://doi.org/10.15454/4MAAI0.

Reference

Borg J, Kiaer LP, Lecarpentier C, Goldrienger I, Saint-Jean S, Enjalbert S, 2018. Unfolding the potential of wheat cultivar mixtures: A meta-analysis perspective and identification of knowledge gaps. *Field Crops Research* **221**, 298–313.

Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C, 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 33–41.

Brown JKM, Tellier A, 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 345–367.

Chartrain L, Brading PA, Brown JKM, 2005. Presence of the Stb6 gene for resistance to septoria tritici blotch (Mycosphaerella graminicola) in cultivars used in wheat-breeding programmes worldwide. *Plant Pathology* **54**, 134–143.

Chin K, Wolfe M, 1984. Selection on *Erysiphe graminis* in pure and mixed stands of barley. *Plant Pathology* **33**, 535–545.

Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC, 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* **49**, 445–451.

Cowger C, Mundt CC, 2002a. Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of Septoria tritici blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **92**, 617–623.

Cowger C, Mundt CC, 2002b. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 624–630.

Crété R, Pires RN, Barbetti MJ, Renton M, 2020. Rotating and stacking genes can improve crop resistance durability while potentially selecting highly virulent pathogen strains. *Scientific Reports* **10**, 19752.

Dai J, Wiersma JJ, Nolen DL, 2012. Performance of hard red spring wheat cultivar mixtures. *Agronomy Journal* **104**, 17–21.

Dileone J, Mundt C, 1994. Effect of wheat cultivar mixtures on populations of *Puccinia striiformis* races. *Plant Pathology* **43**, 917–930.

Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B, 2015. Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. *Evolutionary Applications* **8**, 919–932.

Finckh MR, 2008. Integration of breeding and technology into diversification strategies for disease control in modern agriculture. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 399–409.

Finckh M, Gacek E, Goyeau H *et al.*, 2000. Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance. *Agronomie* **20**, 813–837.

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

Ghaffary SMT, Faris JD, Friesen TL *et al.*, 2012. New broad-spectrum resistance to Septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 125–142.

Gigot C, Saint-Jean S, Huber L *et al.*, 2013. Protective effects of a wheat cultivar mixture against splash-dispersed Septoria tritici blotch epidemics. *Plant Pathology* **62**, 1011–1019.

Gigot C, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2014. Using virtual 3-D plant architecture to assess fungal pathogen splash dispersal in heterogeneous canopies: a case study with cultivar mixtures and a non-specialized disease causal agent. *Annals of Botany* **114**, 863–876.

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

Kildea S, Byrne JJ, Cucak M, Hutton F, 2020. First report of virulence to the Septoria tritici blotch resistance gene *Stb16q* in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *New Disease Reports* **41**, 13–13.

Kristoffersen R, Jørgensen LN, Eriksen LB, Nielsen GC, Kiær LP, 2019. Control of Septoria tritici blotch by winter wheat cultivar mixtures: Meta-analysis of 19 years of cultivar trials. *bioRxiv*, 658575.

Laine A-L, Barrès B, 2013. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathology* **62**, 96–105.

Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Phytopathology* **50**, 319–38.

Lannou C, Hubert P, Gimeno C, 2005. Competition and interactions among stripe rust pathotypes in wheat-cultivar mixtures. *Plant Pathology* **54**, 699–712.

McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.

McIntosh RA, Brown GN, 1997. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 311–326.

McRoberts N, Hughes G, Madden LV, 2003. The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. *Annals of Applied Biology* **142**, 191–211.

Morais D, Sache I, Suffert F, Laval V, 2016. Is the onset of Septoria tritici blotch epidemics related to the local pool of ascospores? *Plant Pathology* **65**, 250–260.

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

Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P, Bai Y, 2011. *Breeding crops with resistance to diseases and pests*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Perronne R, Makowski D, Goffaux R, Montalent P, Goldringer I, 2017. Temporal evolution of varietal, spatial and genetic diversity of bread wheat between 1980 and 2006 strongly depends upon agricultural regions in France. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **236**, 12–20.

Rimbaud L, Papaix J, Barrett LG, Burdon JJ, Thrall PH, 2018. Mosaics, mixtures, rotations or pyramiding: What is the optimal strategy to deploy major gene resistance? *Evolutionary Applications* **11**, 1791–1810.

Seybold H, Demetrowitsch TJ, Hassani MA *et al.*, 2020. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nature Communications* **11**, 1–12.

Suffert F, Delestre G, Gélisse S, 2018. Sexual reproduction in the fungal foliar pathogen *Zymoseptoria tritici* is driven by antagonistic density dependence mechanisms. *Microbial Ecology* **77**, 110–123.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2011. Early stages of Septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–177.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**, 1330–1341.

Vidal T, Boixel A-L, Durand B, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2017. Reduction of fungal disease spread in cultivar mixtures: Impact of canopy architecture on rain-splash dispersal and on crop microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology* **246**, 154–161.

Villaréal LMMA, Lannou C, 2000. Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* **90**, 1300–1306.

Wolfe MS, 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 251–273.

Supplementary Figures

Figure I.S1. *Design of the field experiment performed at the INRAE experimental station in Grignon (Yvelines, France, 48°51'N, 1°58'E) in 2018 and repeated in 2019* The field plot was previously under maize and ploughed. It was divided into three blocks (a, b, c), each consisting in five microplots (3.5 m wide x 8 m long, with an inter-row spacing of 0.175 m) corresponding to five randomly distributed treatments: a pure stand of wheat cv. Apache (C0A1; 220 Apache seeds·m^{-2}), a pure stand of wheat cv. Cellule (C1A0; 220 Cellule seeds·m^{-2}), and three binary mixtures with proportions of Cellule of 0.25 (C1A3; 55 Cellule seeds·m^{-2} + 165 Apache seeds·m^{-2}), 0.5 (C1A1; 110 Cellule seeds·m^{-2} + 110 Apache seeds·m^{-2}) and 0.75 (C3A1; 165 Cellule seeds·m^{-2} + 55 Apache seeds·m^{-2}). Seed lots were prepared with the established proportions by taking into account the specific weight of each cultivar seed (TKW Apache = 45 g; TKW Cellule = 46 g). The microplots were separated by 5.25 m-wide strips of triticale cv. Vuka (220 seeds·m^{-2}) resistant to *Z. tritici* to prevent disease spread between neighbouring plots. Each microplot was split longitudinally into two equal parts. In the first part (western side), lines 2-3-4 were used for strain collection, and lines 6-7-8 for the estimation of disease severity early in the epidemic (t1); in the second part (eastern side), lines 2-3-4 and lines 6-7-8 were used similarly at the late stage of the epidemic (t2), and lines 6-7-8 for the estimation of the actual proportions of each cultivar (spikes).

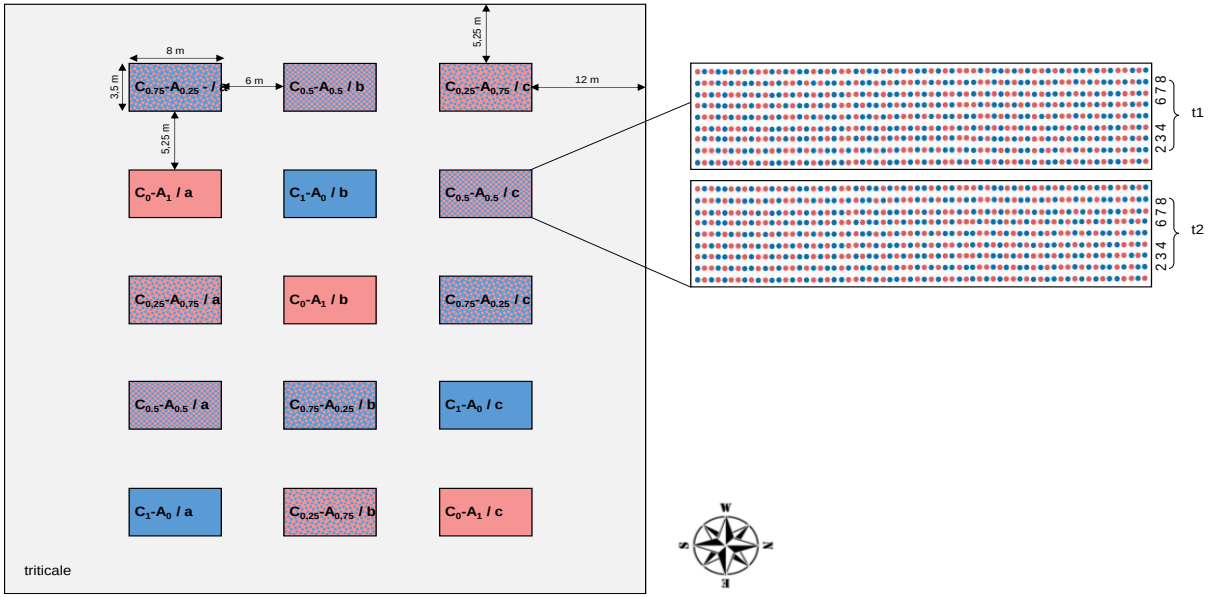


***Figure I.S2**. Overview of field conditions during disease assessments and sampling at the early (t1) and late (t2) stages of the epidemic.* **(a)** Microplot at t1 (March 7, 2018). **(b)** Wheat seedlings of cv. Apache (red seed) and cv. Cellule (green seed). **(c)** Sporulating lesion caused by *Z. tritici* on an Apache seedling. **(d)** Microplot at t2 (May 11, 2018). **(e)** Adult plants of Apache (head not bearded) and Cellule (bearded head). **(f)** Cluster of lesions on an Apache adult leaf

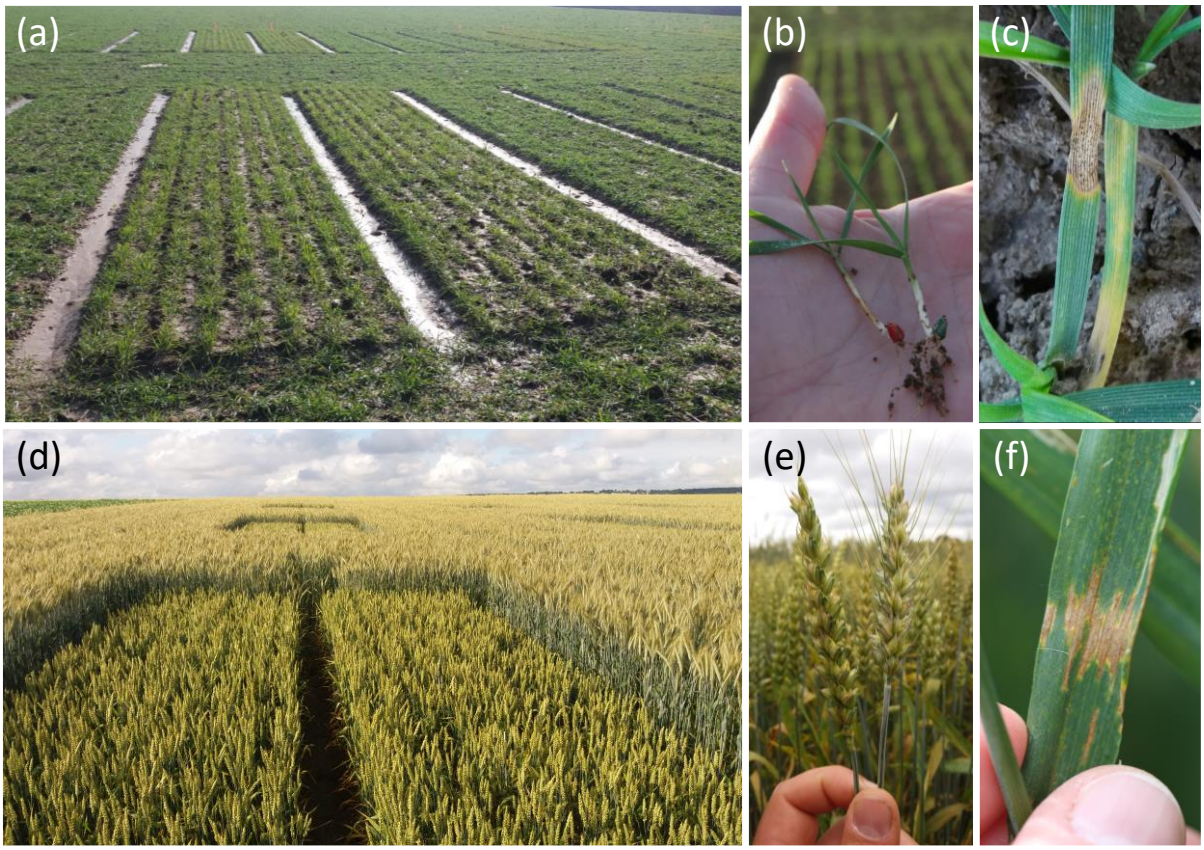


Figure I.S3. Simplified method of inoculation developed for 'population-phenotyping', estimated to be twice as efficient as the classical method (30 isolates per half day x 36 days vs. 100 isolates per half day x 22 days).

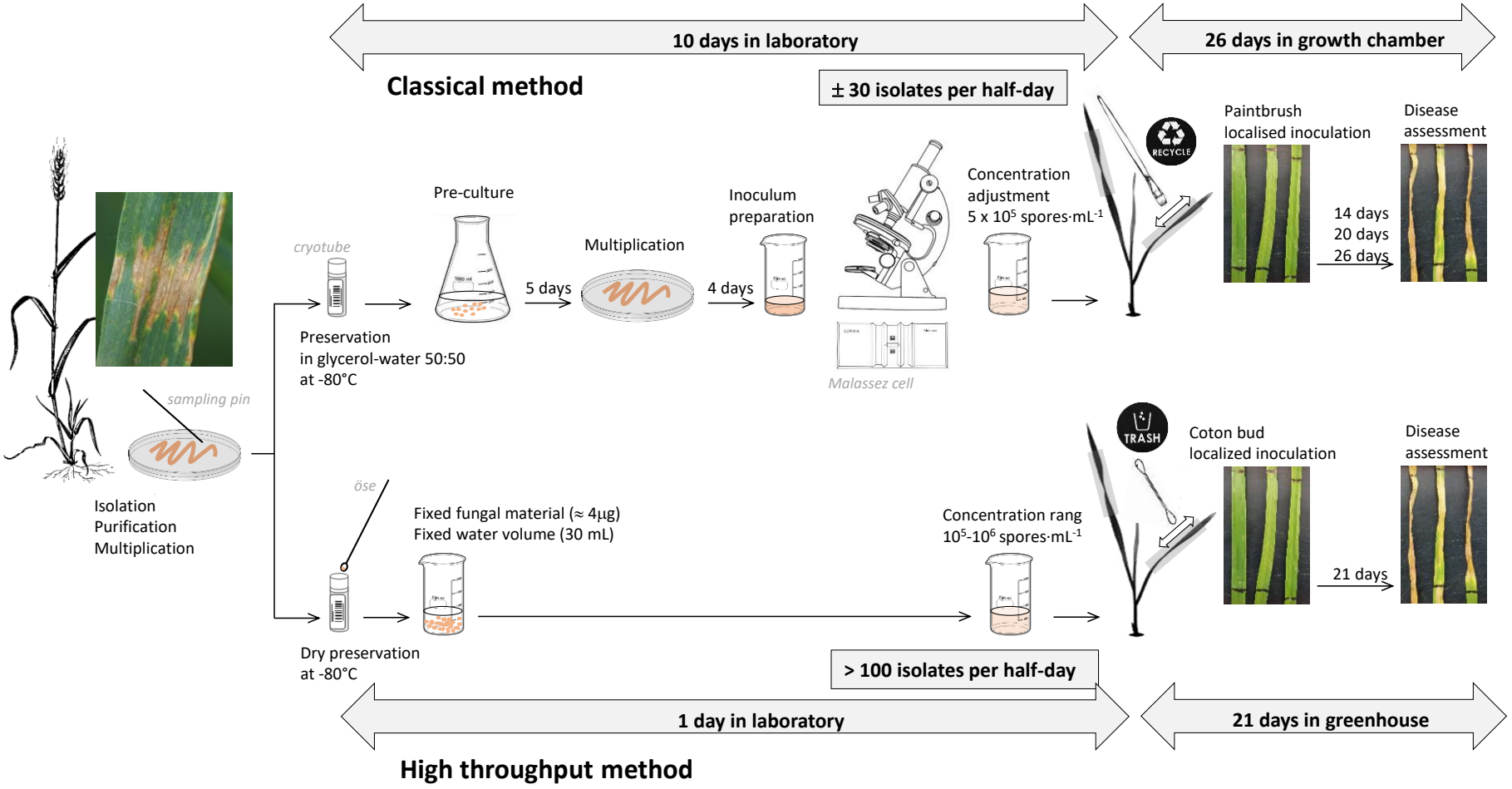


***Figure I.S4**. Variability of Z. tritici blastospore concentration in the non-adjusted suspensions used for 'population-phenotyping'.* The simplified method involved diluting, in a volume of 30 mL of water, the mass of blastospores recovered with a 10-µL inoculating loop (central ring half-filled i.e., about 10 mg) from the freshly thawed contents of cryotubes stored at -80°C. Two independent series of tests (black and white dots) were performed with 2 x 20 strains. The mean concentration (white diamond) was 3.0 x 10^5 spores·mL^{-1}, with 85% of samples within the 10^5-5.0 x 10^5 spores·mL^{-1} range.

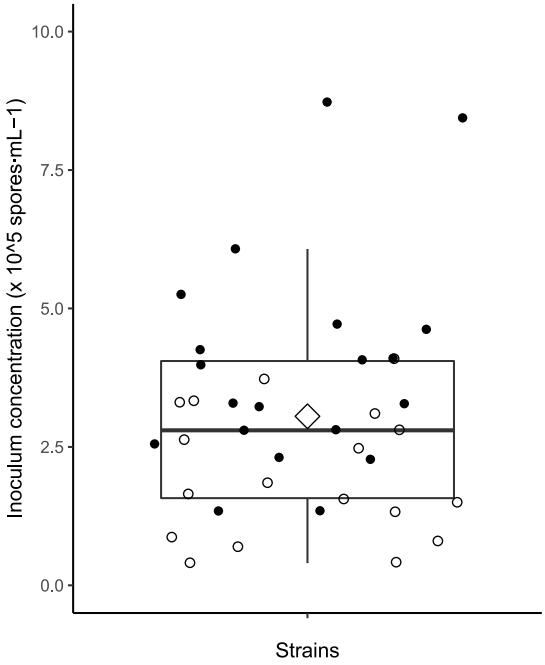


***Figure I.S5**. Thermal conditions to which the 32 batches of Z. tritici strains were exposed during population-phenotyping in the greenhouse.* Thermal time, expressed in degree-days post inoculation (°C·$days^{-1}$), was calculated by summing daily mean air temperatures (0°C as the base temperature). The mean thermal time per population is plotted (white diamonds). Temperature was recorded every 15 min with a thermal sensor (digital probes with a SPY RF N recorder; JRI, Argenteuil, France). Batches were phenotyped (i) from March 12th to June 6th, 2018 for strains collected at t1 in 2018, (ii) from June 25th to August 21st 2018 and from July 5th to August 17th 2019 for strains collected at t2 in 2018, (iii) from February 14th to March 27th and May 18th to August 11th 2020 for strains collected at t1 in 2019, (iv) from July 12th to October 17th 2019 for strains collected at t2 in 2019.

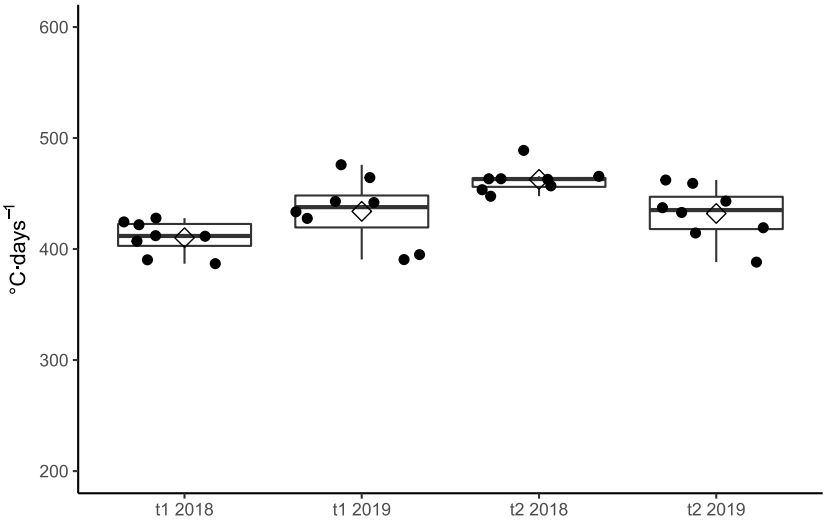


***Figure I.S6**. Frequency of Z. tritici strains considered 'pathogenic' (i.e., causing sporulating area on Apache; grey bar) and non-pathogenic (white bar) among the populations collected on Cellule in pure stands (p_C = 1) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late stages (t2) of the 2018 and 2019 epidemics*. The number of pathogenic and non-pathogenic strains are indicated in grey and white boxes, respectively. The effect of treatment (pure stands and cultivar mixtures; letters at the top of each bar) on the number of pathogenic strains was assessed by performing Fisher's exact test (the expected numbers were small), with Bonferroni correction for pairwise comparison.

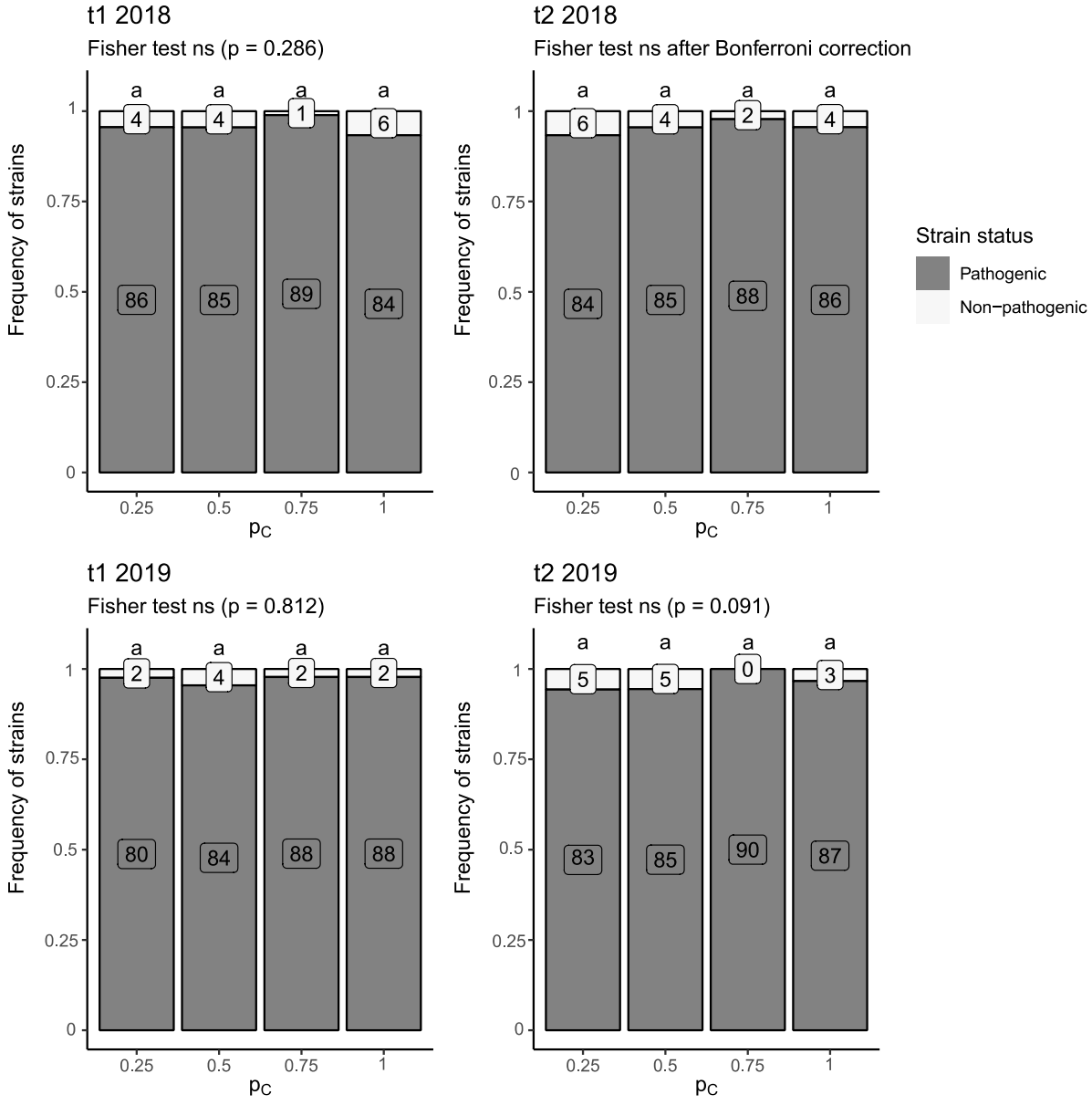


***Figure I.S7**. Frequency of Z. tritici strains considered pathogenic (i.e., causing sporulating area on Apache in the greenhouse; grey bars) and non-pathogenic (white bars) among the populations collected on Apache in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.50 and 0.75 for C1A3, C1A1 and C3A1, respectively) at the early (t1) and late stages (t2) of the 2018 and 2019 epidemics.* The number of pathogenic and non-pathogenic strains are indicated in grey and white boxes, respectively. The effect of treatment (pure stands and cultivar mixtures; letters at the top of each bar) on the number of pathogenic strains was assessed by performing a χ^2 test, or Fisher's exact test when the expected numbers were small, with Bonferroni correction for pairwise comparison.

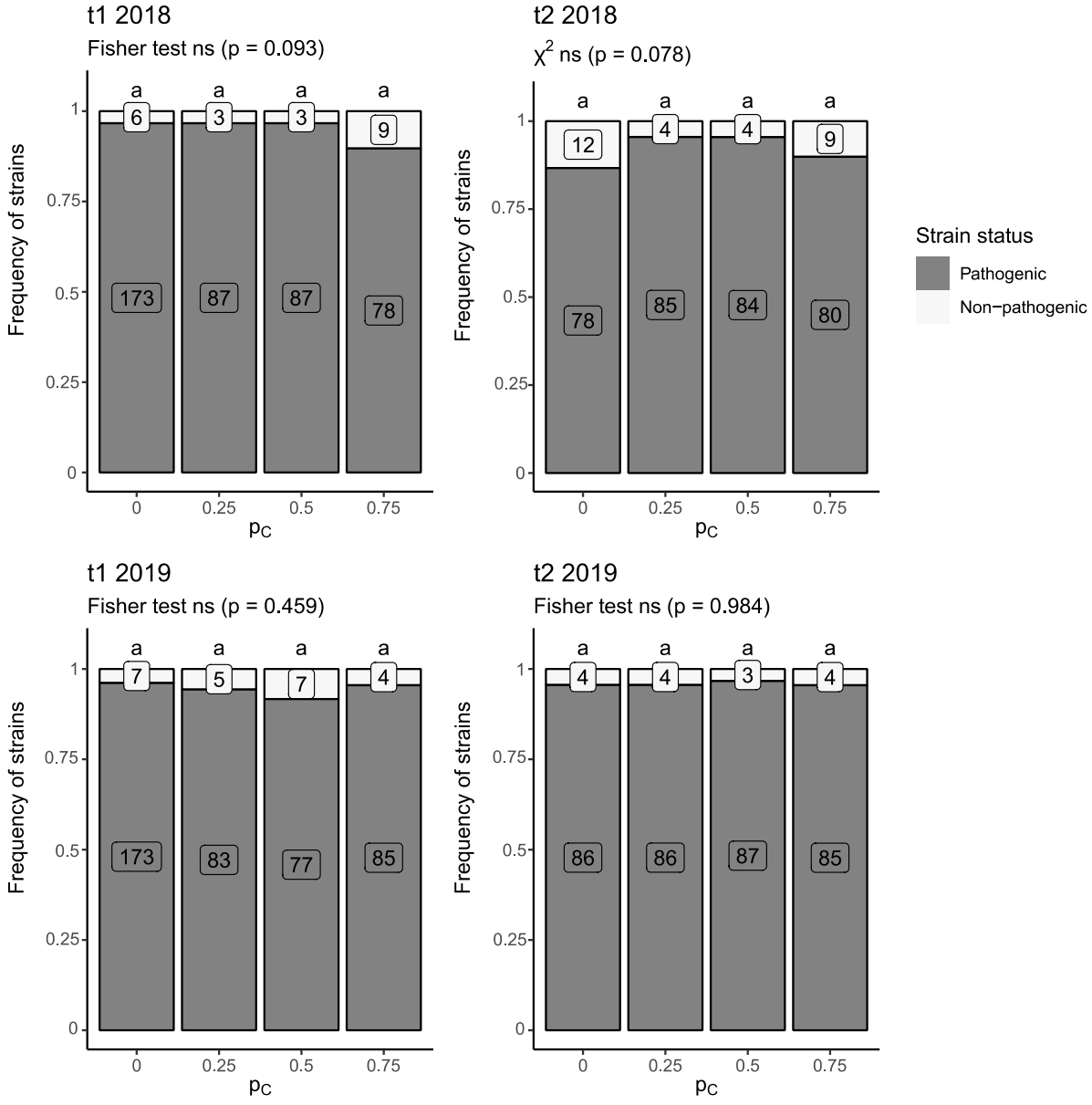


***Figure I.S8**. Comparison of the aggressiveness (AG for aggressiveness and AGc for conditional aggressiveness) of 2886 pathogenic strains according to their virulence status with respect to Stb16q.*
Aggressiveness, expressed as the percentage sporulating leaf area, was assessed on Apache. For AG, each dot represents the mean sporulating area induced by a strain on six leaves, and for AGc, the mean sporulating area on symptomatic leaves only. For each subpopulation the number of strains (n) and the mean are indicated. No significant difference between avirulent and virulent strains was observed for either AG (p = 0.054) or AGc (p = 0.060).

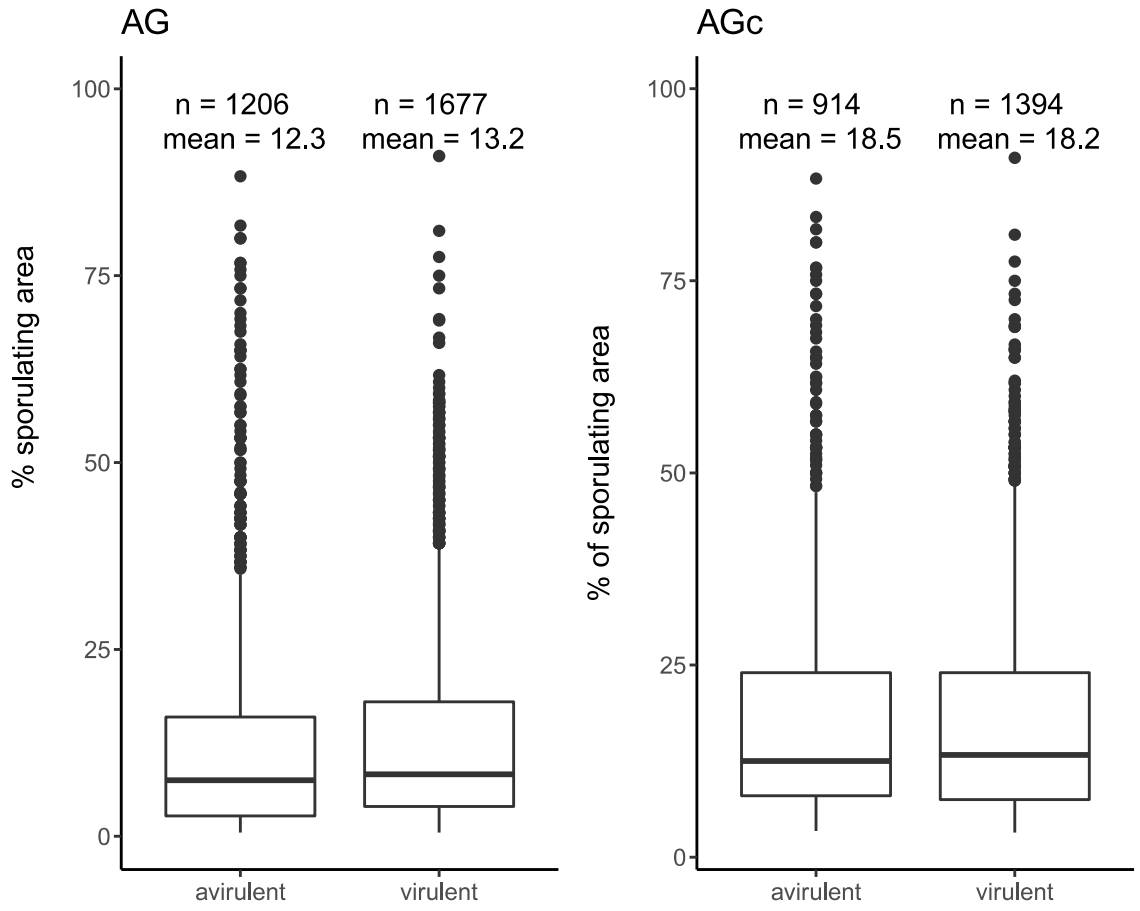


***Figure I.S9**. Aggressiveness of the 47 Z. tritici strains on Cellule (C) and on the isogenic line Chinese Spring with Stb16q (CS-Stb16q) assessed during confirmatory individual phenotyping.* Each point is the mean percentage of the total area of the inoculated section covered with pycnidia on nine leaves per strain × wheat cultivar interaction. The virulence threshold was fixed at 10% (dashed lines). The 16 strains considered virulent on both Cellule and CS-*Stb16q* (mean aggressiveness 58.2% and 65.3%, respectively; Wilcoxon test, $p < 0.0001$) are indicated with black dots (yellow square). Two strains considered virulent only on Cellule and five strains considered virulent only on CS-*Stb16q* are indicated with white dots (blue rectangles). 24 strains considered avirulent on both Cellule and CS-*Stb16q* are indicated with crosses (red square).

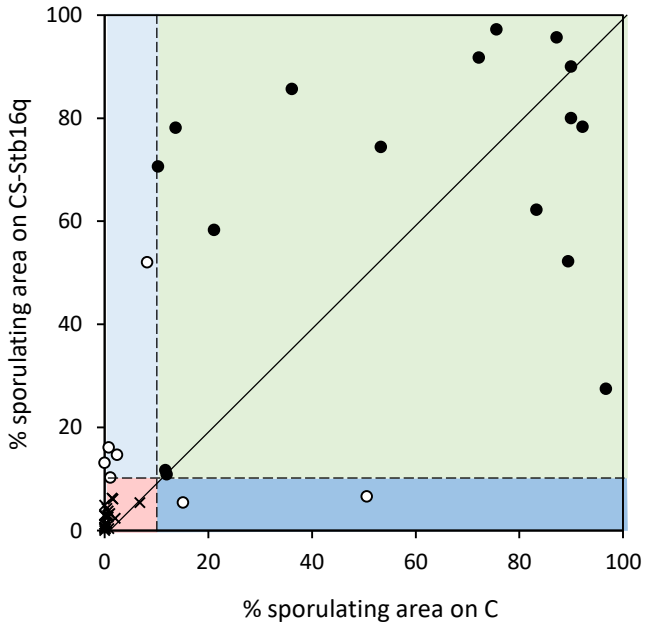


***Figure I.S10**. Analysis of disease severity data leading to the fixing at 10% of the relevant threshold (dashed line) for determining the virulence status of Z. tritici strains with respect to Stb16q 20 days post inoculation (dpi) in confirmatory individual phenotyping.* Strains FS1766 (avirulent) and FS5948 (virulent) were tested three times (3 independent batches × 9 inoculated leaves as replicates) on the isolines Chinese Spring (CS), Chinese Spring with *Stb16q* (CS-*Stb16q*) and Cellule (C). Each point is the disease severity assessed on a leaf (i.e., sporulating area, expressed as a percentage of the inoculated leaf section).

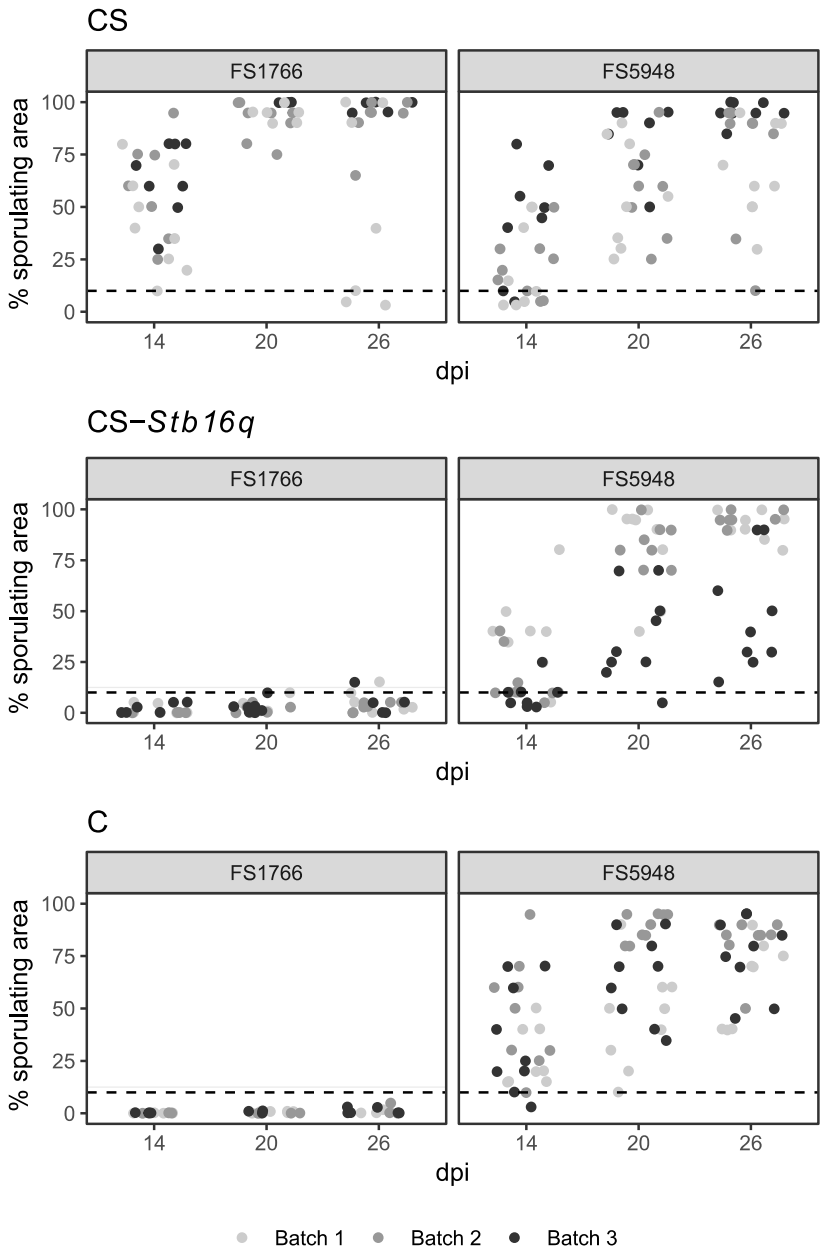
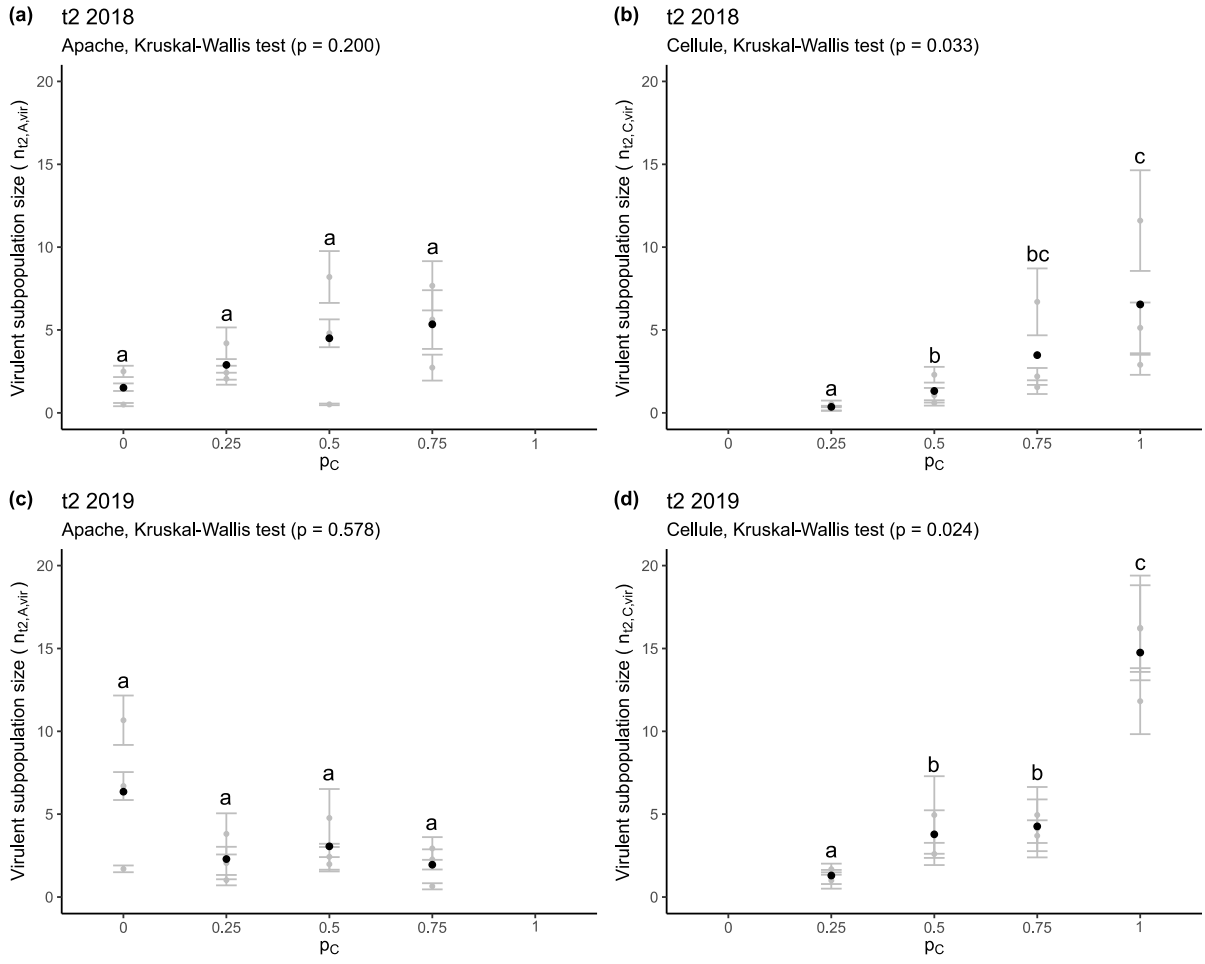


Figure I.S11. *Impact of treatment (pure stands and mixtures) on the Z. tritici virulent subpopulation on each cultivar at the late stage of the epidemic (t2).* **(a, c)** Mean size of the virulent subpopulation on Apache ($n_{t2,A,vir}$; dimensionless variable) according to the proportion of Cellule (p_C) in 2018 and 2019. **(b, d)** Mean size of the virulent subpopulation on Cellule ($n_{t2,C,vir}$) according to the proportion of Cellule (p_C) in 2018 and 2019. Grey dots indicate the mean value for each block and black dots indicate the mean for each treatment. Bars represent the standard error within each block.



Supplementary Tables

Table I.S1. *Actual proportion of wheat plants of cv. Apache (A) and cv. Cellule (C) in microplots in pure stands (C0A1 and C1A0) and in mixtures (C1A3, C1A1, and C3A1) at the late stage of epidemics in 2018 and 2019.* Each proportion was estimated from the proportion of wheat spikes of each cultivar at heading assessed on the basis of the presence (C) or absence (A) of bearded heads (counted along three 1-m lines on July 4th, 2018 and July 1st, 2019). The total number of spikes per metre is indicated in italics, in brackets.

