



HAL
open science

Characterisation of French powdery mildew populations infecting triticales

Anne Sophie A. S. Walker, Annaig A. Bouguennec, Johann J. Confais,
Guillaume G. Morgant, Pierre P. Leroux

► **To cite this version:**

Anne Sophie A. S. Walker, Annaig A. Bouguennec, Johann J. Confais, Guillaume G. Morgant, Pierre P. Leroux. Characterisation of French powdery mildew populations infecting triticales. 9ème conférence internationale sur les maladies des plantes, Dec 2009, Tours, France. hal-02751721

HAL Id: hal-02751721

<https://hal.inrae.fr/hal-02751721>

Submitted on 3 Jun 2020

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

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

AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009

SOMMAIRE

Page

**SESSION : BIOVIGILANCE/SUIVI DES POPULATIONS/QUALITÉ SANITAIRE
BIOVIGILANCE/DYNAMICS OF DISEASES/FOOD SECURITY**

COMMUNICATIONS ORALES

- **La fusariose des épis du blé : effet des pratiques agronomiques sur la répartition des différentes espèces et conséquences sur la qualité sanitaire**
P. DUBOURNET, G. CURE, G. CHANCRIN, Y. COCHET (Bayer CropScience France)10
- **Fusariose des épis de maïs : interactions entre *Fusarium graminearum* et *F. verticillioides***
D. CARON, L. MEYER, A. PICOT (Arvalis – Institut du Végétal)20
- **EST-derived markers highlight genetic relationships among *Plasmopara halstedii* French races**
F. DELMOTTE, X. GIRESSÉ, S. RICHARD-CERVERA (INRA Villenave d'Ornon), J.-E. TOURVIEILLE,
P. WALSER, D. TOURVIEILLE DE LABROUHE (INRA Clermont-Ferrand)30
- **Étude de l'incidence de l'oïdium sur la qualité des raisins et des vins : conséquences sur les seuils de nuisibilité et la vinification des raisins touchés**
J. ROUSSEAU, L. BLATEYRON (ICV Lattes), V. JACUS, D. BLANC (BASF Agro).....38

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- **Contribution à l'étude des virus des céréales par la caractérisation biologique des virus de la mosaïque du blé et de l'orge : WSMV, WSSMV et BSMV dans la zone centre de l'Algérie**
K. BENMOKHTAR (ITGC, Alger), A. AIT YAHIA (INA, Alger)48
- **La PCR quantitative : un potentiel à creuser pour la prévision du développement des symptômes de septoriose**
D. GOUACHE (Arvalis – Institut du Végétal), S. SELIM, C. ROISIN, J. SANSSÈNE (Institut Polytechnique LaSalle, Beauvais).....58
- **Caractérisation des populations françaises d'oïdium infestant le triticale**
A.-S. WALKER (INRA Versailles), A. BOUGUENNEC (INRA Clermont-Ferrand), J. CONFAIS,
G. MORGANT, P. LEROUX (INRA Versailles)67
- **Les premiers leviers identifiés pour maîtriser le risque T-2 et HT-2 sur orges**
B. ORLANDO, B. BARRIER-GUILLOT, E. GOURDAIN, C. MAUMENÉ (Arvalis – Institut du Végétal)76
- **Les gènes d'avirulence de *Leptosphaeria maculans* et définition de marqueurs moléculaires pour suivre les évolutions de populations virulentes**
E. PIC, J. CARPEZAT (CETIOM), M.-H. BALESSENT, T. ROUXEL (INRA Grignon), X. PINOCHET
(CETIOM)85
- **Une coopération européenne pour la validation de protocoles de détection et d'identification de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* sur semences de maïs**
M. VISAGE, S. PAILLARD, V. OLIVIER, F. POLIAKOFF, H. SOUBELET (LNPV, Angers).....92
- **Mise en évidence du PSTVd et TCDVd en France sur plantes ornementales et culture de tomates**
X. TASSUS, V. MOLINERO-DEMILLY, P. SUHARD, I. RENAUDIN, A. LEGUAY, M. LOISEAU,
F. POLIAKOFF (LNPV, Angers)..... 100
- **Identification biochimique de *Pectobacterium* isolés à partir des tubercules de pomme de terre en Algérie**
S. OUANAS, R. YAHIAOUI-ZAIDI (Université A. MIRA, Algérie) 104
- **Quantitative analysis of solanapyrone A from culture filtrates of *Ascochyta rabiei***
M.-M. ZERROUG (Université de Sétif, Algérie), Z. BOUZNAD (ENSA, El-Harrach, Algérie), L. LAROUS
(Université de Sétif, Algérie), R.-N. STRANGE (University of London) 111

| | |
|--|-----|
| • Infections latentes d'<i>Erwinia amylovora</i> : mise en œuvre d'un protocole d'évaluation de méthodes d'extractions d'ADN | |
| C. DOUSSET, F. POLIAKOFF, A. DROUIN, H. SOUBELET (LNPV, Angers) | 117 |
| • Mating types isolates of <i>Ascochyta rabiei</i> | |
| M.-M. ZERROUG (Université de Sétif, Algérie), Z. BOUZNAD (ENSA, El-Harrach, Algérie), L. LAROUS (Université de Sétif, Algérie), R.-N. STRANGE (University of London) | 127 |
| • Évaluation de la phytotoxicité d'une molécule isolée des feuilles d'olivier infectées par <i>Cycloconium oleaginum</i> (Cast.) | |
| A. GUECHI (Université de Sétif, Algérie) | 131 |
| • Prolifération et contrôle de la tavelure cycloconimique des feuilles d'olivier en Algérie | |
| A. GUECHI (Université de Sétif, Algérie) | 138 |
| • Pathological and genetic variability among isolates of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> causing wilt of chickpea in Egypt | |
| NOHER. A. MAHMOUD (Plant Pathology Research Institute, Egypt), ABDALLA M.-Y. (Faculty of Environmental Agri. Sciences, Suez Canal Univ.), ABOU ATTIA M.-A., ABOU ZEID. N.-M. (Plant Pathology Research Institute, Egypt) | 143 |
| • Le mildiou de l'artichaut : état des lieux de nos connaissances | |
| C. MONOT, G. BARBEYRON, M.-C. CARRARA, S. HALLIER, S. BOURY (Bretagne Biotechnologie Végétale), N. MEZENECV (Chambre d'agriculture du Finistère), J.-M. COLLET (CTIFL/CATE) | 152 |
| • PEPEIRA : une analyse de risque du virus de la mosaïque du pépino (PEPMV) ? | |
| X. TASSUS (LNPV, Angers), R. VAN DER VLUGT (Plant Research International B.V., The Netherlands) | 157 |
| • Endophytic mycoflora of atlas cedar (<i>Cedrus atlantica</i> Man.) in Bélezma massif (Aurès, Algeria) | |
| D. HARZALLAH (Université de Sétif, Algérie), O.-A. BENSSACI (Université El-Hadj Lakhdar, Algérie), S. BOUHARATI (Université de Sétif, Algérie) | 159 |
| • Protocole d'évaluation des réactifs sérologiques : essai sur deux modèles viraux et un modèle bactérien | |
| C. FRANÇOIS, V. HERAU, D. ROBERT, J. BUREAU, I. RENAUDIN, V. MOLINERO-DEMILLY, H. SOUBÉLET (LNPV, Angers) | 168 |
| • Mise sous assurance qualité des travaux méthodologiques au LNPV et accréditation en tant qu'organisateur d'essais inter-laboratoires | |
| V. HERAU, A. LEGUAY (LNPV, Angers) | 173 |
| • L'analyse du risque phytosanitaire (ARP) : un outil pour diminuer les risques d'introduction de nouvelles maladies | |
| C. LE FAY-SOULOY, P. REYNAUD (LNPV, Angers) | 178 |
| • Impact des itinéraires techniques sur la dégradation des molécules phytosanitaires dans les vins | |
| M. GRINBAUM (IFV Orange), P. COTTEREAU (IFV Rodilhan), P. VUCHOT (Inter Rhône) | 185 |
| • Molecular characterization of <i>Trichoderma</i> biocontrol isolates using RAPD procedure | |
| N.-M. ABOU-ZEID, A.-Y. AHMED (Plant Pathology Research Institute, Egypt), E.-M. GADO, A.-A. MOSA (Ain Shams University, Egypt) | 196 |

POSTERS ÉTUDIANTS

| | |
|--|-----|
| • Temperature adaptation and teliosore production aptitude of <i>Puccinia striiformis</i> F. Sp. <i>tritici</i> populations in relation to their geographical and phylogenetic position | |
| S. ALI, M. LECONTE, J. ENJALBERT, C. de VALLAVIEILLE-POPE (INRA-AgroParisTech) | 203 |

- **L'enquête botrytis ou qualité[®], 7581 parcelles étudiées en 3 ans dans 5 vignobles français**
G. GASTALDI (Institut National d'Horticulture et de Paysage - Agrocampus Ouest) 209
- **Interactions bidirectionnelles indirectes entre bioagresseurs du rosier**
N. DESNEUX, R. MOUTTET, P. BEAREZ (INRA Sophia-Antipolis) 210

**SESSION : IPM/SYSTÈME DE CULTURE/ÉPIDÉMIOLOGIE/RÉSISTANCES MALADIES
IPM/CROP MANAGEMENT SYSTEMS/EPIDEMIOLOGY/RESISTANCE TO DISEASES**

COMMUNICATIONS ORALES

- **Unité mixte technologique Pivert : un outil de collaboration inter structures pour la protection intégrée des rotations à base de blé et de colza**
H. GOYEAU, X. PINOCHET (Animateurs UMT Pivert).....220
- **Observations relatives à l'impact du travail du sol et à la gestion des résidus de récolte sur le développement du piétin verse, de la septoriose, de l'helminthosporiose et de la fusariose du blé tendre, dans le cadre d'un essai rotation de longue durée**
C. MAUMENÉ, G. BEAUVALLET, J. LABREUCHE, B. ORLANDO (Arvalis – Institut du Végétal).... 225
- **Durabilité et gestion de la résistance génétique du blé à la rouille brune causée par *Puccinia triticina***
H. GOYEAU, C. LANNOU, B. PARIAUD, G. AZZIMONTI (INRA UMR BIOGER, Grignon),
P. DU CHEYRON, G. COULEAUD, C. MAUMENÉ (Arvalis – Institut du Végétal)..... 235

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- **Biological and chemical management of *Phytophthora* root rot /collar rot in citrus nursery**
R.-M. GADE (Department of Plant Pathology, India) 245
- **La ramulariose des orges en France : importance et management de *Ramularia collo-cygni***
D. CARON, C. MAUMENÉ, J.-Y. MAUFRAS, G. BEAUVALLET (Arvalis – Institut du Végétal) 254
- **Date de semis, pression de septoriose et potentiel de rendement : de la compréhension à la préconisation opérationnelle**
D. GOUACHE, P. GATE (Arvalis – Institut du Végétal), C. ROBERT (UMR 1091 INRA-AgroParisTech, Grignon), C. FOURNIER (UMR 759 INRA-SupAgro, Montpellier)..... 263
- **Approche multifactorielle des origines de la verticilliose du lin, *Linum usitatissimum***
E. CARIOU-PHAM, M. BANSARD, M. BROCHARD (ITL)..... 272
- **Gestion durable du risque mildiou du tournesol : influences des facteurs agronomiques et des choix variétaux sur le développement quantitatif et qualitatif de l'inoculum**
J. MOINARD (DRAAF-SRAL Midi-Pyrénées), E. MESTRIES (CETIOM), D. TOURVIELLE DE LABROUHE (INRA Clermont-Ferrand), A. PENAUD (CETIOM), P. WALSER (INRA Clermont-Ferrand), X. PINOCHET (CETIOM), C. THIERY, M. DORDOLO (Montpellier SupAgro), G. MARAGE (Université de Reims) 281
- **Comparison of artificial inoculation with *Phoma macdonaldii* to reproduce sunflower premature ripening**
C. SEASSAU, P. DEBAEKE (INRA Castanet-Tolosan), E. MESTRIES (CETIOM), G. DECHAMP-GUILLAUME (ENSAT)..... 291
- **Study of the rice cultivar resistance to *Pyricularia grisea* in delta Ebro area (Spain)**
E. PLA, M.-M. CATALÀ, N. TOMÀS, M. MARTÍNEZ (IRTA, Espagne), J.-P. MARÍN (Lleida University, Espagne), J. ALMACELLAS (Agricultural Department, Espagne) 301

- **Deciphering the genetic basis of field resistance to blast in European rice varieties to improve breeding for durable resistance**
M.-M. CATALÀ, E. PLA (IRTA, Espagne), R. CARRERES, M.-P. BRETÓ, C. DOMINGO (IVIA, Espagne), D. THARREAU (CIRAD-INRA), M. AGUILAR (CIFA-IFAPA, Espagne), C. BAIXAULI (FUNDACIÓN RURALCAJA, Espagne), L. MARQUÉS (COPSEMAR, Espagne), J.-M. OSCA (UPV, Espagne), P. ARÚS (IRTA, Espagne) 306
- **Méthodes d'évaluation variétale vis-à-vis du phoma du colza : où en sommes-nous ?**
X. PINOCHET (CETIOM), M.-H. BALESDENT, T. ROUXEL (UMR BIOGER INRA AgroParisTech, Grignon), H. BRUN, R. DELOURME (INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes 1) 310
- **Évaluation de la résistance quantitative du tournesol au mildiou (*Plasmopara halstedii*)**
D. TOURVIEILLE de LABROUHE (INRA Clermont-Ferrand), V. GRIMAUULT (GEVES-SNES, Beaucouzé), F. SERRE (INRA Clermont-Ferrand), A. PENAUD (CETIOM), S. PERROT (GEVES-SNES, Beaucouzé), P. WALSER (INRA Clermont-Ferrand), E. MESTRIE (CETIOM) 319
- **Un nouvel indicateur de classement variétal vis-à-vis de la septoriose prenant en compte la précocité variétale**
D. GOUACHE (Arvalis – Institut du Végétal), C. ROBERT (UMR 1091 INRA-AgroParisTech, Grignon) 329
- **Tolérance du blé à la septoriose**
M.-O. BANCAL (AgroParisTech, UMR1091), P. BANCAL (INRA EGC, UMR1091), R. BEN SLIMANE (thèse INRA EGC), P. GATE, D. GOUACHE (Arvalis – Institut du Végétal) 339

POSTERS ÉTUDIANTS

- **Effect of nitrogen and water management on sunflower premature ripening caused by *Phoma macdonaldii***
C. SEASSAU (INRA Castanet-Tolosan), G. DECHAMP-GUILLAUME (ENSAT), E. MESTRIES (CETIOM), P. DEBAEKE (INRA Castanet-Tolosan) 347
- **Sélection de lignées d'orge résistantes à l'agent causal de la strie foliaire (*Pyrenophora graminea*)**
A. LAKEHAL (ENSA, Alger), A. AÏSSAT, L. SAOUDIA (Faculté agro-vétérinaire, Blida, Algérie) 357
- **Mise en place d'un test d'inoculation par le marsonia chez le rosier de jardin**
G. PONTREAU (Agrocampus Ouest Centre d'Angers-INHP), M.-J. JAMMES, J.-P. REYNOIRD (Pépinières et Roseraies George Delbard, Commentry) 361
- **Progression de la septoriose du blé au sein de différents types de cultures sous l'action de la pluie**
C. GIGOT (INRA – AgroParisTech Grignon), S. SAINT-JEAN (AgroParisTech Grignon), L. HUBER, M. LECONTE, L. GERARD, C. DE VALLAVIEILLE-POPE (INRA – AgroParisTech Grignon) 362
- **Mesure de la biomasse fongique *in planta* d'*Alternaria dauci* et description du cycle infectieux en fonction du niveau de résistance de la carotte**
C. BOEDO (INRA/Agrocampus Ouest-INHP/Université d'Angers), R. BERRUYER (UMR GenHort 1259, Agrocampus Ouest-INHP), S. GEORGEAULT (Université d'Angers), S. BERSIHAND (INRA/Agrocampus Ouest-INHP/Université d'Angers), M. CHEVALIER (UMR GenHort 1259, Agrocampus Ouest-INHP), M. BRIARD (UMR GenHort 1259, Agrocampus Ouest-INHP), P. SIMONEAU, P. POUPAR (INRA/Agrocampus Ouest-INHP/Université d'Angers) 369
- **Identification et analyse du polymorphisme de deux homologues putatifs de *NPR1* dans la famille des *vitaceae***
K. BERGEAULT, C. BERTSCH, B. WALTER (Laboratoire Vigne, Biotechnologies & Environnement) 379

**SESSION : OAD/MODÉLISATION
DECISION MAKING TOOLS/MODELLING**

COMMUNICATIONS ORALES

- **Conception et évaluation d'un processus de décision de traitements fongicides contre le mildiou et l'oïdium de la vigne**
L. DELIÈRE, P. CARTOLARO (INRA Villenave d'Ornon), B. LEGER, O. NAUD (Cemagref), A. UGAGLIA (ENITA Bordeaux) 380
- **Modélisation des interactions épidémie – couvert végétal : de la recherche à la mise au point d'outils opérationnels pour la protection intégrée des cultures**
D. GOUACHE (Arvalis – Institut du Végétal), B. ANDRIEU, M.-O. BANCAL, P. BANCAL, M. CHELLE (UMR 1091 INRA-AgroParisTech), C. FOURNIER (UMR 759 INRA-SupAgro, Montpellier), P. GATE (Arvalis – Institut du Végétal), C. ROBERT, B. NEY (UMR 1091 INRA-AgroParisTech)..... 390
- **Évaluation d'un indicateur de risque en tant qu'outil d'aide à la décision d'une protection contre la sclérotiniose du colza**
A. PENAUD, D. WAGNER (CETIOM), D. MAKOWSKI (INRA Grignon), L. RUCK (CETIOM) 400
- **Les outils pour gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre et blé dur**
E. GOURDAIN, F. PIRAUX, B. BARRIER-GUILLOT (Arvalis – Institut du Végétal) 408

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- **Un nouvel indicateur original de l'état des cultures - Utilisation pratique au champ sur culture d'orge de printemps dans les pays de l'Est**
S. GATE (Syngenta Agro SAS), V. MARTINON (FORCE-A) 421
- **Optimisation de la stratégie fongicide anti-*botrytis* après véraison et modélisation de la pourriture grise de la vigne**
M. FERMAUD, J. ROUDET, P. SAURIS, L. DRUELLE, L. DELIÈRE, J.-M. ARMAND (UMR 1065 Santé Végétale INRA-ENITAB), G. BLANC, P. LAGOUARDE (Bayer CropScience France) 427
- **SIPPOM-WOSR, simulator for integrated pathogen population management : un outil d'aide à la conception et à l'évaluation de stratégies durables de contrôle du phoma sur colza d'hiver à l'échelle régionale**
E. LÔ-PELZER (INRA-AgroParisTech), M. BOILLOT (CETIOM), J.-N. AUBERTOT (INRA Castanet-Tolosan), L. BOUSSET (INRA/Agrocampus Ouest), M.-H. JEUFFROY (INRA-AgroParisTech), X. PINOCHET (CETIOM) 437
- **GPM-CAST: an early warning computerized model for grapes powdery mildew in Egypt**
AFIFI, M.-A., SAHAR, A.-M. ZAYAN (Plant Pathology Research Institute, Egypt) 443
- **Le positionnement des traitements fongicides : enjeu pour la septoriose et intérêt du modèle « SeptoLIS »**
D. GOUACHE, G. COULEAUD (Arvalis – Institut du Végétal)..... 455
- **Which air temperature drives epidemiological processes of fungal foliar wheat diseases at leaf scale?**
M. CHELLE (INRA Grignon), S. LIU, B. NEY (AgroParisTech)..... 464
- **Septo3D : un modèle pour analyser les effets de la structure des couverts de blé sur les épidémies de septoriose**
C. ROBERT, B. ANDRIEU (INRA Grignon), C. FOURNIER (INRA Montpellier), D. GOUACHE, P. GATE (Arvalis – Institut du Végétal), B. NEY (INRA Grignon)..... 472
- **Facteurs de rendement du blé tendre : modélisation par les techniques de l'intelligence artificielle**
S. BOUHARATI, D. HARZALLAH, K. BENMAHAMMED (Faculté des Sciences, Algérie)..... 483
- **Helminthosporiose fusiforme du maïs : propositions de seuils d'intervention sur variété sensible**
C. JENN (Coopérative Agricole de Céréales, Colmar), A. WEISSENBERGER (Chambre d'agriculture du Bas-Rhin), E. GAERING (Coopérative Agricole de Céréales, Colmar), J. CASPAR (DRAAF/SRAL Alsace), F. WERSINGER (Coopérative Agricole de Céréales, Colmar) 492

- **Modèle de prévision des risques du mildiou de l'artichaut (*Bremia lactucae*)**
N. MEZENECV (Chambre d'agriculture du Finistère), C. MONOT (Bretagne Biotechnologie Végétale),
J.M. COLLET (CTIFL/CATE)..... 498

POSTERS ÉTUDIANTS

- **Étude d'un modèle climatique de prévision de la nuisibilité de la rouille brune sur blé dur en France**
S. THEPOT (ENSAT), D. GOUACHE (Arvalis – Institut du Végétal)..... 505

SESSION : MÉTHODES ALTERNATIVES ALTERNATIVES METHODS

COMMUNICATIONS ORALES

- **Lutte biologique contre le Cavity Spot de la carotte : Utilisation de l'agent de lutte biologique *Trichoderma atroviride* I-1237**
C. CORDIER (AGRAUXINE SA), C. LUNEAU, J. DUBOIS (SILEBAN) 515
- **Controlling cucumber downy mildew using some Egyptian medicinal plant extracts under field conditions**
M.-A. AFIFI, SAHAR A.-M. ZAYAN (Plant Pathology Research Institute, Egypt)..... 516

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- **Efficacité de stimulateurs de défenses des plantes (BTH et phosphonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversité des pathogènes**
M.-C. DUFOUR, L. DRUELLE, P. SAURIS, G. TARIS, M.-F. CORIO-COSTET (INRA Villenave d'Ornon)..... 526
- **Lutte contre la rouille blanche du chrysanthème**
J. GUERRAND, M. ALJABAL, A. LEBIHAN (Bretagne Biotechnologie Végétale), O. STAPEL (STAPP Bretagne), S. HALLIER (Bretagne Biotechnologie Végétale) 536
- **Intérêt des produits alternatifs face aux maladies des plantes**
S. HALLIER, C. MONOT, M.-C. CARRARA, K. CRADDOCK, J. GUERRAND (Bretagne Biotechnologie Végétale) 546
- **Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* et de *Thymus numidicus* (plantes aromatiques algériennes)**
H. LAOUEUR, F. SAHLI, M. EL KOLLI, M. LAMAMRA, M. M. ZERROUG, D. HARZELLAH (Université de Sétif, Algérie) 556
- **Potentiel of *Olea europaea* leaves and cake and *Salvia officinalis* for controlling soft rot potato tubers**
R. ZAIDI-YAHIAOUI, F. ZAIDI, S. OUANAS, S. MEZIANI ET S. BECHAR (Université de Bejaia, Algérie) 561
- **État sanitaire post-récolte de la mangue commercialisée dans la ville de Dschang et efficacité *in vitro* des huiles essentielles contre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., agent causal de l'antracnose**
J.-F. DJEUGAP, J.-R. KUIATE, D.-A. FONTEM (Université de Dschang, Cameroun) 571
- **Antimicrobial and antioxydant activities of *Artemisia herba alba* Asso. extracts**
R. BELHATTAB, L. AMOR (University Ferhat Abbas, Algérie)..... 579
- **Recherche de bactériocines chez des *Pseudomonas* résistantes aux antibiotiques, isolées de la rhizosphère de la pomme de terre**
S. MEZAACHE, A. GUECHI (Université de Sétif, Algérie)..... 586

POSTERS ÉTUDIANTS

- **Développement d'un produit phytosanitaire contre *Pectobacterium atrosepticum*, bactérie macergène de la pomme de terre : de la recherche de molécules actives à l'application *in situ***
A. CIROU (Comité Nord Plants de pommes de terre), D. FAURE (Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Gif-sur-Yvette) 591
- **Efficacité et sélectivité de quatre phytostimulants contre l'oïdium du rosier**
A. POMMELET (Agrocampus Ouest Centre d'Angers-INHP), O. STAPEL (Station Technique d'Expérimentation des Plantes en Pot de Bretagne) 601
- **Stimulation des défenses naturelles des plantes et stress abiotiques : des interactions pas si défavorables, à exploiter pour sécuriser l'efficacité des SDN !**
B. FAYAUD, E. PAJOT (Valinov) 611

SESSION : RÉSISTANCES AUX FONGICIDES FUNGICIDE RESISTANCE

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- **Sensitivity of *Stemphylium vesicarium* to the most used fungicides to control pear brown spot in Italian orchards**
G. ALBERONI, D. CAVALLINI, M. COLLINA, A. BRUNELLI (University of Bologna, Italy) 612
- **Situation de la résistance de l'oïdium du fraisier (*Podosphaera aphanis*) aux fongicides IDMs en France**
M.-F. CORIO-COSTET, M.-C. DUFOUR, D. BLANCARD (INRA Villenave d'Ornon),
A. SOMBARDIER (Ctifl) 621
- **Résistance de *Plasmopara viticola* aux fongicides QOIs : variabilité et compétitivité**
M.-F. CORIO-COSTET, M.-C. DUFOUR, J. CIGNA, P. ABADIE (INRA Villenave d'Ornon), W.-J. CHEN (Institute of Oceanography, National Taiwan University) 630
- **« Réseau performance » : une 6^{ème} année de diagnostic de la résistance de *Septoria tritici* aux principaux fongicides utilisés en France**
G. COULEAUD, C. MAUMENÉ (Arvalis – Institut du Végétal), A.-S. WALKER,
P. LEROUX (INRA Versailles) 640
- **Mise au point d'outils de q-PCR pour la détection et la quantification des deux groupes génétiques (a, b), de la résistance aux DMIS et aux QOIs chez l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) en France**
M.-C. DUFOUR (INRA Villenave d'Ornon), S. FONTAINE, A. MICOUD (AFSSA), M.-F. CORIO-COSTET (INRA Villenave d'Ornon) 660
- **Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 α -déméthylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity – structural insights from molecular modelling**
A. GLÄTTLI, G. STAMMLER, S. SCHLEHUBER (BASF, Germany) 670
- **La résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne aux fongicides - Résultats des plans de surveillance de la sous direction de la qualité et de la protection des végétaux et du comité interprofessionnel du vin de champagne de 2004 à 2008**
J. GROSMAN (DGAL/SDQPV-DRAAF/SRAL Rhône-Alpes), A. MICOUD, F. REMUSON (AFSSA-URPP, Lyon), M.-L. PANON (CIVC) 682
- **Suivi de l'évolution de la sensibilité aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea* en Gironde, Charente et Midi-Pyrénées**
L. LE COZ, E. TERRIBILE, G. GASTALDI, L. DE BASTARD (Syngenta Agro SAS), P. LEROUX,
A.-S. WALKER (INRA Versailles), G. GIRARD (SRAL Aquitaine), B. BOURGOUIN (SRAL Midi-Pyrénées),
P. RETAUD (SRAL Poitou-Charentes), H. CONSTANT (FREDON Poitou-Charentes), T. COULON (IFV),
L. DAVIDOU (Chambre d'agriculture Aquitaine), P. SAURIS, J. ROUDET (INRA Aquitaine) 692

| | |
|--|-----|
| • Résultats du réseau d'essai de suivi des résistances de la septoriose et de l'oïdium aux fongicides (AFPP) N. LENNE (SRAL-DRAAF Picardie), G. LE HENAFF (CEMAGREF), G. COULEAUD (Arvalis – Institut du Végétal), M. DELOS (SRAL-DRAAF Midi-Pyrénées), A.-S. WALKER (INRA Versailles), A. MICOUD (AFSSA) | 702 |
| • État de la résistance aux fongicides au sein des populations fongiques françaises responsables de la fusariose des céréales P. LEROUX, A.-S. WALKER (INRA Versailles) | 711 |
| • Les fongicides affectant les processus respiratoires : modes d'action et phénomènes de résistance P. LEROUX, A.-S. WALKER (INRA Versailles) | 721 |
| • La résistance aux fongicides de type MDR (MultiDrug Resistance) chez les champignons phytopathogènes : mythe ou réalité ? P. LEROUX, A.-S. WALKER (INRA Versailles) | 740 |
| • La résistance du mildiou de la vigne aux fongicides : résultats des plans de surveillance de la sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux de 2005 à 2008 C. MAGNIEN (DRAAF-SRAL Bourgogne), A. MICOUD, F. REMUSON (AFSSA-URPP, Lyon), J. GROSMAN (DGAL/SDQPV-DRAAF/SRAL Rhône-Alpes) | 750 |
| • « Réseau performance orges » : état de la résistance de l'helminthosporiose de l'orge aux strobilurines et impact sur l'efficacité en pratique C. MAUMENÉ, G. COULEAUD, J.-Y. MAUFRAS (Arvalis – Institut du Végétal)..... | 761 |
| • Résistance de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> aux fongicides utilisés sur colza : bilan de la surveillance du territoire de 2000 à 2008 J. MOINARD (DRAAF-SRAL Midi-Pyrénées), P. LEROUX (INRA Versailles), A. PENAUD (CETIOM), F. REMUSON (AFSSA-URPP, Lyon), A.-S. WALKER (INRA Versailles), A. MICOUD (AFSSA-URPP, Lyon), B. HUGUET (DRIAAF-SRAL Ile-de-France) | 771 |
| • Détermination de l'efficacité préventive et curative du prothioconazole sur des génotypes de <i>Mycosphaerella graminicola</i> résistants aux inhibiteurs de la 14α-déméthylation des stérols J. SANSSÉNÉ, C. ROISIN-FICHTER, L. DJERROUD, S. SELIM (Institut Polytechnique LaSalle Beauvais)..... | 781 |

**SESSION : NOUVELLES MOLÉCULES/NOUVEAUX USAGES
NEW ACTIVE SUBSTANCES/NEW USES**

COMMUNICATIONS ORALES

| | |
|---|-----|
| • Cyflufenamid, a new compound for control of powdery mildew in grape L. HULIN, G. ROUAS (Certis Europe B.V.), H. BUSCHHAUS (Nisso Chemical Europe GmbH, Germany)..... | 791 |
| • BAS 650F : caractérisation d'une molécule issue d'une nouvelle famille chimique pour la lutte contre les oomycètes C. AUMONT, C. GAUTHIER, A. COUSIN, S. FRITZ-PIOU, P.-A. LARDIER, Y. MORVAN (BASF).. | 796 |
| • Intérêt d'une nouvelle association codée BCSV 750 F dans le raisonnement des stratégies de lutte anti-oïdium vigne O. LE MOINE, F. LHEUREUX, P. LAGOUARDE, C. BARREAU, G. BLANC, S. SAUZAY (Bayer CropScience France)..... | 805 |
| • PHF0707 : un nouveau fongicide polyvalent en cultures légumières S. ROUMANILLE (Philagro France), Interlocuteur Bayer CropScience France | 816 |
| • PHF0708 : un nouveau fongicide anti-mildiou en cultures légumières S. ROUMANILLE (Philagro France), Interlocuteur Bayer CropScience France | 825 |
| • NC 224, nouveau fongicide anti-mildiou de la pomme de terre P. ARMENGAUD, Y. BESNARD (Philagro France)..... | 833 |
| • The development of seed treatment products based on the new fungicide ipconazole M.-J. TOMKINS, T. ARCHER, S.-J. MAUDE, K. LITTLEWOOD (Chemtura Europe Ltd, UK)..... | 843 |

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- **Impact d'un adjuvant à base d'alcools terpéniques issus du pin associé à une triazole sur la production de fusariotoxines**
F. GIRAUD, A. QUERRIOUX, M. RAMOS (Action Pin) 849
- **Action d'une formulation associant soufre et composés terpéniques sur l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) à différents stades de son développement**
F. GIRAUD, A. QUERRIOUX, M. RAMOS (Action Pin) 856
- **PHF0714, un nouveau fongicide pour le traitement des plants de pomme de terre**
S. ROUMANILLE (Philagro France) 863
- **PHF0810, nouveau fongicide anti-mildiou de la vigne**
P. ARMENGAUD (Philagro France) 868
- **PHF0811, nouveau fongicide anti-mildiou de la vigne**
P. ARMENGAUD (Philagro France) 876
- **Results of two-years experimental trials with natural products against *Plasmopara viticola* in organic viticulture**
A. LA TORRE, S. TALOCCI, L. PINTO (CRA – Plant Pathology Research Center, Italy) 885
- **MILDICUT : une innovation dans la protection de la vigne contre le mildiou**
É. CHANTELOT (Belchim Crop Protection), T. BERNARD (ISK Biosciences Europe) 895

**LA FUSARIOSE DES ÉPIS DU BLÉ : EFFET DES PRATIQUES AGRONOMIQUES
SUR LA RÉPARTITION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES ET
CONSÉQUENCES SUR LA QUALITÉ SANITAIRE**

P. DUBOURNET, G. CURE, G. CHANCRIN, Y. COCHET.
Bayer CropScience France, 16, rue Jean-Marie Leclair, 69009 LYON, France

RÉSUMÉ

Au travers du plan de surveillance fusariose et mycotoxines, une mesure quantitative des différents pathogènes en présence dans les grains à la récolte, ainsi que du déoxynivalénol (DON) est assurée. A situation climatique équivalente, la proportion relative des espèces présentes sur les grains (*F. graminearum* et *Microdochium spp.*, majoritaires en 2007 et 2008) varie en fonction des situations agronomiques, en particulier en fonction du précédent cultural et du travail du sol. La présence au sol de résidus de culture hôte de *F. graminearum* conduira systématiquement une plus forte proportion de ce champignon sur l'épi et par conséquent une augmentation de la quantité de DON. A l'inverse, la gestion des résidus au sol (rotation, labour) limitera le développement de ce pathogène parfois au profit d'autres espèces. Aussi, au-delà du risque climatique, l'anticipation du risque de développement de *F. graminearum* doit passer par une prise en compte de l'interaction précédent cultural, travail du sol et variété.

Mots-clés : Céréales, *Fusarium spp.*, DON, gestion agronomique, mycotoxines

SUMMARY

**FUSARIUM HEAD BLIGHT: IMPACT OF AGRONOMY ON PATHOGEN SPECIES
REPARTITION AND ITS CONSEQUENCES ON GRAIN QUALITY**

Through the Fusarium head blight and mycotoxin monitoring, a quantitative measurement of the different pathogens present on the grains, and the analysis of deoxynivalenol (DON) is conducted. For the same climatic conditions, the relative proportion of the species (*F. graminearum* and *Microdochium spp.* mainly represented in 2007 and 2008) varied according to agronomy, and especially according to previous crop and soil preparation: residues of crop, host of *F. graminearum* will systematically lead to a highest proportion of this fungus on the ear, and thus to an increased amount of DON. On the contrary, soil crop residues management (rotation, tillage) will limit the pathogen development sometimes in favor of other species. As a conclusion, beside climatic risk, the risk development of *F. graminearum* must be anticipated through the consideration of the interaction between previous crop, soil preparation and variety choice.

Key words: cereal, *Fusarium spp.*, DON, agronomical management, mycotoxins

INTRODUCTION

La fusariose des épis est liée à la présence de plusieurs espèces de champignons appartenant aux genres *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* Au-delà des pertes de rendement, une attaque de fusariose des épis déprécie la qualité de la récolte à plusieurs niveaux : qualité technologique (faculté germinative,...) et qualité sanitaire par la présence de mycotoxines.

Le plan de surveillance des espèces de fusariose de l'épi du blé tendre et du blé dur conduit par Bayer CropScience depuis 1997 montre que les genres *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* sont largement représentés sur le territoire national. Parmi la dizaine d'espèces identifiées, les plus fréquemment rencontrées sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. poae* et *Microdochium spp.* La présence de fusariose des épis, ainsi que la proportion de chaque espèce de *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* est très variable d'une année à l'autre et concerne l'ensemble du territoire national avec un gradient entre les régions Nord et Sud. Le développement de cette maladie est très fortement dépendant des conditions environnementales, au premier rang desquelles le climat joue un rôle majeur dans l'explication des différences pluriannuelles d'intensité de la fusariose.

A situation climatique similaire, la proportion relative des différents pathogènes est variable, semblant indiquer que les facteurs agronomiques ont un rôle à jouer dans la répartition des espèces. Dans une étude précédente (Dubournet et al. 2006), les interactions entre deux agents pathogènes (*F. tricinctum* et *F. graminearum*) avaient été montrées. Ces deux espèces semblent se développer sur l'épi en des quantités inversement proportionnelles.

Aussi, les données disponibles sur blé tendre d'hiver seront analysées à l'échelle pluriannuelle, à l'échelle d'années à forte pression fusariose, et enfin à l'échelle d'années à faible pression, afin d'identifier l'influence des facteurs agronomiques sur la répartition des espèces majoritaires de *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* et par conséquent sur la production de DON. L'effet du précédent cultural, du travail du sol et l'effet variétal seront étudiés isolément, puis les interactions entre les différents facteurs seront examinées.

MATERIEL ET MÉTHODE

ECHANTILLONNAGE

Le plan de surveillance de la fusariose et mycotoxines mis en place par Bayer CropScience a permis la constitution d'une base de données regroupant plus de 5000 parcelles. Chaque année, l'étude expérimentale sur la fusariose de l'épi concerne environ 500 parcelles agriculteurs, non traitées à la floraison et réparties sur l'ensemble du territoire national. Ces parcelles, sélectionnées sans critère prédéfini, assurent une bonne représentativité des situations agronomiques rencontrées dans les différents bassins céréaliers. Un questionnaire sur la conduite culturale et les principales données agronomiques de la parcelle est renseigné. Pour chacune de ces parcelles, un prélèvement de 100 à 200 épis est effectué à la maturité de la culture. Par la suite, chaque échantillon est battu avec la même batteuse. Cette batteuse assure un battage de type agricole, c'est-à-dire élimine les petits grains très fusariés qui n'auraient pas été retenus par une batteuse au champ. Cela évite ainsi une surestimation de la maladie et des mycotoxines. Les échantillons de grains sont ensuite envoyés à deux laboratoires, pour la réalisation des analyses mycologiques d'une part, et pour une analyse de leur contenu en Déoxynivalénol (DON), d'autre part.

ANALYSE MYCOLOGIQUE DU BLE

L'analyse mycologique est réalisée par l'Ecole Supérieure de Microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest (ESMISAB). Les différentes espèces de *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* sont identifiées par étude morphologique des thalles et des spores sous microscope sur 20 grains sans désinfection, et sur 20 grains avec désinfection.

La désinfection superficielle à l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) est utilisée pour éliminer les pollutions qui perturbent l'analyse (spores en surface ou fusarioses non développées sur les téguments, le sillon et la brosse, ainsi que les saprophytes). Cette désinfection permet de mieux déterminer certaines espèces et en particulier *Microdochium spp.* Chaque lot de 20 grains de blé est déposé en boîte de Pétri à raison de 5 grains par boîte sur milieu gélosé à base de Potato Dextrose Agar et d'antibiotiques pour stopper le développement des bactéries. Pour l'ensemble des espèces, et pour chaque espèce isolément, le dénombrement des thalles permet de mesurer le taux d'infestation.

Les espèces recherchées sont : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. arthrosporioides*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* et *Microdochium spp.*, ainsi que leurs formes sexuées respectives, lorsqu'elles sont connues.

ANALYSES DE DON

Ces analyses sont effectuées par le laboratoire de suivi de la qualité de Champagnes Céréales sur les grains non désinfectés par la technologie ELISA. (Limite de détection 220 ppb).

PRESENTATION DES RESULTATS

Les effectifs sont indiqués sur chaque tableau ou figure, sauf mention contraire, les résultats des analyses mycologiques sont issus des études avec désinfection superficielle. Les valeurs de DON sont représentées par les extrêmes, les quartiles et la médiane.

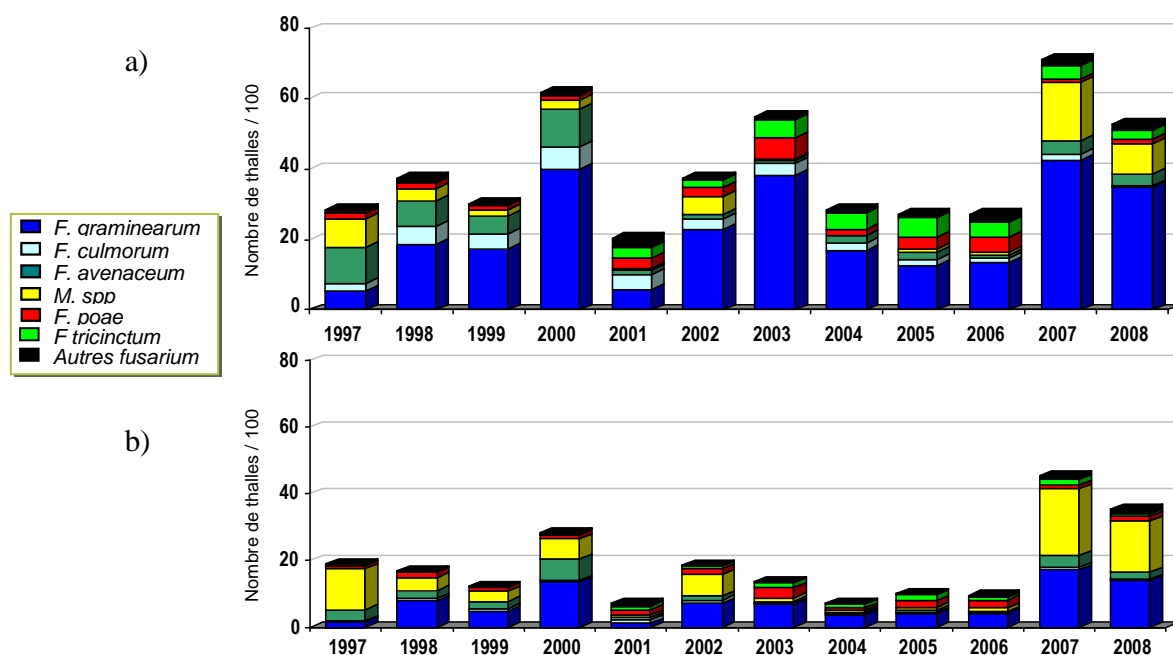
RESULTATS ET DISCUSSIONS

CARTOGRAPHIE PLURIANNUELLE DE LA FUSARIOSE DES EPIS

La figure 1 ci-dessous montre la variation annuelle du taux de grains contaminés avec et sans désinfection superficielle ainsi que la répartition des différentes espèces.

Cette figure illustre la prédominance régulière de *F. graminearum*. Or celui-ci a un fort potentiel de production de trichothécènes de type B : déoxynivalénol (DON), nivalénol (NIV) et zéaralénone.

Figure 1 : répartition pluriannuelle des populations responsables de la fusariose, étude mycologique sans désinfection superficielle (a) et avec désinfection superficielle (b).
Annual distribution of Fusarium species, total contamination (without surface sterilization) and internal contamination (after surface sterilization).



Inversement, la présence de *Microdochium spp* est très irrégulière : pratiquement absent de 2003 à 2006, sa présence est significative en 2007 et 2008. L'étude mycologique avec désinfection superficielle révèle, pour ces deux années, la forte pénétration de *Microdochium spp.* et *F. graminearum* dans le grain.

