

# RESISTAMICRO : Comprendre et Maîtriser les infections de *Microdochium* pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochieuse ».

Romain VALADE<sup>1\*</sup>, Christophe GIGOT<sup>1</sup>, Cindy VITRY<sup>1</sup>, Stéphanie Le PRIEUR<sup>1</sup>, Marie-Anne GARCIA<sup>2</sup>, Philippe MOMONT<sup>3</sup>, Anne-Charlotte LOMBART<sup>3</sup>, Romain LAMERAND<sup>3</sup>, Edouard PENEZ<sup>3</sup>, Julien RATET<sup>3</sup>, Sylvie DUTRIEZ<sup>3</sup>, Sylvain CHOMBART<sup>4</sup>, Constance LAVERGNE<sup>5</sup>, Laure DUCHALAIS<sup>6</sup>, Auberi AVALLE<sup>7</sup>, Gabriel BEUDIN<sup>8</sup>, Hugo MUSSET<sup>9</sup>, Valérie CADOT<sup>10</sup>, Jean-Philippe MAIGNIEL<sup>10</sup>, Ludovic BONHOMME<sup>11</sup>, Cyrille SAINTENAC<sup>11</sup>, Marie FOULONGNE-ORIOU<sup>2</sup>

1 - ARVALIS - Station expérimentale, 91720 Boigneville

2 - INRAE - UR MYCSA, 33882 Villenave d'Ornon

3 - CETAC - 7, rue du Coq Heron, 75030 Paris

4 - FLORIMOND DESPREZ Veuve & Fils - 59242 Cappelle-en-pevele

5 - LIMAGRAIN Europe - 77390 Verneuil l'Étang

6 - AGRI-OBTENTIONS - 78660 Orsonville

7 - UNISIGMA - 60480 Froissy

8 - RAGT 2n - 28150 Louville-la-Chenard

9 - SYGENTA - 31790 Saint Sauveur

10 - GEVES - La Pouëze, 49370 Erdre-en-Anjou

11 - INRAE - UMR GDEC - Université Clermont Auvergne 63000 Clermont-Ferrand

\*Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@ARVALIS.fr

## 1 Introduction

La fusariose de l'épi est une maladie qui affecte de nombreuses céréales à paille dans le monde pouvant provoquer des pertes de rendements directes supérieures à 20 q/ha. Cette maladie est causée par un complexe d'espèces fongiques toxigène (*Fusarium spp.*) et non toxigène (*Microdochium spp.*). Ces 2 genres regroupent environ 19 espèces capables d'induire la fusariose de l'épi sur céréales. Les espèces les plus fréquentes en Europe sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *M. nivale* et *M. majus* (Xu *et al.*, 2005 ; Xu & Nicholson, 2009), avec une fréquence plus faible de *F. culmorum* et plus forte de *F. poae* depuis 2000 en France (Ioos *et al.*, 2004). Les champignons pathogènes du genre *Microdochium* sont capables d'attaquer tous les organes de la plante (des racines aux épis) et à différents stades de développement de la plante (du semis à la récolte). Les attaques précoces sur plantules, nommées « moisissure rose des neiges » sont majoritairement citées dans des régions où le couvert neigeux est persistant avec un printemps très froid, telles que l'Europe centrale, la Scandinavie, la Russie, mais également le Canada et certaines régions des États-Unis. Ce symptôme est rarement décrit en France où il ne survient que très ponctuellement, lors d'épisodes neigeux exceptionnels. Les symptômes sur feuilles sont fréquents en Europe de l'Ouest mais difficiles à identifier et souvent confondus avec la septoriose ou la rhynchosporiose. Peu décrits dans la littérature, ils sont observés assez couramment en Allemagne (Joshi & Miedaner, 2003) et en France (Toussaint-Ferreyrolle, 2012). Le projet « FSOV *Microdochium* 2014 » a permis de former tous les partenaires à la reconnaissance des symptômes foliaires. La tache apparaît tout d'abord vert-bouteille, d'aspect huileux, puis évolue en une nécrose présentant souvent un aspect concentrique. À la face supérieure de la feuille, on peut observer une abondante sporulation du champignon dans le cas d'une

nécrose avancée, ce qui laisse supposer que les attaques sur feuilles pourraient servir de relai à une infection ultérieure des épis. La présence de *Microdochium spp.* sur les épis est généralement décrite comme associée à des températures fraîches et à un climat humide à la floraison (Snider *et al.*, 2000 ; Rossi *et al.*, 2001 ; Nielsen *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2008). Ces agents pathogènes ont été identifiés sur les grains dans les pays du Nord-Ouest de l'Europe, comme le Danemark (Nielsen *et al.*, 2013), la Belgique (Isebaert *et al.*, 2004), l'Angleterre (Parry *et al.*, 2008) ou la France (Ioos *et al.*, 2004 ; Gourdain *et al.*, 2015). Néanmoins, le taxon est également présent dans des pays du bassin Méditerranéen, tels que l'Italie (Shah *et al.*, 2005 ; Pancaldi *et al.*, 2010) ou la Tunisie (Kammoun *et al.*, 2009). Dans ces études, *Microdochium* est systématiquement présenté comme participant au complexe fusarien de l'épi, en association avec des espèces du genre *Fusarium*.

Depuis 1997, Bayer Crop Science par l'intermédiaire du dispositif « CARTOFUSA », mène une enquête à l'échelle nationale portant sur l'identification des populations fongiques sur les grains de blé. Cette étude montre une augmentation de l'occurrence des *Microdochium spp.* en France. Lors d'années à risque élevé, comme en 2007, 2012 et 2016, la proportion de *Microdochium* dans la population fongique des grains à la récolte peut atteindre 50%. Néanmoins, ces études microbiologiques ne permettent pas de différencier les espèces de *Microdochium*. Les études menées notamment par ARVALIS et INRAE Mycsa dans le cadre des projets « Casdar Ecofusa », « ANR Don&Co » et « FSOV *Microdochium* 2014 » ont également permis de mettre en évidence que les espèces de *Microdochium* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées après *F. graminearum* (Taillieu *et al.*, 2019 ; Valade *et al.*, 2020). Plusieurs études reportent une prédominance de *M. majus* lors d'infection par *Microdochium spp.* en Europe (Parry *et al.*, 1995 ; Lees *et al.*, 1995, Nirenberg *et al.*, 1994 ; Nielsen *et al.*, 2013), ou au Japon (Hayashi *et al.*, 2014). En France, il semblerait



que cette prédominance soit moins marquée. En effet, dans les enquêtes réalisées par PCR quantitative (qPCR), *M. majus* n'est pas forcément l'espèce prédominante de *Microdochium* et la proportion entre les deux espèces semble être dépendante de l'année (« FSOV *Microdochium* 2014 »). Aucun modèle de prédiction du risque *Microdochium* n'est actuellement disponible. Les analyses des projets précédents ont permis de mettre en évidence que les variables climatiques seraient plus explicatives que les variables agronomiques dans la présence de *Microdochium* (Valade *et al.*, 2018). Néanmoins, le jeu de données n'est pas assez complet pour permettre de proposer une grille de risque comme pour *F. graminearum* ou un modèle de gestion du risque (Gourdain *et al.*, 2009).

Très peu de données sont également disponibles sur la diversité intraspécifique de chaque espèce de *Microdochium* ou sur la structuration génétique des populations selon l'hôte. Une plus grande variabilité génétique a été décrite au sein de l'espèce *M. nivale* par rapport à l'espèce *M. majus* (Lees *et al.*, 1995). Une diversité plus importante à l'intérieur de populations qu'entre populations de *M. majus* semble également indiquer une faible différenciation génétique (Hayashi *et al.*, 2014). Une analyse spatio-temporelle de populations de *M. nivale* montre une grande diversité inter-parcelles et inter-années (Jewell, 2013), issue potentiellement de la reproduction sexuée ou de flux de gènes extérieurs. Alors que *Microdochium spp.* est capable d'infecter toutes les espèces de céréales en France et même des gazons (pour *M. nivale*), aucune donnée n'est disponible sur les populations issues de ces différents hôtes. Est-ce que ce sont les mêmes populations sur toutes les céréales ? Existe-t-il des souches spécialisées ? Ren *et al.* (2015) ont montré des interactions significatives entre génotypes hôtes et espèces de *Microdochium* pour des données de phénotypage en conditions contrôlées suggérant que les mécanismes de tolérance dans la plante et les gènes de pathogénicité pourraient être différents selon l'espèce de *Microdochium*. Enfin, aucune étude ne s'est intéressée à la variabilité potentiellement existante au sein d'une même plante entre les isolats présents sur les inflorescences ou ceux présents sur les feuilles.

La connaissance de la structuration génétique des populations de *Microdochium* est capitale pour orienter les stratégies de sélection. Dans ce projet, nous avons donc étudié ces différents aspects liés à la diversité génétique, ainsi qu'à la spécialisation à l'hôte et l'organe.

Peu d'études se sont intéressées à la résistance des céréales à paille face à *Microdochium spp.* Plusieurs travaux publiés se rapportent aux symptômes sur plantules de « moisissure rose des neiges » au cours de la période hivernale. La résistance du blé tendre face aux attaques précoces de *Microdochium spp.* augmente suite à l'acclimatation au froid (Nakajima & Abe 1996). Des protéines, liées aux mécanismes de défense de la plante, sont connues pour s'accumuler pendant l'acclimatation au froid des céréales, telles que les protéines PR (protéines impliquées dans les réactions de défense des plantes) reliées à la pathogénèse (Christova *et al.*, 2006). Quelques études ont tenté d'appréhender la résistance du blé aux attaques de *Microdochium spp.* à travers la mise au point de tests d'inoculation sur feuilles détachées (à partir de feuilles issues de plantules) et sur épis (Brennan *et al.*,

2005 ; Maurin *et al.*, 1995 ; Ren *et al.*, 2016). Si les tests sur feuilles détachées semblent être pertinents pour évaluer le comportement des variétés face à la « moisissure rose des neiges » et la fonte des semis, ce protocole n'a cependant pas permis d'établir une corrélation avec les symptômes sur épis en conditions contrôlées pour les mêmes variétés (Brennan *et al.*, 2005 ; Browne *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que la réaction de la plante face à une attaque de *Microdochium spp.*, sur feuilles détachées et épis, met probablement en jeu des mécanismes de résistance différents. A l'heure actuelle, aucune connaissance sur le déterminisme moléculaire de ces mécanismes n'est disponible. Une seule étude s'est intéressée au déterminisme génétique de la résistance du blé à la fonte des semis et au FHB (Fusarium Head Blight) causés par *Microdochium spp.* (Ren *et al.*, 2016), à partir de l'analyse d'une population d'haploïdes doublés issus du croisement entre Rialto et LSP2. Les auteurs ont mis en évidence trois QTL de résistance à *M. majus* (4A, 5B et 7D) et un QTL de résistance à *M. nivale* (différent de *M. majus*) à partir des tests sur feuilles détachées et trois QTL de résistance sur épis à *M. majus* (1D, 4B et 5A) et un QTL majeur de résistance sur épis à *M. nivale* qui explique 20.7% de la variabilité phénotypique. Cette étude montre qu'il existe une spécificité des résistances vis-à-vis des espèces *M. nivale* et *M. majus* mais également vis-à-vis des organes (feuilles et épis). Les résultats issus d'une seule population ne peuvent cependant pas être généralisés et d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les résistances à *Microdochium*. De plus, suite à une analyse de co-localisation, Ren *et al.* (2016) suggèrent que les QTLs identifiés avec *Microdochium spp.* seraient différents de ceux identifiés avec *F. graminearum* et donc que les mécanismes moléculaires expliquant les maladies pourraient être spécifiques de l'espèce fongique.