Year	Block	C0A1	C1A3		C1A1		C3A1		C1A0
		A	C	A	C	A	C	A	C
2018	a	1	0.12	0.88	0.52	0.48	0.61	0.39	1
		(82)		*(68)*		*(68)*		*(75)*	*(79)*
	b	1	0.25	0.75	0.27	0.73	0.71	0.29	1
		(76)		*(82)*		*(75)*		*(92)*	*(82)*
	c	1	0.20	0.80	0.46	0.54	0.69	0.31	1
		(67)		*(82)*		*(77)*		*(73)*	*(97)*
	mean	1	0.19	0.81	0.42	0.58	0.67	0.33	1
		(75)		*(77)*		*(73)*		*(80)*	*(86)*
2019	a	1	0.14	0.86	0.35	0.65	0.76	0.24	1
		(65)		*(86)*		*(69)*		*(74)*	*(79)*
	b	1	0.39	0.61	0.60	0.40	0.61	0.39	1
		(103)		*(77)*		*(82)*		*(95)*	*(73)*
	c	1	0.31	0.69	0.35	0.65	0.82	0.18	1
		(91)		*(72)*		*(65)*		*(95)*	*(69)*
	mean	1	0.28	0.72	0.43	0.57	0.73	0.27	1
		(86)		*(78)*		*(72)*		*(88)*	*(73)*

***Table I.S2**. The origin (treatment, from the following list: C1A3, C1A1, C3A1, C1A0; period, t1 or t2, in 2018) of the 47 Z. tritici strains shown to be avirulent against Stb16q established in the first population-phenotyping, for which virulence status was validated by confirmatory individual phenotyping. The total number of strains tested is indicated in brackets.* There was no significant difference in the number of avirulent strains at t1 between treatments (Fisher's test, p = 1).

	C1A3	C1A1	C3A1	C1A0
t1	7 (11)	7 (11)	4 (7)	6 (12)
t2	0 (4)	0 (1)	0 (0)	0 (1)

***Table I.S3**. Main sources of uncertainty and benefit-disadvantage analysis of the 'population phenotyping' method compared to the classical 'confirmatory individual phenotyping' method (see also Figure S3).* 'False negative' refers to virulent strains that appeared avirulent in the population phenotyping but were actually virulent in the confirmatory individual phenotyping.

Sources of uncertainty	Disadvantages	Solutions for reducing disadvantages and estimating uncertainty	Benefits
Preparation of the inoculum suspensions	The targeted concentration 10^5 spores·mL^{-1} is neither precisely measured nor adjusted, resulting in a loss of accuracy.	The mean concentration of suspensions was estimated ±3.0 10^5 spores·mL^{-1} from a sample of 40 strains, with 85% in the range 1.0 x 10^5-5.0 x 10^5 spores·mL^{-1} (Figure S4). The impact of such variation (see Figure 8 in Suffert *et al.*, 2018) can be considered negligible for characterising the virulence status of strains and acceptable for comparing the orders of magnitude of aggressiveness between virulent and avirulent strains. Uncertainty was further reduced by having the same person prepare all the batches of inoculum suspensions.	Overall preparation time cut to a third (±30 isolates vs. >100 isolates per half day)
Climatic conditions in the greenhouse	Semi-controlled environmental conditions (temperature, moisture and light) can only be maintained within a range of	The impact of climatic conditions on the development of *Z. tritici in planta* has been clearly established (McCorison & Goodwin, 2020). Hygrometric variations and variations of light exposure may explain some of the 'false negatives' and the poor results	Overall time for *in planta* phenotyping reduced by at least 40% due to space saving in our facilities

	variation and not set at given values. The outdoor climatic conditions may influence the climatic conditions in the greenhouse and, thus, the physiology of wheat plants between batches due to seasonality.	obtained with two non-conforming batches. Comparing these less suitable conditions with a classical phenotyping method in a growth chamber, a low threshold was used to identify strains as virulent (at least 5% of the area sporulating on at least one of the six inoculated leaves). Air temperature monitoring (Figure S5) made it possible to check that the thermal time from inoculation to disease assessment was significantly longer than the mean latent period of *Z. tritici* for all batches. The two non-conforming batches were identified (using eight virulent strains as control), and removed before retesting.	
Small number of biological replicates: - Only six leaves inoculated - Potential leaf layer effect - No repetition of the batches	The number of 'false negatives' is expected to be inversely related to the number of biological replicates (number of leaves inoculated with a given strain) and to be higher in the absence of repetitions.	Confirmatory individual phenotyping was performed with a larger number of biological replicates in more suitable conditions (growth chamber). Half the strains collected on cv. Cellule in the field that appeared avirulent after the first population-phenotyping were actually virulent. Thus, the maximal percentage of 'false negatives' was estimated ±3%, which was considered acceptable with respect to the goal of this study.	Overall time for *in planta* phenotyping reduced by at least 40% due to space saving in our facilities. Possibility of testing a very large number of strains (several thousand rather than several hundred)
Visual assessment	Visual assessment is theoretically less accurate than image analysis for area estimation (*e.g.* Stewart *et al.*, 2016).	The difficulties detecting pycnidia made it impossible to use image analysis in practice for high-throughput population phenotyping on seedlings. Uncertainty was reduced further by having the same person perform all visual assessments.	Overall time for *in planta* phenotyping reduced by at least 40% in our facilities

CHAPITRE II

L'impact d'une association variétale de blé sur la dynamique de la virulence dans les populations de *Z. tritici* persiste-t-il après la reproduction sexuée, et entre deux saisons de culture ?

The impact of wheat cultivar mixtures on virulence dynamics in *Zymoseptoria tritici* populations persists after interseason sexual reproduction*

*article publié dans la revue Plant Pathology.

Orellana-Torrejon C[1,2], Vidal T[1], Saint-Jean S[2], Suffert F[1], 2022b. The impact of cultivar mixtures on virulence dynamics in *Zymoseptoria tritici* populations persists after interseason sexual reproduction. *Plant Pathology* online.
https://doi.org/10.1111/ppa.13577

[1]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UR BIOGER, Thiverval-Grignon, France
[2]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, Thiverval-Grignon, France

Abstract

This study follows on from a previous study showing that binary mixtures of wheat cultivars affect the evolution of *Zymoseptoria tritici* populations within a field epidemic from the beginning (t1) to the end (t2) of a growing season. Here, we focused on the impact of interseason sexual reproduction on this evolution. We studied mixtures of susceptible and resistant cultivars (carrying *Stb16q*, a recently broken-down resistance gene) in proportions of 0.25, 0.5 and 0.75, and their pure stands. We determined the virulence status of 1440 ascospore-derived strains collected from each cultivar residues by phenotyping on seedlings. Virulence frequencies in the ascospore-derived population were lower in mixtures than in pure stands of the resistant cultivar, especially in the susceptible cultivar residues, as at t2, revealing that the impact of mixtures persisted until the next epidemic season (t3). Surprisingly, after sexual reproduction the avirulence frequencies on the resistant cultivar residues increased in mixtures where the proportion of the susceptible cultivar was higher. Our findings highlight two epidemiological processes: selection within the pathogen population between t1 and t2 driven by asexual cross-contamination between cultivars (previous study) and sexual crosses between avirulent and virulent strains between t2 and t3 driven by changes in the probabilities of physical encounters (this study). Mixtures therefore appear to be a promising strategy for the deployment of qualitative resistances, not only to limit the intensity of Septoria tritici blotch epidemics, but also to reduce the erosion of resistances by managing evolution of the pathogen population at a pluriannual scale.

Keywords

Cultivar mixtures, interseason, Septoria leaf blotch, sexual reproduction, *Stb16q*, virulence, wheat disease epidemics, *Zymoseptoria tritici*

Introduction

One of the major pillars of crop protection against fungal diseases is the use of resistant cultivars with different sources of resistance. Qualitative resistance genes can confer full protection, by preventing pathogens from infecting, growing on or reproducing in host-plant tissues (Dodds & Rathjen, 2010). However, the deployment of cultivars carrying the same genes at large spatial scales creates strong selective pressure on pathogen populations (McDonald & Linde, 2002). This pressure favours the emergence of 'virulent' individuals capable of infecting plants that were hitherto resistant, and increases in the frequency of such individuals (Niks *et al.*, 2011). As the frequency of virulent strains increases, the resistance is eroded, and may then be considered to have broken down (Brown & Tellier, 2011). In this context, cereal farming systems are faced with two major concrete problems: (i) the number of resistance genes known and/or available to breeders is limited, and (ii) it may take longer for a gene to be incorporated into new cultivars than for its resistance to be broken down. The current challenge is, therefore, to identify and/or optimise agricultural practices to extend the lifetime of cultivars: in other words, to reinforce the 'durability' of their resistance to diseases (Johnson, 1984).

The trade-off between the 'efficacy' and 'durability' of resistance to plant pathogens has emerged as an important issue in recent years (Mundt, 2018; Rimbaud *et al.*, 2018a; Cowger & Brown, 2019). The efficacy of strategies for controlling fungal diseases is generally assessed at the scale of the cropping season, because this is the period of interest for a grower, for limiting yield losses due to disease. However, larger time scales should be considered, because a strategy can result in cumulative effects over a period of years, affecting its durability. Ecological studies have highlighted the importance of deciphering the relationship between the season and the 'off-season' of the pathogen for epidemiological predictions (Numminen *et al.*, 2019). An understanding of this relationship is even more crucial if an important step in the pathogen life cycle occurs predominantly between growing seasons. This is the case for example, for sexual reproduction, which helps to maintain the pathogen population between annual epidemics, while also driving evolutionary processes (Burdon & Laine, 2019). Epidemiological studies have widely highlighted the impact of sexual reproduction on pathogen survival between growing seasons (*e.g.* Yuen & Andersson, 2013, for *Phytophthora infestans*). Moreover, the intensity of sexual reproduction, the amount of primary inoculum at the beginning of the subsequent epidemic and the size of the pathogen population during this epidemic, for which disease 'severity' is a proxy, have been shown to be correlated (*e.g.* Lo-Pelzer *et al.*, 2009, and Fortune *et al.*, 2021,

for *Leptosphaeria maculans*; Cowger *et al.*, 2002; Suffert *et al.*, 2018a, for *Zymoseptoria tritici*). The recombination resulting from sexual reproduction also has a qualitative effect on the characteristics of the offspring population relative to the parental population. However, a few experimental studies have investigated the impact of sexual reproduction on the frequency of strains displaying virulence against a specific gene within pathogen populations at field scale. Sexual recombination can modify the capacity of a progeny to infect the host on which its parental population originated, and the "beneficial" impact of cropping practices on the pathogen population during the preceding growing season, limiting the increase in virulence frequency, for example.

Z. tritici is the ascomycete fungus responsible for *Septoria tritici* blotch (STB), one of the most damaging wheat diseases in temperate countries (Shaw & Royle, 1989a; Fones & Gurr, 2015). This pathosystem is a useful model for investigating these issues. *Z. tritici* displays both asexual reproduction, which predominates during the cropping season, and sexual reproduction, which occurs mostly during the interseason period (Suffert *et al.*, 2011). During the autumn, the fungus survives on wheat residues, forming sexual fruiting bodies (perithecia) that release wind-dispersed ascospores, which constitute the main source of primary inoculum for the next epidemic season (Sanderson, 1972; Shaw & Royle, 1989a). The genetic recombination resulting from sexual reproduction underlies the diversity of the fungal population and the adaptive dynamics of this species (Chen & McDonald, 1996; McDonald & Linde, 2002). As a means of controlling STB, breeders have incorporated *Stb16q*, one of the 21 major resistance genes identified to date (Ghaffary *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2015), into several cultivars, including cv. Cellule (Florimond Desprez, France). This cultivar was widely grown in France over the last decade (see Fig. 2 in Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). A few years after the deployment of Cellule (2012), strains capable of overcoming *Stb16q* were detected, and such strains now comprise a substantial proportion of field populations. For example, these strains were estimated to have reached proportions of 0.13 and 0.14 in a trial in the Parisian basin in 2018 and 2019, respectively (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a).

Growing different cultivars (cultivar mixtures) with complementary sources of resistance in the same field is a promising, well-documented practice for controlling epidemics of plant diseases, such as STB (Cowger & Mundt, 2002b; Vidal et al., 2017a; Kristoffersen et al., 2021). In a previous experimental study, we showed that wheat cultivar mixtures can have a significant impact on both the size and composition of *Z. tritici* populations relative to those on pure stands of the cultivar carrying the

resistance gene (Cellule), over the course of the growing season (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). We established that, in cultivar mixtures, cross-contaminations may occur between cultivars during the cropping season, modifying the dynamics of the pathogen population on a particular cultivar relative to the pure stand. Taking the pure stand of Cellule as a reference, we established that cultivar mixtures could help to slow the dynamics of resistance breakdown.

Our goal in this study was to investigate the consequences of sexual reproduction on the impact of mixtures on the frequency of virulence against a broken-down STB resistance gene within the offspring population constituting the pool of primary inoculum for subsequent epidemics. The challenge was determining whether the evolution of pathogen populations in cultivar mixtures is limited to the scale of an annual epidemic or whether it may continue over a longer period.

Materials and methods

Overall strategy

In a field experiment divided into microplots, we characterised *Z. tritici* populations in binary mixtures with different proportions of a cultivar carrying the *Stb16q* resistance gene relative to pure stands. The populations studied consisted of strains sampled from diseased leaves at the end of a STB epidemic (t2; see Figure 1 in Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a) and from the corresponding wheat residues after interseason sexual reproduction (t3). We characterised population size based on disease severity at t2 in the field and based on the amount of ascospore released from residues at t3 in laboratory conditions. Ascospore-derived strains were then phenotyped on both cultivars in greenhouse seedling assays, to compare the aggressiveness and composition of populations based on estimates of the frequency of strains virulent against *Stb16q*.

Design of the field experiment

This experiment was performed as part of the field trial described in full by Orellana-Torrejon *et al.* (2022a). This trial, conducted during the 2017-2018 season and repeated in 2018-2019, was designed to compare the annual dynamics of *Z. tritici* populations in pure stands and in binary mixtures of wheat cultivars, from the early (t1) to the late stage (t2) of an epidemic (Figure II.1a). It was divided into three blocks (a, b, and c), each consisting of five microplots treated as follows: a pure stand of wheat cv. Apache (C0A1), a pure stand of wheat cv. Cellule (C1A0), and three binary mixtures, with sowing

proportions of Cellule (p_C) of 0.25, 0.5 and 0.75 (C1A3, C1A1, and C3A1, respectively). Apache (A) was chosen for its moderate susceptibility to STB and Cellule (C) because it carries the *Stb16q* resistance gene for which resistance breakdown has recently been reported.



***Figure II.1**: Zymoseptoria tritici populations on wheat tissues at the late stage of the epidemic (t2) and after interseason sexual reproduction (t3).* **(a)** Microplot at t2 (11th May 2018). **(b)** Microplot just before harvest (11th July 2018). **(c)** Manual collection of the wheat plants. **(d)** Wheat bundles, separated by cultivar, positioned on the ground of a microplot at t3, *i.e.* after four months of exposure to weather conditions (26th November 2018). **(e)** Wetting of wheat residue fragments in laboratory conditions. **(f)** Petri dishes with PDA medium placed upside down over wheat residue fragments to generate a discharge event and to collect ascospore-derived strains.

Management of wheat residues and sexual reproduction

Wheat plants were sampled after their complete natural desiccation, on 10th July 2018 and 16th July 2019 (Figure II.1b), over a distance of 2 x 1 m in rows 3 and 4 at the eastern side of each microplot; non-destructive sampling was conducted at t2, to prevent border effects (Figure S1 in Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). Before harvest, the plants were cut at a height 5 cm from the ground in each microplot (Figure II.1c) and grouped by cultivar, based on the presence (Cellule) or absence (Apache) of awns on the ears. The resulting 24 bundles were stored in a dry place outside the field, for three weeks. Meanwhile, the rest of the plants in the microplots were harvested mechanically on 17th July 2018 and 23rd July 2019 (short cut at a height of 5 cm). On 2nd August 2018 and 14th August 2019, each plant bundle was divided into five smaller bundles, hereafter referred to as sets of 'residues', which were deposited on the soil in their microplot of origin, at a location at which most of the other crop debris had been removed by raking.

The residues were, thus, exposed to field conditions during the autumn to promote sexual reproduction between *Z. tritici* strains present on the senescent wheat tissues before harvest (Figure II.1d). On 26th November 2018 and 10th December 2019, 50 g of decaying plant material (mostly stems and sheaths) was sampled from each set of residues and left to dry in laboratory conditions for one month.

Characterisation of pathogen population size

The intensity of sexual reproduction was estimated by quantifying ascospore production by each set of residues of each cultivar with two simultaneous discharge events per treatment and per block, as described in Suffert *et al.* (2016). For each discharge event, 15 g of residues were cut into 2 cm fragments, soaked in water for 20 min (Figure II.1e) and spread on dry filter paper in a box (24 × 36 cm) with the lid left half-open to decrease the relative humidity of the air. Eight Petri dishes (90 mm in diameter) filled with PDA (potato dextrose agar, 39 g·L^{-1}) medium were then placed upside down 1 cm above the fragments (Figure II.1f). The boxes were placed at 18°C overnight (15 h). The Petri dishes were then closed and incubated at the same temperature in the dark. Six days later, clustered yeast-like colonies resembling cream-coloured convoluted heaps were observed. We counted the number of these colonies by eye, and their identification as *Z. tritici* was checked under a microscope four days after ascospore discharge. It was assumed that each colony resulted from the germination of a single ascospore, and that clusters of colonies appeared just above mature pseudothecia from which several ascospores had been discharged (see Figure 2c in Suffert *et al.*, 2016). For each discharge event, we calculated a cumulative ascospore discharge index (ADI; ascospores·g^{-1}), defined as the total number of ascospores discharged per gramme of wheat residues. We then calculated the mean of six discharge events, ADI_v, for each cultivar v (v ∈ [A; C]) and for each treatment. An overall mean ascospore discharge index ($\overline{\mathrm{ADI}}$) was also calculated at the whole-canopy scale for each treatment, by weighting ADI_v by the proportions of the cultivars (p_C for Cellule and 1 – p_C for Apache), as follows:

$$\overline{\mathrm{ADI}} = p_C \times \mathrm{ADI}_C + (1 - p_C) \times \mathrm{ADI}_A \qquad \text{eq. 1}$$

Characterisation of the composition of the pathogen population

Sampling of Z. tritici strains from wheat residues — We sampled 30 ascospore-derived strains per cultivar and per microplot (total of 1440 strains, Table II.1) from wheat residues. Where possible, the strains were selected from distant clusters of colonies, from as many different Petri dishes as possible, to reduce the probability of sampling

the same genotype several times. Each strain was picked with a pin from a single colony and streaked onto a Petri dish containing PDA, which was then incubated at 18°C for five days in the dark. This operation was repeated twice to obtain pure single-genotype strains. Each strain was finally scraped off the dish to obtain a substantial mass of blastopores (150 mg), which was deposited at the bottom of a cryotube and stored dry at -80°C.

Table II.1. *Number of Zymoseptoria tritici strains sampled on each cultivar ('A' for Apache, 'C' for Cellule) for each treatment (C0A1, C1A3, C1A1, C3A1 and C1A0) after interseason sexual reproduction (t3) following the 2018 and 2019 epidemics, with phenotyping to determine virulence status.*

Year	Stage	C0A1	C1A3		C1A1		C3A1		C1A0	Total
		A	C	A	C	A	C	A	C	
2018	t3 [1]	90	90	90	89	90	90	90	90	719
2019	t3 [2]	88	90	90	90	90	90	90	90	718

[1] discharged on 26th November 2018 from wheat residues collected in the field on 10th July 2018

[2] discharged on 10th December 2019 from wheat residues collected in the field on 16th July 2019

Population phenotyping — Phenotyping data for the *Z. tritici* population sampled at t2 (total of 1440 strains) were obtained and analysed in a previous study (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). We characterised the ascospore-derived strains sampled at t3 for virulence and aggressiveness on cv. Cellule and Apache seedlings according to the same protocol. This population was phenotyped by splitting it into 14 batches of strains tested in the greenhouse (14 batches of 93 strains and 2 batches of 69 strains). Each batch was balanced to ensure that it contained similar numbers of strains from each cultivar, treatment, and block. Each strain was tested individually on two leaves of three 18-day-old seedlings grown in a pot (six replicates), for each cultivar. For each strain, inoculation was performed with blastospore suspensions (concentration: 10^5 to 5.0 x 10^5 spores·mL^{-1}) and a cotton bud. All seedlings were then enclosed in transparent polyethylene bags moistened with distilled water for 72 h, to promote infection. The

same eight virulent strains as used by Orellana-Torrejon *et al.* (2022a) were added to each batch as control strains, to ensure similar conditions for all batches.

Disease severity was assessed by eye 21 days post-inoculation, by determining the percentage of the inoculated leaf surface covered by pycnidia. A strain was considered pathogenic if pycnidia were observed on at least one of the six leaves of Apache. A pathogenic strain was considered virulent ('vir') against *Stb16q* if pycnidia were observed on at least one of the six leaves of Cellule, and avirulent otherwise. The frequency of virulent strains $f_{t3,v,vir}$ (v ∈ [A; C]) was calculated for each cultivar for each treatment.

We calculated the conditional aggressiveness (AGc; defined as the amount of disease "conditional on the individuals being infected" by McRoberts *et al.,* 2003) of each strain sampled on cv. Apache and Cellule at the early (t1) and late (t2) epidemic stages (see Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a) and at t3 (after interseason sexual reproduction; current dataset). For a given strain, AGc was calculated if at least three of the six inoculated leaves on cv. Apache presented pycnidia.

Overall impact of cultivar mixtures on the dynamics of virulent subpopulations after sexual reproduction

We estimated the number of virulent ascospores discharged per gramme of residues ($n_{t3,v,vir}$) for each cultivar v (v ∈ [A; C]) as a proxy for the size of the virulent subpopulation at t3. This variable was obtained by multiplying the ascospore discharge index ($\mathrm{ADI_v}$) by the frequency of virulent strains ($f_{t3,v,vir}$) for each cultivar x treatment x block combination. The mean size of the virulent subpopulation at t3 ($\overline{n}_{t3,vir}$) was calculated at the whole-canopy scale for each treatment, as for the overall mean ascospore discharge index ($\overline{\mathrm{ADI}}$, eq. 1).

Statistical analysis

All data analyses were performed with R software (v4.0.2 R Core Team 2012). Shapiro tests ('shapiro.test' function) showed that none of the variables studied were normally distributed. We therefore used various approaches to account for the non-normality of the data, depending on the number of replicates available and the actual distribution of the data.

We assessed the effect of treatment on the size of the pathogen population at t3 (*i.e.* on the intensity of interseason sexual reproduction), by normalising the ascospore discharge index ($\mathrm{ADI_v}$) data with ordered quantile transformation (*bestNormalize* R package; 'orderNorm' function) and performing an analysis of variance (ANOVA; 'lm'

function). The variance of the overall mean ascospore discharge index ($\overline{\mathrm{ADI}}$) was estimated by calculating error propagation from the standard error of individual variables. We analysed the frequency of virulent strains and the frequency of pathogenic strains during the wheat growing season (t2; t3) with a generalised linear model adapted to a binomial distribution of data ('glm' function).

The variance of the three variables described above was partitioned into sources attributable to the following factors and their interactions: cultivar of origin (A; C), treatment (C0A1; C1A3; C1A1; C3A1; C1A0), block (a; b; c), and year (2018; 2019). We also assessed the effect of 'period' (t2; t3) on the frequency of virulent and pathogenic strains. We performed a Tukey HSD post-hoc test for multiple pairwise comparisons on estimated marginal means (*emmeans* and *multcomp* R packages; 'emmeans' and 'cld' functions). The pertinence of the generalised linear models used was checked by calculating the ratio of the residual deviance to the number of degrees of freedom (< 1).

The effect of treatments on the frequency of virulent strains ($f_{\mathrm{t3,v,vir}}$) and on the frequency of pathogenic strains was assessed with a χ^2 test ('chisq.test' function) for contingency tables or with Fisher's exact test when the expected numbers were small. The effects of treatments on the number of virulent ascospores discharged per gramme of residues for each cultivar ($n_{\mathrm{t3,v,vir}}$; v ∈ [A; C]) and on the mean size of the virulent subpopulation calculated at the whole-canopy scale ($\overline{n}_{\mathrm{t3,vir}}$) were assessed in a Kruskal-Wallis test (*agricolae* R package, 'kruskal' function), selected as the appropriate test for one ANOVA factor with a non-normal distribution. Similarly, the effect of 'period' (t1; t2; t3) on conditional aggressiveness means (AGc) was assessed in a Kruskal-Wallis test. Bonferroni correction was used for pairwise comparisons, due to its high stringency.

Results

Impact of cultivar mixtures on the overall size of pathogen populations on residues after sexual reproduction

The ascospore discharge index (ADI) was 10 times higher in 2018 than in 2019, regardless of cultivar or treatment ($p < 0.05$, ANOVA; Table II.S1 and Figure II.2). ADI depended on cultivar, without interaction with any other factor. The post-hoc test revealed that $\mathrm{ADI_A}$ was significantly higher than $\mathrm{ADI_C}$ in pure stands, and in C3A1, in 2019, highlighting a higher intensity of sexual reproduction in Apache than in Cellule in these two sets of conditions. ADI was highly variable, particularly between blocks. Treatment had a significant effect on the intensity of sexual reproduction for two of the three blocks, but the overall effect, when all three blocks were considered together, was not significant. The effect of treatment on $\overline{\mathrm{ADI}}$ was not significant, at least partly due to the high variability of $\mathrm{ADI_A}$ and $\mathrm{ADI_C}$. In 2019, $\mathrm{ADI_A}$ tended to increase ($p = 0.038$, ANOVA) with the proportion of Cellule in the mixture (p_C; Figure II.2 and Table II.S1).

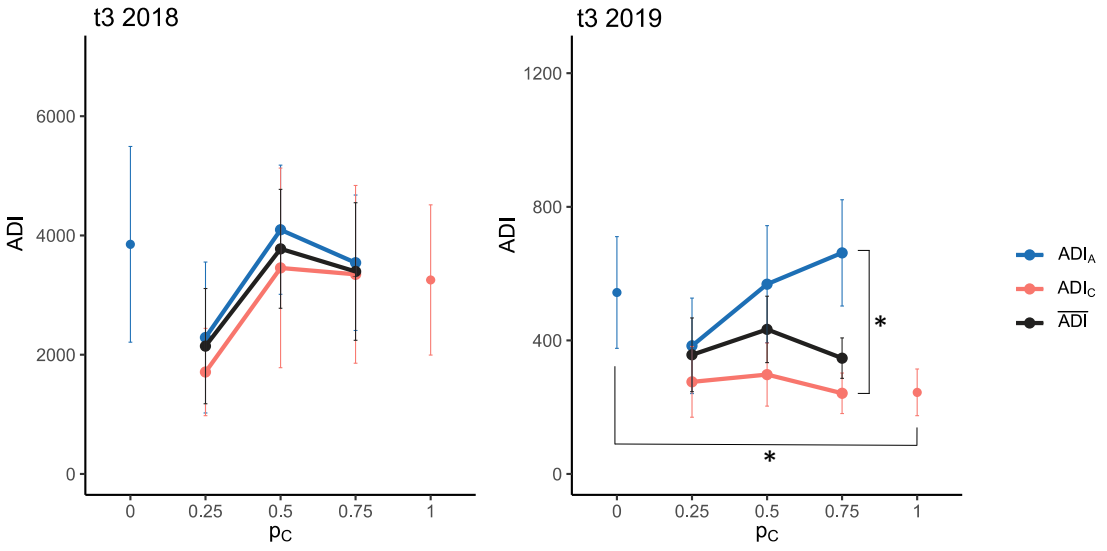


***Figure II.2**. Mean ascospore discharge index, ADI_v (mean number of Zymoseptoria tritici ascospores collected from 1 g of residues of cultivar v), according to the proportion of cv. Cellule (p_C) in the canopy at t3, in 2018 and 2019.* ADI_v was calculated for each cultivar, Apache (ADI_A, blue solid line) and Cellule (ADI_C, red solid line), based on six discharge events (two per block). The overall ascospore discharge index $\overline{ADI}$ (black solid line) was calculated at the whole-canopy scale as the mean of ADI_A and ADI_C weighted by the proportions of the cultivars. Bars represent the standard error for the six discharge events. ADI_A and ADI_C were significantly different (*) only in 2019, in pure stands and C3A1 ($ANOVA$ followed by a Tukey HSD post-hoc test). No other differences between treatments (p_C) were significant for ADI_A or ADI_C.

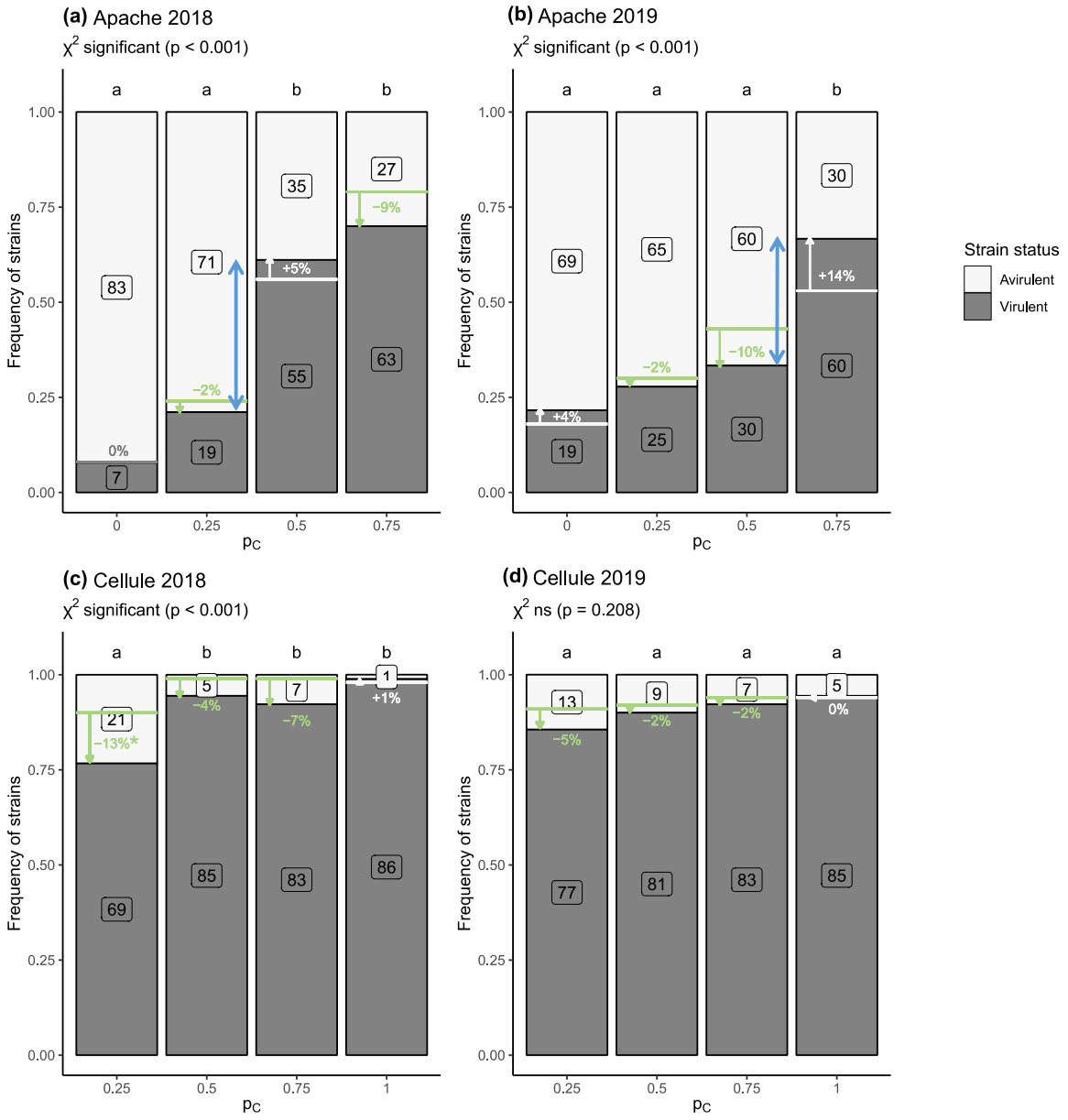


***Figure II.3**. Change in the frequency of Zymoseptoria tritici strains considered virulent against Stb16q in the populations collected **(a, b)** from cv. Apache ($f_{t3,A,vir}$) and **(c, d)** cv. Cellule ($f_{t3,C,vir}$) in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5, and 0.75 for C1A3, C1A1, and C3A1, respectively) from t2 (wheat plants at the late epidemic stage) to t3 (wheat residues after interseason sexual reproduction) in 2018 and 2019.* The frequencies of virulent and avirulent strains are indicated by the grey and white bars, respectively, and the corresponding numbers appear in boxes. The effect of the treatment (pure stands and cultivar mixtures) on the number of virulent strains was assessed by performing a χ^2 test with Bonferroni correction for pairwise comparison (letters at the top of each bar). Changes in the number of pathogenic strains from t2 to t3 were calculated for each p_C and are represented with simple arrows (white for increases and green for decreases). Blue double arrows highlight the increase in the virulence frequency gap between cultivar proportions from t2 to t3. None of the differences in the number of virulent strains from t2 to t3 within treatments was significant, according to the generalised linear model, except for p_C = 0.25 on Cellule in 2018 (*: $p < 0.05$).

Impact of sexual reproduction on the composition of pathogen populations in cultivar mixtures

Three factors had a significant impact on the frequency of virulent strains: year, cultivar and treatment. The change in the frequency of virulent strains between t2 and t3 depended on cultivar (the generalised linear model highlighted a significant period x cultivar interaction; Table II.S2).

The impact of mixtures persisted after sexual reproduction, on both cultivars — The variation of the frequency of virulent strains ($f_{t3,A,vir}$ and $f_{t3,C,vir}$) with the proportion of Cellule in the mixture (p_C) followed the same trend as at the late epidemic stage (t2) for both cultivars (for more details, see Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). After sexual reproduction (t3), the ascospore population derived from Apache contained a still significantly higher number of virulent strains in mixtures than in the pure stands of Apache, in both years (χ^2 test, p < 0.001; Figure II.3a and II.3b), and this number increased with p_C. At t3 on Cellule, the effect of treatment on the frequency of virulent strains relative to that in the pure stand of Cellule was not significant, except for C1A3 in 2018 (χ^2 test; p < 0.001 in 2018 and p = 0.208 in 2019; Figure II.3c and II.3d). The proportion of Cellule (p_C), thus, had little impact on the frequency of virulent strains on Cellule ($f_{t3,C,vir}$), as at t2. Moreover, the difference in the frequency of virulent strains between t2 and t3 was non-significant for almost all treatments and for both cultivars (generalised linear model after post-hoc comparisons). We therefore conclude that the overall effect of mixtures persisted after sexual reproduction, on both cultivars.

The impact of sexual reproduction ('period' effect) on the frequency of virulent strains was dependent on cultivar and treatment (p_C) — On Apache, the effect of treatment seemed to be emphasized by an inflection in the proportion of Cellule in the micture (p_C) at t3, with a substantial increase in the frequency of virulent strains (Figure II.3a and II.3b). The proportions involved were between p_C = 0.25 (C1A3) and p_C = 0.5 (C1A1) in 2018 (tripling $f_{t3,A,vir}$) and between p_C = 0.5 (C1A1) and p_C = 0.75 (C3A1) in 2019 (doubling $f_{t3,A,vir}$). These findings reflect particularly high levels of variation in the frequency of virulent strains after sexual reproduction around p_C = 0.5. In particular, fewer virulent strains were found on Cellule in mixtures (regardless of p_C) at t3 than at t2 (data from Figure 5 in Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a) in both years, with differences in $f_{t3,C,vir}$ ranging from -2% to -13%; however, this difference was significant only for C1A3 in 2018 (generalised linear model, p = 0.020; Figure II.3c). This suggests that sexual reproduction led to an overall increase in the frequency of avirulent strains on Cellule in all mixtures (from x1.2 to x7).

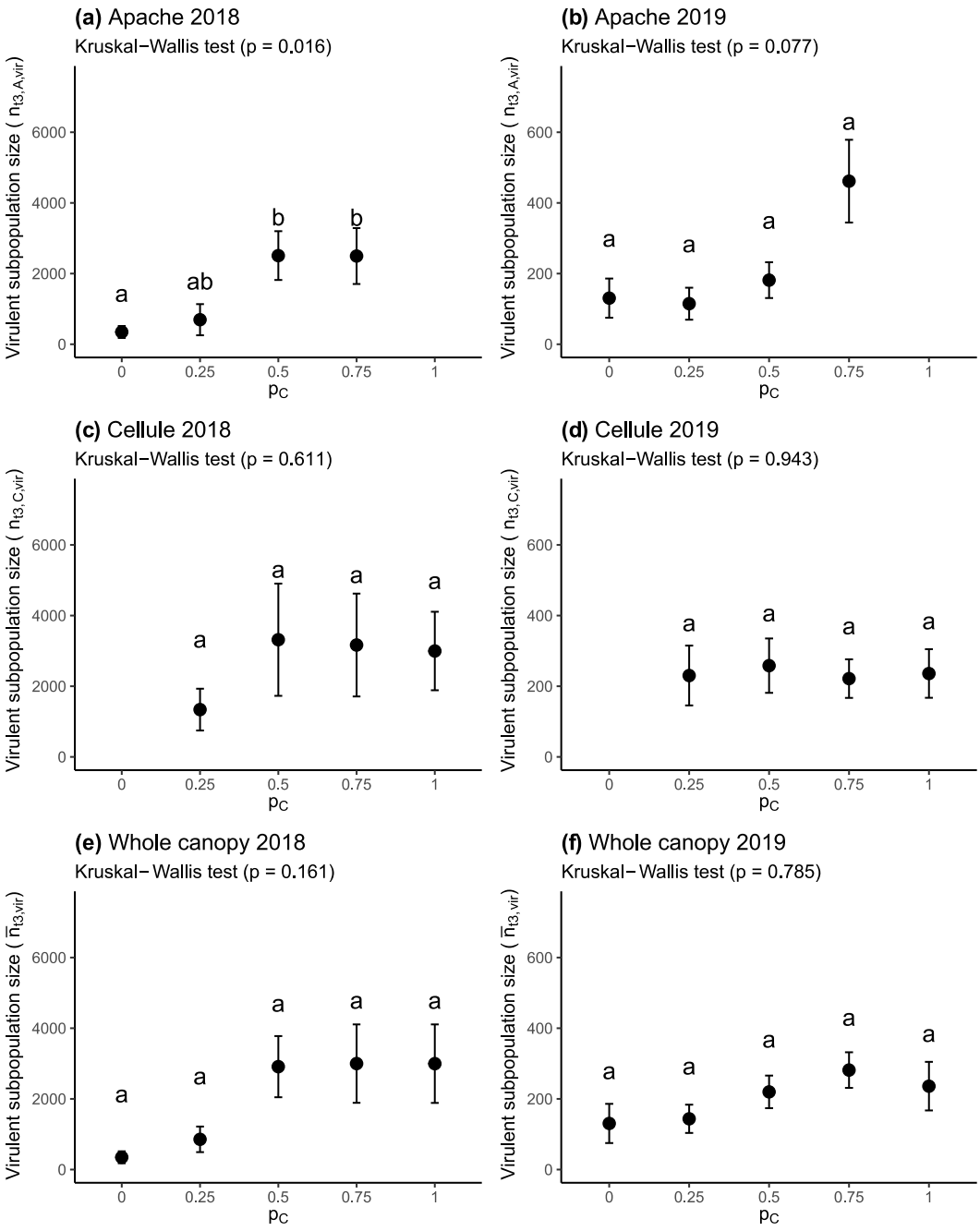


***Figure II.4**. Impact of mixtures on the size of the Zymoseptoria tritici virulent subpopulation after sexual reproduction (t3) on wheat residues from each cultivar and at the whole-canopy scale.* (**a, b)** Proxy for the size of the virulent subpopulation sampled from residues of cv. Apache ($n_{t3,A,vir}$; number of virulent strains collected from 1 g of residues; black dots) and **(c, d)** from residues of cv. Cellule ($n_{t3,C,vir}$), according to the proportion of Cellule (p_C) in 2018 and 2019. **(e, f)** Proxy for the size of the virulent subpopulation calculated at the whole-canopy scale ($\bar{n}_{t3,vir}$). Bars represent the standard error for six replicates for $n_{t3,A,vir}$ and $n_{t3,C,vir}$, and three replicates for $\bar{n}_{t3,vir}$. Error propagation was taken into account. The effect of treatment (pure stand or cultivar mixture) on the mean size of the virulent subpopulation was assessed by performing a Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction for pairwise comparison.

Overall impact of mixtures on the dynamics of the virulent subpopulation after sexual reproduction

The virulent subpopulation $n_{t3,v,vir}$ was about 10 times larger in 2018 than in 2019, whatever the treatment or cultivar (Figure II.4a). After sexual reproduction on Apache, the virulent subpopulation ($n_{t3,A,vir}$) was significantly larger in two mixtures (C1A1 and C3A1) than in the corresponding pure stands in 2018 (Kruskal-Wallis, p = 0.016; Figure II.4a). In 2019, the differences were not significant. The high variability of ADI, the quantitative variable used to calculate $n_{t3,v,vir}$, made it impossible to highlight other significant effects. Nevertheless, $n_{t3,A,vir}$ increased significantly with the proportion of Cellule (p_C) in 2018 and there was a similar trend in 2019 (p = 0.016 and p = 0.077, respectively, Figure II.4a and II.4b). By contrast, on Cellule, differences in $n_{t3,C,vir}$ between mixtures and the pure stand were not significant, in either year (Figure II.4c and II.4d). Finally, the size of the overall virulent subpopulation estimated at whole-canopy scale ($\bar{n}_{t3,vir}$) increased with the proportion of Cellule in the mixture, but this trend was not statistically significant (Figure II.4e and II.4f).

Pathogenicity and aggressiveness of pathogen populations after sexual reproduction

As at t2, most of the ascospore-derived strains sampled from Apache and Cellule residues (> 95%) were pathogenic, causing sporulating lesions on Apache (Figure II.S1). The proportion of Cellule in the mixture (p_C) had no significant effect on the frequency of pathogenic strains on either cultivar, except for C3A1 on Apache in 2019 and on Cellule in 2018 where it was lower (Fisher's test p = 0.016 and p = 0.008, respectively, Figure II.S1). The difference in the frequency of pathogenic strains between t2 and t3 was not significant overall and depended on treatment (p = 0.015 for the interaction between period and treatment; Table II.S2). The post-hoc comparisons showed that the differences were significant in five cases with a number of pathogenic strains lower (C1A3 on Apache in 2018 and C3A1 on Cellule in 2018 and 2019) and higher (C0A1 on Apache in 2018 and C1A3 on Cellule in 2019) in t3 than in t2.

The conditional aggressiveness (AGc) of the *Z. tritici* populations sampled at t1, t2, and t3, expressed as the mean percentage sporulating leaf area on cv. Apache in conditions in which at least three of the six inoculated leaves presented pycnidia, was calculated for a total of 3563 strains. AGc decreased significantly after sexual reproduction in 2018, and a similar trend was observed in 2019 (Kruskal-Wallis, p < 0.01 and p = 0.08, respectively; Figure II.5). AGc was 18.4% for strains collected at t3, versus 20.4% at t1 and 22.0% at t2 in 2018, and 12.4% for strains collected at t3, versus 16.0% at t1 and

14.4% at t2 in 2019. The differences observed between t1 and t2 were not significant in either year.

