

Mise en place d'un test de résistance contre la graisse du soja

Daniela Villacrés de Papajewski, Emilie Grisot, Claude-Alain Bétrix, Arnold Schori et Fabio Mascher
Agroscope, Institut des sciences en production végétale IPV, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Fabio Mascher, e-mail: fabio.mascher@agroscope.admin.ch



Figure 1 | Test de résistance envers la bactériose du soja causée par *Pseudomonas* spp. Les plantes au stade première feuille trifoliée déployée (environ 15 à 18 jours après semis) et pourront être utilisées pour les infections artificielles.

Introduction

Le soja (*Glycine max* [L.] Merr.) est cultivé pour ses teneurs élevées en protéines, mais aussi pour sa capacité de fixer de l'azote atmosphérique à l'aide de bactéries du genre *Bradyrhizobium* sur les racines. En apportant des reliquats d'azote dans le sol, la culture du soja devient un élément clé des rotations (Sindelar *et al.* 2015; Charles et Vulllioud 2001). Outre ses propriétés agronomiques, le soja connaît un intérêt grandissant dans l'industrie alimentaire en Europe. La demande croissante pour des sojas non modifiés génétiquement entraîne une constante augmentation des surfaces cultivées; cela implique également la création de nouvelles variétés plus performantes et toujours mieux adaptées aux conditions européennes.

Pour maintenir les hautes performances de la culture, la sélection se heurte de plus en plus aux maladies d'origine fongique et bactérienne (Hymowitz *et al.* 2015). La bactérie épiphyte *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, agent causal de la graisse du soja, est sou-

vent présente dans les cultures. La maladie se manifeste par des taches angulaires, des nécroses et des déchirures du limbe foliaire. Dans des conditions météorologiques très favorables, l'infection peut entraîner le flétrissement des feuilles et finalement une baisse de rendement jusqu'à 15 % (Siegel *et al.* 2008). Suite à l'infection de la plante, le pathogène contamine la semence, provoquant une diminution de la qualité des semences et la réduction du taux de germination (Gaignard et Luisetti 1993). L'infection n'a que très rarement des conséquences économiques graves. Toutefois, la présence du pathogène sur les semences peut nuire à la commercialisation de ces dernières et à l'adoption de variétés particulièrement sensibles. De plus, étant donné que la principale source d'inoculum de la maladie est la semence contaminée, un des moyens pour lutter contre la maladie est l'utilisation de semences non contaminées. La prévention de la maladie commence donc par la production de semence non contaminée. L'utilisation de variétés résistantes réduit ultérieurement le risque de contamination et constitue un critère de choix pour les variétés. La sélection de variétés résistantes et la connaissance du niveau de résistance des variétés disponibles sur le marché est donc d'intérêt pour les producteurs de soja; en particulier les producteurs de semences.

Le but du présent travail est le développement d'un test en serre permettant l'analyse de la résistance du soja contre la bactériose provoquée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Un tel test doit permettre de simuler la transmission du pathogène à l'état naturel et de provoquer des symptômes similaires à ceux qui surviennent au champ, afin d'étudier la résistance et les gènes de résistance.

La résistance du soja envers la bactériose est déterminée par la présence de gènes de résistance majeurs (Ashfield *et al.* 1995). Une telle interaction gène pour gène présuppose la présence d'un gène d'aviorulence (*avr*) du pathogène et d'un gène de résistance (*r*) de la part de la plante. La détection du pathogène induit

ainsi une série de mécanismes de défense dans la plante lui permettant de se protéger efficacement (Qi *et al.* 2007). A ce jour, neuf races physiologiques du pathogène ont été décrites et autant de gènes de résistance du soja sont connus (Siegel *et al.* 2008). Ces gènes fournissent à la plante la capacité de reconnaître la présence des bactéries pathogènes (Farhatullah *et al.* 2011). Si la plante est dépourvue de gènes de résistance, la bactérie n'est pas reconnue et elle peut causer la maladie (Vidic *et al.* 2013). De cette façon, la présence du gène de résistance dans les génotypes de soja fournit un indice fiable de résistance ou de sensibilité de la variété envers la souche considérée.

Matériels et méthodes

Génotypes de soja et méthode de culture

Les 91 génotypes de soja sont présentés dans le tableau 1. Les semences de toutes les variétés ont été produites à Changins en 2013 et stockées à 4 °C dans des conditions de faible taux d'humidité (40 % HR) permettant d'assurer une faculté germinative élevée à long terme. Les graines ont été semées dans des pots de 9 cm de diamètre remplis d'un substrat composé d'un mélange de 60 % de tourbe blonde, 25 % de terre végétale et 15 % de perlite et saupoudrées avec du *Bradyrhizobium japonicum* (de Sangoisse, Pont-du-Casse, France). Ces pots ont été placés en serre à une température variant de 18 à 25 °C à une photopériode de 16 heures jour et 8 heures nuit. Les plantes au stade première feuille trifoliée déployées (environ 15 à 18 jours après semis) ont été utilisées pour les expériences suivantes (fig. 1).