Aucune étude du comportement des variétés de blé tendre face à des attaques de *Microdochium* sur feuilles (au stade adulte) et épis n'a été publiée. Le projet « FSOV *Microdochium* 2014 » a permis de mettre en évidence de probables sensibilités différentes au sein des variétés françaises suggérant que du progrès génétique est possible. Toutefois, les protocoles et connaissances actuelles ne permettent pas de réaliser des essais au champ qui soient suffisamment robustes, répétables et facilement interprétables à cause d'une pression trop dépendante de l'année ou de la présence d'autres espèces comme *F. graminearum* complexifiant les notations et leurs interprétations.

Au regard de l'agent pathogène, il existe très peu de données dans la littérature décrivant les mécanismes d'infection. Kang *et al.* (2004) ont étudié la progression de *M. nivale* dans l'épi suite à une infection artificielle. Ils ont observé une altération des cellules de la plante lors de la colonisation du champignon qui démontre indirectement que, à l'instar des espèces fusariennes, *M. nivale* dispose de tout l'arsenal enzymatique indispensable à la pénétration et à la progression du champignon dans les tissus hôtes. Mais alors que les mycotoxines ont été démontrées comme étant des facteurs d'agressivité lors de l'interaction *F. graminearum*/blé (Bai *et al.*, 2002), qu'en est-il pour les espèces de *Microdochium* non toxigène ? Rien n'est aujourd'hui connu sur les mécanismes moléculaires et biochimiques potentiellement mis en œuvre par ces espèces lors de l'interaction plante/pathogène.



Ainsi, Le projet « RESISTAMICRO » a été structuré en 3 axes. Le premier, centré sur la biologie et l'épidémiologie du champignon a consisté à caractériser génétiquement les populations de *Microdochium spp.*, isolées principalement sur blé tendre mais également sur blé dur et gazon, afin de regarder s'il existe une structuration des populations selon l'hôte, les organes ou les régions. Parallèlement, un travail a été mené sur les facteurs agro-climatiques à risque dans le développement de la maladie. Le second volet avait pour objectif de mettre au point des protocoles d'évaluation de la sensibilité variétale (blé tendre) à *Microdochium spp.* robustes, reproductibles et transférables à tous les acteurs de la sélection française, aux champs et en conditions contrôlées. Le troisième volet était axé sur l'étude, en conditions contrôlées, de la variabilité du pouvoir pathogène des deux espèces de *Microdochium* par la caractérisation du mode d'infection sur blé tendre, des mesures d'agressivité selon les organes de la plante (feuilles, épis) ou encore la recherche de gènes impliqués dans l'interaction blé/*Microdochium spp.*

## 2 Matériel et méthode

### ► 2.1. Caractérisation génétique

L'objectif de cette étude est de caractériser la diversité génétique des populations de *Microdochium spp.* à l'échelle du paysage français, de la plante hôte et de l'organe de la plante infectée.

#### Échantillonnage des populations de *Microdochium spp.*

Afin de répondre à cet objectif, un échantillonnage conséquent a été réalisé. Dès la campagne 2018, des prélèvements ont été effectués dans le réseau d'essais d'ARVALIS puis poursuivis en 2019 et 2020. Ces prélèvements ont permis d'isoler 550 isolats selon la méthode d'ARVALIS décrite dans Garcia (2021) à partir de feuilles de blé tendre, de grains de blé tendre et de grains de blé dur (Tableau 1, Figure 1). En complément,

	M. majus	M. nivale	Total
Blé dur - grain	59	7	66
Blé tendre - grain	116	120	236
Blé tendre - feuille	205	43	248
Gazon	0	20	20
<b>Total</b>	<b>380</b>	<b>190</b>	<b>570</b>

Tableau 1 : Populations de *Microdochium spp.* échantillonnées selon plante et organe hôte.

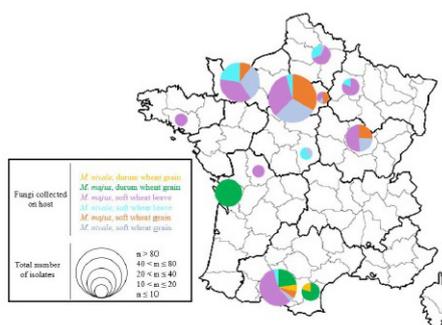


Figure 1 : Répartition spatiale selon l'espèce et l'organe des isolats de *M. majus* et *M. nivale* collectés dans le projet.

20 isolats de *M. nivale* issus de prélèvements sur gazon ont pu être récupérés grâce à une collaboration avec l'ANSES (Unité CASPER, F. Remuson).

#### Obtention d'un génome de référence pour *M. nivale* et *M. majus*

Les souches MI18055 et MI18056 ont été choisies comme représentantes des espèces *M. nivale* et *M. majus* respectivement. Ces souches ont été isolées de la variété Bermude en 2017 dans un essai d'ARVALIS à Boigneville (91).

De l'ADN de haut poids moléculaire a été extrait pour chacune des souches. Une approche combinant du séquençage en longues lectures (plateforme Gentyane de Clermont-Ferrand, technologie SMRT -single molecule real time technology, Sequel I, Pac. Bio.) et du séquençage Illumina (2x100 pb, HiSeq 4000, plateforme GenomEast, Strasbourg) a été utilisée pour générer les données de génomes. Afin de consolider l'annotation automatique, un séquençage RNAseq a également été réalisé pour les deux souches de référence (plateforme PGTB INRAE Cestas Pierroton). L'assemblage et les analyses des séquences ont été réalisées en collaboration avec Jérôme Guzy et Sébastien Carrère (LIPME, INRAE Toulouse). Sept autres souches de *M. majus* et 5 de *M. nivale* ont été séquencées en Illumina.

#### Développement d'un outil de génotypage haut-débit

Une approche SSRseq a été développée, en collaboration avec Olivier Lepais (plateforme PGTB INRAE Cestas Pierroton). Il s'agit d'une méthode de génotypage de marqueurs microsatellites par séquençage haut débit (Lepais *et al.* 2020). A partir des données de génomes obtenues, les motifs microsatellites (SSR) ont été recherchés et des amorces ont été définies pour 48 locus, pour chacune des deux espèces, selon la procédure décrite dans Megléc *et al.* (2014). La mise au point des marqueurs a été réalisée sur un sous échantillon de 94 souches par espèce. Le séquençage a été réalisé par la plateforme PGTB.

#### Analyse génétique des populations de *Microdochium spp.*

Les marqueurs microsatellites opérationnels ont été génotypés par séquençage sur l'ensemble des populations de *M. majus* et *M. nivale* (Tableau 1). A partir des séquences obtenues, une matrice de génotype a été générée et utilisée pour les analyses de génétique des populations.

### ► 2.2. Épidémiologie et prédiction du risque

#### Jeu de données

Les données utilisées ont été collectées par ARVALIS dans le cadre d'un réseau d'enquêtes pluriannuelles (ARVALIS/FAM). Chaque année, il est demandé à des agriculteurs partenaires répartis sur l'ensemble du territoire français et producteur de blé (tendre et dur) de prélever, lors de la récolte, un échantillon de grains par parcelle retenue pour l'enquête. Chaque échantillon est accompagné d'un questionnaire complété par l'agriculteur afin de préciser le contexte (localisation de la parcelle, précédent cultural, travail du sol, variété cultivée, autres aspects de l'itinéraire technique, etc.).

Les échantillons de grains ont été envoyés au laboratoire de pathologie végétale d'ARVALIS afin de réaliser (i) des analyses génétiques pour la recherche d'agents pathogènes par qPCR (*F. graminearum*, *M. majus* et *M. nivale*) selon la méthode de Elbelt *et al.* (2018), et (ii) des analyses toxicologiques pour quantifier des mycotoxines d'intérêt (notamment la déoxynivalénol produite par *F. graminearum*).

Ces enquêtes étant menées depuis de nombreuses années, une riche base de données a pu être constituée et sa mise à jour a pu être poursuivie dans le cadre du projet FSOV « RESISTAMICRO ». Les données à notre disposition s'étalaient de 2007 à 2021 pour un total de 1 640 échantillons de grains de blé (tendre et dur) analysés. En moyenne, ces dernières années, cela correspondait à 100 échantillons de blé tendre et 50 échantillons de blé dur par an.

### Variables agro-météorologiques

Les données météo du réseau de stations d'ARVALIS et de Météo France ont été mobilisées (relevés journaliers de températures, pluviométrie, rayonnement, etc. sur l'ensemble du territoire). Des outils internes d'ARVALIS, valorisant l'expertise de l'Institut, ont également été utilisés pour calculer les dates de réalisation de différents stades phénologiques, comme les stades épiaison et floraison qui sont particulièrement intéressants vis-à-vis des champignons phytopathogènes étudiés. En ayant recours aux données et outils précédemment mentionnés, il nous fut possible d'estimer en tout point de l'espace (via de l'interpolation spatiale) de nombreuses variables agro-climatiques, comme la pluviométrie cumulée durant la période à plus ou moins 7 jours autour de la floraison ou le rayonnement global moyen durant cette même période. Plus de 100 variables agro-climatiques ont été définies collégialement en amont, à dire d'expert.

### Variables à expliquer ou prédire

Parmi les variables à expliquer, nous avons retenu les quantités d'ADN à la récolte de *Microdochium spp.* et *F. graminearum* afin d'identifier et comparer les variables agro-climatiques explicatives ou prédictives identifiées pour ces deux groupes de champignons. Nous avons aussi testé le ratio entre la quantité d'ADN de *F. graminearum* sur la somme des quantités d'ADN de *Microdochium spp.* et *F. graminearum*, afin d'explorer la dominance de l'un ou l'autre des groupes de champignons en fonction de variables agro-climatiques.