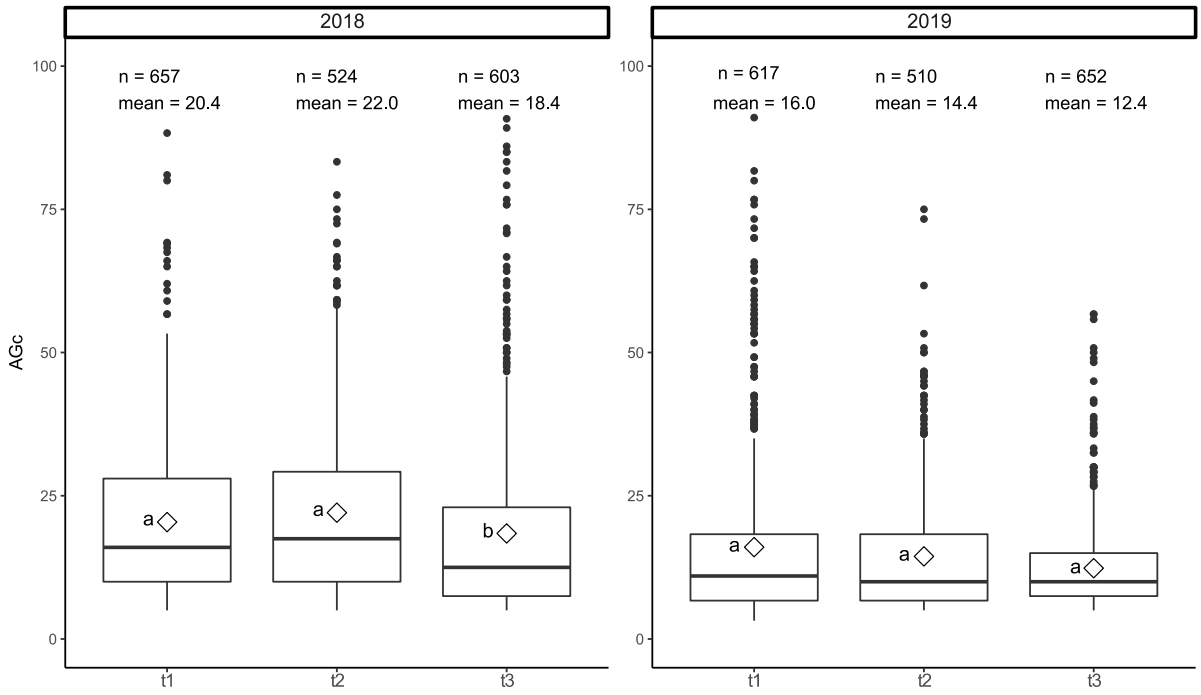


Figure II.5. *Comparison of the conditional aggressiveness (AGc) of 3563 strains collected on Apache and Cellule in the field trial, by sampling period: early epidemic stage (t1), late epidemic stage (t2) and after interseason sexual reproduction (t3).* AGc was calculated as the mean percentage of the leaf area displaying sporulation on cv. Apache in conditions in which at least three of the six inoculated leaves presented pycnidia. For each sampling period, the number of strains (n), the mean (white diamond) and the median (horizontal bar) are indicated. The effect of the sampling period was assessed in a Kruskal-Wallis test ($p < 0.01$ and $p = 0.08$ in 2018 and 2019, respectively).

Discussion

This study follows on from a previous study (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a), in which we highlighted the impact of mixtures of cultivars between the early (t1) and late (t2) stages of the wheat growing season on both the overall size of *Z. tritici* populations (with disease 'severity' as a proxy) and their composition (frequency of virulent strains and size of the virulent subpopulation). We show here that sexual reproduction during the interseason period (t3) on wheat residues does not greatly affect the beneficial impact of mixtures over the epidemic season: the selective dynamics displayed during the growing season persisted in the offspring populations. The frequency of virulent strains derived from ascospores remained lower in mixtures than in pure stands of

Cellule (hereafter referred to as the 'resistant' cultivar), indicating that mixtures effectively limited the transmission of virulence against *Stb16q* resistance into the following epidemic season. Mixtures had no detectable impact on the size of offspring populations relative to pure stands, contrary to expectations of a possible decrease in the amount of primary inoculum based on the lower disease severity observed at t2. We discuss here, in greater detail, the novelty and promise of this study, together with its limitations, by distinguishing the effects on each cultivar and proposing explanatory mechanisms.

***

One of our key findings concerns the impact of sexual reproduction on the composition of the offspring population and the persistence of the overall mixture effect, with differences between cultivars. After interseason sexual reproduction, the increase in the proportion of the susceptible cultivar in the mixture was accompanied by: (i) a decrease in the frequency of virulent strains derived from ascospores on the susceptible cultivar (treatment effect; Figure II.3a and II.3b), consistent with the results obtained late in the growing season (t2) (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a); and (ii) an increase in the frequency of avirulent strains derived from ascospores on the resistant cultivar (treatment effect; Figure II.3c and II.3d). The dual processes involved in reducing the frequency of virulence in mixtures justified a cultivar-by-cultivar analysis. The effect of the proportion of the cultivar in the mixture was significant for the susceptible cultivar in both years, and for the resistant cultivar only in 2018. This suggests that the intensity of epidemics, which is dependent on climatic conditions in the spring, may account for the observed differences in the magnitude of the mixture effect between years (see the discussion in Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a).

A high proportion of the susceptible cultivar in mixtures decreased the frequency of virulent strains derived from ascospores on this cultivar. No significant differences in the frequency of virulent strains on the susceptible cultivar were observed between t2 and t3, for each mixture considered individually. Thus, the selective dynamics established at t2 persisted during the interseason period. The similarity in the frequencies of virulent strains in populations before and after sexual reproduction is consistent with the genetics of *Z. tritici* as a haploid fungus and with Hardy-Weinberg equilibrium, according to which, the allele and genotype frequencies in a population remain constant from generation to generation in the absence of other evolutionary forces. However, the frequency of avirulent offspring collected on the susceptible cultivar in mixtures with lower proportions of the resistant cultivar increased sharply

around a cultivar proportion (p_C) identified as a potential "inflection point" (between p_C = 0.25 and p_C = 0.5 in 2018, and between p_C = 0.5 and p_C =0.75 in 2019; blue double arrows in Figure II.3a and II.3b, respectively). The gap widened from t2 to t3, highlighting an amplification of the effect of cultivar proportion, which could be an emerging property of mixtures.

Conversely, mixtures enriched the offspring populations in avirulence through sexual reproduction on the resistant cultivar. The frequency of avirulent strains remained low on the resistant cultivar in mixtures after sexual reproduction (Figure II.3c and II.3d). This frequency was higher at t3 (11% on average) than at t2 (6% on average), for all mixtures and all years, and this difference was significant for C1A3 in 2018. The frequency of avirulent strains involved in sexual reproduction was actually higher than the frequency estimated at t2 on the basis of sporulating leaf lesion sampling, and was, thus, higher than expected according to Hardy-Weinberg equilibrium. One possible reason for this difference is that several parental avirulent strains may have been present on the resistant cultivar without causing symptoms, thereby escaping sampling at t2. Avirulent strains may be highly abundant on resistant plants due to splash-dispersed pycnidiospores from susceptible plants, especially in mixtures with a high proportion of the susceptible cultivar (low p_C). Avirulent strains may have participated in sexual reproduction in a cryptic manner, without the generation of asexual fruiting bodies or symptoms. This would be consistent with the larger increase in the frequency of avirulent strains on the resistant cultivar, significantly so for C1A3 in 2018 (10% at t2 vs. 23% at t3), when the epidemic was more intense. This important finding indicates that sexual reproduction led to not only the maintenance of avirulence, but also its enrichment, in the offspring population on resistant plants. The possibility of crossing between an avirulent and a virulent strain on a plant carrying the corresponding resistance gene was demonstrated by Kema *et al.* (2018) for *Stb6* and by Orellana-Torrejon *et al.* (2022b) for *Stb16q*. Two biological phenomena may account for the asymptomatic persistence of one of the two parental strains: (i) the germination of pycnidiospores on the leaf surface, with the ramification and epiphytic growth of hyphae (Fones *et al.*, 2017) or proliferation in the form of blastospores (Francisco *et al.*, 2019); (ii) colonisation of the substomatal cavities, with blocking in the leaf tissues before the appearance of symptoms. It is also possible that avirulent strains successfully penetrated the plant tissues and caused symptoms as 'stowaways' co-infecting the plant simultaneously with virulent strains after a 'systemic induced susceptibility' (SIS) reaction (Seybold *et al.*, 2020). This hypothesis is plausible because avirulent isolates were isolated from 3% (24/719) of the sporulating lesions on the resistant cultivar at t1 (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). These hypotheses were recently explored

experimentally under semi-controlled conditions by Orellana-Torrejon *et al.* (2022b) and some of them were validated.

***

Another key finding worthy of discussion is the lower aggressiveness of strains collected from wheat residues after sexual reproduction than of those collected from the living plant at the end of the growing season. The mean aggressiveness of the offspring population (t3) was lower than that of both the initial (t1) and late (t2) parental populations (Figure II.5), this difference being significant in 2018. This result is of great interest because it is robust, being based on the *in planta* individual phenotyping of a very large number of strains (> 3500), compensating for the small mean size of sporulating areas, as pointed out by Orellana-Torrejon *et al.* (2022a). Secondly, it increases our empirical knowledge of the impact of (mal)adaptation to the host on the short-term evolutionary trajectory of local *Z. tritici* populations (Morais *et al.*, 2016; Suffert *et al.*, 2018b). This difference concerns the parental population (both t1 and t2) sampled on plants, acting as a fitness selective 'filter', and also the offspring population consisting of ascospore-derived strains sampled before they infected new wheat plants (*i.e.* before they were 'filtered'). Moreover, more 'non-pathogenic' strains were sampled in mixtures after sexual reproduction (t3) than at t2 (Figure II.S1), confirming that the offspring population was, on average 'less adapted' to its host than the parental population. This decrease in aggressiveness after sexual reproduction is consistent with the pluriannual dynamics established in Suffert *et al.* (2018b), even though we did not observe changes in aggressiveness during the growing season, between t1 and t2 (Figure II.5). Suffert *et al.* (2018b) found that strains sampled later in the epidemic were fitter than those sampled at the early stage, and no such increase was observed at the start of the next epidemic. The lower aggressiveness of the offspring population highlighted here confirms the existence of a trade-off between the seasonal (epidemic) and interseason (interepidemic) periods.

***

The impact of mixtures on the size of offspring populations is an issue meriting further investigation. We did not highlight an impact on the overall size of the *Z. tritici* ascospore populations (t3) relative to pure stands. The size of the offspring population was determined by counting the number of ascospores discharged per 1 g of wheat residues (ADI_v), as a proxy for the intensity of sexual reproduction. The variability of the results, due to the limitations of this method (Suffert & Sache, 2011; Suffert *et al.*, 2016, 2018b), together with a significant block effect (Table II.S1), probably limited our ability

to detect an effect in this trial. However, we were able to establish that the intensity of sexual reproduction was significantly higher in 2018 than in 2019 (Figure II.2). The intensity of epidemics may account for the observed year effect, as weather conditions were more favourable in spring 2018 than in 2019 for disease development through the splash dispersal of pycnidiospores, resulting in a higher disease severity in both the mixtures and the pure stands of the resistant cultivar. We also found that sexual reproduction was significantly more intense on the susceptible cultivar than on the resistant cultivar, in pure stands and in C3A1 in 2019. This finding is consistent with previous demonstrations of a positive correlation between the intensity of sexual reproduction in several ascomycete pathogens and disease severity during the growing season, as shown by Cowger *et al.*, 2002, and Suffert *et al.*, 2018a. There are two possible reasons for the absence of such a correlation in this study (Figure II.S2). First, disease severity was quite low (< 30%) at t2, whereas Suffert *et al.* (2018a) reported a positive correlation only in semi-controlled conditions in which STB severity ranged from 40% to 80%. Second, the residues from which the intensity of sexual reproduction was estimated in this study consisted of all leaf layers and stems, whereas disease severity at t2 was estimated from the last three leaf layers only. This difference in the plant material used may have had a major impact, as the wheat tissues playing the greatest role in sexual reproduction are located in the central part of the plant (ascospore production maximal between 25 and 35 cm above the ground; see Figure 4 in Suffert *et al.*, 2018a).

We assessed the effect of sexual reproduction on the frequency of virulent strains in each mixture, but we were unable to evaluate the effect on the change in overall population size and in the size of the virulent subpopulation from t2 to t3 directly. Indeed, the sizes of the two populations were assessed by means of two different proxies: disease severity, expressed as the percentage of the leaf are displaying sporulation (assumed to be correlated with the number of pycnidiospores), and the number of ascospores ejected. We highlighted differences in the size of virulent offspring subpopulations (Figure II.4): (i) these populations were 10 times larger in 2018 than in 2019; (ii) they were also larger on susceptible cultivar in mixtures than in pure stands. Given the variability observed with the method for estimating the intensity of sexual reproduction, it seems more relevant to focus on “the frequency of virulence" than on "population size". Our conclusions on the effects of mixtures should be considered with caution, because there may be an overall trade-off between size and composition in populations (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a).

***

In conclusion, the results for the epidemic (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a) and interseason (the current study) periods reveal that two epidemiological processes can account for the efficacy of cultivar mixtures for limiting the virulent fraction of a local *Z. tritici* population over the course of the complete pathogen life cycle in field. The first of these processes is the short-term selection that occurs within a local pathogen population, driven by cross-contaminations between cultivars with splash-dispersed pycnidiospores (the composition of which, in virulent strains, depends on the cultivar of origin). The second process results from changes in the probabilities of physical encounters between avirulent and virulent strains at the late epidemic stage, as consequence of the first process. We found that this second process is probably based on two mechanisms for decreasing the frequency of virulence in mixtures relative to the resistant pure stands, depending on the cultivar considered in the mixture: (i) a decrease in the frequency of virulent strains on the susceptible cultivar; (ii) more unexpectedly, an enrichment in avirulent strains on the resistant cultivar. These empirical findings confirm that cultivar mixtures are a promising strategy for resistance deployment, not only to limit the intensity of STB epidemics (Kristoffersen *et al.*, 2020a), but also to manage the erosion of *Stb* genes through effects on virulence frequencies in local *Z. tritici* populations. This study provides experimental elements for further investigation, by modelling approaches, of the potential of cultivar mixtures as a durable resistance deployment strategy relative to other strategies, as assessed by Rimbaud *et al.*(2018), for example. In estimations of the impact of key factors, it will be crucial to consider the nature and number of resistance genes, the proportion of each cultivar in the mixture, and the frequency of virulences (and their combination, if any) in the local population (Vidal *et al.*, 2020; Kristoffersen *et al.*, 2021). An understanding of the interactions between these factors will clearly require modelling approaches, but also further experimental fungal biology studies in semi-controlled conditions (e.g. Orellana-Torrejon *et al.*, 2022b) to characterise the abovementioned mechanisms in greater detail. The potential impact of resistance deployment strategies, including cultivar mixtures — which may be beneficial, but also detrimental over the years — remain to be fully assessed considering both the size and the genetic diversity of a pathogen population (Mcdonald & Linde 2002; Mcdonald *et al.*, 2022). Our conclusions were drawn at field scale, but it should clearly be borne in mind that the impact of mixtures is diluted at greater spatial scales, when considering inoculum exchanges between fields planted with different cultivars (*e.g.* Fabre *et al.*, 2015).

Acknowledgements

We thank Christophe Montagnier (INRAE Experimental Unit, Thiverval-Grignon, FR), Sandrine Gélisse, Nathalie Retout, Laurent Gerard, Nicolas Lecutier, Auriane Pinton, Miléna Bonnard, Jérôme Lageyre, Martin Willigsecker and Benjamin Boudier (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for technical assistance. We thank Dr. Agathe Ballu and Dr. Anne-Lise Boixel for their help and advice with the statistical analysis. We thank Dr. Julie Sappa for her help correcting our English.

Funding

This research was supported by a grant from the "Fond de Soutien à l'Obtention Végétale" (FSOV PERSIST project; 2019-2022) and by a PhD fellowship from the French Ministry of Education and Research (MESR) awarded to Carolina Orellana-Torrejon for the 2018-2022 period. The BIOGER laboratory also receives support from Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Data availability statement

The data that support the findings of this study are freely available from the INRAE Dataverse online data repository (https://data.inrae.fr/) at https://doi.org/10.15454/JGWC5A.

References

Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C, 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 33–41.

Brown JKM, Tellier A, 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 345–367.

Burdon JJ, Laine A-L, 2019. *Evolutionary Dynamics of Plant & Pathogen Interactions*. Cambridge University Press.

Chen RS, McDonald BA, 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics* **142**, 1119–1127.

Cowger C, Brown JKM, 2019. Durability of quantitative resistance in crops: Greater than we know? *Annual Review of Phytopathology* **57**, 253–277.

Cowger C, McDonald BA, Mundt CC, 2002. Frequency of sexual reproduction by *Mycosphaerella graminicola* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 1175–1181.

Cowger C, Mundt CC, 2002. Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of Septoria tritici blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **92**, 617–623.

Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.

Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B, 2015. Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. *Evolutionary Applications* **8**, 919–932.

Fones HN, Eyles CJ, Kay W, Cowper J, Gurr SJ, 2017. A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* **106**, 51–60.

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

Fortune JA, Qi A, Ritchie F, Dewage CSK, Fitt BDL, Huang Y-J, 2021. Effects of cultivar resistance and fungicide application on stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*) and potential interseasonal transmission of *Leptosphaeria* spp. inoculum. *Plant Pathology* **70**, 2115–2124.

Francisco CS, Ma X, Zwyssig MM, McDonald BA, Palma-Guerrero J, 2019. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Scientific Reports* **9**, 1–18.

Ghaffary SMT, Faris JD, Friesen TL *et al.*, 2012. New broad-spectrum resistance to Septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 125–142.

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

Kema GHJ, Gohari AM, Aouini L *et al.*, 2018. Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nature Genetics* **50**, 375–380.

Kristoffersen R, Bonde Eriksen L, Cordsen Nielsen G, Jørgensen JR, Jørgensen LN, 2021. Management of Septoria tritici blotch using cultivar mixtures. *Plant Disease*.

Kristoffersen R, Heick TM, Müller GM, Eriksen LB, Nielsen GC, Jørgensen LN, 2020. The potential of cultivar mixtures to reduce fungicide input and mitigate fungicide resistance development. *Agronomy for Sustainable Development* **40**, 36.

Lo-Pelzer E, Aubertot JN, David O, Jeuffroy MH, Bousset L, 2009. Relationship between severity of blackleg (*Leptosphaeria maculans* / *L-biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. *Plant Pathology* **58**, 61–70.

McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.

McDonald BA, Suffert F, Bernasconi A, Mikaberidze A, 2022. How large and diverse are field populations of fungal plant pathogens? The case of *Zymoseptoria tritici*. *bioRxiv* 2022.03.13.484150 [preprint].

McRoberts N, Hughes G, Madden LV, 2003. The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. *Annals of Applied Biology* **142**, 191–211.

Morais D, Gelisse S, Laval V, Sache I, Suffert F, 2016. Inferring the origin of primary inoculum of *Zymoseptoria tritici* from differential adaptation of resident and immigrant populations to wheat cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **145**, 393–404.

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

Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P, Bai Y, 2011. *Breeding crops with resistance to diseases and pests*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Numminen E, Vaumourin E, Parratt SR, Poulin L, Laine A-L, 2019. Variation and correlations between sexual, asexual and natural enemy resistance life-history traits in a natural plant pathogen population. *BMC Evolutionary Biology* **19**, 142.

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Boixel A-L, Gélisse S, Saint-Jean S, Suffert F, 2022a. Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: A compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology* **71**. 289–303

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Gazeau G, Boixel A-L, Gélisse S, Lageyre J et al., 2022b. Multiple scenarios for sexual crosses in the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* on wheat residues: Potential consequences for virulence gene transmission. *bioRxiv* 2022.02.24.481803 [preprint].

R Core Team (2012) *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: http://www.R-project.org/ [Accessed 26 April 2022].

Rimbaud L, Papaix J, Barrett LG, Burdon JJ, Thrall PH, 2018. Mosaics, mixtures, rotations or pyramiding: What is the optimal strategy to deploy major gene resistance? *Evolutionary Applications* **11**, 1791–1810.

Sanderson F, 1972. A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* rob. and desm. *New Zealand Journal of Botany* **10**, 707–709.

Seybold H, Demetrowitsch TJ, Hassani MA *et al.*, 2020. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nature Communications* **11**, 1–12.

Shaw MW, Royle DJ, 1989. Estimation and validation of a function describing the rate at which *Mycosphaerella graminicola* causes yield loss in winter wheat. *Annals of Applied Biology* **115**, 425–442.

Suffert F, Delestre G, Carpentier F *et al.*, 2016. Fashionably late partners have more fruitful encounters: Impact of the timing of co-infection and pathogenicity on sexual reproduction in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* **92**, 40–49.

Suffert F, Delestre G, Gélisse S, 2018a. Sexual reproduction in the fungal foliar pathogen *Zymoseptoria tritici* is driven by antagonistic density dependence mechanisms. *Microbial Ecology* **77**, 110–123.

Suffert F, Goyeau H, Sache I *et al.*, 2018b. Epidemiological trade-off between intra- and interannual scales in the evolution of aggressiveness in a local plant pathogen population. *Evolutionary Applications* **11**, 768–780.

Suffert F, Sache I, 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* **60**, 878–889.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2011. Early stages of Septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–177.

Vidal T, Boixel A-L, Durand B, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2017. Reduction of fungal disease spread in cultivar mixtures: Impact of canopy architecture on rain-splash dispersal and on crop microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology* **246**, 154–161.

Vidal T, Saint-Jean S, Lusley P *et al.*, 2020. Cultivar mixture effects on disease and yield remain despite diversity in wheat height and earliness. *Plant Pathology*.

Yuen JE, Andersson B, 2013. What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant Pathology* **62**, 485–491

Supplementary Files

Figure II.S1. *Change in the frequency of Zymoseptoria tritici strains considered pathogenic in the populations collected* ***(a, b)*** *on cv. Apache and* ***(c, d)*** *cv. Cellule in pure stands (p_C = 0) and mixtures (p_C = 0.25, 0.5, and 0.75 for C1A3, C1A1, and C3A1, respectively) from t2 (wheat plants at the late epidemic stage) to t3 (wheat residues after interseasonal sexual reproduction) in 2018 and 2019.* The frequencies of pathogenic and non-pathogenic strains are indicated with grey and white bars, respectively, and the corresponding numbers appear in boxes. The effect of treatment (pure stands and cultivar mixtures) on the number of pathogenic strains was assessed by performing a χ^2, or Fisher's exact test when the expected numbers were small, with Bonferroni correction for pairwise comparisons (letters at the top of each bar). Changes in the number of pathogenic strains from t2 to t3 were calculated for each p_C and are represented with arrows (white for increases and green for decreases). Significant differences in the number of pathogenic strains from t2 to t3 within each treatment are indicated according to the results for the generalised linear model (*: $p < 0.05$).

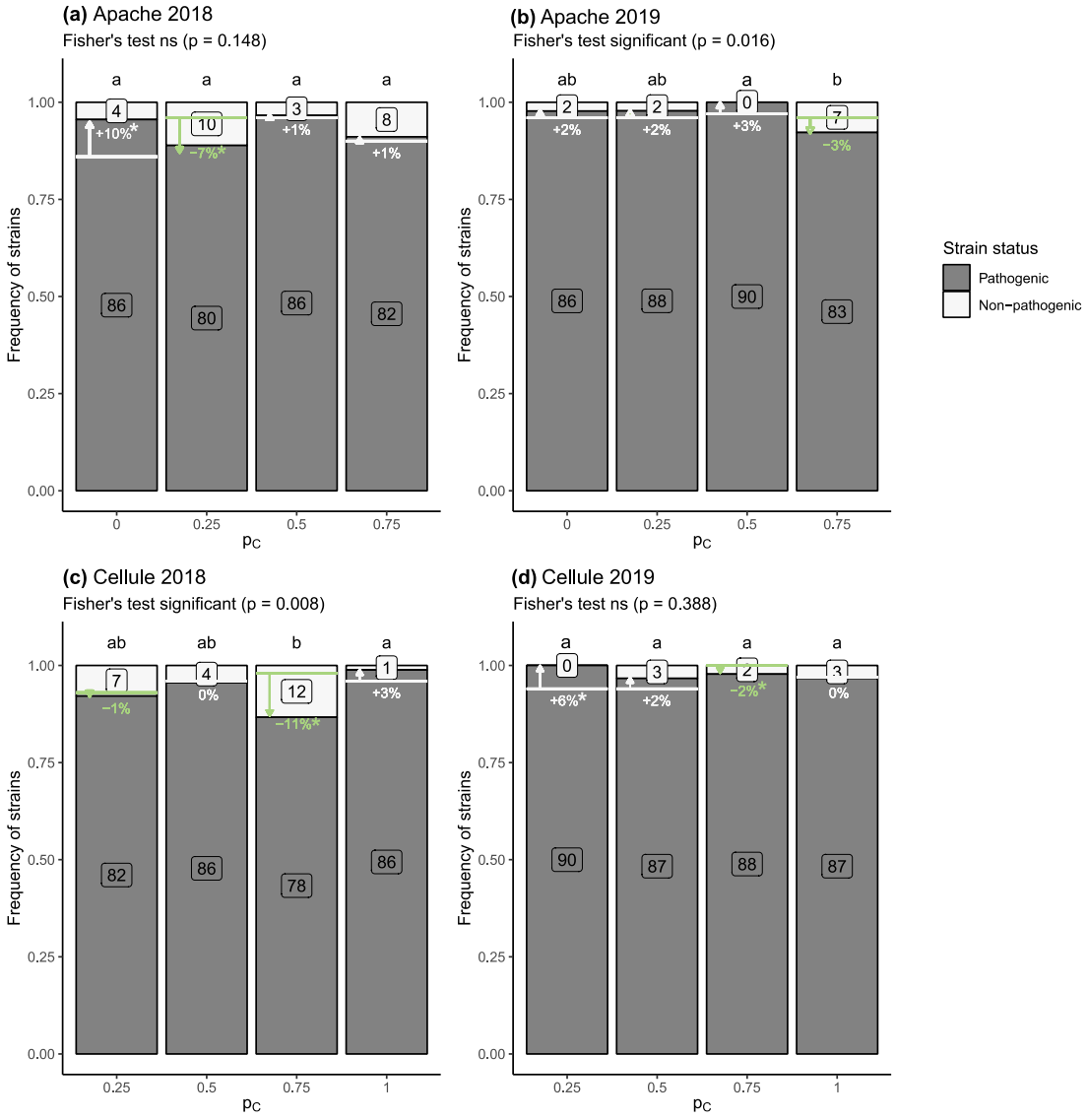
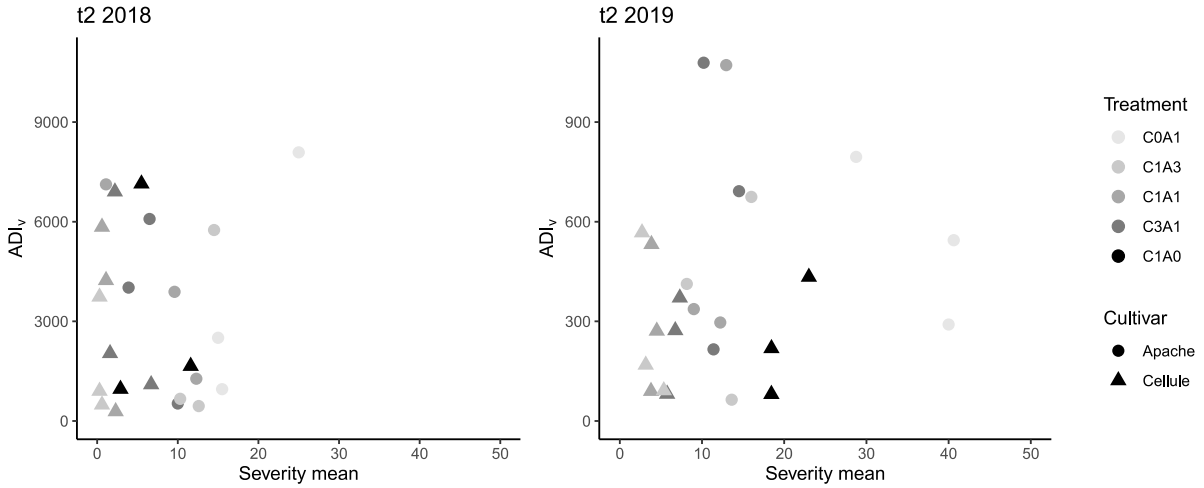


***Figure II.S2**. Relationship between the intensity of Zymoseptoria tritici sexual reproduction (ADI_v) on wheat residues during the interseason period (t3) and disease severity at the late stage of the epidemic (t2).* Disease severity was calculated in the field as the mean percentage of the leaf area covered with pycnidia, for flag leaves in 2018 and for the second and third leaves from the top in 2019. The intensity of sexual reproduction was estimated by calculating the ascospore discharge index (ADI; mean number of ascospores collected per 1 g of residues), for cv. Apache (red symbols) and for cv. Cellule (blue symbols), for each block. Symbols correspond to the different treatments (C0A1 and C1A0 for pure stands of Apache and Cellule, respectively; C1A3, C1A1 and C3A1 for the mixtures).



Supplementary Tables

Table II.S1. *Impact of the various experimental factors (year, cultivar, treatment, and block) on the intensity of Zymoseptoria tritici sexual reproduction estimated by the ascospore discharge index (ADI; mean number of ascospores collected per 1 g of residues), according to ANOVA.* The main effects and their interactions were tested and summarised based on their P values (F test).

Factor	Sum Sq	Degrees of freedom	F statistic	F test	Significance
year	41.683	1	155.168	< 0.001	***
cultivar	2.099	1	7.815	0.007	**
treatment	2.454	3	3.045	0.038	*
block	13.541	2	25.204	< 0.001	***
year x cultivar	0.483	1	1.798	0.186	ns
year x treatment	0.175	3	0.217	0.884	ns
cultivar x treatment	0.327	3	0.406	0.749	ns
year x block	7.174	2	13.354	< 0.001	***
cultivar x block	0.037	2	0.069	0.934	ns
treatment x block	5.698	6	3.536	0.006	**
year x cultivar x treatment	1.023	3	1.270	0.295	ns
year x cultivar x block	0.040	2	0.074	0.929	ns
year x treatment x block	3.084	6	1.914	0.098	.
cultivar x treatment x block	2.831	6	1.757	0.128	ns
year x cultivar x treatment x block	1.187	6	0.737	0.623	ns

***Table II.S2**. Impact of the various experimental factors (year, period, cultivar, treatment, and block) on the number of strains virulent against Stb16q (i.e., causing sporulating lesions on cv. Cellule) and pathogenic strains (i.e., causing sporulating lesions on cv. Apache) in Zymoseptoria tritici populations collected on Apache and Cellule in the field trial, estimated with a generalised linear model.* The main effects and their interactions were tested and summarised based on their P values (F test). The models were fitted to retain only the significant interactions.

Factor	LR Chisq	Degrees of freedom	Chisq probability	Significance
Number of virulent strains				
year	4.53	1	0.033	*
period	2.47	1	0.116	ns
cultivar	582.37	1	< 0.001	***
treatment	296.34	4	< 0.001	***
block	1.85	2	0.396	ns
period x cultivar	7.02	1	0.008	**
year x treatment	43.18	4	< 0.001	***
cultivar x treatment	5.38	2	0.068	.
period x block	6.01	2	0.050	*
period x cultivar x block	9.36	4	0.053	.
Number of pathogenic strains				
year	17.31	1	< 0.001	***
period	0.20	1	0.652	ns
cultivar	0.66	1	0.418	ns
treatment	7.02	4	0.135	ns
block	9.29	2	0.010	**
period x treatment	12.40	4	0.015	*
treatment x block	25.88	8	0.001	**
year x period x treatment	16.80	8	0.032	*
year x cultivar x treatment	16.72	5	0.005	**
period x cultivar x treatment	10.53	3	0.015	*
year x treatment x block	21.44	10	0.018	*

CHAPITRE III

Des scénarios multiples de croisements sexués chez *Z. tritici* sur résidus de culture : Quelles conséquences potentielles sur la transmission d'une virulence à l'échelle populationnelle ?

Multiple scenarios for sexual crosses in the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* on wheat residues: potential consequences for virulence gene transmission*

**article soumis à Fungal Genetics and Biology*

Orellana-Torrejon C[1,2], Vidal T[1], Gazeau G[1], Boixel A-L[1], Gélisse S[1], Lageyre L[2], Saint-Jean S[2], Suffert S[1], 2022c. Multiple scenarios for sexual crosses in the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* on wheat residues: potential consequences for virulence gene transmission. *bioRxiv*, 2022.02.24.481803.

[1]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UR BIOGER, Thiverval-Grignon, France
[2]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, Thiverval-Grignon, France

Abstract

Little is known about the impact of host immunity on sexual reproduction in fungal pathogens. In particular, it is unclear whether crossing requires both sexual partners to infect living plant tissues. We addressed this issue in a three-year experiment investigating different scenarios of *Zymoseptoria tritici* crosses on wheat according to the virulence ('vir') or avirulence ('avr') of the parents against a qualitative resistance gene. Co-inoculations ('vir × vir', 'avr × vir', 'avr × avr') and single inoculations were performed on a cultivar carrying the resistance gene (Cellule) and a susceptible cultivar (Apache), in the greenhouse. We assessed the intensity of asexual multiplication by scoring disease severity, and the intensity of sexual reproduction by counting the ascospores discharged from wheat residues. As expected, disease severity was more intense on Cellule for 'vir × vir' co-inoculations than for 'avr × vir' co-inoculations, with no disease for 'avr × avr'. However, all types of co-inoculation yielded sexual offspring, whether or not the parental strains caused plant symptoms. Parenthood was confirmed by genotyping (SSR markers), and the occurrence of crosses between (co-)inoculated and exogenous strains (other strains from the experiment, or from far away) was determined. We found that symptomatic asexual infection was not required for a strain to participate in sexual reproduction, and that avirulent strains could be maintained asymptomatically "on" or "in" leaf tissues of plants carrying the corresponding resistant gene for long enough to reproduce sexually. In two of the three years, the intensity of sexual reproduction did not differ significantly between the three types of co-inoculation in Cellule, suggesting that crosses involving avirulent strains are not anecdotal. We discuss the possible mechanisms explaining the maintenance of avirulence in *Z. tritici* populations and supporting the potential efficacy of cultivar mixtures for limiting resistance gene breakdown.

Key words: asexual multiplication, avirulence, infection, plant disease epidemiology, sexual reproduction, resistance breakdown

Introduction

Sexual reproduction drives genetic recombination in many phytopathogenic fungal populations (Ni *et al.*, 2011). It also plays an essential role in their interseason survival and, thus, in the multiannual recurrence of many plant disease epidemics (Burdon & Laine, 2019). It is widely believed that sexual reproduction in foliar pathogens requires "infection" — penetration and growth in the organs of a living host plant, including the appearance of symptoms — by both individual partners during an epidemic. Some host plants carry qualitative resistance genes that prevent or stop infection by pathogenic strains that are "avirulent" ('avr'), according to the "gene-for-gene" model (Dangl & Jones, 2001). Pathogenic "virulent" strains ('vir') able to infect these "resistant" plants can then reproduce sexually in host tissues, whereas avirulent strains, having been prevented from infecting the host plants, are presumed not to be able to engage in sexual reproduction. Avirulent strains are, therefore, thought to be progressively eliminated from host plans populations carrying the corresponding resistance gene. However, this assumption is simplistic, because the absence of infection (and, thus, of symptoms) does not necessarily prevent a physical encounter between sexual partners. Indeed, many fungal species reported to act as plant pathogens can also develop epiphytically, endophytically (causing an "asymptomatic infection"), or as saprotrophs on plant residues (Kerdraon *et al.*, 2019; Selosse *et al.*, 2018; Wheeler *et al.*, 2019). As pathogens can complete their life cycle without necessarily causing symptoms, it may be possible for avirulent strains to reproduce sexually on a host that they failed to infect. Clarification of this point is essential, not only from the standpoint of fungal genetics and biology, but also for epidemiology, as 'unexpected' sexual reproduction events may affect the ratio of virulent to avirulent strains in the offspring population developing on a cultivar considered resistant. Such events could affect the efficacy of the resistance gene and the durability of resistance deployment strategies.

There are still many gaps in our knowledge of the interactions between living plants and fungi during sexual reproduction in natural conditions, because of experimental difficulties promoting sexual reproduction in some of the organisms studied, and because of their ability to switch between lifestyles — epiphytic, endophytic and pathogenic — under changing environmental conditions (*e.g.*, Schulz & Boyle, 2005). Sexual reproduction in several fungi can be achieved under controlled conditions *in planta*, but also sometimes in dead plant tissues colonised in a saprophytic way, or in axenic conditions *in vitro*. The ease of crossing is heterogeneous in heterothallic species, which require two sexually compatible parental strains. For example, crosses were obtained for *Phaeosphaeria nodorum* on wheat residues (straw) by Halama &

Lacoste (1992), but the same authors were unable to obtain crosses of *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of Septoria tritici blotch (STB) in wheat under similar conditions. These difficulties do not necessarily reflect what happens in natural conditions. In several ascomycetes, the sexual form is cryptic or facultative, and therefore difficult to detect. For instance, the sexual form has never been identified for the rice pathogen *Magnaporthe oryzae* in natural conditions, whereas it can be obtained *in vitro* (Saleh *et al.*, 2012a, 2012b). Controlled crosses of *Venturia inaequalis* were first obtained on apple trees in the greenhouse by Keitt & Palmiter (1937), then on detached apple leaf discs by Ross & Hamlin (1962) and Martin *et al.* (1981), and, later, on artificial medium by Sierotzki & Gessler (1998). The causal agent of oilseed rape stem canker, *Leptosphaeria maculans,* was successfully crossed on artificial media (Shoemaker & Brun, 2011), but sexual reproduction *in planta* under controlled conditions was not achieved until recently (Bousset *et al.*, 2018). The physiological and cellular mechanisms occurring during sexual reproduction have been described in some model ascomycetes (*e.g. Neurospora crassa*; Brun *et al.*, 2021), but the interaction with the host plant remains poorly understood for biotrophic and hemibiotrophic plant pathogens.

Sexual reproduction helps maintain pathogen populations between epidemics and is involved in the interseason transmission of primary inoculum. It is, thus, essential to understand how plant host immunity affects this process and its consequences for a local pathogen population. The efficacy of strategies for controlling fungal plant pathogens through cultivar resistance is generally assessed at cropping-season scale. For this reason, the impact of host "immunity" on the sexual reproduction of the pathogen, which mainly occurs between cropping seasons, has been much less studied. Host-plant resistance could be considered as a form of stress, in which case it would be expected to increase sexual reproduction rates. However, contrasting results have been obtained for pathosystems in which this question has been addressed. *V. inaequalis* has been reported to grow and produce sexual fruiting bodies (pseudothecia) on pear and apple leaves, but its growth on different apple cultivars was not related to the susceptibility of these cultivars to apple scab (Ross & Hamlin, 1962). Conversely, Marcroft *et al.* (2004), Bousset *et al.* (2021) and Fortune *et al.* (2021) highlighted a significant effect of oilseed rape genotype on the density of *L. maculans* pseudothecia produced on crop residues. The intensity of sexual reproduction was shown to depend on disease severity at harvest, with higher stem canker severities leading to the production of more pseudothecia. A similar finding was reported for the hemibiotrophic pathogen *Z. tritici*: a positive correlation was found between the susceptibility of wheat cultivars, expressed as disease severity during the epidemic stage, and the intensity of sexual reproduction on wheat residues (Cowger *et al.*, 2002).

Such a correlation is not surprising, given that this fungus is heterothallic, the opposite mating types must come into contact for sex to occur (Kema *et al.*, 1996), and the two mating-type idiomorphs are consistently found to be evenly distributed, even at a fine scale (plant and field; Zhan *et al.*, 2002; Siah *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2019). However, data are lacking as to whether there is systematically a good match between the levels of host susceptibility at the asexual and sexual stages (Suffert *et al.*, 2016), apart from the empirical characterisation of density-dependent processes established by Suffert *et al.* (2018a). Moreover, it has been shown that a few days' difference in the latent periods of the strains, with one progressing faster than the other in wheat tissues, is slightly beneficial to ascosporogenesis, whereas a two- to three-week interval between infections with the two strains is detrimental (Suffert *et al.*, 2016). More generally, the conditions of asexual infection by two parental strains of *Z. tritici* affect the dynamics of sexual reproduction, but it remains challenging to identify these conditions and to decipher the mechanisms involved.

Genes conferring partial or complete resistance to an ascomycete pathogen on the host plant may also influence the intensity of the pathogen's sexual reproduction, thereby limiting the density of sexual fruiting bodies and/or ascosporogenesis. The production and release of smaller numbers of ascospores may be another immunity trait lowering disease severity during the early stages of the subsequent epidemic at least (*e.g.* Suffert & Sache, 2011), and ensuring better crop yields. This is an important point consider, although not the focus of this study. It would have epidemiological consequences, as highlighted by the trade-offs identified between crop infection and survival or the interseason transmission of primary inoculum in *Phytophthora infestans* (Pasco *et al.*, 2016), *Plasmopara viticola* (Delbac *et al.*, 2019) and *Z. tritici* (Suffert *et al.*, 2018b).

STB, one of the most important wheat diseases worldwide, is a suitable biological model for the investigation of these issues. The presence of *Stb* genes conferring resistance in wheat cultivars (Brown *et al.*, 2015) is known to determine the ability of virulent and avirulent strains to infect them. If we assume that only virulent strains can cross on a cultivar carrying a resistance gene, then the offspring would be exclusively virulent, resulting in the fixation of this virulence at a very high frequency, especially when the *Stb* gene is present in most, if not all of the cultivars widely deployed in a wheat production area. However, the epidemiological situation is more complex in the case of *Z. tritici*. For instance, the frequency of strains avirulent against *Stb6* remains at about 0.1, despite the widespread use of this resistance gene in wheat cultivars deployed in France (Saintenac *et al.*, 2018; Stephens *et al.*, 2021). Various processes,

such as the possibility of 'avr × vir' crosses on a cultivar carrying *Stb6,* could counter the generalisation of virulence. Indeed, Kema *et al.* (2018) established experimentally that such a cross can occur between a *Z. tritici* virulent strain successfully infecting host seedlings carrying the corresponding resistance gene and an avirulent strain unable to infect the host. This result should be interpreted in light of the 'epiphytic' growth of *Z. tritici*, which has recently been shown to occur for at least 10 days in specific humidity conditions (Fones *et al.*, 2017). A second potential mechanism should also be considered: the facilitation between co-infecting fungal strains demonstrated by Dutt *et al.* (2021), after a 'systemic induced susceptibility' (SIS) reaction (Seybold *et al.*, 2020) or 'neighbour-modulated susceptibility' (NMS) reaction (Pélissier *et al.*, 2021) for instance, in *Z. tritici*, with consequences modelled by Sofonea *et al.* (2017). These mechanisms, explaining the possible simultaneous co-infection of a plant by an avirulent and a virulent strain, are consistent with the presence of avirulent strains in STB lesions sampled from resistant cultivars (*e.g.* Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). Some authors have also suggested the possible induction of 'systemic acquired resistance' (SAR) or 'localised acquired resistance' (LAR) in other pathosystems (Costet *et al.*, 1999), although their studies focused on levels of aggressiveness (quantitative response) rather than virulence (qualitative response). Microscopy studies showed, for example, that the *Stb16q* gene stops the progression of avirulent *Z. tritici* strains 10 day after inoculation, either before their penetration through the stomata or in the substomatal cavities (Saintenac *et al.*, 2021). The physiological processes induced in such incompatible reactions merit exploration, as they may also explain the phenomenon of partial resistance against co-inoculation with virulent and avirulent strains. They could potentially decrease the severity of STB severity observed in co-infected wheat plants (Barrett *et al.*, 2021; Schürch & Roy, 2004). Other mechanisms should also be considered, such as crosses between non-infecting strains developing saprophytically on (or in) wheat residues (*i.e.* dead tissues). Crossing in such conditions has been reported for *P. nodorum* but has never been observed for *Z. tritici* (Halama & Lacoste, 1992).

In this experimental study, we investigated the diversity of scenarios in which *Z. tritici* sexual reproduction could occur in a wheat cultivar carrying an *Stb* resistance gene. Our goal was to determine whether: (i) strains that fail to infect wheat tissues during the asexual phase can reproduce sexually ("Who?"); (ii) sex can occur if one of the parental strains arrives on plant tissues later than the other, particularly after the senescence of these tissues ("When?"); (iii) the presence of parental strains in different proportions affects the intensity of sexual reproduction ("How?"). As a means of addressing the question "Do these situations actually lead to sexual crosses?", we

designed an experiment based on different crossing situations, with three types of co-inoculation ('vir × vir', 'avr × vir' and 'avr × avr') and the corresponding single inoculations (virulent, avirulent), involving multiple epidemiological processes (spore transfers between different types of wheat tissues and fungal growth conditions). Obtaining an answer to this question implied finding a balance between natural conditions allowing the processes to be expressed and controlled conditions managing and dissociating the processes considered, at least partially. We, thus, simplified the host-pathogen interactions, using only pairs of parental strains and two wheat cultivars, for which virulence (vir, avr) and resistance (R, S) status, respectively, were known.