EFFET DU PRECEDENT

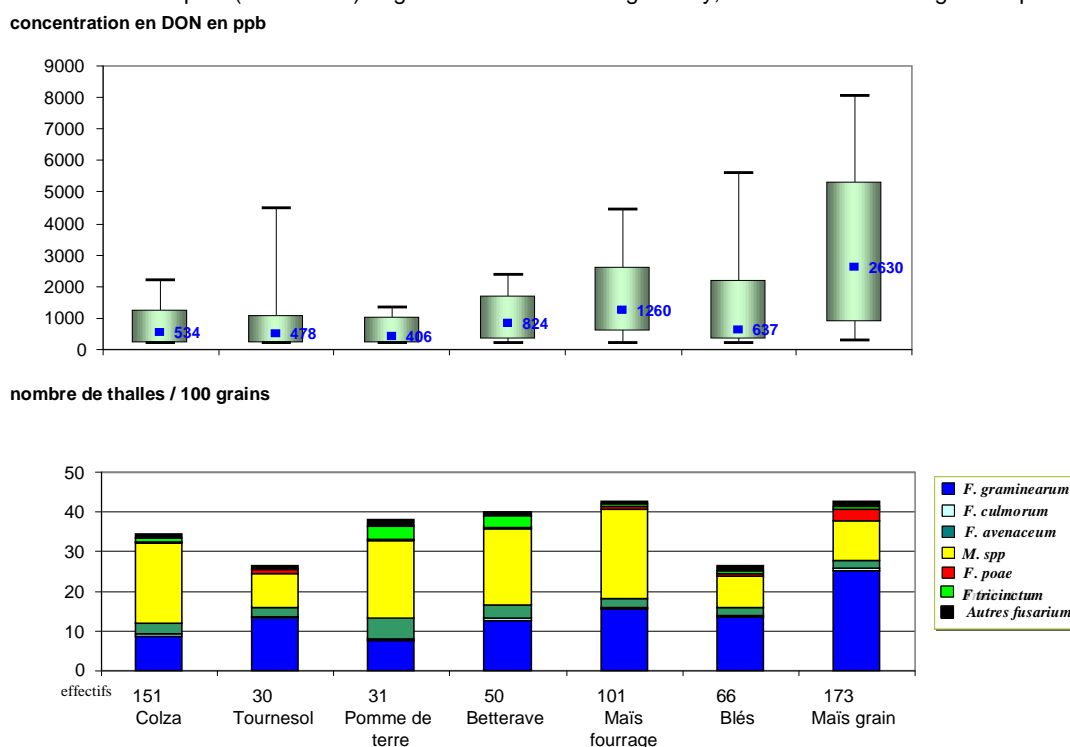
L'effet du précédent sur le développement des différentes espèces de *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* ainsi que sur la quantité de DON correspondante a été étudié en situation de forte pression de maladie (2007-2008) et en situation de faible pression de maladie (2004 à 2006).

Années 2007 et 2008 : conditions climatiques favorables à la fusariose des épis

Les données (figure 2) montrent que la proportion des espèces entre elles varie selon le type de précédent.

Le maïs grain est connu pour être hôte de *F. graminearum*. Ces résultats confirment que ce précédent favorise plus le développement de cette espèce.

Figure 2 : Années 2007 et 2008 – répartition des espèces responsables de la fusariose en fonction du précédent (étude mycologique en bas), concentration en DON en fonction du précédent (en haut). Comparison between percentage of *Fusarium* infected grains and DON concentration in untreated samples (2007-2008) originated from monitoring survey, distribution according to the previous crop



Il semble important de faire la distinction entre le maïs grain et le maïs fourrage, récolté plus tôt en saison et laissant moins de débris de végétation sur la parcelle. En effet, la proportion de *F. graminearum* est moins élevée suite à un précédent maïs fourrage que sur un précédent maïs grain. A contrario, la quantité de grains fusariés est équivalente pour ces deux précédents : ainsi, c'est bien le climat qui prévaut sur l'intensité de la fusariose et de *M. spp* en particulier. La proportion des espèces présentes varie ensuite en fonction de la présence d'inoculum de *F. graminearum*.

Cet effet climatique est également illustré par les précédents betteraves et pommes de terre, pour lesquels l'intensité de fusariose est élevée, mais avec des proportions relatives de

F. graminearum faibles par rapport à *Microdochium spp.* Cette intensité de maladie est à rapprocher des conditions climatiques des régions où ces cultures sont implantées (nord de la France), globalement plus favorables à la fusariose.

De la même façon, le précédent blé, également hôte de *F. graminearum*, induit une proportion de cette espèce plus importante, en comparaison aux autres précédents non hôtes.

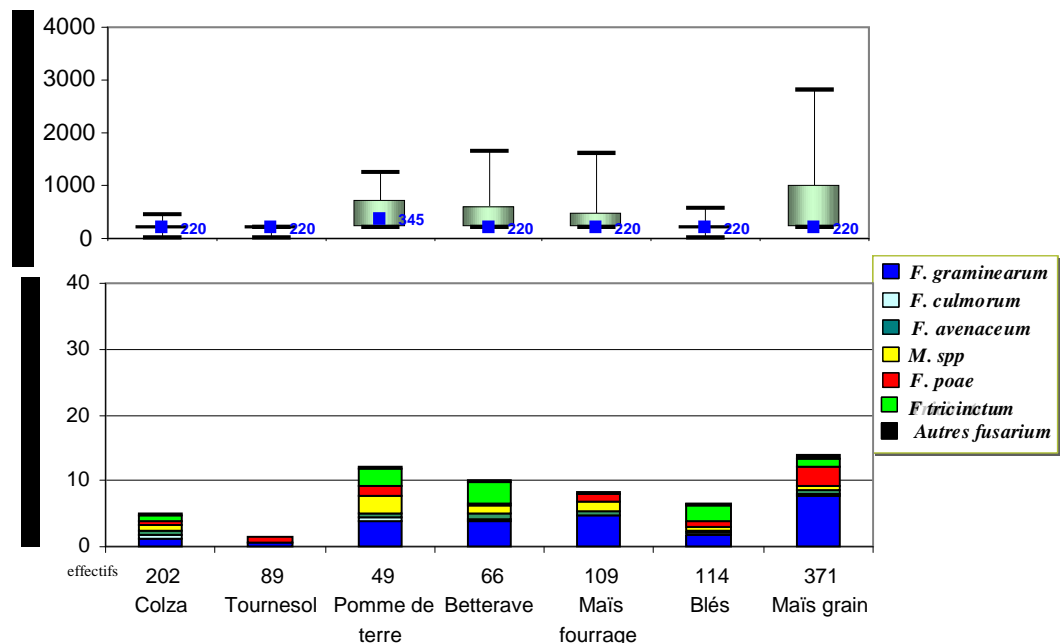
Ainsi, en condition de forte pression de maladie, et dans des années où les deux espèces *F. graminearum* et *Microdochium spp.* dominent, l'influence directe du précédent sera plus visible sur la proportion des deux espèces que sur l'intensité de maladie, très dépendante du climat.

Les analyses de DON indiquent que les précédents favorables à *F. graminearum* (maïs grain et blés) induisent des teneurs en DON élevées par rapport aux autres précédents, en lien avec la proportion de *F. graminearum*.

Années 2004 à 2006 : conditions climatiques peu favorables à la fusariose des épis

Les trois campagnes céréalières se caractérisent par des attaques faibles où cohabitent les différentes espèces. *F. graminearum* reste le plus présent et *Microdochium spp.* pratiquement absent (figure 3). Si le précédent maïs grain a semblé là encore induire la proportion la plus importante de *F. graminearum*, il est notable que le précédent, seul, ne suffit pas à provoquer la maladie, et que ce sont bien les conditions climatiques qui sont le premier facteur d'explication de l'intensité de la maladie. A faible présence des producteurs de mycotoxines coïncident des niveaux faibles de DON. Les médianes sont proches des limites de la quantification.

Figure 3 : Années 2004 à 2006 - répartition des espèces responsables de la fusariose en fonction du précédent (étude mycologique en bas), concentration en DON en fonction du précédent (en haut). Comparison between percentage of Fusarium infected grains and DON concentration in untreated samples (2004-2006) originated from monitoring survey, distribution according to the previous crop.



EFFET DU TRAVAIL DU SOL

Années 2007 et 2008 : conditions climatiques favorables à la fusariose de l'épi

Les données ont été réparties en trois groupes : semis direct, travail superficiel (5 à 10 cm de sol travaillé) et labour (retournement). La proportion des différentes espèces pathogènes, ainsi que les concentrations de DON correspondantes ont été mesurées pour ces trois groupes (figure 4).

Le pourcentage de grains fusariés est globalement peu impacté par le travail du sol. Par contre, la proportion des espèces entre elles semble influencée par le travail du sol. Un semis direct et en moindre mesure, un travail superficiel du sol, favorise le développement de *F. graminearum*. A l'inverse, un labour tend à limiter le développement de *F. graminearum*, au profit du développement de *Microdochium spp.*

Là encore, les quantités de DON mesurées sont proportionnelles à la fréquence de *F. graminearum*, et donc favorisées par les semis directs.

Figure 4 : Années 2007 et 2008 ; répartition des espèces responsables de la fusariose en fonction du travail du sol (étude mycologique en bas), concentration en DON en fonction du précédent (en haut).

Years 2007 and 2008 ; relative proportion of the *fusarium* species and DON in relation with soil preparation

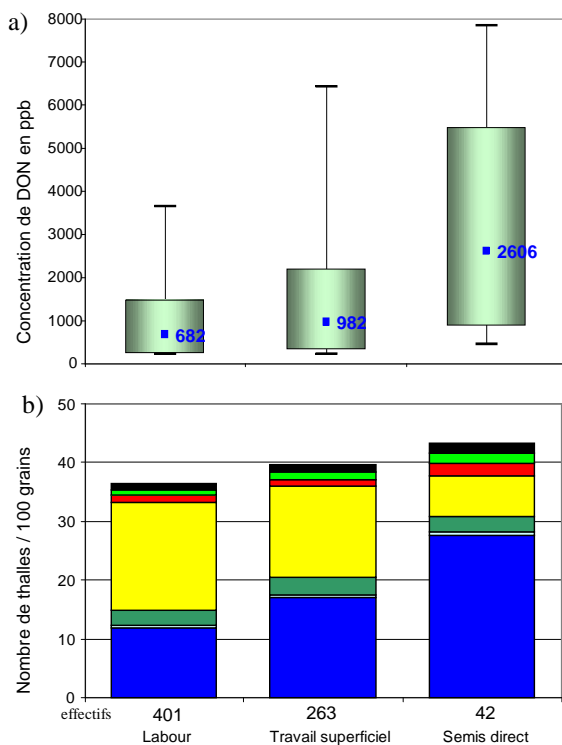
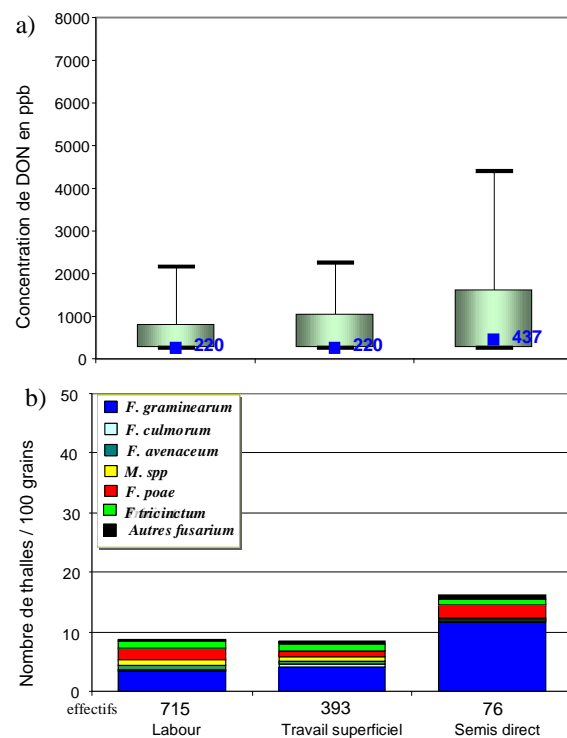


Figure 5 : Années 2004 à 2006 ; répartition des espèces responsables de la fusariose en fonction du travail du sol (étude mycologique en bas), concentration en DON en fonction du précédent (en haut).

Years 2007 and 2008 ; relative proportion of the *fusarium* species and DON in relation with soil preparation



Années 2004 et 2006 : conditions climatiques peu favorables à la fusariose des épis

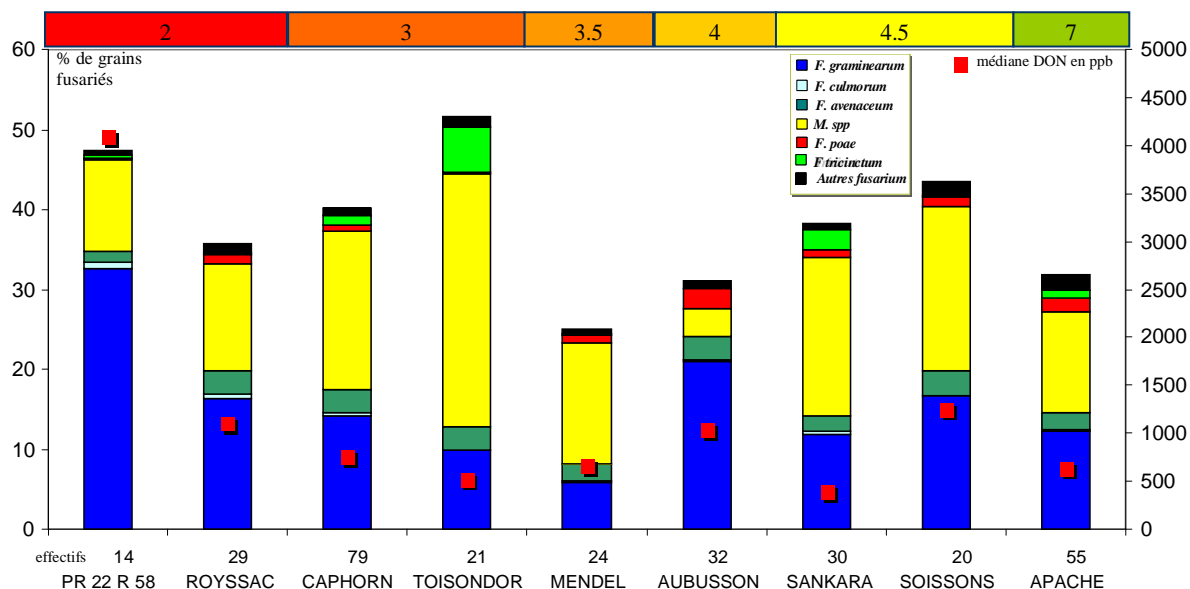
Comme pour les années à forte pression de maladie, les analyses mycologiques indiquent une présence plus marquée de *F. graminearum* après un semis direct (figure 5). La présence de DON est là encore bien corrélée à la présence du champignon.

EFFET DE LA VARIETE

Nous avons classé les variétés en fonction de la note GEVES - Arvalis de sensibilité à la fusariose (la note 2 indique une grande sensibilité, la note 7 une tolérance aux attaques de fusariose), pour les deux années de forte infestation, 2007 et 2008. Comme le montre la figure 6, l'effet variétal ne semble pas, sur la globalité des résultats, avoir seul, autant d'influence que

le précédent et le travail du sol. Nous n'observons pas de corrélation directe entre les notes GEVES – Arvalis (résistance variétale) et l'intensité de maladie ou la répartition des différentes espèces.

Figure 6 : Répartition des espèces responsables de la fusariose en fonction de la variété (note GEVES - Arvalis), Étude mycologique, années 2007 et 2008
Years 2007 and 2008 ; relative proportion of the *fusarium* species in relation with varieties



De la même façon, la relation entre les quantités de DON produites et le classement variétal ne suit pas l'échelle de notation GEVES - Arvalis.

Aussi, l'effet variété sera à observer au travers de ses interactions avec les autres facteurs.

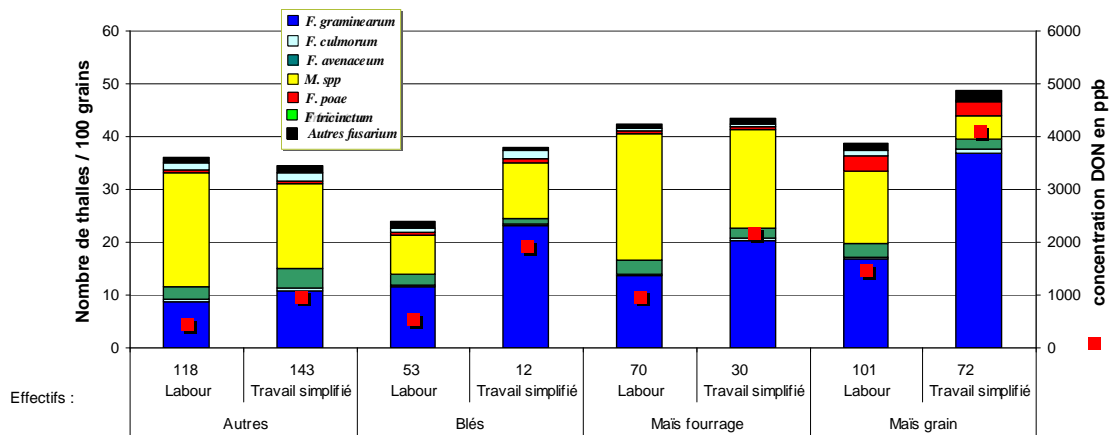
En situation de faible pression parasitaire, le facteur variétal n'apparaît pas comme pertinent et doit être étudié, là encore, en interaction avec d'autres facteurs.

INTERACTION PRECEDENT CULTURAL ET TRAVAIL DU SOL

Cette interaction a été étudiée pour les deux années 2007 et 2008. Afin de conserver un échantillonnage suffisant, les précédents non hôtes de *F. graminearum* ont été regroupés sous l'intitulé « autres »: colza, betterave, pomme de terre et tournesol. Pour les mêmes raisons, semis direct et travail superficiel ont été regroupés dans une rubrique nommée « travail simplifié ».

Figure 6 : Effet de l'interaction travail du sol / précédent sur les proportions des principales espèces et impact sur la concentration en DON – années 2007 et 2008.

Years 2007 and 2008 ; Fusarium species and DON distribution according to the previous crop and soil preparation.



Le labour semble diminuer les teneurs en DON, quelque soit le précédent (figure 6). On observe en effet une diminution de la proportion de *F. graminearum* et par conséquent de la production de DON. Cet effet est d'autant plus visible que le précédent est hôte de *F. graminearum* : le labour limite fortement l'impact d'un précédent maïs grain. Ceci se vérifie moins pour les précédents de la catégorie « autre ».

Il semble donc que le labour joue un rôle majeur dans la réduction de la quantité d'inoculum présent sur le sol, lorsque le précédent est favorable à la fusariose. *Microdochium spp* est présent dans toutes les situations et son développement est favorisé dès lors que la pression de *F. graminearum* est plus faible.

INTERACTION PRECEDENT CULTURAL, VARIETE ET TRAVAIL DU SOL

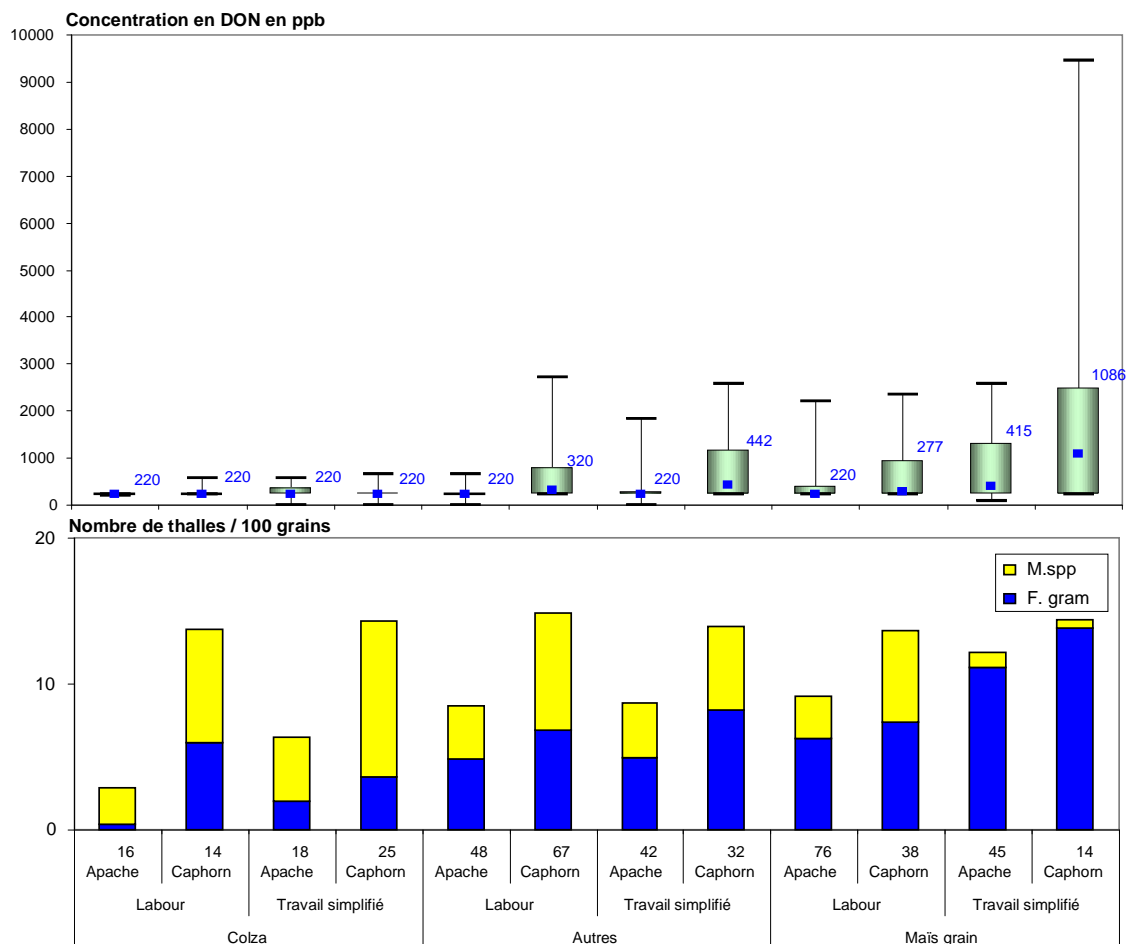
La complexité de cette interaction et le risque de ne pas disposer d'effectif suffisant nous a conduit à regrouper toutes les années pour lesquelles nous disposions des analyses DON (2000-2001, 2004 à 2008) et à choisir deux variétés, une sensible à la fusariose (Caphorn) et l'autre dite tolérante (Apache). Pour ces deux variétés les effectifs disponibles sont plus importants.

Les précédents culturaux comparés sont le maïs grain (extrême favorable au développement de *F. graminearum*), le colza (neutre sur cette espèce) et les autres précédents ont été rassemblés dans la catégorie « autres ». De même, le travail du sol a été séparé en deux groupes, le labour d'une part, et le « travail simplifié », incluant semis direct et travail superficiel d'autre part.

Les résultats sont présentés uniquement pour les deux principales espèces étudiées, à savoir *F. graminearum* et *Microdochium spp*. (figure 7)

Figure 7 : Effet de l'interaction précédent / travail du sol / variété sur la répartition de *F. graminearum* et *M. spp.*

Fusarium species and DON distribution according to the previous crop/soil preparation and varieties.



A situation agronomique comparable, l'effet de la sensibilité variétale est toujours visible. Ainsi, cela confirme la fiabilité des classements variétaux (pour les variétés majeures), établis dans des situations où les facteurs pédo-climatiques sont semblables. En situation de précédents à risque, la variété Apache se distingue par une plus grande résistance à l'accumulation de DON et confirme bien sa note de sensibilité. En parallèle, sur les précédents à risque la note de sensibilité du Caphorn est justifiée, même si les différences de sensibilité variétale s'estompent en situation de faible risque maladie, pour ce qui est de l'accumulation de DON.

En situation agronomique à risque (maïs grain et travail simplifié) la part de *F.graminearum* est prépondérante. L'utilisation d'une variété moins sensible et le labour permet de diminuer la pression mais peut cependant favoriser l'installation de *Microdochium spp.*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les années 2007 et 2008 favorables au développement de la fusariose, montrent que les facteurs agronomiques ont une influence non négligeable sur la répartition des différentes espèces de pathogènes.

Le développement privilégié de *F. graminearum*, et par conséquent la production de DON, sont intimement liés à la présence d'inoculum au sol, provenant d'un précédent cultural hôte du pathogène (maïs, blé), et limité ou non par un travail du sol efficace. Au-delà de la gestion de l'inoculum, le choix d'une variété peu sensible à la fusariose, permet également de réduire les quantités de mycotoxines produites.

Aussi, pour assurer une gestion du risque de développement des mycotoxines, le levier agronomique ne doit pas être négligé et doit être anticipé avant la mise en place de la culture.

En revanche, la gestion du risque de développement des *Fusarium* producteurs de DON ne garanti par pour autant la gestion de l'impact de la fusariose, la baisse de la proportion de ces pathogènes semblant favoriser l'installation d'autres espèces, comme *Microdochium spp.* très présent en 2007 et 2008.

La gestion de la fusariose de l'épi passera donc par un compromis entre une gestion agronomique (rotations, travail du sol, choix variétal...) qui a ses limites en terme de faisabilité technico-économique, et la protection fongicide, qui doit là encore être raisonnée en fonction des espèces en présence. L'utilisation d'Outils d'Aides à la Décision, à la fois agronomiques et épidémiologiques devrait permettre une meilleure stratégie de lutte contre la maladie, pour optimiser la qualité du grain.

Les recherches se portent désormais sur le développement d'outils moléculaires, qui devraient à la fois aider à la quantification des espèces dans le grain, et contribuer en relation avec l'épidémiologie, à une meilleure connaissance des règles qui régissent le développement de la fusariose et de l'expression de leur toxinogénèse.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Dubournet et al. 2006 : Les fusarioses des épis de blé : principaux enseignements du plan de surveillance de Bayer CropScience, AFPP, 8^{ème} CIMA

**FUSARIOSE DES ÉPIS DE MAÏS :
INTERACTIONS ENTRE *FUSARIUM GRAMINEARUM* ET *F. VERTICILLIOIDES***

D. CARON*, L. MEYER ET A. PICOT
ARVALIS Institut du végétal,

* :6 ch. Côte Vieille, 31450 Baziège, FRANCE, d.caron@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

La fusariose sur les épis de maïs a présenté des phénomènes d'interaction entre *Fusarium graminearum* et *Fusarium verticillioides* dans les essais en inoculation artificielle.

Le niveau de développement de la fusariose des épis par *F. verticillioides* s'est trouvé nettement accru en présence de *F. graminearum*, même si la quantité de *F. verticillioides* est faible au départ. D'autre part, les mycotoxines produites par ces deux champignons sont modulées de façon importante. Le DON est le plus souvent sévèrement diminué dans les grains. Les fumonisines (B1 et B2) quant à elles, sont le plus souvent très fortement augmentées. Il peut y avoir des différences en fonction de l'apport d'inoculum conjoint ou différé de *F. verticillioides* par rapport à *F. graminearum*.

Mots-clés : Maïs, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, mycotoxines, interactions.

SUMMARY

IMPORTANCE AND MANAGEMENT OF *RAMULARIA COLLO-CYGNII* IN FRANCE

Fusarium ear rot on corn presented interactions between *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated trials. The level of development of *Fusarium* ear rot of corn by *F. verticillioides* was found significantly increased in the presence of *F. graminearum*, although the amount of *F. verticillioides* is initially low. Moreover, mycotoxins produced by these two fungi are modulated significantly. DON is most often severely decreased in the grains. Fumonisin (B1 and B2) for their part are most often strongly increased. There may be differences depending on the joint or delayed inoculation of *F. verticillioides* and *F. graminearum*.

Key words: Corn, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, mycotoxins, interactions.

INTRODUCTION

La fusariose des épis est une maladie commune du maïs. Bien que de nombreuses espèces puissent occasionnellement être incriminées (Scauflaire *et al.* 2007), elle est principalement causée par deux types de *Fusarium* (Reyneri et Blandino 2003, Délos *et al.* 2006) produisant des mycotoxines réglementées : *F. graminearum* Schwabe (téléomorphe: *Gibberella zeae* Schwein (Petch)) de la section *discolor* et par 3 *mating types* du complexe *Gibberella fujikoro*i de la section *liseola* dont l'anamorphe *F. verticillio*ides est la principale espèce en France. Anciennement cette espèce était dénommée *F. moniliforme*. Cette dénomination est actuellement abandonnée car par avancée de la taxonomie et par difficulté de reconnaissance au microscope, elle était souvent confondue dans les publications avec les 2 autres espèces anamorphes du complexe : *F. proliferatum*, qui produit des microconidies en plus courtes chaînes et *F. subglutinans* qui produit des microconidies en fausses têtes (Leslie *et al.* 2006).

F. graminearum est parasite d'un grand nombre de céréales et d'autres plantes dont le maïs et le blé, qui se succèdent parfois sur la même parcelle, assurant ainsi sa continuité, comme pour les monocultures de maïs. Cet agent pathogène est capable d'attaquer aussi bien les racines et les tiges que les épis. Sa survie hivernale se fait sur les résidus de culture (Nyvall et Kommedahl, 1970; Sutton, 1982; Munkvold 2003, Caron *et al.* 2006) ou dans le sol. La dissémination de l'inoculum et la pollution des épis se font principalement par voie aérienne à l'intérieur de la végétation, avec les ascospores produites à la base de la culture, dans les périthèces développés sur les résidus des cultures précédentes (Francl *et al.* 1999, Paulitz *et al.* 1999, Bergstrom et Shields 2002; Munkvold 2003, Caron *et al.* 2006,).

*F. verticillio*ides comme *F. proliferatum* et *F. subglutinans* sont des parasites très nettement plus fréquents sur maïs mais que l'on peut aussi rencontrer sur d'autres cultures. Comme pour *F. graminearum*, ils sont capables d'attaquer les racines et les tiges. Le champignon est même souvent détecté sans symptômes dans les plantes (Munkvold et Desjardins 1997). L'inoculum est aussi conservé et produit principalement sur les résidus de culture et dans le sol (Nyvall et Kommedahl 1968, Munkvold 2003). La dissémination de l'inoculum et la pollution des épis se produisent principalement par les importantes bouffées aériennes des très nombreuses microconidies poudreuses (Ooka et Kommedahl 1977, Gillette 1999, Munkvold 2003).

La contamination de *F. graminearum* se fait principalement par la voie du canal des soies au sommet de l'épi. L'épi de maïs est sensible dans les 6 jours après le début de la sortie des soies avec un maximum à 4 jours lorsqu'elles sont encore vertes et évolue très rapidement ensuite vers de l'insensibilité (Reid et Hamilton 1996, Munkvold 2003). La voie des blessures par les insectes foreurs ou par la grêle est mineure pour cet agent pathogène.

En ce qui concerne *F. verticillio*ides, il est clair que les blessures de l'épi sont une voie d'entrée ou d'expression majeure du parasite. Les chenilles des insectes foreurs tels que la pyrale ou la sésamie par les blessures qu'elles provoquent en traversant les spathes puis au cours de leur cheminement le long des blessures de nutrition favorisent l'agent pathogène (Munkvold *et al.* 1997; Sobek et Munkvold 1999, Avantaggiato *et al.* 2003, Munkvold 2003, Alma *et al.* 2005). Mais, hormis ces blessures, les soies sont aussi une voie de pénétration de la maladie. Cette voie peut être utilisée comme avec *F. graminearum* pour les inoculations artificielles. Toutefois, le stade de sensibilité optimum y est décalé par rapport à celui de *F. graminearum*. Il est admis par Reid *et al.* en 1999 en s'appuyant sur Headrick *et al.* (1990) et Headrick et Pataki (1991) qu'il faut des soies succulentes âgées de moins de 8 à 10 jours pour l'infection avec *F. graminearum* alors que la colonisation par *F. moniliforme* est plus fréquente après le début de la sénescence des soies. Ces derniers auteurs constatent même que les soies vertes ont plutôt tendance à inhiber la contamination par *F. moniliforme*. Reid et Zhu (2005) pour s'approcher de ces 2 conditions adoptent donc par le canal des soies une inoculation artificielle entre 4 et 7 jours où les soies encore en élévation commencent à présenter un certain brunissement des extrémités sans être desséchées.

Ces 2 agents pathogènes se retrouvent fréquemment ensemble sur les épis. Des effets d'interaction ont été observés. Reid *et al.* (1999), dans des inoculations artificielles par le canal des soies, ont obtenu une croissance plus importante de *F. moniliforme* en présence de *F. graminearum*, que lorsqu'il était inoculé seul. De plus, en 1994 alors que *F. graminearum* s'est peu développé, ils ont même observé une croissance de *F. moniliforme* supérieure à celle de

F. graminearum dans les inoculations artificielles en *F. graminearum*. Le *F. moniliforme*, s'était moins développé lorsqu'il était inoculé seul ou en mélange. Plus il y avait de *F. graminearum* dans les inoculations, plus le *F. moniliforme* se développait, ce qui semblait illogique.

Notre attention a été attirée par ce phénomène lorsqu'en 2005 contre toute attente, nous avons obtenu des niveaux très élevés de fumonisines dans des contaminations artificielles en *F. graminearum* alors que les témoins non contaminés en étaient exempts et que le niveau de DON est resté très faible (Caron et Naïbo 2007).

Des interactions entre *F. graminearum* et des *F. verticillioides* ou *F. proliferatum* sur des grains stérilisés, exposés à des T° fraîches (15° et 25°C) ont été rapportées (Velluti *et al.* 2000) avec des résultats d'inhibition pour le mycélium des *liseola* mais des effets opposés sur la production de fumonisine B1 qui est soit inhibée soit augmentée en fonction des souches ou des espèces en confrontation. Des interactions similaires de *F. graminearum* ont aussi été observées sur d'autres agents pathogènes comme *Aspergillus parasiticus*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* ou *F. poae* avec des résultats proches (Etcheverry *et al.* 1998, Marín *et al.* 2001, Xu *et al.* 2007). D'autre part, *F. verticillioides* est si fréquemment détecté dans les plantes sans occasionner de symptômes et parfois avec amélioration de la croissance des plantes par les gibbérellines (Yates *et al.* 1997) que Munkvold et Desjardins (1997) avaient suggéré que *F. verticillioides* pourrait être un champignon endophyte du maïs, asymptomatique, à bénéfices réciproques avec la plante.

Dans ce contexte d'informations décrivant des comportements parfois contradictoires et en fonction de nos expérimentations précédentes, nous avons expérimenté dans le Sud-Ouest de la France pour comprendre ce qui se passait au champ. Nous avons essayé de décrire les événements rencontrés dans ces interactions entre *F. graminearum* et *F. verticillioides*.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

ESSAIS AU CHAMP :

Les essais ont été effectués dans le Sud-Ouest de la France, Ils sont tous irrigués.

- Saint Martin de Hinx dans les Landes (40) en 2006 :
 - Disposition en split-plot à 4 répétitions avec le facteur variétal en sous bloc.
 - 2 variétés à 4 modalités : Témoin eau stérile, *F. graminearum* souche INRA155 (macroconidies), *F. grami.* 75% + *F. moni* 25%, *F. moni* : *F. spp liseola* (microconidies de 2 souches *F. proliferatum* + 1 souche *F. subglutinans* Biogemma).
 - Parcelles de 3 lignes de 40 plantes. 2 lignes non inoculées en zone tampon.
 - Inoculation de 20 épis par modalité au centre de la ligne centrale. Les plantes des extrémités servent de zone tampon et de bordures.
 - Inoculation par le canal des soies avec une canule non blessante de 2 ml d'une suspension de spores à 10⁶ spores par ml au total.
 - Inoculation au stade sortie des soies + 4 jours :
 - Variété tolérante : 24 juillet ; T° moy. 24,9°C ; T° max 34,5°C.
 - Variété sensible : 26 juillet ; T° moy. 24,1°C ; T ° max : 30,3°C.
 - Protection contre les foreurs par trichogrammes.
- Baziège, parcelle Narbons en Haute Garonne (Montesquieu Lauragais (31)) en 2006 :
 - Disposition en blocs à 2 facteurs à 3 répétitions.
 - 1 variété Bt : DKC5320
 - 5 niveaux d'inoculation :
 - Canal des soies avec canule non blessante : 2 ml à 10⁶ spores / ml.
 - Blessure épi (perforation de Ø 2 mm) au centre de l'épi, en biais, pour traverser quelques grains : 0,5 ml à 4.10⁶ spores / ml.
 - Blessure rafle : perforation plus profonde jusqu'au centre de la rafle.
 - Blessure pédoncule : même perforation dans le pédoncule de l'épi.
 - Blessure tige : même perforation 2 entrenoeuds sous l'épi.
 - 6 modalités d'inoculum :

- Témoin Blessure Sèche (TBS).
 - Témoin Blessure Eau Stérile (TBE).
 - *F. graminearum* : souche INRA155 (macroconidies).
 - Mélange *F. graminearum* 90% + *F. verticillioides* 10% (Ratio 2)
 - Mélange *F. graminearum* 75% + *F. verticillioides* 25% (Ratio 1).
 - *F. verticillioides* : souche INRA63 (microconidies).
- Parcelles 4 lignes de 40 plantes, 2 lignes extérieures en tampon ainsi que chaque extrémité.
 - Inoculation de 40 épis par modalités sur les 2 lignes centrales.
 - Inoculation à sortie des soies + 4 jours : 4 août, T° moy 21,1°C ; T° max 25,6°C.
 - Cinétique d'évolution de la maladie : Sondage par prélèvement de 3 plantes par modalité à : 17 j, 31j, 45j, 59j, 73j, 87j après inoculation.
- 2 essais en 2008 : Montardon (64) et Baziège (31)
 - 3 répétitions avec 2 dates de semis en split-plot.
 - 1 variété : PR 38H20 sensible.
 - Inoculation artificielle dans le canal des soies (0,5 ml à 4.10⁶ sp/ml) à floraison + 4 à 7 jours. À Montardon : 23,8°C T° moy. et 25°C à Baziège.
 - 4 modalités d'inoculation artificielles (: **FG** : *F. graminearum* (INRA 155 et 159), **FV** : *F. verticillioides* (INRA 63) par blessure, **M** le mélange des 2 espèces, **D** FG à 4-7 j puis FV 1 semaine après et le **Témoin** (eau).

METHODES D'ANALYSE :

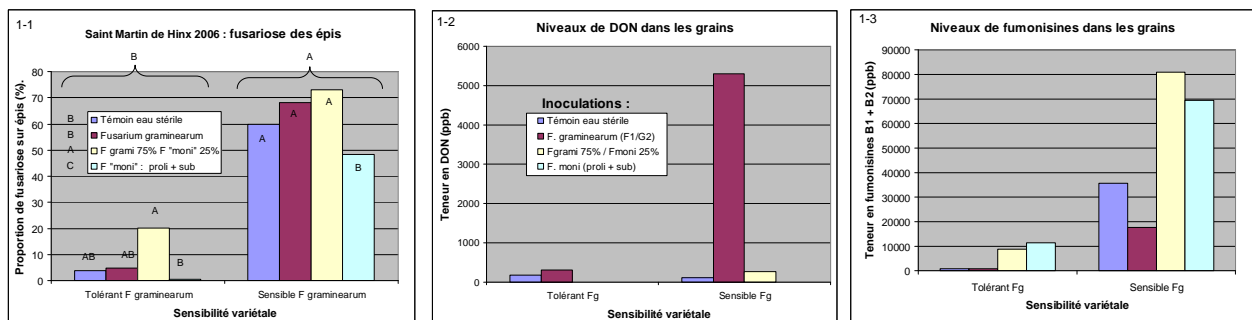
- Notations à l'oeil nu selon une échelle de notation en % de surface d'épi touché. Les épis avec insecte foreur sont éliminés.
- Analyses de mycotoxines par chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse : LC-MS-MS. En 2006 les analyses ont été réalisées sur le rassemblement de la récolte des répétitions de chaque modalité. Les fumonisines sont la somme de B1 et B2.
- Analyses microbiologiques : 20 grains non désinfectés sur PDA à 20°C.

RESULTATS

ESSAI AU CHAMP, SAINT MARTIN DE HINX 2006 :

L'essai a reçu 599°C de T° moyenne dans les 30 jours qui ont suivi l'inoculation. Les variétés proposées à l'expérimentation étaient connues en matière de sensibilité à *F. graminearum* mais non classées en sensibilité aux *Fusarium* de la section *liseola*. Les différences aux attaques de fusariose entre ces 2 variétés sont remarquables (Figure 1-1).

Figure 1 : Observations visuelles de la fusariose des épis et niveaux de mycotoxines sur l'essai de Saint Martin de Hinx en 2006. Les lettres A, B et C correspondent aux groupes homogènes de Newman et Keuls à 5 %. Visual assesment of FHB and mycotoxins levels on Saint Martin de Hinx trial 2006. Letters A, B and C shows the groups of the 5 % Newman and Keuls test.



La variété sensible à *F. graminearum* est aussi plus sensible aux *F. proliferatum* et *subglutinans* utilisés dans cet essai. Les mycotoxines sont nettement plus importantes pour la

variété sensible avec de fortes modulations en fonction des espèces de *Fusarium* et des mélanges inoculés (Fig. 1-2 et 1-3).

ESSAI AU CHAMP, BAZIEGE 2006 :

Figure 2 : Notations visuelles de l'essai de Baziège en 2006. Les lettres A, B et C correspondent au groupes du test de Newman et .Keuls à 5%. Visual assessment of Fusarium ear rot of Baziège trial in 2006. Letters A, B and C shows the groups of the 5% Newman and Keuls Test.

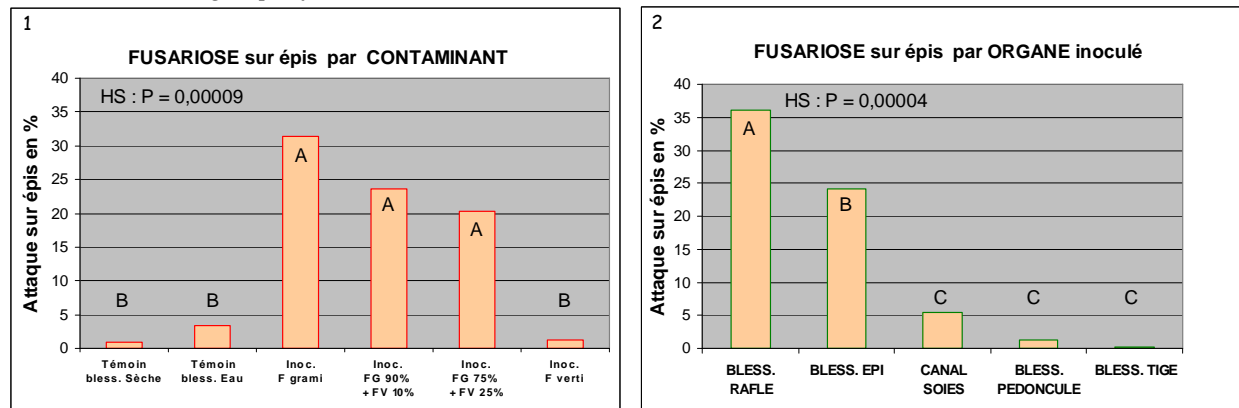


Figure 3 : Notations visuelles du sondage d'évolution de la maladie et détermination *in-vitro* des *Fusarium* sur les grains de l'essai de Baziège en 2006. Visual assessment of the evolution survey of the disease and *in-vitro* determination of *Fusarium* spp. in the trial of Baziège in 2006.