### Approches statistiques

L'apprentissage automatique via des forêts aléatoires (Breiman, 2001) a été privilégié pour identifier les variables agro-climatiques les plus explicatives ou prédictives des quantités à expliquer. D'autres approches — e.g., boosting regression trees (Friedman, 2001) — ont également été mobilisées afin de confirmer les résultats obtenus avec les forêts aléatoires (non présentées).

Les analyses ont été menées avec le logiciel R (version 3.6.3, R Core Team, 2022) en mobilisant en particulier les paquets randomForest (version 4.6-14, Liaw et Wiener, 2002) et plotmo (version 3.5.7) et gbm (version 2.1.8).

## ► 2.3. Mise au point de méthodes de phénotypage

### Conditions contrôlées sur feuilles

L'objectif de cette tâche était de mettre au point un test de phénotypage sur feuilles au stade plantule pour évaluer rapidement la résistance des variétés de blé aux champignons du genre *Microdochium*. Nous avons réalisé sept essais de phénotypage en chambre de culture au stade plantule. Au cours de ces essais, nous avons testé quatre variétés de blé tendre identifiées dans le précédent projet FSOV comme étant sensibles à *Microdochium spp.* sur feuilles : Oregrain, Apache, Prémio et Caméléon. Ces variétés ont été inoculées suivant différentes méthodes : (i) la méthode classique en appliquant les spores du champignon à l'aide d'un pinceau à la surface de la feuille n°2 ou en appliquant des hyphes, (ii) en appliquant les spores à l'aide d'un pinceau sur une feuille où une piqure avait été réalisée (pour mimer l'entrée du champignon par les piqures d'insectes et les blessures), (iii) en coupant l'extrémité de la feuille et en la trempant dans la solution de spores (couper/tremper), et (iv) en infiltrant les spores à la seringue dans la feuille. Nous avons également fait varier les conditions climatiques des chambres : (i) la température avec une condition 21/18°C (jour nuit) et une autre à 15/10°C, (ii) l'hygrométrie relative avec différents moyens (soit en maintenant une bache pendant trois ou sept jours sur les plantes et ensuite une hygrométrie à 80% en utilisant soit un fog fin soit un fog avec de grosses gouttelettes). Pour ces expérimentations, nous avons utilisé deux souches de *M. majus* et deux souches de *M. nivale* avec deux concentrations différentes de spores. Les inoculations ont été réalisées soit avec un système dit « de feuille attachée » où la feuille inoculée est attachée sur une plaque de polycarbonate à l'horizontale pour avoir une exposition homogène à la lumière soit sur des feuilles libres.

### Conditions contrôlées sur épis

Un premier essai a été réalisé sur la variété de blé tendre Récital, génotype de référence du GDEC pour l'analyse de la fusariose de l'épi. Dans ce premier test, les inocula de deux souches de *M. nivale* (12085 et 18055) et deux autres de *M. majus* (18056 et 18041) ont été préparés pour atteindre 10<sup>5</sup> spores/ml. L'inoculation a été réalisée sur la base du protocole développé pour le phénotypage de *F. graminearum*. Les plantes de blé ont été cultivées en chambre de culture en condition de photopériode de 16h à 21°C avant un taux d'hygrométrie de l'air ambiant d'environ 80%. Au stade mi-anthèse (environ 45 jours après la mise en chambre de culture), deux à trois épis par plante ont été sélectionnés et inoculés par le dépôt de 1 000 spores (10µL) directement dans la cavité florale d'épillet médians d'ontogénie synchrone. Une lecture de symptômes a ensuite été réalisée chaque jour, selon la grille de notation établie pour le développement de *F. graminearum* (Fabre *et al.*, 2019).

### Méthode de phénotypage aux champs

Dans le cas des fusarioses des épis, la présence d'un complexe d'espèces (*Fusarium* et *Microdochium spp.*) rend très difficile l'évaluation de la sensibilité variétale pour un seul agent pathogène par des méthodes simples et rapides aux champs. Des verrous



méthodologiques ne permettent pas, à ce jour, de caractériser efficacement la résistance variétale vis-à-vis des *Microdochium*. En effet, les différents protocoles testés ne permettent pas d'obtenir une pression de maladie homogène, garantie et sans interaction avec d'autres espèces. Dans ce projet « FSOV RESISTAMICRO », un important réseau d'expérimentations a été mis en place afin d'essayer de mettre au point un protocole de phénotypage robuste et utilisable facilement afin de pouvoir évaluer à terme la résistance variétale aux *Microdochium spp.* Ainsi, en 2018 et 2019, 13 essais ont été réalisés chaque année. Pour chaque essai, 4 variétés avec des niveaux supposés de résistance différents (résultats du projet « FSOV Microdochium 2014 ») ont été implantées (Caméléon, Sothys CS, Premio, Apache). Ces variétés ont été semées en deux répétitions de trois lignes. Dans chaque site, 8 modalités ont été testées dont 1 modalité non inoculée afin de tester l'efficacité de l'inoculation. Les modalités comprenaient une, deux ou trois applications, des cocktails de souches, des concentrations d'inoculum différentes, du bâchage après la dernière inoculation, l'ajout d'un fongicide spécifique à *F. graminearum*.

Au total, sur les deux années, une trentaine de modalités différentes ont été testées. Pour chaque site, des notations sur feuilles et épis ont été réalisées. Des analyses qPCR ont été menées pour les essais et les modalités les plus intéressantes selon les notations et l'avis des expérimentateurs.

En année 3 du projet (semis 2020), 42 variétés réparties en deux panels (6 sites pour le panel n°1, 7 sites pour le panel n°2) avec 4 témoins identiques dans chaque site soit 25 variétés par site ont été phénotypées vis-à-vis de leur sensibilité à *Microdochium spp.* selon le protocole le plus prometteur avec les résultats obtenus en 2018 et 2019. Dans chaque site, il y avait une modalité inoculée et une modalité non inoculée avec deux répétitions par modalité. Pour chaque site, des notations sur feuilles et sur épis ont été réalisées ; des analyses qPCR ont été menées pour les 4 variétés témoins de tous les essais. Les sites les plus intéressants ont été analysés entièrement.



Photo 1 : Exemple de dispositif de brumisation et d'inoculation.

## ► 2.4. Interactions plante-pathogène

### Variabilité du pouvoir pathogène

L'absence de mise au point d'un test robuste en conditions contrôlées sur feuilles et sur épis n'a pas permis d'étudier cette variabilité entre les espèces et les souches.

## Déterminisme de l'interaction *Microdochium spp.* /blé

Une expérimentation a été mise en œuvre pour l'exploration des ajustements moléculaires au cours de l'interaction. Cet essai a été réalisé sur le génotype de blé Récital en utilisant des spores récentes préparées à partir des souches *M. nivale* 12085 et *M. Majus* 18056. Compte tenu des dynamiques de développement des symptômes très proches de celles observées chez *F. graminearum*, nous avons procédé aux prélèvements des épis spécifiquement inoculés 48h et 72h après inoculation des spores dans la cavité florale. Au total, trois modalités (*M. nivale*, *M. majus* et mock), deux points de cinétique (48hpi et 72hpi) et trois réplicas biologiques ont été expérimentés. Chaque réplica biologique correspondait à l'inoculation de six épis de trois épis par plante soit 54 épis par plante. Ces échantillons ont ensuite été soumis à une analyse dual-protéomique comparable à la procédure développée pour *F. graminearum* (Fabre *et al.*, 2019).

## 3 Résultats

### ► 3.1. Caractérisation génétique

#### Obtention d'un génome de référence pour *M. nivale* et *M. majus*

Pour chacune des deux espèces, nous avons obtenu une séquence génomique de référence (Tableau 2). La complétion du génome est meilleure pour *M. majus* avec une séquence de 36.2 Mb répartie sur 13 scaffolds représentant vraisemblablement les chromosomes (séquences télomériques identifiées aux extrémités). Pour *M. nivale*, 36 scaffolds ont pu être assemblés. Un autre génome de *M. nivale* récemment publié (Tsers *et al.* 2023) présente une taille similaire (37 Mb) pour 16 scaffolds. Le nombre de modèles de gènes est par contre différent avec 11 973 gènes contre 15 012 dans notre étude.

	<b>M. nivale [MI18055]</b>	<b>M. majus [MI18056]</b>
Taille génome (bp)	36 675 401	36 252 715
GC (%)	55	56
Nb scaffolds	36	13
Nb grands scaffolds (>1Mb)	10	13
Nb modèle de gènes avec séquences codantes	15 012	13 285
Nb SSR identifiés	5685	5877
Nb SSR/Mb	154.9	162.3

Tableau 2 : Caractéristiques des deux génomes de référence.

Cette ressource génomique sera rendue disponible prochainement à la communauté scientifique (Foulongne-Oriol *et al.*, in prep). Une analyse plus approfondie exploitant les autres génomes séquencés, (analyses des polymorphismes, analyses approfondies des répertoires de gènes, identification d'effecteurs, clusters de métabolites secondaires, synténie, pan/core genome ...) est également en cours.

#### Développement d'un outil de génotypage haut-débit

L'analyse des éléments répétés de type microsatellites (SSR) a permis de mettre en évidence une densité suffisante en microsatellites chez les deux espèces avec

155 et 162 motifs SSR par Mb identifiés chez *M. nivale* et *M. majus* respectivement. La distribution de ces motifs semble aléatoire sur les génomes (Figure 2).

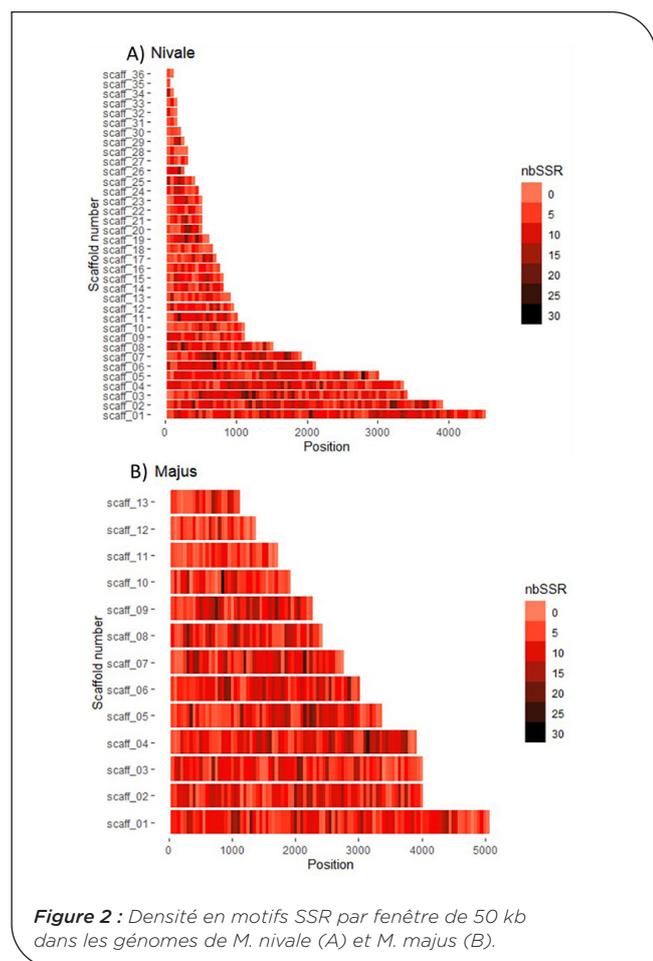


Figure 2 : Densité en motifs SSR par fenêtre de 50 kb dans les génomes de *M. nivale* (A) et *M. majus* (B).

Sur les 48 couples d'amorces définis pour les mises au point, 19 et 22 ont été sélectionnés (fiabilité, reproductibilité, polymorphisme) pour les analyses de population de *M. nivale* et *M. majus* respectivement.

### Analyse génétique des populations de *Microdochium spp.*

L'analyse de clonalité a permis de mettre en évidence que la population de *M. nivale* prélevée sur gazon était entièrement clonale. Ce résultat s'explique notamment par la méthode d'échantillonnage utilisée puisque les souches ont été isolées à partir d'un seul prélèvement sur le site infecté. Pour les souches isolées sur blés, le taux de clonalité est de 24% et 12,8% chez les populations de *M. majus* et *M. nivale* respectivement. Le calcul des indices de diversité montre que la diversité génétique est plus importante chez *M. nivale* ( $h=0.442$ ) que chez *M. majus* ( $h=0.378$ ). Ces résultats sont concordants avec les précédentes études de génétique des populations réalisées sur ces deux espèces (Abdelhalim *et al.*, 2020 ; Matušinsky *et al.*, 2019). Quelle que soit l'espèce, aucune structuration des populations n'a pu être mise en évidence. Ni l'origine géographique, ni l'année, ni l'hôte (blé tendre/blé dur), ni l'organe (grains/feuilles) sur lequel les souches ont été isolées ne semblent structurer les populations de *Microdochium spp.* (Garcia, 2021). Ces résultats suggèrent l'existence d'une métapopulation à l'échelle du territoire français.

## ► 3.2. Épidémiologie et prédiction du risque

### Pression en maladies des épis

Les quantités de *Microdochium spp.* et *F. graminearum* présentes dans les échantillons de grains à la récolte sont marquées par de fortes variabilités intra- et inter-annuelles (Figure 3). Cela est cohérent avec les observations réalisées par Bayer Crop Science dans le cadre du dispositif « CARTOFUSA ». 2007, 2008, 2012, 2013, 2016 et 2021 ressortent comme des années à fortes occurrences en pathogènes des épis (par rapport à la moyenne des années analysées). 2011, 2015, 2019 et 2020, quant à elles, sont des années à faibles pressions en *F. graminearum* et *Microdochium spp.*

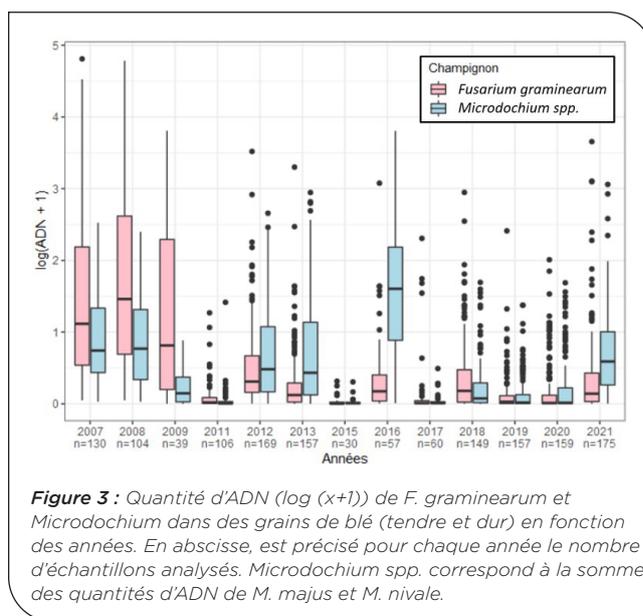


Figure 3 : Quantité d'ADN ( $\log(x+1)$ ) de *F. graminearum* et *Microdochium* dans des grains de blé (tendre et dur) en fonction des années. En abscisse, est précisé pour chaque année le nombre d'échantillons analysés. *Microdochium spp.* correspond à la somme des quantités d'ADN de *M. majus* et *M. nivale*.

### Facteurs agro-climatiques à risque pour *F. graminearum*

Parmi toutes les variables agro-climatiques testées, les deux qui ressortent en tête dans les graphiques d'importance des variables, issus des analyses par forêts aléatoires, sont : la note de la grille d'évaluation du risque d'accumulation de déoxynivalénole (DON) dans le grain de blé (ARVALIS - Institut du végétal, 2011) et le rayonnement global moyen à plus ou moins 7 jours autour de la floraison. La pluviométrie totale à plus ou moins 7 jours autour de la floraison apparaît également comme une variable explicative importante, mais légèrement moins importante que les deux précédentes. Nous retrouvons donc bien, avec cette analyse reposant sur des forêts aléatoires, les facteurs à risque connus vis-à-vis de *F. graminearum* en fin de cycle sur blé ce qui conforte l'intérêt de ce type d'analyses et la base de données utilisée pour étudier ces mêmes facteurs pour *Microdochium spp.*

### Facteurs agro-climatiques à risque pour *Microdochium spp.*

Concernant *M. majus* et *M. nivale*, aucune des variables agronomiques testées (précédent cultural, travail du sol et note du risque d'accumulation de DON) ne ressort. Cependant, plusieurs variables climatiques peuvent être en partie liées à la quantité mesurée d'ADN de *Microdochium spp.*, notamment des sommes de pluies (entre 2 nœuds et épiaison par exemple). L'une d'entre elles en particulier, le rayonnement global moyen à plus ou moins 7 jours autour de la floraison, apparaît

quasiment toujours dans les toutes premières variables des graphiques d'importance (plus le rayonnement global est faible durant cette période, et plus la quantité d'ADN de *Microdochium spp.* a tendance à être élevée).

### Facteurs agro-climatiques à risque pour le ratio entre *F. graminearum* et *Microdochium spp.*

Les variables agro-climatiques identifiées comme les plus importantes par les forêts aléatoires pour expliquer le ratio sont des variables intégrant en général de la température. Nous pouvons notamment citer la somme des températures moyennes à plus ou moins 7 jours autour de la floraison et le nombre de jours avec une température moyenne inférieure à 16 °C et des occurrences de pluie.

### ► 3.3 Mise au point de méthodes de phénotypage

#### Conditions contrôlées sur feuilles

Le système ayant donné le plus de symptômes est le suivant : feuilles attachées, grosses gouttelettes, méthode couper/tremper, bâches pendant sept jours, avec la variété Apache et la souche de *M. majus* 18041. La présence de bâches pendant une longue durée pourrait limiter la présence de rayonnement sur les feuilles, un facteur qui semble être important pour le développement de la maladie au champ. Finalement, dix accessions de blé ont été inoculées selon la méthode couper/tremper avec *M. majus* avec seulement trois jours de bâches. Nous avons observé des longueurs de feuilles nécrosées variables allant de 0,4 à 5 cm suggérant un contrôle génétique de la résistance à ce champignon dans ces conditions.

Pour finaliser ces expérimentations d'optimisation et valider son potentiel intérêt, il serait nécessaire de répéter le protocole avec des variétés dont le niveau de résistance au stade adulte est connu pour déterminer si ce système met en évidence des résistances pertinentes pour le contrôle de cette maladie au champ.

#### Conditions contrôlées sur épis

Les premiers résultats ont montré un développement de symptômes pour toutes les souches évaluées avec des symptômes légèrement plus fort pour *M. nivale* 12085 et *M. majus* 18056 en comparaison avec les souches 18055 et 18041. La dynamique de développement de ces symptômes demeurait comparable à celle observée chez *F. graminearum*, avec toutefois un décalage de 24h dans l'apparition des premiers jaunissements des épillets inoculés. Sur le reste de la dynamique, la typologie de l'évolution symptomatologique demeurait très proche de celle observée avec *F. graminearum* (léger jaunissement localisé sur la glume puis brunissement des glumes et glumelles et nécroses marquées de l'épillet dès le 7<sup>e</sup> jour après infection). Sur la base de ces résultats, nous avons sélectionnés les souches *M. nivale* 12085 et *M. majus* 18056 pour évaluer plus finement leur impact sur des épis de blés contrastés pour leur résistance. Les deux expérimentations initiées au cours de l'année 2 du projet n'ont malheureusement pas permis d'acquies de nouvelles données. La première utilisant les cultivars Récital (très sensible au FHB) et Renan (peu sensible) n'a pas permis d'observer de symptôme alors que la procédure était identique aux mises au point, suggérant une baisse d'agressivité/fitness des spores inoculées ou une mauvaise reproductibilité de la méthode.

### Méthode de phénotypage aux champs

En 2018/2019 et 2019/2020, nous avons pu mettre en évidence une pression naturelle (hors inoculation) de *Microdochium spp.* assez faible et cohérente avec les résultats des enquêtes agriculteurs. En comparant la pression en fusariose des épis avec les notations et les données de biomasses fongiques (qPCR), la capacité de brumisation/irrigation ressort comme très importante pour obtenir des symptômes liés à *Microdochium spp.* Par exemple, en 2018/2019, sur les témoins des 13 sites, les 8 sites avec une biomasse fongique significative sont les sites qui ont pu faire plusieurs cycles d'aspersion par jour et donc apporter une humidité quasi constante sur l'épi et les feuilles (Figure 4). Ainsi, il est préférable de multiplier les cycles de brumisation/irrigation en journée plutôt que des volumes d'eau en fin de journée.

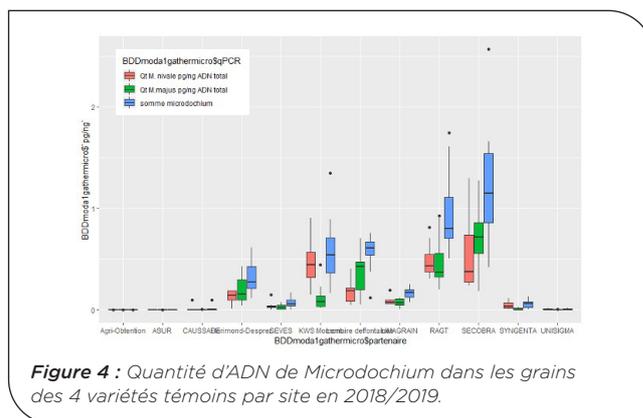


Figure 4 : Quantité d'ADN de *Microdochium* dans les grains des 4 variétés témoins par site en 2018/2019.

Nous avons également pu mettre en évidence qu'il est préférable d'éviter un précédent maïs pour diminuer la pression liée à *F. graminearum* surtout si l'objectif est d'évaluer la seule résistance à *Microdochium spp.* À cette fin, il est également préférable d'effectuer une protection fongicide au moment de la floraison avec une substance active spécifique à *F. graminearum* comme du tébuconazole. Nous avons pu démontrer une baisse significative de la biomasse de *F. graminearum* et aucun effet significatif sur *Microdochium spp.* ce qui permet de noter des symptômes plus étroitement liés à ces derniers et non à des complexes d'espèces.

Dans ces essais, le bâchage du dispositif après inoculation a permis, dans certaines situations, d'augmenter la présence de *Microdochium spp.* sur grains. L'augmentation de l'inoculum (de 10<sup>6</sup> sp/ml à 10<sup>8</sup> sp/ml) a également permis d'augmenter la pression de maladie sur les épis. Néanmoins, cette observation n'a pu être faite que dans un seul site et la production d'inoculum de *Microdochium spp.* à ce niveau de concentration peut être très fastidieuse voire irréalisable selon les souches et les conditions de culture. Enfin, les modalités d'inoculation encadrant la floraison (début floraison - fin floraison) semblaient, dans certains sites, les meilleurs stades d'application de l'inoculum.

Pour conclure, l'effet site notamment lié au climat et à la capacité d'aspersion sont les facteurs qui ressortent comme principaux dans la réussite des inoculations. Ces résultats sont aussi cohérents avec les principaux facteurs de risque identifiés dans la présence significative de *Microdochium* qui sont principalement liés à des variables climatiques (cf.3.2).

L'analyse de sensibilité variétale des quatre témoins dans les essais avec une pression significative a permis de confirmer les différences attendues entre les quatre variétés, soit Apache plus résistante que CAMELEON et SOTHYS eux-mêmes moins sensibles que PREMIO pour la pression sur les épis (Figure 5).

Lors de la dernière année d'essais aux champs, (2020/2021), 42 variétés au total ont été phénotypées en inoculant selon le protocole suivant : 3 applications à dernière feuille étalée (DFE), début floraison et fin floraison. Ce protocole a été défini comme le plus favorable à la réussite de l'inoculation grâce aux résultats précédents. Un traitement anti *F. graminearum*, à base de tébuconazole, a été réalisé dans les sites qui le pouvaient tout comme le bâchage après la dernière inoculation. Sur les 13 sites, 7 sites ont permis d'avoir une pression sur épis assez significative avec une note moyenne de 4.5 pour les quatre témoins. À noter une certaine pression sur feuilles dans certains sites (Figure 6).

Les quantifications de la biomasse fongique dans les grains à la récolte a permis de relier cette présence à la présence de *Microdochium* et/ou *F. graminearum*. Dans la majorité des sites, l'ensemble du complexe est présent mais avec une médiane plus élevée pour *Microdochium* par rapport à *F. graminearum*. Dans

deux sites, *F. graminearum* est significativement plus présent que les espèces de *Microdochium* (Lemaire-Deffontaines et Lidéa, Figure 7).

Dans ces deux sites, il n'y a pas pu avoir de traitements fongicides. Ainsi, quand on analyse l'ensemble du réseau, nous pouvons confirmer l'intérêt du traitement fongicide anti *F. graminearum* pour évaluer principalement l'interaction cultivar x *Microdochium*. (Figure 8).

Enfin, l'analyse des modalités inoculées et non inoculées n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'inoculation en 2021 (Figure 9). Cela signifie que la pression naturelle liée aux conditions climatiques de l'année et aux dispositifs d'expérimentation a été suffisante dans la majorité des sites notamment ceux qui ont pu faire des cycles réguliers d'aspersion. Ce résultat est aussi concordant avec les résultats de l'enquête en 2021 qui a montré une présence significative de *Microdochium* sur le territoire français (3.2)

Pour les 7 sites les plus informatifs selon les résultats obtenus avec les témoins, tous les grains des variétés présentes ont été analysés en qPCR. Le panel n°2 est représenté dans 4 sites et le panel n°1 dans 3 localités. Les modalités inoculées et non inoculées n'étant pas significativement différentes, chaque variété est représentée par 4 notations et 4 analyses moléculaires (2 répétitions par modalité) dans les analyses.

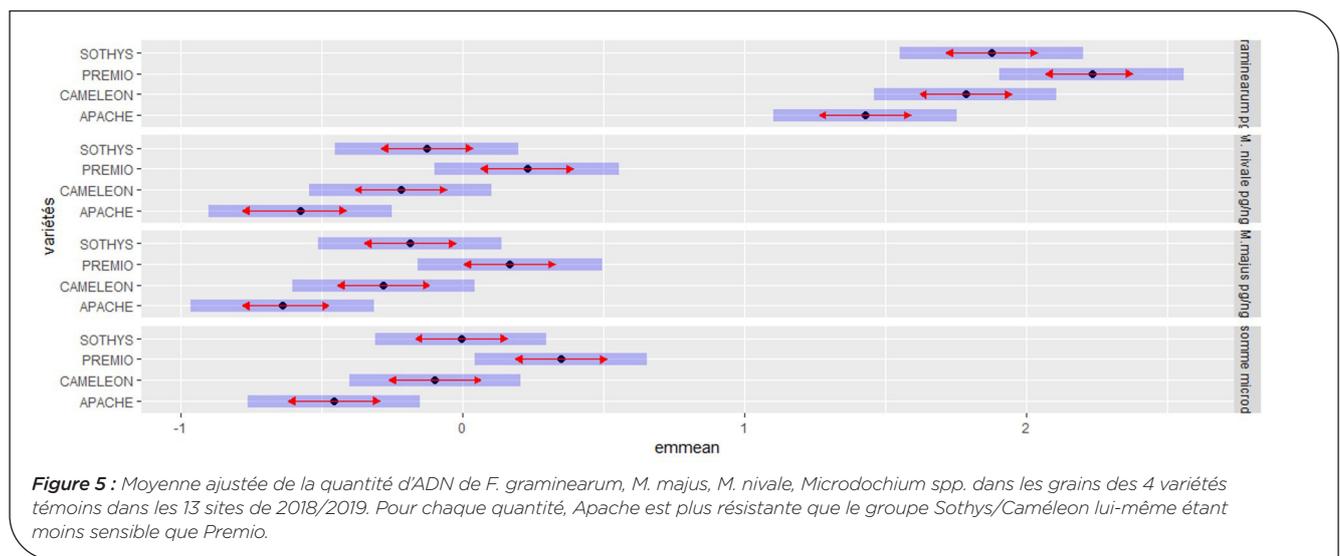


Figure 5 : Moyenne ajustée de la quantité d'ADN de *F. graminearum*, *M. majus*, *M. nivale*, *Microdochium* spp. dans les grains des 4 variétés témoins dans les 13 sites de 2018/2019. Pour chaque quantité, Apache est plus résistante que le groupe Sothys/Caméleon lui-même étant moins sensible que Premio.

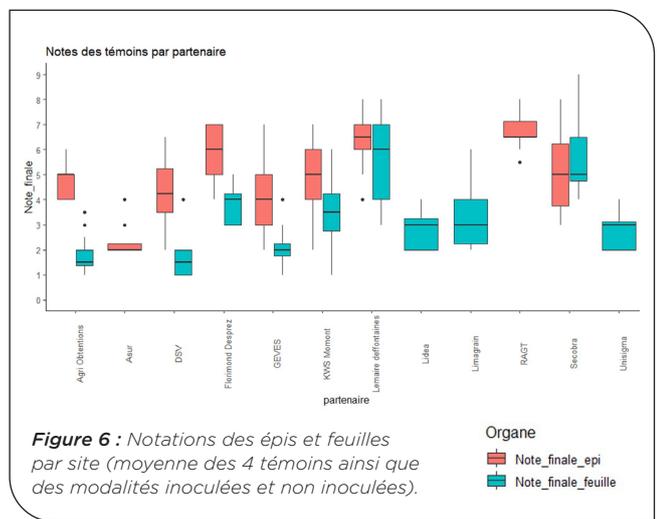


Figure 6 : Notations des épis et feuilles par site (moyenne des 4 témoins ainsi que des modalités inoculées et non inoculées).

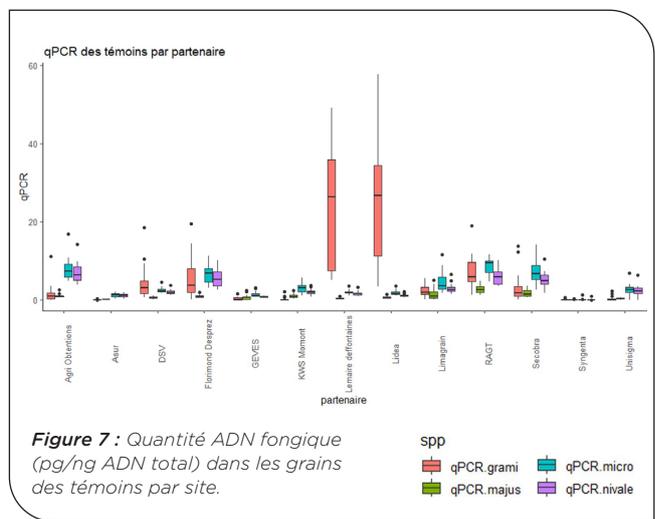
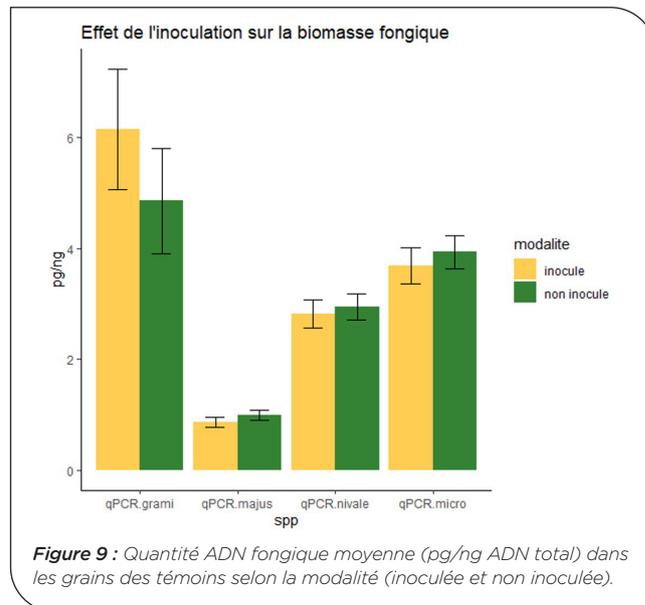
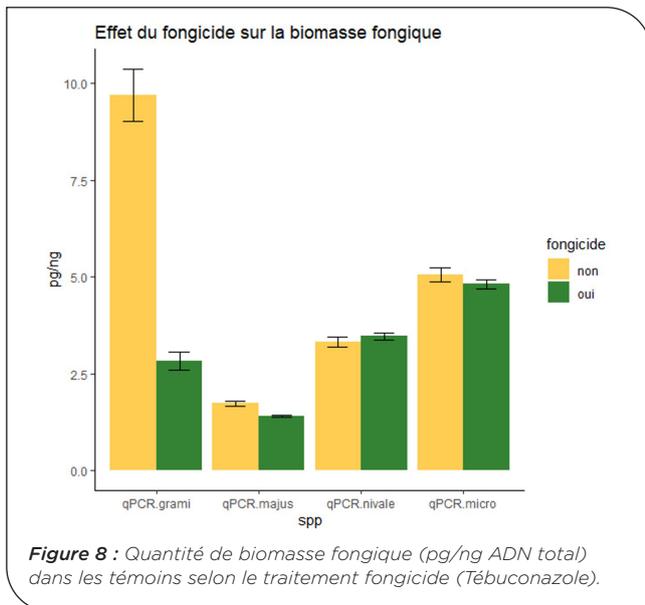


Figure 7 : Quantité ADN fongique (pg/ng ADN total) dans les grains des témoins par site.



Les principaux résultats permettent de mettre en évidence des différences de sensibilité entre les variétés en prenant en compte les notations des épis, ou la biomasse fongique pour chaque panel avec 3 groupes de significativité pour le panel n°1 et 6 groupes pour le panel n°2 (Figure 10).

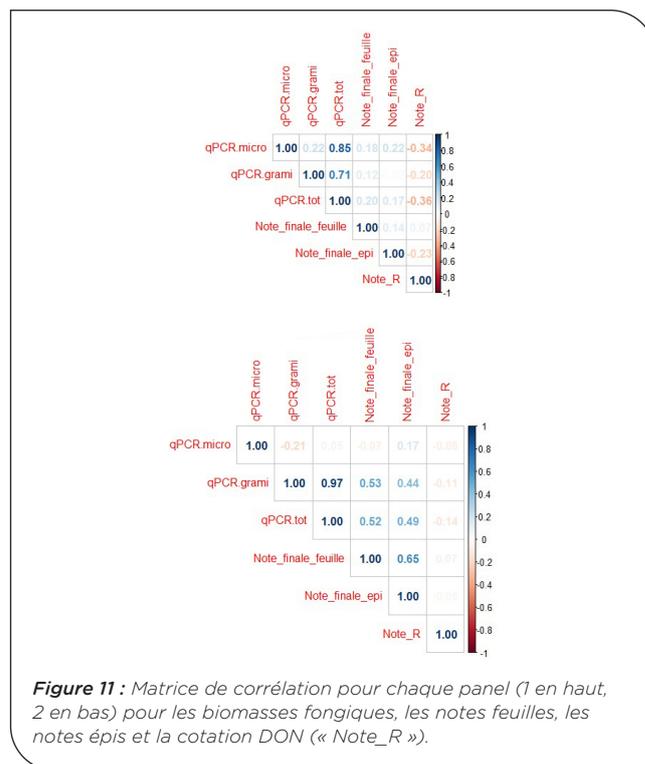
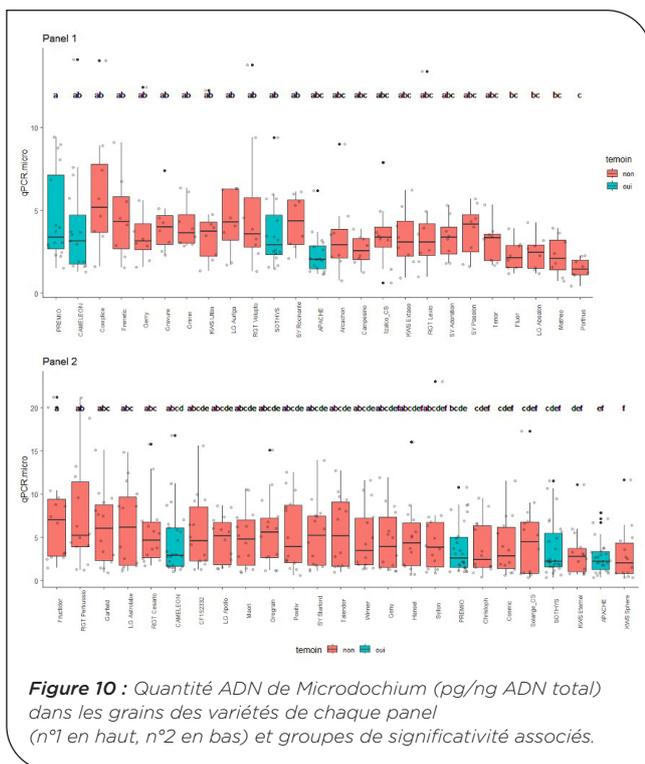
Il est intéressant de noter que les corrélations entre les notations épis, les biomasses fongiques mais aussi les cotations pour l'accumulation à la DON sont assez faibles pour chaque panel (Figure 11). Ce résultat illustre la difficulté à noter les maladies des épis et l'intérêt d'avoir plusieurs méthodes de phénotypage et d'indicateurs.

La corrélation entre les deux espèces de *Microdochium* et le classement variétal est bonne pour chaque espèce indiquant peu de différences de sensibilité selon l'espèce de *Microdochium*.

Dans le projet, nous avons aussi prévu de caractériser la sensibilité variétale au niveau foliaire avec ce type de dispositif. Néanmoins, la maladie ne s'est pas assez exprimée dans les dispositifs pour pouvoir en tirer des conclusions même si des tendances laissent suggérer des différences entre la sensibilité au niveau des épis par rapport à la sensibilité au niveau des feuilles.

### ► 3.4 Interactions plante-pathogène

Les analyses de dual-protéomique ont permis d'identifier 5232 protéines de blé, nombre comparable aux analyses menées avec *F. graminearum*. En revanche, moins de 300 protéines fongiques ont pu être assignées au genre *Microdochium*, dont moins de 50 disposaient de peptides protéotypiques (peptides spécifiques du champignon). Ces protéines fongiques



ont été principalement détectées dans les échantillons infectés par *M. nivale* alors que les deux souches ont produit des symptômes visibles et comparables. L'analyse quantitative a donc porté essentiellement sur le protéome du blé. Aucun impact significatif de la souche *M. majus* n'a pu être détecté sur le protéome des épillets de blé, quel que soit le point de cinétique considéré (48hpi et 72hpi). En revanche, un effet, bien que marginal, a pu être démontré sur le protéome de l'épi lorsque celui-ci subissait l'infection par la souche *M. nivale* depuis 72h. Au total, cinq protéines présentaient des augmentations d'abondance sans équivoque dans les échantillons prélevés à 72hpi. Ces protéines appartenaient à l'ensemble de protéines systématiquement sur-accumulées en réponse à *F. graminearum* indépendamment de la souche inoculée ou du cultivar expérimenté (core-responsive proteins). Deux de ces protéines sont chloroplastiques et corroborent la place centrale du chloroplaste dans les réponses aux agents pathogènes et les trois autres correspondent à des UDP-glucosyl transférases, fonctions connues pour leur rôle dans la détoxification. L'analyse comparative des génomes acquis dans le projet avec ceux de *F. graminearum* pour identifier des gènes potentiellement impliqués dans la pathogénicité et compléter cette étude protéomique est encore en cours.

## 4 Discussion et Conclusion

Le projet « FSOV RESISTAMICRO » a permis d'acquérir de nouvelles références et ressources pour permettre de mieux comprendre la « microdochiose » des céréales et ainsi développer des méthodes de lutte qui seront adaptées à cette maladie. Ainsi, l'importante collection de souches acquise lors du projet, les ressources génomiques (12 génomes) et génétiques (environ 20 marqueurs microsatellites/espèce) nous ont permis de mettre en évidence une probable absence de structure génétique des populations entre les deux espèces de *Microdochium* à l'échelle du territoire mais aussi des plantes hôtes et des organes testés. Les deux génomes Pacbio sont en cours de publication (Foulongne-Oriol *et al.*, in prep) afin d'en faire des génomes de référence pour la communauté internationale. De même, une étude du pangénome de *Microdochium spp.* et de *F. graminearum* est en cours afin d'étudier les différences génétiques entre ces espèces et essayer de déchiffrer les interactions entre *Microdochium spp.* et l'épi. La mise au point des tests en conditions contrôlées a été plus compliquée que prévu à la fois sur feuilles et sur épis. Même si des résultats intéressants ont été obtenus, il reste à améliorer ces tests pour pouvoir disposer de protocoles robustes permettant d'étudier plus finement les interactions et pouvoir les utiliser comme une aide à la sélection variétale. D'ailleurs, il est intéressant de noter que cette difficulté à bien phénotyper les variétés en conditions contrôlées par la maîtrise de l'infection se retrouve également aux champs. Les nombreux tests méthodologiques réalisés dans le cadre de ce projet et du projet « FSOV Microdochium » précédent ont permis

de caler une méthodologie pour favoriser la présence de *Microdochium spp.* au détriment de *F. graminearum*. Cette méthode consiste à inoculer en trois applications (dont surtout deux applications encadrant la floraison pour avoir de la pression sur les épis), éviter un précédent maïs, utiliser un fongicide spécifique à *F. graminearum* (ex : Tébuconazole), bâcher si possible et surtout apporter une hygrométrie très importante sur les épis pendant une longue période. Néanmoins, la réussite de l'inoculation n'est pas assurée à chaque fois et sera très dépendante des conditions climatiques de l'année.

D'ailleurs, ce résultat est corroboré par les travaux sur la prédiction du risque. En effet, ils n'ont pas permis de mettre en évidence de facteur agronomique à risque (contrairement à la fusariose due à *F. graminearum* déjà bien documentée sur le sujet). Cela signifie que, pour lutter contre cette maladie, aucune mesure prophylactique ne peut être envisagée pour le moment. Le déclenchement d'interventions fongicides ciblées (en choisissant la bonne combinaison matière active x dose x stade d'application) pourrait se baser sur le suivi d'une ou plusieurs variables climatiques permettant de prévoir le risque de développement de la microdochiose. Outre la pluviométrie sur différentes périodes, le rayonnement global moyen autour de la floraison nous semble particulièrement prometteur. Cette variable présente en effet plusieurs atouts. Elle permet déjà une bonne prédiction du risque de « microdochiose », en comparaison aux autres variables explicatives testées. Elle a aussi l'avantage d'être elle-même moins entachée d'erreurs d'estimation (lors de son interpolation spatiale) et de prédiction sur les prochains jours que des variables intégrant des informations pluviométriques (les pluies sont par essence des événements localisés et difficilement prévisibles). Le recours au rayonnement global permet très probablement d'intégrer implicitement des variables influençant directement le développement de la « microdochiose » (température, humidité, pluie, etc.). Quoi qu'il en soit, cette variable semble être un critère de choix pour la prédiction du risque de cette maladie (étant donné son niveau d'importance, son niveau de précision et son accessibilité) et il est donc intéressant de poursuivre des travaux à son sujet.

En l'état actuel de nos connaissances, le seul levier agronomique préventif possible pourrait donc être offert par l'évaluation d'une sensibilité variétale vis-à-vis de *Microdochium spp.* Or, les résultats obtenus dans ce projet mettent bien en évidence des sensibilités différentes des variétés testées démontrant que du progrès génétique est possible. La difficulté réside dans les méthodes de phénotypage et la fiabilité des essais même si le projet a permis des avancées sur ce point. De plus, il ne semble pas y avoir de différences de réponse des variétés entre *M. majus* et *M. nivale* ce qui permettrait d'évaluer les deux espèces ensemble. Ainsi, des études populationnelles (croisements entre variétés sensibles et résistantes) ou de génétiques d'association pourraient être engagés pour identifier des sources de résistance, des gènes et/ou des marqueurs d'intérêts vis-à-vis de *Microdochium*.

## Références bibliographiques

- Abdelhalim M., Brurberg M.B., Hofgaard I.S., Tronsmo M.**, 2020. Pathogenicity, host specificity and genetic diversity in Norwegian isolates of *Microdochium nivale* and *Microdochium majus*. *Eur J Plant Pathol* 156, 885-895
- ARVALIS - Institut du végétal.** 2011. Grille d'évaluation du risque d'accumulation du déoxynivalénol (DON) dans le grain de blé tendre et d'aide au traitement contre la fusariose sur épi (*Fusarium graminearum* et *F. culmorum*).
- Bai G.H., Desjardins A.E, Plattner R.D.** 2002. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, vol 153, pp. 91-98.
- Bonhomme L., Valot B., Tardieu F., Zivy M.**, 2012. Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 11, pp. 957-972.
- Breiman L.**, 2001. Random Forests. *Machine Learning*, 45 : 5-32
- Brennan J.M., Leonard G., Cooke B.M., Doohan F.M.**, 2005. Analysis of head and leaf reaction towards *Microdochium nivale*. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 112 (1), pp. 79-83.
- Browne R.A., Mascher F., Golebiowska G., Hofgaard I.S.**, 2006. Components of partial disease resistance in wheat detected in a detached leaf assay inoculated with *Microdochium majus* using first, second and third expanding seedling leaves. *Journal of Phytopathology*, vol. 154 (4), pp. 204-208.
- Christova P.K., Christov N.K. and Imai R.**, 2006. A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*, vol. 223, pp. 1207-1218.
- Elbelt, S., Siou, D., Gelisse, S., Cruaud, C., Lannou, C., Lebrun M-H., Laval, V.** 2018. Optimized real time QPCR assays for detection and quantification of *Fusarium* and *Microdochium* species involved in wheat head blight as defined by MIQE guidelines. *BioRxiv* 272534
- Fabre F., Bormann J., Urbach S., Roche S., Langin T., Bonhomme L.**, 2019. Unbalanced Roles of Fungal Aggressiveness and Host Cultivars in the Establishment of the *Fusarium* Head Blight in Bread Wheat. *Front Microbiol.* 10:2857.
- Friedman J H.** 2001. Greedy function approximation: a gradient boosting machine. *The Annals of Statistics*, 29(5) : 1189-1232
- Garcia M-A.** 2021. Genetic diversity of *Microdochium* spp. populations involved in cereals *Fusarium* Head Blight disease in France. Rapport de stage de fin d'études, Université Bordeaux.
- Gourdain E., Piraux F. et Barrier-Guillot B.**, 2009. Les outils pour gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre et blé dur. AFPP - 9ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 8 et 9 décembre 2009.
- Gourdain E, Lannou C.** 2013. Fusariose des épis de blé, le degré d'infection fonction de l'équilibre entre deux champignons. *Perspectives Agricoles*, 399 : 8-11.
- Gourdain E., Batina H., Du Cheyron P., Fourrey A., Gélisse S., Grignon G., Laval V., Maumené C., Méléard B. et Valade R.**, 2016. Lutte contre les fusarioses des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthodes de lutte, *Innovations agronomiques*, vol. 49, pp. 133-145.
- Hayashi Y., Kozawa T., Aicuhi D., Koike M., Akino S., Kondo N.**, 2014. Population genetic structure of *Microdochium majus* and *Microdochium nivale* associated with *Fusarium* head blight of wheat in Hokkaido, Japan. *European Journal of Plant Pathology*, vol.140, pp. 787-795.
- Ioos R., Belhadj A., Menez M.**, 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia*, vol. 158 (3), pp. 351-362.
- Isebaert S., Haesaert G., Devreese R., Fremaut D., Vlaemynck G., Maene P.**, 2004. *Fusarium* spp. in winter wheat, a problem in Flanders ? *Parasitica*, vol. 60 (1-2), pp. 33-43.
- Jewell L. E.**, 2013. Genetic and pathogenic differences between *Microdochium nivale* and *Microdochium majus*. Doctor of Philosophy, University of Guelph, Ontario, Canada.
- Joshi A.K. & Miedaner T.**, 2003. Occurrence and host preference of foliar blight pathogens in different growth stages of rye and wheat in Southwest Germany. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, vol. 110 (4), pp. 350-358.
- Kammoun L. G., Gargouri S., Hajlaoui M. R. and Marrakchi M.**, 2009. Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *Journal of Phytopathology*, vol. 157, pp.546-551.
- Kang Z., Huang L., Buchenauer H.**, 2004. Ultrastructural and cytochemical studies on infection of wheat spikes by *Microdochium nivale*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, vol. 111 (4), pp. 351-361.
- Lees A.K., Nicholson P., Rezanoor H.N., Parry D.W.**, 1995. Analysis of variation within *Microdochium nivale* from wheat: evidence for a distinct sub-group. *Mycological Research*, vol. 99, pp.103-109.
- Lepais O., Chancerel E., Boury C., Salin F., Manicki A., Taillebois L., Dutech C., Aissi A., Bacles C.FE., Daverat F., Launey S., Guichoux E.**; 2020. Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8:e9085
- Liaw A., Wiener M.**, 2002. Classification and Regression by randomForest. *R News*, 2(3) : 18-22.
- Maurin N., Saur L., G. Capron G.**, 1995. Stem and head reaction of winter wheat cultivars to artificial inoculation by *Microdochium nivale* under controlled environment and field conditions. *Euphytica*, vol. 92, no. 3, pp. 359-366.
- Matušinsky P., Svobodová LL., Svačinová I., Havis N., Hess M., Tvarůžek L.**, 2019. Population genetic structure of *Microdochium majus* and *Microdochium nivale* associated with foot rot of cereals in the Czech Republic and adaptation to penthiopyrad. *European Journal of Plant Pathology* 155(1): 1-12.
- Megléczy E., Pech N., Gilles A., Dubut V., Hingamp P., Trilles A., Grenier R., Martin JF.**, 2014. QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol Ecol Resour.* 2014 Nov;14(6):1302-13.
- Nakajima T. & Abe J.**, 1996. Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. *Canadian Journal of Botany*, vol. 74 (11), pp. 1783-1788.

**Nielsen L.K., Jense J.D., Nielsen G.C., Jensen J.E., Spliid N.H., Thomsen I.K., Justesen A.F., D.B. Collinge and Jørgensen L.N.**, 2011. Fusarium head blight of cereals in Denmark : Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology*, vol. 101 (8), pp. 960-969.

**Nielsen L.K., Justesen A.F., Jensen J.D., Jørgensen L.N.**, 2013. *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. *Crop protection*, vol. 43, pp. 192-200.

**Observatoire CartoFusa**, 2017. BayerCropScience, Communication personnelle.

**Pancaldi D., Tonti S., Prodi A., Salomoni D., Prà M.D., Nipoti P., Alberti I., Pisi A.**, 2010. Survey of the main causal agents of Fusarium head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 49 (2), pp. 258-266.

**Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.**, 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review *Plant Pathology* 44, 207-238.

**Parry D.W., Rezanoor H.N., Pettitt T.R., Hare M.C., Nicholson P.**, 2008. Analysis of *Microdochium nivale* isolates from wheat in the UK during 1993. *Annals of Applied Biology*, vol. 126 (3), pp. 449-455

**R Core Team**. 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://www.R-project.org/>

**Ren R., Ynag X., Ray R.V.**, 2015. Comparative aggressiveness of *Microdochium nivale* and *M. majus* and evaluation of screening methods for Fusarium seedling blight resistance in wheat cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 141, pp. 281-294.

**Ren R., Foulkes J., Mayes S., Yang X., Ray R.V.**, 2016. Identification of novel quantitative trait loci for resistance to Fusarium seedling blight caused by *Microdochium majus* and *M. nivale* in wheat. *Field crops research*, vol. 191, pp. 1-12.

**Rossi V., Ravanetti A., Patteri E., Giosuè S.**, 2001. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight. *Journal of Plant Pathology* vol. 83(3), pp. 189-198.

**Shah D. A., Pucci N., Infantino A.**, 2005. Regional and varietal differences in the risk of wheat seed infection by fungal species associated with fusarium head blight in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 112 (1), pp. 13-21.

**Snider C.S., Hsiang T., Zhao G., Griffith M.**, 2000. Role of ice nucleation and antifreeze activities in pathogenesis and growth of snow molds. *Phytopathology*, vol. 90, pp. 354-361.

**Taillieu D., V. Cadot, B. Foucault, O. Robert, L. Duchalais, S. Caiveau, C. Dubiton, P. Giraudeau, S. Dutriez, T. Bouthillier, J. Auzanneau, C. Duque, C. Vitry, S. Le Prieur, F. Dauthieux, M. Faure, T. Baldwin, C. Galon, I. Serandat, JP. Maigniel, R. Valade**. 2019. *Microdochium* spp. : Vers une meilleure connaissance de l'occurrence, de l'épidémiologie du champignon et du comportement des variétés de blé tendre actuelles face à cette maladie. Synthèse FSOV 2014 MICRODOCHIUM.

**Toussaint-Ferreyrolle J.**, 2012. *Microdochium* : plusieurs types de symptômes en 2012. ARVALIS-Infos.fr.

**Valade R., C. Vitry, S. Le Prieur, E. Gourdain, G. Grignon, L. Duchalais, B. Foucault, D. Taillieu, O. Robert**. 2018. Influence of agronomic and climatic factors on the epidemiology of *Microdochium* species and assessment of wheat cultivars susceptibility to these pathogens in France. In Book of abstracts of 14th European Fusarium Seminar, 08-10 avril, Tulln (Austria).

**Valade R., Orlando B., Maumené C., Laval V., Walker A-S, Ioos R., Boutigny A-L, Cadot V., Foulongne-Oriol M., Forget F., Atanasova-Penichon V., Saintenac C., Bonhomme L., Langin T., Serre F., Taillieu D., Roumet P.**, 2020. La fusariose des épis des céréales à paille : synthèse de 10 années de recherche pour une meilleure gestion intégrée de la maladie. Phloème 2020 : biennales de l'innovation céréalière, ARVALIS - Institut du Végétal, Jan 2020, Paris, France.

**Xu X.M., Parry D.W., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Edwards S.G., Cooke B.M., Coohan F.M., Brennan J.M., Moretti A., Tocco G., Mule G., Hornok L., Giczey G., Tatnell J.**, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing Fusarium ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* vol. 112, pp.143-154.

**Xu X.M., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S.G.**, 2008. Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, vol. 98 (1), pp. 69-78.

**Xu X.M., Nicholson P.**, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 47, pp. 83-103.

# RESISTAMICRO : Comprendre et Maîtriser les infections de *Microdochium* spp. pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose »

Romain VALADE<sup>1\*</sup>, Christophe GIGOT<sup>1</sup>, Cindy VITRY<sup>1</sup>, Stéphanie Le PRIEUR<sup>1</sup>, Marie-Anne GARCIA<sup>2</sup>, Philippe MOMONT<sup>3</sup>, Anne-Charlotte LOMBART<sup>3</sup>, Romain LAMERAND<sup>3</sup>, Edouard PENEZ<sup>3</sup>, Julien RATET<sup>3</sup>, Sylvie DUTRIEZ<sup>3</sup>, Sylvain CHOMBART<sup>4</sup>, Constance LAVERGNE<sup>5</sup>, Laure DUCHALAIS<sup>6</sup>, Aubert AVALLE<sup>7</sup>, Gabriel BEUDIN<sup>8</sup>, Hugo MUSSET<sup>9</sup>, Valérie CADOT<sup>10</sup>, Jean-Philippe MAIGNIEL<sup>10</sup>, Ludovic BONHOMME<sup>11</sup>, Cyrille SAINTENAC<sup>11</sup>, Marie FOULONGNE-ORIOL<sup>2</sup>

1 - ARVALIS - Station expérimentale, 91720 Boigneville

2 - INRAE - UR MYCSA, 33882 VILLENAVE d'ORNON, 3 - CETAC - 7, rue du Coq Heron, 75030 Paris

4 - FLORIMOND DESPREZ Veuve & Fils - 59242 Cappelle-en-Pévèle

5 - LIMAGRAIN Europe - 77390 Verneuil l'Étang

6 - AGRI-OBTENTIONS - 78660 Orsonville

7 - UNISIGMA - 60480 Froissy

8 - RAGT 2n - 28150 Louville-la-Chenard

9 - SYGENTA - 31790 Saint Sauveur

10 - GEVES - La Pouéze, 49370 Erdre-en-Anjou

11 - INRAE - UMR GDEC - Université Clermont Auvergne 63000 Clermont-Ferrand

\*Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@ARVALIS.fr

La fusariose de l'épi est une maladie causée par un complexe d'espèces fongiques toxigènes (*Fusarium* spp.) et non toxigènes (*Microdochium* spp.). Actuellement, la sélection variétale est principalement axée contre les espèces productrices de fusariotoxines notamment *F. graminearum* afin de limiter les pertes liées à la qualité sanitaire des grains. Néanmoins, depuis plusieurs années, les occurrences de deux espèces de *Microdochium* (*M. majus* et *M. nivale*) ne cessent d'augmenter sur les céréales françaises et leurs impacts dans les pertes de rendements deviennent de plus en plus préoccupant. Le projet « FSOV RESISTAMICRO » a pour but de (i) caractériser génétiquement les populations de *Microdochium* spp et identifier les facteurs agro-climatiques à risque dans le développement de la maladie, (ii) mettre au point des protocoles d'évaluation de la sensibilité variétale (blé tendre) à *Microdochium* spp. au champ et en conditions contrôlées, (iii) caractériser le mode d'infection sur blé tendre, et rechercher des gènes impliqués dans l'interaction blé / *Microdochium* spp (non abordé dans ce poster).

## Caractérisation génétique de *Microdochium* spp.

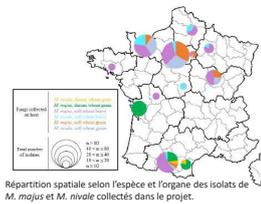
➤ 2 génomes de référence ont été acquis

	M. nivale [MI18055]	M. majus [MI18056]
Taille génome (bp)	36 675 401	36 252 715
GC (%)	55	56
Nb scaffolds	36	13
Nb grands scaffolds (>1Mb)	10	13
Nb modèle de gènes avec séquences codantes	15 012	13 285
Nb SSR identifiés	5685	5877
Nb SSR/Mb	154.9	162.3

Caractéristiques des deux génomes (*M. majus* et *M. nivale*) acquis avec un séquençage PacBio (long read).

➤ Un important effort d'échantillonnage réalisé

➤ Des marqueurs SSR ont été développés pour chaque espèce

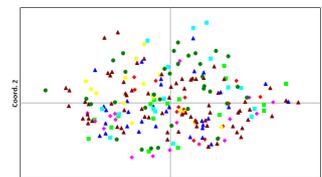


Répartition spatiale selon l'espèce et l'organe des isolats de *M. majus* et *M. nivale* collectés dans le projet.

Espèce	Nombre d'individus génotypés	Nombre de SSR validés	Nombre moyen d'allèles par locus	Diversité génétique (h)
<i>M. majus</i>	450	22	5.7	0.378
<i>M. Nivale</i>	198	19	8.1	0.442

Caractéristiques des isolats génotypés avec les microsatellites (SSR)

➤ Analyses de structuration génétique des populations



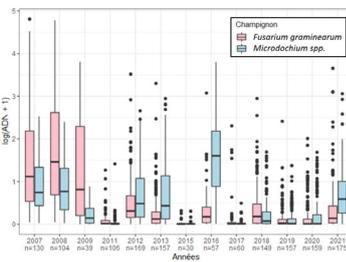
Analyse en composantes principales (ACP) de la diversité génétique aux loci SSR pour les populations de *M. majus* selon les lieux d'isolement.

➔ Très forte synténie entre les deux espèces

➔ Diversité génétique plus importante chez *M. nivale*

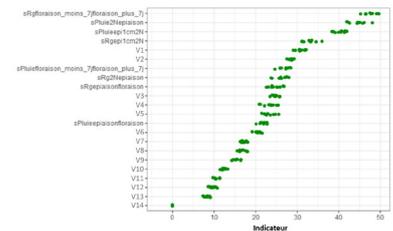
➔ Aucune structuration génétique selon la localité, l'hôte ou l'organe mise en évidence avec ce jeu de données

## Epidémiologie de *Microdochium* spp. et facteurs agro-climatiques



Quantité d'ADN (log(x+1)) de *F. graminearum* et *Microdochium* dans des grains de blé (tendre et dur) en fonction des années. En abscisse, est précisé pour chaque année le nombre d'échantillons analysés. *Microdochium* spp correspond à la somme des quantités d'ADN de *M. majus* et *M. nivale*.

- Prévalence significative de *Microdochium* spp. au cours des 15 dernières années en France avec une forte variabilité interannuelle
- Depuis 2016, année historique, seule 2021 a été une année assez favorable à *Microdochium* spp.
- Les facteurs agro-climatiques:
  - ✓ Parmi les facteurs agronomiques testés (en particulier précédent et travail du sol), aucun ne permet d'expliquer la présence de *Microdochium* spp.
  - ✓ La pluviométrie et le rayonnement global moyen sur différentes périodes (notamment autour de la floraison) ont été retrouvés parmi les principales variables explicatives de ce jeu de données



Graphique d'importance de variables pour prédire la quantité de *Microdochium* spp. La technique des forêts aléatoires a été mobilisée : ce graphique représente les classements des variables obtenus pour 30 forêts aléatoires. Plus la valeur de l'indicateur est importante et plus la variable correspondante permet d'expliquer la quantité de *M. spp.* mesurée. Afin d'alléger le visuel, les variables ne concernant pas uniquement la pluviométrie ou le rayonnement ont été anonymisées.

## Mise au point de méthodes de phénotypage

➤ Conditions contrôlées



Photo de symptômes obtenus après inoculation de *M. majus* avec une méthode « couper/renverser » : feuilles attachées, humidité apportée avec grosses gouttes, 7 jours de bûchage (baisse de rayonnement). Variété Apache.

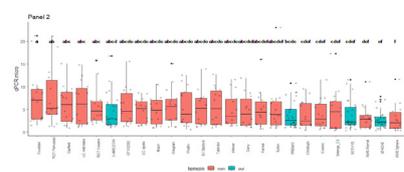
➤ Des méthodes développées sur feuilles détachées et épis mais complexes à mettre en œuvre pour une caractérisation à « haut-débit »

➤ Au Champ



- Les nombreux essais réalisés ont permis de définir un protocole préférentiel pour évaluer les variétés vis-à-vis de *Microdochium* spp.:
- 3 applications d'inoculum: Dernière feuille étalée, début floraison et fin floraison avec bûchage si possible
- Eviter un précédent maïs
- Utiliser un fongicide spécifique anti *F. graminearum*
- Apporter une hygrométrie très importante par aspersion/brumisation

➤ Caractérisation d'un panel de variétés au champ



Quantité ADN de *Microdochium* (pg/ng ADN total) dans les grains des variétés et groupes de significativité associés

- Mise en évidence de différences de sensibilité entre les variétés pour *Microdochium* spp.
- Pas de différences de sensibilité observées selon la présence de *M. majus* et/ou *M. nivale*
- Pas de corrélation forte avec la note de résistance à l'accumulation à la DON?

Le projet a permis d'acquies des ressources microbiologiques, génétiques et méthodologiques utiles pour l'ensemble des partenaires et acteurs de la lutte contre les maladies des épis du blé tendre. Nous avons pu mettre en évidence une probable absence de structure génétique des populations entre les deux espèces de *Microdochium* à l'échelle du territoire mais aussi des plantes hôtes et des organes testés. Des facteurs climatiques responsables de la « microdochiose » ont été identifiés. Des protocoles permettant de mieux évaluer les variétés sont disponibles et ont permis de démontrer que du progrès génétique est possible.