Souches bactériennes

Les souches bactériennes et leur origine sont décrites dans le tableau 2. Il s'agit de trois souches de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolées sur tomate et autres plantes et décrites comme pathogènes du soja ainsi que des quatre races physiologiques R0, R1, R4 et R6 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Toutes les souches sont bien caractérisées, leurs gènes d'avirulence ont été identifiés. Les souches ont été obtenues auprès de la CFBP (Collection Française de Bactéries associées aux Plantes, Angers, France) ou auprès de la collection de *Pseudomonas* à l'Université de l'Etat de Virginie aux USA (<http://genome.ppws.vt.edu>).

Multiplication des bactéries et production d'inoculum

Les bactéries sont conservées à long terme à -80 °C dans un mélange 1:1 de King's B milieu liquide et glycérol (86 %) (Mascher *et al.* 2014). De routine, des cultures

Résumé ■ La graisse du soja est une maladie foliaire provoquée par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* pv. *syringae*. La maladie provoque des taches angulaires sur le limbe foliaire mais n'affecte que rarement le rendement. Toutefois, la première source d'inoculum étant la semence, des graines contaminées portent préjudice à la semence et peuvent nuire à la diffusion des nouvelles variétés. Le meilleur moyen de prévenir cette maladie est l'utilisation de variétés résistantes. L'objectif de cette étude était de développer un test de résistance en serre permettant de caractériser le degré de résistance des génotypes de soja face à la graisse bactérienne.

Les résultats, obtenus avec l'utilisation de sept souches portant des gènes d'avirulence spécifique sur 91 variétés de soja, montrent une large variabilité des résistances. Tous les génotypes étaient résistants envers une partie des souches. Seuls quatre génotypes ont montré une résistance absolue contre toutes les bactéries testées. Le test en serre servira maintenant à vérifier la diversité des gènes d'avirulence présents dans les populations de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, afin de déterminer quels gènes de résistance sont nécessaires à la prévention des infections et à la transmission du pathogène via les semences.

fraîches de bactéries ont été maintenues sur du King's B agar. Pour la production d'inoculum, une colonie simple a été transférée dans 10 ml de King's B milieu liquide et incubé pendant 24h sur une table tournante à 24 °C. Cette suspension a été utilisée pour ensemer des boîtes de King's B agar avec 50 µl de suspension bactérienne. Les boîtes ont été incubées à 24 °C pendant 24 h. Le tapis bactérien a été élué à l'eau déminéralisée stérile. La suspension ainsi obtenue a été filtrée sur couche de laine de verre stérile et purifiée deux fois par des cycles de centrifugation (à 3000 g) et resuspension en eau déminéralisée stérile dans des tubes falcon (Corning Inc., Corning, USA). Enfin, la suspension a été diluée pour arriver à une densité optique de 0,2 à 600 nm, ce qui correspond à une concentration de 5·10⁸ UFC/ml. La concentration a été vérifiée à chaque fois par la culture de dilutions décimales sur KB Agar.

Tableau 1 | Liste de lignées de soja intégrées dans le test variétal

N°	Lignée	Origine	Groupe maturité	Obtenteurs	N°	Lignée	Origine	Groupe maturité	Obtenteurs
Variétés homologuées suisses					Lignées de sélection Agroscope				
1	Amandine	Suisse	000-00	Agroscope / DSP (CH)	46	22164	Suisse	00	Agroscope
2	Amarok	Suisse	000-00	Agroscope / DSP (CH)	47	22214	Suisse	00	Agroscope
3	Aveline	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)	48	22216	Suisse	000	Agroscope
4	Castétis	Suisse	II	Agroscope / DSP (CH) / Rolly (FR)	49	22221	Suisse	00	Agroscope
5	Coraline	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	50	22233	Suisse	000	Agroscope
6	Falbala	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	51	22236	Suisse	00	Agroscope
7	Galice	Suisse	000-00	Agroscope / DSP (CH)	52	22245	Suisse	00-0	Agroscope
8	Gallec	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)	53	22248	Suisse	00	Agroscope
9	Obélix	Suisse	000-00	Agroscope / DSP (CH)	54	22263	Suisse	00	Agroscope
10	Opaline	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	55	22267	Suisse	00-0	Agroscope / DSP (CH)
11	Paco	Suisse	II	Agroscope / DSP (CH) / Rolly (FR)	56	22277	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)
12	Paradis	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)	57	22278	Suisse	00	Agroscope
13	Pollux	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	58	22284	Suisse	00	Agroscope
14	Proteix	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	59	22285	Suisse	00	Agroscope
15	Protibus	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)	60	22286	Suisse	00	Agroscope
16	Tequila	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	61	22288	Suisse	00	Agroscope
17	Tiguan	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)	62	22290	Suisse	00	Agroscope
18	Totem	Suisse	II	Agroscope / DSP (CH) / Rolly (FR)	63	22292	Suisse	00	Agroscope
19	Tourmaline	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)	64	22293	Suisse	00	Agroscope
20	Toutatis	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)	65	22294	Suisse	00	Agroscope
Lignées de sélection étrangères					66	22297	Suisse	00	Agroscope
21	Lissabon	Autriche	000-00	Saatbau Linz	67	22300	Suisse	00	Agroscope
22	London	Autriche	00	Saatbau Linz	68	22305	Suisse	000-00	Agroscope
23	Merlin	Autriche	000	Saatbau Linz	69	22307	Suisse	000-00	Agroscope
24	Korus	Canada	00	Semences Prograin Inc.	70	22308	Suisse	000-00	Agroscope
25	Naya	Canada	00	Semences Prograin Inc.	71	22309	Suisse	000-00	Agroscope
26	Primus	Canada	00	Semences Prograin Inc./RWA (AT)	72	22311	Suisse	00	Agroscope
27	Saska	Canada	00	Semences Prograin Inc.	73	22315	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)
28	Wallace	Canada	00	Semences Prograin Inc.	74	22317	Suisse	00	Agroscope
29	M.a	Canada	00	Semences Prograin Inc.	75	22320	Suisse	00	Agroscope
30	J3	Chine	00-0	Lignée de sélection	76	22321	Suisse	00	Agroscope / DSP (CH)
31	J5	Chine	000	Lignée de sélection	77	22324	Suisse	00	Agroscope
32	Lia 20	Chine	II	Lignée de sélection	78	22325	Suisse	000	Agroscope
33	Lia 23	Chine	II	Lignée de sélection	79	22328	Suisse	000	Agroscope / DSP (CH)
34	Lia 31	Chine	II	Lignée de sélection	80	22332	Suisse	00	Agroscope
35	Tiefeng 19A	Chine	I	Lignée de sélection	81	22335	Suisse	00	Agroscope
36	Amphor	France	00	Euralis	82	22336	Suisse	00	Agroscope
37	Ecuador	France	000	Euralis	83	22338	Suisse	00	Agroscope
38	Mentor	France	00-0	Euralis	84	22343	Suisse	00	Agroscope
39	Suedina	France	000	RAGT 2 N (FR)	85	22346	Suisse	00	Agroscope
40	Sultana	France	000	RAGT 2 N (FR)	86	22347	Suisse	00-0	Agroscope
Lignées de référence					87	22349	Suisse	00	Agroscope
41	Norchief	Canada	00	University of Wisconsin	88	22350	Suisse	00-0	Agroscope
42	Harosoy 63	Canada		Semences Prograin Inc	89	22351	Suisse	00-0	Agroscope
43	Flambeau	Canada	00	University of Wisconsin	90	22353	Suisse	00-0	Agroscope
44	Merit	Canada	000	University of Ontario	91	22358	Suisse	00-0	Agroscope
45	Acme	Canada	000	University of Ontario					

Infection et évaluation de la sévérité de l'infection

Afin de tester la réaction du soja, le limbe d'une feuille a été perforé à l'aide d'une pointe de crayon. Ensuite, 0,1 ml de la suspension bactérienne a été injecté par cette perforation dans les espaces extracellulaires du parenchyme foliaire à l'aide d'une seringue.

Les symptômes provoqués par les bactéries ont été déterminés 48 heures post-infection (48 hpi) et suivis durant trois semaines. Les symptômes à 48 heures ont été appréciés à l'aide de l'échelle présentée en figure 2.

Les plantes sans symptôme, ayant le pourtour de la perforation desséché ou montrant une réaction d'hyper-sensibilité (RH) limitée ont été considérées comme résistantes. La présence de chloroses au pourtour des lésions ou la propagation de l'infection dans d'autres parties des feuilles ont au contraire permis de classer les plantes concernées comme sensibles.