Material and methods

Overall strategy

In this experiment, we inoculated adult wheat plants with and without a resistance gene with several virulent and avirulent *Z. tritici* strains in the greenhouse, to estimate the intensity of sexual reproduction by quantifying the offspring. We performed 'co-inoculations' with pairs of compatible parental strains and 'single inoculations' of each parent, to estimate the possibility of a strain crossing with an exogenous strain (used for another cross during the same experiment or from outside) in the various crossing situations. The experiment was replicated over three years (2018, 2019 and 2020). Each year, we performed 12 co-inoculations with eight parental strains, and eight single inoculations (Figure III.1). We tested three types of cross, defined in terms of the virulence status of the parental strains: both virulent ('vir × vir'), both avirulent ('avr × avr'), and one virulent and the other avirulent ('vir × avr'). All co-inoculations were performed with suspensions of equal proportions of blastospores from the two parental strains sprayed on adult wheat plants. Each year, additional co-inoculations were performed for one of the 'avr × vir' treatments, with unbalanced proportions for the biparental suspensions. Disease severity was assessed to estimate the intensity of asexual multiplication. Plants were left in the greenhouse and allowed to follow their natural development cycle until they had completely dried out. The resulting senescent plants, which were considered to be 'residues', were placed outdoors for several months, and the intensity of sexual reproduction was then estimated by quantifying ascospore discharge, as described by Suffert *et al.* (2016), for each crossing situation. Several offspring strains were sampled from some sets of residues and genotyped with 12 SSR markers (Gautier *et al.*, 2014) to check their 'parenthood': the genotypic profiles of the offspring were compared with those of the (co-)inoculated strains to determine

which strains had actually crossed, their status (virulent and/or avirulent) and their origin (inoculated and/or exogenous).

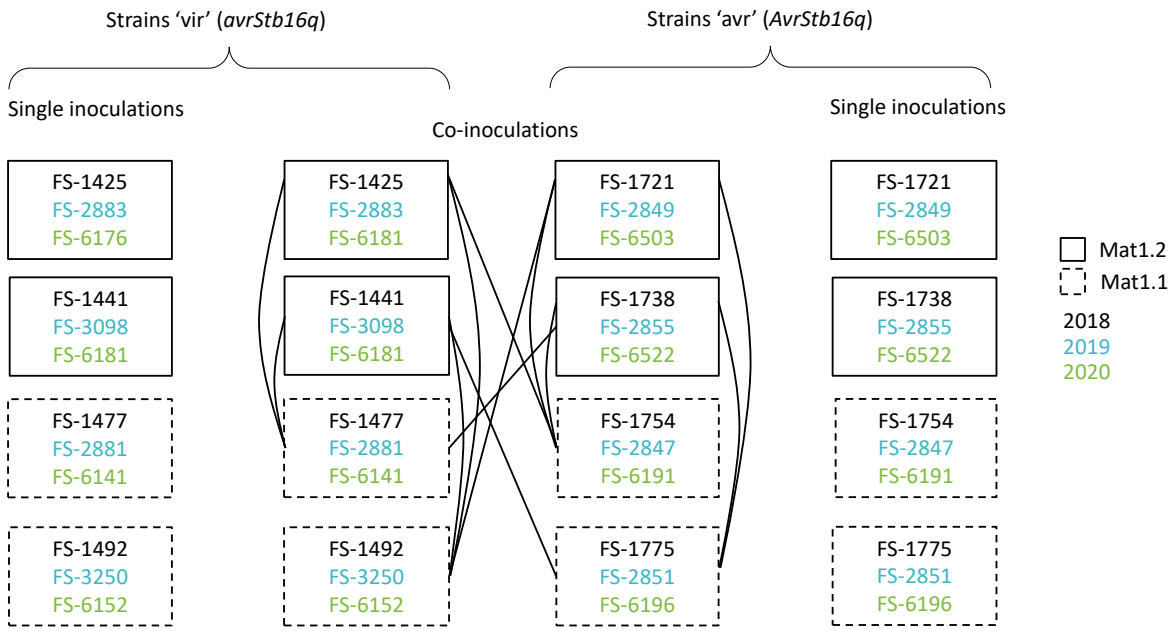


Figure III.1. *Design of the three-year experiment (2018, 2019, 2020) involving Zymoseptoria tritici strains virulent ('vir') and avirulent ('avr') against Stb16q.* Each adult wheat plant of cv. Apache or Cellule received the same number of blastospores, whether inoculated with one (eight single inoculations) or two strains (12 co-inoculations). All co-inoculations were performed with equiproportional biparental inoculum suspensions. For one of the 'avr × vir' co-inoculations (FS1425 × FS1754 in 2018, FS2883 × FS2847 in 2019, FS6176 × FS6191 in 2020), four additional co-inoculations were performed with biparental suspensions in unbalanced proportions (0.1- 0.9, 0.25-0.75, 0.75-0.25, and 0.9-0.1).

Plant material

We used cv. Cellule (Florimond Desprez, France) carrying the *Stb16q* resistance gene (Ghaffary *et al.*, 2012) for its resistance to STB and Apache (Limagrain Europe, France) for its susceptibility. Both cultivars have been widely grown in France in the last decade. A few years after the deployment of Cellule (2012), strains capable of overcoming *Stb16q* were detected. These strains now comprise a substantial proportion of *Z. tritici* populations in Europe (Kildea *et al.*, 2020; Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). Seeds of cv. Cellule and Apache were sown on 11th December 2018, 20th December 2019, and 9th December 2020, in peat pots (Jiffy). Seedlings were kept in greenhouse conditions for two weeks and were then vernalised in a growth chamber for 8 weeks at 8°C, with a 10-h light/14-h dark photoperiod. The plants were then returned to the greenhouse and left to acclimate for one week before transplantation into individual pots filled with 1 litre of commercial compost (Klasmann Peat Substrate 4; Klasmann France SARL,

France) supplemented with 4 g of slow-release fertiliser (Osmocote Exact 16-11-11N-P-K 3MgO Te) per pot. The plants were also watered with Hydrokani C2 fertiliser (Hydro Agri Spécialités, France) diluted 1:100 and poured into the saucers under the pots. During the growth period, the plants were illuminated with natural daylight supplemented with 400 W sodium vapour lamps. The air temperature was kept below 20°C during the 15-hour light period and above 15°C during the 9-hour dark period. Plants were thinned to three stems per pot during the growth period.

Fungal material

Each year, we selected eight strains (Figure III.1 and Table III.S1) from a *Z. tritici* population sampled from single pycnidium on cv. Cellule and Apache in pure-stand field trials in Grignon (France) in July 2017, July 2018, and June 2019 (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). The virulence status of these strains with respect to *Stb16q* was determined by phenotyping on wheat cv. Cellule seedlings. The sexual compatibility of the different pairs of strains was determined by PCR amplification of the two mating-type idiomorphs (Waalwijk *et al.*, 2002). Subcultures were grown for five days in Petri dishes containing PDA (potato dextrose agar, 39 $g \cdot L^{-1}$) at 18 °C in the dark. Blastospore suspensions of each strain were prepared as described by Suffert *et al.* (2013). The inoculum concentration was adjusted to 5×10^5 $conidia \cdot mL^{-1}$ with a Malassez counting chamber, and two drops of surfactant (Tween 20; Sigma, France) were added. Biparental suspensions containing a Mat1.1 strain and a Mat1.2 strain were prepared by mixing 15 mL of each of the monoparental suspensions for the equiproportional combination (0.5-0.5). For the non-equiproportional combinations (unbalanced proportions: 0.1-0.9, 0.25-0.75, 0.75-0.25, and 0.9-0.1), the appropriate volumes of each suspension were combined to achieve a total volume of 30 mL.

Inoculation procedure

An atomiser (Ecospray, VWR, France) was used to apply each blastospore suspension onto three adult plants (nine stems) for biparental suspensions and two adult plants (six stems) for monoparental suspensions, after the wheat heads had fully emerged (on 27th April 2018, 30th April 2019, and 19th April 2020), as described by Suffert *et al.* (2013). Plants were turned during the 10-second spraying event, to ensure even coverage with inoculum. Infection was promoted by enclosing each duo or trio of plants in a transparent polyethylene bag containing a small amount of distilled water for 72 h. The wheat plants were kept in a greenhouse for about 11-12 weeks until they had completely dried out (from 27th April to 12th July 2018, 30th April to 9th July 2019, and 19th April to 8th July 2020). Air temperature was kept above 24 °C during this period. In

2020, three adult plants each of Apache and Cellule were used as non-inoculated control plants.

Assessment of the intensity of asexual multiplication

We estimated the intensity of asexual multiplication, by determining the percentage of the leaf area covered by pycnidia (1, 2, 3 and 5%, and increments of 5% thereafter up to 100%; Suffert *et al.,* 2013) for the two uppermost leaves of each stem of the inoculated plants, between five and six weeks after inoculation (on 15th June 2018, 5th June 2019, and 29th May 2020). Mean disease severity was, thus, calculated with 18 replicates for co-inoculations and 12 replicates for single inoculations. In the third year, an additional assessment was performed eight weeks after inoculation (on 8th June 2020) on some of the leaves of cv. Cellule (co-)inoculated with avirulent strains, on which some sporulating lesions appeared very late (a few days before leaf senescence). The 17 strains collected from pycnidia in these lesions were genotyped, for comparison with the parental strains used in the experiment.

Promotion of sexual reproduction

After the stems and leaves had completely dried out, the wheat plants were placed outdoors during the summer and autumn, to induce the formation of pseudothecia and promote ascosporogenesis. In 2018, each duo or trio of plants was tied up with stiff wire, with the stems and leaves clamped, and placed about 10 cm away from the nearest neighbouring duo or trio, to reduce contact with these other groups of plants (from 12th July 2018 to 16th January 2019; 'arrangement A' in Figure III.2A). In 2019 and 2020, the plants of each duo or trio were cut and grouped into small bundles, hung on a fence and spaced about 30 cm apart to ensure that contact between bundles was totally prevented (from 9th July 2019 to 21st January 2020 and from 22nd July 2020 to 21st December 2021; 'arrangement B' in Figure III.2B). Each duo or trio of plants was considered to constitute a 'set of residues'. After several weeks of exposure to outdoor weather conditions, the senescent leaves and stems from each set of residues were cut into 2 cm segments and left to dry in a laboratory atmosphere at 18 °C for one week.

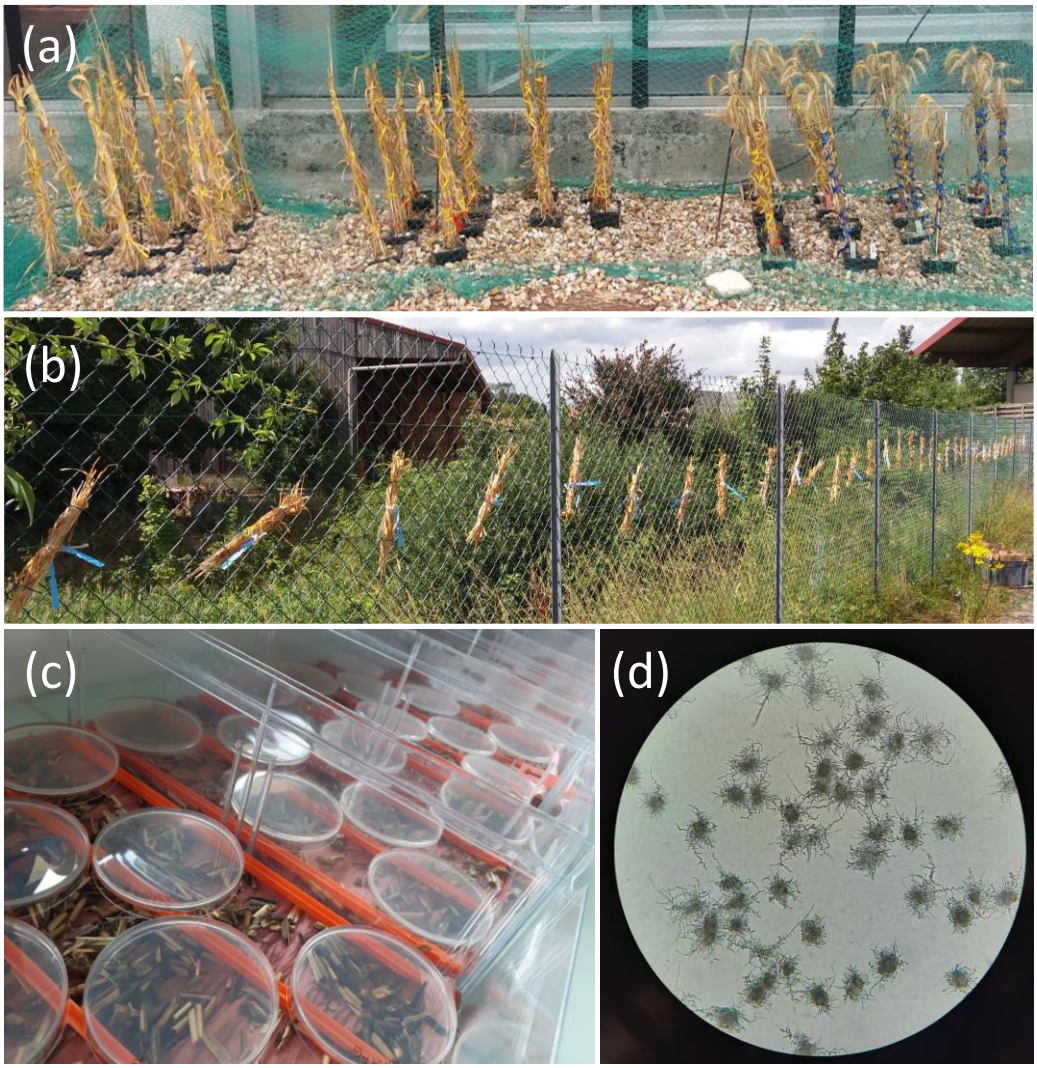


***Figure III.2**. Management of sets of wheat residues, from the induction of Zymoseptoria tritici pseudothecia to the assessment of sexual reproduction intensity.* **(a)**. Dry wheat plants placed outdoors (2018; 'arrangement A'), which led to the residues partially falling on each other. **(b)**. Bundles of dry wheat plants hung on a fence (2019, 2020; 'arrangement B'), with no possibility of direct contact. **(c)**. Petri dishes containing PDA medium placed upside down above wheat residues to collect *Z. tritici* ascospores. **(d)**. Ascospore-derived colonies on PDA at the time of counting, *i.e.*, four days after discharge.

Assessment of the intensity of sexual reproduction

We estimated the intensity of sexual reproduction by evaluating ascospore discharge events in residue samples split in two series (16th and 17th January 2019, 22nd and 23rd January 2020, and 8th and 14th January 2021). Each set of residues was weighed, soaked in water for 20 min and spread on dry filter paper in a box (24 × 36 cm), the lid of which was left half-open to decrease the relative humidity of the air around the residues. Eight Petri dishes (90 mm in diameter) containing PDA medium were placed upside down 1 cm above the residues and left in the dark at 18 °C for 18 h (Figure III.2C). The dishes

were then closed and incubated in the same conditions for five days. The number of ascospore-derived colonies (Figure III.2D and III.S1) was estimated by eye to calculate a cumulative ascospore discharge index (ADI; ascospores·g^{-1}), defined as the total number of ascospores discharged per gramme of wheat residues, which we used as a proxy for sexual reproduction intensity (Suffert *et al.*, 2018a, 2016, 2011).

Genotyping

We sampled 278 offspring strains from different ascospore-derived colonies obtained from nine single inoculations (±10 strains sampled for each) and 11 co-inoculations (±20 strains sampled for each) in 2018, 2019 and 2020. The parenthood of the offspring strains was established by genotyping the 278 offspring strains and the 24 strains used for (co-)inoculation and assumed to be their parents (Table III.S1). We used 12 SSR markers (AC0002-ST4, AG0003-ST3A, CT0004-ST9, TCC0009-ST6, AC0001-ST7, GCA0003-ST3C, chr_02-140-ST2, GAC0002-ST1, GGC0001-ST5, CAA0003-ST10, TCC0002-ST12, CAA0005-ST3B) from the panel developed by Gautier *et al.*, (2014). The genotyping profiles of the offspring and parental strains were analysed with Peak Scanner software v2.0 (Applied Biosystems). We then compared these profiles, using a decision tree designed specifically for this purpose (Figure III.S2). The actual parental strains could be the strains used to inoculate the corresponding plants, other strains used to inoculate other plants during the experiment (evidence of a cross with exogenous strains from neighbouring sets of residues; 'exo-IN' in Table III.2), or other strains not used in the experiment (evidence of a cross with exogenous strains from outside the experiment; 'exo-OUT' in Table III.2). If all 12 SSR markers for a strain matched those of the strains used for inoculation, we considered those strains to be the true parents. However, as several of the 12 alleles are very common in natural *Z. tritici* populations, the probability of one of the parents actually being exogenous was extremely low but not zero. By contrast, if at least one of the markers in an offspring strain did not match the strains used for inoculation, we could be sure that one of the actual parents was exogenous. The 'degree of exogeneity' of the actual parental strains was estimated by considering the status of all genotyped offspring sampled for a given (co-)inoculation. This indicator is expressed as the percentage of offspring strains with at least one parent different from the strains used for inoculation.

We also genotyped 11 strains sampled from late asexual lesions observed on Cellule (pycnidiospores) after 'avr × avr' co-inoculations and six observed after single inoculations with different avirulent strains, to identify the strains responsible for these lesions.

Statistical analysis

All data analyses were performed with R software (v4.0.2 R Core Team 2012). The variables used to assess the intensity of asexual and sexual reproduction were non-normally distributed, as revealed by Shapiro-Wilk tests ('shapiro.test' function). We analysed the results of co-inoculations separately from those of single inoculations, due to a difference in the number of replicates. We, therefore, performed Kruskal-Wallis tests (*agricolae* R package, 'kruskal' function) for all statistical analyses concerning co-inoculations, and Wilcoxon tests (*rstatix* R package, 'wilcox_test' function) for all statistical analyses concerning single inoculations. Both tests were followed, when necessary, by Bonferroni corrections for pairwise comparisons, due to the high stringency of this method (*P* value threshold at 0.05). We estimated the impact on disease severity and ADI of the type of co-inoculation ('vir × vir', 'avr × avr' and 'avr × vir') and virulence status, for single inoculations. To this end, we first separately assessed the effects of year (2018, 2019, 2020) and cultivar (Apache, Cellule) on the two aforementioned variables, and checked for an absence of potential two-way interactions between factors. We used Benjamini & Hochberg correction for pairwise comparisons to prevent the overestimation of mean differences. For ADI, we split the data into two groups ('arrangement A' in 2018; 'arrangement B' in 2019 and 2020). We also compared the effects of single and co-inoculations on ADI and assessed the effect of the proportion of the virulent strain in the biparental 'avr × vir' suspensions (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 0.9) on ADI and disease severity.

We used a linear model to analyse the potential correlation between the intensity of asexual multiplication and the intensity of sexual reproduction. The variance of disease severity was partitioned into sources attributable to the following factors and their interactions: ADI, the cultivar inoculated (Apache, Cellule), the type of co-inoculation and year. The model was fitted by removing non-significant interactions and we used the adjusted R^2 to evaluate the state of the correlation.

Results

Intensity of asexual multiplication resulting from single inoculations and co-inoculations

On Apache, all single inoculations caused symptoms (Figure III.S3), with significant differences in mean disease severity between strains ($p < 0.001$, Kruskall-Wallis test, data not shown). Disease severity per type of co-inoculation was scored 35 to 80% in 2018 and 2019 and 30 to 50% in 2020 (Figure III.3 and Table III.S2).

On Cellule, only single inoculations of virulent strains caused symptoms (Figure III.S3). We observed only rare lesions caused by single inoculations of avirulent strains (Table III.S2). Disease severity measured after 'vir × vir' and 'vir × avr' co-inoculations on Cellule was rated from 9% to 64% (Table III.S2) and was, on average, lower than that on Apache ($p < 0.001$, Wilcoxon test). As expected, no disease was observed on Cellule after 'avr × avr' co-inoculations (Figure III.3 and Figure III.S3).

Mean disease severity on Apache and Cellule differed significantly between years ($p < 0.01$ for both single inoculations and co-inoculations, Kruskal-Wallis test), which can be explained by the difference in disease-scoring dates between years.

Unexpectedly, some rare lesions (isolated sporulating lesions) were observed late on Cellule in 2020, eight weeks after inoculation, *i.e.*, long after the main disease assessment (Figure III.4). These lesions appeared in single inoculations with three different avirulent strains (FS6196, FS6503 and FS6191) and after 'avr × avr' co-inoculation. The genotyping of strains sampled from these asexual lesions (pycnidiospores) showed that almost all (16/17) had the same genotyping profile as one of the strains used to inoculate the plant (Table III.1 and III.S3). The remaining strain had the same genotyping profile as another strain used in the experiment (FS6181) and might have resulted from of a unique contamination event in the greenhouse.

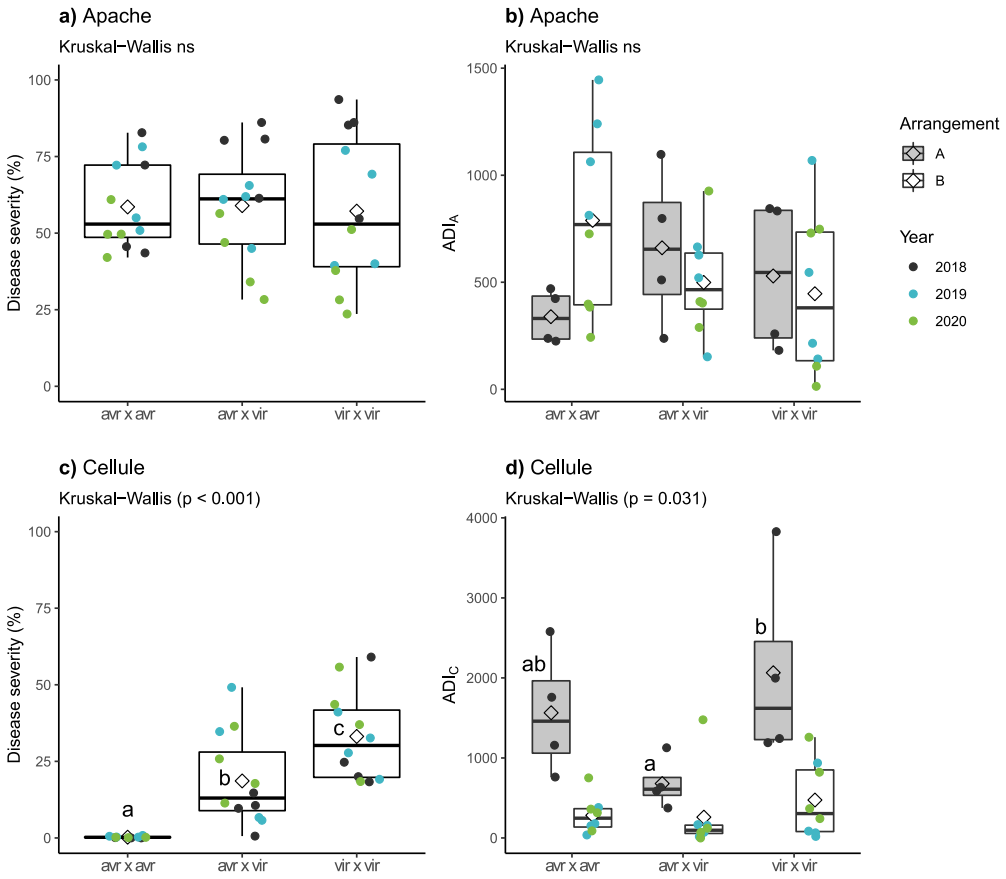


Figure III.3. *Impact of virulence status with respect to Stb16q of the Zymoseptoria tritici strains used for co-inoculation ('avr × avr', 'avr × vir', 'vir × vir') on the intensity of asexual multiplication (expressed as disease severity) and the intensity of sexual reproduction (expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues; ADI) by cultivar (Apache, Cellule) and the arrangement of the different sets of residues ('arrangement A' in Figure III.2A; 'arrangement B' in Figure III.2B) during the three-year experiment.* Kruskal-Wallis tests, with Bonferroni correction for pairwise comparisons, were performed to compare the types of co-inoculation by cultivar and arrangement.

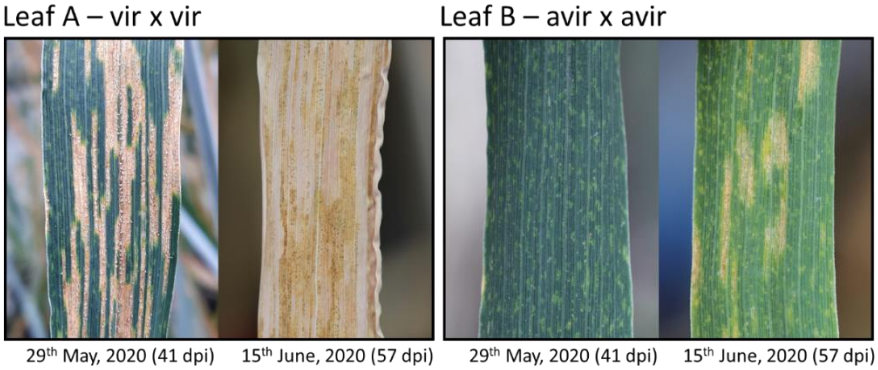


Figure III.4. *Contrasted timing of lesion appearance on adult wheat plants of cv. Cellule in 2020: five vs. eight weeks after co-inoculation. Flag leaves of Cellule were co inoculated with either two virulent strains (Leaf A, FS6503 × FS619) or with two avirulent strains (Leaf B, FS6176 × FS6191).*

Table III.1. *Identification of 17 Zymoseptoria tritici strains causing late lesions on wheat plants of cv. Cellule, 8 weeks after (co-)inoculation (June 15th, 2020), based on the comparison of their genotyping profiles with those of the 8 strains used for co-inoculation.* The genotyping profiles, established with 12 SSR markers from the panel developed by Gautier *et al.* (2014), are presented in Table III.S3. Sampled strains that did not match the strains used for (co-)inoculation are indicated by *.

Cv.	Strains used for (co-)inoculation		Number of strains sampled	Identity of strains sampled
Cellule	FS6503 (avr[1])	-	1	FS6181 (× 1) *
Cellule	FS6191 (avr)	-	4	FS6191 (× 4)
Cellule	FS6196 (avr)	-	1	FS6196 (× 1)
Cellule	FS6503 (avr)	FS6191 (avr)	3	FS6191 (× 3)
Cellule	FS6503 (avr)	FS6196 (avr)	3	FS6196 (× 3)
Cellule	FS6522 (avr)	FS6191 (avr)	2	FS6191 (× 2)
Cellule	FS6522 (avr)	FS6196 (avr)	3	FS6196 (× 3)

[1] 'avr' for avirulent against *Stb16q*

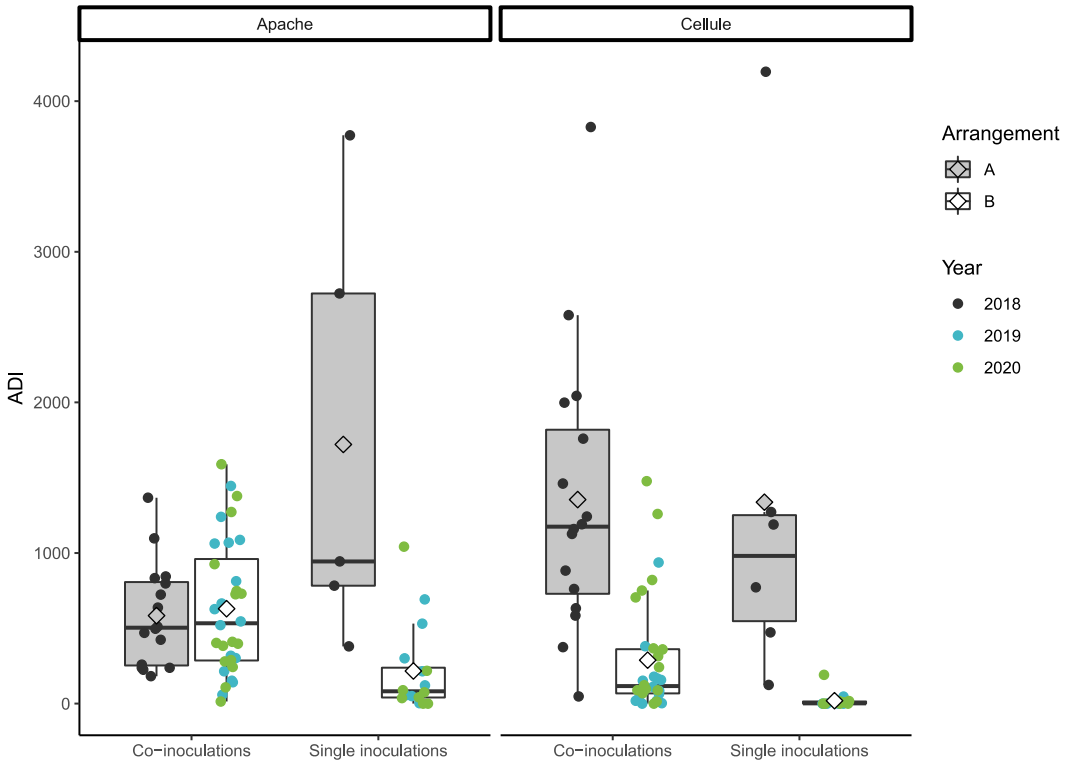


Figure III.5. *Impact of the type of inoculation (single inoculations, co-inoculations) on the intensity of Zymoseptoria tritici sexual reproduction (expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues; ADI), by cultivar (Apache, Cellule) and the arrangement of the different sets of residues ('arrangement A' in Figure III.2A; 'arrangement B' in Figure III.2B) during the three-year experiment.* Kruskal-Wallis tests, with Bonferroni correction for pairwise comparisons, were performed to compare the types of co-inoculation by cultivar and arrangement.

Intensity of sexual reproduction and genotyping of offspring resulting from co-inoculations

Overall, the intensity of sexual reproduction depended on cultivar in 2018 and 2019 (p = 0.002, Wilcoxon), on year for Cellule (p < 0.001, Kruskal-Wallis test; Figure III.5), and on the type of co-inoculation, as described below for each cultivar.

On Apache, we obtained offspring strains for all type of co-inoculations ('vir × vir', 'avr × avr' and 'avr × vir') as expected, regardless of the virulence or avirulence status of parental strains (Figure III.5 and Table III.S4). The intensity of sexual reproduction on this cultivar was not dependent on the virulence status of the parental strains: there were no significant differences in mean ascospore discharge index (ADI) between the three types of co-inoculation (Figure III.5 and Table III.S4). This is not surprising, as the virulence status of strains is relevant only for Cellule, the cultivar carrying the corresponding resistance gene.

On Cellule, we obtained offspring strains for 'vir × vir' co-inoculations, as expected, but also for 'vir × avr' and even for 'avr × avr' co-inoculations (Figure III.3). The intensity of sexual reproduction depended on the virulence status of the parental strains: ADI was higher for 'vir × vir' than for 'vir ×x avr' and 'avr ×x avr' inoculations, with significant differences only in 2018 (p = 0.031, Kruskal-Wallis; Figure III.5 and Table III.S4).

The analysis of genotyping data for offspring strains sampled from Cellule residues confirmed that the parental strains actually involved in sexual reproduction were very probably the strains used for inoculation (Table III.2, Table III.S3 and Figure III.S2A). Few cases were identified in which at least one of the actual parental strains was not among those used for inoculation (mean degree of exogeneity of the parental strains: 5% for all co-inoculations). The genotyping results demonstrate that an avirulent strain present asymptomatically on a plant (without causing sporulating lesions five weeks after inoculation) could cross with a virulent strain (infecting). For instance, two 'vir × avr' co-inoculations, FS2883 × FS2847 in 2018 and FS6181 × FS6196 in 2020, produced offspring for which we genotyped a sample (20 and 25 strains, respectively): all alleles of the 12 SSR markers for all offspring strains matched those of the parental strains used for co-inoculation (no exogeneity of the parental strains; Table III.2). Moreover, genotyping demonstrated that two avirulent strains present asymptomatically on a plant — at least five to six weeks after inoculation — were also able to cross. This is the most striking finding of this study. The 'avr × avr' co-inoculations, FS2851 × FS2855 and FS2849 × FS2847 in 2019 and FS6503 × FS6196 and FS6522 × FS6196 in 2020 all produced offspring strains in which all alleles of the 12 SSR markers matched those of the parental strains used for co-inoculation (no

exogeneity of the parental strains; Table III.2). The genotyping results for the offspring strains from the 'vir × avr' co-inoculations FS1492 × FS1721 and FS1425 × FS1754 in 2018 and the 'avr × avr' co-inoculation FS1721 × FS1754 are consistent with the results reported above, even though the degree of exogeneity of the parental strains was non-null (mean value of 16%; Table III.2). Four of the 51 offspring strains genotyped resulted from a cross between one of the parents used for co-inoculation and another parental strain used in the experiment ('exo-IN'), and three resulted from a cross between one of the parental strains used for co-inoculation and a strain from outside the experiment ('exo-OUT'; Table III.2). The parental strains displayed a higher degree of exogeneity in 2018 (Table III.2), probably due to the difference in the arrangement of the residues between this and the other two years (Figure III.2A and III.2B).

Intensity of sexual reproduction and genotyping of offspring resulting from single inoculations

Another key finding of this study was that offspring strains could be obtained following single inoculations, whereas plants not inoculated in 2020 (controls) produced no offspring. At first sight, this result is surprising, as it shows that sexual reproduction does not necessarily require inoculation with the two parental strains such that they are present in or on (growing epiphytically) the host tissues whilst the plant is growing. Surprising as it may seem, this result was obtained in each of the three years (Table III.2, Figure III.5). The "unexpected" crosses can be explained by the arrival of "exogenous" strains on residues (after the senescent plants were placed outside) from neighbouring sets of residues for the strains used in the experiment ('exo-IN') and from residues present in fields away from the experimental site ('exo-OUT'). In 2018, most of the offspring strains obtained after the inoculation of Cellule with a single avirulent strain (FS1754) were considered to result from a cross between the strain used for inoculation and another parental strain used in the experiment (Table III.S3 and Figure III.S2A). This can be explained by the difference in the arrangement of the residues (A vs. B; Figure III.2). This result is particularly surprising given that the avirulent parental strain used for inoculation produced no symptoms on the plant during the asexual stage. In 2019 and 2020, despite the distancing of residues, offspring strains were obtained after single inoculations, whatever the cultivar or the virulence status of the strain used for inoculation. We genotyped 42 and 21 offspring strains sampled from residues of Apache after single inoculation with a virulent or avirulent strain, respectively. We found that 36 (86%) and 18 (86%) offspring strains, respectively, could be considered to result from a cross between the strain used for inoculation and another parental strain used in the experiment ('exo-IN'), and that 4 (10%) and 2 (10%),

respectively, resulted from a cross between the inoculated strain and strain from outside the experiment ('exo-OUT'; Table III.2, Figure III.S2B). For the remaining cases (two and one, respectively), the genotyping profiles of the offspring strains matched those of the strains used for inoculation, and we cannot, therefore, conclude on the origin of the exogenous parent ('exo-IN' or 'exo-OUT'). On Cellule, 29 of the 33 offspring strains sampled after single inoculation with a virulent strain (88%) were considered to result from a cross between the inoculated strain and another of the parental strains used in the experiment. The remaining four strains (12%) had the same genotyping profile as the strain inoculated, and it was not, therefore, possible to draw any conclusions about the origin of the exogenous parent (Table III.2, Figure III.S2B).

The intensity of sexual reproduction was lower after single inoculations than after co-inoculations in 2019 and 2020 (Figure III.5). Support for the role of non-inoculated strains (arriving on host tissues after the plant was fully senescent) in successful crosses is provided by the observation that the intensity of sexual reproduction in single inoculations was dependent on year (p = 0.056 for avirulent strains in Apache and p = 0.002 in Cellule, Kruskal-Wallis test).

***Table III.2**. Parenthood of 278 Zymoseptoria tritici offspring strains sampled from ascospore-derived colonies obtained after nine single inoculations and 11 co-inoculations (a subset of all the inoculations performed in the three-year experiment).* Parenthood was established by comparing the genotypic profiles of the 278 strains with those of the three sets of eight strains used for (co-)inoculation, based on the decision tree presented in Figure III.S2. The genotypic profiles, established with 12 SSR markers from the panel developed by Gautier et al. (2014), are presented in Table III.S3.

Type of inoculation	Year	Cv. [1]	(Co-)inoculated strain(s) [2]		Intensity of asexual multiplication [3]	Intensity of sexual reproduction [4]	Number of genotyped offspring strains	Number of offspring strains per parental origin [5]				'Degree of exogeneity' of the parental strain(s) [6]
								'inoc'	'exo-IN'	'exo-OUT'	NA	
Co-inoculation	2018	CEL	FS1721 (avr)	FS1754 (avr)	0.1	1034	10	7	1	2	0	30%
		CEL	FS1492 (vir)	FS1721 (avr)	10.6	663	21	18	3	0	0	14%
		CEL	FS1425 (vir)	FS1754 (avr)	14.7	220	20	19	0	1	0	5%
	2019	CEL	FS3250 (vir)	FS2883 (vir)	27.8	551	20	20	0	0	0	0%
		CEL	FS2883 (vir)	FS2847 (avr)	34.7	98	20	20	0	0	0	0%
		CEL	FS2851 (avr)	FS2855 (avr)	0.3	224	20	20	0	0	0	0%
		CEL	FS2849 (avr)	FS2847 (avr)	0.6	89	20	20	0	0	0	0%
	2020	CEL	FS6181 (vir)	FS6141 (vir)	32.8	740	26	26	0	0	0	0%
		CEL	FS6181 (vir)	FS6196 (avr)	19.4	868	25	25	0	0	0	0%
		CEL	FS6503 (avr)	FS6196 (avr)	0.1	442	22	20	0	0	2	(0%)
		CEL	FS6522 (avr)	FS6196 (avr)	0.0	212	24	24	0	0	0	0%
Single inoculation	2018	CEL	FS1754 (avr)	-	0.0	454	10	1	9	0	0	-
	2019	APA	FS3098 (vir)	-	21.5	407	10	0	10	0	0	-
		APA	FS3250 (vir)	-	23.8	312	10	1	9	0	0	-
		APA	FS2851 (avr)	-	67.1	177	10	0	8	2	0	-
		CEL	FS3250 (vir)	-	11.5	28	10	4	6	0	0	-
	2020	APA	FS6181 (vir)	-	44.5	613	11	0	11	0	0	-
		APA	FS6141 (vir)	-	33.1	52	11	1	6	4	0	-
		APA	FS6196 (avr)	-	40.4	128	11	0	10	0	1	-
		CEL	FS6181 (vir)	-	21.7	112	23	0	23	0	0	-

[1] CEL for Cellule, APA for Apache.
[2] 'vir' for virulent against *Stb16q* and 'avr' for avirulent against *Stb16q*.
[3] disease severity, expressed as the mean percentage of the leaf area displaying sporulation on the two uppermost leaves of adult wheat plants five weeks after inoculation.
[4] number of ascospores discharged per gramme of residues (ADI).
[5] number of offspring strains for which it is certain that at least one parental strain was not among those used to inoculate the adult wheat plants in the greenhouse, *i.e.* has an exogenous origin: 'inoc' when we considered the two parental strains to be those used for co-inoculation; 'exo-IN' when we considered that at least one parental strain was another strain used in the experiment (evidence of a cross with an exogenous strain from a neighbouring sets of residues); 'exo-OUT' when we considered that at least one parental strain was not a strain used in the experiment (evidence of a cross with an exogenous strain from outside the experiment); 'NA' for non-assigned, when it was not possible to conclude (see decision trees in Figure III.S2).
[6] number of genotyped offspring strains / ('exo-IN' + 'exo-OUT') × 100, in parenthesis when few strains were non-assigned.

Impact of diverse factors on the intensity of sexual reproduction

Impact of environmental conditions — As highlighted above, the intensity of sexual reproduction was significantly dependent on year, with higher values for 'avr × avr' co-inoculations in Apache in 2018 (p = 0.023, Kruskal-Wallis) and for 'vir × vir' and 'avr × avr' co-inoculations in Cellule in 2018 than for the corresponding co-inoculations in 2019 and 2020 (p = 0.03, p = 0.02, respectively, Kruskal-Wallis; Table III.S4). This was also the case for single inoculations in Apache and Cellule in 2018 (p = 0.011 and p = 0.002, respectively, Kruskal-Wallis). The impact of year is consistent with the difference in the arrangement of the sets of residues (A vs. B): "cross-contaminations" between sets of residues were frequent in 2018, when the arrangement of residues made physical contact possible, but were more limited in 2019 and 2020, when the sets of residues were placed further apart. The intensity of sexual reproduction was higher in field conditions in 2018 than in 2019, and this may be attributed to differences in climatic conditions, as highlighted in a previous study (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a).

Impact of the proportions of the parental strains — The intensity of sexual reproduction (ADI) was not significantly affected by the proportion (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, and 0.9) of the virulent parental strain in the three pairs of 'avr × vir' strains tested, whatever the wheat cultivar, probably because of the small number of replicates and the high variability of ADI (Table III.S5). ADI was higher on Apache than on Cellule (p = 0.025 Wilcoxon test), with no significant difference between years in any cultivar, and it tended to be higher for Cellule in 2018 (p = 0.086, Kruskal-Wallis test), when 'arrangement A' was applied. By grouping similar unbalanced proportions (group 1/10, combining the 0.1-0.9 and 0.9-0.1; group 1/4 combining 0.25-0.75 and 0.75-0.25), we

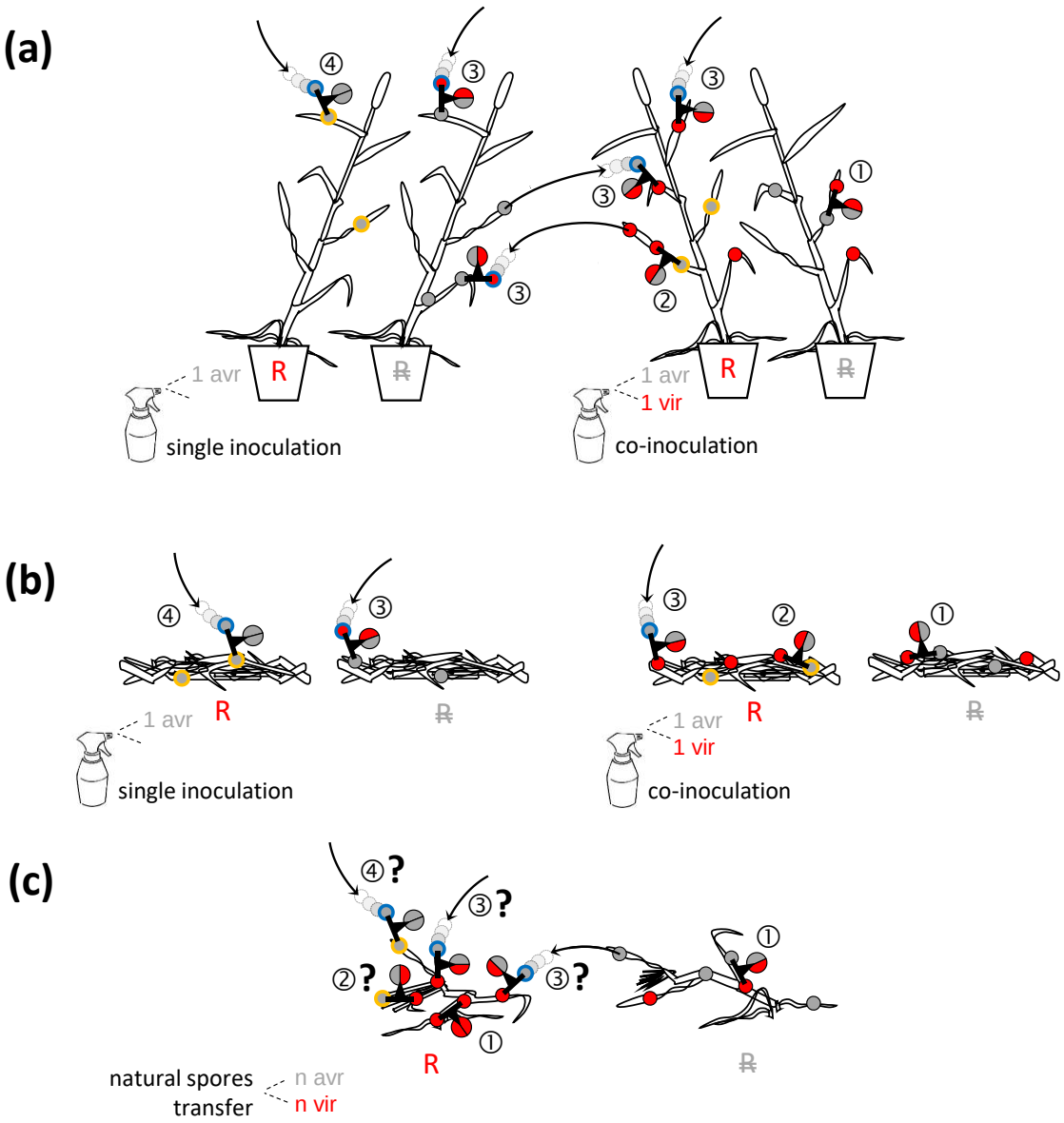
found that the intensity of sexual reproduction after co-inoculation in unbalanced proportions was higher than that when parental strains were used in equal proportions for co-inoculation (0.5-0.5), whatever the cultivar. As expected, disease severity on Apache did not differ with the proportion of the virulent parental strain (Table III.S6), whereas disease severity increased significantly with the proportion of the virulent strain on Cellule.

Discussion

"Unexpected" crosses of avirulent strains in plants carrying S*tb16q*: from experimental findings to explanatory hypotheses

We showed that sexual reproduction between virulent ('vir') and avirulent ('avr') strains is possible in a wheat cultivar carrying the corresponding resistance gene, here *Stb16q* (process ② in Figure III.6; see also Figure III.5 and III.S3, Table III.2). This finding is consistent with the results obtained by Kema *et al.* (2018) in a similar experiment in which all *Z. tritici* crosses on seedlings of a cultivar carrying *Stb6* were successful even if one of the parental strains was avirulent, with no pathogenic relationship to the wheat cultivar used. More unexpectedly, we found that two avirulent strains could cross without causing symptoms in plants, five weeks after their use for co-inoculation (see below). For several crossing situations (Table III.2 and Figure III.S2), we established by genotyping that the strains used for co-inoculation could be considered to be the actual parents, even if the host-pathogen interaction during the asexual stage was "incompatible". As a means of understanding the mechanisms underlying the 'vir' × 'avr' and 'avr × avr' crosses, we focused on the rare symptoms (Figure III.4B) observed on Cellule late after inoculation in 2020, with an origin — the strains used for inoculation — confirmed by genotyping (Table III.1). The immunity conferred by *Stb16q* throughout growth of the wheat plants prevented complete infection until the appearance of lesions by limiting pathogen progression in the substomatal cavities or the apoplast (Saintenac *et al.*, 2021). We hypothesize that this type of immunity ceased to operate just before plant senescence, allowing the pathogen to colonise the host tissues more deeply in some areas of the leaf and leading to the appearance of a few isolated lesions (Figure III.4D). This observation of late symptoms is also consistent with the epiphytic development and/or survival of *Z. tritici* on the surface of leaves, as reported by Fones *et al.* (2017).

This epiphytic development may be explained by specific experimental conditions in the greenhouse: application of a high concentration of inoculum on the leaf surface and favourable conditions for fungal growth over an extended period of time. This phenomenon could however happen in the field: 3.3% of the strains sampled on Cellule grown in mixture with Apache, from STB lesions, were found to be avirulent against *Stb16q* (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). The success of 'vir × avr' crosses (process ② in Figure 6) can be also explained by the hypothesis that penetration of the avirulent strain was favoured by a virulent strain that had previously infected the host tissues (Tollenaere *et al.*, 2016). Facilitation mechanisms of this type have been reported in multiple infections in some pathosystems. For example, the initial arrival of a virulent strain of *Blumeria graminis* on a host plant can suppress resistance, enabling subsequently arriving avirulent strains to penetrate host tissues (Lyngkjær *et al.*, 2001). The possibility of infection by "stowaway" strains through a 'systemic induced susceptibility' reaction was experimentally proposed for *Z. tritici* by Seybold *et al.* (2020) and recently discussed by Barrett *et al.* (2021). This hypothesis is consistent with the intensity of sexual reproduction tending to be higher for unbalanced proportions of the two parental strains, as observed in our study (see 4.4), which could promote the penetration of the avirulent strain. However, this finding requires experimental confirmation and should, therefore, be interpreted with caution.



Example of crossing

parental strain#1 (vir)

parental strain#2 (avr)

→ offspring strains (mixture vir + avr)

Origin of the parental strains

- Strain that infected living host tissues (symptomatic asexual multiplication)
- Strain that grew only epiphytically on living host tissues (until their senescence at least) or infected living tissues through 'stowaway effect'
- Strain that landed on host residues, i.e. already dead tissues (pycnidiospore splash-dispersed from neighbouring residues or long-distance wind-dispersed ascospore), and grew saprophytically

***Figure III.6**. Epidemiological processes, including spore transfers, leading to sexual crosses on wheat residues according to the origin of the Zymoseptoria tritici parental strains and their virulence status, **(a**, **b)** in the conditions of the three-year experiment and **(c)** in field conditions.* Each crossing event is characterised by cultivar — with or without a resistant gene R (Cellule R, Apache ~~R~~) — where the cross occurs, the virulence status ('vir', 'avr') of the parental strains, and the status of the offspring. Four crossing scenarios are proposed according to the origin and type of growth of the parental strains: ① both parents (virulent strains) infect independently living tissues; ② one parent (virulent strain, acting as the maternal parent) infects living tissues whereas the other parent (avirulent strain) grows asymptomatically, possibly epiphytically, penetrates living tissues superficially and growth only in the apoplast (asymptomatic infection), or co-infects as a 'stowaway' taking advantage of the infection with the other strain; ③ one parent (virulent strain) infects living tissues whereas the other parent (virulent or avirulent strain) arrives later on residues from a neighbouring set of residues (pycnidiospores; possible in **a** and **c**, but not possible in **b**) or after covering a longer distance (ascospores; possible in **a**, **b**, **c**) and then grows saprophytically; ④ one parent (avirulent strain) grows asymptomatically, possibly epiphytically, whereas the other parent (virulent or avirulent strain) arrives later on residues from a neighbouring set of residues (pycnidiospores; possible in **a** and **c**, but not possible in **b**) or after covering a longer distance (ascospores; possible in **a**, **b**, **c**) and then grows saprophytically.

Parental strains do not necessarily need to infect their living host to reproduce sexually: the epidemiological processes potentially involved

Debuchy *et al.* (2010) suggested that the physical proximity of parental strains might be sufficient to induce the development of reproductive organs when abiotic conditions are optimal, in a manner dependent on the pathogenic fungi concerned. The recognition of sexually compatible strains is based on the reception of pheromones for heterothallic fungi (Ni *et al.*, 2011). There is, therefore, no evidence that sexual reproduction consistently requires at least one of the two parents to infect the living host tissues until the appearance of symptoms. The "unexpected" crossing situations highlighted in this study support this assumption and suggest that avirulent strains may have developed on leaves, possibly epiphytically or may have penetrated the host tissues only superficially (Fones *et al.*, 2017; Fantozzi *et al.*, 2021). Microscopy studies showed that avirulent strains are able to germinate and penetrate into resistant plants tissues (Cohen & Eyal, 1993; Shetty *et al.*, 2003) but that the infection process is then blocked: pathogen can growth in the apoplast and plant cells are not penetrated. The resistance based on major resistance genes active against apoplastic fungal pathogens is not actually associated with fungal death (Stotz *et al.*, 2014), supporting the idea that avirulent strains may survive in resistant host tissues. Saintenac *et al.* (2021) provided experimental evidence of this for *Stb16q*: they detected fungal biomass 21 days after the inoculation of a resistant cultivar with an avirulent strain of *Z. tritici*, despite the absence of symptoms due to host-pathogen incompatibility. The results obtained by

Kema *et al.* (2018) for *Z. tritici,* focusing on *Stb6,* suggest that the "female" parental strain must infect the host tissues to form maternal ascogonia: the skew in the segregation of mitochondrial SSRs (and, thus, an unbalanced ratio for maternal or paternal parenthood) obtained after co-inoculations showed that the avirulent parent was almost exclusively the paternal parent. This finding is consistent with hypothetical process ③ in Figure III.6. However, as we obtained crosses on Cellule after single inoculations with avirulent strains (not only in 2018, but also, to a lesser extent, in 2019 and 2020; Figure III.5 and Table III.S4), it remains possible that ascogonia were also formed on senescent tissue after the maternal strain had grown saprophytically (process ④ in Figure III.6).

Our results also suggest that the second exogenous parental (probably paternal) strain arrived later, on senescent tissues, when the set of residues had been placed outdoors, and that it grew saprophytically before crossing. Sexual reproduction may, therefore, have been initiated relatively late, at a stage equivalent to the interseason period in field conditions. Furthermore, this scenario is the only one capable of explaining the crosses observed following inoculation with a single virulent or avirulent strain (processes ③ and ④, respectively, in Figure III.6; Figure III.5 and Table III.2). The exogenous parental strain may have come from: (i) pycnidiospores transferred from neighbouring residues by rainsplash or direct physical contact (which was possible in the 2018 arrangement), or (ii) ascospores dispersed by the wind from field residues farther away in 2019 and 2020. Further experiments are required to validate processes ② ③ ④ in addition to the classical process ① for each crossing situation. For instance, the direct inoculation of residues with the second parental strain (or both parental strains) might make it possible to demonstrate the ability of a strain to undergo sexual reproduction after growing saprophytically, as for *Phaeosphaeria nodorum* (Halama & Lacoste, 1992). Cytological analyses would be relevant, but complex to perform on senescent tissues. The current state of knowledge and hypotheses about sexual reproduction are consistent with the hemibiotrophic status of *Z. tritici* and a necrotrophic status for *P. nodorum*, although the lifestyles of these function have been defined to date on the sole basis of analyses of the asexual stage (Sanchez-Vallet *et al.*, 2015).

Relationship between the intensity of asexual multiplication and the intensity of sexual reproduction

We found no correlation (R^2 = 0.38) between the intensity of asexual multiplication and the intensity of sexual reproduction (Figure III.S3). Suffert *et al.* (2018a) highlighted a significant positive correlation for disease severity scores that were lower (from 10% to 40%) than those reported here (35% to 80% on Apache), despite the similar

experimental conditions. In this study, disease severity levels were high enough to maximize physical contact between the two parental strains, but also to induce a decrease in the intensity of sexual reproduction ('density-dependent' processes), as previously shown by Suffert *et al.* (2018a).

No significant impact of the proportions of parental strains

We found no significant impact of the proportions of parental strains on the intensity of sexual reproduction (Table III.S4). The trend obtained by grouping similar parental ratios (1/10 and 1/4) is however consistent with the increase in the intensity of sexual reproduction highlighted by Suffert *et al.* (2016) when parental strains had latent periods differing by a few days. This trend requires confirmation in future experiments.

Epidemiological consequences for avirulent strains reproducing sexually on resistant cultivars: a possibility that could be exploited to limit the breakdown of a resistance gene?

By contrast to our findings, all crosses involving two avirulent parental strains failed in the study by Kema *et al.* (2018). These divergent results may be explained by differences in the plant stages considered: adult plants treated until natural senescence and with a long crossing time in our study, versus seedlings and a short crossing time in the study by Kema *et al.* (2018). Moreover, we found that the most classical scenario of 'vir × vir' crosses (process ① in Figure III.6) and the "unexpected" 'vir × avr' and 'avr × avr' scenarios on plants carrying a resistance gene generated offspring populations of similar sizes. Thus, not only can avirulent strains reproduce sexually, but they can also produce substantial numbers of ascospores. This finding conflicts with the paradigm that avirulent strains tend to be eliminated from a population because they do not infect the host, and cannot therefore reproduce and contribute to subsequent epidemics, at least in agrosystems characterised by monovarietal fields. In fact, avirulence genes can be transmitted to the next generation even in a wheat canopy considered resistant. This can temporally affect the local evolution of the pathogen population and, hence, the dynamics of resistance breakdown. The extent of resistance breakdown should depend: (i) on the number of avirulent strains arriving on the cultivar carrying the resistance gene, and (ii) the available opportunities for encountering and crossing with other strains. 'Vir × avr' and 'avr × avr' crosses are probably rare in pure stands (the lower the frequency of avirulent strains in the pathogen population, the rarer), but their frequency could be enhanced by certain resistance deployment strategies. For instance, the use of cultivar mixtures would increase the exposure of plants carrying a resistance gene to the corresponding avirulent strains, due to the presence of neighbouring susceptible plants on which these strains would be then able

to multiply asexually. Orellana-Torrejon *et al.* (2022a, 2022b) highlighted a consequence of this phenomenon in the field: the frequency of avirulent *Z. tritici* strains was higher after sexual reproduction on the residues of a resistant wheat cultivar grown in a mixture than after sexual reproduction on the residues of a pure stand, providing experimental evidence of an "overtransmission" of avirulence to the next epidemic season. Cultivar mixtures, therefore, appear to be a promising way to exploit the epidemiological consequences of avirulent strains crossing on resistant cultivars for limiting the breakdown of resistance genes.

Conclusion

The selection pressure exerted on pathogen populations by the deployment of a resistance gene in fields planted with a single cultivar promotes the generalisation of virulent strains (Brown & Tellier, 2011). Virulence is, theoretically, accompanied by a fitness cost (Burdon & Laine, 2019). One would think that this advantage for avirulent strains might be compensated by their inability to persist in pathogen populations over a long period of time, which is rarely documented in literature (see for instance Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a). The experimental findings presented here challenge partly this assumption. The hypothetical epidemiological processes we propose can explain the diversity of possible crossing scenarios (detailed in Figure III.6) contributing to the maintenance of avirulence in *Z. tritici* populations. Epi-evolutionary models incorporating sexual reproduction should take the diversity of these scenarios into account, to improve our understanding of their impact on the transmission of avirulence in pathogen populations (Fabre *et al.*, 2022; Rimbaud *et al.*, 2021), particularly when the aim is to compare different deployment strategies for cultivar resistances at large spatiotemporal scales.

Funding

This research was supported by a grant from the *Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale* (FSOV PERSIST project; 2019-2022) and by a PhD fellowship from the French Ministry of Education and Research (MESR) awarded to Carolina Orellana-Torrejon for the 2018-2022 period. The BIOGER laboratory also receives support from Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Acknowledgements

We thank Marie-Pierre Guillot (AgroParisTech BIOGER, Thiverval-Grignon, FR), Nathalie Retout and Laurent Gerard (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for technical assistance, Dr. Cyrille Saintenac (INRAE GDEC, Clermont-Ferrand, FR), Dr. Romain Valade (ARVALIS-Institut du Végétal, Boigneville, FR) and Dr. Marc-Henri Lebrun (INRAE BIOGER, Thiverval-Grignon, FR) for sharing information and relevant suggestions throughout this project. We also thank Dr. Julie Sappa for her help correcting our English.

Data Availability Statement

The raw data used for the analysis of the intensity of asexual multiplication and the intensity of sexual reproduction of *Z. tritici* are available from the INRAE Dataverse online data repository (https://data.inrae.fr/) at https://doi.org/10.15454/IPMIOX

References

Barrett LG, Zala M, Mikaberidze A *et al.*, 2021. Mixed infections alter transmission potential in a fungal plant pathogen. *Environmental Microbiology* **23**, 2315–2330.

Bousset L, Ermel M, Lebreton L, 2018. The full life cycle of *Leptosphaeria maculans* completed on inoculated oilseed rape incubated under controlled conditions. *Plant Pathology* **67**, 1321–1328.

Bousset L, Vallée P, Delourme R, Parisey N, Palerme M, Leclerc M, 2021. Besides stem canker severity, oilseed rape host genotype matters for the production of *Leptosphaeria maculans* fruit bodies. *Fungal Ecology* **52**, 101076.

Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C, 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 33–41.

Brown JKM, Tellier A, 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 345–367.

Brun S, Kuo H-C, Jeffree CE, Thomson DD, Read N, 2021. Courtship ritual of male and female nuclei during fertilization in *Neurospora crassa*. *Microbiology Spectrum*.

Burdon JJ, Laine A-L, 2019. *Evolutionary dynamics of plant-pathogen interactions*. Cambridge: Cambridge University Press.

Costet L, Cordelier S, Dorey S, Baillieul F, Fritig B, Kauffmann S, 1999. Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): hr is necessary for lar to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger lar. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* **12**, 655–662.

Cowger C, McDonald BA, Mundt CC, 2002. Frequency of sexual reproduction by *Mycosphaerella graminicola* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 1175–1181.

Dangl JL, Jones JDG, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.

Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P, 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. John Wiley & Sons, Ltd, 499–535.

Delbac L, Delière L, Schneider C, Delmotte F, 2019. Evidence for sexual reproduction and fertile oospore production by *Plasmopara viticola* on the leaves of partially resistant grapevine cultivars. *Acta Horticulturae*, 607–620.

Dutt A, Anthony R, Andrivon D *et al.*, 2021. Competition and facilitation among fungal plant parasites affect their life-history traits. *Oikos* **n/a**.

Fones HN, Eyles CJ, Kay W, Cowper J, Gurr SJ, 2017. A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal genetics and biology: FG & B* **106**, 51–60.

Fortune JA, Qi A, Ritchie F, Karandeni-Dewage CS, Fitt BDL, Huang Y, 2021. Effects of cultivar resistance and fungicide application on stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*) and potential interseasonal transmission of *Leptosphaeria* spp. inoculum. *Plant Pathology* **n/a**.

Gautier A, Marcel TC, Confais J *et al.*, 2014. Development of a rapid multiplex SSR genotyping method to study populations of the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Research Notes* **7**, 373.

Ghaffary SMT, Faris JD, Friesen TL *et al.*, 2012. New broad-spectrum resistance to Septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 125–142.

Halama P, Lacoste L, 2011. Déterminisme de la reproduction sexuée du *Phaeosphaeria (Leptosphaeria) nodorum* agent de la septoriose du blé. II. Action de la température et de la lumière. *Canadian Journal of Botany*.

Keitt GW, Palmiter DH, 1937. Heterothallism in *Venturia inaequalis*. *Science* **85**, 498–498.

Kema GHJ, Mirzadi Gohari A, Aouini L *et al.*, 2018. Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nature Genetics* **50**, 375–380.

Kema GHJ, Verstappen ECP, Todorova M, Waalwijk C, 1996. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* **30**, 251–258.

Kerdraon L, Laval V, Suffert F, 2019. Microbiomes and pathogen survival in crop residues, an ecotone between plant and soil. *Phytobiomes Journal* **3**, 246–255.

Lyngkjær MF, Carver TLW, Zeyen RJ, 2001. Virulent *Blumeria graminis* infection induces penetration susceptibility and suppresses race-specific hypersensitive resistance against avirulent attack in Mla1 -barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 243–256.

Marcroft SJ, Sprague SJ, Salisbury PA, Howlett BJ, 2004. Potential for using host resistance to reduce production of pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of Brassica napus. *Plant Pathology* **53**, 468–474.

Martin D, Olivier J-M, Lespinasse Y, 1981. Obtention in vitro de périthèces de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.; application à l'analyse de la résistance au bénomyl acquise au verger. *Agronomie* **1**, 745–750.

Morais D, Duplaix C, Sache I, Laval V, Suffert F, Walker A-S, 2019. Overall stability in the genetic structure of a *Zymoseptoria tritici* population from epidemic to

interepidemic stages at a small spatial scale. *European Journal of Plant Pathology* **154**, 423–436.

Ni M, Feretzaki M, Sun S, Wang X, Heitman J, 2011. Sex in Fungi. *Annual Review of Genetics* **45**, 405–430.

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Boixel A-L, Gélisse S, Saint-Jean S, Suffert F, 2022a. Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: A compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology* **71**, 289–303.

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Saint-Jean S, Suffert F, 2022b. Does the impact of cultivar mixtures on virulence dynamics in *Zymoseptoria tritici* populations persist after interseason sexual reproduction? , 2022.01.24.477584.

Pasco C, Montarry J, Marquer B, Andrivon D, 2016. And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans*. *The New Phytologist* **209**, 334–342.

Ross RG, Hamlin SA, 1962. Production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) wint. on sterile apple leaf discs. *Canadian Journal of Botany* **40**, 629–635.

Saintenac C, Cambon F, Aouini L *et al.*, 2021. A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against Septoria tritici blotch. *Nature Communications* **12**, 433.

Saintenac C, Lee W-S, Cambon F *et al.*, 2018. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* **50**, 368-374.

Saleh D, Milazzo J, Adreit H, Tharreau D, Fournier E, 2012a. Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of in vitro experimental evolution assays. *Bmc Evolutionary Biology* **12**, 42.

Saleh D, Xu P, Shen Y *et al.*, 2012b. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology* **21**, 1330–1344.

Sanchez-Vallet A, McDonald MC, Solomon PS, McDonald BA, 2015. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* **79**, 29–32.

Schulz B, Boyle C, 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**, 661–686.

Schürch S, Roy BA, 2004. Comparing single- vs. mixed-genotype infections of *Mycosphaerella graminicola* on wheat: effects on pathogen virulence and host tolerance. *Evolutionary Ecology* **18**, 1–14.

Selosse M-A, Schneider-Maunoury L, Martos F, 2018. Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist* **217**, 968–972.

Seybold H, Demetrowitsch TJ, Hassani MA *et al.*, 2020. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nature Communications* **11**, 1–12.

Shoemaker RA, Brun H, 2011. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany*.

Siah A, Tisserant B, El Chartouni L *et al.*, 2010. Mating type idiomorphs from a french population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biology* **114**, 980–990.

Sierotzki H, Gessler C, 1998. Inheritance of virulence of *Venturia inaequalis* toward Malus×Domestica cultivars. *Journal of Phytopathology* **146**, 509–514.

Sofonea MT, Alizon S, Michalakis Y, 2017. Exposing the diversity of multiple infection patterns. *Journal of Theoretical Biology* **419**, 278–289.

Stephens C, Ölmez F, Blyth H *et al.*, 2021. Remarkable recent changes in the genetic diversity of the avirulence gene AvrStb6 in global populations of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology* **22**, 1121–1133.

Stotz HU, Mitrousia GK, de Wit PJGM, Fitt BDL, 2014. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* **19**, 491–500.

Suffert F, Delestre G, Carpentier F *et al.*, 2016. Fashionably late partners have more fruitful encounters: Impact of the timing of co-infection and pathogenicity on sexual reproduction in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* **92**, 40–49.

Suffert F, Delestre G, Gélisse S, 2018a. Sexual reproduction in the fungal foliar pathogen *Zymoseptoria tritici* is driven by antagonistic density dependence mechanisms. *Microbial Ecology* **77**, 110–123.

Suffert F, Goyeau H, Sache I *et al.*, 2018b. Epidemiological trade-off between intra- and interannual scales in the evolution of aggressiveness in a local plant pathogen population. *Evolutionary Applications* **11**, 768–780.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2011. Early stages of Septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–177.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**, 1330–1341.

Tollenaere C, Susi H, Laine A-L, 2016. Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in Plant Science* **21**, 80–90.

Waalwijk C, Mendes O, Verstappen ECP, de Waard MA, Kema GHJ, 2002. Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf

blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **35**, 277–286.

Wheeler DL, Dung JKS, Johnson DA, 2019. From pathogen to endophyte: an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. *New Phytologist* **222**, 497–510.

Zhan J, Kema GHJ, Waalwijk C, McDonald BA, 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology* **36**, 128–136.

Supplementary Figures

Figure III.S1. *Clusters of Zymoseptoria tritici ascospore-derived colonies photographed seven days after ascospore ejection*. **(A)** Little or no contamination; a few, distant, non-coalescent *Z. tritici* colonies of similar size, easy to identify and count. **(B)** Possible confusion between *Z. tritici* colonies (see **F**) and white bacterial or yeast colonies (see **G**). **(C)** Invasion of the plate by fast-growing fungi or bacteria covering all or part of the cluster of *Z. tritici* colonies. **(D)** Coalescence of *Z. tritici* colonies when cluster density is very high, precluding automated counting approaches based on image analysis. **(E)** High-density effect leading to different colony diameters, hindering automated area measurement approaches based on image analysis with software.

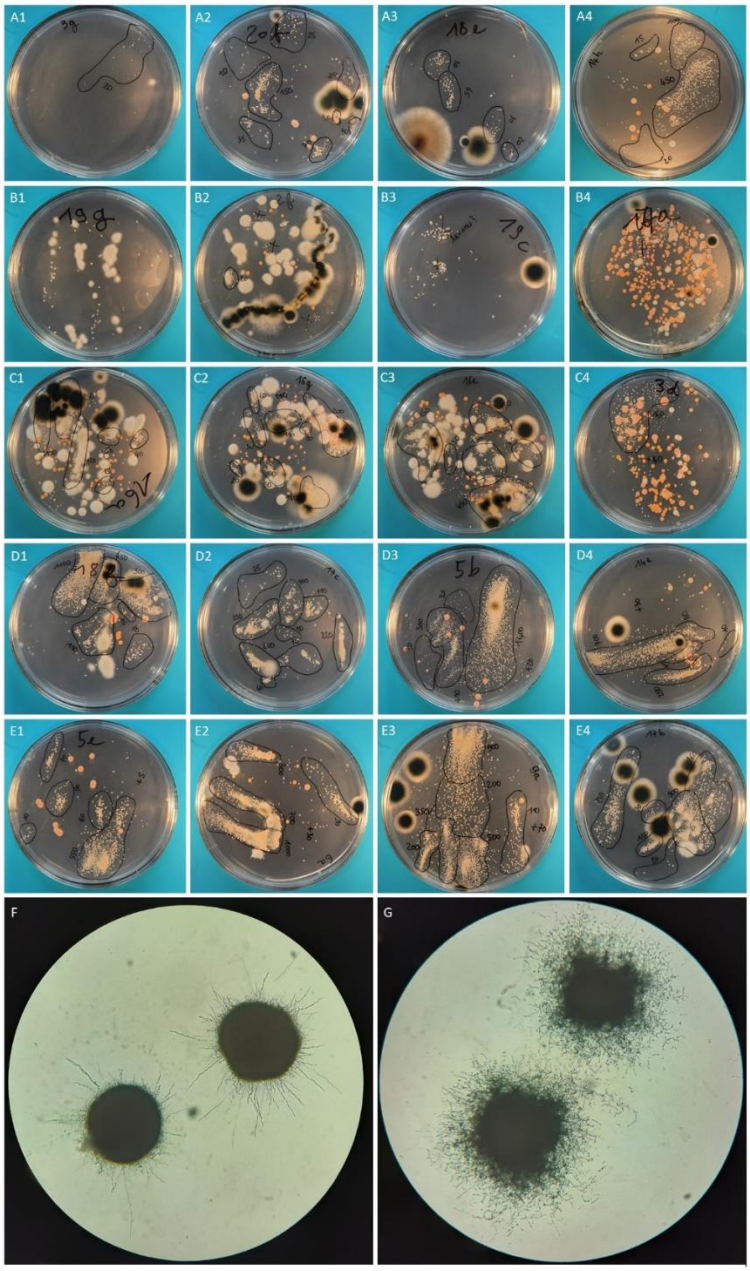
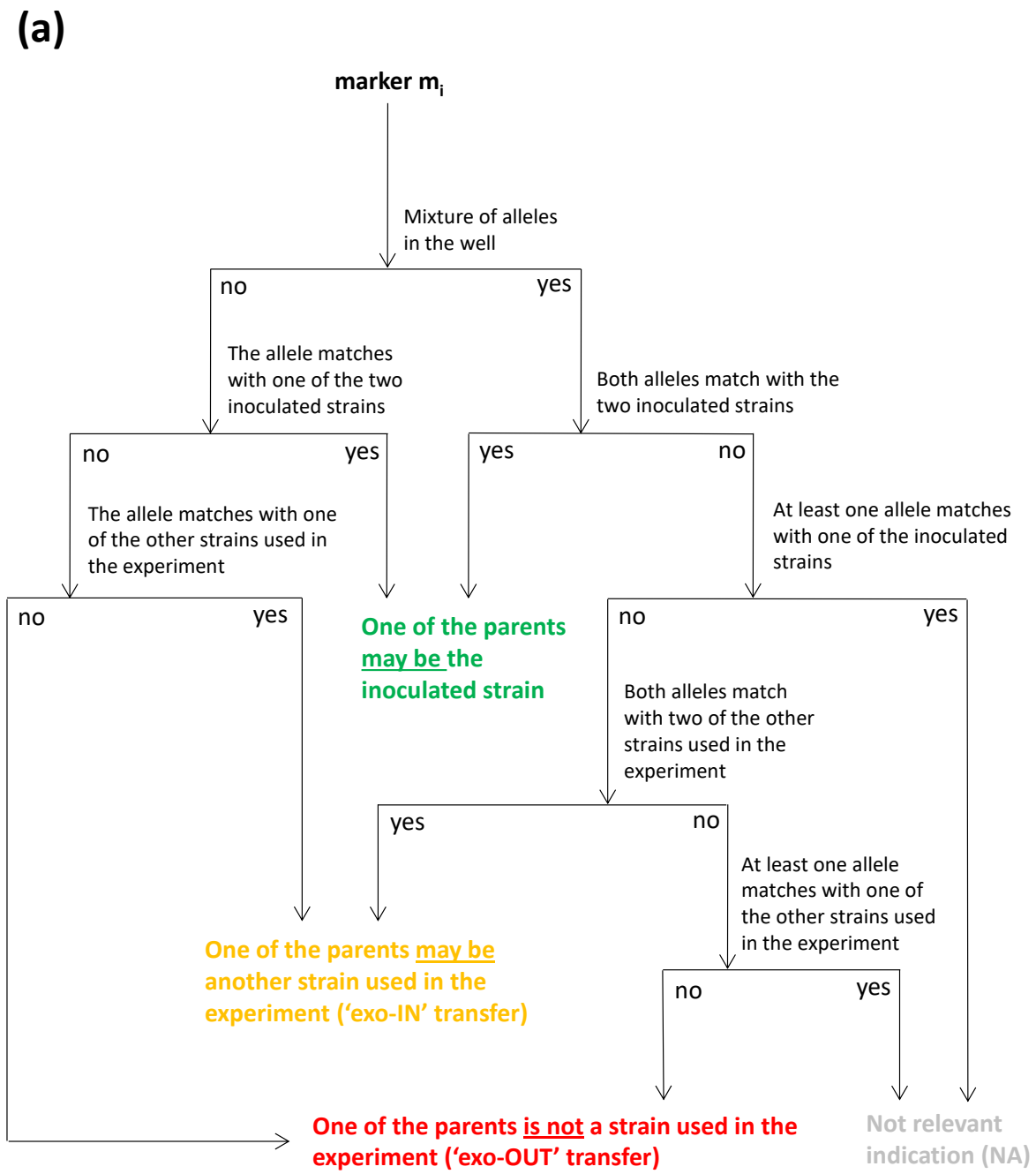


Figure III.S2. *Decision trees used for investigation of the parenthood of Zymoseptoria tritici offspring strains based on the comparison of alleles for 12 SSR markers (m_i) in the cases of (**a**) co-inoculation and (**b**) single inoculation.* The color code is the one used for the genotyping data set in Table III.S3.



(b)

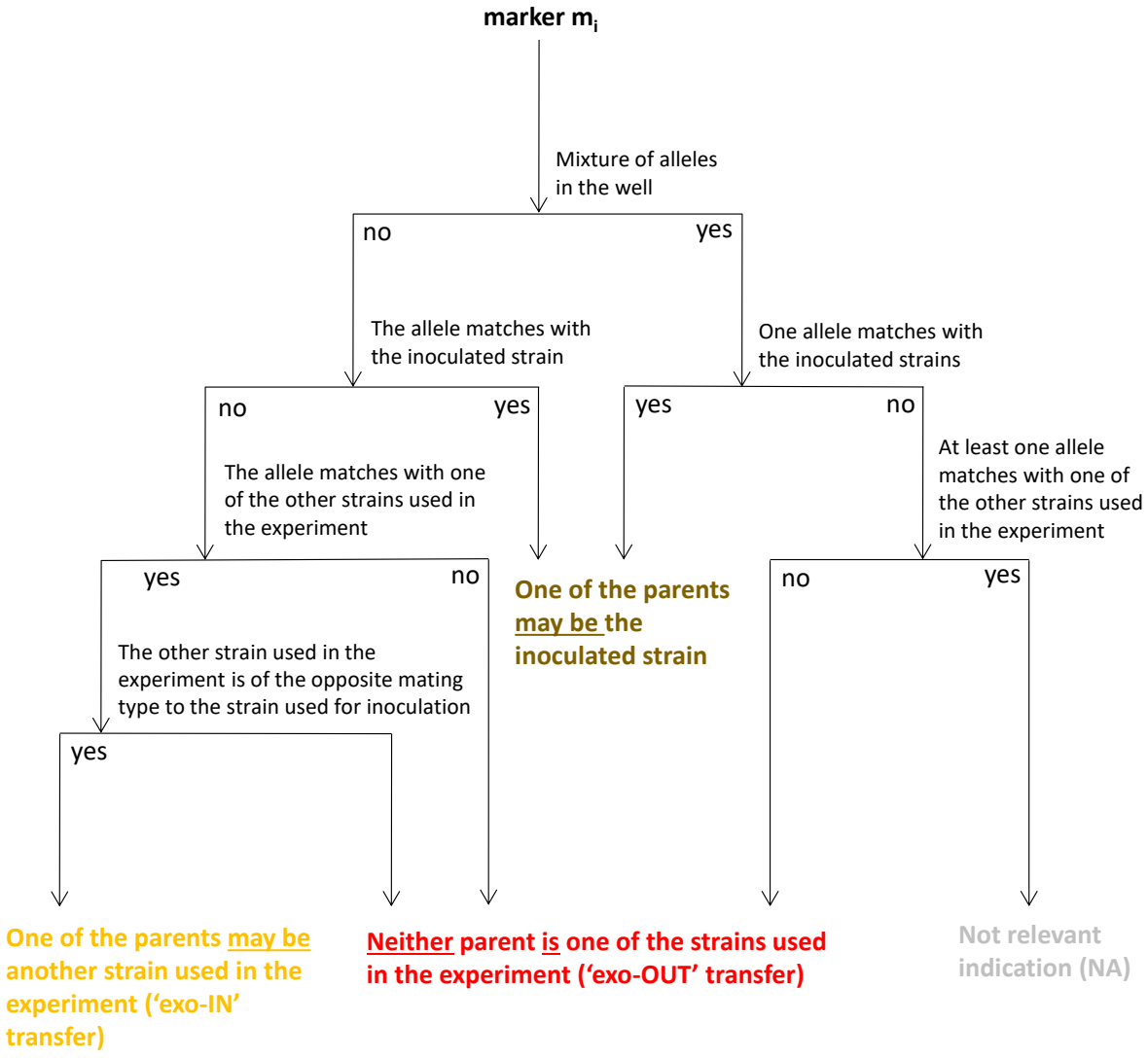
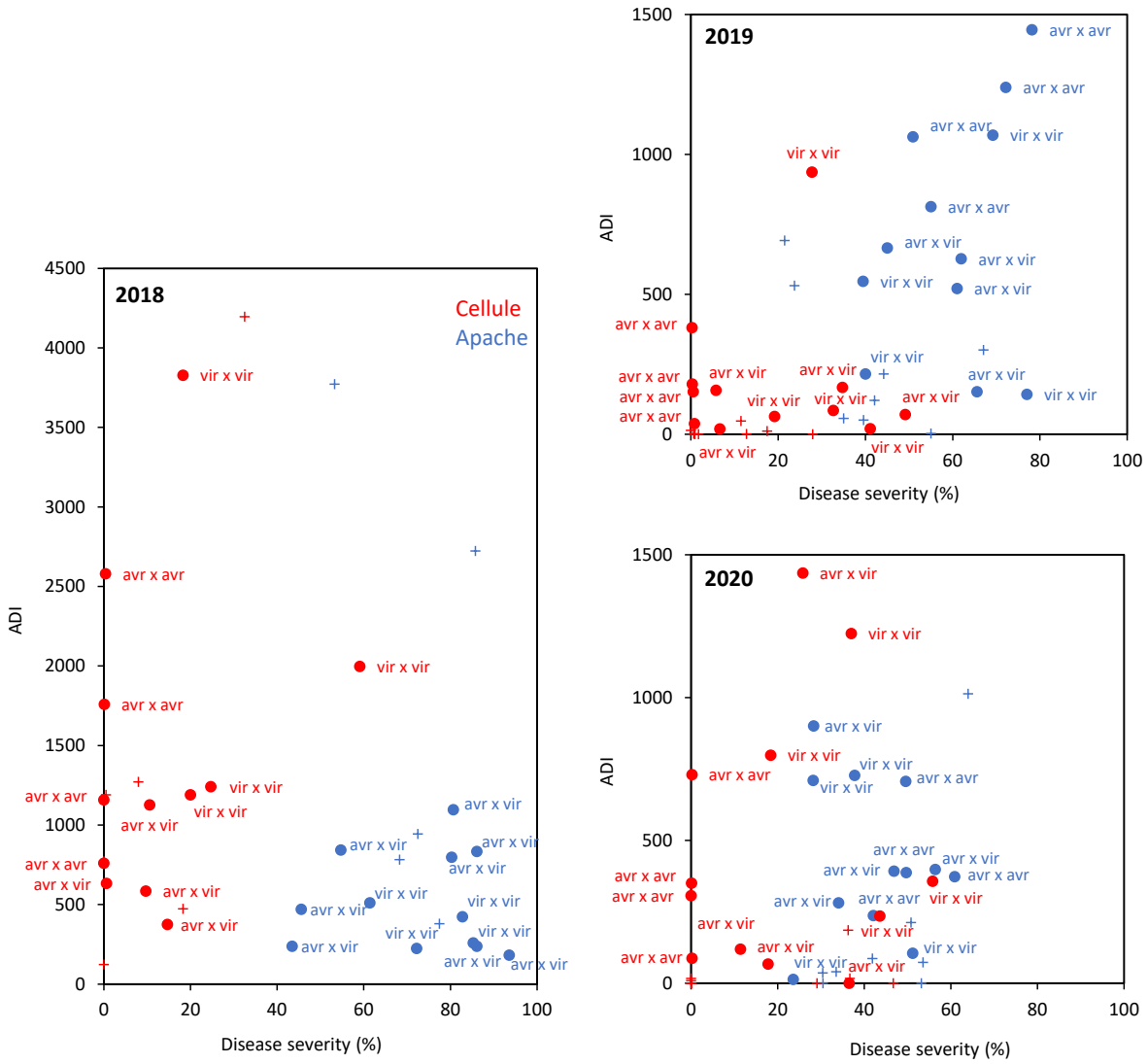

marker m_i
Mixture of alleles in the well
no
yes
The allele matches with the inoculated strain
One allele matches with the inoculated strains
no
yes
yes
no
The allele matches with one of the other strains used in the experiment
At least one allele matches with one of the other strains used in the experiment
yes
no
no
yes
One of the parents may be the inoculated strain
The other strain used in the experiment is of the opposite mating type to the strain used for inoculation
yes
One of the parents may be another strain used in the experiment ('exo-IN' transfer)
Neither parent is one of the strains used in the experiment ('exo-OUT' transfer)
Not relevant indication (NA)

Figure III.S3. *Intensity of Zymoseptoria tritici sexual reproduction (expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues of the same plant; ADI) and asexual multiplication (expressed as disease severity), by cultivar (Apache, Cellule) and type of inoculation during the three-year crossing experiment.* The number of isolates used for inoculation (+ for single inoculations, • for co-inoculations), their virulence status with respect to Stb16q ('v' for a virulent strain, 'a' for an avirulent strain) and the wheat cultivar (red for Cellule, blue for Apache) are indicated for each point, with the data averaged for nine stems (three plants). There was no correlation between the intensity of sexual reproduction and the intensity of asexual multiplication (R^2 = 0.38).



Supplementary Tables

Table III.S1. *List of the 24 Zymoseptoria tritici strains used as parental strains in the three-year experiment.* Strains were sampled on wheat cv. Cellule and Apache in pure-stand field trials located in Grignon (France) in July 2017, July 2018, and June 2019 (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a).

Year	Code	Mating type [1]	Wheat cv. of origin	Virulence status [2]
2018	(INRA17-)FS1425	Mat1.2	Cellule	vir
	(INRA17-)FS1441	Mat1.2	Cellule	vir
	(INRA17-)FS1477	Mat1.1	Cellule	vir
	(INRA17-)FS1492	Mat1.1	Cellule	vir
	(INRA18-)FS1721	Mat1.2	Apache	avr
	(INRA18-)FS1738	Mat1.2	Apache	avr
	(INRA18-)FS1754	Mat1.1	Apache	avr
	(INRA18-)FS1775	Mat1.1	Apache	avr
2019	(INRA18-)FS2883	Mat1.2	Cellule	vir
	(INRA18-)FS3098	Mat1.2	Cellule	vir
	(INRA18-)FS2881	Mat1.1	Cellule	vir
	(INRA18-)FS3250	Mat1.1	Cellule	vir
	(INRA18-)FS2849	Mat1.2	Apache	avr
	(INRA18-)FS2855	Mat1.2	Apache	avr
	(INRA18-)FS2847	Mat1.1	Apache	avr
	(INRA18-)FS2851	Mat1.1	Apache	avr
2020	(INRA19-)FS6176	Mat1.2	Cellule	vir
	(INRA19-)FS6181	Mat1.2	Cellule	vir
	(INRA19-)FS6141	Mat1.1	Cellule	vir
	(INRA19-)FS6152	Mat1.1	Cellule	vir
	(INRA19-)FS6503	Mat1.2	Apache	avr
	(INRA19-)FS6522	Mat1.2	Apache	avr
	(INRA19-)FS6191	Mat1.1	Apache	avr
	(INRA19-)FS6196	Mat1.1	Apache	avr

[1] determined by PCR amplification of the two mating type idiomorphs (Waalwijk *et al.*, 2002).
[2] based on the results of pathotyping on wheat seedlings, using cv. Cellule and Apache; 'vir' for virulent against *Stb16q* and 'avr' for avirulent against *Stb16q*.

Table III.S2. *Intensity of asexual multiplication (disease severity) assessed for each type of co-inoculation and single inoculation in the three-year experiment.* Disease severity is expressed as the mean percent sporulating area on the two uppermost leaves of wheat plants five weeks after inoculation. The impact of the type of co-inoculation on the intensity of asexual multiplication, by cultivar and year (with subsequent pooling of the three years) was assessed in Kruskal-Wallis tests with Bonferroni correction for pairwise comparisons. For single inoculations, the impact of strain status was assessed with Wilcoxon tests. Different letters indicate significant differences in means ($p < 0.05$) between statuses (columns) for a specific year × cultivar (rows) combination.

Year	Cv.	Virulence status of the (co-) inoculated parental strains				
		vir × vir	avr × vir	avr × avr	vir [1]	avr [1]
2018	Apache	79.9 a	77.1 a	61.0 b	59.8 α	72.5 α
	Cellule	30.5 a	8.9 b	0.1 c	17.2 α	0.1 β
2019	Apache	56.4 a	58.4 a	64.1 a	33.8 α	48.2 β
	Cellule	64.1 a	24.1 b	0.5 c	17.4 α	0.7 β
2020	Apache	35.2 a	41.4 ab	50.6 b	48.3 α	41.2 α
	Cellule	38.7 a	22.9 b	0.1 c	37.2 α	0.0 β
Means 2018-2019-2020	Apache	57.2 a	59.0 a	58.6 a	47.3 α [2]	54.0 α
	Cellule	44.4 a	18.6 b	0.2 c	23.9 α	0.3 β

[1] single inoculation
[2] $p = 0.06$

Table III.S3. Genotyping data set (see Excel file in the INRAE Dataverse online data repository (https://data.inrae.fr/) at https://doi.org/10.15454/IPMIOX.).

***Table III.S4**. Intensity of sexual reproduction (ADI) assessed for each type of co-inoculation and single inoculation in the three-year experiment. ADI is expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues.* The impact of the type of co-inoculation on the intensity of sexual reproduction for each cultivar and year (with subsequent pooling of the three years) was assessed in Kruskal-Wallis tests followed by Bonferroni correction for pairwise comparisons. For single inoculations, the impact of strain status was assessed with Wilcoxon tests. Different letters indicate significant differences in means ($p < 0.05$) between statuses (columns) for a specific year × cultivar (rows) combination.

Year	Cv.	Virulence status of the (co)inoculated parental strains				
		vir × vir	avr × vir	avr × avr	vir [1]	avr [1]
2018	Apache	529 a	661 a	339 a	2292 α	864 α
	Cellule	2065 a	680 b	1564 ab	1980 α	695 α
2019	Apache	493 a	491 a	1140 a	320 α	172 α
	Cellule	276 a	103 a	187 a	15 α	4 α
2020	Apache	389 a	493 a	426 a	303 α	62 α
	Cellule	654 a	406 a	368 a	51 α	6 α
Mean 2019-2020	Apache	441 a	492 a	783 a	312 α	117 α
	Cellule	465 a	254 a	278 a	33 α	5 α

[1] single inoculation

Table III.S5. *Intensity of sexual reproduction (ADI) according to the proportion of the Zymoseptoria tritici virulent strain in the biparental inoculum suspension ('avr × vir').* ADI is expressed as the number of ascospores discharged per gramme of residues of each cultivar (Apache, Cellule). Data were obtained in 2018, 2019 and 2020 for the FS1754 × FS1425, FS2883 × FS2847 and FS6176 × FS6191 co-inoculations, respectively. Differences in the mean intensity of sexual reproduction (pooling of the data for the three years) in a specific cultivar according to the proportion of the virulent parental strain were not significant (p > 0.05, Kruskal-Wallis test).

		Proportion of the virulent parental strain				
Cv.	year	0.10	0.25	0.5	0.75	0.90
Apache	2018	638	1367	238	724	497
	2019	302	59	665	318	1087
	2020	1237	1340	398	273	1545
	mean	726	922	434	438	1043
Cellule	2018	2043	883	375	48	1461
	2019	82	3	167	111	0
	2020	685	86	0	14	95
	mean	937	324	181	57	518

		Unbalanced ratio of parental strains		
Cv.		1/10 [1]	1/4 [2]	1/2 [3]
Apache	mean	884	680	434
Cellule	mean	728	191	181

[1] 0.10-0.90 and 0.90-0.10
[2] 0.25-0.75 and 0.75-0.25
[3] 0.50-0.50

***Table III.S6**. Intensity of asexual multiplication (disease severity) according to the proportion of the Zymoseptoria tritici virulent strain in the biparental suspension ('avr × vir').* Disease severity is expressed as the mean percentage sporulating area on the two uppermost leaves of wheat plants five weeks after the inoculation of each cultivar (Apache, Cellule). Data were obtained in 2018, 2019 and 2020 for the FS1754 × FS1425, FS2883 × FS2847 and FS6176 × FS6191 co-inoculations, respectively. Different letters indicate significant differences in the mean intensity of asexual multiplication (pooling of the data for the three years) in a specific cultivar according to the proportion of the virulent parental strain (p < 0.01, Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction for pairwise comparisons).

		Proportions of virulent parental strains				
Cv.	year	0.10	0.25	0.5	0.75	0.90
Apache	2018	92.9	87.1	86.1	80.4	88.3
	2019	34.0	25.5	45.0	43.9	35.0
	2020	48.8	60.0	56.4	63.1	60.0
	mean	58.6	57.5	62.5	62.5	56.2
Cellule	2018	7.5	13.8	14.7	30.8	16.7
	2019	13.2	6.2	34.7	42.5	19.2
	2020	19.1	30.8	36.5	31.7	45.4
	mean	13.3 a	16.9 a	28.6 b	35.0 b	27.1 b

DISCUSSION GENERALE

1 IMPACT DE L'HETEROGENEITE GENETIQUE DU PEUPLEMENT VEGETAL SUR LA DYNAMIQUE D'ADAPTATION D'UNE POPULATION DE *ZYMOSEPTORIA TRITICI* : RETOUR SUR LES RESULTATS EXPERIMENTAUX

Face à l'adaptation des agents pathogènes aux pressions de sélection générées par l'homogénéisation des peuplements végétaux, la diversification des résistances variétales est un levier pour augmenter la durée de leur efficacité et une alternative permettant de contrôler le développement des épidémies.

L'objectif de cette thèse était d'estimer et comprendre l'impact d'un peuplement végétal hétérogène sur l'adaptation d'une population locale de *Z. tritici* à une résistance variétale qualitative, pendant la période épidémique et inter-épidémique, en prenant en compte les processus épidémiologiques impliqués dans la modification de la structure de la population et donc l'ensemble du cycle de vie du champignon. Pour cela, j'ai étudié au cours d'une expérimentation au champ les modifications du nombre total d'individus (taille de la population pathogène) et de la fréquence d'individus virulents (composition de la population), dès les premières infections de la culture jusqu'à la reproduction sexuée sur ses résidus (Figure 15), dans trois associations variétales binaires. Ces trois associations différaient par la proportion de la variété porteuse du gène de résistance *St16q* (« variété résistante »). Puis, dans une expérimentation en conditions semi-contrôlées, j'ai recherché les différentes combinaisons entre individus virulents et avirulents susceptibles de conduire à la reproduction sexuée, m'appuyant ensuite sur ces résultats pour analyser l'impact des associations précédentes sur les modifications de la population pathogène constatées entre la période épidémique et inter-épidémique.

Dans cette discussion générale, je propose dans un premier temps une synthèse des principaux résultats expérimentaux répondant à la problématique d'efficacité. J'expose ensuite les nouvelles questions que ces résultats soulèvent, en particulier autour de l'utilisation des associations variétales en tant que stratégie permettant d'allonger la durée d'efficacité de la résistance (durabilité).

1.1 Effet des associations sur la dynamique épidémique et évolutive de la population pathogène pendant la période épidémique : réduction de la sévérité de la septoriose et du nombre d'individus virulents

Dans le chapitre I j'ai montré comment sont modifiées la taille et la composition d'une population pathogène du début à la fin d'une épidémie au cours d'une saison culturale et comparé ces modifications entre les associations et les cultures pures de chaque variété. Le statut de plusieurs milliers d'individus échantillonnés a été déterminé par un phénotypage individuel *in planta* mené en conditions contrôlées (serre). La fréquence d'individus virulents vis-à-vis de *Stb16q* a été estimée en début d'épidémie : 0.13 en 2018 et 0.14 en 2019. En fin d'épidémie, la sévérité dans les associations a été inférieure à celle des cultures pures, à la fois sur la variété sensible, sur la variété résistante, et globalement à l'échelle du couvert. Cela a confirmé l'efficacité des associations, c'est-à-dire leur capacité à limiter l'intensité des épidémies de septoriose. Toujours en fin d'épidémie, en parallèle de cette réduction de sévérité, les associations ont augmenté la fréquence de virulence sur la variété sensible, sans affecter celle sur la variété résistante. Ces changements se sont accompagnés d'une diminution du nombre d'individus virulents à l'échelle du couvert. Ils ont été interprétés comme étant la conséquence de processus de sélection (et contre-sélection) au sein de la population pathogène résultant des contaminations croisées entre variétés, par le biais de transferts de pycnidiospores dispersées par l'éclaboussement de gouttelettes de pluie. Il est important de noter que, contrairement à l'attendu, quelle que soit l'association, des individus avirulents ont été isolés des lésions sur la variété résistante en fin d'épidémie. Le statut de ces individus collectés au champ a pu être validé par un deuxième phénotypage en conditions contrôlées (chambre de culture), confirmant que dans 97% des cas les individus étaient effectivement avirulents. L'impact des associations a été plus ou moins marqué selon les variétés – porteuse ou non de *Stb16q* – et leur proportion respective dans l'association.

1.2 Persistance et amplification de l'effet des associations sur la dynamique épidémique et évolutive de la population pathogène post reproduction sexuée pendant la période inter-épidémique

Dans le chapitre II j'ai caractérisé la taille et la composition des populations de *Z. tritici* pendant la période inter-épidémique, à l'issue de la reproduction sexuée. Les effets de la dynamique sélective mise en évidence dans les associations au cours de la période épidémique ont persisté après la reproduction sexuée pendant la période inter-épidémique. La fréquence de virulence a été modifiée sur la variété sensible en fonction de la proportion de la variété résistante. Le nombre d'individus virulents est

resté plus faible dans les associations par rapport à la culture pure de la variété résistante au moins en 2019. Sur la variété résistante, la fréquence d'individus avirulents a même eu tendance à augmenter après reproduction sexuée, en particulier dans l'association composée de 25% de cette variété (différence significative). Ce résultat inattendu suggère que le nombre d'individus avirulents présents sur la variété résistante en fin d'épidémie était probablement plus important que celui estimé sur la base de l'échantillonnage réalisé à partir des lésions. Il est très probable que de tels individus avirulents proviennent du transfert par éclaboussement depuis la variété sensible associée, en nombre d'autant plus grand que la proportion de cette variété était élevée. Une petite fraction de ces individus avirulents a pu se développer de manière asymptomatique sur ou dans les tissus foliaires pourtant « résistants » (développement épiphyte et/ou pénétration et colonisation limitée à l'apoplaste) avant de réussir à se croiser avec d'autres individus virulents ayant, eux, provoqué des lésions. Les hypothèses qui sous-tendent ce scénario, ayant conduit à l'augmentation de la proposition de descendants (recombinants) avirulents comparativement à celle de la fin d'épidémie, ont été confirmées expérimentalement dans le chapitre III (voir ci-dessous). Dans les associations, la reproduction sexuée entre individus virulents et avirulents, présents pendant l'épidémie en plus ou moins grande quantité sur la variété résistante selon le niveau de maladie, a donc limité la transmission de la virulence vis-à-vis de *Stb16q* à la population de descendants. Aucune réduction significative de la quantité d'inoculum primaire produit par les résidus de culture n'a toutefois été mise en évidence dans les associations. Une réduction était attendue au regard de la réduction de sévérité constatée en fin d'épidémie (chapitre I) et de la relation densité-dépendance connue entre l'intensité de la multiplication asexuée et l'intensité de la reproduction sexuée (Suffert *et al.*, 2018a). Les conditions de l'étude (intensité de maladie modérée ; quantification de l'intensité de la reproduction sexuée trop imprécise) n'ont cependant pas permis d'avoir une réponse suffisamment robuste pour être concluante. L'impact des associations sur la taille des populations n'a donc pas pu être mis en évidence pendant la période inter-épidémique.

1.3 Des scénarios multiples de croisements entre individus virulents et avirulents expliquant l'amplification de l'impact des associations pendant la période inter-épidémique

Dans le chapitre III j'ai mis en évidence en conditions semi-contrôlées des croisements entre individus virulents et avirulents sur une variété porteuse du gène *Stb16q*. J'ai également montré que des croisements étaient possibles entre deux individus avirulents, et ce sans qu'aucun symptôme n'ait été détecté sur la plante pendant la phase asexuée. Ces résultats expérimentaux démontrent que des

croisements peuvent avoir lieu entre individus incapables de produire des symptômes sur la plante hôte, ce qui avait déjà été établi par Kema *et al.* (2018). Dans le cas présent, les conséquences épidémiologiques et évolutives de ce mécanisme ont pu être quantifiées. Au champ, les individus impliqués dans de tels croisements sont difficilement détectables pendant la période épidémique, comme expliqué précédemment (présence asymptomatique sur la variété résistante). Cette expérimentation a montré que les croisements impliquant des individus avirulents peuvent expliquer la persistance de leur fréquence dans la population de descendants, voire l'augmentation de cette fréquence comme constaté au champ (chapitre II). J'ai mis en évidence expérimentalement la multiplicité des scénarios et des situations de croisements dans les associations variétales, en fonction du statut des individus vis-à-vis de *Stb16q* (virulent, avirulent), de leur origine (des résidus voisins ou d'ailleurs) et de la temporalité de leur arrivée sur les tissus de l'hôte (plante vivante, résidus). Les conditions de l'expérimentation sont évidemment perfectibles, mais les résultats obtenus au cours des trois répétitions ont été cohérents. Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer la présence d'individus avirulents sur la variété porteuse de *Stb16q* : (i) en premier lieu un développement épiphyte, qui a déjà été constaté dans le cas de *Z. tritici* (Fones *et al.*, 2017), mais dont les conséquence n'ont jamais été étudiées sur des durées aussi longues ; (ii) plus plausible, une infection asymptomatique caractérisée par le développement de *Z. tritici* limité à l'apoplaste (Cohen & Eyal, 1993 ; Shetty *et al.*, 2003 ; Fantozzi *et al.*, 2021) ; (iii) également, une suppression de la résistance suite à l'arrivée préalable d'individus virulents (Lyngkjær *et al.*, 2001 ; Tollenaere *et al.*, 2016) pouvant faciliter la pénétration des tissus par les individus avirulents (Seybold *et al.*, 2020 ; Barrett *et al.*, 2021). Enfin, les résultats de cette expérimentation suggèrent que des individus virulents et avirulents (pycnidiospores dispersées à courte distance par la pluie ou ascospores dispersées à longue distance par le vent) ont pu arriver tardivement sur les tissus de l'hôte alors qu'ils étaient déjà à l'état de résidus, et s'y développer de façon saprophyte, comme cela a été observé pour *Phaeosphaeria nodorum* (Halama & Lacoste, 1992).

2 LES ASSOCIATIONS VARIETALES : UNE STRATEGIE DE DEPLOIEMENT DES RESISTANCES IMPLIQUANT DE PRENDRE EN COMPTE LE COMPROMIS ENTRE « EFFICACITE » ET « DURABILITE » ?

Ma thèse a permis de mieux comprendre les conséquences épidémiologiques et démogénétiques (voir 2.1 et 2.3) de l'utilisation d'une résistance qualitative en cours de contournement dans une association variétale. Les associations apparaissent comme une stratégie de déploiement des résistances permettant non seulement de réduire l'intensité d'une épidémie mais aussi de maintenir/prolonger l'efficacité de gènes de résistance en contribuant à stabiliser voire à diminuer la fréquence d'individus virulents dans une population pathogène locale (voir 2.4). Rien ne démontre néanmoins que cet effet « fréquence » ne soit pas contrebalancé par un effet « taille » (ou densité) en dépit de la grande diversité génétique des populations de *Z. tritici*. Une analyse plus fine des données suggère en effet que le nombre d'individus virulents pourrait dans certains cas être supérieur en valeur absolue alors même que leur fréquence diminuerait au sein de la population globale (chapitre I). Cette corrélation entre fréquence et densité mériterait d'être approfondie, par exemple par une approche plus théorique de modélisation pour prendre en compte, entre autres, des paramètres tels que la proportion de chaque variété et de la fréquence d'individus virulents dans la population pathogène initiale.

Les conséquences évolutives sur la dynamique d'adaptation de la population sont discutées, en mettant l'accent notamment sur l'impact de la proportion des variétés associées (voir 2.4). Les nouvelles connaissances d'ordre biologiques sont également abordées, en particulier celles qui expliquent certains scénarios de reproduction sexuée jusqu'alors inattendus sur la variété résistante (voir 2.2).

2.1 Les associations variétales, un moyen approprié pour comprendre la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale

Les chapitres I et II montrent comment le contraste de résistance de deux variétés associées, caractérisé par la présence/absence d'un gène de résistance majeur, peut modifier la taille et la composition de la population pathogène en conditions naturelles à l'échelle annuelle à différent moment clés du cycle de vie de *Z. tritici* (période épidémique et inter-épidémique). En cela, l'association de deux variétés a été un outil de recherche particulièrement approprié pour comprendre la dynamique de contournement d'une résistance qualitative à un pas de temps fin (l'année) en

identifiant les mécanismes spécifiques de cette échelle temporelle. Ces informations expérimentales seront utiles pour calibrer des modèles étudiant l'évolution des populations pathogènes dans des couverts associés, ou à des échelles de temps supérieures (plusieurs années) auxquelles le contournement de la résistance peut être quantifiée. Afin de généraliser ces résultats, il serait pertinent de tester d'autres conditions expérimentales en mettant en place une série d'essais au champ basés sur un dispositif similaire à celui de la thèse. L'objectif serait de mettre en évidence un différentiel d'efficacité des associations en se plaçant dans des contextes épidémiologiques contrastés, caractérisés par des fréquences de virulences à *Stb16q* potentiellement différentes au sein des populations locales (expression de différents stades de contournement) (voir partie 2.4). Ce type d'approche permettrait d'approfondir l'impact de certains facteurs populationnels sur les dynamiques épidémiques et évolutives mis en évidence dans cette thèse.

L'interprétation des résultats du chapitre I et II s'appuie sur une représentation simplifiée du développement d'une épidémie de septoriose qui cantonne, la multiplication asexuée à la période épidémique et la reproduction sexuée à la période inter-épidémique. Sur le terrain, la réalité est plus complexe et, les deux phases sont probablement chevauchantes : la reproduction sexuée et les infections par ascospores deviennent prépondérantes pendant la période d'inter-culture, mais peuvent aussi se produire pendant la saison de culture. Il en résulte que la multiplication asexuée et la reproduction sexuée modifient en parallèle et de façon continue la structure de la population pathogène. Cette distinction correspondait aux quantifications des types de spores qui ont été faites dans plusieurs études (Hunter *et al.*, 1999 ; Eriksen & Munk, 2003 ; Suffert & Sache, 2011 ; Duvivier *et al.*, 2013), qui montrent le type de reproduction majoritaire à chaque période.

2.2 La reproduction sexuée, un mécanisme à exploiter au sein des associations pour contrôler ou ralentir la dynamique d'adaptation d'une population pathogène à une résistance variétale

Les résultats des chapitres II et III ont mis en évidence l'importance de la reproduction sexuée dans l'évolution de la population pathogène. D'une part, j'ai précisé la diversité des modalités de rencontre physique entre deux parents, qu'ils aient infecté ou non la plante hôte en conduisant à l'apparition de symptômes, ce qui conditionne la réalisation de la reproduction sexuée. D'autre part, j'ai montré les effets de la reproduction sexuée sur la fréquence de virulence de la population recombinante, qui ne correspond pas forcément à la fréquence de virulence dans la population asexuée, et ce malgré l'équilibre de liaison (loi de Hardy-Weinberg). Concrètement, les

résultats de ma thèse suggèrent que la reproduction sexuée contribue à diminuer la fréquence des génotypes virulents dans la population d'ascospores impliquées dans l'initiation des épidémies suivantes, diminution probablement causée par la participation d'individus avirulents dans les croisements, y compris sur des plantes résistantes qu'ils n'ont pas réussi à infecter. Les résultats obtenus dans le chapitre III vont toutefois plus loin que ceux obtenus par Kema *et al.* (2018), avec la mise en évidence de la possibilité de croisement entre deux individus avirulents sur la variété résistance. Ces observations montrent l'intérêt d'estimer à la fois la taille de la population d'individus virulents et avirulents sur une variété portant un gène de résistance pour comprendre comment une association contribue à ralentir la dynamique de contournement de ce gène, étant donné que les deux types d'individus sont susceptibles de participer à la reproduction sexuée. La taille de la sous-population avirulente n'étant pas estimable expérimentalement (car présente de manière asymptomatique), et à défaut de marqueur moléculaire disponible, la modélisation des processus de dispersion s'avère être une perspective d'intérêt. La reproduction sexuée mériterait d'être intégrée dans les modèles destinés à simuler l'évolution de populations pathogènes, même dans le cas d'une culture pure, car certains croisements juqu'alors inattendus pourraient affecter la fréquence de virulence estimée (Rimbaud *et al.*, 2021 ; Fabre *et al.*, 2022). La diversité des scenarios envisagés devrait également être prise en compte. Elle améliorerait la compréhension de l'évolution pluriannuelle du ratio virulent/avirulent.

Les hypothèses portant sur les mécanismes permettant le maintien des individus avirulents dans ou sur les tissus foliaires des plantes résistantes (chapitre III) nécessitent aussi d'être examinées par des approches expérimentales complémentaires pour que leurs conséquences épidémiologiques et évolutives puissent être validées. Il serait par exemple intéressant d'étudier la reproduction sexuée grâce à des méthodes de cytologie, bien que cela semble difficile à mettre en œuvre sur des résidus de culture. Pour cela, il faudrait d'abord identifier certains déterminants de la reproduction sexuée de *Z. tritici* en conditions contrôlées, comme cela a pu être fait *in vitro* dans le cas de *P. nodorum* (Halama & Lacoste, 1992). L'objectif serait de découvrir s'il s'agit d'individus avirulents à croissance épiphyte, comme observé par Fones *et al.* (2017), ou d'individus ayant colonisé les tissus de la variété résistance et ayant été bloqués dans l'apoplaste (Cohen & Eyal, 1993; Shetty *et al.*, 2003; Fantozzi *et al.*, 2021). À l'inverse de l'effet prémunition (Calonnec *et al.*, 1996 ; Clin *et al.*, 2020) connu dans les associations, la présence d'individus virulents aurait pu faciliter l'entrée d'individus avirulents (Tollenaere *et al.*, 2016) en supprimant l'expression de la résistance *Stb16q* (Lyngkjær *et al.*, 2001 ; Saintenac *et al.*, 2021) ou en sensibilisant la plante (Seybold *et al.*, 2020 ;

Barrett *et al.*, 2021). Des travaux récents en conditions contrôlées montrent en effet que certaines associations réduisent le niveau d'immunité des plantes hôtes (Pélissier *et al.*, 2021a,b), avec une identification possible des associations les plus préjudiciables grâce à des approches génomiques (Montazeaud *et al.*, 2022). Pour connaître les conséquences évolutives sur la population pathogène, il faudrait réussir à estimer quels mécanismes (dilution, barrière, prémunition, facilitation etc.) sont capables de s'exprimer dans les associations au champ et quels sont les facteurs qui les modulent.

2.3 En dépit de la capacité déjà démontrée des associations variétales à réduire la sévérité des maladies, quels sont les freins à leur utilisation ?

Les résultats de ma thèse confirment que les associations variétales de blé tendre sont un levier de protection efficace contre les épidémies de septoriose. Les réductions de sévérité observées dans les associations, comparativement à la culture pure de chaque composante, sont particulièrement marquées (chapitre I), en accord avec les résultats de travaux précédents (Gigot *et al.*, 2013 ; Vidal *et al.*, 2017a ; Kristoffersen *et al.*, 2020b). Les résultats de mon travail vont parfois plus loin, avec la conclusion d'une réduction de sévérité plus forte, observée à la fois sur la variété sensible et sur la variété résistante (effet protecteur réciproque), et le constat que cette réduction est modulée par la proportion des variétés. La complexité et la variabilité des facteurs agronomiques, environnementaux et propres à la biologie de l'agent pathogène, expliquent la grande variabilité des performances rapportées dans la littérature. Cela incite à ne pas généraliser de manière abusive ces résultats, en dépit de leur robustesse de circonstance. Les performances des associations variétales doivent être déterminées au cas par cas selon l'objectif recherché et le contexte épidémiologique local : protection contre une ou plusieurs maladies (Wuest *et al.*, 2021), stabilisation du rendement (Borg *et al.*, 2018), valorisation de variétés porteuses d'un gène de résistance en cours de contournement, etc.

La difficulté des agriculteurs à utiliser des associations variétales, malgré l'augmentation très récente de la sole française cultivée en mélange (Perronne *et al.*, 2021), pourrait s'expliquer, d'une part par la difficulté à concilier l'objectif de contrôle des épidémies et les critères de qualité exigés par les filières en aval, dont les processus industriels ne sont pas forcément adaptés à la « diversité », et d'autre part par le manque d'outils d'aide à la décision et de pilotage adaptés à cette pratique culturale. Les exigences de qualité et l'organisation des filières de blé panifiable et d'orge-malt rendent encore difficile le recours aux associations variétales. En France, la répartition des associations de blé tendre est différente selon les régions, notamment en raison des débouchés visés : elles sont plus répandues dans le Centre Ouest, où les céréales

sont plus souvent utilisées pour l'alimentation animale (Arvalis - Institut du Végétal, 2022). Un frein symbolique à leur utilisation a récemment été levée avec l'autorisation de la commercialisation de semences de céréales pré-mélangées (arrêté du 26 juin 2018 ; Legifrance, 2018), tels que le Mélange Moulin Soufflet ou Certimix.

2.4 Les associations variétales, une stratégie pertinente de déploiement des résistances : Oui, mais à quelles échelles ?

La façon dont les associations variétales de blé ont modifié la structure de la population de *Z. tritici* pendant les périodes étudiées laisse entrevoir le potentiel de cette pratique culturale en tant que stratégie permettant d'augmenter la durabilité d'une résistance qualitative. Les résultats expérimentaux de ma thèse suggèrent que l'impact des associations pourrait être bénéfique dans certaines situations mais préjudiciable dans d'autres, notamment en fonction du stade de contournement de la résistance considérée. L'association tend à maintenir, voire légèrement augmenter, l'efficacité de la résistance conférée par le gène *Stb16q* via deux effets conjoints : (i) la réduction de la fréquence d'individus virulents sur la variété sensible, déjà présents dans la population pathogène initiale, et (ii) l'augmentation, légère mais significative, de la fréquence des individus avirulents sur la variété « résistante » par rapport à sa culture pure. À supposer que ce résultat acquis pour un pas de temps annuel s'incrémente chaque année, on peut raisonnablement faire l'hypothèse qu'une telle association contribue à ralentir le contournement de la résistance, avant d'arriver éventuellement à une situation « stable ». En revanche, s'il s'agissait d'une nouvelle résistance, déployée au champ pour la première fois et non contournée (absence totale de symptômes ; virulence non détectée), il est raisonnable de penser que les associations variétales pourraient contribuer à initier le processus de contournement de cette résistance. Les connaissances les plus récentes, incluant celles acquises expérimentalement dans le cadre de cette thèse, vont en effet dans ce sens. Il est peu probable de trouver un variant virulent dans la culture pure d'une variété dont la résistance est totale (en dépit de la forte pression de sélection qu'elle exercerait sur lui) et encore moins qu'il se transmette (par croisement) à la saison suivante. Dans la culture pure d'une variété sensible la probabilité qu'un tel variant virulent préexiste est à l'inverse élevée (compte tenu de la grande taille de la population pathogène ; McDonald *et al.*, 2022), mais la probabilité qu'il émerge et soit sélectionné est faible (compte tenu de l'absence d'avantage sélectif associé). En revanche, une association variétale cumule les deux facteurs de risque : (i) d'une part la présence d'une variété sensible (et donc une population pathogène de grande taille, possiblement très diversifiée), qui rend probable la présence d'un variant virulent ; (ii) d'autre part, la présence de la variété résistante, qui est susceptible de générer une pression de

sélection suffisante (effet « filtre variétal ») pour faire émerger ce variant virulent, avec la possibilité de croisement sur la variété résistante (avec un individu avirulent, comme démontré dans le chapitre III) venant augmenter la probabilité de transmission à la saison épidémique suivante. Seule une démarche de modélisation permettrait d'estimer la fréquence d'individus virulents (et donc le stade de contournement d'un gène de résistance) à partir de laquelle une association variétale commence à avoir des effets bénéfiques. Ce « point de bascule » correspond à la situation où les effets « taille de population » et « pression de sélection » exercée par la variété résistante s'équilibreraient. Selon toute vraisemblance, il dépend, entre autres, du taux de mutation du locus du gène d'avirulence (voir McDonald *et al.*, 2022 pour une première estimation théorique) et de l'avantage sélectif d'un variant virulent dans un peuplement hétérogène, qui dépend lui-même de la proportion de plantes résistantes et de l'éventuel coût de fitness associé à la virulence.

Il existe d'autres manières de déployer des résistances à l'échelle de la parcelle qui tiennent compte de leur « nature » et la façon dont elles sont « combinées », avec pour objectif de les rendre plus durables, c'est-à-dire plus longtemps efficaces. La résistance quantitative est souvent considérée comme plus durable que la résistance qualitative, car contrôlée par plusieurs parties du génome (QTLn; Chartrain *et al.*, 2004 ; St Clair, 2010). S'il existe peu de preuves de contournements rapides et totaux de ce type de résistance, « l'érosion » de leur efficacité a pu être mise en évidence (Montarry *et al.*, 2012 ; Delmas *et al.*, 2016). En ciblant des fonctions clés de l'infection, une résistance quantitative pourrait conduire à la sélection d'individus plus agressifs dans la population pathogène (Lannou, 2012). Les déterminants génétiques de cette érosion ne sont pas encore bien compris (Poland *et al.*, 2009) : des travaux récents sur l'interaction entre *Z. tritici* et le blé montrent que des interactions « gène-pour-gène » peuvent être sous-jacentes à la résistante quantitative (Camilla Langlands-Perry, com. pers.). La combinaison de différent gènes de résistance qualitatifs et quantitatifs dans une même variété (pyramidage) apparaît comme une alternative pour prolonger la durée de vie de chaque résistance (Quenouille *et al.*, 2013; Mundt, 2014; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Or cette pratique a également des limites (Rimbaud *et al.*, 2021b) : (i) l'identification d'individus déjà adaptés, qui pourraient se développer à basse fréquence, est difficile ; (ii) l'adaptation de la population pathogène peut se faire via un passage par d'autres variétés cultivées ou espèces sauvages ; (iii) le fait que des ressources génétiques précieuses soient perdues si un individu multi-virulent parvient à contourner une combinaison de résistances. Dans le cas de *Z. tritici,* le fait que les virulence vis-à-vis de la plupart des résistances qualitatives connues aient déjà été détectées (autrement dit ont déjà émergé) rendrait le pyramidage peu durable (Brown,

2015). En effet, dans ces conditions la sélection d'individus multi-virulents au cours d'une épidémie annuelle dans un couvert monovariétal est probable (Crété *et al.*, 2020), même si la reproduction sexuée peut chaque année éliminer une grande partie des combinaisons multiples de virulences. En revanche, associer des variétés entre-elles au sein d'un couvert, pratique plus accessible pour les agriculteurs capables de composer eux-mêmes le mélange de semences répondant à leurs objectifs et adapté au contexte épidémiologique local, permettrait d'exercer des pressions de sélection moindres sur la population pathogène. Les résultats sur l'utilisation des résistances uniquement quantitatives dans les associations sont assez contradictoires. Une étude théorique portant sur la rouille jaune suggère que des associations de variétés portant différents gènes de résistance quantitative tendent à limiter la pression de sélection sur la population pathogène, tout au moins par rapport à la résistance la plus efficace, et à réduire le nombre de variétés résistantes devant être utilisées (Sapoukhina *et al.*, 2013a). Toutefois, les simulations de Fabre *et al.* (2022) suggèrent que les conséquences évolutives et épidémiologiques de telles associations dépendent des traits d'agressivité que les résistances utilisées modulent. Ces approchent théoriques montrent également la difficulté de maximiser simultanément les composantes « efficacité » et « durabilité » des effets des associations variétales.

Enfin, les associations variétales peuvent être envisagées comme une stratégie de déploiement permettant de prolonger l'efficacité de gènes de résistance variétale en cours de contournement ou de « recycler » des gènes contournés depuis plusieurs années, c'est-à-dire dont les virulences correspondantes sont très répandues. Ce bénéfice potentiel doit être estimé au regard de la fréquence des individus virulents déjà présents dans la population locale mais aussi, dans le cas où plusieurs résistances viendraient à être associées : du type de résistances déployées (qualitative, quantitative), du nombre et de la façon dont elles sont combinées dans chaque variété (pyramidage), et de la proportion de chacune d'elles au sein de l'association.

PERSPECTIVES

Cadre conceptuel de modélisation mécaniste permettant de simuler l'impact de la « fréquence de virulence » et des « proportion de variétés » sur la dynamique de la virulence dans les populations pathogènes

Dans ce manuscrit, la synthèse bibliographique présente la complexité des processus qui peuvent expliquer la façon dont les populations pathogènes s'adaptent à la diversité génétique d'un peuplement végétal. À ces processus génériques il convient d'ajouter ceux spécifiques à *Z. tritici,* dont certains mis en évidence expérimentalement dans les chapitres I, II et III, ainsi que les hypothèses mécanistes explicatives formulées. L'objectif de cette partie est de proposer un cadre conceptuel permettant de synthétiser les connaissances acquises afin d'aller vers une approche de modélisation qui permettra de simuler les flux de spores entre différentes variétés et d'analyser les changements de taille et de composition d'une population de *Z. tritici* dans un couvert hétérogène de blé à l'échelle d'une année. Le modèle qui pourra en découler doit permettre d'étudier plus en profondeur les principaux déterminants (traduits en paramètres d'intérêt) de cette dynamique : « fréquence de virulence » et « proportion de variétés ». Les premières étapes, que je présente ici sous forme de perspectives, sont conceptuelles. Elles permettent de réfléchir à la meilleure façon d'intégrer les hypothèses mécanistes issues de connaissances biologiques et épidémiologiques acquises expérimentalement, tout en identifiant les synergies et antagonismes des processus qui en résultent.

1 OBJECTIFS ET CARACTERISTIQUES DE L'APPROCHE PROPOSEE

1.1 Modéliser les processus identifiés pour mieux comprendre l'influence de paramètres d'intérêt

Sur la base des résultats expérimentaux que j'ai obtenus et des connaissances issues de la littérature, j'ai identifié deux paramètres d'intérêt gouvernant l'adaptation de la population pathogène à une résistance variétale qualitative dans une association variétale : la fréquence d'individus virulents en début d'épidémie, difficilement modulable expérimentalement, et la proportion de la variété portant le gène de résistance dans le couvert. J'ai montré que la reproduction sexuée joue un rôle important dans cette adaptation, notamment du fait de la possibilité de croisements entre individus avirulents et virulents sur une plante porteuse du gène de résistance correspondant. Les conséquences de la reproduction sexuée doivent donc être prise en compte dans la démarche de modélisation. Un modèle permettrait de mieux comprendre et estimer les effets de ces paramètres et de ce processus, en répondant à deux questions : (i) Quel est l'impact de la fréquence initiale d'individus virulents sur la dynamique annuelle d'adaptation dans une association variétale ? (ii) Quelle proportion de variétés au sein d'une association permettrait le meilleur compromis

entre gestion de la maladie et durabilité de la résistance sur la base d'un pas de temps annuel ? Je propose un modèle mécaniste dont la structure prendrait en compte des processus biophysiques ayant à la fois des conséquences épidémiologiques et évolutives (*e.g.* Fabre *et al.*, 2022) à l'échelle du couvert. L'objet d'étude serait le suivant : une association de deux variétés de blé, l'une porteuse d'un gène de résistance qualitatif en cours de contournement – considérée comme étant « résistante » au moins à l'origine de son déploiement – et l'autre non porteuse du gène, considérée comme « sensible ». L'approche distinguerait les individus virulents et avirulents sur les plantes du couvert et ainsi d'accéder à la taille de chacune des sous-population, virulente et avirulente, plutôt qu'à la sévérité de la maladie ou la quantité de symptômes (voir 2.1.2). Une approche spatialisée (voir 2.1.1) prendrait en compte les processus de contaminations croisées entre plantes et les effets des associations sur ces processus (voir synthèse bibliographique et chapitre I).

1.2 Intégrer les phases asexué et sexuée pour représenter l'évolution d'une population pathogène sur un pas de temps annuel complet

La dynamique de l'épidémie annuelle de septoriose serait scindée en deux : une période épidémique pendant laquelle plusieurs cycles de multiplication asexuée seraient représentés (module épidémique) et une période inter-épidémique au cours de laquelle seule la reproduction sexuée aurait lieu (module inter-épidémique). Ce choix de modélisation répondrait à la fois à un besoin de simplification et de réalisme biologique, en accord avec les effets constatés expérimentalement sur la dynamique d'adaptation d'une population dans les associations. Cette représentation permettrait de décrire la dynamique quantitative et qualitative de la population pathogène en tenant compte des processus susceptibles de modifier sa structure. En réalité pendant la période épidémique plusieurs cycles de multiplication asexués « emboités » ont lieu, dont le nombre dépend de la latence et des évènements de dispersion, la pluie en l'occurrence. Par exemple, Karisto *et al.*, (2021) estiment en moyenne jusqu'à six cycles complets (synthèse bibliographique 4.2). Pour simplifier et faciliter l'étude d'un tel système, le modèle pourrait considérer un nombre fini et distinct d'évènements de dispersion-infection successifs, appelés « cycles asexués » par la suite. Les processus biologiques et physiques associés à un cycle asexué seraient considérés comme ponctuels et synchronisés, avec une durée optimale telle que chaque lésion pourrait atteindre une taille moyenne et une capacité de sporulation maximale avant l'intervention du cycle suivant (voir 2.1.3), bien que le temps soit représenté de façon discrète. Les propriétés du couvert seraient spatialisées en trois dimensions afin de considérer les mécanismes de dispersion à l'œuvre dans les associations, tels que présentés dans le chapitre I 3.3. Le modèle s'appuierait sur l'architecture plus ou moins

détaillée du couvert et des variétés associées, selon les questions de recherche formulées (voir 2.1.1).

2 PROPOSITION D'UNE STRUCTURE DE MODELE ET DES HYPOTHESES INTEGREES

Le modèle s'articulerait autour de plusieurs modules couplés tels que présentés à la figure IV.1. Les modules concernant la construction du couvert et la prise en compte de la dispersion par éclaboussement de gouttelettes de pluie existent déjà et sont décrits ci-dessous. Les sorties de ces modules seraient en entrée du module épidémique : en utilisant les informations sur la distribution des gouttelettes de pluie, les coordonnées des éléments constitutifs du couvert et son état sanitaire, le module permettrait de calculer la taille et la composition de la population pathogène après plusieurs cycles asexués successifs. Puis, les caractéristiques de la population pathogène seraient en entrée du module inter-épidémique qui simulerait la reproduction sexuée. Les sorties finales seraient une taille de la population pathogène, exprimée en nombre d'ascospores éjectées par gramme de résidus de culture, et une composition de la population pathogène, caractérisée par une fréquence d'individus virulents.

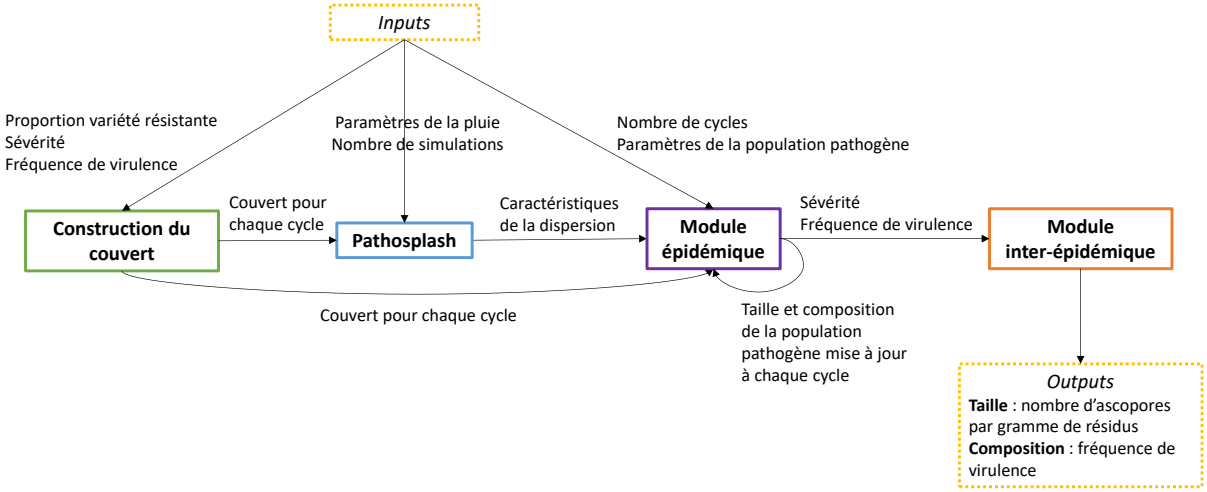


Figure IV.1. *Structure et étapes de calcul du modèle.* Le modèle serait divisé en plusieurs modules : construction d'un couvert de blé tendre en association variétale, éventuellement généré par un modèle annexe ; dispersion de gouttes de pluies (*Pathosplash*, Saint-Jean *et al.*, 2004 ; Gigot *et al.*, 2014) ; contaminations et développement de la population pathogène (module épidémique) ; reproduction sexuée (module inter-épidémique).

2.1 Module épidémique (phase asexuée)

2.1.1 Représentation du couvert en association variétale

Une description fine du couvert végétal n'est pas l'objectif premier de l'approche proposée, bien que l'architecture du couvert ait un impact sur la progression de la maladie et sur la performance des associations (Vidal *et al.*, 2017a, 2018). Une représentation spatialisée des éléments hôtes « résistants » et « sensibles » ainsi que l'échelle du processus de dispersion par éclaboussement rendent nécessaire une description en trois dimensions du couvert (synthèse bibliographique 3.3 et 4.2 ; Sanderson *et al.*, 1985 ; Shaw, 1987 ; Saint-Jean *et al.*, 2004). Chaque plante serait représentée par un ensemble de feuilles réparties autour d'un l'axe vertical correspondant à une tige, décrites par des objets géométriques (Figure IV.3). Dans un premier temps, il pourrait être pertinent que les variétés constitutives de l'association aient une représentation architecturale et géométrique identique. Il s'agit d'une simplification majeure, impliquant que les différences de caractéristiques physiques et physiologiques des variétés cultivées en pure tout comme en association influenceraient peu la dynamique d'adaptation de la population pathogène. Selon les proportions choisies, les variétés seraient distribuées aléatoirement dans le couvert afin d'optimiser le grain d'hétérogénéité génétique et par conséquent de maximiser les effets des associations (Mundt & Leonard, 1986 ; Gigot *et al.*, 2014). Une autre simplification majeure consisterait à utiliser le même couvert pour tous les cycles

asexués, considérant que la grande majorité de la phase asexuée se déroule, dans le cas du blé, après que l'architecture de l'hôte soit établie.

Pour aller plus loin

Les caractéristiques géométriques du couvert seraient une entrée du modèle et pourraient donc être complexifiées dans un second temps selon les objectifs de recherche. La description géométrique du couvert pourrait être issue d'un modèle du type FSPM (functional-structural plant models), comme *ADEL-Wheat* (un modèle architectural du développement du blé en 3D, Fournier *et al.*, 2003), de mesures directes d'architecture du couvert ou d'une approche simplifiée.

2.1.2 Modélisation de la dynamique quantitative et qualitative de la population pathogène

Dispersion par éclaboussement de gouttes de pluie

Le processus de dispersion de spores par des gouttelettes de pluies dans un couvert hétérogène serait simulé à partir du modèle *Pathosplash* (Gigot *et al.*, 2014) avec une approche stochastique et physique (Saint-Jean *et al.*, 2004, 2008; Figure IV.2). Les mécanismes d'interception de gouttes, de production et de transport de gouttelettes, ainsi que leur interception par les éléments du couvert y sont décrits explicitement. *Pathosplash* calcule la distribution moyenne de gouttelettes dans un couvert après une pluie. Il est basé sur les hypothèses suivantes : (i) les épisodes de pluie et la production de gouttelettes sont stationnaires ; (ii) les gouttes de pluie sont la seule source de gouttelettes ; (iii) les gouttelettes sont générées uniquement par l'interception de goutte par les éléments du couvert ; et (iv) le transport de gouttelettes ne prend pas en compte l'effet du vent. Sous sa forme actuelle *Pathosplash* ne tient pas compte du ruissellement des gouttelettes sur les organes des plantes. L'utilisateur peut choisir les paramètres de la pluie simulée. Dans un premier temps, il conviendrait de considérer que la pluie est de même nature pour chaque cycle asexué et disjointe entre cycles.

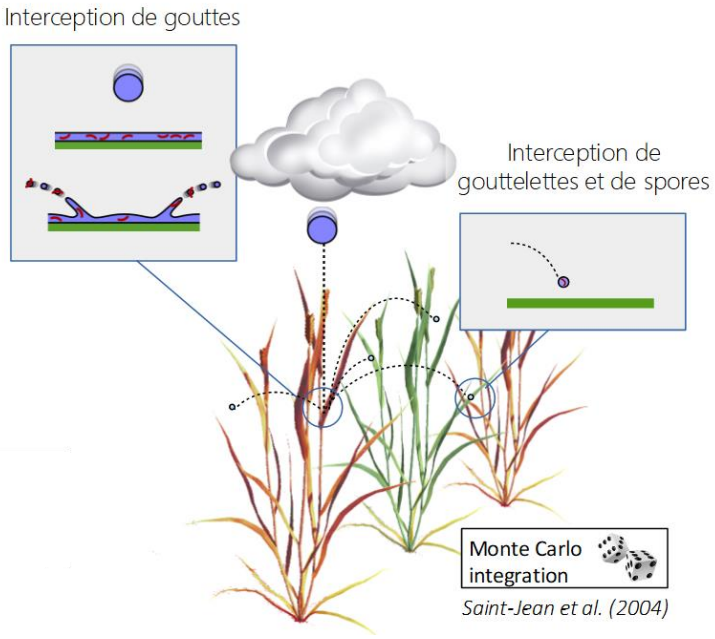


***Figure IV.2**. Processus de dispersion des gouttelettes de pluie et des spores d'un agent pathogène dans un couvert en 3D.* L'interception d'une goutte de pluie par un élément du couvert provoque l'éclaboussement de plusieurs gouttelettes contenant des spores qui sont interceptées à leur tour par les plantes voisines (allo-infections) ou la plante d'origine (auto-infections. Le calcul stochastique de la distribution des gouttelettes dans le couvert se fait suivant une intégration par Monte Carlo (Saint-Jean, 2003 ; d'après Vidal, 2017).

Dispersion des individus constituant la population pathogène

Il serait possible de coupler la dimension physique, représentée par les flux d'eau simulés dans *Pathosplash*, et la dimension populationnelle, représentée par les flux d'individus constituant la population pathogène que simuleraient le module épidémique. Pour cela, chaque gouttelette d'éclaboussement serait considérée comme une unité de dispersion ou unité de contamination (Rapilly, 1991), c'est-à-dire transportant des spores. La maladie résulterait des contaminations générées par la dispersion de ces gouttelettes issues de l'impact d'une goutte de pluie sur une surface foliaire présentant des lésions sporulantes (Figure IV.3). Une gouttelette, ou unité de contamination, pourrait être considérée « contaminante » ou « non-contaminante » selon qu'elle transporterait ou non une quantité non limitante de spores d'un seul type, et « virulente » ou « avirulente » en fonction du type d'individu transporté. Ces caractéristiques seraient attribuées à chaque gouttelette en fonction des caractéristiques sanitaires de leur feuille d'origine (voir 2.1.3). Les feuilles seraient donc à la fois une source et un puits d'inoculum. Cette représentation permet d'envisager un modèle dont la structure serait semblable à celle des modèles épidémiologiques SIR classiques (susceptible-infecté-retiré ou rétabli ; Kermack & McKendrick, 1927 ;

Anderson, 1991). Dans le module épidémique, la population pathogène serait représentée dans chaque feuille du couvert grâce à quatre compartiments (Figure 3 : une surface saine appelée « surface verte » (S_h), une surface sporulante appelée « surface malade » (S_d) et une surface sénescente (S_r). La surface malade serait elle-même divisée en deux pour tenir compte du statut de la population pathogène transportée : surface dite « virulente » ($S_{d,vir}$) et surface dite « avirulente » ($S_{d,avir}$).

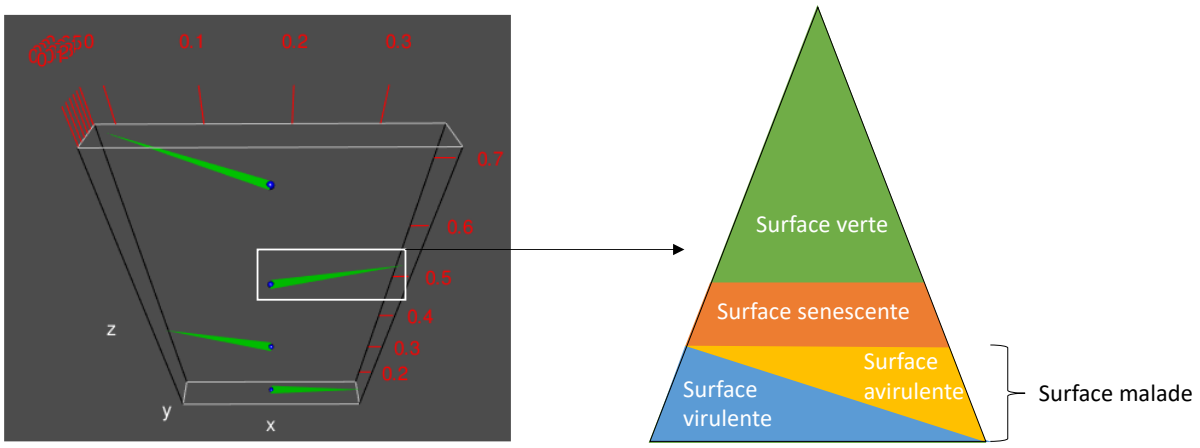


***Figure IV.3**. Exemple de représentation en 3D d'une plante à quatre feuilles, élément de base du couvert simplifié (à gauche) et de répartition des compartiments (type SIR) dans une feuille (à droite).* La position de la tige sur l'axe vertical est représentée par des sphères bleues.

D'un point de vue opérationnel, il est proposé que : (i) la surface virulente et avirulente ne se superpose pas ; (ii) seules les gouttelettes contaminantes interceptant des surfaces saines au cycle t soient capables de générer une surface malade au cycle $t + 1$; (iii) les surfaces sénescentes ne puissent plus être infectées, comme dans le cas des champignons hémibiotrophes (Duncan & Howard, 2000). Les surfaces infectées au cycle t sporuleraient au cycle $t + 1$, impliquant que les surfaces sporulantes ne coexistent pas aux fils des générations, et les surfaces sporulant au cycle t deviendraient sénescentes au cycle $t + 1$. À l'échelle de la feuille, la taille de la population pathogène globale serait décrite par sa surface malade et sa composition par sa surface virulente et avirulente. La sénescence naturelle des feuilles serait dans un premier temps négligée. Ainsi, la surface sénescente serait uniquement une conséquence de la maladie, et cumulée d'un cycle à l'autre. Dans le cas d'interactions hôte-pathogène compatibles, on considèrerait les traits de pathogénicité (efficacité d'infection, agressivité, capacité de sporulation) des individus virulents et avirulents comme étant identiques. Ainsi, une gouttelette génèrerait une surface sporulante égale à la taille moyenne d'une lésion sporulante (Δs estimé à 11mm^2 expérimentalement par Morais *et al.* (2015) sur des plantes adultes en conditions contrôlées). En théorie, seules des spores « virulentes » peuvent infecter les tissus des plantes résistantes, mais

des individus avirulents ont pu être échantillonnés au champ à partir de lésions présentes sur des feuilles de la variété résistante en fin d'épidémie (chapitre I) et une petite fraction des descendants issus de la reproduction sexuée avirulente (chapitre II). Il serait intéressant de prendre en compte dans le modèle les processus susceptibles d'expliquer ces résultats et donc l'efficacité de l'association variétale. Dans le module épidémique, une certaine surface malade serait provoquée par des gouttelettes avirulentes sur les feuilles résistantes. Cette surface serait limitée par un pourcentage maximal (T) déterminé à partir des résultats expérimentaux (par exemple entre 5% et 10%) et en tenant compte du nombre total de gouttelettes contaminantes interceptées. Par ailleurs il serait souhaitable de limiter l'accroissement de la surface malade générée par l'interception des gouttelettes contaminantes en intégrant un processus de freinage F limité par la surface totale de la feuille ($S_{tot,l}$), ou en empêchant un site d'être plusieurs fois contaminé. Une liste non exhaustive des paramètres et variables qu'il faudrait prendre en compte est proposée en annexe (annexe 1).

2.1.3 Modélisation de la dynamique temporelle de la population pathogène

La durée d'un cycle asexué serait définie dans le modèle sur la base d'une période de latence standard de 350 degrés jours, soit 21 jours printaniers (température moyenne comprise entre 16 et 17°C ; Lovell *et al.*, 2004 ; Suffert & Thompson, 2018). Cette durée est considérée comme suffisante pour que les processus biologiques constitutifs d'un épisode infectieux complet aient lieu : dépôt d'inoculum, développement de nouvelles lésions, sporulation et dispersion. Les conditions d'initialisation du premier cycle asexué et les processus déterminant l'enchaînement des cycles suivants sont décrits ci-dessous.

Le modèle se décomposerait en une initialisation (Figure IV.4a), puis en un transfert (Figure IV.4b) d'unités de contaminations virulente ou avirulente (depuis l'émission d'une feuille source jusqu'au dépôt sur feuille puits) en incrémentant les différents compartiments d'un modèle SIR à l'échelle de la feuille. Enfin chaque cycle serait itéré après une période de latence. L'intégration à l'échelle du couvert végétale pourraient s'effectuer à partir de la méthode de Monte Carlo.

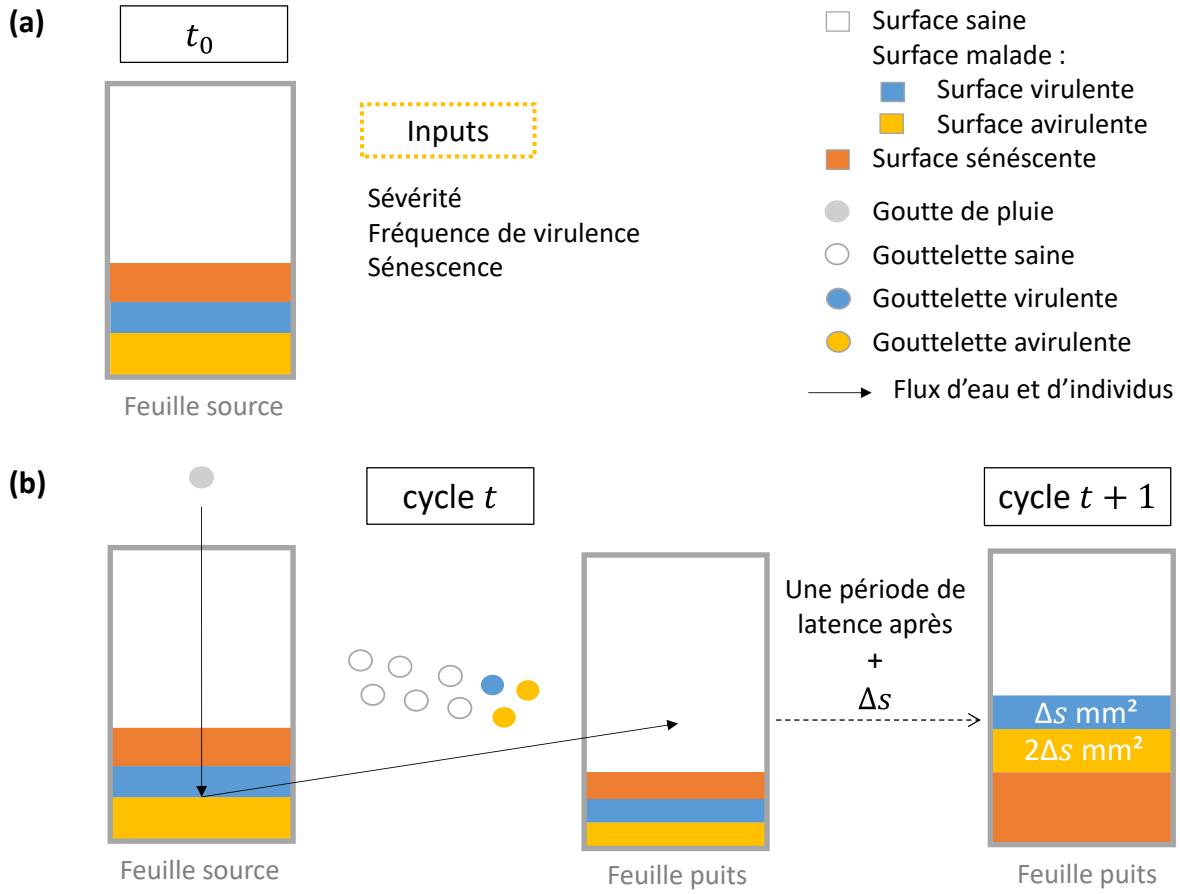


***Figure IV.4**. Représentation schématique **(a)** de l'initialisation de l'état sanitaire d'une feuille de blé dans le couvert (feuille « source ») et **(b)** du transfert d'unités de contamination (gouttelettes) depuis cette feuille vers une feuille « puits » suite à l'impact d'une goutte de pluie sur la feuille source.* Les conditions d'initialisation des surfaces saine, malade est sénescente de la feuille source sont définies par l'utilisateur (inputs) à t_0. Leur évolution entre le cycle t et le cycle $t+1$, suite à l'interception d'unités de contaminations et après une période de latence est illustrée.

2.2 MODULE INTER-EPIDEMIQUE (PHASE SEXUEE)

Ce module simulerait la phase de reproduction sexuée de la population de *Z. tritici* présente sur les résidus de culture pendant la phase inter-épidémique, à l'origine de la population de descendants considérés comme en partie responsables de l'initiation de l'épidémie suivante. Comme pour le module épidémique, cette population serait caractérisée par sa taille (nombre d'individus) et sa composition (fréquence d'individus virulents). Les populations présentes sur chacune des deux variétés seraient distinguées. Le module inter-épidémique ne nécessiterait pas pour autant une représentation spatialisée du couvert (ou de ce qu'il en reste, sur le sol). Seraient néanmoins distingués les processus ayant lieu sur la variété sensible (« compartiment sensible ») et sur la variété résistante (« compartiment résistant »). Dans le chapitre III, différentes combinaisons de croisement impliquant des individus

virulents ('vir') et/ou avirulents ('avr') ont été mises en évidence : vir × vir, vir × avr et avr × avr. Plusieurs mécanismes, s'appuyant sur la littérature, ont été proposés pour expliquer les résultats obtenus : maintien des individus avirulents dans ou sur les plantes résistantes (croissance épiphyte, sensibilité induite, infection asymptomatique avec un développement de *Z. tritici* limité à l'apoplaste). Différents scénarios, basés sur l'origine des individus parentaux (résidus voisins ou distants) et sur la temporalité de leur arrivée sur les tissus végétaux hôtes (avant ou après sénescence), ont également été élaborés. Le module inter-épidémique intègrerait les conséquences démogénétiques de ces différentes hypothèses (Figure IV.5). Sa structure reflèterait un découpage en deux étapes clés : une étape décrivant les flux d'individus parentaux potentiellement impliqués dans la reproduction sexuée (2.2.1) et une étape de croisement sensu stricto entre les différents individus parentaux en présence (2.2.2).

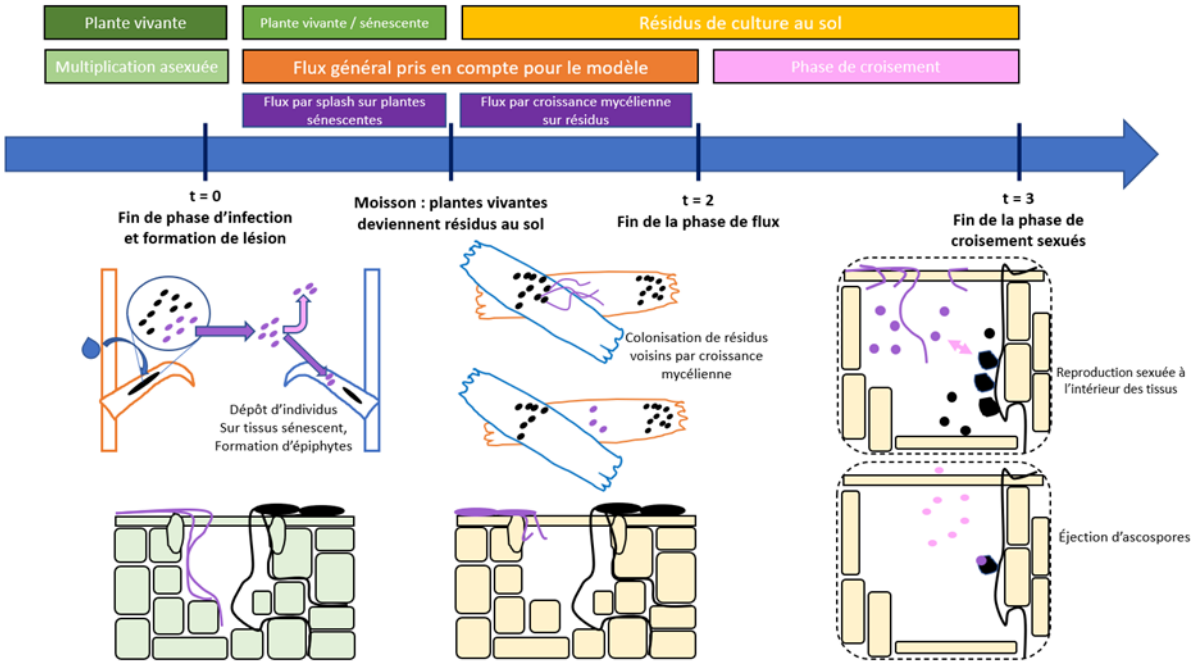


Figure IV.5. *Représentation des différents mécanismes impliqués dans la reproduction sexuée. Les schémas du bas illustrent les différents modes développement d'un couple parental de Zymoseptoria tritici au cours d'un cycle infectieux.* En violet : les individus épiphytes ou dont la colonisation dans les tissus serait limitée à l'apoplaste et asymptomatique. En rose : les descendants (ascospores). En noir et violets à l'intérieur des tissus, les organes reproducteurs mâles et femelles (Lageyre, 2020).

2.2.1 Simulation des flux d'individus à l'origine de la population parentale

L'étape décrivant les flux d'individus à l'origine de la population parentale aurait pour point de départ la situation prévalant à l'issue du dernier épisode de dispersion (module épidémique) : la taille et la composition de la population pathogène parentale présente sur chaque variété (compartiment sensible et résistant) serait alors considérée comme « figée » à l'issu de cette ultime étape de dispersion sans que l'étape d'infection n'aille à son terme. Juste avant la constitution des résidus de culture, la population parentale présente sur chaque variété serait alors constituée :

(1) *d'individus « infectants » ayant provoqué des symptômes :* individus ayant réussi à infecter les tissus végétaux et à provoquer des symptômes visibles.

(2) *d'individus « épiphytes » (présents à la surface des feuilles) et/ou « infectants asymptomatiques » (présents dans l'apoplaste)* : individus n'ayant pas eu le temps de provoquer des symptômes compte tenu d'une sénescence naturelle intervenue avant la fin de l'étape d'infection (des individus virulents sur la variété résistante et des individus virulents et avirulents sur la variété sensible) et individus n'ayant pas réussi à infecter les tissus (grande majorité des individus avirulents sur la variété résistante) mais ayant été capables d'y subsister jusqu'à pouvoir participer à la reproduction sexuée.

La population parentale constituée d'individus « infectants » serait considérée comme directement accessible via les données expérimentales acquises en fin d'épidémie (t2 ; chapitre I). Une fois les résidus de cultures constitués et entrés en contact avec le sol, il faudrait considérer qu'un ultime flux d'individus parentaux pourrait se produire. Ce flux correspondrait aux « contaminations » des résidus mises en évidence dans le chapitre III : par contacts physiques directs entre résidus voisins (intra-parcelle), mais aussi par des dépôts d'ascospores issues d'autres résidus de culture distants (hors parcelle). Chacun de ces deux processus expliquerait donc la présence :

(3) *d'individus parentaux provenant de résidus « voisins ».*

(4) *d'individus parentaux provenant de résidus « lointains ».*

Ces deux derniers flux, très difficilement quantifiables, pourrait être négligés dans l'attente de nouveaux résultats expérimentaux.
Pour prendre au mieux en compte la diversité des scénarios de croisement mis en évidence expérimentalement dans les chapitres II et III, le module inter-épidémique

simulerait la présence des quatre sous-population précédemment identifiées (Figure IV.6), définie chacune par leur taille (nombre d'individus parentaux) et leur composition (fréquence d'individus virulents).

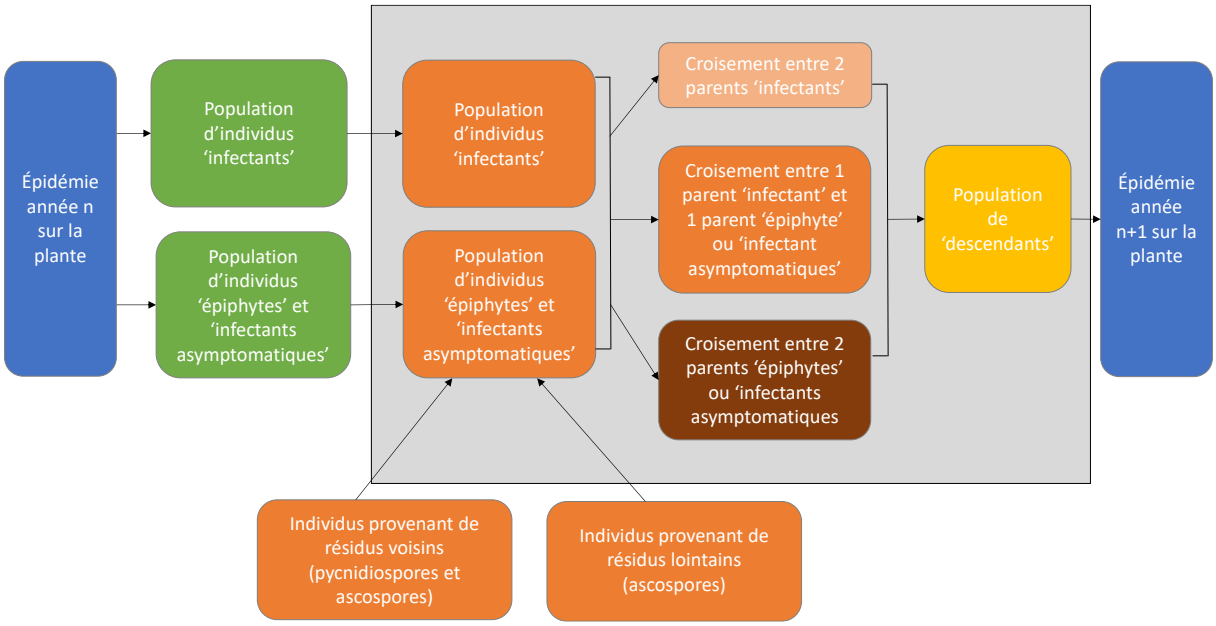


***Figure IV.6**. Représentation des interactions et processus impliqués dans la modélisation de la reproduction sexuée, de la fin d'une épidémie l'année n au début de l'épidémie de l'année n + 1* (d'après Lageyre, 2020).

Simulation des croisements entre individus parentaux à l'origine de la population de descendants

L'étape de croisement proprement dite entre les différents individus parentaux en présence prendrait en compte la taille de population et la fréquence de virulence. Comme dans le chapitre I, la combinaison entre les deux variables quantitatives et qualitatives permettrait de calculer un nombre de descendants virulents et avirulents sur chacune des deux variétés, et donc à l'échelle globale du couvert, en prenant en compte la proportion de chaque variété. Pour cette étape de croisement, deux déterminants biologiques seraient considérés : (i) la probabilité de « rencontre » - et donc de contact physique - entre individus ; (ii) la proportion de descendants virulents et avirulents issus de chaque type de croisement ('vir × vir', 'vir × avr', 'avr × avr').

Le premier déterminant serait la taille de chaque sous-population virulente et avirulente. Le modèle devrait prendre en compte la relation densité-dépendance entre la taille de population parentale (sévérité) et la taille de population recombinante (nombre d'ascospores produites), comme cela a été mis en évidence expérimentalement au champ (Eriksen & Munk, 2003) et estimé plus finement en conditions contrôlées (Suffert *et al.*, 2018a).

Le second déterminant serait plus simple à caractériser dès lors que la proportion d'individus virulents au sein de la population parentale serait connue et que l'on ferait l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg : la proportion de descendants virulents et avirulents issus de chaque croisement serait identique à celle de la population parentale.

Pour aller plus loin

L'hypothèse que le succès reproducteur de deux individus parentaux, *i.e.* l'intensité de l'ascosporogénèse, est toujours le même est simplificatrice car il est probable que les individus parentaux présents de manière épiphytes aient une probabilité de rencontre moins importante que les individus infectants, d'autant plus s'ils sont avirulents. Le module pourrait également intégrer des différences du succès reproducteur en fonction de l'origine des individus parentaux.

Conclusion

Dans ma thèse j'ai évalué l'impact d'une parcelle de blé génétiquement hétérogène, cultivée en association variétale, sur la dynamique d'adaptation d'une population pathogène de *Z. tritici* à une résistance variétale qualitative en cours de contournement à l'échelle annuelle. Les résultats de mes travaux montrent qu'en plus de diminuer la sévérité d'une maladie, les associations peuvent être utiles pour réduire la transmission d'une virulence (chapitre I et II). La reproduction sexuée peut même faire persister cet effet jusqu'à l'épidémie suivante du fait de l'implication de souches avirulentes, conduisant à une « dilution » de la virulence dans la population de descendants (chapitre II et chapitre III). L'évolution de la population pathogène au sein d'une association variétale a été caractérisée aux échelles de la parcelle et de l'année. Cependant, pour évaluer quel pourrait être l'impact d'une généralisation de ce type de stratégie de déploiement sur l'évolution d'une population pathogène et sur la durabilité des gènes de résistance utilisés, il est indispensable de changer de référentiel et d'échelle. Le passage à l'échelle pluriannuelle, compte tenu de la récurrence des épidémies de septoriose, et à l'échelle du paysage, compte tenu de la capacité de dispersion des ascospores de *Z. tritci*, reste un défi conceptuel et méthodologique. Des approches de modélisation peuvent être développées dans ce sens, mais doivent s'appuyer sur des données expérimentales. Cela reviendrait à prendre en compte la contribution de l'ensemble des sous-populations provenant des parcelles de blé à l'inoculum primaire impliqué dans l'initiation de l'épidémie suivante, et à intégrer cet effet dans le temps.

Pour savoir si les associations variétales permettraient de ralentir le contournement d'une résistance, il est nécessaire de comprendre l'évolution de la population pathogène à de plus larges échelles spatio-temporelles. Cela implique d'examiner l'impact du « *cropping ratio* », défini comme la proportion de parcelles de blé cultivées avec une variété portant un gène de résistance, en distinguant les cultures pures des associations, et de parcelles de blé totales d'un paysage (van den Bosch & Gilligan, 2003 ; Fabre *et al.*, 2012 ; Rimbaud *et al.*, 2018). Cela implique également d'estimer la part de la population pathogène issue de la parcelle en association qui contribue à la population pathogène globale à laquelle est exposée un paysage dans son ensemble. Combien de spores issues d'une parcelle constituent l'inoculum primaire à l'origine de l'épidémie suivante (taille de la population locale) ? Comment évolue la fréquence d'individus virulents à l'échelle du paysage (composition de la population locale) ? Comment se réparti l'inoculum primaire dans les différentes parcelles du paysage au début de l'épidémie suivante ? Telles sont les nouvelles questions de recherche, déjà abordées dans le cas de *Z. tritici* (*e.g.* Fraaije *et al.*, 2005 ; Morais *et al.*, 2016), qui pourraient émerger de ce travail de thèse. Pouvoir y répondre implique d'estimer des flux d'individus entre parcelles, caractérisées par leur degré de connectivité (Taylor *et*

al., 1993), leur agencement spatial, et l'intensité d'utilisation des résistances à l'échelle du paysage (Plantegenest *et al.*, 2007 ; Mundt, 2014 ; Fabre *et al.*, 2015 ; Papaïx *et al.*, 2018). Une forte connectivité entre parcelles pourrait atténuer les effets de la dérive génétique intra-parcellaire et aboutirait à une population génétiquement plus homogène à l'échelle du paysage (Barrett *et al.*, 2008). Les mécanismes épidémiologiques et évolutifs à l'œuvre dans les associations qui modifient la structure d'une population pathogène, en termes de virulences, ont rarement été étudiés expérimentalement à des échelles pluriannuelles. Expérimenter à cette échelle de temps nécessiterait, a minima, de mettre en place un essai dans une parcelle agricole et d'estimer les effets des parcelles environnantes (*e.g.* Morais *et al.*, 2016). Il semble finalement plus envisageable d'étudier l'impact de ces mécanismes par des approches de modélisation, où la portée des parcelles environnantes peut être définie. Par exemple, certaines simulations suggèrent que les associations, comparées à d'autres stratégies visant à prévenir ou à retarder l'apparition d'individus multi-virulents, sont plus efficaces à long terme dans le cas des agents pathogènes présentant des taux de mutation et des coûts de fitness à la virulence élevés (Rimbaud *et al.*, 2018 ; Créte *et al.*, 2020). De telles approches théoriques sont fortement dépendantes du paramétrage du modèle (basé sur les traits de l'agents pathogène considéré : capacité de dispersion, modes de reproduction, taille de population), mais aussi des processus épidémiologiques et des mécanismes biologiques sous-jacents qui le structurent. Or, les expérimentations menées dans cette thèse ont montré que certains processus, inattendus, étaient susceptibles de jouer un rôle majeur.

S'il existe peu d'éléments expérimentaux dans la littérature permettant d'évaluer la capacité des associations de variétés commerciales à prolonger la durée de vie des résistances, les exemples historiques de diversification intra-spécifique mobilisée à l'échelle pluriannuelle suggèrent que cette hypothèse est réaliste (Zhu *et al.*, 2000). Les déterminants de cette durabilité sont explorés dans d'autres cas que le blé. Ainsi, dans le cas de la pyriculariose, l'association intra-parcellaire de variétés de riz traditionnelles, utilisée pourtant depuis plusieurs centaines d'années, a empêché l'apparition d'individus multi-virulents et fortement réduit l'impact de la maladie (Fournier *et al.*, 2021).

Pour conclure, compte tenu des défis démographiques, environnementaux et climatiques du XXI siècle, il est crucial d'explorer et comprendre les pratiques de diversification culturale (associations, variétés traditionnelles, etc.) à différentes échelles qui permettraient d'augmenter la durabilité des résistances variétales. Ces résistances doivent être considérées, comme suggéré par plusieurs auteurs, comme un « bien commun » à préserver.

RÉFÉRENCES

Agrios GN, 2005. *Plant Pathology*. Elsevier.

Alby K, Schaefer D, Bennett RJ, 2009. Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* **460**, 890-U127.

Altieri M, 1995. *Agroecology. The science of sustainable agriculture*. London: ITP.

Altieri MA, 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In: Paoletti MG, ed. *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes*. Amsterdam: Elsevier, 19–31.

Anderson RM, 1991. Discussion: The Kermack-McKendrick epidemic threshold theorem. *Bulletin of Mathematical Biology* **53**, 1.

Arraiano LS, Brown JKM, 2006. Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology* **55**, 726–738.

Barot S, Allard V, Cantarel A *et al.*, 2017. Designing mixtures of varieties for multifunctional agriculture with the help of ecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **37**, 13.

Barrett LG, Thrall PH, Burdon JJ, Linde CC, 2008. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 678–685.

Barrett LG, Zala M, Mikaberidze A *et al.*, 2021. Mixed infections alter transmission potential in a fungal plant pathogen. *Environmental Microbiology* **23**, 2315–2330.

Bayles R, Flath K, Hovmøller M, De Vallavieille-Pope C, 2000. Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* **20**, 805–811.

Beillouin D, Ben-Ari T, Malezieux E, Seufert V, Makowski D, 2021. Positive but variable effects of crop diversification on biodiversity and ecosystem services. *Global Change Biology* **27**, 4697–4710.

Ben M'Barek S, Karisto P, Abdedayem W *et al.*, 2020. Improved control of septoria tritici blotch in durum wheat using cultivar mixtures. *Plant Pathology* **69**, 1655–1665.

Bennett RJ, Turgeon BG, 2016. Fungal sex: the ascomycota. *Microbiology Spectrum*.

Bergelson J, Dwyer G, Emerson JJ, 2001. Models and data on plant-enemy coevolution. *Annual Review of Genetics* **35**, 469–499.

Bernard F, Sache I, Suffert F, Chelle M, 2013. The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature! *New Phytologist* **198**, 232–240.

Bertazzoni S, Williams AH, Jones DA, Syme RA, Tan K-C, Hane JK, 2018. Accessories make the outfit: accessory chromosomes and other dispensable DNA regions in plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* **31**, 779–788.

Bistis GN, 1983. Evidence for diffusible, mating-type-specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology* **7**, 292–295.

Biswas K, Morschhäuser J, 2005. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **56**, 649–669.

Boixel A-L, 2020. *Environmental heterogeneity, a driver of adaptation to temperature in foliar plant pathogen populations? Thèse de doctorat* Thesis. France: Université Paris-Saclay.

Boixel A-L, Chelle M, Suffert F, 2022a. Patterns of thermal adaptation in a globally distributed plant pathogen: Local diversity and plasticity reveal two-tier dynamics. *Ecology and Evolution* **12**, e8515.

Boixel A-L, Gélisse S, Marcel TC, Suffert F, 2022b. Differential tolerance of *Zymoseptoria tritici* to altered optimal moisture conditions during the early stages of wheat infection. *Journal of Plant Pathology*.

Bonnefoy N, 2012. *Rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement*. Enregistré à la présidence du Sénat le 10 octobre 2012.

Bonneuil C, Thomas F, 2009. *Gènes, pouvoirs et profits. recherche publique et régimes de production des savoirs de mendel aux OGM*. Quae-ECLM.

Bonnin I, Bonneuil C, Goffaux R, Montalent P, Goldringer I, 2014. Explaining the decrease in the genetic diversity of wheat in France over the 20th century. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **195**, 183–192.

Borg J, Kiaer LP, Lecarpentier C, Goldrienger I, Saint-Jean S, Enjalbert S, 2018. Unfolding the potential of wheat cultivar mixtures: A meta-analysis perspective and identification of knowledge gaps. *Field Crops Research* **221**, 298–313.

van den Bosch F, Gilligan CA, 2003. Measures of durability of resistance. *Phytopathology* **93**, 616–625.

Bousset L, Chèvre A-M, 2012. Controlling cyclic epidemics on the crops of the agroecosystems: articulate all the dimensions in the formalisation, but look for a local solution. *Journal of Botany* **2012**, e938218.

Bousset L, Ermel M, Lebreton L, 2018. The full life cycle of *Leptosphaeria maculans* completed on inoculated oilseed rape incubated under controlled conditions. *Plant Pathology* **67**, 1321–1328.

Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ, Brown JKM, 2002. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria tritici blotch pathogen. *Phytopathology* **92**, 439–445.

Brennan CJ, Benbow HR, Mullins E, Doohan FM, 2019. A review of the known unknowns in the early stages of septoria tritici blotch disease of wheat. *Plant Pathology* **68**, 1427–1438.

Brokenshire T, 1976. The reaction of wheat genotypes to Septoria tritici. *Annals of Applied Biology* **82**, 415–423.

Brown JKM, 2015. Durable resistance of crops to disease: a darwinian perspective. In: VanAlfen NK, ed. *Annual Review of Phytopathology, Vol 53*. Palo Alto: Annual Reviews, 513–539.

Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C, 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 33–41.

Brown J, Kellock A, Paddick R, 1978. Distribution and dissemination of *Mycosphaerella-graminicola* (fuckel) schroeter in relation to epidemiology of speckled leaf blotch of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **29**, 1139–1145.

Brown RA, Rosenberg NJ, 1999. Climate change impacts on the potential productivity of corn and winter wheat in their primary United States growing regions. *Climatic Change* **41**, 73–107.

Brown JKM, Tellier A, 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 345–367.

Brun S, Kuo H-C, Jeffree CE, Thomson DD, Read N, 2021. Courtship ritual of male and female nuclei during fertilization in *Neurospora crassa*. *Microbiology Spectrum*.

Burdon JJ, Barrett LG, Rebetzke G, Thrall PH, 2014. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications* **7**, 609–624.

Burdon JJ, Laine A-L, 2019. *Evolutionary Dynamics of Plant & Pathogen Interactions*. Cambridge University Press.

Calonnec A, Cartolaro P, Naulin J-M, Bailey D, Langlais M, 2008. A host-pathogen simulation model: powdery mildew of grapevine. *Plant Pathology* **57**, 493–508.

Calonnec A, Goyeau H, de VallaviellePope C, 1996. Effects of induced resistance on infection efficiency and sporulation of *Puccinia striiformis* on seedlings in varietal mixtures and on field epidemics in pure stands. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 733–741.

Castilla NP, Willocquet L, Suwarno S *et al.*, 2010. Assessing the effect of resistant-susceptible associations and determining thresholds for associations in suppressing leaf and neck blast of rice. *Crop Protection* **29**, 390–400.

Charlesworth B, 2009. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics* **10**, 195–205.

Chartrain L, Brading PA, Brown JKM, 2005. Presence of the Stb6 gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in cultivars used in wheat-breeding programmes worldwide. *Plant Pathology* **54**, 134–143.

Chartrain L, Brading PA, Widdowson JP, Brown JKM, 2004. Partial resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars arina and riband. *Phytopathology* **94**, 497–504.

Chen R, Boeger J, Mcdonald B, 1994. Genetic stability in a population of a plant-pathogenic fungus over time. *Molecular Ecology* **3**, 209–218.

Chen RS, McDonald BA, 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics* **142**, 1119–1127.

Chin K, Wolfe M, 1984. Selection on *Erysiphe graminis* in pure and mixed stands of barley. *Plant Pathology* **33**, 535–545.

Choudhuri S, 2014. Chapter 2 - Fundamentals of molecular evolution. In: Choudhuri S, ed. *Bioinformatics for Beginners*. Oxford: Academic Press, 27–53.

Chu B, Yuan K, Wang C *et al.*, 2021. Effects of wheat cultivar mixtures on population genetic structure of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *PhytoFrontiers*^{TM}.

Clin P, Grognard F, Mailleret L, Val F, Andrivon D, Hamelin F, 2020. Taking advantage of pathogen diversity and immune priming to minimize disease prevalence in host mixtures: a model. *Phytopathology*.

Cohen L, Eyal Z, 1993. The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with Septoria tritici. *Plant Pathology* **42**, 737–743.

Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ, 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. In: VanAlfen NK, ed. *Annual Review of Phytopathology, Vol 53*. Palo Alto: Annual Reviews, 541–563.

Cowger C, Brown JKM, 2019. Durability of quantitative resistance in crops: Greater than we know? *Annual Review of Phytopathology* **57**, 253–277.

Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC, 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* **49**, 445–451.

Cowger C, McDonald BA, Mundt CC, 2002. Frequency of sexual reproduction by *Mycosphaerella graminicola* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 1175–1181.

Cowger C, Mundt CC, 2002a. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 624–630.

Cowger C, Mundt CC, 2002b. Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of Septoria tritici blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **92**, 617–623.

Cox CM, Garrett KA, Bowden RL, Fritz AK, Dendy SP, Heer WF, 2004. Cultivar mixtures for the simultaneous management of multiple diseases: Tan spot and leaf rust of wheat. *Phytopathology* **94**, 961–969.

Crété R, Pires RN, Barbetti MJ, Renton M, 2020. Rotating and stacking genes can improve crop resistance durability while potentially selecting highly virulent pathogen strains. *Scientific Reports* **10**, 19752.

Dangl JL, Jones JDG, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.

Dawkins R, Krebs JR, 1979. Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **205**, 489–511.

Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P, 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. John Wiley & Sons, Ltd, 499–535.

Debuchy R, Turgeon BG, 2006. Mating-type structure, evolution, and function in Euascomycetes. In: Kües U,, Fischer R, eds. *Growth, Differentiation and Sexuality*. The Mycota. Berlin, Heidelberg: Springer, 293–323.

Delmas CEL, Fabre F, Jolivet J *et al.*, 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evolutionary Applications* **9**, 709–725.

Dileone J, Mundt C, 1994. Effect of wheat cultivar mixtures on populations of *Puccinia striiformis* races. *Plant Pathology* **43**, 917–930.

Djidjou-Demasse R, Moury B, Fabre F, 2017. Mosaics often outperform pyramids: insights from a model comparing strategies for the deployment of plant resistance genes against viruses in agricultural landscapes. *New Phytologist* **216**, 239–253.

Dodds PN, Rathjen JP, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.

Duncan KE, Howard RJ, 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* **104**, 1074–1082.

Dutt A, Anthony R, Andrivon D *et al.*, 2021. Competition and facilitation among fungal plant parasites affect their life-history traits. *Oikos* **130**, 652–667.

Duvivier M, Dedeurwaerder G, De Proft M, Moreau J-M, Legreve A, 2013. Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *European Journal of Plant Pathology* **137**, 325–341.

El Chartouni L, Tisserant B, Siah A *et al.*, 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* **103**, 764–774.

El Wazziki H, El Yousfi B, Serghat S, 2015. Contributions of three upper leaves of wheat, either healthy or inoculated by *Bipolaris sorokiniana*, to yield and yield components. *Australian Journal of Crop Science* **9**, 629–637.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.

Eriksen L, Munk L, 2003. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph Septoria tritici in winter wheat during the growing season. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 253–259.

Eriksen L, Shaw MW, Østergård H, 2001. A model of the effect of pseudothecia on genetic recombination and epidemic development in populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology®* **91**, 240–248.

Eyal Z, 1999. The septoria tritici and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 629–641.

Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM, Ginkel M van, 1987. *The septoria diseases of wheat. Concepts and methods of disease management*. CIMMYT.

Fabre F, Bruchou C, Palloix A, Moury B, 2009. Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Research* **141**, 140–149.

Fabre F, Burie J-B, Ducrot A, Lion S, Richard Q, Djidjou-Demasse R, 2022. An epi-evolutionary model for predicting the adaptation of spore-producing pathogens to quantitative resistance in heterogeneous environments. *Evolutionary Applications* **15**, 95–110.

Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B, 2012. Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist* **193**, 1064–1075.

Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B, 2015. Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. *Evolutionary Applications* **8**, 919–932.

Fantozzi E, Kilaru S, Gurr SJ, Steinberg G, 2021. Asynchronous development of *Zymoseptoria tritici* infection in wheat. *Fungal Genetics and Biology* **146**, 103504.

Finckh MR, 2008. Integration of breeding and technology into diversification strategies for disease control in modern agriculture. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 399–409.

Finckh M, Gacek E, Goyeau H *et al.*, 2000. Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance. *Agronomie* **20**, 813–837.

Finckh MR, Wolfe MS, 1997. The use of biodiversity to restrict plant diseases and some consequences for farmers and society. In: *Ecology in Agriculture*. Elsevier, 203–237.

Flor HH, 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. In: Demerec M, ed. *Advances in Genetics*. Academic Press, 29–54.

Fones HN, Eyles CJ, Kay W, Cowper J, Gurr SJ, 2017. A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* **106**, 51–60.

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

Fortune JA, Qi A, Ritchie F, Dewage CSK, Fitt BDL, Huang Y-J, 2021. Effects of cultivar resistance and fungicide application on stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*) and potential interseasonal transmission of *Leptosphaeria* spp. inoculum. *Plant Pathology* **70**, 2115–2124.

Fournier C, Andrieu B, Ljutovac S, Saint-Jean S, 2003. ADEL-Wheat: a 3D architectural model of wheat development. In: Hu, B.-G., Jaeger, M. eds. *Plant Growth Modeling and Applications*. Springer Verlag, 54–63.

Fournier E, Hannachi M, Morel J-B, 2021. Les terrasses rizicoles du Yuanyang : un cas exceptionnel de gestion durable des maladies. In: *L'immunité des plantes: pour des cultures résistantes aux maladies*. 283–295.

Fraaije BA, Cools HJ, Fountaine J *et al.*, 2005. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **95**, 933–941.

Francisco CS, Ma X, Zwyssig MM, McDonald BA, Palma-Guerrero J, 2019. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Scientific Reports* **9**, 1–18.

Garnault M, Duplaix C, Leroux P *et al.*, 2019. Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Management Science* **75**, 1794–1807.

Garrett KA, Mundt CC, 1999. Epidemiology in mixed host populations. *Phytopathology* **89**, 984–990.

Ghaffary SMT, Faris JD, Friesen TL *et al.*, 2012. New broad-spectrum resistance to Septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 125–142.

Gigot C, Saint-Jean S, Huber L *et al.*, 2013. Protective effects of a wheat cultivar mixture against splash-dispersed Septoria tritici blotch epidemics. *Plant Pathology* **62**, 1011–1019.

Gigot C, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2014. Using virtual 3-D plant architecture to assess fungal pathogen splash dispersal in heterogeneous canopies: a case study with cultivar mixtures and a non-specialized disease causal agent. *Annals of Botany* **114**, 863–876.

Gómez P, Rodríguez-Hernández AM, Moury B, Aranda MA, 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 1–22.

Goyeau H, Halkett F, Le Cam B, Montarry J, Le May C, 2021. Les contournements de résistance : Mécanismes, dynamiques et conséquences. In: *L'immunité des plantes: Pour des cultures résistantes aux maladies*. France: Editions Quae.

Guttman DS, McHardy AC, Schulze-Lefert P, 2014. Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions. *Nature Reviews Genetics* **15**, 797–813.

Hajjar R, Jarvis DI, Gemmill-Herren B, 2008. The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **123**, 261–270.

Halama P, Lacoste L, 1992. Determinism of sexual reproduction of *Phaeosphaeria (leptosphaeria) nodorum* as cause of wheat septoriosis .2. Influence of temperature and light. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **70**, 1563–1569.

Halkett F, Lannou C, Le May C, Montarry J, Papaix JJ, Ravigné V, 2021. L'adaptation des agents pathogènes de plantes aux systèmes cultivés : une évolution sous contraintes anthropiques. In: *L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies*. Editions Quae, 125–134.

Hallsson LR, Bjorklund M, 2012. Selection in a fluctuating environment leads to decreased genetic variation and facilitates the evolution of phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 1275–1290.

Hamelin FM, Castel M, Poggi S, Andrivon D, Mailleret L, 2011. Seasonality and the evolutionary divergence of plant parasites. *Ecology* **92**, 2159–2166.

Hardoim PR, Overbeek LS van, Berg G *et al.*, 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.

Hazell P, Wood S, 2008. Drivers of change in global agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **363**, 495–515.

Hernandez-Jerez AF, Adriaanse P, Aldrich A *et al.*, 2020. Statement on the translocation potential by *Pseudomonas chlororaphis* MA342 in plants after seed treatment of cereals and peas and assessment of the risk to humans. *Efsa Journal* **18**, 6276.

Hess D, Shaner G, 1987. Effect of moisture and temperature on development of septoria tritici blotch in wheat. *Phytopathology* **77**, 215–219.

Hirano SS, Upper CD, 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 624–653.

Hondrade RF, Hondrade E, Zheng L *et al.*, 2017. Cropping system diversification for food production in Mindanao rubber plantations: a rice cultivar mixture and rice intercropped with mungbean. *PeerJ* **5**, e2975.

Hooper DU, Chapin III FS, Ewel JJ *et al.*, 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**, 3–35.

Hovmøller MS, Justesen AF, 2007. Rates of evolution of avirulence phenotypes and DNA markers in a northwest European population of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology* **16**, 4637–4647.

Huang C, Sun Z, Wang H, Luo Y, Ma Z, 2011. Spatiotemporal effects of cultivar mixtures on wheat stripe rust epidemics. *European Journal of Plant Pathology* **131**, 483–496.

Huang C, Sun Z, Wang H, Luo Y, Ma Z, 2012. Effects of wheat cultivar mixtures on stripe rust: A meta-analysis on field trials. *Crop Protection* **33**, 52–58.

Huber L, Madden LV, Fitt BDL, 2006. Environmental biophysics applied to the dispersal of fungalspores by rain-splash. In: COOKE BM, JONES DG, KAYE B, eds. *The Epidemiology of Plant Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, 417–444.

Hunter T, Coker RR, Royle DJ, 1999. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* **48**, 51–57.

Jeger M, Griffiths E, Jones D, 1981a. Disease progress of non-specialized fungal pathogens in intraspecific mixed stands of cereal cultivars .1. Models. *Annals of Applied Biology* **98**, 187–198.

Jeger M, Jones D, Griffiths E, 1981b. Disease progress of non-specialized fungal pathogens in intraspecific mixed stands of cereal cultivars .2. Field experiments. *Annals of Applied Biology* **98**, 199–210.

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

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

Kaltz O, Shykoff JA, 1998. Local adaptation in host–parasite systems. *Heredity* **81**, 361–370.

Kanyuka K, Rudd JJ, 2019. Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Current Opinion in Plant Biology* **50**, 1–8.

Karisto P, Hund A, Yu K *et al.*, 2018. Ranking quantitative resistance to septoria tritici blotch in elite wheat cultivars using automated image analysis. *Phytopathology®* **108**, 568–581.

Karisto P, Suffert F, Mikaberidze A, 2021. Measuring splash dispersal of a major wheat pathogen in the field. *PhytoFrontiers™*, PHYTOFR-05-21-0039-R.

Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS, 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* **9**, 485–498.

Keitt GW, Palmiter DH, 1937. Heterothallism in *Venturia inaequalis*. *Science*.

Kema GHJ, Annone JG, 1991. In vitro production of pycnidia by Septoria tritici. *Plant Pathology* **97**, 65–72.

Kema GHJ, Gohari AM, Aouini L *et al.*, 2018. Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nature Genetics* **50**, 375–380.

Kema GHJ, van Silfhout CH, 1997. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem. III. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* **87**, 266–272.

Kema GHJ, Verstappen ECP, Todorova M, Waalwijk C, 1996a. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in Mycosphaerella graminicola. *Current Genetics* **30**, 251–258.

Kema GHJ, Yu DZ, Rijkenberg FHJ, Shaw MW, Baayen RP, 1996b. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* **86**, 777–786.

Kerdraon L, Laval V, Suffert F, 2019. Microbiomes and pathogen survival in crop residues, an ecotone between plant and soil. *Phytobiomes Journal* **3**, 246–255.

Kermack WO, McKendrick AG, 1927. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society of London.Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **115**, 700–721.

Kiær LP, Skovgaard IM, Østergård H, 2009. Grain yield increase in cereal variety mixtures: A meta-analysis of field trials. *Field Crops Research* **114**, 361–373.

Kildea S, Byrne JJ, Cucak M, Hutton F, 2020. First report of virulence to the Septoria tritici blotch resistance gene *Stb16q* in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *New Disease Reports* **41**, 13–13.

Kogel K-H, Franken P, Hückelhoven R, 2006. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 358–363.

Kolmer JA, 1995. Selection of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* virulence phenotypes in three multilines of Thatcher wheat lines near isogenic for leaf rust resistance genes. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1081–1088.

Kremen C, 2020. Ecological intensification and diversification approaches to maintain biodiversity, ecosystem services and food production in a changing world. *Emerging Topics in Life Sciences* **4**, 229–240.

Kristoffersen R, Bonde Eriksen L, Cordsen Nielsen G, Jørgensen JR, Jørgensen LN, 2021. Management of Septoria tritici blotch using cultivar mixtures. *Plant Disease*.

Kristoffersen R, Heick TM, Müller GM, Eriksen LB, Nielsen GC, Jørgensen LN, 2020a. The potential of cultivar mixtures to reduce fungicide input and mitigate fungicide resistance development. *Agronomy for Sustainable Development* **40**, 36.

Kristoffersen R, Jørgensen LN, Eriksen LB, Nielsen GC, Kiær LP, 2019. Control of Septoria tritici blotch by winter wheat cultivar mixtures: Meta-analysis of 19 years of cultivar trials. *bioRxiv*, 658575.

Kristoffersen R, Jørgensen LN, Eriksen LB, Nielsen GC, Kiær LP, 2020b. Control of Septoria tritici blotch by winter wheat cultivar mixtures: Meta-analysis of 19 years of cultivar trials. *Field Crops Research* **249**, 107696.

Lageyre J, 2020. *Modélisation de l'impact de la période inter-épidémique sur l'évolution locale de populations de* Zymoseptoria tritici. Montpellier: Institut Agro - AgroCampusOuest.

Laine A-L, Barrès B, 2013. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathology* **62**, 96–105.

Laine A-L, Hanski I, 2006. Large-scale spatial dynamics of a specialist plant pathogen in a fragmented landscape. *Journal of Ecology* **94**, 217–226.

Langlands-Perry C, Cuenin M, Bergez C *et al.*, 2022. Resistance of the wheat cultivar 'renan' to septoria leaf blotch explained by a combination of strain specific and strain non-specific qtl mapped on an ultra-dense genetic map. *Genes* **13**, 100.

Lannou C, 2001. Intrapathotype diversity for aggressiveness and pathogen evolution in cultivar mixtures. *Phytopathology* **91**, 500–510.

Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Phytopathology* **50**, 319–38.

Lannou C, De Vallavieille-Pope C, Goyeau H, 1995. Induced resistance in host mixtures and its effect on disease control in computer-simulated epidemics. *Plant Pathology* **44**, 478–489.

Lannou C, Hubert P, Gimeno C, 2005. Competition and interactions among stripe rust pathotypes in wheat-cultivar mixtures. *Plant Pathology* **54**, 699–712.

Lannou C, Mundt CC, 1997. Evolution of a pathogen population in host mixtures: Rate of emergence of complex races. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 991–999.

Launay M, Caubel J, Bourgeois G *et al.*, 2014. Climatic indicators for crop infection risk: Application to climate change impacts on five major foliar fungal diseases in Northern France. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **197**, 147–158.

Leonard KJ, 1969. Factors affecting rates of stem rust increase in mixed plantings of susceptible and resistant oat varieties. *Phytopathology*.

Leroux P, Gredt M, Walker AS, Moinard JM, Caron D, 2005. Resistance of the wheat leaf blotch pathogen Septoria tritici to fungicides in France. *Modern fungicides and antifungal compounds IV: 14th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany, April 25-29, 2004*, 115–124.

Linde CC, Zhan J, McDonald BA, 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology®* **92**, 946–955.

Lo Iacono G, van den Bosch F, Gilligan CA, 2013. Durable resistance to crop pathogens: An epidemiological framework to predict risk under uncertainty. *Plos Computational Biology* **9**, e1002870.

Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G *et al.*, 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. In: Merchant SS, ed. *Annual Review of Plant Biology, Vol 66*. Palo Alto: Annual Reviews, 513–545.

Lof ME, de Vallavieille-Pope C, van der Werf W, 2017. Achieving durable resistance against plant diseases: Scenario analyses with a national-scale spatially explicit model for a wind-dispersed plant pathogen. *Phytopathology* **107**, 580–589.

Lô-Pelzer E, Aubertot JN, David O, Jeuffroy MH, Bousset L, 2009. Relationship between severity of blackleg (*Leptosphaeria maculans* / *L-biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. *Plant Pathology* **58**, 61–70.

Lô-Pelzer E, Bousset L, Jeuffroy MH *et al.*, 2010. SIPPOM-WORS: a simulator for integrated pathogen population management of phoma stem canker on winter oilseed rape: I. Description of the model. *Field Crops Research* **118**, 73–81.

Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, Van den Bosch F, 2004a. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* **53**, 170–181.

Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Welham SJ, Nichols AR, 2004b. Position of inoculum in the canopy affects the risk of septoria tritici blotch epidemics in winter wheat. *Plant Pathology* **53**, 11–21.

Lyngkjær MF, Carver TLW, Zeyen RJ, 2001. Virulent *Blumeria graminis* infection induces penetration susceptibility and suppresses race-specific hypersensitive resistance against avirulent attack in Mla1 -barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 243–256.

Malezieux E, 2012. Designing cropping systems from nature. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 15–29.

Markham P, 1992. Stress management: Filamentous fungi as exemplary survivors. *FEMS Microbiology Letters* **100**, 379–385.

Marshall B, Newton AC, Zhan J, 2009. Quantitative evolution of aggressiveness of powdery mildew under two-cultivar barley mixtures. *Plant Pathology* **58**, 378–388.

Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ, 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* **277**, 504–509.

McCorison CB, Goodwin SB, 2020. The wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* senses and responds to different wavelengths of light. *Bmc Genomics* **21**, 513.

McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.

McDonald BA, Suffert F, Bernasconi A, Mikaberidze A, 2022. How large and diverse are field populations of fungal plant pathogens? The case of *Zymoseptoria tritici*. *bioRxiv*, 2022.03.13.484150.

McIntosh RA, Brown GN, 1997. Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 311–326.

McRoberts N, Hughes G, Madden LV, 2003. The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. *Annals of Applied Biology* **142**, 191–211.

Meile L, Croll D, Brunner PC *et al.*, 2018. A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytologist* **219**, 1048–1061.

Mendgen K, Deising H, 1993. Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist* **124**, 193–213.

Mendgen K, Hahn M, Deising H, 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 367–386.

Mikaberidze A, McDonald BA, Bonhoeffer S, 2015. Developing smarter host mixtures to control plant disease. *Plant Pathology* **64**, 996–1004.

Mille B, Fraj MB, Monod H, de Vallavieille-Pope C, 2006. Assessing four-way mixtures of winter wheat cultivars from the performances of their two-way and individual components. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 163–173.

Mille B, Jouan B, 1997. Influence of varietal associations on the development of leaf and glume blotch and brown leaf rust in winter bread wheat. *Agronomie* **17**, 247–251.

Montarry J, Cartier E, Jacquemond M, Palloix A, Moury B, 2012. Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 2242–2252.

Montarry J, Hamelin FM, Glais I, Corbi R, Andrivon D, 2010. Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights

from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Bmc Evolutionary Biology* **10**, 283.

Montazeaud G, Flutre T, Ballini E *et al.*, 2022. From cultivar mixtures to allelic mixtures: Opposite effects of allelic richness between genotypes and genotype richness in wheat. *New Phytologist* **n/a**.

Montazeaud G, Violle C, Roumet P *et al.*, 2020. Multifaceted functional diversity for multifaceted crop yield: Towards ecological assembly rules for varietal mixtures. *Journal of Applied Ecology* **57**, 2285–2295.

Morais D, Duplaix C, Sache I, Laval V, Suffert F, Walker A-S, 2019. Overall stability in the genetic structure of a *Zymoseptoria tritici* population from epidemic to interepidemic stages at a small spatial scale. *European Journal of Plant Pathology* **154**, 423–436.

Morais D, Gelisse S, Laval V, Sache I, Suffert F, 2016a. Inferring the origin of primary inoculum of *Zymoseptoria tritici* from differential adaptation of resident and immigrant populations to wheat cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **145**, 393–404.

Morais D, Laval V, Sache I, Suffert F, 2015. Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology* **64**, 1429–1439.

Morais D, Sache I, Suffert F, Laval V, 2016b. Is the onset of Septoria tritici blotch epidemics related to the local pool of ascospores? *Plant Pathology* **65**, 250–260.

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

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

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

Mundt CC, Brophy LS, Schmitt MS, 1995a. Disease severity and yield of pure-line wheat cultivars and mixtures in the presence of eyespot, yellow rust, and their combination. *Plant Pathology* **44**, 173–182.

Mundt CC, Brophy LS, Schmitt MS, 1995b. Choosing crop cultivars and cultivar mixtures under low versus high disease pressure: A case study with wheat. *Crop Protection* **14**, 509–515.

Mundt CC, Leonard KJ, 1986. Analysis of factors affecting disease increase and spread in mixtures of immune and susceptible plants in computer-simulated epidemics. *Phytopathology* **76**, 832–840.

Newton A, 2009. Plant disease control through the use of variety mixtures. In: *Disease Control in Crops*. John Wiley & Sons, Ltd, 162–171.

Newton AC, Ellis RP, Hackett CA, Guy DC, 1997. The effect of component number on *Rhynchosporium secalis* infection and yield in mixtures of winter barley cultivars. *Plant Pathology* **46**, 930–938.

Newton AC, Guy DC, 2011. Scale and spatial structure effects on the outcome of barley cultivar mixture trials for disease control. *Field Crops Research* **123**, 74–79.

Ni M, Feretzaki M, Sun S, Wang X, Heitman J, 2011. Sex in fungi. *Annual Review of Genetics* **45**, 405–430.

Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P, Bai Y, 2011. *Breeding crops with resistance to diseases and pests*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

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

Numminen E, Vaumourin E, Parratt SR, Poulin L, Laine A-L, 2019. Variation and correlations between sexual, asexual and natural enemy resistance life-history traits in a natural plant pathogen population. *BMC Evolutionary Biology* **19**, 142.

O'Driscoll A, Kildea S, Doohan F, Spink J, 2014. The wheat-Septoria conflict : a new front opening up ? *Trends Plants Science* **19**, 602–610.

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Boixel A-L, Gélisse S, Saint-Jean S, Suffert F, 2022. Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: A compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology* **71**, 289–303.

Østergård H, Jensen JW, 2005. Increased yield and yield stability in variety mixtures of spring barley. *DARCOFenews*.

Otto SP, 2009. The evolutionary enigma of sex. *The American Naturalist* **174**.

Papaïx J, Rimbaud L, Burdon JJ, Zhan J, Thrall PH, 2018. Differential impact of landscape-scale strategies for crop cultivar deployment on disease dynamics, resistance durability and long-term evolutionary control. *Evolutionary Applications* **11**, 705–717.

Pariaud B, Robert C, Goyeau H, Lannou C, 2009. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* **99**, 869–878.

Pélissier R, Buendia L, Brousse A *et al.*, 2021a. Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures. *Journal of Experimental Botany* **72**, 6570–6580.

Pélissier R, Violle C, Morel J-B, 2021b. Plant immunity: Good fences make good neighbors? *Current Opinion in Plant Biology* **62**, 102045.

Perronne R, Makowski D, Goffaux R, Montalent P, Goldringer I, 2017. Temporal evolution of varietal, spatial and genetic diversity of bread wheat between 1980

and 2006 strongly depends upon agricultural regions in France. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **236**, 12–20.

Perronne R, Vidal T, Du Cheyron PP, Enjalbert J, Goldringer I, 2021. Évolution de la diversité cultivée du blé tendre en France. In: *L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies*. France: Editions Quae.

Petit-Houdenot Y, Fudal I, 2017. Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1072.

Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V *et al.*, 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* **8**.

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

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

Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GHJ, 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*.

Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ *et al.*, 2011. *Zymoseptoria gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts*.

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

Raboin LM, Ramanantsoanirina A, Dusserre J *et al.*, 2012. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. *Plant Pathology* **61**, 1103–1111.

Rapilly F, 1991. *L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes*. INRA Editions.

Ravigné V, Halkett F, Tollenaere C, 2021. Coévolution plantes-parasites en populations naturelles. In: *L'immunité des plantes : Pour des cultures résistantes aux maladies*. France, 103–114.

Reiss ER, Drinkwater LE, 2018. Cultivar mixtures: a meta-analysis of the effect of intraspecific diversity on crop yield. *Ecological Applications* **28**, 62–77.

Rimbaud L, Fabre F, Papaix J *et al.*, 2021b. Models of plant resistance deployment. In: Leach JE, Lindow SE, eds. *Annual Review of Phytopathology, Vol 59, 2021*. Palo Alto: Annual Reviews, 125–152.

Rimbaud L, Fabre F, Papaïx J *et al.*, 2021a. Models of plant resistance deployment. *Annual Review of Phytopathology* **59**, null.

Rimbaud L, Papaix J, Barrett LG, Burdon JJ, Thrall PH, 2018a. Mosaics, mixtures, rotations or pyramiding: What is the optimal strategy to deploy major gene resistance? *Evolutionary Applications* **11**, 1791–1810.

Rimbaud L, Papaix J, Barrett LG, Burdon JJ, Thrall PH, 2018b. Mosaics, mixtures, rotations or pyramiding: What is the optimal strategy to deploy major gene resistance? *Evolutionary Applications* **11**, 1791–1810.

Rimbaud L, Papaïx J, Fabre F, 2021c. Stratégies paysagères pour déployer efficacement et durablement la résistance : modèles et prédictions. In: *L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies*. Editions Quae.

Robert C, Fournier C, Andrieu B, Ney B, 2008. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a Septoria tritici epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology* **35**, 997–1013.

Roelfs AP, 1985. Wheat and rye stem rust. *Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*, 3–37.

Ross RG, Hamlin SA, 1962. Production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) wint. on sterile apple leaf discs. *Canadian Journal of Botany* **40**, 629–635.

Royle DJ, Parker SR, Lovell DJ, Hunter T, 1995. *Interpreting trends and risks for better control of Septoria in winter wheat. In: A Vital Role for Fungicides in Cereal Production* (HG Hewitt, D Tyson, DW Hollomon, JM Smith, WP Davies, KR Dixon, Eds,). Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers.

Saintenac C, Cambon F, Aouini L *et al.*, 2021a. A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against Septoria tritici blotch. *Nature Communications* **12**, 433.

Saintenac C, Cambon F, Aouini L *et al.*, 2021b. A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against Septoria tritici blotch. *Nature Communications* **12**, 433.

Saintenac C, Lee W-S, Cambon F *et al.*, 2018. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* **50**, 368–374.

Saint-Jean S, 2003. *Etude expérimentale et numérique du mécanisme de transfert d'eau par éclaboussement de gouttes de pluie dans une structure tridimensionnelle: application au cas d'une structure végétale en vue de l'analyse de processus de contamination à courte distance. Thèse de doctorat Thesis*. 1970-2019, France: Université Paris-Sud.

Saint-Jean S, Chelle M, Huber L, 2004. Modelling water transfer by rain-splash in a 3D canopy using Monte Carlo integration. *Agricultural and Forest Meteorology* **121**, 183–196.

Saint-Jean S, Kerhornou B, Derbali F, Leconte M, De Vallavieille-Pope C, Huber L, 2008. Role of rain-splash in the progress of Septoria leaf blotch within a winter wheat variety mixture. *Aspects of Applied Biology* **89**, 49–54.

Saleh D, Xu P, Shen Y *et al.*, 2012. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology* **21**, 1330–1344.

Sanchez-Vallet A, McDonald MC, Solomon PS, McDonald BA, 2015. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* **79**, 29–32.

Sanderson F, 1972. A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* rob. and desm. *New Zealand Journal of Botany* **10**, 707–709.

Sanderson FR, Scharen AL, Scott PR, 1985. Sources and importance of primary infection and identities of associated propagules. In: *Septoria of Cereals*. Montana State University, Bozeman, MT, 57–64.

Sapoukhina N, Durel C-E, Le Cam B, 2009. Spatial deployment of gene-for-gene resistance governs evolution and spread of pathogen populations. *Theoretical Ecology* **2**, 229.

Sapoukhina N, Paillard S, Dedryver F, Vallavieille-Pope C de, 2013a. Quantitative plant resistance in cultivar mixtures: wheat yellow rust as a modeling case study. *New Phytologist* **200**, 888–897.

Sapoukhina N, Paillard S, Dedryver F, de Vallavieille-Pope C, 2013b. Quantitative plant resistance in cultivar mixtures: wheat yellow rust as a modeling case study. *New Phytologist* **200**, 888–897.

Sapoukhina N, Tyutyunov Y, Sache I, Arditi R, 2010. Spatially mixed crops to control the stratified dispersal of airborne fungal diseases. *Ecological Modelling* **221**, 2793–2800.

Savary S, Horgan F, Willocquet L, Heong KL, 2012. A review of principles for sustainable pest management in rice. *Crop Protection* **32**, 54–63.

Schulz B, Boyle C, 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**, 661–686.

Schürch S, Roy BA, 2004. Comparing single- vs. mixed-genotype infections of *Mycosphaerella graminicola* on wheat: effects on pathogen virulence and host tolerance. *Evolutionary Ecology* **18**, 1–14.

Selosse M-A, Schneider-Maunoury L, Martos F, 2018. Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytologist* **217**, 968–972.

Seybold H, Demetrowitsch TJ, Hassani MA *et al.*, 2020. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nature Communications* **11**, 1–12.

Shaw M, 1987. Assessment of upward movement of rain splash using a fluorescent tracer method and its application to the epidemiology of cereal pathogens. *Plant Pathology* **36**, 201–213.

Shaw MW, Royle DJ, 1989a. Estimation and validation of a function describing the rate at which *Mycosphaerella graminicola* causes yield loss in winter wheat. *Annals of Applied Biology* **115**, 425–442.

Shaw MW, Royle DJ, 1989b. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella-graminicola*) infections in winter-wheat crops in the UK. *Plant Pathology* **38**, 35–43.

Shaw M, Royle D, 1993. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella-graminicola* (septoria-tritici) on winter-wheat in the uk. *Plant Pathology* **42**, 882–899.

Shetty NP, Kristensen BK, Newman M-A, Møller K, Gregersen PL, Jørgensen HJL, 2003. Association of hydrogen peroxide with restriction of Septoria tritici in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 333–346.

Shoemaker RA, Brun H, 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany* **79**, 412–419.

Siah A, Bomble M, Tisserant B *et al.*, 2018. Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant, and leaf layer scales. *Phytopathology®* **108**, 1114–1123.

Siah A, Tisserant B, El Chartouni L *et al.*, 2010. Mating type idiomorphs from a french population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biology* **114**, 980–990.

Sierotzki H, Gessler C, 1998. Inheritance of Virulence of *Venturia inaequalis* Toward Mains×domestica Cultivars. *Journal of Phytopathology* **146**, 509–514.

Singh NK, Karisto P, Croll D, 2021. Population-level deep sequencing reveals the interplay of clonal and sexual reproduction in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Microbial Genomics* **7**, 000678.

Sofonea MT, Alizon S, Michalakis Y, 2017. Exposing the diversity of multiple infection patterns. *Journal of Theoretical Biology* **419**, 278–289.

Stadnik MJ, de Freitas MB, 2014. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology* **39**, 111–118.

St.Clair DA, 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 247–268.

Steinberg G, 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat Infection. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 17–23.

Stephens C, Ölmez F, Blyth H *et al.*, 2021. Remarkable recent changes in the genetic diversity of the avirulence gene AvrStb6 in global populations of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology* **22**, 1121–1133.

Stewart EL, Hagerty CH, Mikaberidze A, Mundt CC, Zhong Z, McDonald BA, 2016. An improved method for measuring quantitative resistance to the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using high-throughput automated image analysis. *Phytopathology* **106**, 782–788.

Stuthman DD, Leonard KJ, Miller-Garvin J, 2007. Breeding crops for durable resistance to disease. In: *Advances in Agronomy*. Elsevier, 319–367.

Suffert F, 2015. Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum : une approche fonctionnelle et expérimentale de l'épidémiologie végétale. Habilitation à diriger des recherches Thesis. Université Paris Sud.

Suffert F, Delestre G, Carpentier F *et al.*, 2016. Fashionably late partners have more fruitful encounters: Impact of the timing of co-infection and pathogenicity on sexual reproduction in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* **92**, 40–49.

Suffert F, Delestre G, Gélisse S, 2018a. Sexual reproduction in the fungal foliar pathogen *Zymoseptoria tritici* is driven by antagonistic density dependence mechanisms. *Microbial Ecology* **77**, 110–123.

Suffert F, Goyeau H, Sache I *et al.*, 2018b. Epidemiological trade-off between intra- and interannual scales in the evolution of aggressiveness in a local plant pathogen population. *Evolutionary Applications* **11**, 768–780.

Suffert F, Ravigné V, Sache I, 2015. Seasonal changes drive short-term selection for fitness traits in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 18–6367.

Suffert F, Sache I, 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* **60**, 878–889.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2011. Early stages of Septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–177.

Suffert F, Sache I, Lannou C, 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**, 1330–1341.

Suffert F, Thompson RN, 2018. Some reasons why the latent period should not always be considered constant over the course of a plant disease epidemic. *Plant Pathology* **67**, 1831–1840.

Tamburini G, Bommarco R, Wanger TC *et al.*, 2020. Agricultural diversification promotes multiple ecosystem services without compromising yield. *Science Advances* **6**, eaba1715.

Taylor PD, Fahrig L, Henein K, Merriam G, 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* **68**, 571–573.

Tellier A, Hamelin FM, 2021. Coévolution des hôtes et de leurs parasites : la théorie. In: *L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies*. Editions Quae.

Thrall PH, Burdon JJ, 1997. Host-pathogen dynamics in a metapopulation context: the ecological and evolutionary consequences of being spatial. *Journal of Ecology* **85**, 743–753.

Tian D, Traw MB, Chen JQ, Kreitman M, Bergelson J, 2003. Fitness costs of R-gene-mediated resistance in Arabidopsis thaliana. *Nature* **423**, 74–77.

Tollenaere C, Susi H, Laine A-L, 2016. Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in Plant Science* **21**, 80–90.

Torriani SFF, Melichar JPE, Mills C, Pain N, Sierotzki H, Courbot M, 2015. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 8–12.

Tratwal A, Bocianowski J, 2018. Cultivar mixtures as part of integrated protection of spring barley. *Journal of Plant Diseases and Protection* **125**, 41–50.

Tucker SL, Talbot NJ, 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 385–417.

de Vallavieille-Pope C, Ali S, Leconte M, Enjalbert J, Delos M, Rouzet J, 2012. Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp tritici in France between 1984 and 2009. *Plant Disease* **96**, 131–140.

Van der Plank JE, 1975. *Principles of plant infection*. New York: Academic Press.

Vidal T, 2017. *Intérêt de la diversité architecturale des plantes cultivées pour limiter la progression épidémique de maladies foliaires à dispersion pluviale: cas de la septoriose au sein d'associations variétales de blé. Thèse de doctorat, AgroParisTech*. Paris.

Vidal T, Boixel A-L, Durand B, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2017a. Reduction of fungal disease spread in cultivar mixtures: Impact of canopy architecture on rain-splash dispersal and on crop microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology* **246**, 154–161.

Vidal T, Boixel A-L, Durand B, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2017b. Reduction of fungal disease spread in cultivar mixtures: Impact of canopy architecture on rain-splash dispersal and on crop microclimate. *Agricultural and Forest Meteorology* **246**, 154–161.

Vidal T, Gigot C, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2018. Contrasting plant height can improve the control of rain-borne diseases in wheat cultivar mixture: modelling splash dispersal in 3-D canopies. *Annals of Botany* **121**, 1299–1308.

Vidal T, Lusley P, Leconte M, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S, 2017c. Cultivar architecture modulates spore dispersal by rain splash: A new perspective to reduce disease progression in cultivar mixtures. *Plos One* **12**, e0187788.

Vidal T, Saint-Jean S, Lusley P *et al.*, 2020. Cultivar mixture effects on disease and yield remain despite diversity in wheat height and earliness. *Plant Pathology*.

Villaréal LMMA, Lannou C, 2000. Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* **90**, 1300–1306.

West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL, 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans*(phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**, 10–27.

Wheeler DL, Dung JKS, Johnson DA, 2019. From pathogen to endophyte: an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. *New Phytologist* **222**, 497–510.

Wilson M, Lindow S, 1994. Coexistence among epiphytic bacterial-populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4468–4477.

Wolfe MS, 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 251–273.

Wolfe MS, 1992. Barley diseases: maintaining the value of our varieties. In: *Barley Genetics VI: Barley research reviews 1986-91, session and workshop summaries*. Copenhagen.

Wuest SE, Peter R, Niklaus PA, 2021. Ecological and evolutionary approaches to improving crop variety mixtures. *Nature Ecology & Evolution* **5**, 1068–1077.

Xu X, 2012. Super-races are not likely to dominate a fungal population within a life time of a perennial crop plantation of cultivar mixtures: A simulation study. *BMC Ecology* **12**, 16.

Xu X-M, Ridout MS, 2000. Stochastic simulation of the spread of race-specific and race-nonspecific aerial fungal pathogens in cultivar mixtures. *Plant Pathology* **49**, 207–218.

Yang N, McDonald MC, Solomon PS, Milgate AW, 2018. Genetic mapping of Stb19, a new resistance gene to *Zymoseptoria tritici* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **131**, 2765–2773.

Yuen JE, Andersson B, 2013. What is the evidence for sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Europe? *Plant Pathology* **62**, 485–491.

Zadoks JC, Schein RD, 1979. Epidemiology and plant disease management. *Epidemiology and plant disease management*.

Zeyl C, 2009. The role of sex in fungal evolution. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 592–598.

Zhan J, Kema GHJ, Waalwijk C, McDonald BA, 2002a. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology* **36**, 128–136.

Zhan J, Mundt CC, Hoffer ME, McDonald BA, 2002b. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 634–647.

Zhan J, Mundt CC, McDonald BA, 1998. Measuring immigration and sexual reproduction in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*® **88**, 1330–1337.

Zhan J, Mundt CC, McDonald BA, 2000. Estimation of rates of recombination and migration in populations of plant pathogens - A reply. *Phytopathology* **90**, 324–326.

Zhan J, Mundt CC, McDonald BA, 2001. Using restriction fragment length polymorphisms to assess temporal variation and estimate the number of ascospores that initiate epidemics in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*® **91**, 1011–1017.

Zhan J, Pettway RE and M, B.A., 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genet. Biol* **38**, 286–297.

Zhan J, Thrall PH, Papaix J, Xie L, Burdon JJ, 2015. Playing on a pathogen's weakness: Using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. In: VanAlfen NK, ed. *Annual Review of Phytopathology, Vol 53*. Palo Alto: Annual Reviews, 19–43.

Zhao L, Sun Z, Huang C *et al.*, 2010. Study on the control effect and wheat yield of cultivar mixtures to wheat stripe rust. *Journal of China Agricultural University* **15**, 49–54.

Zhu YY, Chen HR, Fan JH *et al.*, 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* **406**, 718–722.

Zhu YY, Fang H, Wang YY *et al.*, 2005. Panicle blast and canopy moisture in rice cultivar mixtures. *Phytopathology* **95**, 433–438.

Annexes

ANNEXE 1 : PARAMETRES ET VARIABLES DU MODULE EPIDEMIQUE

***Tableau A.1**. Liste des paramètres du module épidémique (phase asexuée)*

Symbole	Unité	Signification
P_R	%	Proportion de la variété résistante dans le couvert
$SEV_{V,P}$	%	Index de sévérité de la variété V en proportion P dans le couvert, calculé expérimentalement à l'échelle du couvert
f_{vir}	-	Fréquence des individus virulents dans le pool d'inoculum primaire (fréquence de virulence à t= 0)
n	-	Nombre de cycles asexués (n=5 ; 0≤ t ≤n, t étant le cycle en cours)
$S_{tot,l}$	m^2	Surface totale des feuilles
Δs	m^2	Accroissement de surface malade
T	%	Pourcentage maximal d'individus avirulents pouvant se développer sur la variété résistante
F	-	Fonction de freinage de l'accroissement de la surface malade

***Tableau A.2**. Liste des variables du module épidémique (phase asexuée)*

Symbole	Unité	Signification
$S_{r,l}$	m^2	Surface sénescente de la feuille l
$S_{d,l}$	m^2	Surface malade de la feuille l
$S_{d,vir,l}$	m^2	Surface virulente de la feuille l
$S_{d,avir,l}$	m^2	Surface avirulente de la feuille l
$S_{h,l}$	m^2	Surface saine de la feuille l
$p_{conta,i}$	-	Probabilité de la gouttelette i d'être contaminante
$p_{vir,i}$	-	Probabilité de la gouttelette i d'être virulente, sachant qu'elle est contaminante

ANNEXE 2 : LISTE DES PUBLICATIONS

Articles de revues à comité de lecture

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

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Saint-Jean S, Suffert F, 2022b. The impact of cultivar mixtures on virulence dynamics in *Zymoseptoria tritici* populations persist after interseason sexual reproduction. *Plant Pathology* online.
https://doi.org/10.1111/ppa.13577

Preprints

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Gazeau G *et al.*, 2022c. Multiple scenarios for sexual crosses in the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* on wheat residues: potential consequences for virulence gene transmission. *bioRxiv*, 2022.02.24.481803. https://doi.org/10.1101/2022.02.24.481803. Article soumis à la revue *Fungal Genetics and Biology*.

Dataset

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Gazeau G et al., 2022d. Dataset of a three-year experiment about *Zymoseptoria tritici* sexual crosses on wheat according to the virulence or avirulence of the parental strains against a recently broken-down qualitative resistance gene. https://doi.org/10.15454/IPMIOX, Portail Data INRAE, V2.

Orellana-Torrejon, Carolina; Vidal, Tiphaine; Saint-Jean, Sébastien; Suffert, Frédéric, 2022e. Dataset of a two-year field experiment on the dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: interseason period. https://doi.org/10.15454/JGWC5A, Portail Data INRAE, V1.

Orellana-Torrejon C, Vidal T, Boixel A-L, Gélisse S, Saint-Jean S, Suffert F, 2021. Dataset of a two-year field experiment on the dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures. https://doi.org/10.15454/4MAAI0, Portail Data INRAE, V2.

Communications orales

Orellana-Torrejon, C, Vidal T, Boixel, A-L, Gélisse S, Saint-Jean S, Suffert F. Dynamique annuelle de populations de *Zymoseptoria tritici* dans des associations variétales de blé : mise en évidence d'un compromis potentiel entre efficacité et durabilité d'un gène de résistance récemment contourné. Communication orale présentée au Webinar des doctorants et post-doctorants sur la durabilité des résistances – INRAE (France, 21-22 janvier 2021).

Orellana-Torrejon, C, Boixel, A-L, Vidal T, Saint-Jean S, Suffert F. Impact d'associations variétales de blé sur le développement de la septoriose et la dynamique de contournement d'un gène de résistance majeur. Communication orale présentée aux Biennales de l'innovation céréalière – Phloème – Arvalis (Paris, France, 29-30 janvier 2020).

Orellana-Torrejon, C, Boixel, A-L, Vidal T, Saint-Jean S, Suffert F. Impact of wheat cultivar mixtures on *Zymoseptoria tritici* evolution over the course of an annual epidemic: the case of the ongoing breakdown of Stb16q. Communication orale présentée à International Symposium of Cereal Leaf Blights (ISCLB, Dublin, Ireland, 22-24 mai 2019).

Orellana-Torrejon, C, Saint-Jean S, Suffert F. Impact d'associations variétales sur la dynamique locale de contournement d'une résistance variétale : cas de la transmission d'une virulence récemment apparue chez *Zymoseptoria tritici*. Communication orale présentée au Groupe Champignons phytopathogènes – REID/BASC (Paris, France, 30 novembre 2018).

Stages co-encadrés

Lageyre J, 2020. Mémoire de fin d'études ingénieur agronome de l'Institut Agro - AgroCampusOuest, option Protection des Plantes et Environnement. « Modélisation de l'impact de la période inter-épidémique sur l'évolution locale de populations de *Zymoseptoria tritici* ».

Bonnard M, 2019. Mémoire de fin d'études technicien supérieur agricole de l'Institut SANDAR, option Agronomie-Productions-Végétales. « Les associations variétales, un moyen de lutte contre le pathogène *Zymoseptoria tritici* ».

Titre : Impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique annuelle d'adaptation d'une population de *Zymoseptoria tritici* à un gène de résistance qualitative récemment contourné

Résumé : Accroître l'efficacité et la durabilité de gènes de résistance à des agents phytopathogènes est un enjeu majeur pour la protection des cultures. Augmenter la diversité cultivée intra-parcellaire est un des moyens d'y parvenir. Cela implique de comprendre comment un tel déploiement modifie la population pathogène pendant un cycle épidémique annuel complet, qui s'étend au-delà d'une saison de culture. Pour y répondre, j'ai tout d'abord évalué l'impact d'associations variétales de blé tendre sur la dynamique d'adaptation d'une population pathogène de *Zymoseptoria tritici* à un gène de résistance qualitative (*Stb16q*) récemment contourné. J'ai étudié comment l'association de deux variétés porteuses ou non de *Stb16q*, selon différentes proportions (0.25, 0.5, 0.75), a modifié la population pathogène comparativement aux cultures pures au cours de deux années d'expérimentation. Trois phases clé ont été analysées : le début et la fin de la période épidémique (plusieurs cycles successifs de multiplication asexuée pilotés par la dispersion pluviale de pycnidiospores entre variétés) et la période inter-épidémique (production d'ascospores résultant de la reproduction sexuée sur résidus de culture). La fréquence de virulence sur chaque variété des associations (composition de la population) a été estimée par phénotypage sur plantules en serre. La taille de la population a été estimée en mesurant la sévérité de la maladie (période épidémique) et en estimant le nombre d'ascospores éjectées des résidus (période inter-épidémique). À la fin de la période épidémique, une diminution de la sévérité a été constatée dans les associations, à l'échelle du couvert et sur chaque variété, mettant en évidence une "protection" réciproque. Les associations ont eu pour effet une diminution de la fréquence de virulence comparativement à la culture pure de la variété porteuse de *Stb16q* à la fin de la période épidémique et pendant la période inter-épidémique, montrant que la reproduction sexuée n'a pas annulé l'impact "bénéfique" des associations.La fréquence de virulence sur cette variété a même légèrement diminué pour certaines proportions, mettant en évidence la capacité des associations à maintenir des souches avirulentes dans la population recombinante. Dans un second temps, j'ai exploré en conditions semi-contrôlées différentes combinaisons de croisements entre souches virulentes et/ou avirulentes, susceptibles de s'être produits sur chaque variété dans les associations. La descendance a été quantifiée et la parentalité de souches recombinantes correspondant à chaque type de combinaison a été vérifiée par génotypage. Il en est ressorti que des croisements avirulent × virulent, et même avirulent × avirulent, ont pu se produire sur la variété porteuse du gène *Stb16q*. Ce résultat démontre qu'une infection allant jusqu'à l'apparition de symptômes n'est pas indispensable pour qu'une souche se reproduise sexuellement. Enfin, j'ai proposé un cadre conceptuel de modélisation pour étudier plus en détail l'influence de la fréquence de virulence et de la proportion des variétés sur l'impact d'une association à l'échelle de la parcelle et annuelle. Pour conclure, j'ai montré qu'en plus de diminuer la sévérité d'une maladie, les associations peuvent être utiles pour réduire la transmission d'une virulence. La reproduction sexuée peut faire persister cet effet jusqu'à l'épidémie suivante du fait de l'implication de souches avirulentes, conduisant à une "dilution" de la virulence dans la population de descendants. Tous ces éléments font que les associations variétales, déployées à des échelles spatio-temporelles plus larges, pourraient être à la base de stratégies efficaces pour améliorer la durabilité – c'est-à-dire maintenir, voire rehausser – l'efficacité d'un gène de résistance qualitatif déjà contourné.

Title : Impact of wheat cultivar mixtures on the annual adaptation dynamics of a *Zymoseptoria tritici* population to a recently broken down qualitative resistant gene

Improving the efficacy and the durability of resistance genes against plant pathogens is a major challenge for farming systems. Increasing the cultivated genetic diversity within a field is a lever to achieve this goal. We need to understand how such deployment of the resistance affects pathogen populations during the whole cropping season including the post-epidemic period. To address this question, first I investigated the impact of wheat cultivar mixtures on the adaptation dynamics of a population of the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* to the recently broken down qualitative resistant gene (*Stb16q*). I assessed how two wheat cultivars, carrying *Stb16q* or not and cultivated in mixtures in different proportions (0.25, 0.5, 0.75), modified the pathogen population over two annual field epidemics compared to pure stands. Three key moments were considered in the whole pathogen life cycle: the epidemic period, which involves successive asexual multiplication cycles driven by rain-splash dispersal of pycnidiospores between growing plants of both cultivars (two dates: early and late epidemic stages), and the inter-epidemic period, which involves sexual reproduction in wheat residues releasing ascospores. The frequency of virulent strains in each cultivar and mixture (population composition) was assessed by phenotyping in seedling assays under greenhouse conditions. Population size was assessed by measuring disease severity (epidemic period) or estimating the number of ascospores discharged from residues (inter-epidemic period). At the end of the epidemic period, severity reductions were observed in mixtures at the whole canopy scale and on both cultivars, highlighting a reciprocal "protective" effect. Mixtures decreased the frequency of virulent strains relative to the pure stand of the cultivar carrying *Stb16q* at the end of the epidemic period and at the inter-epidemic period, showing that sexual reproduction did not counter the "beneficial" impact of mixtures. Even so, the frequency of virulent strains on this cultivar slightly decreased after sexual reproduction for some mixture proportions, highlighting the capacity of cultivar mixtures to actively maintain avirulent strains in the offspring population through specific epidemiological mechanisms. Secondly, I investigated in semi-controlled conditions different combinations of sexual crosses that may have occurred in field conditions between virulent and/or avirulent strains, in both cultivars. The offspring were quantified, and the parenthood of recombinant strains from each type of cross was checked by genotyping. I established that avirulent × virulent crosses, and even avirulent × avirulent, can occur on the cultivar carrying *Stb16q*. This result demonstrates that the expression of symptoms on living plant tissues are not essential for a *Z. tritici* strain to subsequently reproduce sexually. Finally, I suggested a conceptual modeling framework to further investigate the impact of the initial frequency of virulent strains and the proportion of cultivars on the mixture efficacy at the field and annual scales. To conclude, I showed that, besides disease reductions, cultivar mixtures may be used to restrict the overall propagation of a virulence. Sexual reproduction can make these mixture effects persist over the subsequent epidemic and avirulent strains can take part in it, allowing to "dilute" the virulence within recombinant populations. For these reasons, cultivar mixtures, when deployed at larger spatio-temporal scales, could be an efficient strategy to improve the durability – (*i.e.* maintain, even slightly re-increase, the efficacy) – of a broken down qualitative resistance gene.