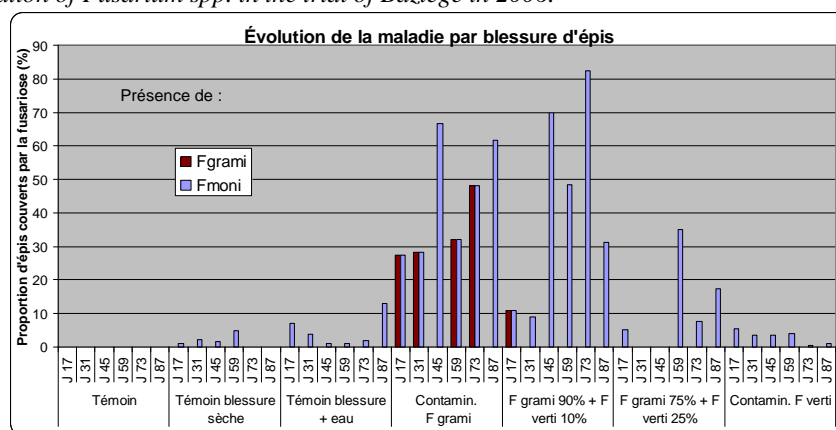
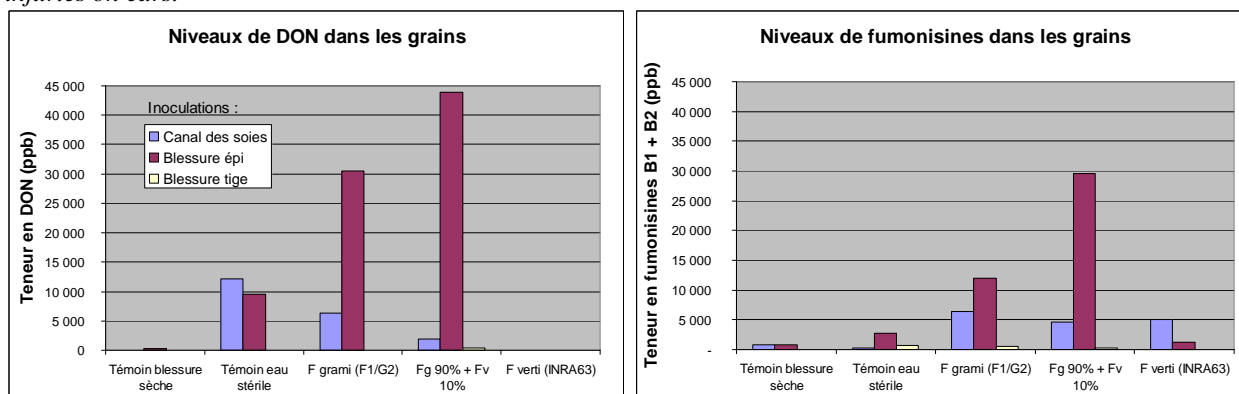


Figure 4 : Mycotoxines à la récolte dans les grains de maïs de l'essai de Baziège en 2006 avec inoculation par blessures d'épis. Mycotoxins in corn kernels at harvest in the Baziège trial in 2006 with inoculations by injuries on ears.



L'essai de Baziège a reçu 592°C de T° moyenne dans les 30 jours suivant l'inoculation. Il comporte des notations visuelles (fig. 2) et des analyses de mycotoxines à la récolte (fig. 4), en

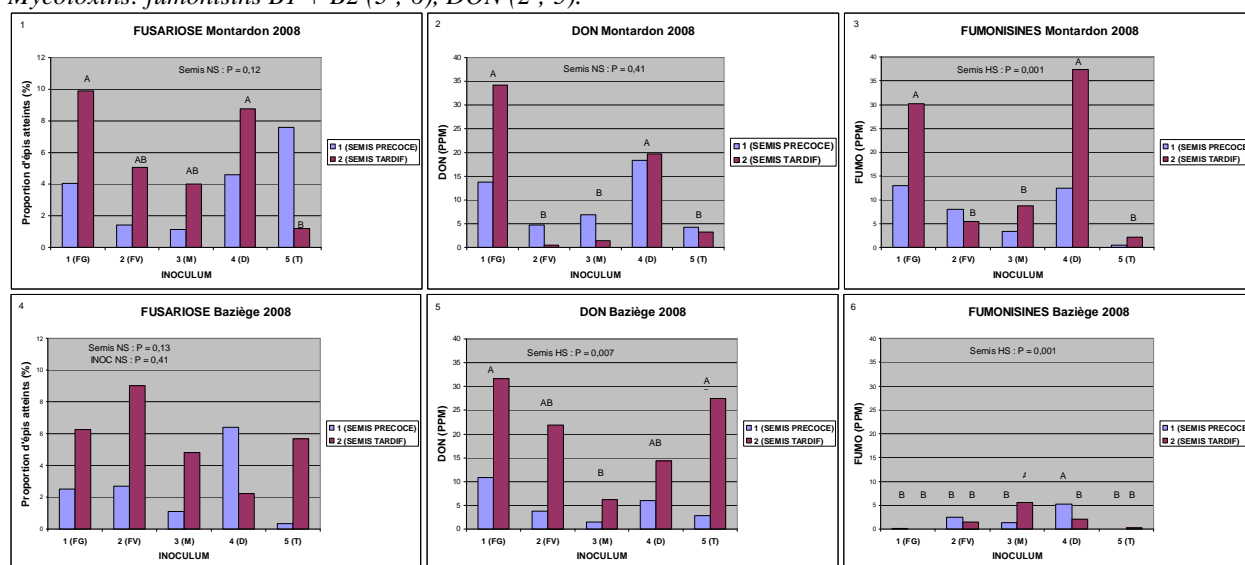
outre, un sondage de l'évolution de la maladie avec 6 prélèvements (3 épis) au cours du temps, a été réalisé pour situer l'évolution des 2 agents pathogènes (fig. 3).

ESSAIS AU CHAMP, MONTARDON ET BAZIEGE 2008 :

La fusariose s'est modestement développée dans ces essais qui ont reçu 595° et 586°C de T° moyenne à Montardon dans les 30 jours suivant l'inoculation pour les semis précoces et tardifs. À Baziège ils ont reçu respectivement 647° et 613°C en 30 jours. Le niveau moyen de maladie se situe près de 5 % de surface d'épi atteinte.

Pour les notations visuelles les différences de maladies entre les lieux et les dates de semis n'apparaissent que faiblement significatives. On peut toutefois noter une tendance à un développement plus important en semis tardifs (fig. 1-1 et 1-4) avec des niveaux moyens atteignant près de 10 %.

Figure 5 : Evaluation de la maladie à la récolte : notations visuelles (1 et 4) et mycotoxines à la récolte : fumonisines B1 + B2 (3 et 6) et DON (2 et 5). Evaluation of disease at harvest: visual assessment (1 ; 4) and Mycotoxins: fumonisins B1 + B2 (3 ; 6), DON (2 ; 5).



Les inoculum correspondent à : (FG) *F. graminearum*, (FV) *F. verticillioides* ; (M) le mélange des 2, (D) les 2 *Fusarium* séparément avec *F. verticillioides* différé de 7 jours. Inoculum abbreviations are: (FG) *F. graminearum*, (FV) *F. verticillioides*, (M) mixture, (D) 2 *Fusarium* separately with a delay of 7 days for *F. verticillioides*.

Toutefois, les résultats de mycotoxines sont élevés et significatifs et révèlent encore des valeurs élevées de fumonisines dans des parcelles inoculées en *F. graminearum* à Montardon en semis tardifs (fig. 1-3).

DISCUSSION

Les inoculations artificielles permettent de développer la fusariose sur les épis de maïs avec plus ou moins de succès selon les conditions opérées.

Le choix de la variété est important (fig. 1.1) ainsi que l'emplacement de l'inoculation (fig. 2.2). Que ce soit avec *F. graminearum* ou *F. verticillioides*, les blessures d'épis permettent une plus forte extension de la maladie que le passage par le canal des soies. Les inoculations effectuées par blessures au niveau du pédoncule ou de la tige n'ont pas permis de développer la maladie sur les épis, ce qui rend improbables les contaminations naturelles par cette voie. Les résultats de l'essai de Baziège en 2006 correspondent à des blessures d'épis, mais les autres essais ont été inoculés par le canal des soies.

Les expérimentations effectuées à Arvalis en 2005 avaient présenté la singularité d'augmenter le niveau de fumonisines par rapport au témoin en contaminant avec *F. graminearum*. Les 4 essais présentés ici, réalisés en 2006 et 2008 enregistrent des résultats similaires. Dans ces derniers essais, la fusariose provoquée par le *F. graminearum* est systématiquement plus importante que celle issue de l'inoculation par les *Fusarium* de la section *liseola* (fig. 1.1 ; 2.1 et 5.1). Le pouvoir pathogène des *F. graminearum* utilisés ici s'avère plus élevé que celui de *F. verticillioides* et cause plus de dégâts en contamination simple avec un seul agent pathogène.

Toutefois, lorsque les 2 *Fusarium* sont en présence, la maladie est équivalente à celle provoquée par *F. graminearum* (Fig.1.1 ; 2.1 ; 5.1 et 5.4). On pourrait donc s'attendre à ce que le *F. graminearum* soit le principal champignon représenté dans les symptômes. Cependant, ce n'est pas le cas. Des déterminations avec incubations sur milieu gélosé ont montré que le *F. verticillioides* est déjà présent naturellement dans les échantillons inoculés avec *F. graminearum* seul (Fig. 3) et que *F. graminearum* cède rapidement la place à *F. verticillioides* dans les contaminations en mélange. Cette expérimentation permet de constater que la contamination conjointe avec *F. graminearum* amène un élément nouveau dans le comportement de *F. verticillioides* qui lui permet un développement plus important avec un pouvoir compétitif élevé.

La production de DON par les inoculations avec *F. graminearum* seul atteint des niveaux importants (Fig. 1.2 ; 4 ; 5.2 et 5.5). Lorsque les inoculations sont conjointes avec du *Fusarium* de la section *liseola*, sa production ou son accumulation est perturbée. Elle est pratiquement nulle à Saint Martin en 2006 inoculé conjointement avec *F. proliferatum* et *F. subglutinans*, (Fig. 1.2) ainsi qu'à Montardon et à Baziège en 2008 avec du *F. verticillioides* (Fig. 5.2 et 5.5). Cette annulation de l'accumulation de DON par contamination conjointe est un phénomène remarquable, mais difficile à généraliser quand on constate qu'il est au contraire exacerbé dans l'essai de Baziège en 2006 (Fig. 4.1).

Les confrontations entre *F. graminearum* et les *Fusarium* de la section *liseola* perturbent gravement l'accumulation de DON dans les gains.

En ce qui concerne les niveaux de Fumonisines, nous observons aussi des modifications profondes. Dans l'essai de Baziège en 2006, l'inoculation en *F. graminearum* seul apporte déjà un niveau important de fumonisines de près de 10 PPM, nettement supérieur à celui des témoins non inoculés et du *F. verticillioides* seul, proche des témoins (fig. 4.2). De plus, la contamination par le mélange triple le niveau de fumonisines à 30 PPM. Ce phénomène se reproduit à Montardon en 2008 et nous conduit en plus à une différenciation entre la double inoculation en mélange ou différée. Dans cet essai, le mélange n'a pas d'effet alors que l'inoculation différée de 7 jours pour *F. verticillioides* produit cette augmentation des fumonisines. Toutefois, comme pour le DON cet effet n'est pas systématique et l'on a aussi fait une observation où les fumonisines sont importantes avec une inoculation en *F. proliferatum* et *subglutinans* (fig. 1.3), comme cela devrait être logiquement le cas à chaque fois.

Il est vraisemblable que les interactions entre ces espèces de *Fusarium* assez différentes dans leurs symptômes et leur mode d'évolution sur l'épi, soient importantes dans le déterminisme de la production de mycotoxines. Il apparaît aussi qu'elles seraient certainement modulées par d'autres facteurs. Il faudrait détecter et différencier ce qui pourrait provenir de l'état physiologique des plantes hôtes de ce qui pourrait provenir des épisodes climatiques. En ce qui concerne le climat, les effets pourraient être directs ou indirects par l'intermédiaire de la plante. Ces phénomènes joueraient un rôle dans le métabolisme et la régulation de la biosynthèse des mycotoxines qu'il est nécessaire d'approfondir. Cela pourrait permettre de fournir des pistes pour l'identification de gènes d'influence et la construction de matériel génétique résistant à la maladie.

CONCLUSION

Les expérimentations effectuées sur la fusariose des épis de maïs entre 2005 et 2008 ont révélé des comportements en interaction entre *F. graminearum* et *F. verticillioides*.

Le plus souvent *F. verticillioides* en inoculation artificielle des épis de maïs par le canal des soies ne permet qu'une faible augmentation de la maladie. L'adjonction de *F. graminearum* à l'inoculum permet des effets tant au niveau de la croissance de l'agent pathogène que de la modulation des mycotoxines produites par les 2 champignons. Les fumonisines se trouvent le plus souvent nettement augmentées alors que le DON est le plus souvent très fortement réduit mais peut parfois être augmenté.

Ces aspects d'interaction devraient être étudiés plus finement au laboratoire *in-vitro* ou en serres.

Il ne faut pas négliger non plus les aspects physiologiques de la plante hôte, notamment les réactions aux stress : températures, sécheresse, nutrition azotée... ainsi que les épisodes climatiques qui peuvent avoir une incidence sur les champignons eux-mêmes ou au travers de la plante. Des corrélations entre ces phénomènes et la maladie devraient être recherchés de façon à améliorer la connaissance du métabolisme et de la régulation de ces mycotoxines et la détection de gènes d'influence pour construire des plantes résistantes.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les équipes techniques et leur implication dans les contaminations artificielles sans qui ces expérimentations n'auraient pas été réalisées. Les premiers essais ont été effectués avec l'appui du consortium RARE et les suivant avec le soutien de l'action Qualité Sanitaire des Aliments en Aquitaine du Conseil Régional. Nous tenons aussi à remercier l'équipe MycSA de l'INRA de bordeaux pour le support qu'ils nous ont apporté dans les analyses ainsi que l'équipe de l'INRA de Saint Martin de Hinx qui nous a fourni des parcelles nécessaires à l'expérimentation.

REFERENCES

Alma A, Lessio F; Reyneri A; Blandino M, 2005. Relationships between *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera: Crambidae*) feeding activity, crop technique and mycotoxin contamination of corn kernel in north western Italy. *International Journal of Pest Management*, 51 (3): 165 – 173.

Avantaggiato G, Quaranta F, Desiderio E, Visconti A, 2003. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003 83 (1): 13 – 18.

Bergstrom GC and Shields EJ, 2002. Atmospheric spore dispersal and regional epidemiology of the *Fusarium* head blight fungus. *Phytopathology* 92: S93 (Abstr.)

Caron D., Dupont de Dinechin L. et Malavergne D., 2006. *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs en fonction du travail du sol.. *Proceedings of the AFPP 8th International Conference on Plant Diseases* in Tours 5-6 December 2006: 293-303.

Caron D., Malavergne D. et Dupont de Dinechin L., 2006. Impact des facteurs agro-environnementaux sur le niveau d'inoculum et la cinétique de dissémination des ascospores de *Gibberella zeae*. In : *Colloque scientifique, projet RARE : Fusariotoxines des céréales*, Arcachon, France 11, 12, 13 septembre 2007 : 12 pp.

Caron D et Naïbo B, 2007. La génétique : un levier majeur pour réduire la production de fusariotoxines au champ chez le maïs. In : *Colloque scientifique, projet RARE : Fusariotoxines des céréales*, Arcachon, France – 11, 12, 13 septembre 2007 : 10 pp.

- Délos M, Weissenberger A, Pillon O, Baubet F et Guéry B, 2007. Les maïs en France en 2006 : bilan phytosanitaire. *PHYTOMA, La Défense des Végétaux*, 605 : 6 – 8.
- Etcheverry M, Magnoli C, Dalcero A, Chulze S et Lecumberry S, 1998. Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol production by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* in interactive cultures on irradiated corn kernels.
- Francl L, Shaner G, Bergstrom G, Gilbert J, Pedersen W, Dill-Macky R, Corwin B, Jin Y, Gallenberg D and Wiersma J, 1999. Daily inoculum levels of *Gibberella zeae* on wheat spikes. *Plant Disease* 83: 662–666
- Gillette KS, 1999. Biodiversity of *Fusarium* species in Iowa maize fields and kernels: Preharvest and postharvest. M.S. Thesis, Iowa State University, USA 123 pp
- Headrick JM; Pataky JK et Juvik JA, 1990. Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, vol. 80, n°5, pp. 487-494.
- Headrick JM and Pataky JK (1991) Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 81: 268–274.
- Leslie J. F., Summerell B. A. et Bullock S., 2006. in: *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, pp. 388.
- Marín S, Albareda X, Ramos AJ, et Sanchis V, 2001. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1061-1068.
- Munkvold GP, 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European journal of Plant Pathology* **109**: 705-713.
- Munkvold GP et Desjardins A, 1997. Fumonisin in Maize ; can we reduce their occurrence ? *Plant Disease* 81 (6): 556 – 565.
- Nyvall RF and Kommedahl T. 1968 Individual thickened hyphae as survival structures of *Fusarium moniliforme* in corn. *Phytopathology* 58: 1704–1707
- Nyvall RF and Kommedahl T, 1968 Individual thickened hyphae as survival structures of *Fusarium moniliforme* in corn. *Phytopathology* 58: 1704–1707.
- Ooka JJ and Kommedahl T, 1977. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology* 67: 1023–1026
- Paulitz T, Dutilleul P, Yamasaki SH, Fernando WDG and Seaman WL, 1999. A generalized two-dimensional Gaussian model of disease foci of head blight of wheat caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 89: 74–83.
- Reid LM and Hamilton RI (1996) Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. *Agriculture and Agri-Food Canada Technical Bulletin* 1996-5^E
- Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW and Schaafsma AW. 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 89: 1028–1037
- Reid LM et Zhu X, 2005. Criblage du maïs quant à sa résistance aux maladies courantes au Canada. *Agriculture et agroalimentaire Canada*, 26 pp.
- Reyneri A and Blandino M, 2003. Control of mycotoxins in corn: 7 years of research on crop techniques and post harvest treatments in North West Italy. The second World Mycotoxin Forum – Noordwijk aan Zee - February 17-18 2003.

Scauflaire J, Mahieu O, Pasternostre L, Louvieux J, Foucart G, Renard F et Munaut F, 2007. Caractérisation et dynamique des fusarioses sur maïs en Région Wallonne. Rapport CARAH 2005-2006, 5pp.

Sutton JC, 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195–209

Velluti A, Marín S, Gonzalez R, Ramos AJ et Sanchis V, 2001 Fumonisin B1, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium moniliforme* *F proliferatum* and *F graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels.

Yates IE, Bacon CW, and Hinton DM, 1997. Effects of Endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on Corn Growth and Cellular Morphology. *Plant Disease* 81 – 7: 723-728.

EST-DERIVED MARKERS HIGHLIGHT GENETIC RELATIONSHIPS AMONG *PLASMOPARA HALSTEDII* FRENCH RACES

F. DELMOTTE ¹, X. GIRESSÉ ¹, S. RICHARD-CERVERA ¹, J.E TOURVIEILLE ², P. WALSER ²,
D. TOURVIEILLE DE LABROUHE ²

¹ INRA, UMR Santé Végétale, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux-Aquitaine, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France (delmotte@bordeaux.inra.fr)

² INRA, UMR Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales (INRA-Université Blaise Pascal), Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, Domaine de Crouelle, 63100 Clermont-Ferrand, France.

RESUME

Douze marqueurs dérivés d'EST ont été isolés chez *Plasmopara halstedii* (Oomycetes), l'agent du mildiou du tournesol. L'analyse par SSCP du polymorphisme de ces marqueurs a permis de révéler la présence de 25 single nucleotide polymorphisms (SNPs) et cinq insertion-délétions. Ces 12 marqueurs ont été utilisés pour génotyper 24 isolats de *P. halstedii* représentant les 14 races de mildiou du tournesol connues en France à ce jour. L'analyse génétique a mis en évidence 13 génotypes multilocus différents et l'existence d'un fort déficit en hétérozygotes qui suggère que cette espèce est fortement autogame. Les isolats se structurent en trois groupes génétiquement bien différenciés organisés autour des 3 premiers pathotypes observés en France. Ce dernier résultat suggère que les populations de mildiou du tournesol pourraient résulter de trois introductions successives de *P. halstedii* en France.

Mots-clés : mildiou du tournesol, SNP, pathotype, évolution, espèce invasive.

SUMMARY

Twelve EST-derived markers were isolated from *Plasmopara halstedii* (Oomycetes), the causal agent of sunflower downy mildew. A total of 25 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and five indels were detected by single-strand conformation polymorphism analysis and developed for high-throughput genotyping of 24 isolates. These markers reveal a good level of genetic diversity and were useful in detecting genotypic variability of French populations. Deficit in heterozygotes indicated that *P. halstedii* is a selfing species. For the first time, these markers allowed to reveal genetic relatedness among 14 races characterized over a 19-year period of *P. halstedii* monitoring in France. Bayesian assignment analysis identified three genetically differentiated groups of isolates organized around the first three pathotypes described in France suggesting three separate introductions into France of isolates with different genetic and phenotypic backgrounds.

Keywords: sunflower downy mildew, SNP, pathotype, evolution, invasive species.

INTRODUCTION

Sunflower downy mildew due to *Plasmopara halstedii* (Berlese & de Toni) is potentially one of the most damaging diseases in sunflower. *P. halstedii* is a homothallic oomycete that alternates one sexual generation with several asexual generations. It is an obligate endoparasite that cannot be cultivated independently from its plant host. *P. halstedii* develops gene-for-gene interactions with its host *Helianthus annuus* and presents several physiological races known as pathotypes. Genetic resistance in cultivated sunflower varieties is the most efficient control method against the disease but the efficiency of major resistance genes is regularly challenged. To date, at least 20 different pathotypes have been described in different parts of the world (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000).

Our understanding of the recurrent breakdown of sunflower major resistance genes can be improved based on new findings concerning the key processes governing the evolution of *P. halstedii* populations. Indeed, knowledge of the evolutionary potential of plant pathogen species has improved the management of resistance genes and maximized their durability in space and time. The population genetics approach can be used to evaluate the major forces driving pathogen evolution, *i.e.* selection, mutation, recombination, genetic drift and gene flow. Previous genetic studies of *P. halstedii* in Europe have reported low levels of genetic and genotypic diversity in this species, with no clear genetic structure revealed with RAPD markers (Komjati *et al.*, 2004; Roeckel-Drevet *et al.*, 1997, 2003), ISSR (Intelmann and Spring, 2002) or ITS sequences (Spring *et al.*, 2006). This precluded any reliable conclusions on the mode of reproduction, genetic structuring or the extent to which pathotypes are related in this species. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are promising molecular markers for population genetics as they are widespread throughout the genome, codominant, specific and have a high resolving power. The development of new methods for screening for DNA polymorphism has rendered possible the extensive development of such markers for plant pathogen species. With a total of 174 nucleotide sequences available in the international nucleotide sequence database, *P. halstedii* is a typical example of a non-model organism for which genomic resources are very scarce.

We used the 145 cDNA sequences available to design a set of EST-derived markers that may be used for future population genetic studies (Giresse *et al.* 2007, Delmotte *et al.* 2008). Here we report the characterization of 12 polymorphic markers based on SNPs and size variations (insertion-deletion) in Expressed Sequence Tags (ESTs) of *P. halstedii* and the development of high-throughput genotyping methods for 10 of these markers. We used these 12 EST-derived markers to perform a genetic analysis of the "reference races" of *P. halstedii* characterized over a 19-year period of monitoring in France (1988-2006).

MATERIAL AND METHODS

Sampling. We analyzed 24 isolates of *P. halstedii* collected in France between 1966 and 2006. Fourteen of these isolates are "reference isolates", corresponding to the first description of the pathotype concerned in France (Table 1). The other 10 isolates (Table 1) were obtained from the French Plant Protection Service monitoring program (Moinard *et al.* 2006).

Virulence profile determination. Downy mildew pathotypes are defined on the basis of virulence profiles on a set of differential hosts carrying different *PI* resistance genes. Resistance tests were performed as described by Cohen and Sakston (1974), with the modifications proposed by Mouzeyar *et al.* (1993): 15 days after inoculation, plants were incubated for 48 h in a saturated atmosphere. Plants were scored as susceptible if sporulation was observed in cotyledons and leaves, and as resistant if no sporulation or only light sporulation was seen on cotyledons. Pathotypes were named according to the international nomenclature of *P. halstedii* pathotypes proposed by Gulya *et al.* (1998) (Table2).

Table I.

Race (pathotype), collection site and date of isolation in France for the 24 isolates of *Plasmopara halstedii*. The star (*) indicates isolates corresponding to the "reference pathotype".

Race (pathotype), département d'origine et date d'isolement en France pour les 24 isolats de *Plasmopara halstedii*. Les étoiles (*) indiquent les isolats servant de "pathotype de référence".

| Race | Collection site ("département") | Year of collection |
|-------------|--|-------------------------------|
| 100* | Unknown | 1966 |
| 100 | Charente-Maritime | 1993 |
| 100 | Cher | 1993 |
| 710* | Indre | 1988 |
| 710 | Cher | 1993 |
| 710 | Unknown | 2000 |
| 710 | Maine-et-Loire | 2004 |
| 710 | Deux-Sèvres | 2006 |
| 703* | Lot-et-Garonne | 1989 |
| 703 | Tarn | 1993 |
| 703 | Lot-et-Garonne | 2001 |
| 703 | Haute-Garonne | 2004 |
| 703 | Gers | 2006 |
| 300* | Aude | 1995 |
| 700* | Haute-Garonne | 1995 |
| 304* | Aude | 2000 |
| 314* | Manche | 2001 |
| 307* | Haute-Garonne | 2002 |
| 704* | Deux-Sèvres | 2002 |
| 714* | Gers | 2002 |
| 334* | Charente | 2004 |
| 707* | Lot-et-Garonne | 2004 |
| 717* | Gers | 2004 |
| 730* | Tarn | 2005 |

Table II.

Name of race (pathotype), date of first isolation in France and virulence profiles for the 14 French reference isolates of *Plasmopara halstedii*.

Nom de la race (pathotype), date de premier isolement en France et profil de virulence des 14 isolats de références français de *Plasmopara halstedii*.

| Race name ¹ | Isolement year | Virulence profiles according to differential hosts ² | | | | | | | | | |
|------------------------|----------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| | | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 | D9 | |
| 100 | 1966 | S | R | R | R | R | R | R | R | R | |
| 710 | 1988 | S | S | S | S | R | R | R | R | R | |
| 703 | 1989 | S | S | S | R | R | R | S | S | R | |
| 300 | 1995 | S | S | R | R | R | R | R | R | R | |
| 700 | 1995 | S | S | S | R | R | R | R | R | R | |
| 304 | 2000 | S | S | R | R | R | R | R | R | S | |
| 314 | 2001 | S | S | R | S | R | R | R | R | S | |
| 307 | 2002 | S | S | R | R | R | R | S | S | S | |
| 704 | 2002 | S | S | S | R | R | R | R | R | S | |
| 714 | 2002 | S | S | S | S | R | R | R | R | S | |
| 334 | 2004 | S | S | R | S | S | R | R | R | S | |
| 707 | 2004 | S | S | S | R | R | R | S | S | S | |
| 717 | 2004 | S | S | S | S | R | R | S | S | S | |
| 730 | 2005 | S | S | S | S | S | R | R | R | R | |

¹ according to Gulya *et al* (1998)

² S: susceptible (compatible interaction); R: resistant (incompatible

interaction)

Molecular markers. A total of 124 ESTs of *P. halstedii* were screened for their polymorphism by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (Giresse *et al.* 2007). DNA extraction was performed on infected plant tissue as previously described for *Plasmopara viticola* by Delmotte *et al.* (2006). Marker amplification reactions were carried out in a final volume of 25 µl containing 10 ng of genomic DNA, 2 mM of MgCl₂, 150 µM of each dNTP, 4 pmol of each primer and 0.2 U *Taq* Silverstar DNA polymerase (Eurogentec) in reaction buffer. Reactions were performed with the following program: an initial denaturation step of 4 min at 96°C, followed by 38 cycles of 40 s denaturation at 96°C, 50 s annealing at 57°C, 90 s elongation at 72°C, and a final elongation step of 10 min at 72°C. Sequence polymorphism was revealed on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel with migration at 4°C at 10 W overnight. The gel was silver-stained. For each of the different profiles of polymorphic EST markers, five alleles were sequenced in order to determine the mutations responsible for the polymorphism.

Statistical analyses. Genepop version 3.2a was used to calculate expected and observed heterozygosities, unbiased estimates of F_{IS} and F_{ST} and to perform exact tests for departure from Hardy-Weinberg equilibrium. The phylogenetic relationships between French pathotypes was investigated by building a neighbor-joining (NJ) tree based on allele shared distance (D_{AS}), using Populations 1.2.28 software. Bootstrap support for the nodes was calculated over 10,000 replications, using the same program. To describe the genetic structure of *P. halstedii* pathotypes, we also applied a Bayesian approach of genetic mixture analysis using the software Structure v2.2.

RESULTS

Molecular markers. Among the 124 ESTs tested by PCR-SSCP, only 12 were found to be polymorphic (9.6%). A total of five indels and 25 SNPs were revealed, one locus (Pha79) presenting 18 SNPs among the 25 (Table 2). The frequency of SNPs in coding regions was 0.52 SNP per kb and was 0.15 when the most polymorphic locus Pha79 was excluded. Five markers presented size polymorphism, with the number of inserted or deleted nucleotides varying in a range from 2 to 63. For the marker Pha42, the deletion and SNP were linked so there were only two alleles at this locus (Giresse *et al.* 2007).

Five SNPs were transformed into Cleaved Amplified Polymorphism Sequence (CAPS) markers. Four indel polymorphisms were automated on a Beckman Coulter Ceq8000 capillary sequencer using the manufacturer's recommendations and one was directly visualized on agarose gel. Finally, two markers were screened by PCR-SSCP since no enzyme discriminating the alleles could be found. The following protocol was used for CAPS markers: 1 µl of PCR product digested by 0.1 U restriction enzyme in 10X enzyme buffer for 1 hour at the appropriate temperature.

Table III.

Characterization and description of 12 EST-derived markers for *Plasmopara halstedii*: locus name, Genbank accession number, homology of sequences, primer sequences, polymorphism type, annealing temperature of primers and genotyping method used are shown (Giresse *et al.* 2007, Delmotte *et al.* 2008).

Caractérisation et description des 12 marqueurs dérivés d'EST chez *Plasmopara halstedii*. Nom du locus, numéro d'accèsion Genbank, homologie de séquence, séquences des amersces, type de polymorphisme, température d'annealing, et méthode de génotypage utilisée (Giresse *et al.* 2007, Delmotte *et al.* 2008).

| Locus name | Genbank acc. no. | Homology | Primer sequences (5'-3') | Polymorphism | T _a (°C) | Genotyping method |
|------------|------------------|--------------------------|--|--------------|---------------------|-------------------|
| Pha6 | CB174585 | Transportin | F: GTCGCTGATTTTATGTTTATGTGC R: TACTACCTCAGTCACATCATCACC | SNP | 57 | CAPS (Tsp45I) |
| Pha39 | CB174648 | Hypothetical protein | F: GATTGGGTTCCCTTGTGGGA R: ATCTTCGCTGCCAGCTTCT | Indel | 57 | Sequencer |
| Pha42 | CB174650 | Hypothetical protein | F: GGATGTTGCTCGTCAAGTAGC R: ACGCATCCTACGCATTCAAC | indel | 57 | Sequencer |
| Pha43 | CB174680 | Hypothetical protein | F: ACTCAGGACTGGGCAACAAT R: CGACATCCTTGTGAGCTTGT | indel | 57 | Sequencer |
| Pha54 | CB174708 | Hypothetical protein | F: ATTTGGCAACGTCTCAGAGC R: CCATCGTAATAACATTCTTTAAAGTCC | SNP | 57 | CAPS (Faul) |
| Pha56 | CB174714 | 40S ribosomal protein S2 | F: GCGGTACTGGTCTATGTGCTG R: TTCAAGAAGTTTGATTTTTCATGC | SNP | 57 | CAPS (Ofl) |
| Pha74 | CB174642 | Hsp 90 | F: ACCTCGCATGGTTGCTTTAC R: TTGCTATTTCCGGCCTACTGG | indel | 57 | Agarose |
| Pha79 | CB174692 | Hypothetical protein | F: GACGCCCACTTAGCTTTC R: TTCGGGAGTAAGTGATTGAGC | SNP | 57 | SSCP |
| Pha82 | CB174573 | MMSDH ¹ | F: ACTCGATCCATGCAGTAAGTAAG R: AGGAGGCTTTGCAGATTGAA | SNP | 57 | CAPS (BspMI) |
| Pha99 | CB174703 | Hypothetical protein | F: CTCGCATTCAAACGGAAAAT R: CAAGCCAACCTGTGCATGAAT | SNP | 57 | CAPS (BsrDI) |
| Pha106 | CB174676 | Hypothetical protein | F: TTGACGTTTATGCCAAGTGC R: AAAAGGAAGTTGTGATGGTGAG | Indel | 57 | Sequencer |
| Pha120 | CB174660 | Hypothetical protein | F: CTATTTAAAGGGGCCCGAAC R: CGGGTTTCTCCATTAATCC | SNP | 57 | SSCP |

Genotypic structure. Based on combinations of the 12 genomic markers, we identified 11 different multilocus genotypes among the 24 isolates analyzed. Three multilocus genotypes were found in multiple copies. A combination of eleven EST markers was sufficient to discriminate all the multilocus genotypes in the dataset, demonstrating the high resolving power of the markers (Fig. 1). Three pathotypes were represented by more than one isolate (race 100 represented by 3 isolates, races 703 and 710 each represented by 5 isolates). Isolates of the same pathotype presented an

identical multilocus genotype, indicating that the three pathotypes may correspond to three clonal lineages. Conversely, two multilocus genotypes included more than one pathotype: the first multilocus genotype comprised pathotypes 100, 300, 304 and the second comprised pathotypes 307, 703.

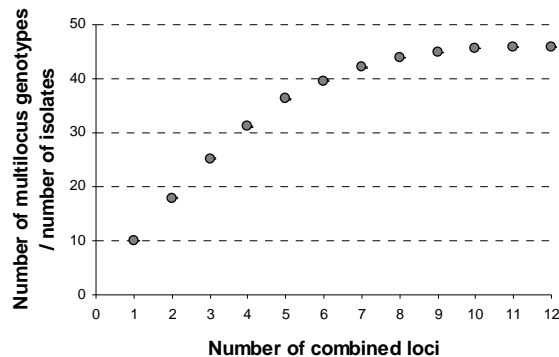


Figure 1.

Number of genotypes discriminated (number of multilocus genotypes/total number of isolates) as a function of the number of loci combined to discriminate isolates of *Plasmopara halstedii*.

Nombre de genotypes discriminés (nombre de genotypes multilocus/nombre total d'isolats analysés) en fonction du nombre de marqueurs combinés dans l'analyse des isolats de *Plasmopara halstedii*.

Population genetic structure. The expected heterozygosity level was consistent with high levels of genetic diversity across loci ($0.349 < H_E < 0.677$). However, observed heterozygosity levels were much lower, with a mean H_O of 0.026. Only three of the 11 distinct multilocus genotypes were heterozygous: two at two loci and one at one loci. Tests of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium revealed significant strong heterozygote deficits with respect to expectations under the assumption of random mating. All loci presented significant and positive F_{IS} values, with an overall F_{IS} of 0.948.

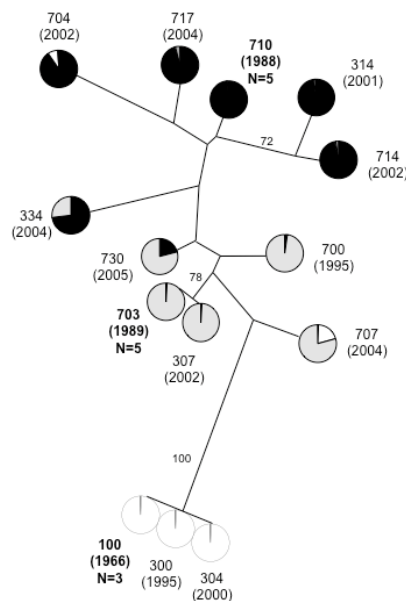


Figure 2. NJ clustering from the allele shared distance matrix calculated among the 14 pathotypes of *Plasmopara halstedii* based on 12 EST-derived markers. The estimated membership coefficients of the clusters inferred with structure software are shown on the tree using a pie chart with three

colored areas (white, gray, black) that are proportional to the assignment of the pathotypes to the 3 inferred clusters. Date of the first description in France of each pathotype is indicated under brackets. Pathotypes 100, 703 and 710 were represented by three to five isolates (N) and isolates belonging to a same pathotype presented an identical multilocus genotype. Numbers above branches of the tree are bootstrap percentages after 10,000 re-samplings.

Arbre de Neighbor-joining basé sur une matrice de distance des allèles partagés calculée entre les 14 pathotypes de *Plasmopara halstedii*. Les estimations du coefficient d'appartenance aux clusters inférés à l'aide du logiciel structure sont représentés sur l'arbre par des "disques" à trois couleurs proportionnelles aux pourcentage d'assignation des pathotypes. La date de premier observation des pathotypes est indiquée entre parenthèses. Les pathotypes 100, 703 et 710 sont représentés par cinq isolats. Les nombres sur les branches de l'arbre correspondent aux valeurs de bootstraps (10000 échantillonnages des données).

Bayesian assignment analyses showed three genetic groups of isolates: the first cluster was constituted of a unique multilocus genotype including 3 pathotypes: 100, 300 and 304. The second cluster included 4 multilocus genotypes and 5 pathotypes: 703, 307, 700, 730, 707. The third cluster included 6 pathotypes having distinct multilocus genotypes: 710, 334, 314, 714, 717 and 704. Pathotypes 334, 707 and 730 were clearly 'mixed' genotypes that presented alleles belonging to two different clusters (Fig. 2).

DISCUSSION

The EST-derived markers used in this study displayed high levels intraspecific polymorphism which made it possible to infer the reproductive mode of *P. halstedii* and to assess the relationships among French pathotypes (Giresse et al. 2007, Delmotte et al. 2008). These markers are specific and could therefore be used for the high-throughput genotyping of isolates directly from sporulating lesions collected from host leaves, avoiding the need for labor-intensive isolate subculture. *P. halstedii* is a homothallic species, and is therefore able both to outcross and to self. However, our results suggest that *P. halstedii* is mainly a selfing species, with only limited outcrossing.

The finding that *P. halstedii* pathotypes cluster into three genetically differentiated groups, each including one of the first races described in France (i.e. 100, 703, 710), sheds new light on sunflower downy mildew evolution (Delmotte et al. 2008). Races 100, 710 and 703 correspond to three clonal lineages that not only present a strong genetic differentiation but also have very distinct virulence profiles. Given the strong geographic structuration of races distribution in France, we hypothesize that these results reflect (at least) three different introductions of this pathogen in France: the first introduction correspond to race 100 (before 1966) that is now widely distributed in France, the second to race 710 in the North of France (before 1988) and the third to race 703 in South-West of France (before 1989). From then on, the triple introduction of *P. halstedii* might have provided the raw genetic materials for more complex evolutionary processes of race emergence such as recombination between pathotypes or accumulation of mutation in clonal lineages (further referred as clonal evolution). These three introductions of *P. halstedii* may have provided the raw genetic materials for more complex evolutionary processes, such as recombination between pathotypes or the accumulation of mutations in clonal lineages (clonal evolution), in the emergence of new races.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CETIOM (*Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains*) and in part by MAP (Ministry for Agriculture and Fishing) within the framework of the program CASDAR.

REFERENCES

- Cohen Y., Sackston W. E., 1974 - Seed infection and latent infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* 52:231-238.
- Delmotte F., Chen W. J., Richard-Cervera S., Greif C., Papura D., Giresse X., Mondor-Genson G., Corio-Costet M.F., 2006 - Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes*, 6, 379-381.
- Delmotte F., Giresse X., Richard-Cervera S., Vear F., Tourvieille J., Walser P., Tourvieille de Labrouhe D., 2008 - Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen responsible of sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 534-540.
- Giresse X., Tourvieille de Labrouhe D., Richard-Cervera S., Delmotte F., 2007 - Twelve polymorphic expressed sequence tags-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. *Molecular Ecology Resources*, 7, 1363-1365.
- Gulya T., Tourvieille de Labrouhe D., Masirevic S., Penaud A., Rashid K., Viranyi F. 1998 - Presented at the Symposium III: Sunflower Downy Mildew, Fargo, 13-14 January.
- Intelmann F., Spring O., 2002 - Analysis of total DNA by minisatellite and simple-sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 555-559.
- Komjati H., Fekete C., and Viranyi F., 2004 - Genetic and molecular characterization of *Plasmopara halstedii* isolates from Hungary, p. 193-201. In P. S.-P. a. M. Jeger (ed.), *Avances in Downy Mildew Research*, vol. 2. Kluwer Academic Publisher, London, UK.
- Moinard, J., Mestries E., Penaud A., Pinochet X., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., Tardin M.C., Pauchet I., Eychenne N., 2006 - Le mildiou du tournesol : panorama du pathogène. *Phytoma*, 589, 34-38.
- Mouzeyar S., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., 1993 - Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Journal of Phytopathology*, 139, 289-297.
- Roeckel-Drevet P., Coelho V., Tourvieille J., Nicolas P., Tourvieille de Labrouhe D., 1997 - Lack of genetic variability in French identified races of *Plasmopara halstedii*, the cause of downy mildew in sunflower *Helianthus annuus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 260-263.
- Roeckel-Drevet P., Tourvieille J., Gulya T. J., G. Charmet, Nicolas P., Tourvieille de Labrouhe D., 2003 - Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 492-502.
- Spring O., Bachofer M., Thines M., Riethmuller A., Goker M., Oberwinkler F., 2006 - Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 309-315.
- Tourvieille de Labrouhe D., Pilorgé E., Nicolas P., Vear F., 2000. Le mildiou du tournesol. INRA and CETIOM, Paris, France.

**ÉTUDE DE L'INCIDENCE DE L'OÏDIUM SUR LA QUALITÉ DES RAISINS ET DES VINS :
CONSÉQUENCES SUR LES SEUILS DE NUISIBILITÉ ET LA VINIFICATION DES
RAISINS TOUCHES**

J. ROUSSEAU¹, L. BLATEYRON¹, V. JACUS² et D. BLANC²

¹ ICV, La Jasse de Maurin, 34970 LATTES, France jrousseau@icv.fr

² BASF Agro, 21 Chemin de la Sauvegarde, 69134 ECULLY Cedex, France

RÉSUMÉ

L'oïdium de la vigne, causé par *Erysiphe necator*, est une maladie majeure dont l'impact est observé à la fois sur le rendement et sur la qualité des vins à travers le monde. Une expérimentation réalisée en France, de 2006 à 2008, avait pour objectifs (i) de mesurer l'incidence de l'oïdium sur la composition des raisins et des vins, notamment aromatique, et sur leurs profils sensoriels, et (ii) d'étudier les moyens potentiels d'adapter les techniques de vinification en fonction de l'altération du raisin (définition de seuils de nuisibilité qualitative utile pour la gestion des vendanges au niveau des caves viticoles). Dans un premier temps, les résultats obtenus sur deux cépages distincts (Chardonnay (blanc) et Carignan (rouge)) seront présentés et discutés avant d'envisager, dans un second temps, l'identification des étapes-clés dans la conduite d'un vignoble permettant de diminuer l'impact des défauts occasionnés par l'oïdium.

Mots-clés : vigne, oïdium, vin, seuil de nuisibilité, qualité, défauts aromatiques, vinification.

SUMMARY

**STUDY OF THE INCIDENCE OF POWDERY MILDEW ON GRAPES AND WINES
QUALITY: DEFINITION OF DAMAGE THRESHOLDS AND IDENTIFICATION OF THE
BEST WINEMAKING TECHNIQUES IN ORDER TO CORRECT THE DEFECTS INDUCED
BY THE DISEASE**

Grapevine powdery mildew, caused by the fungus *Erysiphe necator*, is a major disease affecting grape yield and quality world-wide. An experiment conducted in France from 2006 to 2008 was intended (i) to measure the incidence of the disease on the grape and wine composition, with an emphasis on aromatic compounds, as well as on the sensory profiles of wines and (ii) to explore the different ways in order to adapt the winemaking techniques according to the grape alteration intensity (definition of damage thresholds to manage the grape harvest at the wine cellars level). The results obtained with two grape varieties (Chardonnay (to make white wine) and Carignan (to make red wine)) will be presented and discussed in the first part of this communication before to describe the main factors of *E. necator* development in vineyards which could allow to minimize the wine defect expression.

Key words: grape, powdery mildew, wine, sensory threshold, quality, aromatic defects, winemaking.

INTRODUCTION

L'impact de l'oïdium sur la qualité des raisins et des vins a fait l'objet de relativement peu de travaux. Selon certains (Viala, 1893 ; Ough et Berg 1979 ; Darriet *et al.*, 2001, Calonnec *et al.*, 2004), l'oïdium favorise la concentration en sucres des raisins, alors que selon d'autres (Piermattei *et al.*, 1999 ; Gadoury *et al.*, 2001 ; Pool *et al.*, 2004, Moriondo *et al.*, 2005), la maladie entraîne une réduction de la teneur en sucres des baies, qui s'expliquerait, selon Moriondo *et al.* (2005, par une baisse de l'activité photosynthétique.

Une augmentation de l'acidité totale dans les baies de raisins oïdiés a été mise en évidence dans certains essais (Stummer *et al.*, 2005 ; Darriet *et al.*, 2001), alors que dans d'autres (Ough et Berg, 1979), les vins issus de raisin oïdiés ont une acidité plus faible, et que selon d'autres auteurs (Piermattei *et al.*, 1999) l'oïdium n'a aucune incidence sur le pH.

L'oïdium réduit significativement la teneur en anthocyanes des baies, de -25 % à -70 % selon l'intensité d'attaque (Piermattei *et al.*, 1999). L'incorporation de baies oïdiées entraîne une baisse de 0.66% à 0.91% de la teneur en anthocyane par % de baies oïdiées (Calonnec *et al.*, 2004). Cependant, cette baisse n'affecte pas forcément l'intensité colorante du vin issu de ces baies oïdiées. Un phénomène de concentration se réalise lors de la vinification : les baies sont plus légères donc il faut plus de baies pour produire un litre de vin (Ough et Berg, 1979 ; Pool *et al.*, 1984 ; Darriet *et al.*, 2002). L'oïdium entraîne une augmentation des polyphénols des vins (Stummer *et al.*, 2005 ; Darriet *et al.*, 2002 ; Piermattei *et al.*, 1999).

Enfin, certains travaux ont mis en évidence sur Sauvignon une dégradation importante d'un arôme, le 3 mercaptohexanol, au-delà de 20 % de baies oïdiées (Calonnec *et al.* 2004).

La plupart des vinifications expérimentales de vendanges oïdiées identifient une différence significative entre le moût issu de raisins sains et celui issu de raisins oïdiés (Ough et Berg, 1979 ; Calonnec *et al.*, 2004 ; Stummer *et al.*, 2005). Certains auteurs ont évalué le seuil de détection de ces défauts : sur Sauvignon, il correspond à une intensité d'attaque de 25% pour un jury expert et de 50% pour un jury non expert (Calonnec *et al.*, 2004), et de 30 % sur Chardonnay (Stummer *et al.*, 2005). Dans les deux cas, la définition des seuils est imprécise : concerne-t'il le pourcentage de grappes touchées, ou celui de baies touchées ?

L'objectif des travaux présentés ici est d'approfondir l'étude de l'incidence de l'oïdium sur la composition des raisins et des vins, notamment sur le plan aromatique, de préciser les seuils de nuisibilité, et d'étudier les possibilités d'adaptation des techniques de vinification pour corriger les défauts des vins. C'est ce qui a été réalisé dans un programme expérimental mis en place de 2006 à 2008 sur Chardonnay et Carignan en Languedoc.

MATERIEL ET MÉTHODE

Les essais ont été réalisés sur une parcelle de Carignan située à Cuxac d'Aude (11) et une parcelle de Chardonnay à Alignan le Vent (34). Il s'agit de parcelles de test de stratégies de lutte contre l'oïdium, selon des protocoles de type CEB. À maturité, les raisins ont été récoltés dans les différentes modalités et triés en 3 lots à la parcelle en fonction de leur taux d'attaque: sain, peu touchés par l'oïdium (moins de 50 % d'oïdium), très touchés (plus de 50 % d'oïdium).

A la cave expérimentale, 6 lots de 50 kg ont été constitués en incorporant dans du raisin sain une proportion variable de raisins touchés, par niveau d'attaque (Tableau 1). Les lots obtenus ont été vinifiés, en appliquant le même protocole de vinification, correspondant à un protocole standard de bonnes pratiques œnologiques (un pour l'ensemble des vins rouges, et un autre pour l'ensemble des vins blancs).

Les vins ont été analysés aux stades moût, fin de fermentation alcoolique, fin de fermentation malolactique et mise en bouteilles, puis dégustés par le jury RD de l'ICV selon la procédure d'analyse sensorielle descriptive quantifiée (DELTEIL, 2000).

Tableau 1: Constitution et intensité en oïdium des lots vinifiés

Table 1 : Composition of the lots of grapes prepared for wine making

| Type de raisin | | | |
|----------------------|---|--|------------------|
| Grappes saines (0 %) | Grappes peu touchées (intensité moyenne 15 %) | Grappes très touchées (intensité moyenne 70 %) | Intensité du lot |
| 50 kg | - | - | 0% |
| 35 kg | 15 kg | - | 5% |
| 30 kg | 18 kg | 3 kg | 9% |
| 25 kg | 20 kg | 5 kg | 13% |
| 20 kg | 23 kg | 8 kg | 17% |
| 5 kg | 30 kg | 15 kg | 30% |

Certains lots (0%, 13% et 30 % d'oïdium) ont été vinifiés selon différents protocoles de vinification (selon les bonnes pratiques œnologiques, correspondant à des frais de vinifications moyens, selon un programme à faible coût de vinification, ou à l'inverse à coût de vinification élevé avec incorporation de copeaux de chêne pour tenter de masquer les défauts des vins).

Tableau 2 : Comparaison des process et des frais de vinification en rouge (€ HT/hl)

Table 2 : Comparison of red wine process and of vinification cost (€/hl)

| | Coût faible | Coût moyen | Coût élevé |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| Enzymage | - € | 0,22 € | 0,45 € |
| Sulfitage | 0,04 € | 0,04 € | 0,04 € |
| Levurage | 0,78 € | 0,93 € | 1,17 € |
| Activateurs | - € | 0,62 € | 0,62 € |
| Bactéries | - € | 2,40 € | 2,40 € |
| Gélatine | 0,03 € | 0,03 € | 0,03 € |
| Copeaux | - € | - € | 2,52 € |
| Total intrants | 0,85 € | 4,24 € | 7,22 € |
| Autres frais | 10,91 € | 11,23 € | 11,27 € |
| Coût total | 11,76 € | 15,47 € | 18,49 € |

RESULTATS ET COMMENTAIRES

1 Impact sur la composition du raisin

Une fois les 3 lots de raisin constitués en fonction de leur état sanitaire, des prélèvements de 200 baies ont été réalisés sur chaque lot, à raison de 5 baies par grappe sur 40 grappes choisies au hasard.

Tableau 3 : Composition des lots de raisin (cv Carignan) regroupés en fonction de l'intensité des dégâts d'oïdium (24/9/07)

Table 3 : Composition of grapes (cv Carignan) according to their oïdium intensity (24/09/07)

| Intensité oïdium sur grappes | Poids d'une baie (g) | Sucres par baie (g/baie) | Malique par baie (mg/baie) | Anthocyanes par baie (mg/baie) | Polyphénols totaux par baie (mg/baie) |
|------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| >50% | 1,12 | 0,24 | 2,82 | 1,00 | 48,58 |
| <50% | 1,81 | 0,34 | 4,49 | 1,74 | 46,14 |
| 0% | 1,98 | 0,36 | 4,29 | 1,58 | 40,99 |

Des différences significatives de la composition d'une baie apparaissent en fonction de l'état sanitaire (tableau 3) :

- Forte réduction du poids des baies
- Diminution du chargement en sucres et en anthocyanes
- Augmentation de la quantité de polyphénols totaux par baie
- Faible teneur en acide malique

Cela signifie que l'oïdium réduit fortement l'activité photosynthétique et la maturation de la baie de raisin. Cette incidence est peu significative sur les grappes faiblement touchées par l'oïdium, mais affecte fortement les grappes les plus touchées (réduction de 33% du chargement en sucres et en anthocyanes).

2 Composition aromatique des moûts

Les moûts ont été analysés (Figure 1) par chromatographie en phase gazeuse (laboratoire Nyseos).

Les dégâts d'oïdium entraînent une augmentation significative en arômes de type composés phénolés : les lots touchés à 30 % ont 124 à 170 % plus de phénols que le témoin sain, quelle que soit la couleur du cépage (figure 2). La progression des teneurs en composés phénolés est proportionnelle au taux d'oïdium ($R^2 = 0,94$ à $0,98$). Les principaux arômes concernés sont l'eugénol (arôme du clou de girofle) et l'inconnu 198, dont la teneur peut être multipliée par 2 ou 3, et à un niveau moindre, le zingérone.

On constate également le développement important de 1-octen-3-ol, à l'origine d'arômes de champignon, déjà signalé par Darriet (2002), et d'autres alcools comme 2-hexen-1-ol trans, l'heptanol ou l'hexanol, à l'origine d'arômes herbacés.

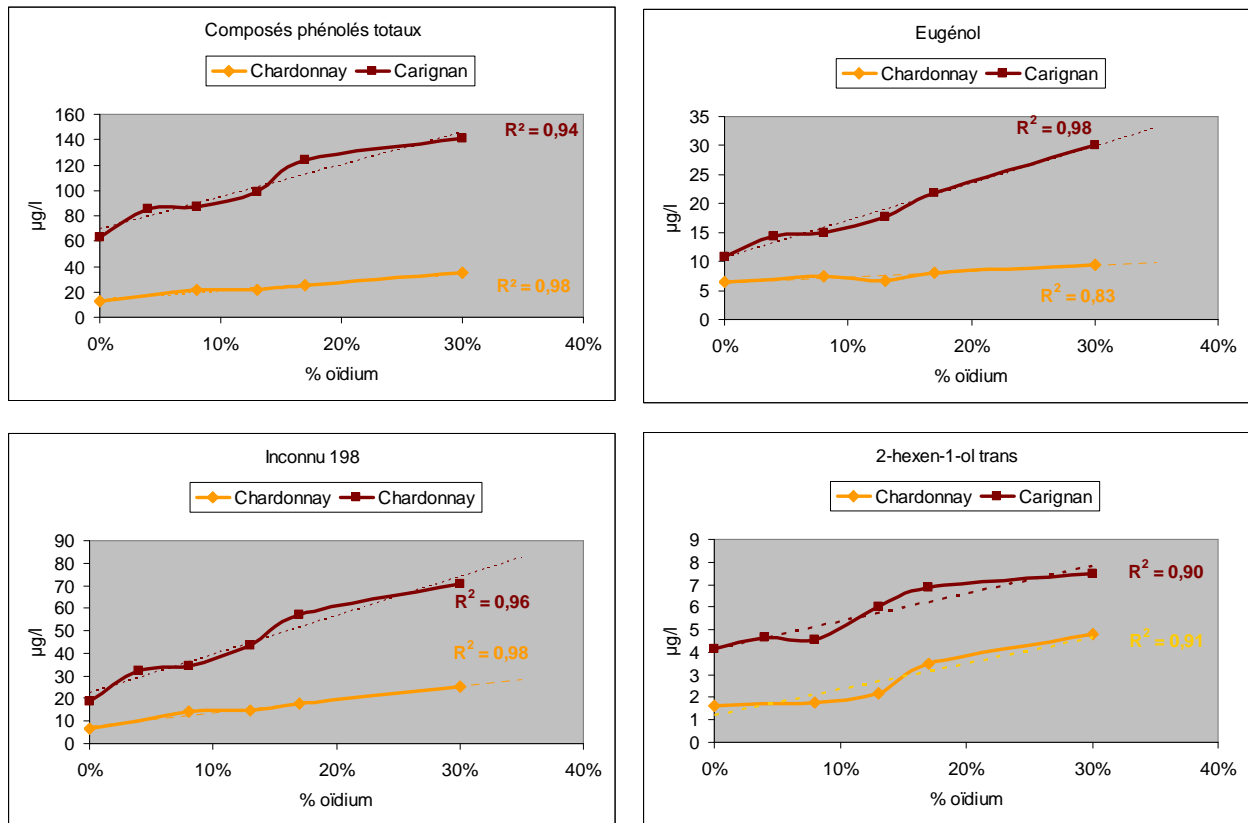
Par ailleurs, on constate une réduction significative d'autres précurseurs d'arômes, comme 3-hexen-1-ol cis, l'alcool benzylique, l'oxyde de linalol pyranique cis (LOP Cis), la vanilline. Mais la plupart des précurseurs d'arômes (norisoprénoides, monoterpénols...) ont tendance à augmenter dans les moûts issus de raisin oïdiés.

Ces observations montrent que l'oïdium est à l'origine de la production de nombreux arômes à l'origine d'odeurs parasites dans le vin, et contribuent à dégrader une partie des précurseurs d'arômes du raisin. Cette réduction est compensée par la concentration des moûts de raisins oïdiés, qui explique que l'on observe une augmentation de la richesse de nombreux précurseurs.

Les différences sont plus marquées sur vin rouge que sur vin blanc : cela montre que le pressurage direct du raisin à la réception en cave, pratiquée sur blanc, en limitant la durée de contact entre le moût et les pellicules du raisin, réduit l'extraction des arômes, qui est au contraire favorisée par la macération des pellicules dans le moût en vinification en rouge.

Figure 1 : Evolution des arômes des moûts en fonction de la contamination en oïdium des raisins sur cv Carignan et Chardonnay : composés phénolés totaux, eugénol, inconnu 198 et 2-hexen-1-ol-trans (en µg/l).

Fig 1 : Evolution of grape juice aromas according to oïdium damages on cv Carignan and Chardonnay: total phenolic compounds, eugenol, "unknown 198", 2-hexen-1-ol-trans (µg/l)



a. Composition finale des vins

L'oïdium entraîne une légère augmentation du titre alcoométrique volumique des vins finis (figure 2). Cette augmentation est due à la concentration des moûts provoquée par la faible taille des baies oïdiées : malgré un chargement en sucres (en g/baie) plus faible, les moûts issus de baies oïdiées sont plus concentrés en sucres. L'augmentation du titre alcoométrique volumique est un facteur qui tend à améliorer la qualité sensorielle des vins, mais qui peut être préjudiciable pour des consommateurs préférant éviter des vins trop alcoolisés.

Mais les vins sont avant tout caractérisés par une élévation du pH, et par une diminution de l'acide tartrique. Les différences sont particulièrement forte sur vin rouge (avec des écarts de pH entre le lot à 30 % d'oïdium et le témoin supérieurs à 0,2), beaucoup moins marquées sur vin blanc (figure 3). Les moûts issus de raisin oïdiés sont particulièrement riches en potassium : les hyphes du champignon, qui traversent une grande partie de l'épiderme de la baie, fragilisent les cellules des faisceaux libériens, situées à la limite inférieure de l'épiderme, dans lesquelles le potassium est stocké. L'enrichissement en potassium des moûts favorise la précipitation tartrique en cours de vinification et de l'élevage des vins, ce qui contribue à augmenter le pH.

Le pressurage direct des blancs, en limitant l'extraction du potassium, limite le phénomène en comparaison avec une macération de 5 jours sur les rouges, qui favorise une extraction complète du potassium.

Avec des pH plus élevés, les vins oïdiés sont plus instables, plus sensibles aux altérations microbiennes, l'efficacité de l'action antiseptique de l'anhydride sulfureux est réduite, la couleur tend à précipiter plus facilement.

Figure 2 : Evolution du titre alcoométrique volumique (en % vol) des vins à la mise en bouteille en fonction de l'intensité d'oïdium

Fig 2 : Evolution of alcohol content (% vol) of wines after bottling according to oidium intensity.

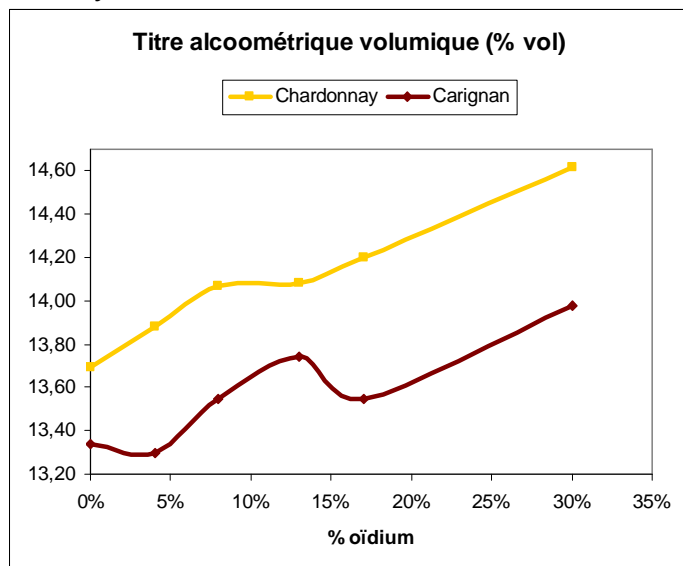
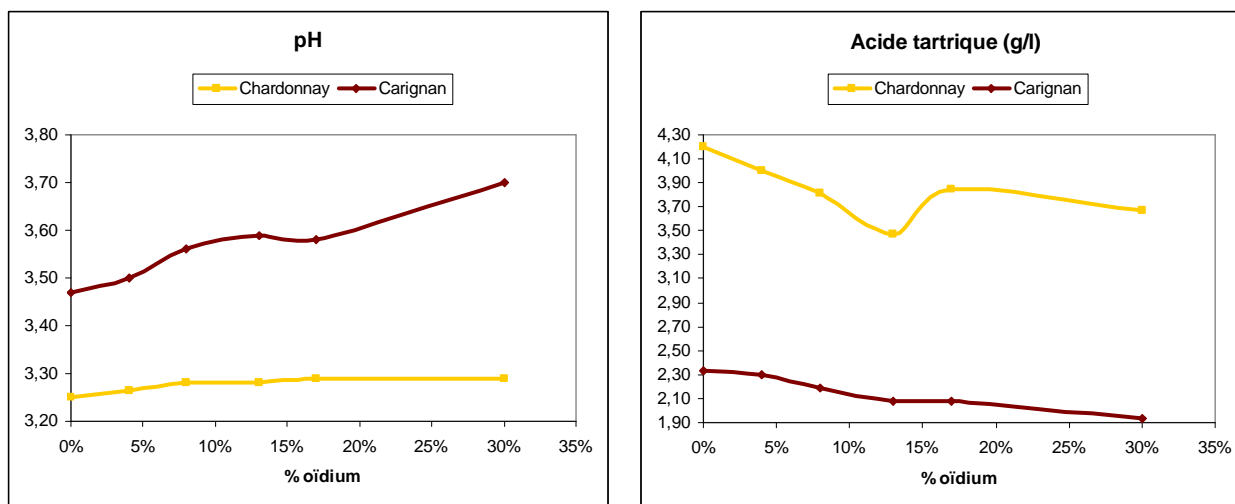


Figure 3 : Evolution du pH et de la teneur en acide tartrique des vins à la mise en bouteille en fonction de l'intensité d'oïdium

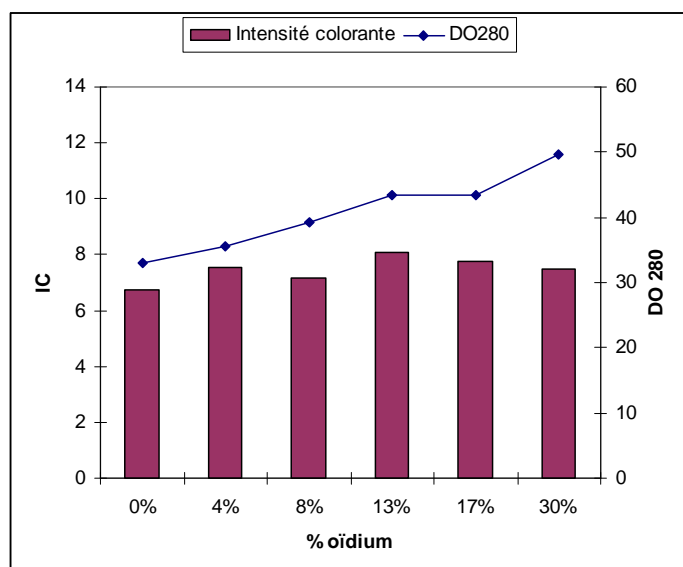
Fig 3 : Evolution of pH and tartaric acid (g/l) of wines after bottling according to oidium intensity.



Sur rouge en cours de fermentation, on assiste à une forte augmentation de l'intensité colorante et des polyphénols totaux (DO280) sur les vins issus de raisins oïdiés, mais la couleur des vins oïdiés est particulièrement instable et sur vins finis, les différences d'intensité colorante sont beaucoup moins marquées. En revanche, l'enrichissement en polyphénols totaux est particulièrement stable, et on note une augmentation particulièrement forte sur vins finis de la DO 280 (figure 4).

Figure 4 : Evolution de l'intensité colorante et des polyphénols totaux (DO 280) sur les vins finis (cv Carignan, 2007).

Fig 4 : Evolution of color intensity and total polyphenols (DO280) of wines after bottling according to oïdium intensity (cv Carignan, 2007).



L'oïdium a donc une action multiple sur la composition du raisin et des jus :

- en réduisant fortement l'activité photosynthétique, ce qui réduit significativement le chargement en sucres et en anthocyanes dans la baie de raisin
- l'oïdium stimule la synthèse des polyphénols totaux dans la pellicule, certainement en suscitant une réaction biochimique face à l'agression des cellules de la pellicule ;
- la fragilisation de la pellicule entraîne une extractibilité accrue du potassium (stocké dans les vaisseaux situés dans la partie inférieure de la pellicule) et des constituants de la pulpe (anthocyanes polyphénols totaux)
- en ralentissant la croissance des baies, l'oïdium favorise la concentration des jus, qui peuvent être plus riches en sucres et en anthocyanes

Il en résulte une forte modification des jus et moûts issus de raisins oïdiés, qui peuvent être plus sucrés et plus colorés, mais qui ont surtout des pH beaucoup plus élevés à cause de la forte teneur en potassium, et une richesse très élevée en polyphénols totaux.

b. Profils sensoriels des vins

Les vins ont fait l'objet d'une analyse sensorielle descriptive quantifiée (ASDQ) par le jury de l'ICV (DELTEIL, 2000).

Sur Carignan, l'effet oïdium génère des arômes de type moisi, perceptibles dès le niveau de contamination de 8 % (figure 5). Sur les lots plus touchés (13, 17 et 33 %) des défauts de type animal (fumier, cuir) apparaissent. Les arômes fruités du vin sont fortement diminués à partir de 8 % d'oïdium, et deviennent dominés par des notes évoluées de pruneau. En bouche, l'oïdium entraîne une baisse de la sensation acide, mais également du volume, avec globalement un meilleur équilibre volume/acidité. Au delà de 8% d'oïdium, l'intensité tannique et la sécheresse augmentent, pour finir de façon très agressive en finale sur les lots à 17 et 33 %.

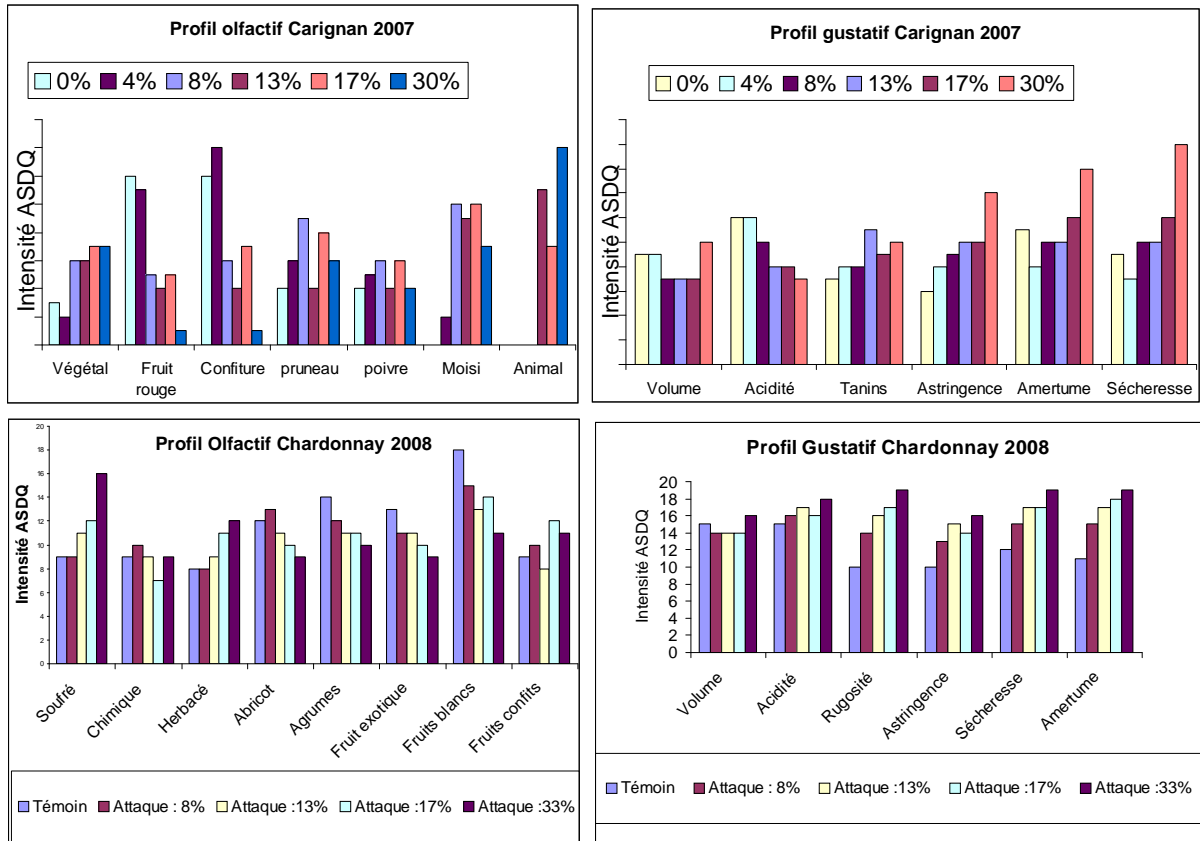
Cependant, le lot touché à 4 % d'oïdium présente le profil le plus confituré, avec en bouche une structure tannique plus intense sans être plus desséchante ou amère. Les vins sont souvent préférés au témoin par les dégustateurs. A partir de 8 à 13 % d'oïdium selon les dégustateurs, des défauts sont notés dans le vin (sur le plan olfactif avec l'apparition

d'arômes déplaisants, et sur le plan gustatif avec une augmentation de la sécheresse. Ils sont jugés réhivitoires à partir de 13 ou 17 % d'oïdium.

Sur Chardonnay, les mêmes tendances apparaissent, mais atténués : apparition d'arômes indésirables, de type soufré, diminution des arômes typiques (fruit blanc, agrumes), et augmentation de la rugosité, de la sécheresse et de l'amertume en bouche.

Figure 5 : Incidence de la teneur en oïdium sur les profils sensoriels des vins (cv Carignan, 2007 et Chardonnay, 2008)

Fig 5 : Incidence of oïdium intensity on grapes on wine sensory profile (cv Carignan, 2007 and Chardonnay, 2008)



c. Incidence des process de vinification

Sur rouge, la mise en œuvre de techniques de vinification à faible coût de revient accentue les défauts des vins provoqués par l'oïdium. Sur le plan analytique, ces vins sont caractérisés par une augmentation de la teneur en polyphénols totaux (DO280) de 32 % et 50 % pour les vins issus de raisins touchés respectivement à 13 et 30 % par l'oïdium. Sur le plan sensoriels, les défauts sont aggravés (augmentation des arômes moisissés et animal, diminution des arômes confiture et fruit rouge, augmentation de l'acidité et de la sécheresse) par rapport aux bonnes pratiques de vinification (coût moyen). Le recours à des pratiques améliorées et à des copeaux ne suffit pas à masquer les défauts provoqués par l'oïdium.

Sur blanc, le process amélioré réduit significativement les défauts sur une vendange touchée à 13 % par l'oïdium, mais ne peut les éliminer sur la vendange touchée à 30 %. Ce process a une forte incidence économique : en réduisant le nombre de pressurages réalisés, il réduit de 10 % le rendement en jus par rapport au process standard.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'oïdium entraîne une tendance à la concentration des raisins qui est globalement favorable à l'amélioration de la qualité à faible intensité d'attaque. Sur Carignan, une contamination de 4 % sur raisin donne le vin le plus apprécié. Cela correspond à la présence de 30 % de grappes faiblement touchées dans la vendange. A ce stade, il n'y a pas de réduction de rendement par rapport au témoin.

La présence de grappes fortement touchées entraîne rapidement une dégradation de la qualité, avec augmentation du pH et de la DO280 (polyphénols totaux), baisse de l'acide tartrique, apparition d'arômes phénolés et herbacés et dégradation de nombreux arômes du raisin. Les profils sensoriels des vins sont altérés : diminution des arômes variétaux, augmentation des arômes plus évolués, et surtout apparition d'arômes soufrés, moisis ou animaux. En bouche, les vins paraissent plus tanniques et plus agressifs. Ces caractéristiques apparaissent dès 8 % d'oïdium, et deviennent rédhibitoires à partir de 13 % à 17 % d'oïdium.

Le type de modification a une grande importance dans l'expression des défauts : la vinification en blanc, avec pressurage direct des raisins à la réception en cave, limite grandement l'augmentation du pH des vins. Sur le plan sensoriel, les défauts sont moins intenses, mais jugés rédhibitoires aux mêmes niveaux de contamination (13 à 17 % d'oïdium).

Plus que le nombre de grappes touchées, c'est l'intensité des dégâts sur les baies qui ont un impact sur la qualité des vins. Les baies fortement touchées, avec une couverture quasi-totale de la pellicule par le champignon entraînant leur nanification sont particulièrement préjudiciables la qualité, même à faible pourcentage dans la vendange. Ces conclusions déjà signalées par Calonnec et al (2004) sont confirmées dans cet essai. Ainsi, l'incorporation de 30 % de grappes faiblement touchées dans une vendange saine n'entraîne pas de défaut des vins, et est parfois à l'origine d'une amélioration sensorielle des vins.

Par contre, l'introduction même en quantité limitée de grappes très touchées (avec plus de 50 % des baies touchées et des baies couvertes en totalité par l'oïdium) suffit à générer des défauts. Ainsi 5 % de grappes très touchées (correspondant à une contamination moyenne de 8 %) suffisent à modifier le profil sensoriel des vins, et les défauts importants apparaissent avec l'introduction de 10 à 16 % en poids, (soit 12,5 à 20 % en nombre compte tenu des pertes de poids des grappes dues à l'oïdium) de grappes très touchées (correspondant respectivement à des intensités moyennes de 13 et 17 %).

Ces dégâts importants sur grappe correspondent à des attaques précoces, avant la fermeture de la grappe. Ces attaques sont non seulement préjudiciables au rendement (du fait d'une coulure importante de baies et de bouquets, suivie d'une forte réduction de la croissance des baies restantes), mais également à la qualité des vins.

En région méditerranéenne, les attaques plus tardives semblent n'avoir que peu d'incidence qualitative, les baies éclatées se desséchant rapidement. Les observations faites sur des grappes identifiées montre que l'évolution de l'oïdium sur des grappes saines ou peu touchées (moins de 20 % de baies touchées) à fermeture de la grappe ne permet pas d'atteindre des niveaux préjudiciables à la qualité à la récolte.

A l'issue de ce programme d'expérimentation, il est possible de dégager des conclusions importantes pour la maîtrise de l'oïdium dans une optique de qualité durable :

- les grappes peu touchées à la récolte ne présentent aucune incidence sur la qualité ;
- seules les grappes très touchées sont nuisibles à la qualité : le seuil de tolérance peut être fixé à 10 % (en nombre) sans que la qualité des vins ne soient significativement affectée ;

- en cas de bon état sanitaire des raisins à la fermeture de la grappe, il semble possible de supprimer les derniers traitements anti-oïdium, y compris sur cépages sensibles, sans risque majeur pour la qualité à la récolte.

Ces observations ont été faites en région méditerranéenne, avec une faible pluviométrie pendant la maturation du raisin. Elles ne sont pas forcément transposables dans des vignobles plus septentrionaux, avec une pluviométrie et une hygrométrie plus importante entre véraison et récolte, où les éclatements de baies dues à l'oïdium tardif peuvent être à l'origine de développement de botrytis ou de pourriture acide, et donc d'une forte dépréciation qualitative.

BIBLIOGRAPHIE

CALONNEC A., CARTOLARO P., POUPOT C., DUBOURDIEU D., DARRIET P., 2004. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes and wine. *Plant Pathology*. Vol 53, n°4 p.434-445

DARRIET P., POUPOT C., ARMAND J-M., DUBOURDIEU D., CLERJEAU M., GLORIES Y., BORDEU E., PSZCZOLKOWSKI P., BUGARET Y., 2001. Incidence anti-cryptogamiques avec des fongicides anti-mildiou, en absence de pression parasitaire, sur la composition des raisins et des vins de cabernet sauvignon. *Journal international scientifique vigne vin*, 30, N°1, 23-29.

DARRIET P., PONS M., HENRY R., DUMONT O., FINDELING V., CARTOLARO P., CALONNEC A., DUBOURDIEU A., 2002. Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew; incidence of enzymatic activities of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of agriculture and food chemistry*, 50, 3277-3287.

DELTEIL D. 2000. Evaluation sensorielle du profil gustatif des vins *Revue des Œnologues* n°94 p21-23

GADOURY D. M., SEEM R. C., PEARSON R. C., WILCOX W. F., 2001. Effects of Powdery Mildew on Vine Growth, Yield and Quality on Concord Grapes *Plant disease*, vol. 85 n°2 p. 137-140

MORIONDO M., ORLANDINI S., GIUNTOLI A., BINDI M., 2005. Effects of downy mildew and powdery mildew on grape wine, leaf gas exchange. *Journal of phytopathology*, Vol. 153, issue 6, p 350.

OUGH C.S., BERG H.W., 1979. Research note: powdery mildew sensory effect on wine. *American journal enology, viticulture*, Vol. 30, NO. 4, 1979.

PIERMATTEI B., PIVA A., CASTELLARIE M., ARFELLI G., AMATI A., 1999. The phenolic composition of red grapes and wines as influenced by *Oïdium tuckeri* development. *Vitis* 38 (2), 85-86.

POOL RM, PEARSON RC, WELSER MJ, LAKSO AN, SEEM RC, 1984. Influence of powdery mildew on yield and growth of rosette grapevines. *Plant Disease*, Vol. 68, no. 7, pp. 590-593.

ROUSSEAU J., BLANC D., JACUS V., 2008. Incidence de l'oïdium sur le rendement et la qualité des raisins et des vins *Phytoma LdV* n°615. p. 37-40

STUMMER B., FRANCIS I.L., ZANKER T., LATTEY K., SCOTT E., 2005. Effects of powdery mildew on the sensory properties and composition of chardonnay juice and wine when grape sugar ripeness is standardised. *Australian journal of grape and wine research* 11, 66-76, 2005.

VIALA P., 1893. Les maladies de la vigne. Paris France, Ed George Masson.

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES VIRUS DES CEREALES PAR LA CARACTERISATION
BIOLOGIQUE DES VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU BLE ET DE L'ORGE: WSMV, WSSMV
ET BSMV dans la zone centre de l'Algérie.**

K. BENMOKHTAR ⁽¹⁾, A. AIT YAHIA ⁽²⁾

⁽¹⁾ – ITGC, 01 Rue Hassen Badi, BP 16 El-Harrach ,Alger, benmokhtarkenza@yahoo.fr.

⁽²⁾ – Département de Botanique protection des végétaux, INA El Harrach, Alger.

RESUME

L'objectif de cette étude est la détection et la caractérisation de trois virus de mosaïque (BSMV, WSMV, WSSMV) affectant les céréales. Pour cela, nous avons effectué des prospections au niveau de la station de l'INA d'EL HARRACH, ITGC de Oued Smar et de Khemis-Miliana sur les cultures de blé et d'orge. Des analyses sérologiques (ELISA) et biochimiques (électrophorèse) ont été effectuées afin de détecter et de caractériser ces trois virus. La présence du BSMV, WSMV et WSSMV a ainsi été confirmée sur les cultures de blé et d'orge dans la zone centre de l'Algérie.

Mots clés : Virus, mosaïque, céréale, Electrophorèse, Sérologie.

SUMMARY

The objective of this study is the detection and the characterization of three mosaic viruses (BSMV, WSMV and WSSMV) affecting cereals. For this purpose, field surveys were realized on wheat and barley crops at the following stations: El Harrach (INA), ITGC of Oued-Smar and ITGC of Khemis Miliana. The serologic analysis (ELISA) and biochimic electrophoresis were done to detecte this three mosaic viruses. The presence of BSMV, WSMV and WSSMV on wheat and barley crops was confirmed in the central zone of Algeria.

Key words: Virus, mosaic, Cereal, Electrophoresis, Serology.

INTRODUCTION

Les céréales ont de tout temps représenté, avec les légumes secs, les principales plantes cultivées pour leurs grains utilisés dans l'alimentation de l'Homme et des animaux domestiques à travers le monde, Cette importance est justifiée, d'une part, par les superficies mondiales emblavées, où elles représentent près de 666.5 millions d'hectares, et d'autre part par leur large utilisation comme aliment de base dans les rations alimentaires quotidiennes de nombreuses populations.

En Algérie, la production céréalière (blés et orges en particulier), reste faible, avoisinant en moyenne 26 millions de quintaux (Anonyme, 1995-1999). Cette production ne permet pas d'assurer une autosuffisance en céréales. Cette réduction est probablement due à plusieurs facteurs abiotiques (température, humidité...) et biotiques (les champignons, virus...) (Sayoud *et al.*, 1999).

Ce travail consiste en une contribution à l'identification des trois principaux virus de type mosaïque sur blé et orge : BSMV, WSMV et WSSMV et l'appréciation de leur importance épidémiologique. Enfin, l'objectif final de cette contribution reste la mise au point de méthodes de diagnostic fiables des virus présents sous nos conditions, par la maîtrise d'une technique immuno-enzymatique sensible (ELISA).

I. Présentation des trois virus BSMV, WSMV et WSSMV

Le virus de la mosaïque striée de l'orge ou Barley stripe mosaic virus (BSMV)

Le BSMV est le virus membre type du genre des Hordeivirus, il a été signalé dans plusieurs pays (l'Amérique du nord, l'Europe, le Japon, L'Australie, la Chine et la Corée) (Wiese, 1998). Les particules du BSMV sont formées d'un seul brin d'ARN (monocaténaire) multipartite (Cornuet, 1987; Brunt et al, 1997) qui se présente sous forme de filaments droits et rigides de 25 nm de diamètre et de 100 à 150 nm de longueur, selon les souches étudiées (Wiese, 1998). Il se trouve dans toutes les parties de la plante hôte, au niveau du cytoplasme et du noyau il provoque des changements cellulaires tels que la formation des vésicules périphériques dans les chloroplastes (Carroll, 1970 in Brunt et al, 1997). Le BSMV est transmis par la semence, ce mode de transmission permet d'assurer la survie de l'inoculum essentiellement chez l'orge, il peut également se propager par contact des feuilles de plantes avoisinantes infectées vers des plants sains (Clarck et al in Jackson et Lane, 1981).

1.1. Le virus de la mosaïque striée du blé ou Wheat streak mosaic virus (WSMV)

Le WSMV appartient à la famille des Potyviridae, genre Tritimovirus, il a été signalé aux Etats Unies (Shukla et al., 1994), en Europe et en Jordanie (Slykhuis, 1967 in Katri, 1973). C'est un virus à ARN monopartite. Les observations en microscopie électronique ont révélé que les particules du WSMV se présente sous forme de filaments flexibles mesurant 700 nm de long et 15 nm de diamètre (Brandes et Wetter, 1959 in Slykhuis, 1965 ; Brakk, 1971; Wiese, 1998). Le virus se trouve au niveau du cytoplasme des cellules des plantes infectées où il induit la formation d'inclusions de type Pinwheels (Brunt et al, 1997). La transmission est assurée par des acariens (Slykhuis, 1955 in Seifers et al, 1995 ; Brakk, 1971 ; Shukla et al, 1994 ; Wiese, 1998).

1.2. Le virus de la mosaïque striée en fuseau du blé ou Wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV)

Le WSSMV appartient à la famille des Potyviridae genre Bymovirus, il a été signalé en Amérique du nord (Cunfer et al, 1988 in Carroll et al., 1997). Il est à ARN monocaténaire bipartite. Les particules du WSSMV se présentent sous forme de filaments flexueux de 200 à 300 nm de long et de 15 à 18 nm de diamètre (Langenberg et Schroeder, 1973 in Bays, 1985). Le virus se trouve dans le cytoplasme au niveau des feuilles et des racines, ou il induit la formation d'inclusions cytoplasmiques de type Pinwheels, particulièrement au niveau du mésophile et du parenchyme vasculaire (Brunt et al, 1997). Le WSSMV est un virus transmis par vecteur. Ce vecteur est un champignon du sol *Polymyxa graminis* Il s'agit d'un parasite obligatoire appartenant à l'ordre des Plasmodiophorales.

II. Matériel et méthodes

2.1 Prospection

Des prospections ont été effectuées dans la zone centre de l'Algérie au niveau des stations expérimentales d'El Harrach (INA), ITGC de Oued-smar et de Khemis Miliana, entre les mois de mars et avril 1999 (**tableau I**).

Tableau I : Espèces et variétés céréalières échantillonnées lors des prospections
(Cereal species and varieties collected during prospections)

| Espèces | Provenance |
|--|--|
| <u>Orge</u> Saïda Plaisant Acsad 176 Acsad 68 Rihane 03 | Khemis-Miliana Oued-Smar Oued-Smar El Harrach (INA) et Oued-Smar Khemis-Miliana |
| <u>Blé tendre</u> Anza HD 1220 | El Harrach (INA) Khemis-Miliana |
| <u>Blé dur</u> Hedba 03 Bidi 17 Chen" S" Vitron Ofanto Waha | Oued-Smar Oued-Smar Khemis-Miliana El Harrach (INA) Oued-Smar El Harrach (INA) et Khemis-Miliana |

Plusieurs des échantillons sélectionnés (feuilles de blé et d'orge), présentant des symptômes de nature virale, notamment des mosaïques blanchâtres, mosaïques ponctiformes, jaunissement apical et des stries chlorotiques, sont utilisés dans les tests de détection immuno-enzymatiques. Le protocole de Ternynck et Avameas (1987) est appliqué (**Protocole 1**), et les sérums anti- WSMV, anti-BSMV (produits à l'ICARDA, Syrie) et anti-WSSMV (produit à Cornell university, USA) sont utilisés pour la détection spécifique des trois virus recherchés. Après extraction par broyage dans du PBS-Tween 0.1 mole pH 7.8 (0.5 g poids frais / 2ml tampon) dans un mortier froid, 100ul de chaque échantillon (infectés et témoins) sont déposés trois fois au niveau des plaques de microtitration en polystyrène, préalablement sensibilisées par les sérums respectifs. Après dépôt de la deuxième couche d'anticorps et du conjugué, la lecture des résultats est faite par spectrophotomètre (Metertech w 960) à 405nm. Les valeurs des lectures de densités optiques supérieures à $T_{moy} + 3ds$ sont considérées comme positives (T_{moy} = la moyenne des témoins, ds = écart type).

Protocole 1
Enzyme-linked immuno sorbent assay
Triple - Antibody Sandwich (TAS-ELISA)
(Ternynck et Avrameas, 1987)

- 1- Dépôt de 100 ul d'anticorps dilués dans le tampon carbonate bicarbonate 0.1M pH 9.5, incubation pendant 2h à 37 C°.
- 2- Lavage 3 fois 5 mn des plaques dans le PBS-T 0.1 M pH 7.8.
- 3- Dépôt de 100 ul d'antigènes extraits dans le tampon PBS-T 0.1, pH 7.8, incubation une nuit à 4 C°.
- 4- Lavage comme en 2.
- 5- Saturation des sites de la plaque avec une solution de gélatine à 0.5% diluée dans du PBS-T.
- 6- Lavage comme en 2.
- 7- Dépôt de 100 ul d'anticorps dilués dans le tampon PBS-T 0.1, M pH 7.8, incubation 2h à 37 C°.
- 8- Lavage des plaques cinq fois, 5mn dans le tampon PBS-T 0.1, pH 7.8.
- 9- Dépôt de 100 ul d'IgG (chèvre anti-lapin) couplées à l'enzyme diluée dans le tampon PBS-T 0.1 M, pH 7.8, incubation 2h à 37 C°.
- 10- Lavage comme en 8.
- 11- Addition du substrat de l'enzyme PNPP (Pra-nitrophenyl phosphate) dilué dans le diethanolamine à pH 9.8 (1 mg/ml).
- 12- Lecture des plaques par spectrophotométrie à 405 nm.

2.2 Caractérisation électrophorétique des particules virales par SDS-PAGE

Pour chaque virus suspect de causer la mosaïque du blé et de l'orge, quelques échantillons issus du terrain sont choisis pour ce test biochimique. Ainsi, nous avons choisi les variétés **Saïda (Khemis Miliana)** pour la culture d'orge, **Anza (Khemis Miliana)** pour le blé tendre, et **Chen "s"** et **Waha (Khemis Miliana)** pour le blé dur. Ce choix est justifié par le fait que ces échantillons ont fortement réagi au test ELISA-TAS. Quatre protéines de références sont utilisées dans ce test à savoir Lysozyme, B-Lactoglobuline, Anhydrase Carbonic et la Bovine sérum albumine.

Les échantillons partiellement purifiés selon la méthode de Parent et Asseline 1984 (**Protocole 2**) sont dilués dans le tampon Laemmli. Ils sont ensuite soumis à une dénaturation de 3 mn dans un bain Marie bouillant, avant d'être déposés sur gel de polyacrylamide (concentration à 5%). Après dépôts sur le gel, les échantillons sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970) pendant, 1 à 2 heures à 150 volts puis 14 heures à 50 volts et à 4 C°.

Les gels sont ensuite colorés au bleu de coomassie à 1% pendant 30 à 60 mn, puis décolorés dans plusieurs bains de décoloration. Le poids moléculaire des sous unités protéiques est estimé par extrapolation sur une courbe étalon $\log P_m = f(\text{distance de migration})$, établie par rapport aux distances de migration, des protéines de références respectives.

Protocole 2
Purification partielle des échantillons pour l'étude électrophorétique
(Parent et Asseline, 1984)

- 1- Broyage de 50 à 100 mg de feuilles infectées dans 1 ml de tampon : K_2HPO_4 à 0.1 M + Na_2 – EDTA à 0.002 M (PH 7.1).
- 2- Addition de 0.7 ml de chloroforme-butanol (V/V).
- 3- Agitation 3 mn à température ambiante.
- 4- Centrifugation à 15 000 g pendant 15 mn.
- 5- Addition de 200 ul de $CaCl_2$ à 0.006 M.
- 6- Centrifugation à 15 000 g pendant 15 mn.
- 7- Récupération du culot dans 10 ul de Na_2HPO_4 (0.01 M PH 7) ou dans 20 ul du tampon de Laemmli.

III Résultats et discussions

3.1 Prospections et symptômes aux champs

Les symptômes observés sur culture d'orge et blé, différent d'une variété à une autre et même au sein d'une même variété dans les champs prospectés.

Les symptômes observés sur orge consistent en une mosaïque ponctiforme et en stries jaunes discontinues. Ces symptômes ressemblent à ceux causés par le BSMV, décrit par plusieurs auteurs (Cornuet, 1959 ; Jackson et Lane, 1981 ; Brunt et al, 1997).

Sur blé, une mosaïque jaune striée, des stries chlorotiques, ainsi que des taches chlorotiques ont été observés. Ces symptômes sont généralement attribués au WSSMV ou au WSMV (Slykhuis, 1976 ; Lommel et al, 1986 ; Wiese, 1998).

3.2 Résultats du test sérologique par ELISA-TAS

Les résultats obtenus par le test ELISA-TAS sur les différentes variétés échantillonnées sont reportés dans le **tableau II**. Pour chaque culture, quelques échantillons ont réagi vis-à-vis des deux sérums anti-BSMV et anti-WSSMV. Cependant, le WSMV n'a pas été détecté au niveau du blé dur, malgré le fait que quelques variétés présentaient des symptômes similaires à ceux causés par ce virus (Vitron, Hedba 03, Bidi 17). Ceci peut être expliqué bien sûr par l'absence de ce virus dans les échantillons analysés mais pourrait également être lié à une concentration en particules virales trop faible pour que ce virus soit détecté par un test sérologique.

La présence du WSSMV au niveau de l'orge (Saida, Plaisant, Acsad 176 et Acsad 68) était très importante. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par Boubetra et Mohamedi (1998) et indiquent donc que des infections naturelles de l'orge par le WSSMV peuvent se produire, contrairement à ce qui avait été reportés jusqu'à présent (Slykhuis, 1976 ; Cornuet, 1987 ; Wiese, 1998).

Quelques échantillons présentant des symptômes typiques à ceux causés par le BSMV, tel que Acsad 68, Waha et Hedba 03, n'ont pas réagi à ce virus lors de nos dosages immuno-enzymatiques. Cette absence peut s'expliquer par le fait que les symptômes observés sur ces échantillons sont soit dus à un autre facteur biotique, ou encore pouvant être confondus avec des troubles physiologiques (Hamilton, 1965).

Certaines infections ont été retrouvées en complexes de virus. Ces complexes maladiés sont regroupés au niveau du **tableau III**.

3.3 Migration électrophorétique

L'étude électrophorétique a révélé la présence de plusieurs bandes protéiques dont les poids moléculaires varient de 16 985 à 59 391 Da (Dalton). L'estimation des poids moléculaires a été effectuée par projection sur la courbe étalon, établie à partir de la relation linéaire qui existe entre les logarithmes des poids moléculaires des protéines marqueuses et leurs distances de migration (Figure1 et 2).

Figure 1 : Evolution des log des poids moléculaire en fonction des distances de migration de la première électrophorèse. (Molecular weight logs' evolution in relation with the migration distance of 1st electrophoresis).

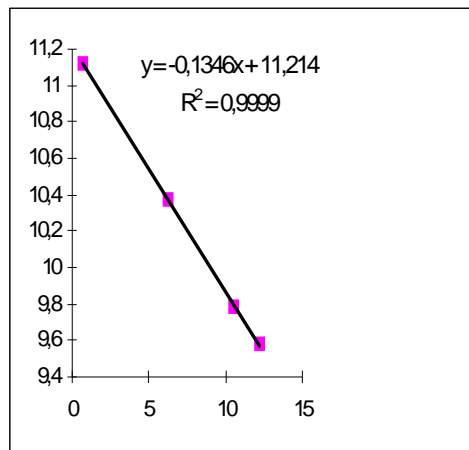
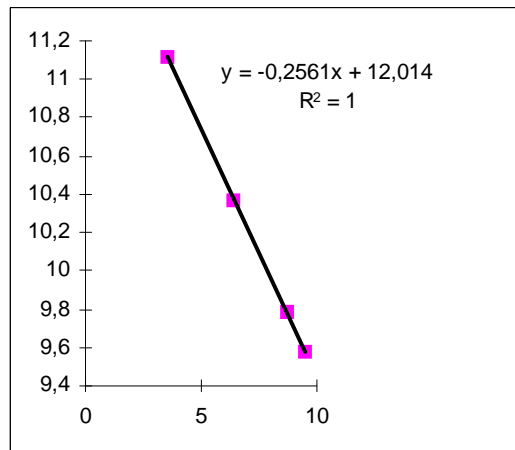


Figure 2 : Evolution des log des poids moléculaire en fonction des distances de migration de la deuxième électrophorèse. (Molecular weight logs' evolution in relation with the migration distance of 2nd electrophoresis).



Les résultats obtenus confirment ceux des tests sérologiques, et nous permettent de dire que les bandes de la première électrophorèse, allant de 21 067 à 48 861 Da, correspondent aux protéines virales des virus déjà détectés. En se référant aux données préexistantes sur ces virus, nous avons attribué les valeurs obtenues comme suit :

Isolat 1 : deux bandes majeures ont été notées. Celle de 21 209 Da attribuée au BSMV et celle 48 861 attribuée au WSMV.

Isolat 2 : les mêmes bandes de protéines virales sont observées pour cet isolat. Il s'agit de BSMV à 21 067 Da et à 42 421 Da du WSMV.

Isolat 3 : les sous unités protéiques d'un seul virus ont été observées. Celles-ci sont échelonnées de 45 374, 42 136, 33 518 à 30 096 Da. Il pourraient s'agir des sous unités de la capsid virale du WSMV.

Cependant, la deuxième électrophorèse a révélé des bandes allant de 20 735 à 45 374 Da, qui correspondent aux sous unités des protéines capsidiales des virus suivants :

Isolat 4 : le WSSMV (28 926 Da)

Isolat 5 : le BSMV (20 735 Da)

Isolat 6 : le WSMV (30 839 Da et 45 283 Da)

Les autres bandes observées, qui ne s'apparentent à aucun des virus cités, pourraient correspondre soit à des protéines végétales, du fait que les suspensions virales n'ont été que partiellement purifiées, soit à des sous unités capsidiales virales agrégées (Hewings et d'Arcy, 1986).

**Tableau II : Résultats des tests sérologiques des échantillons collectés
(Serological results of the collected samples)**

| Espèce et variétés | Localité | BSMV | | WSSMV | | WSMV | | |
|---|-----------|----------------------|----------|-------|----------|------|----------|---|
| | | D.O | Réaction | D.O | Réaction | D.O | Réaction | |
| O R G E | Saïda | ITGC Khemis-Miliana | 0,207 | + | 0,208 | + | 0,155 | - |
| | Saïda | ITGC Khemis-Miliana | 0,195 | + | 0,170 | + | 0,211 | + |
| | Plaisant | ITGC Oued Smar | 0,142 | - | 0,163 | + | 0,152 | - |
| | Acsad 176 | ITGC Oued Smar | 0,150 | - | 0,164 | + | 0,179 | + |
| | Acsad 68 | ITGC Oued Smar | 0,148 | - | 0,175 | + | 0,167 | + |
| | Acsad 68 | El Harrach (INA) | 0,142 | - | 0,146 | - | 0,152 | - |
| | Acsad 68 | ITGC Oued Smar | 0,138 | - | 0,149 | - | 0,153 | - |
| | Acsad 68 | El Harrach (INA) | 0,119 | - | 0,150 | - | 0,148 | - |
| | Rihane 03 | ITGC Khemis-Miliana | 0,145 | - | 0,146 | - | 0,152 | - |
| B L E T E N D R E | Anza | El Harrach (INA) | 0,306 | + | 0,164 | + | 0,163 | + |
| | Anza | El Harrach (INA) | 0,143 | - | 0,149 | - | 0,187 | + |
| | Anza | El Harrach (INA) | 0,138 | - | 0,150 | - | 0,152 | - |
| | HD | ITGC Khemis-Méliana | 0,158 | - | 0,159 | + | 0,154 | - |
| | Anza | El Harrach (INA) | 0,156 | - | 0,158 | + | 0,191 | + |
| | Anza | El Harrach (INA) | 0,135 | - | 0,145 | - | 0,148 | - |
| | Anza | El Harrach (INA) | 0,145 | - | 0,148 | - | 0,156 | - |
| B L E D U R B L E | Waha | ITGC Khemis-Méliana | 0,154 | - | 0,158 | + | 0,153 | - |
| | Waha | El Harrach (INA) | 0,152 | - | 0,161 | + | 0,146 | - |
| | Hedba 03 | ITGC Oued Smar. | 0,171 | + | 0,153 | - | 0,140 | - |
| | Hedba 03 | ITGC Oued Smar. | 0,160 | + | 0,164 | + | 0,147 | - |
| | Hedba 03 | ITGC Oued Smar. | 0,155 | - | 0,151 | - | 0,146 | - |
| | Hedba 03 | ITGC Oued Smar. | 0,140 | - | 0,154 | - | 0,149 | - |
| | Bidi 17 | ITGC Oued Smar. | 0,202 | + | 0,140 | - | 0,146 | - |
| | Bidi17 | ITGC Oued Smar. | 0,151 | - | 0,137 | - | 0,136 | - |
| | Chen "S" | ITGC Khemis-Méliana. | 0,161 | + | 0,151 | - | 0,153 | - |
| | Chen "S" | ITGC Khemis-Méliana. | 0,177 | + | 0,154 | - | 0,150 | - |

| | | | | | | | | |
|-------------|--------|------------------|-------|---|-------|---|-------|---|
| D U R | Vitron | El Harrach (INA) | 0,129 | - | 0,137 | - | 0,150 | - |
| | Vitron | El Harrach (INA) | 0,148 | - | 0,143 | - | 0,145 | - |
| | Ofanto | ITGC Oued Smar. | 0,142 | - | 0,142 | - | 0,139 | - |

BSMV (Orge: $M+3\sigma=0.162$; Blé: $M+3\sigma=0.157$); WSSMV (Orge: $M + 3\sigma=0,153$; Blé: $M+3\sigma=0,155$); WSMV (Orge: $M+3\sigma=0,160$; Blé: $M+3\sigma= 0,157$)

Tableau III : Complexes viraux identifiés par voie sérologique (Viral complex identified by serology).

| Culture | Symptômes | Complexes viraux |
|-------------------|---|-------------------|
| Orge | | |
| Saida | Nanisme, jaunissement apical et jaunissement systémique. | BSMV, WSSMV |
| Saida | Mosaïque ponctiforme, jaunissement apical et lésions nécrotiques. | BSMV, WSSMV, WSMV |
| Acsad 176 | Mosaïque, jaunissement | WSMV, WSSMV |
| Acsad 68 | jaunissement | WSMV, WSSMV |
| Blé tendre | | |
| Anza | Stries chlorotiques, nanisme. | BSMV, WSSMV, WSMV |
| Anza | Mosaïque | WSMV, WSSMV |
| Blé dur | | |
| Hedba 03 | Jaunissement | BSMV, WSSMV |

Tableau IV : Résultats de la migration électrophorétique (PAGE-SDS) des échantillons. (SDS-PAGE results of the collected samples).

| Protéines testées | Distance de migration (cm) | | Pm (Da) | Poids moléculaire de référence et auteurs |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------|---|
| | 1 ^{ère} Electrophorèse | 2 ^{ème} Electrophorèse | | |
| Lyz | 12.5 | 9.5 | | 14500 |
| BLG | 10.5 | 8.7 | | 18000 |
| AC | 6.3 | 6.4 | | 32000 |
| BSA | 0.7 | 3.5 | | 68000 |
| Isolat 1 Orge (Saida) | 3.1 | | 48861 | WSMV (42000-47000 Da); Niblett <i>et al</i> , 1991 in Shukla <i>et al</i> , 1994) |
| | 4.95 | | 38090 | - |
| | 7.35 | | 27575 | - |
| | 7.85 | | 25780 | - |
| | 9.3 | | 21209 | BSMV (21000 Da) Cornuet, 1987. |
| | 10.25 | | 18663 | - |
| | 10.95 | | 16985 | - |
| Isolat 2 Orge (Saida) | 1.65 | | 59391 | - |
| | 4.15 | | 42421 | WSMV (42000-47000 Da) |
| | 9.35 | | 21067 | BSMV (21000 Da) Cornuet, 1987. |
| | 9.85 | | 19696 | - |
| | 10.25 | | 18663 | - |

| | | | | |
|---|------|------|-------|---|
| Isolat 3 Blé tendre (Anza) | 3.65 | | 45374 | WSMV (42000-47000 Da) Niblett <i>et al.</i> , 1991 in Shukla <i>et al.</i> , 1994. - - WSMV (33000 Da) Cornuet, 1987. WSMV (31000, 32000, 33000 et 36000 Da) Niblett <i>et al.</i> , 1991 in in Shukla <i>et al.</i> , 1994 |
| | 4.2 | | 42136 | |
| | 4.8 | | 38867 | |
| | 5.1 | | 37329 | |
| | 5.9 | | 33518 | |
| | 6.7 | | 30096 | |
| Isolat 4 Blé dur (Waha) | | 6.8 | 28926 | WSMV (30000-36000 Da) Chen, 1993 in Carroll <i>et al.</i> , 1995 |
| | | 7.9 | 21824 | - |
| Isolat 5 Blé dur (Chen S) | | 5.4 | 41400 | - |
| | | 6.9 | 28195 | - |
| | | 8.1 | 20735 | BSMV (21000 Da) Cornuet, 1987. |
| Isolat 6 Blé tendre (Anza) | | 5.05 | 45283 | WSMV (42000-47000 Da); Niblett <i>et al.</i> , 1991 in Shukla <i>et al.</i> , 1994 |
| | | 6.55 | 30839 | WSMV (30000-36000 Da) Chen, 1993 in Carroll <i>et al.</i> , 1995. Ou le WSMV (31000. 32000.33000 et 36000 Da) Niblett <i>et al.</i> , 1991 in Shukla <i>et al.</i> , 1994. |

- : pas de données ; BSA : bovine sérum albumine ; AC : anhydrase carbonique ; BLG : B lacto globuline ; LYS : lysozyme
P.M : Poids moléculaire ; Da : Dalton ; cm : centimètres

CONCLUSION

Ce travail, s'inscrit dans le cadre de la continuité des travaux sur les virus des céréales et dans la logique d'une meilleure connaissance des virus susceptibles d'affecter les céréales, en vue d'apprécier l'importance relative de chacun des virus existant dans la zone centre de l'Algérie.

La jaunisse nanisante de l'orge, bien que très répandue dans presque la totalité des zones céréalières de l'Algérie, n'est pas la seule maladie d'origine virale sur les céréales.

A partir des résultats obtenus, les prochains travaux sur les maladies virales des céréales doivent traiter des sujets qui incluraient :

- Un élargissement des prospections à toutes les zones céréalières de l'Algérie afin de détecter les virus mis en cause, à savoir le BSMV, WSSMV, WSMV.
- La recherche et l'étude d'autres virus, car les études effectuées jusqu'à présent ont été orientées sur les virus du BYDV.
- La sélection des variétés de blé et d'orge tolérantes aux virus de la mosaïque.

BIBLIOGRAPHIE

Bays D.-C., Cunfer B.-M., Demski J.-W., 1985 - Occurrence of wheat Spindle Streak Mosaic Virus on winter wheat in Georgia. *Plant disease*, 69, 12, 1094-1096.

Boubetra S., Mohamedi F., 1998 - Contribution à l'étude des virus affectant les céréales à pailles au niveau de la région centre d'Algérie. Identification sérologique et biologique de quelques isolats. Mémoire d'ingénieur en Agronomie, INA, El-Harrach, 55p.

Brakk M.-K., 1971 - Wheat Streak Mosaic Virus. Description of plant virus CMI/AAB, n°77.

Brunt A.-A., Crabtree K., Dallwitz M.-J., Gribbs A.-J., Watson L., 1997 - Viruses of plants. Descriptions and lists from the vide database. Ed. CAB international, 1484p.

Carroll J.-E., Gray S.-M., Bergstrom G.-C., 1995 - Use of antiserum to a New York isolate of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus to detect related Bymovirus from North America, Europe and Asia. *Plant disease*, 79, 4, 346-353.

- Carroll J.-E., Bergstrom G.-C., Grays S.-M., 1997** – Dynamics of Wheat Spindle Streak Mosaic Bymovirus in winter wheat. *European Journal of plant Pathology*, 103, 3, 313-321.
- Cornuet P., 1959** - Maladies à virus des plantes cultivées et méthodes de lutte. Ed. INRA, Paris, 440p.
- Cornuet P., 1987** - Eléments de virologie végétale. Ed. INRA, Paris, 206p.
- Hamilton R.-I., 1965** - An embryo test for detecting seed born Barley Stripe Mosaic Virus in Barley. *Phytopathology*, 55, 7, 798-799.
- Hewings A.-D., D'Arcy C.-J., 1986** - Comparative characterization of two Luteovirus: Beet Western Yellows Viruses and Barley Yellow Dwarf Virus. *Phytopathology*, 76, 11, 1270-1274.
- Jackson A.-O., Lane C., 1981** - Hordeivirus. In *Handbook of plant virus infections. Comparative diagnosis*. Ed. Kurstak E., North Holland, pp 566-625.
- Katri B., 1973** – Comparison of four virus isolates of Wheat Streak Mosaic from Turkey. *Phytopathology Mediterranean* 12, 67-71.
- Laemmler U.-K., 1970** - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4 *Nature*, 227, 680-685.
- Lommel S.-A., Willis W.-G., Kendall T.-L., 1986** - Identification of wheat Spindle Streak Mosaic Virus and its role in a new disease winter wheat in Kansas. *Plant disease*, 70, 10, 964-968.
- Parent G.-J., Asseline O., 1984** - Note on characterization and electrophoretic detection of Canadian isolate of AMV. *Phyto. Prot*, 65, 35-39.
- Sayoud R., Ezzahiri B., Bouznad Z., 1999** - Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. ITGC, Alger.
- Seifers D.-L., Martin T.-J., Harvey T.-L., Gill B.-S., 1995** - Temperature sensitivity and efficacy of wheat Streak Mosaic Virus resistance derived from Agropyron intermedium *Plant disease* 79, 11, 1104-1106.
- Shukla D.-D., Ward. C.-W., Brunt A. -A., 1994** - The potyviridae. Ed. CAB international, 516P.
- Slykhuis J.-T., 1965** - Mite transmission of plant viruses. *Advances in Virus Research* 11, 97-137.
- Slykhuis J.-T., 1976** - Wheat Spindle Streak Mosaic Virus. Description of plant virus CMI/AAB, n°167.
- Wiese M.-V., 1998** - Compendium of wheat diseases. Second .Ed. St-Paul (Minnesota), ED.APS, 112p.
- Ternynck C.-K., Avrameas S., 1987** - Techniques immuno-enzymatiques. Ed. Société française d'immunologie (techniques en immunologie), 102p.
- Anonyme.; 1995-1999** - Statistiques agricoles, superficie et production. Séries 1995-1999. Ed. Direction des statistiques agricoles et systèmes d'information. Ministère de l'Agriculture et du développement rural. Algérie.

**LA PCR QUANTITATIVE : UN POTENTIEL A CREUSER POUR LA PREVISION DU
DEVELOPPEMENT DES SYMPTOMES DE SEPTORIOSE**

D. GOUACHE ⁽¹⁾, S. SELIM ⁽²⁾, C. ROISIN⁽²⁾, J. SANSSENE ⁽²⁾

⁽¹⁾ ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL

Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, France

⁽²⁾ Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

19 rue Pierre Waguet – BP 30313 – F-60026 BEAUVAIS Cedex, France

Contact : d.gouache@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

La PCR quantitative permet de quantifier le développement du mycélium avant apparition des symptômes. Pour la septoriose du blé, maladie à incubation longue, un tel outil semble particulièrement intéressant. Il faut cependant être capable d'en interpréter les résultats en termes opérationnels. En 2007 et 2008, des cinétiques de biomasse fongique ont été obtenues sur des essais faisant l'objet d'observations de symptômes à pas de temps régulier. Les suivis de symptômes ont permis de déterminer la date d'explosion des symptômes. On montre qu'il existe une relation linéaire entre le résultat issu de la PCR quantitative et l'intervalle de temps entre la date du prélèvement et la date d'explosion des symptômes. Moyennant une amélioration de cette relation, la PCR quantitative pourrait donc s'inscrire dans des schémas d'avertissement ou de conseil.

Mots-clés : blé (*Triticum aestivum*), septoriose (*Mycosphaerella graminicola*), PCR quantitative, prévision

SUMMARY

**QUANTITATIVE PCR: A POTENTIALLY INTERESTING TOOL FOR PREDICTING
SYMPTOM DEVELOPMENT OF SEPTORIA TRITICI BLOTCH**

Quantitative PCR allows mycelial development of a pathogen to be followed before symptom expression. For the wheat disease septoria, which has long incubation times, this is of particular interest. The PCR results do however need to be interpreted into a operational recommendations. In 2007 and 2008, fungal biomass dynamics were followed in trials that were also the object of regular visual disease assessments. The onset of symptom development was thus calculated. We show that there is a linear relationship between the PCR results and duration of the interval separating tissue sampling and disease onset. Given an improvement of this relation, it could be used in advisory schemes.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*), septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*), quantitative PCR, prediction

INTRODUCTION

En France, la septoriose, maladie fongique foliaire causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est la plus dommageable sur blé tendre (*Triticum aestivum*), pouvant engendrer des pertes de rendement de l'ordre de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la maladie est essentiellement basé sur la lutte chimique. Cependant, cette lutte chimique est doublement remise en cause. Le développement de résistances aux matières actives par le pathogène a induit des baisses d'efficacité importantes (Maufras *et al.*, 2006 ; An., 2009). De plus, la pression sociétale s'est concrétisée par l'engagement pris lors du Grenelle de l'Environnement de réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques de 50% (An., 2007). Les modèles épidémiologiques et les outils d'aide à la décision permettant de caler au mieux le positionnement des traitements afin d'augmenter leur efficacité et/ou de diminuer leur nombre représentent des solutions permettant de répondre à ce double enjeu (Gouache et Couleaud, 2009). Les modèles peuvent cependant être complétés par des observations afin d'en augmenter la fiabilité. C'est le cas du modèle de développement des maladies foliaires proposé par Audsley *et al.* (2005), qui utilise des observations visuelles de maladie.

La septoriose est pourtant une maladie à incubation longue (Lovell *et al.*, 2004 ; Viljanen-Rollinson *et al.*, 2005) avec des valeurs rapportées allant de 11 à 37 jours. L'observation des symptômes à une date donnée ne fournit donc pas d'informations sur le développement de l'épidémie dans les 11 à 37 jours précédant l'observation. Pourtant, la quantification par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) existe sur septoriose (Fraaije *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2006) et permet de quantifier de manière présymptomatique le champignon, fournissant de bonnes relations entre avec d'autres variables quantifiant le niveau de maladie (nombre de lésions, nombre de pycnides, surface symptomatiques). Cet outil a été utilisé pour caractériser et étudier l'efficacité des fongicides (Guo *et al.*, 2007), les résistances variétales (Fraaije *et al.*, 2001), les progressions épidémiques (Fraaije *et al.*, 2002) et la résistance aux fongicides (Fraaije *et al.*, 2005). Cependant, la valeur prévisionnelle d'un tel outil a jusqu'à maintenant été peu explorée. On a donc cherché à relier le développement de symptômes à celui de la biomasse mycélienne caractérisée par PCR quantitative dans le cas de l'interaction blé tendre – *Septoria tritici*.

MATERIEL ET MÉTHODE

METHODOLOGIE DE QUANTIFICATION

Le traitement des échantillons et l'extraction d'ADN a été réalisée selon le protocole décrit dans Selim (2009). L'amplification du gène de β -tubuline (GenBank accession no. AY547264) ciblant un fragment de 63 paires de bases, selon une méthodologie dérivée de Bearchell *et al.* (2005), utilisant 0.3 μ M de chaque amorce, 0.2 μ M de sonde TaqMan et 200 ng d'ADN. Chaque réaction (volume total 25 μ l) contenait 1 volume de PCR master mix (Applied Biosystems, USA). Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 10 min à 95°C, suivies de 40 cycles de 15 s à 95°C et d'une min à 60°C. réalisées avec un appareil de type ABI PRISM 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, USA).

CONDUITE DES EXPERIMENTATIONS

Des prélèvements ont été réalisés sur deux types d'essais implantés en 2007 et 2008 sur le site de Villiers-le-Bac (91). Ces essais sont décrits dans le tableau I. Deux d'entre eux (2007-D et 2008-D) ont été décrits dans Gouache et Robert (2009) et étudiaient différentes variétés. Le dernier concernait la variété Soissons, cultivée à deux niveaux d'azote, dose X et dose X-50 kg N/ha, X étant la dose prévisionnelle calculée par la méthode des bilans. Les essais étaient conduits en traité et non-traité fongicides, et pour le reste de la conduite selon les standards locaux. On ne traitera ici que des parcelles non-traitées.

Tableau I : Caractéristiques des essais

| Essai | Année de récolte | Modalités prélevées | Date de semis | Dates de prélèvement | Organes prélevés | Nombre de notations maladie |
|--------|------------------|--------------------------------------|---------------|--|------------------|-----------------------------|
| 2007-D | 2007 | Charger, Paledor, Royssac, Toisonдор | 09/10/2006 | 04/05, 04/06 | F1, F2, F3 | 8 |
| 2008-D | 2008 | Dinosor, Toisonдор | 19/10/2007 | 08/04, 15/04, 21/04, 29/04, 05/05, 13/05, 21/05, 02/06, 09/06, 17/06, 23/06, 30/06 | F1, F4 | 6 |
| 2008-F | 2008 | Soissons dose X, Soissons dose X-50 | 12/11/2007 | | | 6 |

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Pour chaque parcelle et chaque étage foliaire, un prélèvement est constitué de 20 feuilles échantillonnées le long d'un transect de la parcelle en évitant les rangs de bordure. L'humidité résiduelle a été enlevée par tamponnage avec papier absorbant. Les échantillons ont ensuite été expédiés au laboratoire de Lasalle-Beauvais en service 24 heures.

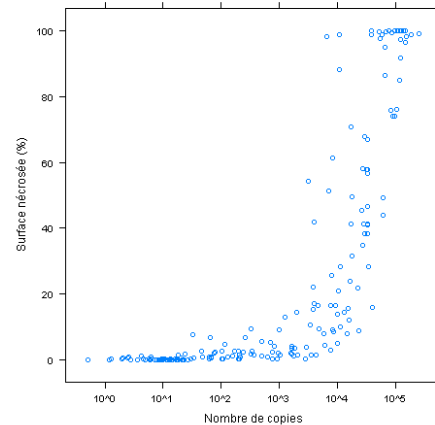
ANALYSE ET TRAITEMENT DES DONNEES

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel statistique R (R Development Core Team, 2007). Les analyses ROC (Receiver-Operator Characteristic) ont été réalisées avec la bibliothèque de fonctions ROCR (Sing et al., 2007). L'analyse des cinétiques de progression de symptômes a été réalisée par ajustement de courbes de Gompertz selon la méthodologie décrite dans Gouache et Robert (2009).

RESULTATS

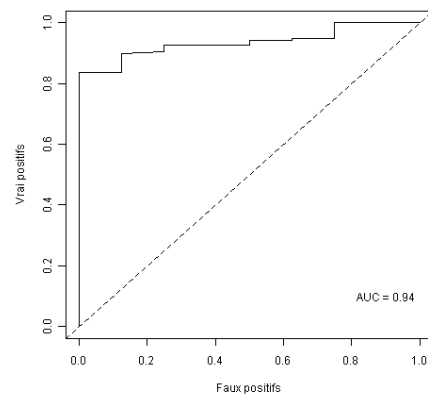
RELATION DIRECTE NOMBRE DE COPIES D'ADN ET SYMPTOMES

A la lecture de la figure 1a, qui représente la relation entre le nombre de copies d'ADN et les surfaces nécrosées, il apparaît que la présence de symptômes est liée au dépassement d'un seuil de nombre de copies d'ADN compris entre 10^1 et 10^2 . Une analyse en courbe ROC (Hughes *et al.*, 1999) des données met effectivement en avant le fait que le nombre de copies est un très bon indicateur de présence/absence de symptômes : en effet, la courbe s'éloigne fortement de la bissectrice, et l'aire sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) s'approche très fortement de 1 (figure 1b).



(a)

Figure 1 : Analyse de la relation entre résultats de PCR quantitative et surfaces nécrosées. *Analysis of the relationship between quantitative PCR and necrotic area* (a) Surfaces nécrosées en fonction du nombre de copies d'ADN (échelle logarithmique). *Necrotic area explained by number of DNA copies (log scale)*. (b) Courbe ROC analysant l'efficacité du nombre de copies d'ADN comme indicateur de présence/absence de symptômes. *ROC curve analysis of number of DNA copies as an indicator of presence/absence of symptoms*.



(b)

RELATION ENTRE CINÉTIQUES DE NOMBRE DE COPIES D'ADN ET DE SYMPTOMES

Pour approfondir le lien entre niveau de symptômes et résultat de la PCR quantitative, on a ajusté une courbe de Gompertz à chaque courbe d'évolution de symptômes sur chaque étage foliaire prélevé au cours des essais. Cela a permis de caractériser à chaque fois le paramètre de position de la cinétique de développement des symptômes : il s'agit du t_{90} qui représente la date à laquelle 10% de symptômes nécrotiques sont apparus sur l'étage foliaire (Gouache et Robert, 2009). On considère que ce paramètre indique le moment du décollage de la maladie sur l'étage foliaire étudié. On a ensuite représenté l'évolution des quantités d'ADN en fonction des sommes de températures à partir de différentes origines : le semis, la date d'émergence de l'étage foliaire étudié, et la date correspondant au décollage de la maladie sur l'étage foliaire étudié (Figure 2a). On observe que le calage des sommes de température en fonction de la date de décollage de la maladie permet de regrouper les points en une cinétique. Ainsi, on peut considérer, en inversant les axes, que le nombre de copies d'ADN est une variable explicative et que le temps entre la date du prélèvement et la date d'explosion de la maladie est la variable à prédire (Figure 2b). Il apparaît donc possible de prévoir par le biais d'une quantification d'ADN fongique le développement ultérieur du champignon. La régression correspondante est hautement significative ($p < 10^{-16}$) et affiche un R^2 de 0.90. Cependant, un bruit persiste, l'erreur quadratique moyenne étant de 78.54 °C.

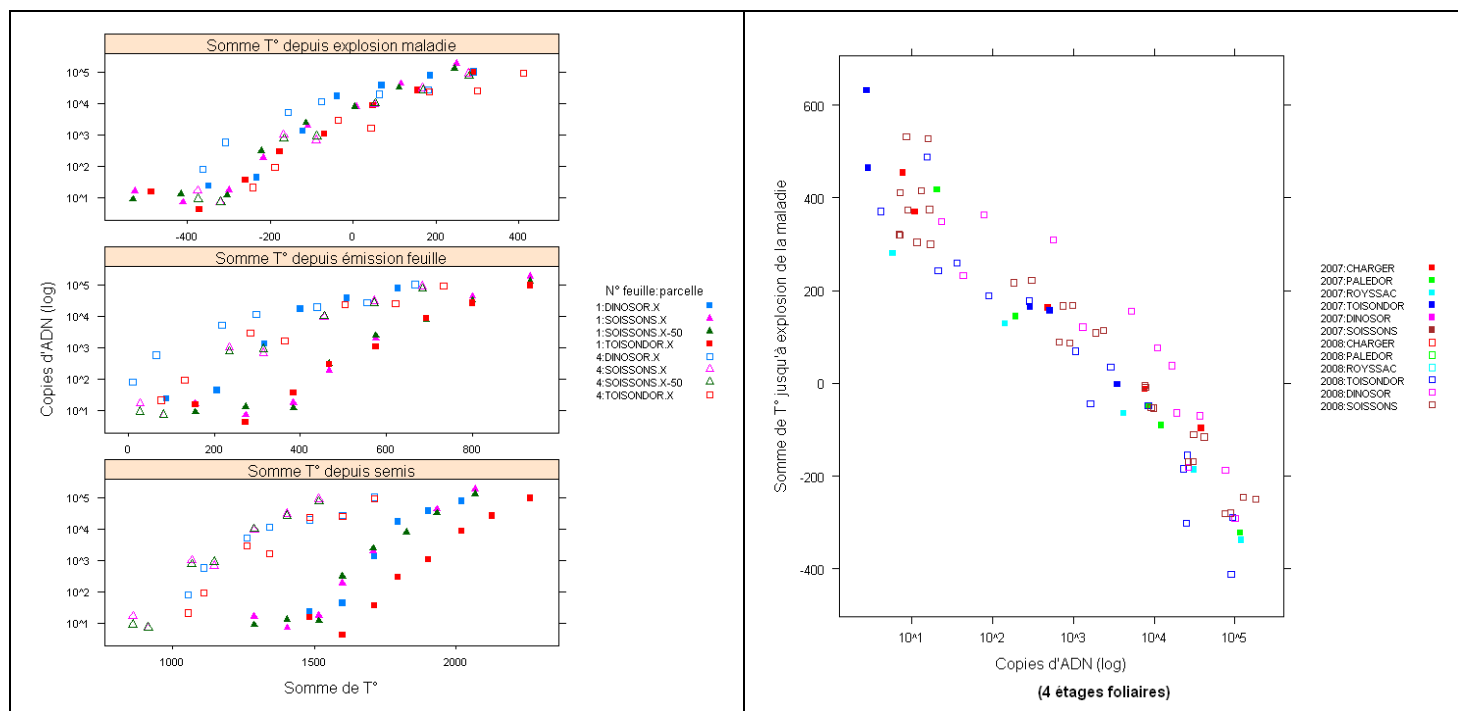


Figure 2 : (a) Cinétique de nombre de copies d'ADN (échelle logarithmique) en fonction de sommes de températures exprimées en fonction de différentes origines pour les essais de l'année 2008. *Evolution of the number of DNA copies (log scale) over thermal time from various origins (from bottom to top: from sowing, from leaf emergence, from symptom explosion) for 2008 trials.* (b) Utilisation du nombre de copies d'ADN comme variable prédictive du temps entre la date du prélèvement et l'explosion de la maladie. *Use of the number of DNA copies as a predictor of the time from sampling to symptom explosion, as characterized by t_{90} .*

Nous avons réalisé essai par essai des séries d'analyses de covariance pour appréhender l'origine de la variabilité autour de cette relation (Tableau I). On remarque qu'à l'exception de l'essai 2008-D, il n'y a pas d'effets d'interaction significatifs avec le nombre de copies. Cependant, sur cet essai, cet effet est peut être à relier à une légère attaque de rouille jaune mal maîtrisée qui a pu perturber la quantification visuelle des symptômes. On note qu'il n'y a pas non plus d'effet de la conduite azoté sur cette relation. L'effet variété apparaît par contre dans tous les cas sauf un significatif au seuil de 5%. Il semble également y avoir un effet étage foliaire, mais celui-ci semble moins net. La pente de la relation étudiée apparaît donc comme plutôt stable, et le bruit observé autour de celle-ci comme étant du à des effets de la variété ou de l'étage foliaire.

Tabelau I : Résultats des analyses de covariance : niveau des significativité des effets des modalités testées (variété ou azote) et de l'étage foliaire sur la relation entre nombre de copies d'ADN et délai jusqu'à l'explosion des symptômes. L'effet du nombre de copies, non-représenté, est systématiquement hautement significatif. *Results of covariance analyses : level of signficancy of the experimental factors (cultivar or nitrogen) and leaf layer on the relation between the number of DNA copies and time to symptom explosion.*

| Essais 2007 – D et 2008 - D | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|--|---|---|
| Effet testé | Variété | Etage foliaire | Interaction étage foliaire - variété | Interaction variété – nombre de copies | Interaction étage foliaire – nombre de copies | Interaction étage foliaire – variété – nombre de copies |
| 2007-D | 5.2*10 ⁻⁴ | non testé | non testé | 0.18 | non testé | non testé |
| 2007-D sans F3 | 0.0035 | 0.054 | 0.49 | 0.24 | 0.38 | 0.38 |
| 2008-D | 1.4*10 ⁻⁶ | 0.19 | 0.0029 | 0.57 | 0.17 | 0.031 |
| 2008-D sans F4 | 0.062 | non testé | non testé | 0.10 | non testé | non testé |
| Essai 2008 - F | | | | | | |
| Effet testé | Azote | Etage foliaire | Interaction étage foliaire - variété | Interaction azote – nombre de copies | Interaction étage foliaire – nombre de copies | Interaction étage foliaire – variété – nombre de copies |
| 2008 - F | 0.81 | 8.5*10 ⁻⁵ | 0.69 | 0.56 | 0.38 | 0.75 |

DISCUSSION

La PCR quantitative appliquée aux pathogènes permet d'en quantifier le niveau *in planta* avant même l'expression de symptômes visibles. Sur septoriose, cet outil a été déployé dans de nombreuses études, démontrant son intérêt pour l'étude des résistances variétales (Fraaije *et al.*, 2001), de l'efficacité des fongicides (Guo *et al.*, 2007) et des résistances des pathogènes (Fraaije *et al.*, 2001) à ceux-ci, et des progressions épidémiques dans des couverts aux architectures différenciées (Fraaije *et al.*, 2002). La quantification présymptomatique d'un pathogène offre aussi un potentiel pour améliorer le déploiement de méthodes de lutte, mais comme l'ont souligné Lockley *et al.* (1996), cela implique de pouvoir relier de manière robuste la mesure réalisée au développement ultérieur du pathogène, puis de relier ce développement à une action par le biais de règles de décision. Des expériences existent avec d'autres outils de quantification présymptomatique, comme l'immunodiagnostic, pour déclencher des interventions fongicides. Kendall *et al.* (1998) ont par exemple établi un seuil de déclenchement du 2^{ème} traitement anti-septoriose avec ce type d'outil. Cependant, ces schémas sont limités car ce type de diagnostic ne permet pas de projection dans l'avenir.

On a montré que la quantité d'ADN mesurée par PCR quantitative pouvait effectivement être reliée aux niveaux de symptômes, premièrement en tant qu'indicateur de présence/absence, mais surtout en tant qu'outil de prédiction du développement ultérieur des symptômes. Cela correspond bien aux observations réalisées par Kema *et al.* (1996) décrivant le développement du mycélium dans la feuille comme très lent pendant une longue phase puis

accélération très fortement peu avant l'apparition des symptômes : l'apparition des symptômes et le développement de la biomasse du mycélium semblent très liés. L'étude de la relation entre quantité de mycélium (évaluée par PCR quantitative) et temps (en degré-jours base 0 °C) restant entre la date du prélèvement et la date d'explosion des symptômes a cependant montré qu'il existe des effets non encore pris en compte. La pente de la relation est apparue comme plutôt stable, mais cela demanderait d'être vérifié sur un plus grand nombre de situations, et en particulier de variétés connues pour leur résistance quantitative. On a pu constater un effet de la variété et un effet de l'étagage foliaire sur cette relation. Le peu d'effet constaté sur la pente de la relation semble exclure l'hypothèse d'une différence de vitesse de croissance mycélienne pour expliquer cet effet. Ces effets demandent donc à être creusés.

Rohel *et al.* (2002) dans un travail sur l'efficacité des matières actives ont signalé la difficulté de relier développement de la biomasse mycélienne estimée par PCR quantitative au développement ultérieur des symptômes. Une analyse préliminaire des données présentées dans cet article avec la méthode présentée ici laisse penser qu'un effet des traitements fongicides existe sur cette relation, en interaction avec l'étagage foliaire. Cependant, la sensibilité de la méthodologie de quantification n'étant pas la même, il est difficile de tirer une conclusion.

On montre dans cette étude que la PCR quantitative semble pouvoir être un prédicteur robuste des futurs symptômes de septoriose. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de la septoriose, pathogène à temps de latence élevé, pouvant dépasser 4 semaines, (Lovell *et al.*, 2004 ; Viljanen-Rollinson *et al.*, 2005). En effet, une observation visuelle ne permet pas d'appréhender l'ensemble des contaminations ayant eu lieu moins d'une latence auparavant, contrairement à cet outil, qui, selon sa sensibilité, permet d'obtenir une quantification 2 à 3 semaines avant apparition des symptômes. La capacité prédictive de la PCR quantitative ouvre ainsi une porte à son utilisation dans des schémas de conseil ou d'aide à la décision. L'utilisation d'observations visuelles de symptômes peut permettre d'ajuster au mieux aux conditions parcellaires un modèle épidémiologique (Audsley *et al.*, 2005). Ces modèles peuvent à leur tour être utilisés pour fournir un conseil technique, de décision de traitement par exemple (Gouache et Couleaud, 2009). On peut par le biais de la relation étudiée ici envisager de remplacer l'observation visuelle par une mesure de PCR quantitative, qui apporterait ainsi 2 à 3 semaines d'informations supplémentaires. L'assimilation de données dans les modèles de fonctionnement (Naud *et al.*, 2009) pourrait être une piste pour mettre cela en oeuvre.

CONCLUSION

On montre l'intérêt de la PCR quantitative comme outil permettant une prédiction robuste du développement ultérieur des symptômes de septoriose. Une meilleure compréhension des effets des variétés et des fongicides, sur cette relation apparaît cependant nécessaire. Dans le cadre de la prévision, toute amélioration de la sensibilité des méthodes de quantification par PCR pour des faibles quantités de pathogène serait très intéressante. L'intégration de cet outil dans des schémas de conseil par le biais de modèles épidémiologiques semble donc possible.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Il a été soutenu par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. » La poursuite du travail est en cours avec l'appui du FSOV (Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale) dans le cadre du projet intitulé « Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *Mycosphaerella graminicola* ».

Les auteurs tiennent à remercier l'ensemble des équipes techniques de La Minière qui ont permis d'obtenir les données. Anne-Sophie Rabetsarazaka est remerciée pour son appui

technique et l'analyse préliminaire des données de 2008. Florent Duyme est remercié pour son appui statistique.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 2007. Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » in : Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »
http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf

Anonyme. 2009. Note commune : état des lieux et recommandations pour 2009. Perspectives Agricoles 354, 48-52.

Audsley, E., Milne, A., Paveley, N., 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. *Aspects of Applied Biology* 147, 161-172.

Bearchell, S. J., B. A. Fraaije, M. W. Shaw, and B. D. L. Fitt. 2005. Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (15):5438-5442.

Fraaije, B. A., D. J. Lovell, J. M. Coelho, S. Baldwin, and D. W. Hollomon. 2001. PCR-based Assays to Assess Wheat Varietal Resistance to Blotch (*Septoria Tritici* and *Stagonospora Nodorum*) and Rust (*Puccinia Striiformis* and *Puccinia Recondita*) Diseases. *European Journal of Plant Pathology* 107 (9):905-917.

Fraaije, B. A., D. J. Lovell, and S. Baldwin. 2002. *Septoria* epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape. In EFPP - 6th. Prague.

Fraaije, B. A., H. J. Cools, J. Fontaine, D. J. Lovell, J. Motteram, J. S. West, and J. A. Lucas. 2005. Role of ascospores in further spread of Qol-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95 (8):933-941.

Gouache, D., C. Robert. 2009. Un nouvel indicateur de classement variétal vis-à-vis de la septoriose prenant en compte la précocité variétale. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Gouache, D., G. Couleaud. 2009. Le positionnement des traitements fongicides : enjeu pour la septoriose et intérêt du modèle « SeptoLIS ». In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Guo, J. R., F. Schnieder, and J. A. Verreet. 2006. Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. *FEMS microbiology letters* 262 (2):223-229.

Guo, J. R., F. Schnieder, and J. A. Verreet. 2007. A Real-time PCR Assay for Quantitative and Accurate Assessment of Fungicide Effects on *Mycosphaerella graminicola* Leaf Blotch. *Journal of Phytopathology* 155 (7):482-487.

Jorgensen, L.N., Jahn, M., Clark, W., Antichi, D., Goral, T., Schepers, H., Lucas, P., Rolland, B., Gouache, D., Hornok, L., 2008. Endure Wheat Case Report

Kema, G. H. J., D. Yu, F. H. J. Rijkenberg, M. W. Shaw, and R. P. Baayen. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86 (7):777-786.

Kendall, S. J., D. W. Hollomon, and A. Selley. 1998. Immunodiagnosis as an aid to the timing of fungicide sprays for the control of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in the UK. In Brighton Crop Protection Conference. Brighton: British Crop Protection Council.

Hughes, G., N. McRoberts, F. J. Burnett. 1999. Decision-making and diagnosis in disease management. *Plant Pathology* 48, 147–153

Lockley, K. D., N. D. Paveley, A. J. Leadbeater, J. A. Smith, G. M. Booth, and G. Marshall. 1996. The value of ELISA diagnostics as tools to optimise fungicide use for the control of *Septoria tritici* in winter wheat. In British Crop Protection Council Symposium Proceedings.

Lovell, D. J., Hunter, T., Powers, S. J., Parker, S. R., van den Bosch, F.. 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53, 170-181.

Maufras J. Y., Maumene C., Couleaud G., Bousquet N, 2006. Comment résister à la résistance? *Perspectives Agricoles* 328, 30-36

Naud, C., D. Makowski, M.H. Jeuffroy. 2009. Leaf transmittance measurements can improve predictions of the nitrogen status for winter wheat crop. *Field Crops Research* 110: 27-34.

R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rohel, E. A., P. Laurent, B. A. Fraaije, N. Cavelier, and D. W. Hollomon. 2002. Quantitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field. *Pest Management Science* 58 (3):248-54.

Selim, S. 2009. Allele-specific real time PCR for quantification and discrimination of sterol 14 a-demethylationinhibitor-resistant genotypes of *Mycosphaerella graminicola*. *Journal of Plant Pathology* *accepté*

Sing, T., O. Sander, N. Beerenwinkel, T. Lengauer. 2007. ROCR: Visualizing the performance of scoring classifiers. R package version 1.0-2. <http://rocr.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>

Viljanen-Rollinson, S. L. H., Marroni, M. V., Butler, R. C., Deng, Y., Armour, T., 2005. Latent periods of septoria tritici blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection* 58, 256-260.

**CARACTERISATION DES POPULATIONS FRANÇAISES D'OIDIUM INFESTANT
LE TRITICALE**

A.-S. WALKER^{1*}, A. BOUGUENNEC, J. CONFAIS¹, G. MORGANT¹ et P. LEROUX¹

¹ INRA, UMR BIOGER-CPP, Avenue Lucien Bretignières, F78850 Thiverval-Grignon

² INRA, UMR Génétique, Diversité et Ecophysiologie des céréales, 234 avenue du Brézat, F63100 Clermont- Ferrand

* walker@versailles.inra.fr

RESUME

Depuis les années 2000, plusieurs variétés de triticales sont régulièrement infestées par l'oïdium *Blumeria graminis* alors qu'elles en étaient auparavant exemptes. L'origine hybride du triticales (seigle x blé) permet de supposer, pour cette nouvelle entité, soit une origine existante (oïdium du blé ou du seigle), soit une origine hybride de cette nouvelle entité. Ce travail a permis de caractériser au moins sept profils d'adaptation à l'hôte chez l'oïdium du triticales qui attaque, au stade plantule, quasiment toutes les variétés de triticales testées, plusieurs variétés de blé, et ponctuellement, le seigle, se distinguant ainsi des formes spéciales existantes. Aucune résistance aux fongicides n'a été détectée dans ces populations. Des analyses phylogénétiques utilisant différents marqueurs ont permis de différencier l'oïdium du seigle d'une part, de l'oïdium du blé et du triticales d'autre part. Finalement, l'oïdium du triticales aurait dérivé de l'oïdium du blé et aurait contourné les gènes de résistance à l'oïdium présents en faible diversité dans les variétés actuelles de triticales

Mots-clés : oïdium, triticales, adaptation à l'hôte, phylogénie, résistance aux fongicides.

SUMMARY

CARACTERISATION OF FRENCH POWDERY MILDEW POPULATIONS INFESTING TRITICALE

Since the early 2000s, many triticales cultivars are regularly infested by powdery mildew caused by *Blumeria graminis*, whereas they were free of this fungus before. As triticales is a hybrid between wheat and rye, the origin of this novel entity could be an existing *forma specialis* of *B. graminis* (possibly *tritici* or *secalis*) or an hybrid between the former. This work enabled us to characterize at least seven resistance profiles within triticales powdery mildew populations, infesting plantlets of nearly all triticales cultivars, several wheat cultivars and sometimes rye. No resistance to fungicides was detected within these populations. Phylogenetic analyses using several genetic markers differentiated rye mildew from triticales and wheat mildew. At last, triticales *B. graminis* may have derived from wheat powdery mildew and overcome resistance genes present in low diversity in the actual triticales cultivars and probably inherited from wheat.

Keywords: powdery mildew, triticales, host adaptation, phylogeny, resistance to fungicides

INTRODUCTION

Le « blanc » des céréales est une maladie causée par le champignon biotrophe obligatoire *Blumeria graminis*. Cette maladie se caractérise par le développement dès le printemps de colonies blanches à jaunâtres couvrant les feuilles ou les épis. Le champignon produit des fructifications sphériques noires ou cléistothèces, organes de la reproduction sexuée, en fin de saison et se conserve sur des résidus végétaux pendant l'hiver. Au sein de cette espèce fongique, plusieurs « formes spéciales » (ou *formae speciales f. sp.*) attaquent sélectivement diverses céréales cultivées, selon une relation hôte-parasite très stricte (Marchal 1902). Ainsi, les formes spéciales *B. graminis f. sp. tritici, secalis, avenae* et *hordei* attaquent respectivement le blé, le seigle, l'avoine et l'orge. Ainsi, lorsqu'une forme spéciale d'oïdium est inoculée sur une espèce végétale non hôte, des analyses microscopiques ont montré que si les spores étaient capables de germer, elles ne pouvaient pénétrer dans les cellules végétales, probablement à cause des réactions de défense mises en place par la plante (Olesen, Carver et al. 2003). Plusieurs auteurs ont suggéré que les formes spéciales actuelles observées dérivent d'une même population ancestrale d'oïdium non spécialisée qui se serait adaptée aux différents hôtes présents. L'oïdium et les graminées auraient alors co-évolué graduellement au cours de la domestication des céréales pour aboutir à la relation hôte-parasite que nous connaissons actuellement. En conséquence, les arbres phylogénétiques (les représentations qui illustrent les relations génétiques entre les différentes entités) des céréales et des oïdiums se superposent au moins partiellement : l'oïdium du blé est ainsi plus différent de l'oïdium de l'avoine qu'il ne l'est de l'oïdium du seigle... et le blé est plus proche du seigle qu'il ne l'est de l'avoine (Catalan, Kellogg et al. 1997; Wyand and Brown 2003; Inuma, Khodaparast et al. 2007).

Le blé (*Triticum sp.*) et le seigle (*Secale cereale*) appartiennent tous deux à la tribu des *Triticae* (Catalan, Kellogg et al. 1997) et sont cultivés depuis l'Antiquité. Le premier croisement entre ces deux plantes génétiquement proches a été obtenu en 1875 par Wilson mais n'a donné que des descendants stériles. Des plantes partiellement fertiles ont ensuite été obtenues par Rimpau en 1888 mais il a fallu attendre l'utilisation de la colchicine en 1938 par Müntzig pour produire plus facilement des hybrides fertiles (Ammar, Mergoum et al. 2004). Le principal intérêt de cet hybride pour les agronomes était de cumuler dans une même plante des qualités des deux parents, à savoir la tolérance au froid et aux maladies et l'adaptation aux sols et climats difficiles du seigle et les qualités nutritionnelles et de productivité du blé. Ce nouvel hybride intergénérique fut dénommé *x Triticosecale* (triticale) par Wittmack. Les triticales obtenus par ce type de croisement (triticales primaires) combinent les génomes A, B et D du blé tendre ou A et B du blé dur avec le génome R du seigle. Ces triticales hexaploïdes (6x) ou octoploïdes (8x) génétiquement variés sont alors recroisés entre eux, ou avec du blé, du seigle ou un autre triticales pour donner au final des variétés de triticales hexaploïdes stabilisées et utilisables au champ. La résistance aux maladies du triticales est alors transmise *via* ses géniteurs. Concernant la résistance à l'oïdium, les gènes de résistance (dits *Pm* pour powdery mildew) sont transmis aux lignées de triticales s'ils sont présents dans les génomes R du seigle et/ou A et B du blé. Au moins 31 gènes *Pm* sont actuellement caractérisés chez ces deux espèces de céréales, et de nouveaux sont régulièrement identifiés (Tyrka and Chelkowski 2004). Dans le monde, les gènes les plus répandus sont *Pm1*, *Pm3*, *Pm9*, *Pm10* et *Pm15* (Tosa, Kusaba et al. 1995; Doussinault, Pavoine et al. 2001). Cependant, la procédure complexe de sélection des triticales rend difficile la prédiction des gènes *Pm* transmis aux variétés de triticales, d'autant plus que ce critère n'était pas prépondérant pour les sélectionneurs jusqu'à une date récente.

Or, depuis le début des années 2000, les agronomes observent régulièrement de fortes infestations d'oïdium sur les variétés de triticales dans plusieurs pays européens, dont la France (Du Cheyron and Masson 2007). Des variétés, résistantes à l'inscription au catalogue sont maintenant totalement sensibles et nécessitent l'utilisation de fongicides. Des pertes de rendement allant jusqu'à 20% ont pu être observées dans de nombreuses situations

d'infestation par l'oïdium, remettant même parfois en cause l'intérêt de l'utilisation du triticale. Face à ce phénomène nouveau, l'objet de notre travail a été de caractériser cette nouvelle entité infectant le triticale, et en particulier de comprendre s'il pouvait s'agir d'une forme spéciale préexistante et qui se serait adaptée à ce nouvel hôte ou d'un hybride entre des formes spéciales actuelles, potentiellement *secalis* et *tritici*. La réponse à cette question d'importance devrait permettre d'orienter au mieux la sélection des futures variétés de triticale et de choisir l'origine des gènes *Pm* à y inclure.

MATERIEL ET METHODE

Collection d'isolats et production d'inoculum

Les échantillons de *Blumeria graminis* ont été collectés en France en 2006 et en 2007 dans des parcelles de blé, seigle, triticale, avoine et orge, soit directement par prélèvement de feuilles malades, soit en utilisant des pots pièges constitués d'une variété sensible de la céréale considérée. Les isolats sont conservés sur des fragments de feuilles de la céréale concernée maintenus en survie sur un milieu gélosé contenant 12,5 g/l d'agar et 30 mg/l de benzimidazole comme anti-chlorotique (Walker, Wilhelm et al. 2006). Les cultures sont conservées sous forme conidienne pendant 10 jours à 17°C et avec une photophase de 12h avant utilisation. Les variétés suivantes sont utilisées pour conserver les différentes formes spéciales d'oïdium : Audace (blé), Rasant (seigle), Champie (orge) et Ourasi (avoine). Les échantillons collectés sur triticale ont été maintenus sur la variété Maximal.

Analyse des profils de résistance à l'hôte

Les profils de résistance à différents hôtes ont été établis en infectant des fragments de feuilles de différentes céréales et cultivars avec des conidies d'oïdium de 10 jours. Trois panels ont été testés, contenant chacun une paire de fragments de feuilles des variétés listées dans le tableau 1 : (1) un panel constitué des 5 variétés de céréales (2) un panel constitué d'une grande diversité de triticales et (3) un panel constitué d'une grande diversité de blés. Les paires de fragments de feuilles sont disposées dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre selon 2 combinaisons aléatoires correspondant à 2 répétitions du test. Les notations sont effectuées après 10 jours d'incubation et une note est attribuée à chaque variété : 0 : pas d'infestation ; 1 : quelques pustules, éventuellement anormales ; 2 : pustules couvrant moins de 50% de la surface du fragment ; 3 : infestation normale, abondante et sporulante, couvrant plus de 50% de la surface du fragment.

Resistance aux fongicides

Les tests ont été réalisés comme décrit précédemment (Walker, Wilhelm et al. 2006), en utilisant des doses discriminantes des différents fongicides dilués dans l'eau stérile : azoxystrobine (Amistar) 25 mg/l ; fenpropidine (Gardian) 10 mg/ ; triadiménol (Bayfidan) 16 mg/l ; quinoxifène (Fortress) 3 mg/l ; cyflufenamid (Cyflamid) 0,5 mg/l ; métrafénone (Flexity) 10 mg/l. Les fragments de feuilles de la céréale utilisée pour conserver la souche sont traités à la tour de Burgerjon, puis inoculés avec les isolats à tester et incubés pendant 10 jours. La notation (présence/absence) d'infestation normale et sporulante est notée pour chaque condition et chaque test est répété 2 à 3 fois.

Techniques de biologie moléculaire

Après extraction de l'ADN des différents isolats, plusieurs gènes fongiques ont été amplifiés par PCR avant séquençage : β -tubuline *tub2* (Wyand and Brown 2003), chitine synthase *chs1* (Inuma, Khodaparast et al. 2007), ITS (White, Bruns et al. 1990), IGS (James, Moncalvo et al. 2001) et le facteur d'élongation *ef1a*, amplifié pour cette étude à partir des séquences d'EST de *B. graminis f.sp. hordei* disponibles dans les banques de données. Le gène codant pour la cible des triazoles, la 14 α -déméthylase, a également été amplifié par PCR pour vérifier les mutations liées à la résistance à cette classe de fongicides (Wyand and Brown 2005) mais également pour compléter les analyses phylogénétiques. Les protocoles de PCR et d'extraction sont décrits dans une publication soumise récemment (Walker, Bouguennec et al. 2009).

Analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues précédemment ont été corrigées, alignées et assemblées pour chaque gène et chaque isolat et comparées aux séquences de référence présentes dans les bases de données internationales. Pour chaque forme spéciale d'oïdium, un représentant de chaque haplotype a été conservé pour construire un arbre phylogénétique montrant la relation génétique entre les différents haplotypes de toutes les formes spéciales. Un arbre concaténé a également été réalisé en groupant les séquences de tous les marqueurs sauf celles du facteur d'élongation, pour lequel nous n'avons pu séquencer la forme spéciale *avenae*. Les arbres ont été construits selon la méthode du maximum de vraisemblance (ML) à l'aide du logiciel PhyML (Guindon and Gascuel 2003) et la représentativité des branches a été testée par 1000 bootstraps.

RESULTATS

Spécificité d'hôte chez l'oïdium des céréales (tableau 1 ; figure 1)

Les 41 isolats de l'étude ont été cultivés sur les 22 cultivars du tableau 1 et les résultats d'infection ont permis de décrire 13 profils d'adaptation à l'hôte. Le profil AA1, représenté par 5 isolats collectés sur seigle montre une croissance optimale sur les 2 variétés de seigle et servent de témoin *B. graminis f. sp. secalis*. La croissance des isolats de profils AA2 et AA3 est limitée respectivement à l'orge et à l'avoine et correspond à celle des formes spéciales *B. graminis f. sp. hordei* et *B. graminis f. sp. avenae* collectées sur ces céréales. Les isolats de profils AC, AD et AE se distinguent par leur capacité à infecter différentes variétés de blé mais pas significativement de triticales ou de seigle. Ces souches, toutes collectées en parcelle de blé sauf pour une isolée d'un pot piège de blé placé en parcelle de triticales (figure 1), correspondent à la forme spéciale *tritici*.

Enfin, les sept autres profils (BA à BH) sont les seuls à présenter une croissance significative sur toutes les variétés de triticales, à l'exception de FDT4015. Ces profils sont par contre mieux discriminés par les variétés de blé et n'infectent jamais Koréli et Lancelot. Lorsqu'elles sont observées, les infestations sur seigle sont très faibles (note moyenne inférieure ou égale à 1). Parmi ces profils adaptés au triticales, le profil BB semble dominant, avec 13 isolats, soit 52% des isolats collectés sur triticales. Les autres profils sont plus rares et sont parfois représentés par un seul isolat (BA, BH).

Tableau I : Profils de résistance à différentes variétés de céréales obtenues pour divers isolats de *Blumeria graminis*

Table I: Profiles of resistance to different cereal cultivars obtained for various isolates of *Blumeria graminis*

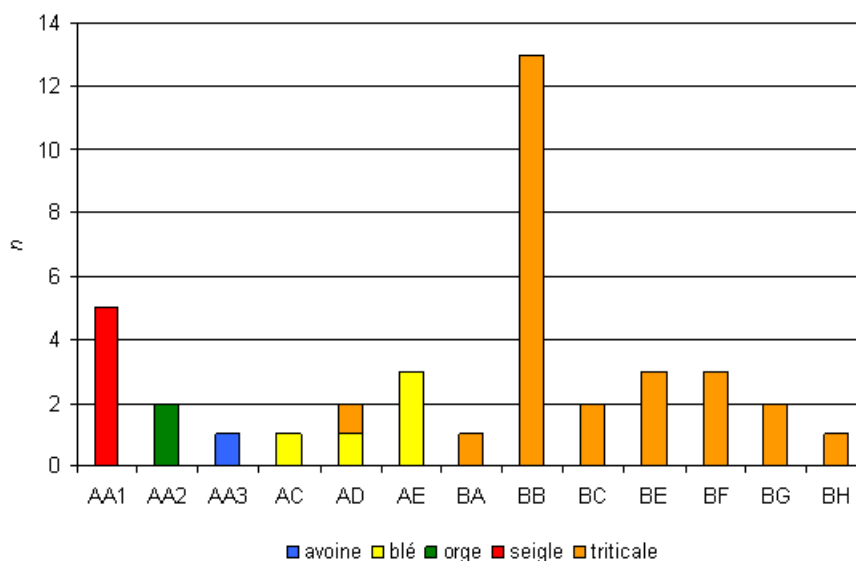
| Profil (n) | | AA1 (5) | AA2 (2) | AA3 (1) | AC (1) | AD (2) | AE (5) | BA (1) | BB (13) | BC (2) | BE (3) | BF (3) | BG (2) | BH (1) |
|------------|------------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Triticale | Maximal | | | | | | | | | | | | | |
| | FDT04015 | | | | | | | | | | | | | |
| | Bienvenu | | | | | | | | | | | | | |
| | Aprim | | | | | | | | | | | | | |
| | Ragtac | | | | | | | | | | | | | |
| | Bellac | | | | | | | | | | | | | |
| | RATR 02-70 | | | | | | | | | | | | | |
| | Rotego | | | | | | | | | | | | | |
| | Tricolor | | | | | | | | | | | | | |
| Blé | Audace | | | | | | | | | | | | | |
| | Koreli | | | | | | | | | | | | | |
| | Ephoros | | | | | | | | | | | | | |
| | Raspail | | | | | | | | | | | | | |
| | Toreador | | | | | | | | | | | | | |
| | Apache | | | | | | | | | | | | | |
| | Lancelot | | | | | | | | | | | | | |
| | Périclès | | | | | | | | | | | | | |
| Seigle | Rasant | | | | | | | | | | | | | |
| | Pollino | | | | | | | | | | | | | |
| Orge | Champie | | | | | | | | | | | | | |
| Avoine | Ourasi | | | | | | | | | | | | | |

En vert : interactions présentant une moyenne des notes supérieures ou égale à 2 (infestation normale et abondante)

En rouge : interactions présentant une moyenne des notes inférieures à 2 (infestation faible, anormale ou inexistante)

Figure I : Origine des isolats de *B. graminis* étudiés, selon leur céréale d'origine et leur profil de résistance

Figure I: Origin of *Blumeria graminis* isolates, according to their cereal of origin and resistance profile



Sensibilité aux fongicides (tableau 2)

La résistance aux strobilurines (Qols) a été trouvée chez les profils AA1 (*B. graminis f. sp. secalis*), AA2 (*B. graminis f. sp. hordei*), AC, AD et AE (*B. graminis f. sp. tritici*). Cette résistance est causée par une mutation dans le gène codant pour la cible des strobilurines, le cytochrome b, et conduit à la substitution G143A (Sierotzki, Wullschlegel et al. 2000). Concernant les inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes, la résistance aux amines (fenpropidine) a été retrouvée pour un isolat collecté sur blé (profil AD) et la résistance aux triazoles (inhibiteurs de la 14 α -déméthylation, représentés par le triadiménol) a été retrouvée chez différents isolats des formes spéciales *hordei* et *tritici*. L'analyse moléculaire du gène cible *cyp51* a confirmé que ces souches présentaient toutes la substitution F136L et que les souches isolées sur orge possédaient de plus le changement K147Q, comme décrit précédemment (Wyand and Brown 2005). La résistance au quinoxifène (phénoxyquinoléines) a été identifiée chez 2 isolats collectés sur orge et 1 isolat ramassé sur blé. Enfin, aucun des isolats n'était résistant au cyflufénamid (amidoximes) et à la métrafenone (benzophénones) qui sont des molécules très récemment introduites sur le marché européen. Aucun des isolats collectés sur triticales (profils BA à BH) n'était résistant aux fongicides testés.

Tableau II : Résistance aux fongicides observée chez différents isolats de *Blumeria graminis*

Table II: Resistance to fungicides in various isolates of *Blumeria graminis*

| Profil (n) | AA1 (5) | AA2 (2) | AA3 (1) | AC (1) | AD (2) | AE (5) | BA (1) | BB (13) | BC (2) | BE (3) | BF (3) | BG (2) | BH (1) |
|---------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Azoxystrobine | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fenpropidine | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyflufenamid | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Quinoxifène | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Metrafenone | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

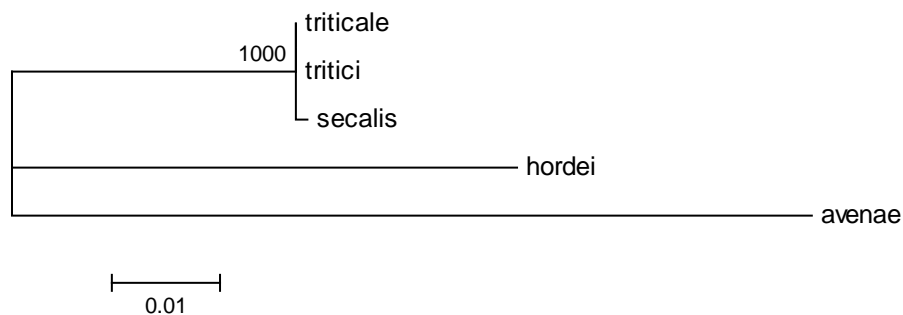
Analyse phylogénétique des formes spéciales

Les arbres phylogénétiques établis pour les marqueurs ITS, *cyp51*, *tub2* et *ef1 α* présentent une topologie similaire, à savoir un clade très bien supporté contenant les haplotypes des oïdiums collectés sur blé, triticales et seigle. Pour ces différents marqueurs, les séquences sont identiques pour les trois entités d'oïdium qui ne peuvent être différenciées entre elles. Ce clade est ensuite génétiquement plus proche de la forme spéciale *hordei* puis de la forme spéciale *avenae*. Cette topologie était déjà observée par différents auteurs (Wyand and Brown 2003; Inuma, Khodaparast et al. 2007) et confirme la très forte proximité génétique des deux formes spéciales déjà établies, (Inuma, Khodaparast et al. 2007) *tritici* et *secalis*. A noter que cet arbre phylogénétique des formes spéciales de *B. graminis* se calcule parfaitement sur l'arbre phylogénétique des graminées hôtes : le seigle et le blé sont génétiquement plus proches de l'orge que de l'avoine (Catalan, Kellogg et al. 1997). Cette proximité génétique entre les hôtes et les parasites est révélatrice de leur co-évolution.

La topologie établie avec le marqueur IGS est différente des autres puisqu'elle groupe les isolats issus de blé et de triticales et les différencie des isolats collectés sur seigle. Cette topologie se retrouve dans l'arbre combiné des différents marqueurs (figure 2), même si la différenciation entre ces trois entités reste finalement faible.

Figure 2 : Relation génétique entre les différentes formes spéciales de *Blumeria graminis*

Figure 2: Genetic relationship between *B. graminis formae specialis*



Arbre phylogénétique obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance (ML) et après 1000 bootstraps. Les séquences des marqueurs ITS, IGS, *chs1*, *tub2* et *cyp51* ont été concaténées pour obtenir cet arbre combiné.

DISCUSSION-CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons comparé et clairement distingué les formes spéciales d'oïdium des céréales déjà décrites d'une entité plus récente infestant le triticale. Cette différenciation est basée en premier lieu sur l'observation des profils d'hôtes établis lorsque les oïdiums sont inoculés sur des gammes de variétés de céréales. Cette nouvelle entité, décrite pour la première fois, a la capacité d'infecter sur fragments de feuilles de plantules quasiment toutes les variétés de triticale testées, un large panel de variétés de blé, et ponctuellement 2 variétés de seigle et présente au moins 7 profils d'adaptation à l'hôte.

L'émergence de cette nouvelle entité est récente et date du début des années 2000 en Europe. Cependant, lors d'essais anciens de sélection de nouvelles triticales, certains auteurs avaient déjà observé que jusqu'à 10% des nouvelles lignées étaient sensibles à *B. graminis f. sp. tritici* au stade plantule (Linde-Laursen 1977) et expliqué ce phénomène par le fait que l'interaction entre les génomes du blé et du seigle peut modifier la sensibilité à l'oïdium du triticale ou que le champignon peut s'adapter aux gènes de résistance présents dans ces nouvelles variétés. En effet, la sélection du triticale est un processus complexe et peu d'informations sont disponibles quant aux gènes *Pm* transmis aux variétés actuelles. En effet, ce critère de sélection n'a pas été prépondérant pendant de longues années, par rapport aux critères de productivité, de qualité du grain ou de germination sur pied. Les généalogies des variétés ne sont pas souvent rendus publiques et même s'ils sont connus chez les géniteurs blé et/ou seigle, les gènes *Pm* sont rarement identifiés dans les cultivars de triticale. En conséquence, il est difficile d'identifier les gènes *Pm* présents dans les cultivars que nous avons utilisés et qui discriminent les profils de résistance (tableau 1), à l'exception de la variété Clément qui porte le gène *Pm8* introduit du seigle après la translocation 1BL-1RS. Nous avons également remarqué que les variétés sensibles Tricolor et Maximal portaient dans leur ascendance la variété Trimaran, également très sensible. Ainsi, des gènes *Pm* contournés par l'oïdium chez le triticale ou le blé ont pu être transférés dans les variétés que nous avons testées. A l'inverse, la variété de triticale FDT04015 est prometteuse puisqu'elle n'a jamais été attaquée dans nos conditions de test *in vitro* au stade plantule et doit disposer d'un fond génétique différent des autres variétés, qui doivent plus ou moins partager les mêmes gènes de résistance. Finalement, la base génétique de la résistance à l'oïdium semble relativement étroite chez les variétés actuelles de triticale qui doivent partager beaucoup de gènes *Pm* en commun, en comparaison des variétés de blé. Chez cette céréale, par contre, plusieurs gènes *Pm* ou plusieurs mécanismes de résistance ne semblent pas contournés puisque certaines variétés restent résistantes à plusieurs profils d'oïdium du triticale. Ainsi, l'oïdium du triticale semble avoir sélectionné plusieurs combinaisons de gènes de virulence, conduisant à la diversité des profils phénotypiques observés. Cette diversité peut avoir plusieurs origines : (1) les gènes de virulence ont pu être

sélectionnés indépendamment dans différentes régions utilisant des variétés de triticale différentes, exerçant donc des pressions de sélection variées et (2) la recombinaison liée à la reproduction sexuée et à la migration ont pu contribuer à cumuler plusieurs gènes de virulence dans les populations. En effet, des études de génétique des populations récentes de ce champignon ont montré qu'il pouvait migrer sur de grandes distances, au moins à l'échelle d'un pays (Parks, Carbone et al. 2009).

De plus, lors de nos expérimentations sur l'oïdium du triticale, nous n'avons pas observé de différences morphologiques avec les autres formes spéciales (taille des conidies, aspect et développement des colonies, conditions de culture...). Les analyses moléculaires des différents marqueurs confirment que cette entité appartient bien à l'espèce *B. graminis* et qu'elle est très proche des formes spéciales *tritici* et *secalis*, précédemment regroupées dans le même clade des « *Triticum* » (Inuma, Khodaparast et al. 2007). Ainsi, la différenciation de ces deux formes spéciales existantes est très faible et n'était observée que grâce à une position nucléotidique différente sur le gène de la β -tubuline. Nous n'avons pas retrouvé cette différenciation dans notre jeu de données, ce qui confirme la proximité génétique de ces formes spéciales mais rend difficile leur différenciation. Seul le marqueur IGS nous a seul permis de faire la différence entre ces entités appartenant à la même espèce, en groupant d'une part l'oïdium du triticale et du blé, et d'autre part, l'oïdium du seigle. Ce marqueur est ainsi connu pour évoluer plus rapidement que d'autres, ce qui explique que nous ayons pu observer cette différence après moins de 10 années de sélection de cette nouvelle entité. Il nous permet également de supposer que l'oïdium du triticale dérive de *B. graminis f. sp. tritici*. Ceci nécessite bien sûr d'être confirmé par d'autres marqueurs (nouveaux gènes évoluant rapidement ou marqueurs neutres comme les microsatellites récemment développés (Parks, Carbone et al. 2009)) et des échantillons fournis par les autres pays concernés comme la Pologne ou la Suisse. Ceci est également cohérent avec le fait que l'oïdium du blé a facilement contourné les gènes de résistance de nombreuses variétés françaises, qui ont pu être transmis aux variétés actuelles de triticale. Cette forme spéciale est également décrite dans la littérature comme celle ayant le spectre d'hôtes le plus large, ce qui suggère une grande capacité d'adaptation. Enfin, ceci est également conforté par le fait que nous ayons réussi à adapter une souche de référence d'oïdium du blé au triticale après seulement trois générations de culture sur la variété Maximal. Cette expérience n'a pas été possible avec l'oïdium du seigle.

Finalement, ces données rassemblées nous confirment les fortes capacités d'évolution de *B. graminis* et le besoin urgent en nouvelles sources de résistances à l'oïdium. Les génomes du seigle et des graminées sauvages pourraient être de bons candidats, d'autant plus que de nouveaux gènes *Pm* semblent y avoir été identifiés récemment. De nouvelles combinaisons de gènes *Pm* et la production de nouvelles triticales primaires pourraient également contribuer à élargir la base génétique de la résistance à l'oïdium chez le triticale, ainsi que l'utilisation de résistances non hôtes. En attendant ces nouvelles variétés, les fongicides peuvent constituer une bonne solution à court terme puisque les populations d'oïdium du triticale semblent pour le moment exemptes de résistances aux principales familles.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient toutes les personnes qui sur le terrain ont collectés les échantillons de céréales oïdiées et y ont placé des pots-piège. Ils remercient également Philippe Du Cheyron d'Arvalis – Institut du Végétal pour la fourniture des différentes semences de céréales. Ce projet a été financé par l'INRA (département SPE) et par le GIE triticale (Agri-obtentions, Florimond-Desprez, Lemaire-Deffontaines, R2n et Serasem), associé à Arvalis - Institut du Végétal et à l'INRA (département GAP).

BIBLIOGRAPHIE

- Ammar, K., M. Mergoum, et al., Eds. (2004). The history and evolution of triticale. Triticale improvement and production. FAO.
- Catalan, P., E. A. Kellogg, et al. (1997). "Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **8**(2): 150-166.
- Doussinault, G., M. Pavoine, et al. (2001). "Evolution de la variabilité génétique chez le blé." *Les dossiers de l'environnement* **21**: 91-103.
- Du Cheyron, P. and E. Masson (2007). "Variétés de triticale : décryptage du catalogue français." *Perspectives Agricoles* **335**: 38-46.
- Guindon, S. and O. Gascuel (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Systematic Biology* **52**(5): 696-704.
- Inuma, T., S. A. Khodaparast, et al. (2007). "Multilocus phylogenetic analyses within *Blumeria graminis*, a powdery mildew fungus of cereals." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**(2): 741-751.
- James, T. Y., J. M. Moncalvo, et al. (2001). "Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*." *Genetics* **157**(1): 149-161.
- Linde-Laursen, I. (1977). "Reaction of triticale, wheat and rye to the powdery mildew fungi, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* and *E. graminis* f. sp. *secalis*." *Z. Pflanzenzüchtg*(79): 110-121.
- Marchal, E. (1902). "De la spécialisation du parasitisme chez l'*Erysiphe graminis*." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **135**: 210-212.
- Olesen, K., T. Carver, et al. (2003). "Fungal suppression of resistance against inappropriate *Blumeria graminis formae speciales* in barley, oat and wheat." *Physiological and Molecular Plant Pathology*(62): 37-50.
- Parks, R., I. Carbone, et al. (2009). "Population Genetic Analysis of an Eastern US Wheat Powdery Mildew Population Reveals Geographic Subdivision and Recent Common Ancestry with UK and Israeli Populations." *Phytopathology* **99**(7): 840-849.
- Sierotzki, H., J. Wullschleger, et al. (2000). "Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **68**(2): 107-112.
- Tosa, Y., M. Kusaba, et al. (1995). "Geographical distribution of genes for resistance to *formae speciales* of *Erysiphe graminis* in common wheat." *Theoretical and Applied Genetics* **91**(1): 82-88.
- Tyrka, M. and J. Chelkowski (2004). "Enhancing the resistance of triticale by using genes from wheat and rye." *Journal of Applied Genetics* **45**(3): 283-295.
- Walker, A., A. Bouguennec, et al. (2009). "Phenotypic and genetic diversity in the powdery mildew *Blumeria graminis* infecting triticale (*Triticum x Secale*) in France." Submitted.
- Walker, A., E. Wilhelm, et al. (2006). Observatoire des résistances aux fongicides chez l'oïdium du blé : Résultats du groupe de travail AFPP 2001-2005. 8ème conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours, France, AFPP.
- White, T. J., T. D. Bruns, et al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. PCR protocols. M. A. Innis, D. H. Gelfrand, J. J. Sninsky and T. J. White. San Diego, CA, Academic Press: 315-322.
- Wyand, R. A. and J. K. M. Brown (2003). "Genetic and *forma specialis* diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution." *Molecular Plant Pathology* **4**(3): 187-198.
- Wyand, R. A. and J. K. M. Brown (2005). "Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides." *Fungal Genetics and Biology* **42**(8): 726-735.

**LES PREMIERS LEVIERS IDENTIFIES POUR MAITRISER
LE RISQUE T-2 ET HT-2 SUR ORGES**

B. ORLANDO⁽¹⁾, B. BARRIER-GUILLOT⁽¹⁾, E. GOURDAIN⁽¹⁾, C. MAUMENÉ⁽¹⁾

ARVALIS-Institut du végétal, station expérimentale, 91720 Boigneville, France
b.orlando@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

La Commission Européenne travaille actuellement sur un projet de réglementation concernant les toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et produits céréaliers. Les études d'occurrence ont permis de montrer que les avoines et dans une moindre mesure les orges de printemps sont les plus touchées par ces toxines. Depuis 2006, 450 parcelles d'orges, majoritairement d'orge de printemps, ont été enquêtées selon une même méthodologie, au sein d'une démarche menée par ARVALIS-Institut du végétal en collaboration avec différents partenaires de la filière orge. Les différents leviers identifiés pour limiter le risque T-2 et HT-2 sur orges sont par ordre d'importance décroissant : la date de semis, la rotation (nombre de céréales à paille sur les 2 dernières années), le travail du sol (avec un impact plus faible que pour le DON), et une interrogation sur la sensibilité variétale et la protection fongicides. Des travaux sont en cours pour mettre au point une méthodologie de contamination artificielle afin de pouvoir étudier ces deux derniers facteurs. Enfin, ces enquêtes ont mis évidence une opposition entre les teneurs en DON et en toxines T-2 et HT-2, impliquant une stratégie de gestion du risque probablement différente.

Mots-clés : orge, facteurs agronomiques, gestion du risque, toxines T-2 et HT-2, trichothécènes

SUMMARY

The European Commission has considered the appropriateness of setting a forthcoming maximum level for T-2 and HT-2 toxins in cereals and cereal products. Occurrence studies show that oat, and to a lesser extent barley, seem to accumulate higher levels of these toxins than others cereals. Consequently, ARVALIS–Institut du végétal has conducted a field survey in collaboration with different French partners (coops and merchants, agro industries and research institutes). The agronomic factors identified to reduce the risk of T-2 and HT-2 toxins on barley are in decreasing order of importance: sowing date, rotation (number of small grain cereals on the last 2 years), tillage (with a smaller impact than for DON), and a query on varietal susceptibility and fungicide protection. Further investigations are underway to develop a methodology for artificial contamination in order to study these two factors. Finally, this field survey shows that DON and T-2&HT-2 toxins seem to be opposed, which probably means a different risk management for those different mycotoxins.

Key words: barley, agronomic factors, risk management, T-2 and HT-2 toxins, trichothecenes

INTRODUCTION

Produites au champ par *Fusarium spp.*, les mycotoxines de la famille des trichothécènes se répartissent en deux groupes : le groupe A, dont font partie les toxines T-2 et HT-2, et le groupe B comprenant notamment le déoxynivalenol (DON), toxine la plus fréquemment rencontrée dans nos céréales. Si les teneurs en DON dans les céréales et produits céréaliers à destination de l'alimentation humaine sont réglementées depuis 2006 (Règlement CE 1881/2006), les toxines T-2 et HT-2 font également l'objet d'un projet de réglementation depuis 2003. Suspendues jusqu'en 2007 faute de méthodes d'analyses suffisamment précises, les réflexions ont repris afin d'apporter des éléments de réponses aux nombreuses inconnues qui demeurent encore aujourd'hui : exposition de la population, compétition entre les espèces fusariennes productrices des différentes toxines, mesures préventives au champ pour limiter et gérer le risque.

Annoncée pour juillet 2009, la réglementation des toxines T-2 et HT-2 n'est pas encore prête. Les dernières limites maximales proposées remontent à 2003, avec 500µg/kg pour les avoines et 100µg/kg pour les autres céréales brutes.

Les études d'occurrence ont permis de montrer que les avoines et dans une moindre mesure les orges de printemps sont les céréales les plus touchées par les toxines T-2 et HT-2 (Edwards *et al.*, 2009). Plusieurs études sont en cours pour déterminer les champignons producteurs de ces toxines. *Fusarium langsethiae* semble être le principal champignon à l'origine de la contamination dans les pays d'Europe du Nord (Torp and Nirenberg, 2004 ; Parikka *et al.*, 2008), mais il n'est peut-être pas le seul responsable car d'autres espèces telles que *Fusarium poae* ou *Fusarium sporotrichioides* ont également été identifiées (Causin *et al.*, 2008). Beaucoup d'inconnues subsistent sur le pouvoir de compétition entre les différentes espèces pathogènes. Les recherches se concentrent aujourd'hui essentiellement sur *Fusarium langsethiae* afin de mieux comprendre la biologie du champignon, son mode de dissémination, le stade de contamination et l'impact du climat. Les travaux sont également en cours afin d'évaluer l'impact des pratiques agronomiques sur la qualité sanitaire des orges de printemps.

MATERIEL ET MÉTHODES

Depuis 2006, 451 parcelles d'orges, majoritairement d'orge de printemps, ont été enquêtées par ARVLIS - Institut du végétal en collaboration avec différents partenaires de la filière orge et principalement les organismes stockeurs.

CHOIX DES PARCELLES ENQUETÉES

L'objectif de cette enquête pluriannuelle est d'identifier puis hiérarchiser l'importance des différents facteurs impliqués dans la contamination en toxines T-2 et HT-2 de l'orge.

Cette étude a été menée dans les principales régions françaises productrices d'orges : Bourgogne, Centre, Franche Comté, Poitou-Charentes, Champagne-Ardenne, Ile-de-France, Normandie, Nord Pas de Calais, Alsace et Lorraine.

La répartition annuelle des parcelles étudiées est de : 33 en 2006, 126 en 2007 et 293 en 2008.

Le premier objectif étant d'identifier les facteurs agronomiques susceptibles d'influer sur les teneurs en toxines T-2 et HT-2, la sélection des parcelles étudiées s'est basée sur la variabilité des critères agronomiques caractérisant l'historique de la parcelle et l'itinéraire cultural de l'orge.

QUESTIONNAIRE AGRONOMIQUE, PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ET ANALYSE DES TRICHOHECENES

Pour chaque parcelle, un questionnaire retraçant l'historique cultural a été renseigné, et un échantillon de 3 kg de grain a été constitué à la récolte. Cet échantillon est composé de 3 sous-échantillons de 1kg minimum chacun, prélevés à la vidange de la moissonneuse batteuse. Les trois sous-échantillons ont été rassemblés, homogénéisés, nettoyés pour retirer les impuretés (pailles glumes, petits grains, grains cassés, poussières...) puis divisés de manière à obtenir 1,5kg de grain pour analyse. Celui-ci est d'abord broyé à l'aide d'un broyeur équipé d'une grille de 1mm, puis un sous-échantillon de 500g de ce broyat été prélevé pour analyse des trichothécènes par chromatographie liquide, détection couplée masse-masse (LC-MSMS). Les teneurs en DON et en toxines T-2 et HT-2 sont donc disponibles pour l'ensemble de ces échantillons.

ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

L'ensemble de l'étude statistique a été réalisée sur la somme des toxines T-2 et HT-2 sur laquelle porte le projet de réglementation.

Un modèle linéaire mixte a été utilisé pour analyser les données. La variable à expliquer, teneur en toxines T-2 et HT-2, a été transformée en $\ln(T-2+HT-2)$ afin de normaliser la distribution des données. Les variables explicatives sont qualitatives (facteurs agronomiques, année, région). Le facteur année a été considéré comme aléatoire, ainsi que toutes les interactions impliquant ce facteur.

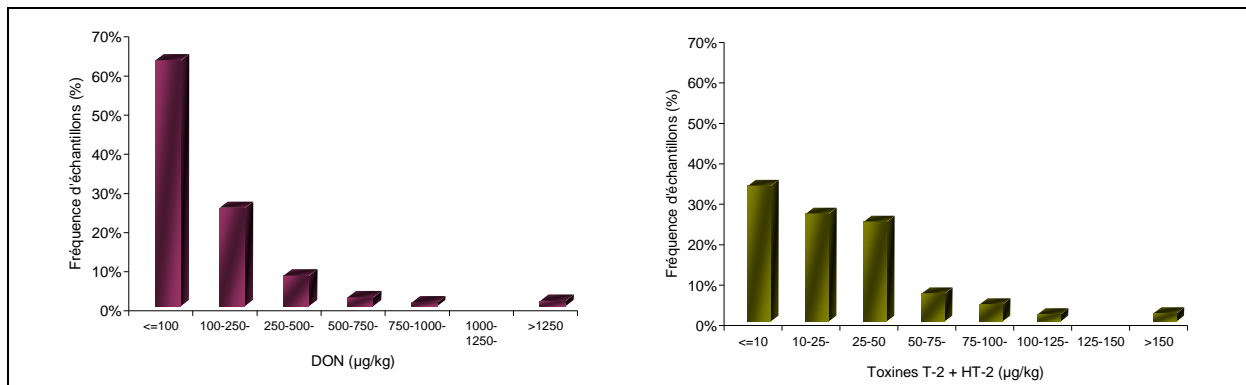
RESULTATS

TENEURS EN DEOXYNIVALENOL ET TOXINES T-2 ET HT-2 MESUREES DANS LES ENQUETES

Niveaux de contamination en DON et en toxines T-2 et HT-2

Les niveaux de contamination rencontrés sur ces 3 années d'étude 2006 à 2008 sont relativement faibles. 96% des échantillons ont une teneur en DON inférieure à 500µg/kg, avec toutefois des dépassements ponctuels de la limite maximale réglementaire fixée à 1250µg/kg pour 1% des échantillons. Les teneurs en toxines T-2 et HT-2 sont également relativement faibles, avec 96% des échantillons en deçà de 100µg/kg pour la somme des deux toxines (Figure 1). La corrélation entre les 2 toxines est moyenne ($R^2=0.44$) mais en tendance, il y a 3 fois plus de toxine HT-2 que de toxine T-2 (résultats non présentés).

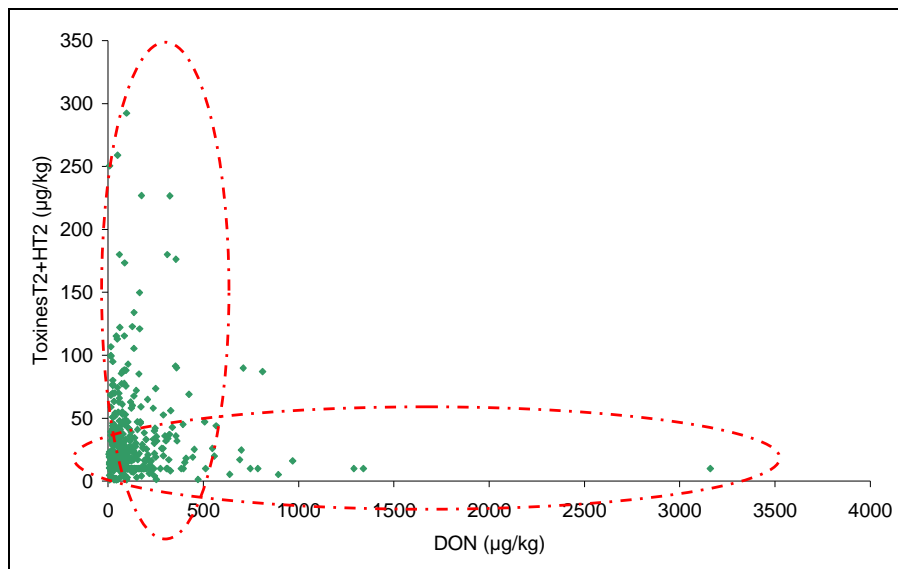
Figure 1 : Fréquence de répartition des 451 échantillons analysés par classe de teneur en DON et toxines T-2+HT-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Percentage frequency of DON and T-2+HT-2 toxins in the 451 samples ($\mu\text{g}/\text{kg}$)



Opposition entre DON et toxines T-2 et HT-2

L'analyse globale des teneurs en trichothécènes mesurées montre une opposition entre les teneurs en DON d'une part, et les teneurs en toxines T-2+HT-2 d'autre part. Aucun échantillon n'est fortement contaminé simultanément par les 2 toxines (Figure 2).

Figure 2 : Opposition entre teneurs en DON et toxines T-2+HT-2 sur orges des 451 échantillons
T-2+HT-2 against DON concentration for 451 barley samples



IMPACT DES FACTEURS PEDOCLIMATIQUES SUR LES TENEURS EN TOXINES T-2+HT-2

L'analyse de variance met évidence une interaction significative au seuil de 5% entre l'année et la région, qui explique 15% de la variabilité des teneurs en toxines T-2 + HT-2. Ce constat est classique puisque les conditions climatiques annuelles et régionales vont conditionner le développement des espèces de *Fusarium*, ainsi que la production de toxines associées.

IDENTIFICATION DES FACTEURS AGRONOMIQUES INFLUENÇANT LES TENEURS EN TOXINES T-2+HT-2

Les niveaux moyens de contamination en toxines T-2 et HT-2 sont relativement peu élevés, mais la variabilité des teneurs permet toutefois de réaliser une étude statistique pertinente. Les résultats présentés ci-dessous ne sont pas toujours très différents, néanmoins ils ont toujours une signification statistique.

Orges de printemps, orges d'hiver

L'analyse de variance montre une différence significative entre les orges d'hiver et les orges de printemps. La problématique T-2 et HT-2 concerne exclusivement les orges de printemps (Tableau 1), 4 fois plus contaminées que les orges d'hiver. Le test de Tukey confirme la différence entre les moyennes ajustées des orges d'hiver et des orges de printemps.

Tableau 1 : Teneur en toxines T-2 et HT-2 des orges d'hiver ou de printemps - Moyennes ajustées (435 données)

T-2+HT-2 concentration for winter or spring barley – Adjusted means (n=435)

| | Toxines T-2 + HT-2 en µg/kg (Moyennes ajustées) | Test de Tukey (5%) |
|----------------|--|-----------------------|
| ORGE HIVER | 6 | a |
| ORGE PRINTEMPS | 22 | b |

Les moyennes suivies de la même lettre dans la colonne ne sont pas différentes entre elles d'après le test de Tukey significatif à 5%
Means in the same column, followed by the same letter are not significantly different, according to the Tukey test (5%)

Date de semis

L'analyse de variance met en évidence l'importance de la date de semis, que ce soit pour les orges d'hiver ou de printemps. Ce facteur explique 12% de la variabilité des teneurs en toxines T-2 et HT-2. Plus les parcelles sont semées tard, et plus elles sont contaminées (Tableau 2). Dans notre jeu de données, les semis d'automne concernent des orges d'hiver, mais également des orges de printemps. Dans le cas spécifique des orges de printemps, les semis d'automne restent les moins contaminés. Le test de Tukey confirme la différence entre les moyennes ajustées de chacune des catégories de semis.

Tableau 2 : Teneur en toxines T-2 et HT- des orges en fonction de la date de semis - Moyennes ajustées (427 données)

Effect of sowing time on T-2+HT-2 concentration in barley– Adjusted means (n=427)

| | Toxines T-2 + HT-2 en µg/kg (Moyennes ajustées) | Test de Tukey (5%) |
|-----------|--|-----------------------|
| AUTOMNE | 9 | a |
| HIVER | 17 | b |
| PRINTEMPS | 29 | c |

Les moyennes suivies de la même lettre dans la colonne ne sont pas différentes entre elles d'après le test de Tukey significatif à 5%
Means in the same column, followed by the same letter are not significantly different, according to the Tukey test (5%)

Précédent cultural

L'analyse de variance révèle l'impact du précédent cultural sur la culture d'orge qui suit. Ce facteur explique 9% de la variabilité des teneurs en toxines T-2 et HT-2. Les précédents céréales à paille induisent plus de toxines T-2 et HT-2. Le test de Tukey nous permet de classer les précédents en 2 groupes, les céréales à paille étant isolées des autres précédents. Les parcelles en précédent orge sont en tendance plus élevées mais elles ne sont pas significativement différentes des autres parcelles en précédent céréales à paille (Tableau 3).

Tableau 3 : Teneur en toxines T-2 et HT-2 des orges en fonction du précédent - Moyennes ajustées (434 données)
Effect of the previous crop on T-2+HT-2 concentration in barley– Adjusted means (n=434)

| | Toxines T-2 + HT-2 en µg/kg (Moyennes ajustées) | Test de Tukey (5%) |
|-----------|---|--------------------------|
| AUTRE | 10 | a |
| BETTERAVE | 10 | a |
| MAÏS | 11 | a |
| BLE | 18 | b |
| ORGE | 20 | b |

Les moyennes suivies de la même lettre dans la colonne ne sont pas différentes entre elles d'après le test de Tukey significatif à 5%
Means in the same column, followed by the same letter are not significantly different, according to the Tukey test (5%)

La connaissance de l'antéprécédent apporte également une petite part d'explication complémentaire au précédent dans la variation des teneurs en toxines T-2 et HT-2. La connaissance de ces deux informations cumulées explique 12% de la variabilité mais l'antéprécédent seul n'apporte pas d'information significative. Les parcelles sont d'autant plus contaminées qu'elles cumulent des céréales à paille. Le test de Tukey rejoint ce constat : il nous permet de classer les historiques parcellaires en 2 groupes, selon le précédent cultural (Tableau 4).

Tableau 4 : Teneur en toxines T-2 et HT-2 des orges en fonction du nombre de céréales à paille cultivées les 2 années précédant la culture d'orge- Moyennes ajustées (414 données)
Effect of the number of small grain cereals on the last 2 years on T-2+HT-2 concentration in barley– Adjusted means (n=414)

| | Toxines T-2 + HT-2 en µg/kg (Moyennes ajustées) | Test de Tukey (5%) |
|------------------------------|---|--------------------------|
| AUCUN | 14 | a |
| 1- ANTEPRECEDENT | 10 | a |
| 1- PRECEDENT | 18 | b |
| 2 ANTEPRECEDENT ET PRECEDENT | 22 | b |

Les moyennes suivies de la même lettre dans la colonne ne sont pas différentes entre elles d'après le test de Tukey significatif à 5%
Means in the same column, followed by the same letter are not significantly different, according to the Tukey test (5%)

Travail du sol

L'analyse de variance montre que le travail du sol n'apporte pas d'explication significative sur les variations de teneurs en toxines T-2 et HT-2 (Tableau 5). Le travail du sol n'est donc pas un élément déterminant pour les toxines T-2 et HT-2 mais n'oublions pas que le labour joue un rôle important dans la maîtrise des teneurs en DON.

Tableau 5 : Teneur en toxines T-2 et HT-2 des orges selon le travail du sol - Moyennes ajustées (428 données)

Effect of tillage on T-2+HT-2 concentration in barley– Adjusted means (n=428)

| | Toxines T-2 + HT-2 en µg/kg (Moyennes ajustées) | Test de Tukey (5%) |
|------------|--|-----------------------|
| LABOUR | 17 | a |
| NON LABOUR | 19 | a |

Les moyennes suivies de la même lettre dans la colonne ne sont pas différentes entre elles d'après le test de Tukey significatif à 5%

Means in the same column, followed by the same letter are not significantly different, according to the Tukey test (5%)

Sensibilité variétale et protection fongicide

L'analyse de variance montre que les 22 variétés du réseau d'enquête n'ont pas le même comportement vis-à-vis des variations de teneurs en toxines T-2 et HT-2. Cependant, cette démarche d'enquête ne permet pas d'étudier les variétés de façon pertinente. Des réseaux dédiés à l'évaluation des variétés sont préférables.

L'analyse de variance sur l'influence de la protection fongicide semble montrer qu'il ne s'agit pas d'un critère neutre. Mais là encore, cette démarche d'enquête ne permet pas d'étudier l'impact des protections fongicides. Des dispositifs spécifiques permettent sont plus adaptés.

DISCUSSION

Un lot d'orge brassicole commercialisé demain devra respecter les limites réglementaires à la fois pour le DON et pour les toxines T-2 et HT-2. Du fait de l'opposition entre ces deux toxines, il faudra s'assurer que les bonnes pratiques à mettre en place pour l'une ne favorisent pas l'autre. Cette opposition n'est pas surprenante puisque les *Fusarium* responsables sont différents. Celle-ci peut s'expliquer par la compétition entre les espèces, des optimums climatiques différents, ou encore une installation différée dans le temps. Beaucoup d'inconnues subsistent quant aux *Fusarium* responsables de la production des toxines T-2 et HT-2. Des programmes de recherche sont en cours et, comme évoqué précédemment, les recherches se concentrent essentiellement sur *F. langsethiae* afin de mieux comprendre la biologie du champignon, son mode de dissémination, le stade de contamination et l'impact du climat. Ainsi, le projet BARSAFE, financé par l'Agence Nationale de la Recherche et engagé en 2008 sur une durée de 3 ans, rassemble ARVALIS-Institut du végétal, l'INRA et le CNRS sous la coordination de l'Institut Français de la Brasserie et de la Malterie (IFBM). Le but de ce projet est de mieux cerner et mieux gérer, par la mise en place de dispositifs expérimentaux, tous les aspects du risque sanitaire encouru lié à *F. langsethiae* tout au long de la filière, de la parcelle d'orge brassicole aux produits finis (suivi des différentes étapes de fabrication de la bière).

En France, les toxines T-2 et HT-2 semblent épargner les orges d'hiver (IFBM, 2008), en moyenne 4 fois moins contaminées que les orges de printemps dans notre étude. Les teneurs pour la somme des 2 toxines ne dépassent pas 32µg/kg sur orge d'hiver. Deux

hypothèses peuvent expliquer cette différence : soit une meilleure tolérance génétique des orges d'hiver, soit une interaction entre le stade de la céréale et la période de contamination du champignon responsable.

La date de semis est un élément déterminant : plus les orges sont semées tard et plus les niveaux de contamination sont élevés. Quel que soit le type d'orge, les semis d'automne sont 2 fois moins contaminées que dans les semis d'hiver et 3 fois moins que les semis de printemps. Ce constat est également fait dans la mise en place d'un essai variété mis en place à Ouzouer-le-Marché confrontant six variétés de printemps semées à l'automne ou au printemps : les variétés semées au printemps sont deux fois plus contaminées que les semis d'automne (Orlando, 2009) ; Ces résultats vont dans le sens de la seconde hypothèse citée plus haut : les semis tardifs fleurissant plus tard seraient plus exposés à la libération des spores de *Fusarium* producteurs de toxines T-2 et HT-2. Toutefois ce comportement n'est pas à généraliser à toutes les céréales et tous les climats car on retrouve la tendance inverse sur les avoines anglo-saxonnes (Edwards 2007)

Le précédent cultural a également un impact tout aussi important, les céréales à paille -et l'orge en particulier- induisant plus de toxines T-2 et HT-2 sur la culture d'orge suivant. Ce constat est également fait sur les avoines françaises (Orlando, 2009) et anglo-saxonnes (Edwards, 2007). Nous sommes donc ici dans une situation opposée à celle de la problématique DON où les précédents céréales à paille induisent moins de DON que des précédents comme le maïs (Barrier-Guillot *et al.*, 2006).

Le travail du sol a un impact moindre sur les teneurs en toxines T-2 et HT-2. Seul, ce facteur n'apporte pas d'explication significative mais en revanche il complète l'information apportée par le précédent cultural. On retrouve ici un principe bien connu également retrouvé dans les avoines anglo-saxonnes (Edwards 2007) : tout ce qui favorise la décomposition des résidus restreint le substrat sur lequel s'installe le *Fusarium*, limitant ainsi le développement du champignon sur la culture suivante. Le labour est donc un atout pour les précédents céréale à paille ; il est bien connu qu'il permet de diminuer significativement les niveaux de contamination en DON.

Le comportement *a priori* différent des variétés vis-à-vis des teneurs en toxines T-2 et HT-2 est à approfondir par l'étude de réseaux d'essais dédiés. Les variétés d'avoine semblent également se comporter différemment (Edwards 2007) mais aucune donnée n'est actuellement disponible sur les cultures d'orges.

Enfin, on pourrait supposer que le traitement fongicide permettrait de limiter le développement de la maladie et donc des toxines produites. Nous n'avons pas pu mettre en évidence cet impact dans notre étude, et là encore la mise en place d'essais dédiés sur des années climatiques plus « à risque » nous permettrait d'avancer sur le sujet. Toutefois, une étude Suédoise récente menée sur les avoines montre que l'impact des fongicides est faible ou nul (Pettersson, 2008).

CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier les premiers leviers agronomiques influant les teneurs en toxines T-2 et HT-2 des orges. Cette démarche d'enquêtes est toujours en cours en 2009. Plusieurs années d'étude seront encore nécessaires pour bien identifier et hiérarchiser les itinéraires techniques à risque, et définir les séquences climatiques déterminantes pour les années critiques.

Parallèlement, la recherche doit encore progresser pour mieux comprendre la biologie des *Fusarium* responsables : compétition entre les espèces, optimums climatiques, toxicologie. A ce jour, il n'est toujours pas possible de réaliser des contaminations en conditions

contrôlées car les paramètres permettant de favoriser le développement du champignon ne sont pas bien connus. La connaissance de ces éléments permettrait de répondre à un certain nombre de questions pratiques par la mise en place d'essais en conditions contrôlées.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Conseil Général Ile-de-France (2006), BAYER-CropScience (2008), l'Agence Nationale de la Recherche (2008), ainsi que l'ensemble des collecteurs et agriculteurs partenaires pour leur investissement et/ou leur soutien financier.

Nous remercions également l'équipe technique Arvalis-Institut du végétal de Villerable, qui a centralisé, nettoyé et préparé les échantillons de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

Barrier-Guillot, B., Delambre, M., Morel, A., Maumené, C., Gouet, H., Grosjean, F., Leuillet, M. 2006. Identification of agronomic factors that influence the level of DON in wheat grown in France. Mycotoxins and phycotoxins. Advances in determination, toxicology and exposure management. Edited by H. Njapau, S. Trujillo, H.P. van Egmond, D.L. Park. 239-247

Causin R., Mastella C., Mergoni V., Pizzolato G., Bailoni L., 2008 - Survey on T-2 and HT-2 toxins in samples of cereals and products thereof from north Italy. Proceedings of the fifth Fusarium toxin forum, 10-11th January 2008.

Edwards S.G., 2007 - Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK barley and oat production. HGCA, London, UK.

Edwards S.G., Barrier-Guillot B., Clasen P.E., Hietaniemi v., Pettersson H., 2009 - Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World mycotoxin Journal*, May 2009; 2(2): 173-179.

Orlando B., 2009 Qualité sanitaire des orges et des avoines. La recherche progresse sur les toxines T-2 et HT-2. *Perspectives Agricoles*. 356:6-18.

Parikka P., Rämö S., and Hietaniemi V., 2008 - *Fusarium* infection and mycotoxins in Finnish cereals in 2005-2006. *Journal of plant Pathology* 90:56.

Pettersson H., 2008. T-2 and HT-2 toxins in oats products. Proceedings of the fifth Fusarium toxin forum, 10-11th January 2008.

Règlement (CE) n°1881/2006 de la Commission Européenne du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. (Texte modifié en matière de mycotoxines par le règlement (CE) n° 1126/2007 et consolidé le 28 juillet 2008).

Torp M. and Nirenberg H.I., 2004 - *Fusarium langsethiae* sp. Nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology* 95:247-256.

**LES GENES D'AVIRULENCE DE *LEPTOSPHAERIA MACULANS* ET DEFINITION DE
MARQUEURS MOLECULAIRES POUR SUIVRE LES EVOLUTIONS DE POPULATIONS
VIRULENTES**

E. PIC⁽¹⁾, J. CARPEZAT⁽¹⁾, M.-H. BALESSENT⁽²⁾, T. ROUXEL⁽²⁾, X. PINOCHET⁽¹⁾

⁽¹⁾ CETIOM, UMT Pivert Centre de Grignon, BP 4, 78850 Thiverval Grignon, France;

⁽²⁾ INRA UMR1290-BIOGER, UMT Pivert, Centre de Grignon, 78850 Thiverval Grignon,
France

RÉSUMÉ

Le Phoma, maladie majeure du colza, est essentiellement contrôlé par l'utilisation de variétés résistantes. L'utilisation de résistances spécifiques expose à un risque de contournement si la pression de sélection est suffisante pour provoquer une évolution des populations qui deviennent virulentes. Trois gènes d'avirulence de *Leptosphaeria maculans* ont été clonés. L'étude de leur polymorphisme a permis de définir des amorces pour identifier par PCR les allèles virulents d'isolats du champignon, notamment pour les virulences susceptibles d'évoluer (*AvrLm1* et *AvrLm4*). Ceci permet de suivre plus facilement l'état des populations à partir d'échantillonnages de symptômes de plein champ. Un travail de multiplexage des amorces et une validation sur des souches de collection précédemment phénotypées ont permis une étape supplémentaire dans la simplification des procédures. Un exemple d'application au suivi de populations en Région Centre est présenté. Avec l'introduction récente de la résistance spécifique *Rlm7*, les travaux se focalisent aujourd'hui sur la mise au point d'un test PCR d'identification des allèles virulents *avrLm7*.

Mots-clés : colza, *Leptosphaeria maculans*, PCR, multiplex, avirulence, biovigilance

SUMMARY

**AVIRULENCE GENES OF *LEPTOSPHAERIA MACULANS* AND DESIGN OF
MOLECULAR MARKERS TO FOLLOW PATHOGEN POPULATION DYNAMICS**

Blackleg is a major disease for winter oilseed rape, mainly controlled using resistant cultivars. Use of specific resistance increases a break down risk if the selection pressure is high enough to allow population evolution toward virulence. Recently three avirulence genes, of *Leptosphaeria maculans* were cloned and their polymorphism in natural populations studied. From these sequences, primers were designed to identify by a PCR procedure the main avirulent alleles of interest (*AvrLm1* and *AvrLm4*). Qualitative population dynamic could be followed easily from field sampling. A next easier step has been carried out with a duplex PCR procedure and validated with references isolates phenotyped in previous studies. An example of population assessment done in the Centre Region of France is given. With the recent introduction of the new specific resistance *Rlm7* in commercial cultivar, the work is now focussed on a new test able to detect *avrLm7* virulent alleles.

Key words: oilseed rape, *Leptosphaeria maculans*, PCR, multiplex, avirulence, biovigilance

INTRODUCTION

Le Phoma est la principale maladie du colza, non seulement en France et en Europe, mais à l'échelle mondiale (Fitt et al 2006). Le principal moyen mis en œuvre pour la contrôler est l'utilisation de résistances variétales. Dans les années 70 et 80, les résistances quantitatives présentes dans les variétés « 0 » ont permis un excellent contrôle. Avec l'arrivée des variétés « 00 », la maîtrise de la maladie est revenue au premier plan des préoccupations. Les sélectionneurs ont, dans un premier temps, utilisé des résistances spécifiques qui se sont avérées très efficaces durant plusieurs années. Elles ont été par contre contournées après utilisation massive des génotypes les possédant. Ce fut le cas de *Rlm1* en France et en Europe (Rouxel et al 2003, Stachowiak et al 2006) et de la résistance Surpass en Australie (Sprague et al 2006). En France, les populations de *Leptosphaeria maculans* ont été caractérisées sur une vingtaine de sites (Balesdent et al 2006). Malgré ces épisodes de contournement, les populations restent partagées entre individus virulents et avirulents, pour les gènes *AvrLm1* et *AvrLm4* (Balesdent et al 2006). Par ailleurs, les travaux comparant des individus avirulents et virulents suggèrent qu'il existe un coût de fitness lié au gain de virulence pour ces deux gènes (Huang et al 2006, Huang et al 2009). Ces éléments incitaient à proposer une gestion de la pression de sélection par le choix variétal pouvant permettre une nouvelle augmentation de la proportion d'individus avirulents (Gladders et al 2006). Les travaux réalisés sur les gènes d'avirulence visant à comprendre les mécanismes de passage de l'avirulence à la virulence ont également débouché sur le développement d'outils de suivi des virulences dans populations. Les surveillances ainsi menées permettent de fournir des informations utiles pour inciter à gérer durablement les résistances spécifiques pour éviter de nouveaux contournements brutaux de résistances comme celui intervenu pour *Rlm1*. La présente communication a pour objectif de montrer comment le CETIOM a valorisé les connaissances récemment acquises sur les gènes d'avirulence *AvrLm1* et *AvrLm4-7* pour la améliorer la surveillance des populations.

MATERIEL ET MÉTHODE

ZONES DE SURVEILLANCE ET PRELEVEMENTS DES MACULES FOLIAIRES

La plupart des isolats produits et utilisés proviennent d'une zone d'observation du Phoma située en région Centre entre St Florent sur Cher (Cher) et Issoudun (Indre), en particulier à proximité de la commune de Civray. Les feuilles prélevées ont été envoyées dans un papier buvard pour isolement immédiat à partir d'une pycnide selon la procédure classique décrite par West et al (2002). Les feuilles sont issues de variétés n'ayant aucun gène de résistance spécifique, ou des gènes de résistance pour lesquels les populations françaises sont complètement virulentes (variétés dites de groupe 1). D'autres isolats ont été utilisés pour la validation des marqueurs. Il s'agit d'isolats issus de la collection constituée par l'INRA et le CETIOM dans le cadre du Contrat de Branche CTPS financé par le ministère de l'Agriculture 2000-2003 (Balesdent et al 2006). Ces isolats, phénotypés pour la plupart de leurs gènes d'avirulence, sont maintenus par l'INRA.

MARQUEURS MOLECULAIRES

Les isolats de *Leptosphaeria* sont dans un premier temps caractérisés pour leur appartenance à l'espèce *maculans* ou *biglobosa*, d'une part d'après leur morphologie en boîte de Petri lors des isolements et purifications, puis par amplification PCR de l'ITS (Balesdent et al. 1998).

La mise au point de marqueurs moléculaires des races de *L. maculans* présuppose le clonage préalable du gène d'avirulence (*Avr*) que l'on veut diagnostiquer dans les populations. Trois gènes *Avr* ont été clonés: *AvrLm1* (Gout et al 2006), *AvrLm6* (Fudal et al 2007) et *AvrLm4-7* (Parlange et al 2009), ce dernier gène étant reconnu par les 2 gènes de résistance *Rlm4* et *Rlm7*. Ces travaux d'about ont permis de définir les amorces permettant les identifications rapides et le transfert des techniques au CETIOM.

Pour amplifier *AvrLm1*, les amorces sont celles décrites par Gout et al (2006) (Tableau n°1). Pour *AvrLm4*, Parlange et al. (2009) ont montré que le passage de l'état avirulent à l'état virulent était déterminé par une mutation ponctuelle non synonyme de la base 358, conduisant à la substitution d'une glycine par une arginine en position 120 de la protéine. La caractérisation moléculaire se fait donc en deux temps. Un couple d'amorces amplifie le gène d'avirulence *AvrLm4* (Tableau n°1). Pour visualiser la mutation, l'amplification est suivie d'une digestion par l'enzyme de restriction *MlsI* puis d'une électrophorèse sur gel d'agarose (Parlange et al 2009). Pour la procédure multiplexée, les deux paires d'amorces sont mises simultanément. Après amplification, la digestion est effectuée avec *MlsI*, puis une électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium et une lecture sous UV permet de visualiser les bandes

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les amplifications des gènes *AvrLm1* et *AvrLm4-7*. Primers used for avirulence genes amplification

| |
|---|
| AvrLm4-7 : amorce CDS1extup : 5'- TATCGCATACCAAACATTAGGC -3' |
| AvrLm4-7 : amorce CDS1extlo : 5'- GATGGATCAACCGCTAACAA -3' |
| AvrLm1 : amorce 133AVR1U : 5'- CTATTTAGGCTAAGCGTATTCATAAG -3' |
| AvrLm1 amorce 133AVR1L : 5'- GCGCTGTAGGCTTCATTGTAC -3' |

VALIDATIONS

La validation du multiplexage a été réalisée avec 200 isolats provenant aléatoirement des 17 sites prélevés à l'automne 2000 (Balesdent et al 2006). 100 isolats sont *AvrLm1-avrLm4*, et 100 autres sont *avrLm1-AvrLm4*. Par ailleurs ils sont tous *AvrLm7*, sur la base des tests cotylédonaire effectués sur les hôtes de référence.

RESULTATS

La figure 1 illustre les bandes d'électrophorèse obtenues après multiplexage et digestion, pour chacune des combinaisons de virulences suivies. La distinction des différents allèles est relativement facile dans une gamme de poids moléculaires assez large. La bande la plus basse correspond à l'amplification du gène *AvrLm1*, bande absente chez les isolats virulents. La bande la plus haute correspond à l'amplification de l'allèle virulent *avrLm4*, fragment non digéré par *Mls1* chez les souches virulentes mais coupé en une bande plus petite (fragment de taille intermédiaire) chez les souches avirulentes *AvrLm4*.

Le tableau 2 présente une synthèse des résultats obtenus pour la validation du multiplexage des amorces. Pour 196 isolats sur 200, le résultat obtenu par PCR est conforme à l'identification par test phénotypique. Trois isolats *avrLm1-AvrLm4* et un isolat *AvrLm1-avrLm4* sont diagnostiqués double virulents par PCR multiplex. Ces taux de conformité entre les 2 tests sont considérés comme très satisfaisants, et permettent l'utilisation de la PCR en routine

Le tableau n°3 illustre un exemple d'utilisation de la PCR multiplexée pour la surveillance réalisée dans la région Centre aux automnes 2004 et 2008. Les résultats sont comparés à ceux obtenus en 2000 dans le même secteur par Balesdent et al (2006). On constate la large prédominance des isolats doublement virulents (*avrLm1* et *avrLm4*) : 76.7 à 78.7 %, à un niveau légèrement inférieur aux 88.2 .3% trouvés en 2000. Les fréquences sont voisines de 10% pour l'allèle *AvrLm1* et entre 10 et 20% pour l'allèle *AvrLm4*, à un niveau légèrement plus élevé que le résultat de 2000. Les isolats avirulents pour les 2 loci sont rares, de l'ordre du pourcent, comme détecté en 2000 sur l'ensemble des sites du territoire français (Moyenne à 1%).

Figure n° 1 : Visualisation des bandes d'électrophorèse des 4 combinaisons possibles d'allèles aux loci AvrLm1 et AvrLm4. Colonne M : Marqueurs de poids moléculaires. Colonne 1 : isolate I3.21 double avirulent. Colonne 2: Isolat C1.5 virulent aux 2 loci. Colonne 3 : Isolat R3.15 : avirulent au locus AvrLm1 et virulent au locus AvrLm4. Colonne 4: isolat VDB2.8 : virulent pour le locus AvrLm1 et avirulent au locus AvrLm4. Patterns corresponding to the four possible combinations of alleles at the AvrLm1 and AvrLm4 loci. Lane M : 1 kb DNA ladder (Invitrogen). Lane 1 : isolate I3.21, avirulent at the two loci. Lane 2 : isolate C1.5, virulent at the two loci. Lane 3 : isolate R3.15, avirulent at the AvrLm1 locus and virulent at the AvrLm4 locus. Lane 4 : isolate VDB2.8, virulent at the AvrLm1 locus and avirulent at the AvrLm4 locus.

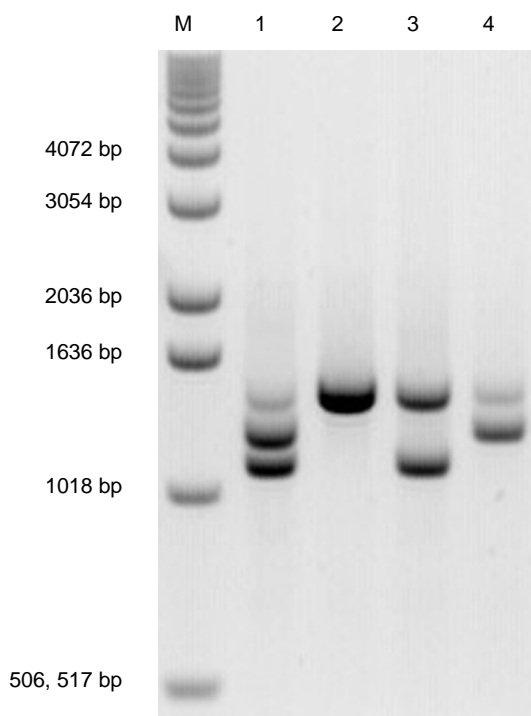


Tableau n°2 : Comparaison de la PCR multiple *AvrLm1* et *AvrLm4* et du test cotylédonnaire pour 200 isolats de *Leptosphaeria maculans* . Comparison of the multiplex PCR procedure with phenotypic cotyledon tests for 200 reference isolates of *Leptosphaeria maculans* .

| Résultat PCR Multiplexe | Phénotypes d'après les tests biologiques sur cotylédons | |
|-------------------------|---|-------------|
| | <i>a1A4</i> | <i>A1a4</i> |
| <i>a1A4</i> | 97 | 0 |
| <i>A1a4</i> | 0 | 99 |
| <i>a1a4</i> | 3 | 1 |
| Total | 100 | 100 |

Tableau n°3 : Fréquences des différents allèles pour les loci AvrLm1 et AvrLm4 lors des prélèvements effectués fin 2000, fin 2004 et fin 2008 en région Centre sur des variétés n'ayant pas de résistances spécifiques efficaces. En 2004 et 2008, après isolement, les virulences sont identifiées par PCR multiplex. Frequency of alleles for loci AvrLm1 and AvrLm4 for isolates collected in November 2000, 2004 and 2008 in Region Centre on genotypes without efficient specific resistance. In 2004 and 2008, after isolation, virulences were identified by multiplex PCR.

| Site et année d'échantillonnage | Méthode de phénotypage | nbre isolats | Allèles (%) | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------|-------|-------|-------|
| | | | A1A4 | A1a4 | a1A4 | a1a4 |
| Chateauroux 2000-01 Cv Grpe 1 | Tests Biologiques sur cotylédons | 93 | 0% | 11.8% | 4.3% | 88.2% |
| Zone pilote 2004-05 Cv Grpe 1 | Tests PCR multiplexés | 86 | 2.3% | 5.8% | 15.1% | 76.7% |
| Zone pilote 2008-09 cv Grpe 1 | | 61 | 1.6% | 11.5% | 8.2% | 78.7% |

DISCUSSION

Le clonage des gènes d'avirulence permet de franchir une étape importante dans leur connaissance et dans la caractérisation des échanges de signaux entre le pathogène et la plante, et la compréhension des mécanismes de fonctionnement des résistances spécifiques. Pour cet objectif de connaissance, *L. maculans* est un modèle biologique de premier rang. La connaissance des alignements de séquences des gènes d'avirulence et de leur environnement immédiat permet également des avancées plus pratiques. Il devient possible, à partir de ces séquences, de définir des amorces permettant d'identifier si le gène d'avirulence ciblé est présent ou pas. Les 2 cas présentés ici sont assez simples : dans le cas d'AvrLm1 le passage de l'état avirulent à l'état virulent est essentiellement lié à la délétion complète du gène (Gout et al 2007). En effet Gout et al (2007) avaient montré que les amorces définies permettaient l'identification correcte des allèles virulents ou avirulents dans plus de 98% des cas, sur une collection de plus de 300 isolats français ou étrangers, les autres cas d'altération de l'avirulence étant très minoritaires. Nos résultats confirment largement cette observation, avec 99,5% d'identification correcte du phénotype par PCR pour le locus AvrLm1. Pour AvrLm4, l'acquisition de la virulence est corrélée à une unique mutation ponctuelle (Parlange et al 2009). Cette mutation affecte probablement suffisamment le peptide synthétisé à partir du gène d'avirulence pour affecter sa fonction de reconnaissance par le gène de résistance *Rlm4*. Là encore les résultats présentés confirment largement l'intérêt du diagnostic moléculaire, avec 98,5% des isolats correctement phénotypés par PCR. Les deux gènes d'avirulence pris en compte appartiennent à deux clusters différents. Par ailleurs les deux mécanismes aboutissant à la virulence sont différents. Ces éléments sont favorables au développement de la méthode de diagnostic proposée ici, avec un multiplexage couplé à une digestion enzymatique générant

des bandes spécifiques se séparant facilement et suffisamment sur le gel d'électrophorèse, pour permettre une lecture aisée.

Pour surveiller des populations de *L. maculans* et avoir accès à l'évolution de leurs virulences, la procédure classique consiste à isoler des individus, leur faire produire des spores et utiliser ces spores pour inoculer une gamme d'hôtes de référence. Cette procédure est longue et mobilise des moyens humains conséquents. Ceci limite de fait les possibilités de surveillance et d'échantillonnage à partir de situations de plein champ. L'intérêt des techniques moléculaires est de réduire les temps de réalisation et les charges de travail, ce qui peut permettre d'augmenter les tailles d'échantillonnage. La substitution du test biologique par la PCR permet de réduire le temps de réalisation d'une quinzaine de jours. Il est également possible de réaliser la PCR directement à partir d'une macule foliaire. Le gain de délais et de temps de travail sont alors beaucoup plus conséquents, et autorise, à temps de travail équivalent une très forte augmentation de l'échantillonnage. Le déroulement des différentes étapes qui demandaient a minima 5 à 6 semaines est réduit à 2 jours. Néanmoins on ne peut alors identifier que les virulences pour lesquelles on dispose des outils moléculaires, puisqu'il n'y a alors pas d'isolement. Par ailleurs, ne repassant pas par la phase pycniospores il est envisageable d'avoir une macule foliaire formée par plusieurs individus. Si la mise en œuvre en routine de ces techniques permettra d'augmenter les échantillonnages pour atteindre des niveaux rendant pleinement crédible la surveillance, il sera de toute façon nécessaire de maintenir un minimum d'échantillons traités classiquement par isolement puis tests biologiques sur gamme d'hôtes de référence afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu occurrence fréquente d'un évènement nouveau conduisant à la virulence et non pris en compte par la méthode moléculaire. Aujourd'hui, avec l'introduction de la résistance spécifique *Rlm7*, se pose la question de la mise au point d'outils moléculaires pour identifier les individus virulents vis-à-vis de cette résistance spécifique, qui nécessite tout d'abord d'analyser les événements moléculaires responsables du gain de virulence.

L'application de la méthode d'évaluation proposée au suivi temporel des populations dans un site donné (Tableau n°3) montre une relative stabilité des proportions de virulents pour les 2 gènes d'avirulence considérés. Les avirulents *AvrLm1* conservent une proportion de l'ordre de 10 %, bien que sur les dix dernières années, à l'échelle régionale, les variétés portant *Rlm1* ont toujours occupé au moins 30% des surfaces (Données enquêtes postales CETIOM). La même relative stabilité est constatée pour les avirulents *AvrLm4* à un niveau de l'ordre de 10-15%, cependant légèrement plus élevé que le résultat de Chateauroux en 2000. Ces résultats ne gardent qu'une valeur indicative assez grossière compte tenu de l'échantillonnage réalisé, qui reste faible.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet CASDAR financé par le ministère de l'Agriculture. Les auteurs remercient les partenaires du projet ayant participé à la collecte des feuilles avec symptômes et en particulier les chambres d'agriculture de l'Indre et de la Vienne, ainsi que le GEVES.

BIBLIOGRAPHIE

- Balesdent M.H., Jedryczka M., Jain L., Mendes-Pereira E., Bertrand J. and Rouxel T. (1998) Conidia as a substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of members of the *Leptosphaeria maculans* species complex. *Phytopathology*, 88: 1210-1217.
- Balesdent, M.-H., Louvard, K., Pinochet, X. and Rouxel, T. (2006) A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *Eur. J. Plant Pathol.*, 114: 53-65.

- Fitt B.D.L., Brun H., Barbetti M.J., Rimmer S.R. (2006) World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 03-15.
- Fudal I., Ross S., Gout L., Blaise F., Kuhn M.L., Eckert M.R., Cattolico L., Bernard-Samain S., Balesdent M.H., Rouxel T. (2007) Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome : map-based cloning of *AvrLm6*. *Molecular Plant - Microbe Interactions* 20. 459-470
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T. (2006) Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.*, 60: 67-80.
- Gout, L., Kuhn, M.-L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., Moreno-Rico, O., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T. (2007) Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environ. Microbiol.*, 9:2978-2992.
- Gladders P., Evans N., Marcroft S.J., Pinochet X. (2006). Dissemination of information about management strategies and changes in farming practices for the exploitation of resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). *European Journal of Plant Pathology* 114: 117-126.
- Huang Y.J., Li Z.Q., Evans N., Rouxel T., Fitt B.D.L., Balesdent M.H. (2006) Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* 114: 117-126.
- Huang Y.J., Balesdent M.H. , Li Z.Q., Evans N., Rouxel T. and Fitt B.D.L. (2009) Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* (in press)
- Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Balesdent, M.-H., Blaise, F., Grezes-Besset, B. and Rouxel, T. (2009) *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Mol. Microbiol.* 71 : 851-863.
- Rouxel T., Penaud A., Pinochet X., Brun H., Gout L., Delourme R., Schmit J., Balesdent M.H. (2003) A ten year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* 109 : 871-881
- Sprague S.J., Balesdent M.H., Brun H., Hayden H.L., Marcroft S.J., Pinochet X., Rouxel T., Howlett B.J. (2006) Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* 114: 33-40
- Stachowiak A., Olechnowicz J., Jedryczka M., Rouxel T., Balesdent M.H., Happstadius I., Gladders P., Latunde-Dada A., Evans N. (2006) Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 114: 67-75.
- West, J.S., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., Narcy, J.P., Huang, Y.-J., Roux, J., Steed, J.M., Fitt, B.D.L. and Schmit, J. (2002). Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox⁺ and B/Tox⁰ *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathol.* 51:311-321.

**UNE COOPÉRATION EUROPÉENNE POUR LA VALIDATION DE PROTOCOLES DE
 DÉTECTION ET D'IDENTIFICATION DE *PANTOEA STEWARTII* SUBSP. *STEWARTII*
 SUR SEMENCES DE MAÏS**

M. VISAGE¹, S. PAILLARD¹, V. OLIVIER¹, F. POLIAKOFF¹, H. SOUBELET¹

¹ : Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station d'Angers, 7 rue Jean
Dixméras – FR-49044 Angers cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

RÉSUMÉ

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* (*Pss*) est la bactérie responsable du flétrissement du maïs, l'infection se traduisant par des lésions foliaires. La bactérie est transmise via un insecte vecteur (*Chaetocnema pulicaria*) mais les semences sont également considérées comme une source potentielle d'introduction et de dissémination. Cette bactérie est présente sur le continent américain, en Asie et en Europe (Hongrie). C'est pourquoi elle est recherchée dans le cadre d'imports de lots de semences de maïs par les Laboratoires des Organisations Nationales de Protection des Végétaux. Actuellement, il n'existe pas de protocole de détection harmonisé au niveau européen. Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet européen EUROpean PHYtosanitary RESearch COordination (EUPHRESKO). Le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPV) du Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche s'est impliqué dans ce projet avec les objectifs suivants : coordonner l'évaluation des méthodes de détection et d'identification du *Pss* actuellement disponibles (biologie moléculaire, sérologie, isolement sur milieu) et organiser un essai inter-laboratoires européen destiné à valider les protocoles de détection. Ce programme, engagé en 2008, doit se terminer fin 2009.

Mots-clés : bactérie, PCR, immunofluorescence, isolement sur milieu, essai inter-laboratoires.

SUMMARY

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* (*Pss*) is a bacterium responsible of wilt on corn; the main symptoms are leaf lesions. The disease is transmitted via an insect vector (*Chaetocnema pulicaria*) even if seed is also considered as an important source of contamination. The bacterium is present in the United States, Central America, Asia and Europe (Hungary).. Currently there is no harmonized detection protocol at the European level. This study is part of the project EUROpean PHYtosanitary RESearch COordination (EUPHRESKO) in which the Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPV) is involved with the following objectives: coordinate the evaluation of methods detection and identification currently available (molecular biology, serology, isolation in the middle), get contaminated seeds to organize an interlaboratory test to validate European protocols for detection. The program planned for 2008 and 2009 is underway.

Key words: bacteria, PCR, immunofluorescence, isolation on media, ring test.

INTRODUCTION:

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* (*Erwinia stewartii* Mergeart et al, 1993) est la bactérie responsable du flétrissement des cultures de maïs (*Zea mays*). Elle est classée en bactérie de quarantaine au sens de la directive 2000/29/CE. De ce fait, c'est un organisme nuisible dont l'introduction et la dissémination sont interdites dans tous les Etats Membres. C'est pourquoi, elle est recherchée dans le cadre d'imports de lots de semences de maïs par les Laboratoires des Organisations Nationales de Protection des Végétaux (ONPV). Pour prévenir sa propagation, il est nécessaire d'effectuer des analyses de laboratoire sur semences. Cependant, bien qu'un protocole OEPP (Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes) ait été publié en 2006, il n'y a pas de protocole de détection harmonisé entre les Etats Membres de l'Union européenne. Depuis 2008, un programme européen EUPHRESO (EUropean PHytosanitary RESearch COordination) vise à évaluer au travers de l'obtention de critères de performance et d'un test inter-laboratoires les méthodes de détection et d'identification du *Pss* disponibles dans le protocole OEPP. Les partenaires de ce programme sont le JKI en Allemagne, l'AGES en Autriche, le FERA en Grande-Bretagne, le PPCRI en Turquie, l'AODP en Hongrie et le LNPV en France.

Le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPV) d'Angers est coordinateur de ce programme prévu sur 2008 et 2009.

MATERIEL ET METHODES

Evaluation des critères de performance

a) Définitions

Les critères de performance des techniques ont été déterminés sur la base des normes EN ISO 16140 et AFNOR XP V03-111.

L'**inclusivité** est la capacité d'une méthode à détecter la cible à partir d'un large éventail de souches de *Pss*. C'est une composante de la **sensibilité** qui est la capacité d'une méthode à donner un résultat positif quand la cible est présente.

La **spécificité** est la capacité de la méthode à donner un résultat négatif quand la cible n'est pas présente.

L'exactitude relative est le niveau de correspondance entre la réponse attendue (positive ou négative) et la réponse obtenue avec la méthode sur des échantillons identiques.

Le **seuil de détection** est le niveau de contamination le plus bas pouvant être détecté par la méthode.

La **répétabilité** quantifie l'homogénéité des résultats d'essai. C'est la capacité d'une méthode à donner le même résultat lorsque les deux échantillons identiques sont analysés dans les mêmes conditions.

Enfin, la **reproductibilité** est la capacité d'une méthode à reproduire toujours le même résultat lorsque deux échantillons identiques sont analysés dans des conditions différentes.

b) Modalités d'évaluation des critères de performance de la PCR, l'immunofluorescence et le test ELISA

L'évaluation de la sensibilité, de la spécificité, de la répétabilité et de l'exactitude a été réalisée au sein du LNPV pour les techniques d'immunofluorescence indirecte (sérum de marque Loewe), ELISA (kit de marque Agdia) et PCR (Coplin et al, 2002 – 4 couples d'amorces) sur 30 souches bactériennes de référence dont 15 souches de bactéries cibles (*Pss*) et 15 souches de bactéries non cibles (Tableau 1).

Les gammes de suspensions bactériennes suivantes ont été analysées : IF, 10^4 à 10^6 ufc/ml ; ELISA, 10^6 ufc/ml ; PCR, 10^8 ufc/ml. Chaque analyse a été répétée 3 fois (figure 1).

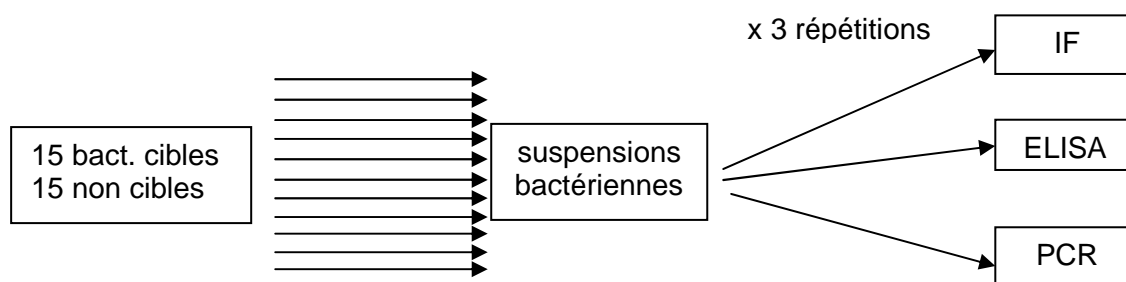
La méthode d'isolement sur milieu King B ayant fait l'objet d'une étude préalable (Moreau, 2002), elle n'a pas été ré-évaluée dans le cadre de ce programme.

Tableau 1 : Collection de souches bactériennes

Table 1: Collection of bacterial strains

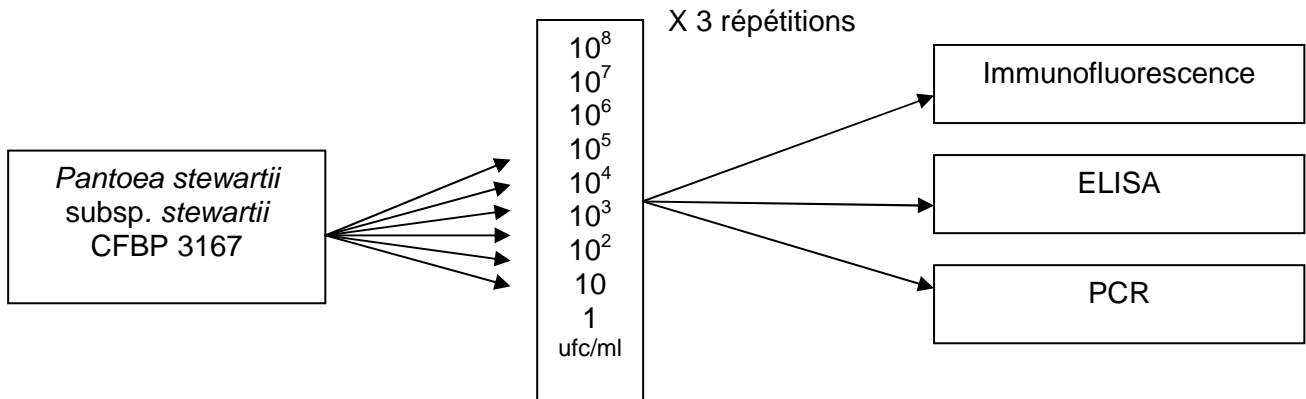
| N° | REF PATHOGENE | NOM PATHOGENE | HOTE | ORIGINE | ANNEE ISOLEMENT |
|----|---------------|--|-------------------------------------|----------|-----------------|
| 1 | CFBP 3171 | <i>Pantoea ananas</i> pv. <i>uredovora</i> | <i>Puccinia graminis</i> | USA | 1954 |
| 2 | CFBP 1392 | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> | <i>Syringae vulgaris</i> | UK | 1950 |
| 3 | CFBP 1719 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | - |
| 4 | CFBP 2502 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> var. <i>Rugosa</i> | USA | 1957 |
| 5 | CFBP 3167 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1970 |
| 6 | CFBP 3445 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1985 |
| 7 | CFBP 3395 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | - | USA | - |
| 8 | NCPPB 3253 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | - | - | - |
| 9 | CFBP 3157 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1963 |
| 10 | CFBP 3517 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | - |
| 11 | CFBP 3394 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | Coléoptère | USA | 1954 |
| 12 | CFBP 3166 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1975 |
| 13 | CFBP 3845 | <i>Pantoea agglomerans</i> | - | - | 1956 |
| 14 | CFBP 3396 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | Coléoptère | USA | 1975 |
| 15 | CFBP 3169 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | - |
| 16 | CFBP 1141 | <i>Pseudomonas viridiflava</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Suisse | 1927 |
| 17 | CFBP 3168 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1957 |
| 18 | CFBP 3393 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | - | - | - |
| 19 | CFBP 3165 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1932 |
| 20 | CFBP 4999 | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | - | - | - |
| 21 | CFBP 1526 | <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | UK | 1957 |
| 22 | CFBP 1731 | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapsa</i> | <i>Zea sp.</i> | - | 1731 |
| 23 | CFBP 3456 | <i>Curtobacterium flaccumfasciens</i> pv. <i>flaccumfasciens</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Hongrie | 1957 |
| 24 | CFBP 2046 | <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotova</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Danemark | 1952 |
| 25 | CFBP 2052 | <i>Erwinia chrisanthemi</i> pv. <i>zea</i> | <i>Zea mays</i> | USA | 1970 |
| 26 | CFBP 5251 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | <i>Brassicae oleracea gemmifera</i> | UK | 1957 |
| 27 | CFBP 3614 | <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i> | <i>Setaria italica</i> | Inde | 1995 |
| 28 | CFBP 2431 | <i>Pseudomonas corrugata</i> | - | - | - |
| 29 | CFBP 1232 | <i>Erwinia amylovora</i> | <i>Pyrus communis</i> | UK | 1959 |
| 30 | CFBP 3521 | <i>Clavibacter michiganensis</i> susp. <i>nebraskensis</i> | | | |

Figure 1 : schéma de détermination des critères de performance des techniques
Figure 1: scheme for determining the performance criteria of the techniques



Le seuil de détection des 3 mêmes techniques a été évalué à partir d'une gamme de dilutions de 10^8 à 1 ufc/ml de la souche type *Pss* CFBP 3167 (figure 2). La concentration initiale a été vérifiée par dénombrement sur milieu King B. Cette analyse a été répétée 3 fois.

Figure 2 : schéma de détermination des seuils de détection des techniques
 Figure 2: scheme for determining the detection thresholds of the techniques



c) Test d'immunofluorescence (OEPP, 2006)

L'immunofluorescence a été réalisée avec l'antisérum polyclonal de lapin de marque Loewe (1/2000^e) et l'anticorps anti-lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceine (Sigma 1/400). Les lames ont été observées au microscope à épifluorescence (grossissement x 1000). Les critères de reconnaissance de *Pss* sont d'une part, sa **forme** (bâtonnets qui peuvent être regroupés en paires avec des séparations caractéristiques de la division des cellules), sa **taille** (0,9 à 2,0 μm de longueur et 0,4 à 0,7 μm de largeur) et la **qualité de sa coloration** (fluorescence intense et continue).

La souche analysée est considérée comme **négative** lorsque aucune cellule à fluorescence vive et morphologiquement typique n'a été trouvée. *A contrario*, celle-ci est considérée **positive** lorsqu'il y a présence de cellules à fluorescence vive et morphologiquement caractéristiques.

d) Test ELISA (OEPP, 2006)

Le protocole DAS-ELISA est réalisé à l'aide d'un kit commercial de marque Agdia sur les suspensions bactériennes. Les microplaques ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 2 heures et les densités optiques lues à une longueur d'onde de 405 nm. Un échantillon est déterminé comme positif lorsque la valeur moyenne des densités optiques est supérieure à un seuil supérieur à deux fois la moyenne des valeurs des densités optiques des témoins négatifs.

e) Test PCR (Coplin & al, 2002)

L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée par choc thermique : ébullition à 95°C pendant 10 minutes, puis congélation. La PCR a été réalisée avec 2 μl d'extrait d'ADN et 23 μl de mélange réactionnel comprenant 1U/ μl de Taq polymérase (Promega), 0,50 μM de chaque amorce, 0,20mM de dNTP dans 1,5mM de MgCl_2 et 1x de tampon 10x.

Les couples d'amorces sont CPSL1 CCTGTCTCAGTCTCGAACC et CPSR2c ATCTCGAACCGGTAACC (1100 pb); HRP1d GCACTCATTCGACCAC et HRP3c GCGGCATACCTAACTCC (900 pb); ES16 GCGAACTTGGC-AGAGAT et ESIG2c GCGCTTGCGTGT-TATGAG (920 pb); ESIG 1 CGAAGC-GAGGACACACG et ESIG2c GCGCTTGCGTGT-TATGAG (290 pb).

Les conditions de l'amplification de la PCR sont : 1 cycle d'une minute à 94°C, puis 25 cycles de 15 secondes à 94°C, 15 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C et enfin un cycle de 5 minutes à 72°C. Les amplifiats ont ensuite été séparés sur un gel d'agarose à 3% avec une migration de 1 V/cm et révélés dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET).

f) Evaluation du pouvoir pathogène (OEPP, 2006)

Ce test d'identification a été effectué sur des variétés sensibles de plants de maïs avec 15 souches de *Pss* (2 répétitions). Les plants de maïs ont été inoculés dans la tige, 15 jours après le semis avec des suspensions bactériennes à 10^8 ufc/ml puis placés à une température de 26°C (+/- 1°C), une hygrométrie allant de 80 à 100 % et une photopériode de 14 heures par jour.

Les premiers symptômes sont apparus environ 5 jours après l'inoculation. Cependant, afin d'observer l'ensemble des lésions provoquées par chaque souche, la lecture a été effectuée 13 jours après l'inoculation, puis à 17 jours. Un prélèvement (4 à 5 cm de tige) a été effectué afin de confirmer les symptômes par un ré-isolément sur milieu King B et une immunofluorescence.

Premiers résultats

La PCR et l'immunofluorescence sont les deux techniques qui ont obtenu les meilleurs critères de performance (seuil de détection, sensibilité, spécificité, répétabilité et exactitude) sur souches pures.

Ces deux techniques ont donc été retenues pour la réalisation de l'essai inter-laboratoires qui vise à vérifier la validité des méthodes sur semences.

Préparation de l'organisation d'un essai inter-laboratoires

a) problématique : obtention de semences contaminées

Comme la bactérie *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* n'est pas présente en Europe, la recherche de lots de semences contaminées naturellement a été effectuée aux États-Unis. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir de tels lots de semences. La seule façon de travailler sur les différentes techniques de détection du *Pss* a été d'obtenir des échantillons contaminés artificiellement. Le but étant d'obtenir des semences avec différents niveaux de contamination. La contamination de ces semences se devait d'être homogène et stable dans le temps afin de pouvoir l'utiliser dans l'essai inter-laboratoires.

Les deux méthodes de contamination qui ont été testées sont l'injection dans la graine et l'infiltration sous vide.

b) Matériel et méthodes pour l'obtention de semences contaminées

Les inoculations pour injection ont été réalisées avec des suspensions de la souche type *Pss* CFBP 3167 (concentrations de 10^8 , 10^6 et 10^3 ufc/ml), de la souche *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* CFBP 3614 (10^8 ufc/ml) et une bactérie saprophyte isolée de graines de maïs présentant une morphologie de colonie sur milieu King B proche du *Pss* (10^8 ufc/ml). L'inoculation a été réalisée avec 100 µl de suspension bactérienne injectés dans chaque graine préalablement imbibée. Après séchage à température ambiante, les graines ont été stockées à +4°C.

L'inoculation par infiltration sous vide a été réalisée seulement à partir de la souche type *Pss* CFBP 3167 à une concentration de 10^6 ufc/ml. Les graines préalablement imbibées ont été mises en contact avec la suspension bactérienne sous une cloche à vide. Le vide a été

maintenu pendant 2 à 4 minutes sous agitation. Puis, les graines ont été égouttées, séchées à température ambiante et stockées à +4°C.

La vérification de la contamination des graines a été réalisée 3, 7 et 15 jours après contamination par analyse avec dénombrement sur milieu King B et par immunofluorescence.

c) Résultats des essais de contamination de semences

Les résultats des isolements sur milieu et des tests d'immunofluorescence ont montré que les semences n'avaient pas un niveau de contamination homogène et stable dans le temps. Dans le cadre de l'essai inter-laboratoires, le matériel à disposition des laboratoires participants se devant d'être homogène et stable, le choix a alors été fait de contaminer des macérats de semences de maïs et d'envoyer des extraits inactivés.

d) Réorientation : production de macérats contaminés

Les macérats ont été préparés à partir de 35g de graines de maïs dans 70 ml de tampon PBS stérile pendant une nuit à 4°C. Les contaminations ont été réalisées avec des suspensions bactériennes de souches de *Pss* et de non-*Pss* afin d'obtenir les concentrations finales de macérats suivantes : souche type CFBP 3167 à 10^8 ufc/ml, *Pss* CFBP 3169 à 10^6 , 10^5 , 10^4 et 10^3 ufc/ml, souche *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* CFBP 3614 à 10^8 ufc/ml, souche de *Pseudomonas corrugata* LNPV 2.29 à 10^8 ufc/ml.

Après contamination, le protocole OEPP a été suivi : une agitation à 200 tours/minute à température ambiante pendant 10 à 15 minutes, une concentration x10 des extraits a été réalisée par une centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes. Ensuite, le culot a été resuspendu dans 2 ml de solution saline. Puis, l'inactivation a été effectuée par un bain à 70°C pendant 15 minutes. Des vérifications de concentration des inocula ont été effectuées par dénombrement de colonies sur milieu King B et par des tests d'immunofluorescence à chaque stade de la manipulation.

Les résultats des dénombrements sur milieu King B ont montré la mortalité des bactéries après l'inactivation. Ce procédé peut donc être utilisé pour les échantillons de l'essai inter-laboratoires.

Cependant, après l'inactivation, lors de la lecture du test d'immunofluorescence, les bactéries ont présenté des lésions avec une paroi abîmée voire cassée et un halo fluorescent autour des cellules bactériennes. La lecture a été, par conséquent, rendue difficile et inhabituelle. Les extraits inactivés ne sont donc pas adaptés à la lecture au microscope à épifluorescence. L'inactivation ne pouvait pas être utilisée dans le cadre d'un essai inter-laboratoires pour tester la technique d'immunofluorescence.

RESULTATS

Les résultats obtenus lors de la phase préparatoire d'évaluation des méthodes et lors de la phase de préparation des échantillons nécessaires à l'essai inter-laboratoires ont conduit le LNPV :

- à sélectionner les techniques IF et PCR pour l'essai ;
- à modifier le protocole d'essai
 - o au profit de macérats contaminés et non de semences contaminées ;
 - o la lecture des lames d'immunofluorescence étant rendue difficile par l'inactivation, le choix a été fait d'envoyer aux laboratoires participants des lames avec les extraits centrifugés mais non inactivés et fixés à l'éthanol à 96 % ; les extraits inactivés ont été conservés pour les tests à réaliser en PCR;

Chaque extrait a été répété afin de tester la répétabilité et la reproductivité de l'essai.

L'obtention des macérats a été réalisée de la façon suivante : les graines préalablement imbibées dans le volume de 70ml de PBS ont été agitées à 200 tours/minutes à température ambiante pendant 15 minutes ; les macérats ont été concentrés x10 par une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes. Ensuite, le culot a été resuspendu dans 2 ml de solution saline. L'échantillon a ensuite été séparé en deux pour réaliser d'une part une inactivation à 70°C pendant 15 minutes pour la réalisation des PCR et d'autre part, la fixation à l'alcool 96% sur des lames pour immunofluorescence.

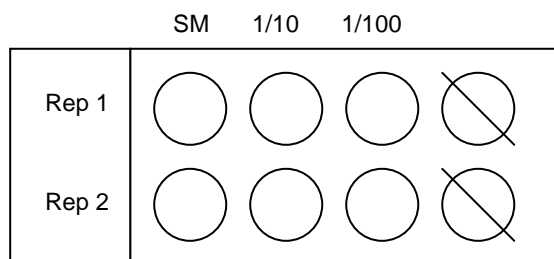
Les témoins négatifs préparés sont les suivants : une souche de *Psi* CFPB 3614, de *Pc* CFPB 2431 et deux bactéries saprophytes isolées de graines de maïs. De plus, un échantillon négatif a été préparé avec 35g de graines de maïs dans 70 ml de tampon PBS. Les témoins positifs (2 répétitions) utilisés sont dix extraits contaminés à différentes concentrations par du *Pss* (souches CFPB 3169, CFPB 3396 et CFPB 3167).

Des vérifications de concentration des inoculums ont été effectuées par dénombrement de colonies sur milieu King B et par des tests d'immunofluorescence.

Les laboratoires ont reçus 30 lames d'immunofluorescence avec trois concentrations des macérats (suspension mère, 1/10, 1/100) par 2 répétitions et 30 microtubes de PCR de 500 µl avec des suspensions mère inactivées.

Figure 3 : Schéma des lames d'immunofluorescence

Figure 3 : Scheme of immunofluorescence slides



Les tests réalisés par les laboratoires sont la coloration et la lecture sous microscope à épifluorescence des lames d'immunofluorescence, les tests de PCR selon le protocole de Hufnagl (non publié) et la PCR temps réel selon le protocole de Tambong (2006).

Les résultats de l'EIL feront l'objet d'une synthèse une fois l'analyse des données terminée.

CONCLUSION

Ce travail de collaboration permettra d'optimiser le schéma de détection et d'identification du *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* sur semences de maïs et de modifier le protocole OEPP. Cependant, l'étape d'extraction de la bactérie à partir des semences n'aura pas pu être étudiée dans le cadre de ce programme. L'obtention de semences contaminées reste une limite à l'approfondissement de ces travaux. L'obtention des critères de performance des méthodes interviendra en appui aux décisions du Ministère chargé de l'Agriculture concernant les méthodes à utiliser dans la gestion du risque d'introduction du flétrissement bactérien du maïs en France.

REMERCIEMENTS

Le LNPNV remercie les laboratoires JKI en Allemagne, AGES en Autriche, FERA en Grande-Bretagne et PPCRI en Turquie pour leur participation dans les travaux de ce programme EUPHRESKO.

BIBLIOGRAPHIE

- Agdia Reagent Set compound / ELISA, alkaline phosphatase label.
- Bradbury JF., 1986 - Guide to plant pathogenic bacteria - CAB international, mycological institute.
- Coplin DL & Majerczak DR., 2002 - Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and Strain Differentiation by PFGE. *Plant Disease* 86, 304-311.
- Moreau S. 2002 – Recherche pour l'amélioration des méthodes de détection d'une bactérie de quarantaine pathogène du maïs : *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Rapport de stage LNPV.
- OEPP/EPPO., 2008 - EPPO standards PM1/2. EPPO A1 and A2 list of pest recommended for regulation as quarantine pests.
- OEPP, 1992 - Data Sheets on Quarantine Pests prepared by CABU and EPPO for the EU under Contract 90/399003.
- OEPP, 2006 - Diagnostic *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, *Bulletin OEPP/EPPO* 36, 111-115.
- Tambong JT & al., 2008 - Rapid detection and identification of the bacterium *Pantoea stewartii* in maize by Taqman ® real-time PCR assay targeting the *cpsD* gene. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), p.1525-1537.

**MISE EN EVIDENCE DU PSTVD ET TCDVD EN FRANCE SUR PLANTES
ORNEMENTALES ET CULTURE DE TOMATES**

X. TASSUS, V. MOLINERO-DEMILLY, P. SUHARD, I. RENAUDIN, A. LEGUAY,
M. LOISEAU ET F. POLIAKOFF

Laboratoire national de la protection des végétaux, 7 rue Jean Dixmèras, 49044 ANGERS
cedex 01, France, xavier.tassus@agriculture.gouv.fr

RÉSUMÉ

Le Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) et le Tomato Chlorotic Dwarf Viroid (TCDVd) appartiennent à la famille des *Pospiviridae*.

Le PSTVd est un organisme de quarantaine sur tout végétal importé de pays tiers (2000/29/CE). Les hôtes de ces deux viroïdes sont la pomme de terre, la tomate et des solanacées ornementales. Sur pomme de terre et tomate, ces viroïdes causent des dommages importants. Suite à un signalement aux Pays-Bas du PSTVd (Verhoeven, 2004), des mesures phytosanitaires doivent être mises en oeuvre au niveau de l'Union européenne sur *Solanum jasminoïdes* et *Brugmansia* sp à l'importation et lors de leur circulation dans l'UE (décision 2007/410/CE). Le dispositif français est présenté ici. Il vise, grâce à une surveillance renforcée, à minimiser les risques d'introduction de ce viroïde sur le territoire national. Des premières investigations sur culture de tomate ont également permis la mise en évidence sur le territoire du TCDVd.

Mots-clés : PSTVd, TCDVd, viroïde, plante ornementale, tomate

SUMMARY

OUTBREAK OF THE PSTVD AND TCDVD IN FRANCE ON ORNAMENTAL PLANTS AND TOMATO CROPS

The Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) and the Tomato Chlorotic Dwarf Viroid (TCDVd) belong to the *Pospiviridae* family .

The former is a quarantine pest on all imported plants from third country (2000/29 EC). Plant hosts of these two viroids include potato, tomato and ornamental plants of the *Solanaceae* family. On potato and tomato, these viroids produce important damages. Following the PSTVd outbreak detected in Netherland (Verhoeven, 2004), phytosanitary measures must be carry out in the European Union on imported *Solanum jasminoides* and *Brugmansia* sp and during their movement in the EU (Decision 2007/410/EC). The French monitoring is presented here. This strengthned monitoring aim to decrease the risk of introduction of these viroids on the national territory. First investigations on tomato crops have permitted to find an outbreak of TCDVd in France.

Key words: PSTVd, TCDVd, viroid, ornamental plant, tomato

INTRODUCTION

Le Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVD) pathogène des *Solanaceae* appartient à la famille des *Pospiviroidae*. Les hôtes principaux connus de ce viroïde sont la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Les symptômes varient du simple jaunissement au rabougrissement, voire à la nécrose, des plantes (Anonymous, 1992).

A la suite de prospections réalisées par les Services de la Protection des Végétaux néerlandais, le PSTVd a été identifié sur *Brugmansia sp* et *Solanum jasminoides* (Verhoeven, 2004), plantes sur lesquelles ce viroïde n'engendre pas de symptômes. La France a rapidement mis en place, conformément à l'article 3 de la décision communautaire 2007/410/ CE du 12 juin 2007, un plan de contrôle du PSTVd sur culture ornementale. Ce plan vise à limiter les risques de diffusion sur culture d'intérêt. Cette communication présente les résultats obtenus lors de la campagne de prospection 2007.

MATERIEL ET MÉTHODE

PREPARATION DES ECHANTILLONS ET EXTRACTION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES (ARN)

A partir des échantillons de matériel végétal reçu au laboratoire, 1g de feuille est pesé et déposé dans un sac de broyage plastique de type ELISA (Bioreba). Avant broyage à l'aide d'un homex 6 (Bioreba), 5 mL de tampon d'extraction (0.02M PBS, 0.05% TWEEN, 2% PVP, 0.2% Ovalbumine) est ajouté à l'échantillon. 50 µL du broyat ainsi obtenu est ensuite prélevé et déposé dans un tube eppendorf de 1,5 mL. La suite de l'extraction est réalisée en appliquant la procédure décrite par le fournisseur du kit RNA Masterpure (TEBU). Dans chaque série d'extraction est placé un contrôle dit positif d'extraction composé de matériel infecté par du PSTVd ou TCDVd et un contrôle dit négatif d'extraction composé de matériel végétal de même espèce que celui testé indemne du pathogène à détecter. Ces contrôles permettront de vérifier la bonne réalisation de la manipulation et l'absence de contamination croisée.

REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) ET MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

L'étape de reverse transcription est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL qui contient 1 µL d'ARN purifié. Les amorces utilisées sont celles décrites par Shamlool (1997) :

2H1 : 5'-CCCTGAAGCGCTCCTCCGAG-3', 3H1 : 5'-ATCCCCGGGAAACCTGGAGCGAA34.

La composition du mix réactionnel est décrite par le fournisseur du kit superscript one-step RT-PCR with Platinum *Taq* (Invitrogen). Le cycle d'amplification est le suivant : 43°C pendant 30 minutes ; 94°C pendant 2 minutes, 10 cycles de 94°C pendant 30 secondes, 68°C pendant 90 secondes et 72°C pendant 45 secondes, 20 cycles de 94°C pendant 30 secondes, 64°C pendant 90 secondes et 72°C pendant 45 secondes et une élongation finale de 72°C pendant 8 minutes. En plus des échantillons et contrôles utilisés durant la phase d'extraction d'ARN, un contrôle positif (ARN positif lors d'une manipulation de détection par RT-PCR du PSTVd et du TCDVd) et un contrôle négatif (eau ayant servi à la préparation du mix) d'amplification sont ajoutés durant la phase de RT-PCR afin de vérifier la bonne réalisation de la manipulation et l'absence de contamination croisée.

L'identification du fragment d'acide nucléique amplifié d'intérêt d'une taille de 359 paires de base se fait après migration sur gel d'agarose 3% et révélation au bromure d'éthyldium.

SEQUENÇAGE

Afin de caractériser génétiquement les fragments PCR amplifiés, leur séquençage est réalisé par la société Cogenics (Meylan, France). A partir de la séquence ainsi obtenue, un alignement *in silico* est réalisé via le logiciel Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) avec des séquences génomiques de viroïdes disponibles dans les banques internationales. L'identité de la séquence est déterminée en fonction du pourcentage d'homologie observé.

RESULTATS

Le plan de contrôle 2007 du PSTVd sur plante ornementale s'est étendu du mois de juin à décembre. Au total, 226 échantillons ont été analysés : 35% issus de pépinières ou de pieds-mères, 65% issus de plantes destinées à la vente en jardinerie. Les résultats de la campagne d'analyse sont regroupés dans le tableau I.

tableau I : Résultats de la surveillance menée en 2007

table I : Results of the monitoring led in 2007

| Espèces végétales | Nombre d'échantillons prélevés et analysés | Nombre d'échantillons positifs PSTVd | Incidence en % | Nombre d'échantillons positifs TCDVd |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------|
| <i>Brugmansia sp</i> | 47 | 7 | 15 % | |
| <i>Petunia spp</i> | 5 | 1 | 20 % | |
| <i>Solanum capsicum</i> | 5 | 1 | 20 % | |
| <i>Solanum jasminoides</i> | 126 | 20 | 15 % | |
| <i>Solanum pseudocapsicum</i> | 8 | 1 | 12 % | |
| <i>Solanum rantonetti</i> | 22 | 9 | 40 % | |
| <i>Solanum spp</i> | 8 | 3 | 37 % | |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | 5 | | | 2 |

DISCUSSION

Ce plan de contrôle a permis de mettre en évidence sur le territoire français, la présence de cultures ornementales infectées par du PSTVd. Sur 232 plantes testées, 42 se sont montrées positives pour la détection du PSTVd après analyse soit 18%. Ces plantes infectées ne présentent pas de symptômes de la maladie mais peuvent servir de réservoir et disséminer le viroïde par simple contact de plante à plante ou à des cultures d'intérêt tel que la pomme de terre ou la tomate. La majorité de ces plantes ornementales est multipliée par bouturage, un contrôle des pieds-mère devrait donc permettre de limiter l'expansion du PSTVd sur ces cultures. Des travaux sont en cours afin d'identifier d'autres modes de transmission tel qu'une transmission par arthropode ou par la semence.

Tous les échantillons positifs ont fait l'objet d'une destruction.

Lors du même plan de surveillance, un cas d'infection d'une culture de tomate par le TCDVd a été détecté. Des dommages importants causés par ce viroïde ont alors pu être observé notamment en termes de perte de rendement. Des mesures d'éradication des plants infectés ont été prises afin de limiter l'expansion du TCDVd au sein de l'exploitation concernée. Les origines possibles d'introduction de ce pathogène sont en cours d'examen.

CONCLUSION

Le contrôle des cultures ornementales hôtes du PSTVd doit permettre de limiter la diffusion de ce pathogène sur des cultures d'intérêt tel que la pomme de terre ou la tomate. Durant l'année 2007, 18% des échantillons ont été détectés positifs le PSTVd. Ces plants ont tous

été détruits. L'assainissement progressif des pieds-mère devrait permettre de sécuriser la filière de production.

Durant l'année 2007, un cas de TCDVd a également été détecté sur culture de tomate. Ce viroïde, proche génétiquement du PSTVd, a causé d'importants dommages sur la culture infectée. Des mesures d'éradication ont été prises. Les origines d'introduction de ce viroïde dans l'exploitation sont en cours d'étude.

La problématique de l'émergence des viroïdes, commune à plusieurs pays au sein de l'Union Européenne, a entraîné la mise en place d'un projet ERANET Euphresco, visant à développer les connaissances sur l'épidémiologie et la détection des Pospiviroides.

BIBLIOGRAPHIE

Anonymous. 1992. Potato Spindle Tuber Viroid. Data Sheets on Quarantine Pests. *EPPO/CABI*. 936-941

Shamloul AM, Hadidi A, Zhu SF, Singh RP and Sagredo B. 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian journal of Plant Pathology*. 19: 89-96

Verhoeven J. T. J., Janse C. C. C., Willemn T; M. Kox L. F. F., Owens R. A. and Roenhorst J. W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato Chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 823-831

**IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DE *PECTOBACTERIUM* ISOLÉS À PARTIR DES
TUBERCULES DE POMME DE TERRE EN ALGÉRIE**

S. OUANAS ⁽¹⁾ et R. YAHIAOUI-ZAIDI. ⁽²⁾

(1) Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Microbiologie, Faculté des
Sciences de la Nature et de la Vie,
Université : A.MIRA/ALGERIE/monia_bio@hotmail.com

(2) Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biochimie, Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie,
Université : A.MIRA/ALGERIE/rachida_zaidi@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Différents types de microorganismes peuvent être à l'origine de la dégradation des tubercules de pomme de terre disposés en entrepôt ou aux champs.

Parmi les microorganismes, les bactéries et notamment les espèces du genre *Erwinia* sont particulièrement incriminées, provoquant la maladie de la pourriture molle.

Notre travail a consisté à isoler et identifier cinq souches appartenant à l'espèce *Erwinia chrysanthemi*, à partir des prélèvements réalisés sur des tubercules de pomme de terre apparemment contaminés appartenant à la variété Spunta et présents sur le marché algérien.

Notre travail ressortit et ce comparativement à des travaux antérieurs, une nette élévation de la fréquence d'isolement des souches d'*Erwinia chrysanthemi*, ceci doit être pris en considération, vu l'agressivité qu'exerce cette bactérie sur les tubercules de pomme de terre.

Mots-clés : phytopathogénécité, *Erwinia*, pourriture molle, pomme de terre.

SUMMARY

**BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF *PECTOBACTERIUM* ISOLATED FROM POTATO
TUBERS IN ALGERIA**

Different microorganisms can cause degradation of the potato arranged in a warehouse or field.

Among microorganisms, including bacteria *Erwinia chrysanthemi* are particularly challenged, causing disease of the soft rot.

This work was to isolate and identify strains belonging to the species *Erwinia chrysanthemi*, from samples taken on potato variety Spunta and on Algerian market.

Our work this out and compared with previous work, a clear increase in frequency of isolation of strains of *Erwinia chrysanthemi*, this must be taken into consideration, given the aggressiveness exerted this bacterium on potato tubers.

Key words: phytopathogenicity, *Erwinia*, soft rot, potato tubers.

INTRODUCTION

L'accroissement de la productivité en agriculture est devenu un souci constant ces dernières années. En effet, les plantes sont constamment exposées à de nombreux problèmes phytosanitaires qui ont limité sévèrement la productivité agricole et ont influencé l'histoire et le développement des pratiques culturales (Walton, 1997).

Les agents responsables des maladies végétales sont très similaires à ceux rencontrés chez l'homme et les animaux. Ils peuvent être biologiques (bactéries, champignons, virus, insectes et nématodes), ou environnementaux (manque de nutriments, lumière, eau, présence de produits toxiques dans le sol et l'air (Castro et Fontes, 2005).

La pomme de terre est l'une des cultures maraîchères les plus touchées par une contamination parasitaire et microbienne importante. Les bactéries du genre *Erwinia* caractérisées par une activité pectinolytique (*Pectobacterium*), provoquent les maladies de pomme de terre développées au champ (jambe noire et flétrissements bactériens), ou lors du stockage (pourritures molles).

Le développement massif de ces pourritures est à l'origine de préjudices économiques importants.

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour caractériser et identifier ces bactéries mais la technique biochimique classique reste la plus adaptée et la plus maîtrisée dans nos conditions de travail. L'identification d'une centaine de souche appartenant à l'espèce *E. carotovora* réalisée par Yahiaoui-Zaidi et al, (2003) a permis de révéler une grande diversité biochimique et moléculaire, au sein des populations d'*Erwinia* pectinolytiques avec la présence de souches affiliées à de nouveaux groupes RFLP. Même si l'espèce *chrysanthemi* n'a pas été signalée dans cette collection, sa présence sur pomme de terre n'est pas à écarter en Algérie puisqu'elle a été décrite comme espèce dominante des tubercules dans les climats chauds (Pérombelon, 1992).

Ainsi, notre travail porte sur l'investigation d'une collection d'autres souches, par une prospection plus large sur des tubercules d'apparence saine ou présentant des symptômes de pourriture molle), pour apporter une collection de souches plus diversifiées. Notre travail expérimental est axé sur les points suivants

- Prélèvement, et isolement de micro-organismes présumés appartenant aux *Erwinia* pectinolytiques.
- Identification biochimique et ceci par une série de tests dans le but de caractériser ces souches et de distinguer entre les différentes espèces et sous-espèces d'*Erwinia* pectinolytiques.

MATERIEL ET MÉTHODE

-MATERIEL

- Matériel bactérien

--Souches provenant de la collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP/INRA Angers, France)

* *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* 100T (*Eca* 100T);

* *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* 98.1 (*Ecc* 98.1) ;

* *Erwinia chrysanthemi* 99.21 (*Ech* 99.21).

--Souches isolées localement à partir des tubercules de pomme de terre.

- Matériel végétal

Les prélèvements ont été effectués à partir de divers tubercules de pomme de terre de consommation. Les échantillons proviennent de la localité de BEJAIA/ALGERIE.

Les tubercules de pomme de terre appartiennent à la variété Spunta. Certains de ces échantillons présentent les symptômes caractéristiques de la pourriture molle due aux *Erwinia* pectinolytiques, à savoir des parties infectées de forme spongieuse et de couleur crème à brune, laissant une substance visqueuse d'odeur fétide. Tandis que d'autres ont un aspect plus ou moins intact

-METHODES

- Isolement des bactéries

Les isolements des souches d'*Erwinia* pectinolytiques ont été fait selon les méthodes de Hyman *et al* (1998), et de Lacroix et Vézina (2003).

Les ensemencements par épuisement ont été fait sur le milieu King B et après incubation à 27°C pendant 24 à 72 heures, la présence de colonies caractéristiques est notée.

- