

Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé tendre et mise au point d'outils permettant la caractérisation et la quantification de ces espèces

Romain VALADE¹, Cindy VITRY¹, Stephen LEITE¹, Jayne STRAGLIATI², Patrice SENELLART³, Benoit FOUCAULT⁴, Stephen SUNDERWIRTH⁴, Philippe LONNET⁵, Thierry LANGIN⁶, Laetitia PINSON-GADAIS⁷, Vessela ATANASOVA⁷, Pierre GEORGE⁸, Jean-Philippe MAIGNIEL⁹, Rodolphe VADAINÉ¹⁰, Valérie CADOT¹⁰, Hélène BATINA¹¹, Valérie LAVAL¹¹, Julie FERREYROLLE^{1et5*}

1 – Arvalis-Institut du végétal. Laboratoire de pathologie végétale. Avenue Lucien Brétignières, Bât Bioger -CPP, 78850 Thiverval-Grignon

2 – Limagrain Europe. Site de Chartainvilliers, 5 rue de l'égalité, 28130 Chartainvilliers. (Représentant l'UFS)

3 – Syngenta France SAS. Ferme de Moyencourt, 78910 Orgerus. (Représentant l'UFS)

4 – SARL Adrien Momont et fils. Rue Maurice Violette, 28150 Allonnes (Représentant l'UFS)

5 – Florimond-Desprez. 59242 Cappelle-en-Pévèle (Représentant l'UFS)

6 – INRA. UMR1095 GDEC. 5 chemin de Beaulieu. 63039 Clermont-Ferrand.

7 – INRA. UR1264 MycSA. 1 avenue Edouard Bourlaux, F-33 883 Villenave d'Ornon, France

8 – Biogemma. Plateforme de Phénotypage et de pathologie végétale – 6, chemin de Panedautes, 31700 Mondonville

9 – GEVES. 25 rue Georges Morel - 49071 Beaucouzé cedex

10 – GEVES. Unité expérimentale de l'Anjouère. Domaine de l'Anjouère, 49370 La Pouëze

11 – INRA. UR1290 BIOGER-CPP, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon

* Coordinateur Julie FERREYROLLE <julie.ferreyrolle@groupsud.com> Tel. : 04.66.02.21.21 ; Tel. : 06.03.83.36.11

1. Introduction

Le blé tendre (*Triticum aestivum*) est sujet à de nombreuses maladies (piétin verse, piétin échaudage et fusarioses au niveau du pied, rouilles jaune et brune, helminthosporiose et septoriose sur les feuilles, fusarioses de l'épi) qui se développent à différents stades causant des pertes de rendement importantes et des problèmes de qualité sanitaire (production de mycotoxines). Si l'amélioration de la tolérance des variétés, les pratiques culturales et les traitements fongicides ont permis de poursuivre la progression des rendements (rendement national moyen en 2013 de 74 qx/ha selon FranceAgriMer) et une bonne qualité du grain, il est nécessaire d'intensifier les travaux afin de caractériser les variétés vis-à-vis des agents pathogènes et de fournir des outils efficaces aux sélectionneurs. L'apparition de champignons pathogènes résistants aux traitements fongicides, l'érosion de la durabilité des tolérances des variétés ainsi que les contraintes actuelles sur l'usage des produits phytosanitaires en agriculture (plan ECOPHYTO) ont créé un contexte difficile dans lequel la prédiction et l'évaluation des comportements variétaux vis-à-vis de la résistance aux maladies prennent une place prépondérante. La caractérisation des variétés de blé tendre pour leur tolérance aux maladies implique une connaissance des populations actuelles de champignons pathogènes, de leurs modes de croissance et de conservation, des symptômes

générés, allant jusqu'à la maîtrise de la contamination artificielle. De surcroît, ces études nécessitent le développement d'outils fiables permettant d'observer et de quantifier les différences de comportement des variétés.

Le premier enjeu de ce projet a été la constitution d'une mycothèque de souches actuelles représentatives des différentes espèces de champignons pathogènes du blé tendre et l'identification des meilleures méthodes permettant leur isolement et leur conservation au cours du temps. Le second enjeu de cette étude a été le développement d'outils permettant la caractérisation (taxonomique, génétique et potentiel toxigène) et la quantification des différentes espèces de champignons pathogènes du blé. Des travaux ont également été réalisés sur la mise au point d'une méthode de phénotypage par imageur multispectral. Enfin, l'intérêt de ces outils pour la sélection variétale a été évalué en plein champ.

2. Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé

2.1. Constitution de la mycothèque

Il a été choisi de constituer une mycothèque composée des espèces de champignons nuisibles auxquels les cultures de blé sont le plus souvent confrontés (hors champignons biotrophes tels que les

rouilles): fusarioses causées par *Fusarium* spp., *Microdochium* spp., septorioses causées par *Zymoseptoria tritici* et *Phaeosphaeria nodorum*, l'helminthosporiose causée par *Pyrenophora tritici-repentis*, le piétin verse causée par *Oculimacula* spp., le piétin échaudage causée par *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et le rhizoctone causée par *Rhizoctonia cerealis*.

Les différents partenaires ont fourni des souches déjà disponibles et des isolations ont été réalisées à partir de plantes symptomatiques lors des trois années du projet. Au total, 151 souches correspondant à 14 espèces ont été isolées, purifiées, monosporees et constituent la mycothèque. Les espèces les plus représentées sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Microdochium* spp. et *Z. tritici* qui sont les agents pathogènes les plus représentatifs des maladies sur blé tendre à l'heure actuelle (hors rouilles). Cette mycothèque est stockée en trois exemplaires distincts (Arvalis-Institut du végétal, Biogemma, GEVES-SNES) afin d'éviter tout risque de perte. L'ensemble des données disponibles sur les souches est accessible pour les partenaires sur la base R-syst (<http://138.102.89.203/champsys/>).

Cette banque, pérenne et accessible aux acteurs de la sélection variétale, génère à la fois une connaissance sur les souches actuelles de champignons pathogènes du blé tendre et une importante source d'inoculum pouvant être employée de manière concrète pour phénotyper les essais de sélection variétale vis-à-vis des résistances aux maladies ciblées.

La création d'une mycothèque est assez facile mais l'entretien et la conservation des souches sur le long terme est souvent problématique. Dans ce projet, nous avons évalué des protocoles de conservation des souches afin d'assurer la pérennité de la collection.

2.2. Méthodes de conservation des isolats.

2.2.1 Matériel et Méthodes

Deux genres particulièrement bien représentés ont été choisis pour évaluer les protocoles de conservation : le genre *Fusarium* (5 espèces, 51 isolats) et le genre *Zymoseptoria* (1 espèce, 11 isolats). 3 protocoles de conservation des isolats ont été testés :

- dans du glycérol 20% à -80°C
- dans du glycérol 50% à -80°C
- sans substance cryoprotectante (uniquement *Z. tritici*).

Pour chacun de ces protocoles, nous avons évalué la forme de conservation (spore ou mycélium) la plus adaptée pour maintenir les capacités de sporulation et d'agressivité des différentes souches après 8 jours, 1 mois, 6 mois et 1 an de congélation.

2.2.2 Résultats

- Conservation de *Fusarium* spp. sous forme de spores :

Pour les deux concentrations de glycérol étudiées, certaines souches survivent mal sous la forme de spores. A la plus forte concentration de glycérol (50%), jusqu'à 50% des souches peuvent être perdues et cela dès 8 jours de congélation. Le temps de conservation n'influe pas sur le nombre de souches qui survivent.

- Conservation de *Fusarium* spp. sous forme mycélienne :

Indépendamment de l'espèce, toutes les souches se sont développées après une conservation à -80°C pendant 8 jours, 1 mois, 6 mois ou 1 an. Le diamètre moyen des colonies après 4 jours de culture est présenté Figure 1. La vitesse de croissance diffère d'une espèce à l'autre et les souches conservées dans du glycérol 50% ont une croissance plus lente. Après plusieurs jours de culture, toutes les souches de toutes les espèces ont complètement envahi la boîte de culture, indépendamment du temps de conservation à -80°C.

- Conservation des souches de *Z. tritici*

In vitro, sur milieu malt agar, *Z. tritici* ne se développe pas sous forme mycélienne mais sous sa forme levure. Cette forme levure se présente sous forme d'une 'pâte' laiteuse de couleur marron clair/rosé qui peut être stockée sans substance cryoprotectante.

Les souches de *Z. tritici* se sont très mal conservées sous forme de spores dans le glycérol 50%. En effet, les taux de survie ont été faibles, inférieurs à 0.16. Pour les conservations sans cryoprotectant et avec 20% de glycérol, les taux de survie sont meilleurs et toutes les souches ont fini par coloniser le milieu gélosé. Dans les trois méthodes de conservation, une forte variabilité a été observée entre les souches (Figure 2).

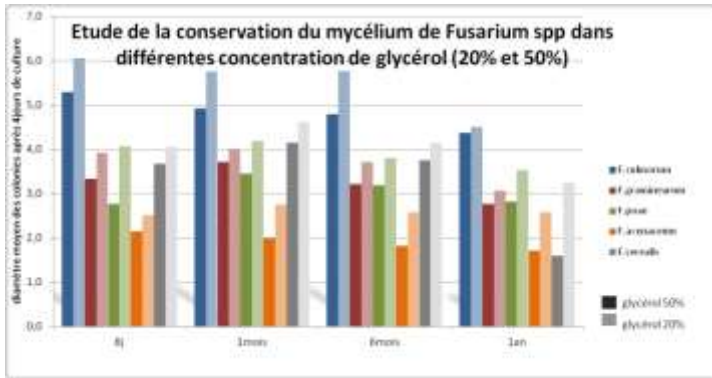


Figure 1 : mesure de la croissance des souches de *Fusarium spp.*, conservées à -80°C à 4 jours de culture. Le diamètre moyen des colonies est présenté pour toutes les espèces de *Fusarium* testées. Les barres pleines représentent les souches conservées dans du glycérol 50% et les barres hachurées celles conservées dans du glycérol 20%. Les analyses ont été effectuées à 8 jours (8J), 1 mois (1M), 6 mois (6M) et 1 an de congélation.

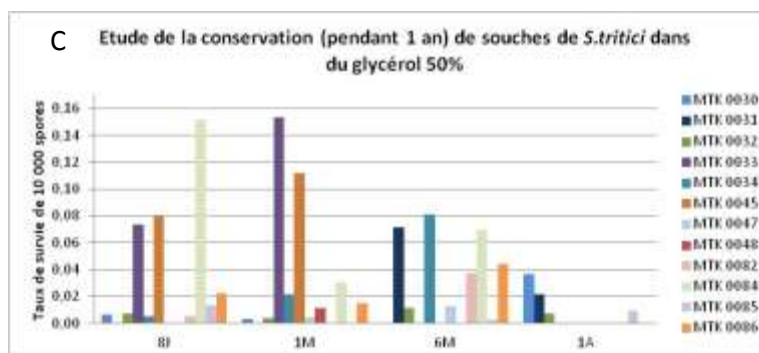
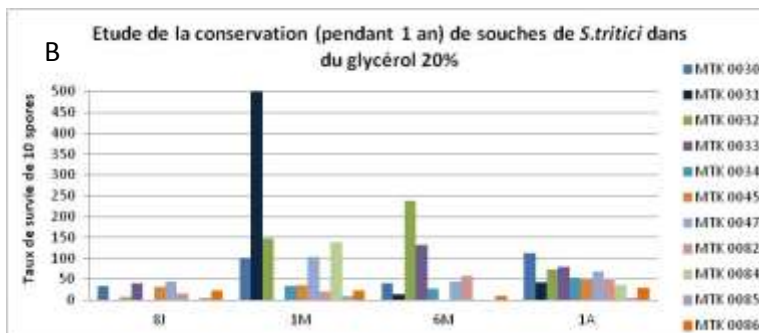
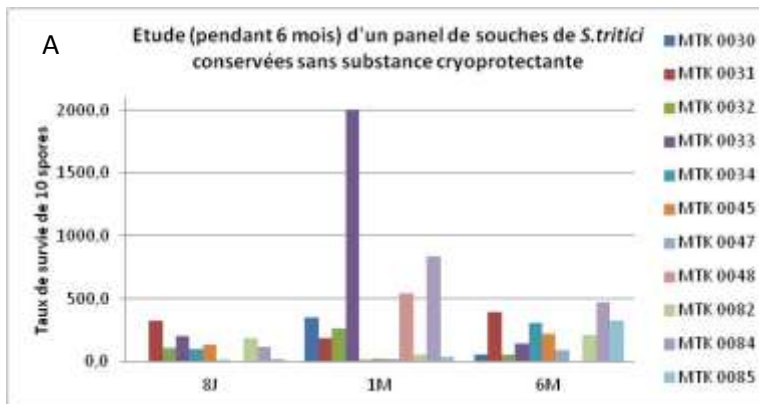


Figure 2 : mesure du taux de survie des spores de *Z. tritici* après congélation sans substance cryoprotectante (A), dans du glycérol 20% (B), dans du glycérol 50% (C). Le taux de survie est présenté pour toutes les souches à 8 jours (8J), 1 mois (1M), 6 mois (6M), et 1 an (1A).

2.2.3 Conclusions

Les espèces de *Fusarium* supportent bien la conservation à -80°C sous forme mycélienne sur un an contrairement aux spores où la perte est très variable selon les souches et indépendante du temps de conservation. La croissance est plus rapide quand la conservation a été effectuée dans du glycérol 20%.

La conservation des souches de *Z. tritici* ne doit pas se faire dans 50% de glycérol. La conservation sans cryoprotectant est rapide, peu coûteuse et efficace puisque toutes les souches sont reparties. La conservation des spores dans 20% de glycérol est également efficace.

Une fiche technique pour la conservation de ces genres a été mise à disposition des partenaires (Annexes 1 et 2).

2.3. Agressivité des souches après conservation

2.3.1 Matériel et Méthodes

L'espèce *Fusarium graminearum*, particulièrement bien représentée a été choisie pour évaluer l'agressivité après conservation : 4 méthodes de conservation ont été comparées : repiquage régulier sur milieu solide (plug), conservation sous huile à température ambiante, congelé à -80°C et congelé sous azote liquide. Le test a consisté à produire un inoculum liquide d'une concentration de spores connues à partir des 4 conservations pour 9 souches sélectionnées pour leurs origines variées. L'agressivité a été évaluée en serre sur les variétés Apache et Altigo. Les épis ont été inoculés à floraison par pulvérisation des spores. L'évolution des symptômes a été notée une fois par semaine pendant 1 mois après infection.

2.3.2 Résultats

Les tests effectués ont mis en évidence des différences d'agressivité entre les souches pour un génotype donné mais également selon la tolérance du génotype infecté.

La comparaison des méthodes sur la base du taux maximum de symptômes obtenus 28 jours après infection sur un génotype tolérant (Apache) a révélé des différences en fonction de la méthode de conservation (Figure 3). Pour certaines des souches étudiées, les méthodes de conservation sont comparables mais pour 4 souches, l'agressivité peut se trouver réduite (jusqu'à 40%). Cette baisse

d'agressivité a été observée dans le cas d'une conservation par repiquages successifs (plugs) ou d'une conservation en huile.

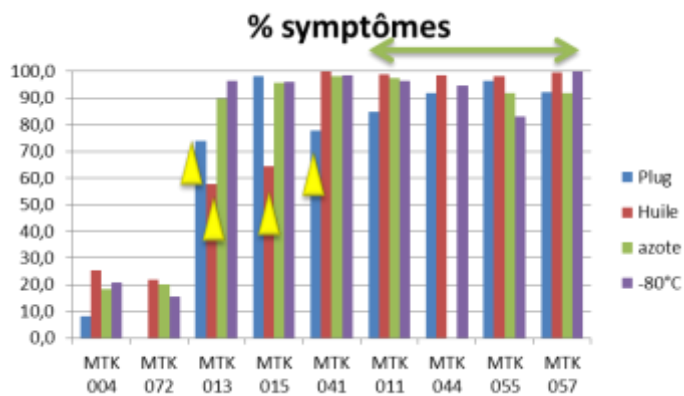


Figure 3: % symptômes obtenus (par rapport au maximum observé) en fonction des 4 méthodes de conservation (plug, huile, azote, -80°C) pour les 9 souches de *F. graminearum* inoculées sur Apache.

2.3.3 Conclusion

Il apparaît donc important de privilégier la congélation soit à -80°C soit sous azote liquide pour assurer le maintien de l'agressivité des souches de *Fusarium graminearum* dans le temps.

3. Développement d'outils de caractérisation des isolats

3.1. Caractérisation taxonomique des isolats

Certaines espèces fongiques sont difficilement identifiables par des caractères taxonomiques classiques (morphologie) qui peuvent être soit difficiles à observer, soit faiblement discriminants. Dans ces cas, des marqueurs moléculaires taxonomiques (gènes barcode, gènes pour analyses phylogénétiques), sont utilisés pour identifier de manière précise les espèces auxquelles appartiennent les différents isolats étudiés. De nombreuses initiatives nationales (R-Syst) et internationales (IBOL) consacrent leurs efforts à réunir les informations de taxonomie moléculaire et morphologique. Ces bases de données permettent de développer des outils de diagnostic et d'identification d'espèce performants en s'appuyant sur les gènes barcode connus.

Afin de valider la détermination morphologique des souches déposées dans la mycothèque, une caractérisation moléculaire de chaque souche de la mycothèque a été effectuée. L'objectif est de donner à

chaque souche un marqueur barcode, la séquence de l'Internal Transcribed Spacer (ITS) de l'ADN ribosomique. Ce gène a été choisi car il est à présent le barcode officiel et référent pour les champignons (Schoch et al., 2012). Le gène ITS, bien que permettant de déterminer l'espèce d'appartenance des souches dans la plupart des cas, n'est pas taxonomiquement résolutif pour le genre *Fusarium*. Ainsi, pour le genre *Fusarium*, le gène EF1 alpha, plus résolutif, a été amplifié et séquencé.

L'ensemble des séquences obtenues une fois analysées et nettoyées ont été déposées dans la base de données R-Syst et sont accessibles aux partenaires du projet via le web. De plus, les séquences obtenues dans ce projet alimentent la base qui permet de produire des outils de plus en plus spécifiques au fur et à mesure que le nombre de séquences augmente.

3.2. Caractérisation génotypique des isolats

En complément des données de taxonomie moléculaire, les isolats de *Z. tritici*, ont été génotypés à l'aide de marqueurs moléculaires microsatellites par une méthode développée lors d'un précédent projet FSOV (Gautier et al., 2014, FSOV 2008 H).

Chaque isolat génotypé a au moins un allèle qui le différencie des autres. Ainsi, les isolats de *Z. tritici* constituant la mycothèque correspondent à des souches distinctes qui grâce aux marqueurs microsatellites pourraient être suivies dans des essais inoculés et différenciés de l'allo-inoculum.

3.3. Caractérisation du potentiel toxigène des isolats

Parmi les différents agents pathogènes du blé tendre, certaines espèces sont connues pour leur production de mycotoxines. Les espèces du genre *Fusarium* spp. sont les principales responsables de la présence de mycotoxines dans le grain à la récolte (Trichotécènes A et B, Enniatines, Beauvericine...). Ainsi, les souches de *Fusarium* spp. de la mycothèque ont été caractérisées pour leur potentiel toxigène par une approche moléculaire, ou biochimique quand les tests moléculaires n'ont pu être définis.

3.3.1 Définition d'outils moléculaires de caractérisation du type de toxines potentiellement produites par une souche donnée.

Des outils de caractérisation et quantification moléculaire (qPCR) des souches productrices de trichothécènes A et B (TCT), d'enniatiens (ENNs) et beauvericine (BEA) ont été développés dans ce projet.

Un outil spécifique des chémotypes de TCTB (DON/15ADON, DON/3ADON et NIV/FX) basé sur le gène Tri12 et un outil TCTA (T2/HT2 +DAS/MAS) basé sur le gène Tri16 ont été validés. Le gène Tri16 est un gène impliqué uniquement dans la voie de biosynthèse des TCTA (Kimura *et al.*, 2007 ; Peplow *et al.*, 2003). Le gène Tri12 code pour un transporteur membranaire spécifique des TCTs (Alexander *et al.*, 1999). En ce qui concerne les TCTA, un outil permettant de quantifier spécifiquement les producteurs de T2/HT2 a été validé. Ces outils ont été développés en technologie TaqMan avec des sondes FAM/BBQ.

De même, le développement d'outils permettant d'identifier et de quantifier les *Fusarium* producteurs d'ENNs et BEA a été mené. Un seul gène a jusqu'à présent été décrit comme impliqué dans la biosynthèse d'ENNs, *esyn1* (Kulik *et al.*, 2007, 2011 ; Nicholson *et al.* 2004). Une analyse comparée des séquences disponibles pour ce gène chez toute une gamme de souches potentiellement productrices d'ENNs a mis en évidence l'impossibilité de définir un outil commun à l'ensemble des espèces fusariennes capables de produire des ENNs. Dans un premier temps quatre couples d'amorces ont ainsi été définis et ont été analysés. Un seul couple d'amorces (AVE/SCRIPTI) a permis d'amplifier quatre espèces suivantes : *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. temperatum*. Pour les autres espèces productrices d'ENNs et/ou BEA (*F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*), le produit d'amplification est spécifique mais se fait tardivement. Nous avons essayé d'augmenter la spécificité et gagner de la sensibilité en développant des sondes TaqMan (FAM/BBQ) avec le couple d'amorces AVE/SCRIPTI. Ainsi trois sondes TaqMan ont été testées avec ces amorces AVE/SCRIPTI :

-sonde1: spécifique de *F. acuminatum*, *F. tricinctum* et *F. avenaceum*,

-sonde2: spécifique de *F. poae* et *F. sporotrichioides*,

-sonde3: spécifique de *F. proliferatum* et *F. oxysporum*.

Seule la sonde 1 avec les amorces AVE/SCRIPTI a permis d'obtenir une amplification pour les espèces de *F. acuminatum*, *F. avenaceum* et *F. tricinctum* avec des CT

(Cycle Threshold) et des efficacités pour les trois espèces proches. Cette sonde 1 FAM/BBQ + les amorces AVE/SCRIPTI permet une bonne identification et quantification dans une matrice complexe comme le blé. L'outil permet donc de quantifier 3 des 7 espèces de *Fusarium* producteurs de ENNs et/ ou BEA retrouvés sur blé. Dans la littérature des amorces et une sonde spécifiques à l'amplification de *F. poae* ont été développées. Ces amorces et cette sonde seront testées pour essayer de faire un multiplexage avec l'outil développé pour *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. acuminatum*. Ainsi nous pourrions détecter et quantifier les 4 espèces majoritairement présentes sur blé productrices d'ENNs et BEA.

3.3.2 Mise au point et validation de méthodes d'extraction et d'analyse de toxines émergentes : enniatiens, beauvericine et moniliformine

Nous avons également mis au point et validé les méthodes d'extraction et d'analyse de la beauvericine, des enniatiens et de la moniliformine considérées comme des toxines "émergentes".

La moniliformine est extraite par un mélange acétonitrile / eau. L'extrait est évaporé, repris dans du méthanol et purifié sur colonne Strata Sax de PHENOMENEX. Puis la moniliformine est éluée par de l'acide chlorhydrique. L'extrait est de nouveau évaporé et repris avec une solution acétonitrile/eau pour être analysé par HPLC UV.

L'extraction d'ENNs et BEA se fait par un mélange d'acétonitrile / eau. L'extrait est évaporé et repris avec une solution acétonitrile/eau pour être analysé. Nous avons testé deux modes de détections pour ces toxines : par spectrométrie de masse et DAD. Nous avons opté pour la détection par spectrométrie de masse compte tenue d'une plus grande spécificité par ce mode de détection.

3.3.3 Caractérisation du potentiel toxigène des isolats de la mycothèque

La mise au point des outils moléculaires, et des méthodes d'extraction et d'analyse des toxines dites "émergentes", a permis la caractérisation du potentiel toxigène des souches de la mycothèque et la comparaison des 2 méthodes

- Moléculairement :

Grâce aux outils définis, nous avons pu caractériser le chémotype en TCTB, des 69 souches de *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. crookwellense* de ce projet.

48 souches de *F. graminearum* sont de chémotype DON/15ADON, 3 souches de chémotype NIV/FX et 1 souche de chémotype DON/3ADON. Pour les souches de l'espèce *F. culmorum* 10 souches sont de chémotype DON/3ADON et 9 souches de chémotype NIV/FX. Les deux souches de *F. crookwellense* sont de chémotype NIV/FX.

Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet les souches de *F. graminearum* présentes en Europe peuvent être de deux chémotypes soit DON/15ADON soit NIV/FX (Boutigny *et al.*, 2014, Yli-Mattila 2010, Wang *et al.*, 2008) avec une fréquence beaucoup plus importante des souches de *F. graminearum* de chémotype DON/15ADON. La souche de *F. graminearum* chémotypée DON/3ADON est à confirmer par caractérisation biochimique de son potentiel toxigène car ce chémotype n'est pas encore rencontrée en France, bien que quelques souches aient été récemment isolées en Angleterre (2011) (Communication personnelle Ryan Basler). Chez *F. culmorum*, deux chémotypes existent : le DON/3ADON et le NIV/FX. Chez les souches de *F. crookwellense*, seul le chémotype NIV existe.

- Biochimiquement :

Dans plusieurs publications (Duverger *et al.*, 2011, Greenhalgh *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2013), il a été montré que le potentiel toxigène des souches était plus important *in vitro* sur substrat riz. Ainsi, pour caractériser au mieux le potentiel toxigène des souches, nous avons testé plusieurs substrats de culture :

- le riz et le maïs pour les souches de *F. poae* et *F. avenaceum* producteurs de toxines " émergentes",
- le blé et le riz pour les souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* producteurs de TCTB.

Nous avons ainsi comparé ces substrats sur un panel de 6 souches pour chacune de ces quatre espèces.

F. poae et *F. avenaceum* sont connus pour être des producteurs de BEA et ENNs. Actuellement pour ces deux espèces, il existe très peu d'études sur l'évaluation de leur capacité à produire ces toxines et leur variabilité intra-spécifique et inter-spécifique :

F. avenaceum : 5 des 6 souches produisent les quatre types d'ENNS (A1, A, B, B1) avec majoritairement de l'ENNs B1 et B. Les niveaux de productions sont très importants, pouvant aller jusqu'à 225 000µg/Kg. Pour cette espèce et ce type de toxine, la production a été meilleure sur le substrat riz.

F. poae : 3 des 6 souches produisent de l'ENN et exclusivement de l'ENNA. Les souches de *F. poae* sont des souches faiblement productrices d'ENNs (2 à 50µg/Kg) comparativement aux souches de *F. avenaceum*. Pour les souches de *F. poae*, les deux substrats semblent convenir pour la caractérisation du potentiel toxigène.

Pour la BEA, toutes les souches de *F. avenaceum* produisent de la BEA mais en faible quantité (de 5µg/Kg à 30µg/Kg) alors que toutes les souches de *F. poae* en produisent de fortes quantités (de 10 000µg à 25 000µg/Kg). Le substrat affecte peu la capacité des souches de *F. poae* ou *F. avenaceum* à produire de la BEA.

Aucune des souches des deux espèces ne produit de la moniliformine.

Pour les souches de *F. graminearum* et *F. culmorum*, la production de TCTB est meilleure sur le substrat riz que sur blé (Figure 4) alors que la production de zéaralénone ne semble pas impactée par le substrat.

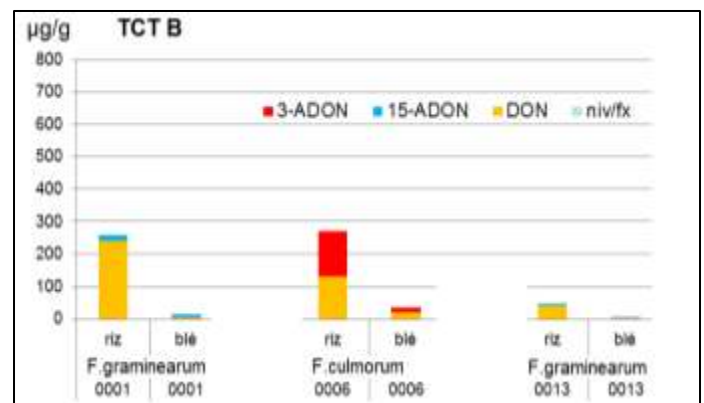


Figure 4: Production de TCTB (3aDON, 15aDON, DON, niv/fx) en µg/g en fonction du substrat (riz ou blé) pour 2 souches de *F. graminearum* et une souche de *F. culmorum*

- Comparaison des deux méthodes :

Les souches constituant la mycothèque ont toutes été chémotypées moléculairement et biochimiquement en TCTB. Les résultats du chémotypage biochimique est

cohérent avec celui déterminé moléculairement pour pratiquement toutes les souches, à l'exception de 6 souches sur les 51 analysées. Pour ces souches nous avons moléculairement déterminé un chémotype NIV/FX et nous avons biochimiquement une production de DON faible. Deux de ces souches : MTK 072 et MTK 0076 ont été également chémotypées moléculairement dans le cadre d'un autre projet (coll. Todd Ward, USDA), avec un résultat similaire au nôtre (chémotype NIV). Les analyses biochimiques de ces souches ont été ré-analysées, et ont confirmé la présence de DON. De nouvelles expériences doivent être menées afin de comprendre la différence observée.

Ainsi toutes les souches de *Fusarium* disponibles dans la mycothèque pour les différents partenaires de ce projet sont parfaitement caractérisées (caractérisation taxonomique, génotypique et potentiel toxigène). Des outils moléculaires permettant la quantification des *Fusarium* appartenant aux deux grands types de producteurs TCTB, TCTA ont été définis. Avec un outil moléculaire permettant de caractériser le chémotype de la souche chez les *Fusarium* producteurs de TCTB (DON/15ADON, DON/3ADON et NIV/FX). Quant à l'outil permettant la quantification des *Fusarium* producteurs de ENN et BEA, il cible pour l'instant 3 des 7 espèces de *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. acuminatum*) producteurs de ENNs et BEA retrouvées sur blé. Ces trois espèces sont avec le *F. poae*, les quatre espèces majoritaires retrouvées sur blé.

3.4. Mise au point de la quantification des différentes espèces de champignons pathogènes

Des outils moléculaires de quantification de la biomasse fongique (qPCR) pour différentes espèces ont été développés, internalisés ou validés dans les différents laboratoires des partenaires. En effet, l'isolement d'un grand nombre de souches bien déterminées et caractérisées a permis de valider la spécificité des méthodes moléculaires qui étaient en cours de développement dans les différents laboratoires. Ainsi, des méthodes qPCR pour sept espèces de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*) et deux espèces de *Microdochium* (*M. majus*, *M. nivale*) ont pu être validées (Elbelt *et al.* submitted).

Une nouvelle méthode qPCR spécifique de *Z. tritici* a également été mise au point lors de ce projet. Des méthodes qPCR pour *Z. tritici* déjà publiées ont été évaluées dans un projet FSOV précédent (D. Gouache *et al.*, FSOV 2008 H). Ces méthodes présentent des niveaux de spécificité et sensibilité qui sont variables. Ainsi, une nouvelle méthode plus spécifique basée sur la technologie TaqMAN avec comme cible un gène nucléaire monocopie codant pour la mannitol déshydrogénase a été validée selon les directives de la norme AFNOR V03-110 et du protocole d'accréditation Cofrac pour la détection d'OGM (Ferreynolle *et al. in prep*).

Ces outils moléculaires sont disponibles pour l'ensemble des partenaires et ont été appliqués et évalués, pour certains, pour leur utilité dans l'aide à la sélection variétale et pour caractériser la sensibilité variétale du blé tendre.

4. Applications à la sélection variétale

4.1 Outils moléculaires

Les outils moléculaires développés et validés au cours de ce projet ont été appliqués à des essais au champ pour évaluer l'intérêt de ces méthodes dans la caractérisation variétale du blé tendre face à leurs principaux agents pathogènes. L'objectif a été de déterminer si une relation existe entre les notations habituellement effectuées par des observations visuelles des symptômes (qui sont fastidieuses voire impossibles notamment quand plusieurs maladies sont présentes sur les mêmes organes), les rendements et la quantité d'ADN du champignon ciblé. Dans le projet, nous avons ciblé deux maladies principales qui sont les fusarioses causées par *F. graminearum* et *Microdochium* spp. et la septoriose causée par *Z. tritici*.

4.1.1 Matériels et méthodes

➤ Septoriose

10 variétés de blé tendre (Tableau 1) couvrant la gamme de sensibilité à la septoriose ont été implantées en microparcelles en 2012 sur 5 lieux dans un dispositif à deux répétitions sous des conditions de contamination naturelle. En 2013, les mêmes variétés ont été implantées dans 6 lieux en deux répétitions inoculées indépendamment par 4 souches de *Z. tritici* et deux répétitions non inoculées. Les 4 souches

(MTK031, MTK046, MTK084 et la IPO09415-MSI) ont été inoculées à 3 dates au stade Z39.

Deux notations globales ont été réalisées ; la première dès que les deux témoins sensibles ont présenté des symptômes sur la F2 définitive et la seconde au stade Z75. A chaque stade de notation et suite à la notation globale, des prélèvements de 25 feuilles pour chaque étage foliaire (F1, F2 et F3) ont été effectués. Sur ces feuilles, une seconde notation détaillée par étage foliaire (F1, F2 et F3 définitives) a été effectuée. 5 feuilles de chaque étage foliaire ont été regroupées pour créer un échantillon moyen qui a été ensuite analysé par la PCR quantitative développée pendant le projet. La présence du champignon a également été quantifiée pour chaque étage foliaire séparément (15 feuilles / échantillon) afin de déterminer les étages foliaires les plus représentatifs de la sensibilité variétale avec la méthode moléculaire.

En 2012, dans des conditions de contamination naturelle, deux lieux avec une pression de septoriose discriminante ont pu être analysés (Allonnes, 28 et Premesques, 59). En 2013, les deux lieux analysés sont situés dans le 28. Dans les autres lieux, le témoin non-inoculé a été soit fortement attaqué soit d'autres champignons comme la rouille brune ont empêché les notations.

➤ Fusariose

10 variétés de blé tendre (Tableau 1) couvrant la gamme de sensibilité à la fusariose ont été implantées en microparcelles en 2012 sur 6 lieux dans un dispositif à deux répétitions avec cannes de maïs afin de faciliter la contamination. En 2013, 4 essais ont été réalisés avec les mêmes variétés mais contaminées artificiellement sous un dispositif de brumisation avec trois souches différentes (2 *F. graminearum* et 1 *M. nivale*). La souche MTK004 (*F. graminearum*) présente un chémotype 15aDON, la souche MTK012 (*F. graminearum*) un chémotype NIV et la souche MTK088 est une souche de *M. nivale*. Des notations ont été effectuées à 350°J et 450°J après floraison. 25 épis par modalité et notation ont été prélevés et analysés par PCR quantitative pour la présence de *F. graminearum*, *M. majus* et *M. nivale*.

Tableau 1 : Liste des variétés implantées dans les essais au champ avec cotations de résistance à la septoriose et à la fusariose des épis (Source GEVES/Arvalis-Institut du végétal). Notes croissantes de 1 à 9 de résistance aux maladies.

Variétés blé tendre	Note CTPS septoriose	Variétés blé tendre	Note CTPS Fusariose
Aubusson	4	Royssac	2
Alixan	4	Bermude	3.5
Apache	4.5	Altigo	4
Bermude	5	Premio	4.5
Premio	5,5	Solehio	5
Altigo	5,5	Alixan	5
Caphorn	6	Aligator	5
Boregar	7	Arezzo	5.5
Solehio	7	Barok	6.5
Barok	7	Apache	7

4.1.2 Résultats

➤ Septoriose :

En conditions naturelles, les corrélations entre les notations globales, les notations détaillées et la quantité d'ADN de *Z. tritici* sont très bonnes (Tableau 2). Une corrélation de 0.76 et 0.67 (respectivement pour l'essai d'Allonnes et de Premesques) est obtenue entre les notations globales et l'analyse moléculaire sur les étages foliaires groupés. Les étages foliaires sont retrouvés aisément avec l'outil moléculaire, avec une contamination graduelle de la F3 à la F1, conformément au développement par étages de la maladie. Les variétés se classent bien, avec une difficulté cependant au niveau des variétés intermédiaires qui sont très proches.

L'outil qPCR a permis également d'évaluer l'impact de la maladie sur le rendement. Ainsi, à Allonnes (28), la quantité d'ADN de *Z. tritici* explique 60% du rendement observé alors qu'elle n'explique que 15% à Premesques. Ceci s'explique par la présence importante de rouille brune et de rouille jaune dans l'essai de Premesques. La présence des rouilles a rendu impossible les notations à la date 2 pour deux variétés sensibles (Boregar et Alixan) à Premesques mais l'apport de la qPCR a permis de classer ces variétés de façon cohérente par rapport aux notes CTPS.

Tableau 2 : Corrélations entre notations globales et données moléculaires aux 2 dates de notations pour le site d'Allonnes (28) et le site de Premesques (59) en 2012.

Allonnes				Premesques					
Globalité (F1+F2+F3)	Symptômes 1 ^{ère} notation	Symptômes 2 ^{ème} notation	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation	Globalité (F1+F2+F3)	Symptômes 1 ^{ère} notation	Symptômes 2 ^{ème} notation	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation
Symptômes 1 ^{ère} notation	1	0,87	0,70	0,83	Symptômes 1 ^{ère} notation	1	0,94	0,93	0,83
Symptômes 2 ^{ème} notation		1	0,67	0,78	Symptômes 2 ^{ème} notation		1	0,90	0,86
Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation			1	0,74	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation			1	0,92
Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation				1	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation				1

En 2013, sous contamination artificielle, seul l'essai d'Allonnes (28) a montré des différences significatives entre les modalités inoculées et les témoins non inoculés. Ainsi, même si la méthode d'inoculation utilisée est la plus efficace connue, sa réussite est très dépendante des conditions climatiques et de la pression maladie naturelle. 3 souches différentes ont été inoculées à Allonnes. Les modalités inoculées avec la souche MTK082 ne sont pas significativement différentes du témoin non inoculé.

Ce résultat est cohérent avec les tests de phénotypage réalisés en conditions contrôlées. En effet, cette souche est avirulente sur l'ensemble des hôtes différentiels testés (17 gènes stb). Ce résultat met en évidence une bonne corrélation entre les données obtenues en conditions contrôlées et les données au champ. De même, les modalités inoculées avec les souches IPO 09415-MSI et MTK030 sont significativement différentes du témoin. Le comportement des 10 variétés face à ces deux souches est similaire suggérant un spectre de virulence proche entre les deux souches mais une agressivité plus importante a été observée pour la souche IPO 09415-MSI.

La corrélation entre les notes visuelles globales et les qPCR sur les trois étages foliaires regroupées est de mieux en mieux corrélée avec l'efficacité de l'inoculation, avec la pression maladie. En effet, la corrélation est seulement de 0.27 dans le témoin non inoculé alors qu'elle est de 0.64 avec la souche MTK030 et de 0.88 avec la souche IPO 09415-MSI.

➤ Fusariose :

En 2012, 3 essais ont été analysés avec les outils qPCR. Dans chaque essai, les deux répétitions ont été homogènes (test student, $p > 0.05$) à la fois pour les données de notations visuelles et les données moléculaires confirmant l'intérêt de réaliser des essais de caractérisation variétale pour la sensibilité à la fusariose avec des cannes de maïs. La corrélation entre le pourcentage d'épillets fusariés et la qPCR est très

faible pour les trois essais mais meilleure avec les notes visuelles globales (Figure 5).

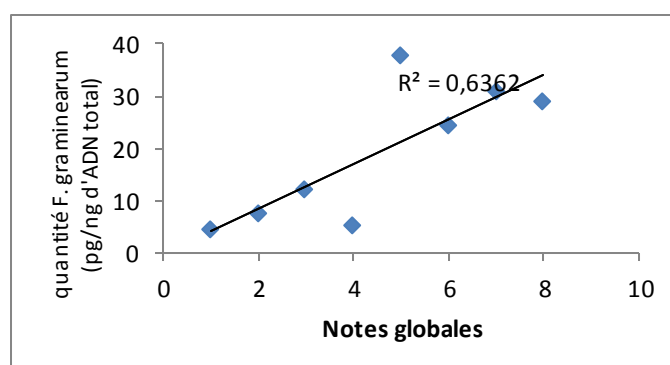
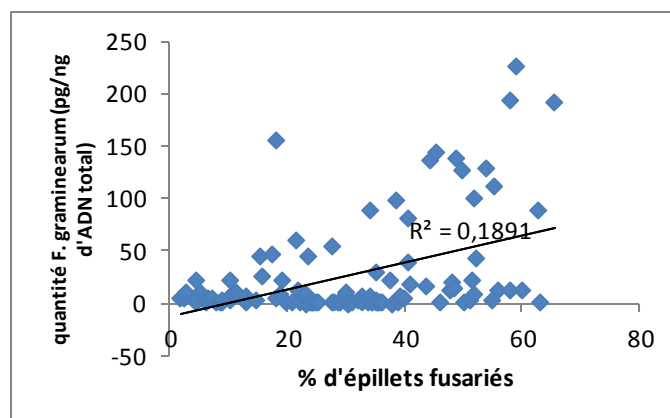


Figure 5 : quantité d'ADN de *F. graminearum* en fonction des notes détaillées en pourcentage d'épillets fusariés (en haut) et des notes globales (en bas).

Ces résultats s'expliquent par la variabilité très importante observée avec les notations en pourcentage d'épillets fusariés et de la difficulté à noter ce type de symptômes. De plus, le pourcentage d'épillets fusariés n'indique pas la surface atteinte qui est probablement mieux corrélée aux données moléculaires et confirmée par la meilleure corrélation avec les notes visuelles globales qui prennent en compte un aspect général de la parcelle. Enfin, il est très difficile de séparer les symptômes causés par *F. graminearum*, des symptômes causés par d'autres espèces comme *Microdochium* qui ont été retrouvés dans au moins deux des trois essais.

Néanmoins, le classement variétal obtenu est plutôt cohérent avec les notes DON (Arvalis) ou les notes CTPS en utilisant la qPCR d'autant plus que la pression est importante.

En 2013, deux des quatre essais réalisés ont été analysés par les outils moléculaires (Maule, 78 et Verneuil l'étang, 77). Dans ces deux essais inoculés avec trois souches différentes, aucune différence significative n'a été observée entre les répétitions d'une même modalité confirmant une homogénéité de la pression maladie. L'inoculation par *F. graminearum* a été efficace dans les deux essais pour la souche MTK012 (chénotype NIV), validée par des différences significatives observées pour les données moléculaires et les notations par rapport aux témoins. Pour la souche MTK004 (chénotype 15aDON), l'inoculation n'a été statistiquement efficace que dans un seul essai. De plus, cette souche semble moins virulente que la souche MTK012. En effet, la différence avec le témoin est moins importante à la fois pour les données quantitatives et les notations. Dans les deux essais, l'inoculation par *Microdochium nivale* (MTK088) n'a pas été efficace et n'a pas permis de caractériser les variétés pour cette souche. Néanmoins, la présence de *Microdochium nivale* dans les témoins et l'utilisation de l'outil moléculaire spécifique de *Microdochium* a permis d'estimer la sensibilité à *Microdochium* des différentes variétés. Les résultats observés suggéreraient quelques différences de sensibilité variétale qui ne sont pas complètement corrélées aux notes CTPS fusarioses. Ces résultats restant à confirmer dans des expériences dédiées et avec un plus grand nombre de variétés et d'analyses, ils ne sont pas présentés ici. Néanmoins, un projet FSOV accepté en 2014, coordonné par l'UFS et en partenariat avec Arvalis-Institut du végétal et le GEVES aura notamment pour but de mettre au point une méthode d'inoculation artificielle de *Microdochium* au champ et de caractériser un panel de variétés récentes pour la sensibilité à *Microdochium* en utilisant les outils développés dans ce projet.

4.1.3 Conclusion

L'expression des symptômes de septoriose au stade adulte est bien corrélée au développement du champignon dans la plante et donc à la quantité d'ADN présent. Dans une étude précédente (FSOV 2008), Gouache et collaborateurs ont montré que les données moléculaires et les notations sont globalement

corrélées mais à des valeurs assez faibles (30 à 45 %). Dans notre étude, les corrélations observées sont de l'ordre de 70 à 80%. Ceci peut s'expliquer par une meilleure spécificité et sensibilité de la méthode moléculaire développée dans ce projet. Ainsi, la qPCR est utilisable pour caractériser plus finement les variétés. En effet, en complément des notes visuelles, elle permet de s'affranchir des risques de confusion avec d'autres maladies (comme les rouilles) afin d'obtenir une caractérisation fine pour une maladie donnée. De plus, en complétant avec une inoculation artificielle efficace avec une souche préalablement caractérisée, cela peut permettre de différencier des variétés au champ pour des gènes *stb* putatifs.

La corrélation entre la quantification moléculaire de *F. graminearum* et les notations visuelles est moins importante que celle observée avec *Z. tritici*. Ceci s'explique par différents facteurs qui sont la difficulté à noter des symptômes de fusariose inféodée uniquement à *F. graminearum* et qui sont très dépendants de l'expertise de l'expérimentateur et de la pression maladie exercée par *F. graminearum* seule. Néanmoins, l'outil qPCR est assez bien corrélé avec les notes globales notamment dans les essais où *F. graminearum* est prédominant. L'outil moléculaire permet également de vérifier plus finement l'homogénéité d'un essai et le suivi du développement de la maladie notamment à des stades précoces ou très tardifs (stade où les notations visuelles sont difficiles à réaliser). Les outils moléculaires utilisés permettent également de suivre le développement de plusieurs agents pathogènes causant des symptômes proches (*F. graminearum* VS *Microdochium* spp.) et donc de caractériser de manière plus fine que les notations visuelles la sensibilité des variétés face à ces différents bioagresseurs.

En complément des méthodes moléculaires, un autre outil de phénotypage a été évalué pour diagnostiquer la fusariose de l'épi à partir des essais analysés avec la qPCR.

4.2 Etude de l'imagerie multispectrale (Vidéométer) pour diagnostiquer la fusariose de l'épi

4.2.1 Introduction

En 2013, le GEVES a mis au point une nouvelle méthode de phénotypage pour évaluer la résistance à la fusariose sur blé tendre (*Fusarium graminearum* et *culmorum*), en développant un programme de détection des grains fusariés par le Videometer, qui enregistre une image multispectrale à partir d'éclairages successifs sur 20 longueurs d'ondes (Figure 6). Les premiers essais menés, hors programme Mycotek, sur les témoins CTPS au GEVES de l'Anjouère ont montré une très bonne corrélation lors d'une étude sur 125 épis de cinq variétés entre les notations visuelles du taux d'épillets fusariés à 450°C jour après floraison et le taux de grains fusariés mesurés par le videometer, à la récolte ($R^2=0.91$) (Cadot et al., 2014). L'étude menée en utilisant un système à plus haut débit pour transporter les graines avec une bande transporteuse a également montré une bonne corrélation (Figure 7). Dans le cadre du programme Mycotek, l'objectif était de confirmer sur un plus grand nombre de variétés et de sites le classement de la résistance variétale par le Videometer comparativement aux notations visuelles et à la qPCR.



Figure 6 : Videometer avec sa bande transporteuse

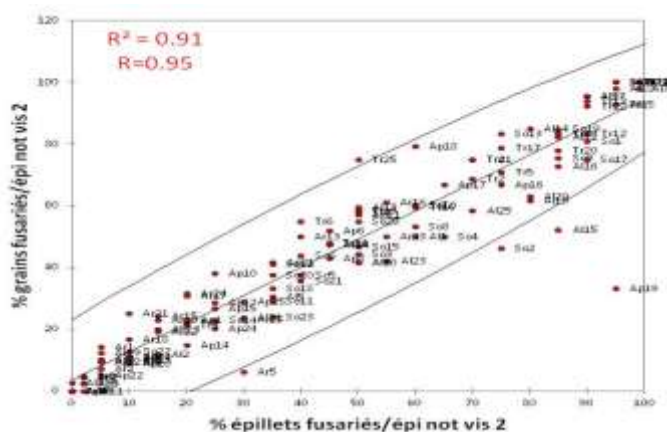


Figure 7 : Corrélation entre le taux de grains fusariés par le Videometer et les notations visuelles du taux d'épillets fusariés au GEVES de l'Anjouère

4.2.2 Matériel et méthodes

Deux essais inoculés en 2013 (cf. 4.3.1) ont été retenus pour les analyses Videometer, Maule (78) récolté à 450°C après floraison (lot étuvé), et Verneuil l'Étang (77) récolté à maturité. Un troisième lieu (hors projet) et récolté à maturité a été également analysé (5 variétés CTPS à l'Anjouère). Pour chaque essai, 30 épis par répétition et par variété ont été analysés. Les notations visuelles exprimées en pourcentage d'épillets fusariés ont été comparées aux analyses réalisées par le videometer exprimées en pourcentage de grains fusariés suivant l'algorithme mis au point par le GEVES (hors projet) et aux analyses qPCR réalisées par Arvalis (cf. 4.3.1).

Des analyses microbiologiques supplémentaires ont été menées par le GEVES-SNES sur 400 grains pour détecter *Fusarium Section discolor* (*F. graminearum* et *culmorum*) et *Microdochium* spp afin de définir la flore fongique présente sur les grains après récolte.

4.2.3 Résultats

➤ Analyses microbiologiques

Dans les essais inoculés à Maule et à Verneuil l'Étang, soit par du *Fusarium*, soit par du *Microdochium*, les analyses microbiologiques ont montré un mélange de *Microdochium* spp et de *Fusarium Section Discolor* (*F. graminearum* ou *culmorum*), indiquant une contamination naturelle par du *Microdochium* dans les essais inoculés par du *Fusarium*, et inversement ; confirmant les résultats obtenus par qPCR (4.3.1).

Sur le site de l'Anjouère inoculé par *Fusarium*, les analyses microbiologiques ont révélé uniquement du *Fusarium Section Discolor* (*F. graminearum* ou *culmorum*).

➤ Corrélation Videometer- notations visuelles :

De par la présence simultanée des deux agents fongiques sur les 2 sites inoculés de Verneuil l'Étang et de Maule, l'analyse des résistances variétales de chaque essai par notation visuelle s'est avérée délicate pour différencier visuellement *F. graminearum* de *Microdochium* spp. sur épis.

De ce fait, les corrélations entre les notations visuelles et le Videometer se sont révélées variables, selon le site et la souche de *Fusarium* (R^2 variant de 0.21 à 0.73, Figure 8).

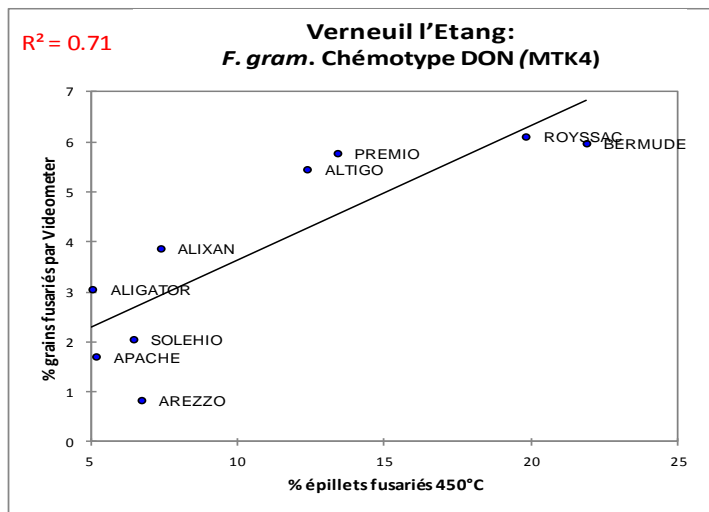


Figure 8 : Corrélation entre le taux de grains fusariés par le Videometer et les notations visuelles du taux d'épislets fusariés à Verneuil l'Étang

➤ **Corrélation Videometer-qPCR :**

Les corrélations entre les mesures du Videometer et la qPCR pour les deux souches de *Fusarium* et celle de *Microdochium* se sont révélées variables selon les souches et le site : faibles à Maule (R^2 variant de 0.1 à 0.2) et moyennes à Verneuil l'Étang (R^2 variant de 0.5 à 0.6, Figure 9).

Cette corrélation moyenne à Verneuil peut s'expliquer par le fait que le programme actuel du Videometer est destiné à reconnaître uniquement des grains fusariés par *Fusarium graminearum* ou *culmorum* et n'a pas encore été conçu pour différencier les symptômes attribuables à du *Microdochium* ou à du *Fusarium graminearum*, lorsque les deux sont en mélange. La faible corrélation à Maule peut en plus s'expliquer par le fait que le programme du Vidéomètre est à perfectionner pour les lots étuvés qui ne présentent pas la même signature spectrale.

Sur le site de l'Anjouère, les mesures du Videometer se sont montrées fortement corrélées avec les notations visuelles ($R^2=0.91$) (Figure 10) ainsi qu'avec les mesures de qPCR ($R^2=0.82$) (Figure 11).

Ces résultats indiqueraient que lorsque les notations visuelles de la fusariose ne sont pas perturbées par une contamination par du *Microdochium*, le Vidéomètre s'avère un bon prédicteur de la note de sensibilité variétale ; la qPCR ayant confirmé la bonne prédiction de l'imageur spectral. Ce constat nécessite néanmoins une confirmation sur un grand nombre de variétés.

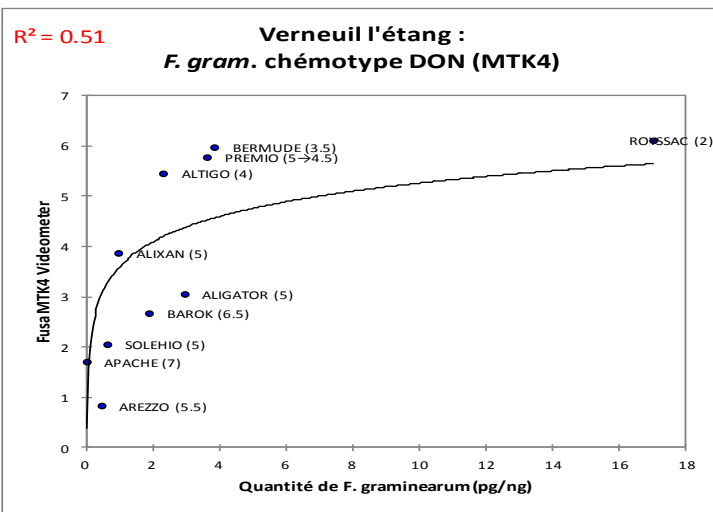


Figure 9 : Corrélation entre le taux de grains fusariés par le Vidéomètre et la qPCR de *F. graminearum* à Verneuil l'Étang

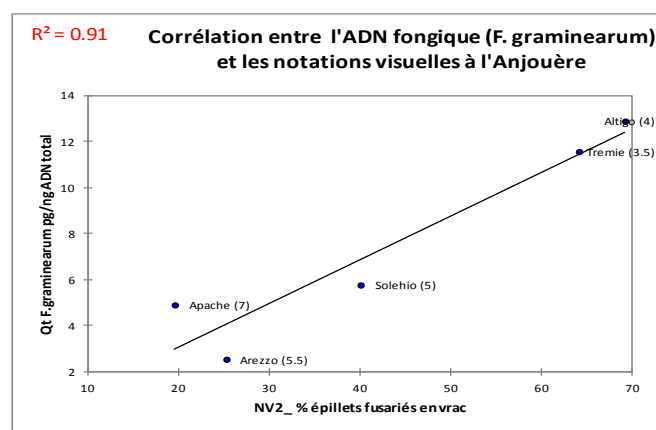


Figure 10 : Corrélation entre la notation visuelle du taux d'épislets fusariés et les mesures de qPCR de l'essai CTPS de l'Anjouère en 2013

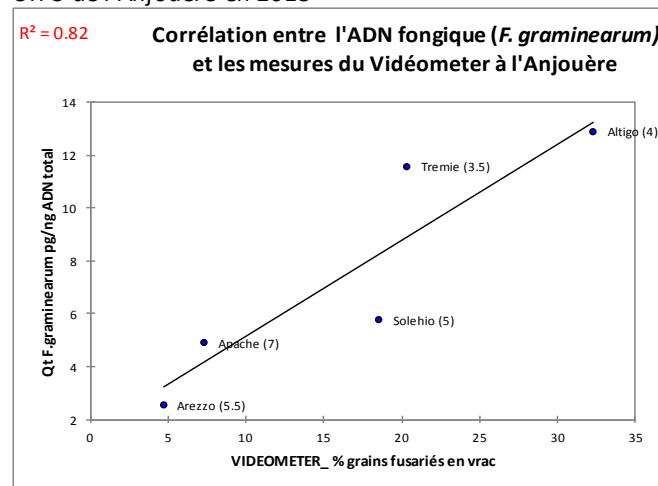


Figure 11 : Corrélation entre le % grains fusariés par le Vidéomètre avec la bande transportée et les mesures de qPCR de l'essai CTPS de l'Anjouère en 2013

4.2.4 Conclusion et perspectives :

Avec l'algorithme actuel, le phénotypage de la fusariose par le Videometer s'annonce prometteur lorsque la fusariose des épis n'est pas en mélange avec d'autres agents pathogènes et sur des grains non étuvés. En 2014, l'étude des corrélations entre Videometer et notations visuelles s'est poursuivie au GEVES de l'Anjouère avec succès sur un grand nombre de variétés de blé tendre inoculées par *Fusarium graminearum*, pour confirmer le classement variétal de la résistance. Des études ont également démarré sur d'autres espèces de céréales à paille.

Un programme de recherche a été initié pour définir de nouveaux algorithmes permettant au Videometer de reconnaître *Microdochium* spp et de le différencier de *Fusarium graminearum* afin de pouvoir disposer d'un outil fiable de quantification de la résistance variétale pour chacun des deux agents pathogènes (FSOV *Microdochium* 2014).

L'imagerie mutispectrale pourrait devenir prochainement un outil d'aide à la sélection et à l'inscription des variétés au Catalogue français pour évaluer la résistance variétale à la fusariose.

5. Conclusion générale

Ce projet financé par le FSOV et issu d'une collaboration entre différents partenaires (Arvalis – Institut du végétal, UFS, INRA UR Bioger-CPP, INRA UR MycSA, UMR GDEC, Biogemma et le GEVES) a permis des avancées significatives dans le développement d'outils utiles à la sélection variétale. La création d'une mycothèque pérenne, représentative des principaux agents pathogènes actuelles du blé tendre et accessible aux acteurs de la sélection génère à la fois une connaissance sur les souches de champignons pathogènes du blé tendre et une importante source

d'inoculi pouvant être employée de manière concrète pour phénotyper les essais de sélection variétale vis-à-vis des résistances aux maladies ciblées. De plus, la caractérisation taxonomique, génotypique et du potentiel toxigène de ces isolats, grâce notamment à des outils développés dans le projet, permet de caractériser finement des variétés pour un critère donné (accumulation mycotoxines, gènes de résistance...). Ensuite, l'intérêt de l'utilisation des méthodes de quantification moléculaire pour phénotyper les variétés au champ a été démontré. En effet, ces méthodes spécifiques permettent de s'affranchir des risques de confusion avec d'autres maladies afin d'obtenir une caractérisation fine pour une maladie donnée et donc participer à la recherche de variétés tolérantes. En complément des méthodes moléculaires, un autre outil de phénotypage a été évalué pour diagnostiquer la fusariose de l'épi. Avec l'algorithme actuel, le phénotypage de la fusariose par le Videometer s'annonce prometteur lorsque la fusariose des épis n'est pas en mélange avec d'autres agents.

Ainsi, ce projet renforce les moyens d'évaluation des variétés afin de permettre aux acteurs de la sélection de fournir des variétés de blé tendre de plus en plus tolérantes aux maladies.

Références bibliographiques

- ALEXANDER N. J., MC CORMICK S. P., HOHN T. M. 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics MGG*. August 1999, Volume 261, Issue 6, pp 977-984.
- BOUTIGNY A-L, WARD T J., BALLOIS N., IANCU G. IOOS R. 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur J Plant Pathol* 138: 133-148.
- CADOT V., VADAINÉ R., VALADE R., MAIGNIEL J-P. 2014. Multispectral camera and imaging for assessment of resistance to *Fusarium graminearum*. EUCARPIA Cereals Section, Wernigerode, Germany, June 29 – July 4, 2014. (Poster)

DUVERGER F., BAILLY, S., QUERIN A., PINSON-GADAIS L., GUERRE., P. BAILLY. 2011. Influence of culture medium and incubation time on the simultaneous synthesis of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum*. REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE Volume: 162, Issue: 2, Pages: 93-97.

ELBELT S., SIOU D., GELISSE S., LANNOU C., LEBRUN M-H., LAVAL. 2014. **Efficient tools for molecular diagnostic of *Fusarium* head blight: a complex story. Submitted AEM.**

GAUTIER A., MARCEL T.C., CONFAIS J., CRAN C., KEMA G., SUFFERT F., WALKER A-S. 2014, Development of a rapid multiplex SSR genotyping method to study populations of the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*.

GREENHALGH R., NEISH G. A., MILLER J. D. 1983. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. Appl. Environ. Microbiol. 46:625-629.

GOUACHE D., HOURCADE D., LEBRUN M-H., MARCEL T., GOUT L., DUCASSE A., DELLER S., AUDEON C., GOYEAU H., SUFFERT F., MICHELET C., ROBERT O., CADOT V., GHAFARY S.M.T., KEMA G.H.J. Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *Mycosphaerella graminicola*. FSOV 2008.

KIMURA M., TOKAI T., TAKAHASHI-ANDO N., OHSATO S., FUJIMUR M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: Pathways, genes, and evolution BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY Volume: 71 Issue:9 Pages: 2105-2123.

KULIK T., PSCZCOTKOWSKA A., FORDORISKI G., OLSZEWSKI J.. 2007. PCR approach based on the esyn1 gene for the detection of potential enniatin-producing *Fusarium* species. International Journal of Food Microbiology 116 319–324

KULIK T., JESTOI M., OKORSKI A. 2011. Development of TaqMan assays for the quantitative detection of *Fusarium avenaceum* / *Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae* esyn1 genotypes from cereal grain. FEMS Microbiol Lett 314 49–56

NICHOLSON P., SIMPSON D. R., WILSON A.H., CHANDLER E, THOMSETT M. Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. European Journal of Plant Pathology 110: 503–514, 2004.

PEPLOW A. W., MEEK, I. B., WILES M. C., PHILIPS T.D., BEREMAND M. N. 2003. Tri16 is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5935–5940.

SCHOCH C.L., SEIFERT K.A., SABINE HUHNDORF S., ROBERT V., SPOUGE J.L., LEVESQUES C.A., CHEN W., and Fungal Barcoding Consortium Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 2012 109 (16) 6241-6246

YLI-MATTILA. 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. Journal of Plant Pathology, 92 (1), 7-18

WANG J-H., LI H-P., QU B., ZHANG J-B., HUANG T., CHEN F-F., LIAO Y-C. 2008. Development of a Generic PCR Detection of 3-Acetyldeoxynivalenol-, 15-Acetyldeoxynivalenol- and Nivalenol-Chemotypes of *Fusarium graminearum* Clade. Int. J. Mol. Sci. 9, 2495-2504.

ZHANG J-B., WANG J-H., GONG A-D., CHEN F-F., SONG B., LI X., LI H-P., PENG C-H., LIAO Y-C. 2013. Natural occurrence of fusarium head blight, mycotoxins and mycotoxin-producing isolates of *Fusarium* in commercial fields of wheat in Hubei. Plant Pathology 62, 92–102.

Annexe 1

Fiche technique

Conservation des souches de *Fusarium spp.* dans du glycérol 20% à -80°C

Fusarium spp.

Matériel & milieu

- Boîte de pétri (diamètre 90mm)
- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Acumedia Neogen ®, USA)
- Microtubes de 1,5 ou 2 mL
- Eau glycérolée stérile à 20%
- Scalpel stérile



Conditions de culture

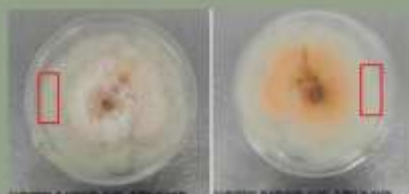
- **Température** : 19 – 20 °C
- **Hygrométrie** : 80%
- **Alternance Jour/Nuit** : 12 h



ETAPES

1 – Congélation du mycélium des souches de *Fusarium spp.*

- Faire pousser le mycélium sur le milieu PDA pendant 7 jours dans la chambre de culture.
- Après 7 jours, découper des petits carrés (environ 5mm/5mm) de mycélium avec un scalpel stérile, en évitant de prélever du mycélium trop vieux (centre de la boîte à proscrire, cf photos ci-dessous).



Culture de *F. graminearum* (Souche FU10008, Arvalis Institut du végétal) sur milieu PDA.

Le rectangle rouge indique la zone à prélever préférentiellement.

- Mettre les carrés de mycélium dans un microtube stérile contenant 1 mL d'eau glycérolée stérile à 20%.

Entre chaque souche, bien stériliser le scalpel à la flamme (ou utiliser un scalpel par souche) et attendre qu'il soit refroidi avant de découper de nouveaux carrés de mycélium.

La chaleur risque de tuer la souche (une vérification sur un coin de la boîte est préconisée).

- Placer les tubes directement à -80°C.

2 – Decongélation des souches de *Fusarium spp.*

- Décongeler les tubes contenant les carrés de mycélium à température ambiante.
- Placer un carré de mycélium sur une boîte de milieu PDA, le côté "mycélium" en contact avec le milieu PDA.
- Placer les boîtes dans une chambre de culture adaptée.



FSOV MYCOTEK



Annexe 2

Fiche technique

Septoria tritici

Conservation des souches de *Septoria tritici* (= *Zymoseptoria tritici*, forme sexuée : *Mycosphaerella graminicola*) à sec à -80°C

Matériel & milieu



- Boîte de pétri (diamètre 90mm)
- Oeses stériles
- Microtubes de 1,5 ou 2 mL
- Milieu Malt Levure Agar
(20g/L Malt, 5g/L Bacto yeast extract, 15g/L Agar)

Conditions de culture



- Température : 18°C
- Hygrométrie : 70%
- Luminosité : Obscurité totale



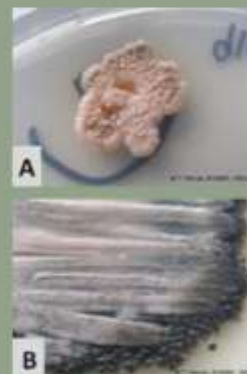
ETAPES

1 – Congélation des souches de *M. graminicola*

- Faire pousser la souche sur du milieu Malt Levure Agar pendant 3 à 4 jours dans une chambre de culture appropriée.
La forme levure se développe (Photo A).

Après 3 ou 4 jours, la forme levure ne doit pas avoir noirci (apparition des stroma = noircissement, Photo B).

- Racler la boîte avec une oese stérile (une par souche), on obtient une sorte de pâte au bout de l'oese.
- Mettre la "pâte" dans un microtube stérile.
- Placer les tubes directement à -80°C.



2 – Décongélation des souches de *M. graminicola*

- Décongeler les tubes dans la glace afin d'éviter un choc thermique.
- Prélever à l'aide d'une oese un peu de "pâte" levuriforme.
- ensemencer sur une boîte de milieu Malt Levure Agar.
- Placer les boîtes dans une chambre de culture adaptée.

FSOV MYCOTEK