Mise en place des essais

L'expérience consistait à tester la résistance de 91 génotypes de soja avec sept souches de *Pseudomonas spp.* L'essai a été réalisé en trois répétitions et deux fois dans le temps pour chaque combinaison variété et souche. Les notations des symptômes étaient qualitatives et identiques entre les répétitions. Par conséquent, la classification des variétés en sensible ou résistant a été faite sur la base de la moyenne des résultats. Toutes les analyses ont été faites en utilisant Microsoft Excel (Microsoft Corp. Redmond, USA).

Résultats

Interaction entre hôte et pathogène

Les bactéries peuvent provoquer plusieurs types de symptômes locaux, limités autour du site d'inoculation (fig. 2). L'évaluation des symptômes tient compte de manière simplifiée de cette diversité et se limite à qualifier le type d'interaction. En général, les premiers symptômes observés 48 heures après l'injection du pathogène sont soit la cicatrization rapide des blessures et la présence de tissus nécrotiques indiquant la résistance variétale, soit l'observation de tissus translucides devenant chlorotiques après trois à six jours d'inoculation, lesquels indiquent la sensibilité de la variété face à la bactérie testée (fig. 2). Par la suite, l'infection peut se propager dans les tissus limitrophes.

Évaluation de la résistance

Les résultats de l'interaction entre les génotypes de soja et les sept souches bactériennes sont présentés dans le tableau 3. Les souches DC3000, PSS 642, PSS B728a et PSG R4 n'ont pas provoqué de chloroses (fig. 3). Les autres souches, toutes appartenant au groupe *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*, provoquent des infections sur certaines variétés. La proportion des génotypes de soja sensibles aux souches du pathogènes est présentée à la figure 4. La figure 3 montre la complexité des gènes de résistance. Tous les génotypes sont résistants envers quatre souches bactériennes et 93 % sont encore résistants envers cinq souches bactériennes. Toutefois, seulement 4 % des lignées sont résistantes envers toutes les souches qui ont été testées ici.

Tableau 2 | Souches bactériennes du genre *Pseudomonas* testées

Souche	Pathovar	Origine	Hôte	Gènes d'avirulence	Référence	Origine de la souche
PS DC3000	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Etats-Unis	Tomate	<i>avrD, avrE, avrPto</i>	Greenberg & Vinatzer, 2003	PAMDP.ORG, VirginiaTech, Blacksburg, USA
PSS B728a	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	Amérique	Haricot	<i>avrB, avrE, avrPto, avrRpm</i>	Greenberg & Vinatzer, 2003	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSS 642	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	Amérique	Mauvaise herbe non identifiée	<i>avrE</i>	Clarke et al, 2010	PAMDP.ORG, VirginiaTech, Blacksburg, USA
PSG R0	<i>Pseudomonas savastanoi pv. glycinea</i>	Etats-Unis	Soja	<i>avrB0, avrC, avrE</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSG R1	<i>Pseudomonas savastanoi pv. glycinea</i>	Etats-Unis	Soja	<i>avrB1, avrC, avrE</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSG R4	<i>Pseudomonas savastanoi pv. glycinea</i>	Etats-Unis	Soja	<i>avrA1, avrB0, avrC, avrE, avrPto, avrRpm, avrRsp 4</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)
PSG R6	<i>Pseudomonas savastanoi pv. glycinea</i>	Etats-Unis	Soja	<i>avrA1, avrE</i>	Kucharek & Stall, 1985	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)

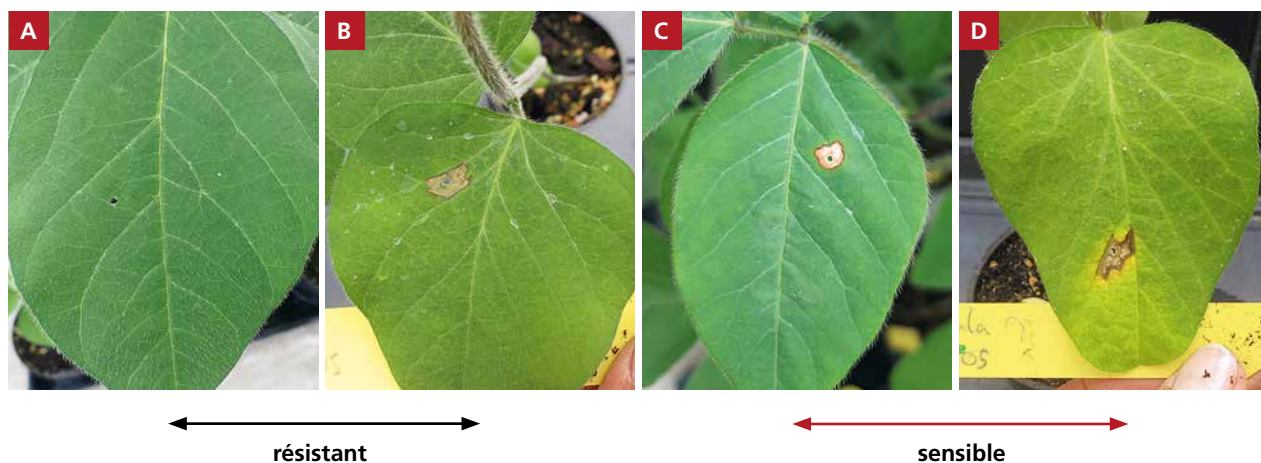


Figure 2 | Echelle des symptômes utilisée lors de la caractérisation des différentes lignées de soja. Les symptômes sont observés entre 48 et 72 hpi (heures après infection): A. sans symptôme; B. dessèchement des tissus infectés; C. cellules nécrotiques avec début de chloroses; D. chloroses très marqués.

Identification des gènes de résistance

A l'inverse, il est possible de postuler la présence de gènes de résistance dans les variétés incluses dans ce test. Les résultats suggèrent que toutes les variétés contiennent le gène de résistance contre la souche *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* race 4 (fig. 4.). Le gène d'avirulence *avrE* est présent dans toutes les souches. Les trois souches virulentes se distinguent par la présence des gènes d'avirulence *avrB0*, *avrB1*, *avrC*, respectivement. Il y a un certain nombre de lignées capables de les reconnaître et on peut postuler la présence des gènes de résistance correspondants dans ces lignées. La race 6 se distingue par la présence du gène d'avirulence *avrA1*. Le gène de résistance correspondant n'est présent que dans six génotypes. Quatre parmi ces six génotypes contiennent aussi tous les autres gènes de résistance étudiés ici et s'avèrent particulièrement intéressants pour la création variétale.

Discussion

L'objectif de cette étude était de mettre en place un test en serre permettant de caractériser la résistance de lignées de soja envers la bactériose provoquée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. L'approche expérimentale utilisée permet de caractériser la résistance globale des variétés. A l'aide de souches porteuses des gènes d'avirulence spécifiques il a aussi été possible de vérifier la présence de certains gènes de résistance.

La virulence de souches de *Pseudomonas* spp., qui n'ont pas été isolées sur soja, mais qui sont décrites comme pathogènes du soja (Gaignard & Luisetti 1993), n'a pas été confirmée. Le gène d'avirulence *avrD*, de la souche *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* DC3000 est reconnu par le gène de résistance *rpg4* dans du soja

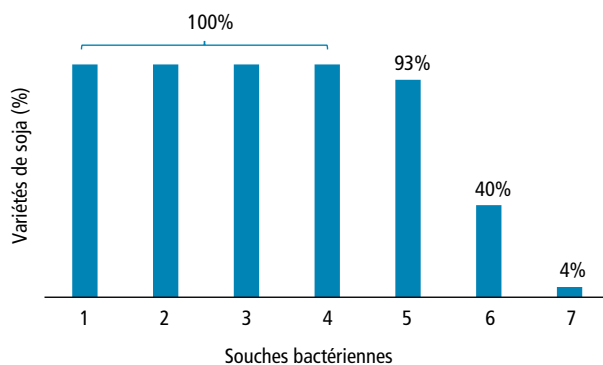


Figure 3 | Le pourcentage de génotypes de soja résistants contre les souches bactériennes. Tous les génotypes ont des résistances contre quatre souches pathogènes. Encore 97 % des sojas montrent des résistances contre cinq souches. Finalement, seulement 4 % des sojas ont des résistances contre chacune des sept souches bactériennes.

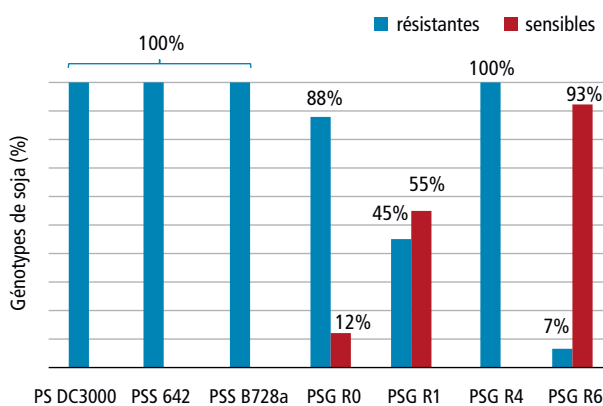


Figure 4 | Représentation de la résistance variétale du soja. Pourcentage de variétés résistantes ou sensibles par souche bactérienne.

Tableau 3 | Réactions visibles après inoculation de différentes souches bactériennes *Pseudomonas* spp. dans 91 phénotypes de soja: R (résistance) réactions d'incompatibilité avec la présence de cellules nécrotiques sans évolution de symptômes et S (sensible) réaction compatible traduit par l'observation de tissus translucides et chloroses

N°	Noms	PS DC3000	PSS 642	PSS B728a	PSG R0	PSG R1	PSG R4	PSG R6	N°	Noms	PS DC3001	PSS 643	PSS B728a	PSG R0	PSG R1	PSG R4	PSG R6
Variétés homologuées suisses									Lignées de sélection Agroscope								
1	Amandine	R	R	R	R	R	R	S	46	22164	R	R	R	R	S	R	S
2	Amarok	R	R	R	R	R	R	S	47	22214	R	R	R	R	S	R	S
3	Aveline	R	R	R	R	S	R	S	48	22216	R	R	R	R	S	R	S
4	Castétis	R	R	R	R	S	R	S	49	22221	R	R	R	R	R	R	S
5	Coraline	R	R	R	R	S	R	S	50	22233	R	R	R	R	R	R	S
6	Falbala	R	R	R	R	R	R	S	51	22236	R	R	R	R	R	R	S
7	Galice	R	R	R	R	R	R	S	52	22245	R	R	R	R	R	R	S
8	Gallec	R	R	R	R	S	R	S	53	22248	R	R	R	S	S	R	S
9	Obélix	R	R	R	R	R	R	S	54	22263	R	R	R	R	S	R	S
10	Opaline	R	R	R	R	S	R	S	55	22267	R	R	R	R	S	R	S
11	Paco	R	R	R	R	S	R	S	56	22277	R	R	R	R	S	R	S
12	Paradis	R	R	R	R	R	R	S	57	22278	R	R	R	S	R	R	S
13	Pollux	R	R	R	R	S	R	S	58	22284	R	R	R	R	R	R	S
14	Proteix	R	R	R	R	S	R	S	59	22285	R	R	R	R	S	R	S
15	Protibus	R	R	R	R	R	R	S	60	22286	R	R	R	R	R	R	S
16	Tequila	R	R	R	R	R	R	S	61	22288	R	R	R	S	R	R	S
17	Tiguan	R	R	R	R	R	R	S	62	22290	R	R	R	R	S	R	S
18	Totem	R	R	R	R	S	R	S	63	22292	R	R	R	R	R	R	S
19	Tourmaline	R	R	R	R	S	R	S	64	22293	R	R	R	S	R	R	S
20	Toutatis	R	R	R	R	R	R	S	65	22294	R	R	R	S	S	R	S
Variétés homologuées étrangères									66	22297	R	R	R	R	S	R	S
21	Lissabon	R	R	R	S	S	R	S	67	22300	R	R	R	R	S	R	S
22	London	R	R	R	R	R	R	S	68	22305	R	R	R	R	S	R	S
23	Merlin	R	R	R	R	S	R	S	69	22307	R	R	R	R	S	R	S
24	Korus	R	R	R	R	S	R	S	70	22308	R	R	R	R	S	R	S
25	Naya	R	R	R	R	S	R	S	71	22309	R	R	R	S	S	R	S
26	Primus	R	R	R	R	S	R	S	72	22311	R	R	R	R	R	R	S
27	Saska	R	R	R	R	R	R	S	73	22315	R	R	R	R	S	R	S
28	Wallace	R	R	R	S	S	R	S	74	22317	R	R	R	R	R	R	S
29	M.a	R	R	R	R	S	R	S	75	22320	R	R	R	R	S	R	S
30	J3	R	R	R	R	S	R	S	76	22321	R	R	R	R	R	R	S
31	J5	R	R	R	R	S	R	R	77	22324	R	R	R	R	S	R	S
32	Lia 20	R	R	R	S	S	R	S	78	22325	R	R	R	R	R	R	S
33	Lia 31	R	R	R	R	S	R	S	79	22328	R	R	R	R	R	R	S
34	Lia 23	R	R	R	R	S	R	R	80	22332	R	R	R	R	S	R	S
35	Tiefeng 19A	R	R	R	R	R	R	R	81	22335	R	R	R	R	R	R	S
36	Amphor	R	R	R	S	R	R	S	82	22336	R	R	R	R	R	R	S
37	Ecuador	R	R	R	S	R	R	S	83	22338	R	R	R	R	R	R	S
38	Mentor	R	R	R	R	S	R	S	84	22343	R	R	R	R	S	R	S
39	Suedine	R	R	R	R	S	R	S	85	22346	R	R	R	R	R	R	S
40	Sultana	R	R	R	R	S	R	S	86	22347	R	R	R	R	R	R	S
Lignées de référence									87	22349	R	R	R	R	S	R	S
41	Norchief	R	R	R	R	R	R	R	88	22350	R	R	R	R	S	R	S
42	Harosoy 63	R	R	R	R	S	R	S	89	22351	R	R	R	R	R	R	S
43	Flambeau	R	R	R	R	R	R	R	90	22353	R	R	R	R	R	R	S
44	Merit	R	R	R	R	R	R	R	91	22358	R	R	R	R	S	R	S
45	Acme	R	R	R	R	R	R	S									

(Slaymaker & Keen, 2004). Ce gène de résistance semble très répandu dans cette espèce (Farhatullah *et al.* 2011). Il est concevable que la résistance Rpg4 est présente dans tous les génotypes inclus dans ce test. Ce constat vaut aussi pour l'isolat de soja *Pseudomonas savastanoi* *pv.* *glycinea* race R4. Cette souche a pourtant été décrite comme très virulente sur un large éventail de génotypes de soja dont les variétés Acme, Flambeau et Norchief également intégrées dans notre expérimentation (Staskawicz *et al.* 1984). Dans nos essais, la souche a uniquement provoqué des nécroses 24 h et 48 h après infection, que nous devons interpréter comme réaction d'hyper-sensibilité, donc de de résistance (Keen & Buzzell 1991). Considérant que (a) nous avons utilisé la même souche que les auteurs de la publication de référence (Staskawicz *et al.* 1984) et que (b) les conditions d'infections ont été propices pour les infections d'autres *Pseudomonas syringae* *pv.* *glycinea*, il est postulé que la souche PSG R4 a perdu sa virulence. Vidic *et al.* (2013) ont également émis l'hypothèse que la souche a muté. La souche PSG R6 est virulente envers 96 % des lignées testées. Elle se distingue par la présence du gène d'avirulence *avrA1* (Vidic *et al.* 2013) lequel est reconnu par les génotypes de soja portant le gène *rpg2*, notamment les variétés locales chinoises Tiefeng 19A, J5, Lia 23 et les variétés de Merit, Fambeau et Norchief.

Le test de résistance présenté ici permet une appréciation globale et détaillée de la résistance. Il s'agit d'un outil important pour la description variétale et la sélection de variétés résistantes. La possibilité de solliciter spécifiquement des gènes de résistance devrait permettre une amélioration plus ciblée des variétés. L'emploi de marqueurs moléculaires spécifiques pour des gènes de résistance est un outil très puissant pour ultérieurement accélérer l'identification de lignées résistantes dans un contexte de sélection. A ce jour, seul le gène de résistance *rpg1-b* (interagissant avec *avrB1*) peut être identifié à l'aide de marqueurs moléculaires (Ashfield *et al.* 2003).

Pour compléter ce travail, il serait souhaitable de mieux connaître la diversité des gènes d'avirulence dans les populations du pathogène en Suisse et en Europe. Une telle étude permettrait de déterminer les gènes de résistance nécessaires pour maintenir un niveau de résistance acceptable.

Conclusions

- Un test pour évaluer la résistance du soja contre la graisse a été développé et validé.
- L'infection artificielle est effectuée par des blessures dans les feuilles de jeunes plantes et les symptômes sont notés après trois à cinq jours.
- En général, les variétés et lignées incluses dans ce test montrent des résistances envers une partie des bactéries. Seuls quatre génotypes montrent une résistance absolue contre toutes les bactéries employées.
- Le test mis en place permettra désormais d'étudier la diversité des souches bactériennes présentes pour ainsi déterminer de quels gènes de résistance nous avons besoin. Avec le développement des surfaces de soja en Europe, le développement de nouveaux outils soutenant les efforts de sélection concernant la résistance aux maladies sont nécessaires.

Riassunto

Resistenza contro la maculatura batterica della soia

La maculatura batterica della soia è una malattia fogliare provocata da *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. La malattia si manifesta con delle macchie angolari sul lembo fogliare ma causa solo raramente delle perdite di resa. Tuttavia, essendo i semi la principale fonte d'inoculo, la presenza di sementi contaminate può nuocere alla diffusione di varietà. Ciò rende l'uso di varietà resistenti il modo migliore per prevenire la malattia. Lo scopo del presente studio è di sviluppare un test di resistenza in serra che permetta di valutare la resistenza di genotipi di soia contro la maculatura batterica. I risultati, ottenuti con 7 ceppi recanti geni d'avirulenza specifica su 91 genotipi di soia, mostrano un largo spettro d'interazioni. Tutti i genotipi di soia sono resistenti contro una parte dei ceppi, ma solo 4 varietà, impiegate come referenza, mostrano una resistenza completa contro tutti i ceppi batterici. Questo test in serra servirà ora a esaminare la diversità dei geni d'avirulenza presenti nelle popolazioni di *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, ciò che permetterà di determinare i geni di resistenza utili per prevenire efficacemente la maculatura batterica e la trasmissione del patogeno tramite le sementi.

Bibliographie

- Ashfield T., Keen N., Buzzell R. I. & Innes R. W., 1995. Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic or closely linked, at the Rpg1 locus. *Genetics* **141** (4), 1597–1604.
- Ashfield T., Bocian A., Held D., Henk A.D., Fredrick Marek L., Danesh D., Peñuela S., Meksem K., Lightfoot D. A., Young N. D., Shoemaker R. C. & Innes R. W., 2003. Genetic and physical localization of the Soybean Rpg1-b disease resistance gene reveals a complex locus containing several tightly linked families of NBS-LRR genes. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16** (9), 817–826.
- Charles R. & Vulllioud P., 2001. Pois protéagineux et azote dans la rotation. *Revue suisse d'Agriculture* **33** (6), 265–270
- Clarke C. R., Cai R., Studholme D. J., Guttman D. S. & Vinatzer B. A., 2010. *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae* hrp/hrc locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system. *Molecular Plant Microbe Interactions* **23**, 198–210.
- Farhatullah, Stayton M. M., Groose R. W. & Khan M. J., 2011. Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Pakistan Journal of Botany* **43** (1), 7–13.
- Gaignard J. I. & Luisetti J., 1993. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaço-gène et pathogène. *Agronomie* **13** (5), 333–370.
- Greenberg J. T. & Vinatzer B. A., 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology* **6** (1), 20–8.
- Hymowitz T., Nelson R. L., Sinclair J. B. & Hartman G. L., 2015. History and Growth of the Soybean Plant. In: *Compendium of Soybean Diseases and Pests*, Fifth edition. (Ed. G. L. Hartman, J. C. Rupe, E. J. Sikora, L. L. Domier, J. A. Davis & K. L. Steffey). American Phytopathological Society, St. Paul, USA. 1–4.

Summary

Creating a test to measure resistance to soybean

Bacterial blight is a foliar disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. The disease is characterised by angular leaf spots yet with only little impact on the yield. The seeds constitute the primary source of inoculum, and contaminated seeds may affect the diffusion of new varieties. The best approach to preventing the disease is to use resistant varieties. The aim of this study was to develop a resistance test for the greenhouse to determine the resistance of soybean lines to bacterial blight. The test included seven bacterial strains with distinct and specific avirulence genes tested on 91 soybean genotypes. The results exhibit a wide spectrum of interactions. Whilst all genotypes were resistant to part of the bacteria, only four varieties were resistant to all bacterial strains. This test will be used to screen the diversity of avirulence genes present in the populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in order to determine which resistance genes are most useful for preventing bacterial blight and the transmission of the seed-borne pathogen.

Key words: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, gene postulation, bacterial blight, artificial infection.

- Keen N. T. & Buzzell R. I., 1991. New resistance genes in soybean against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*: evidence that one of them interacts with a bacterial elicitor. *Theoretical and Applied Genetics* **81**, 133–138.
- Kucharek T. & Stall R. E., 1985. A bacterial leaf spot disease of soybean caused by a new race of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Proceedings- Soil and Crop Science Society of Florida* **44**, 174–177.
- Mascher F., Hase C., Bouffaud M.-L., Défago G. & Moëgne-Loccoz, Y., 2014. Cell culturability of *Pseudomonas protegens* CHA0 depends on soil pH. *FEMS Microbiology Ecology* **87**, 441–450.
- Qi M., Wang D., Bradley C. A. & Zhao Y., 2011. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization based comparative genomics with nine *Pseudomonads*. *PLoS One* **6** (1), e16451.
- Siegel S. P., Zhao Y. F. & Bradley C. A., 2008. Race characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in Illinois. *Phytopathology* **98**, S146.
- Sindelar A. J., Schmer M. R., Jin V. L., Wienhold B. J. & Varvel G. E., 2015. Long-term corn and soybean response to crop rotation and tillage. *Agronomy Journal* **107** (6), 2241–2252.
- Slaymaker D. & Keen N., 2004. Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins. *Plant Science* **166**, 387–396.
- Staskawicz B., Dahlbeck D. & Keen N., 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **81**, 6024–6028.
- Vidc M., Dordevic V., Petrovic & Miladinovic J., 2013. Review of Soybean Resistance to Pathogens. *Ratarstvo i Povrtarstvo* **50** (2), 52–61.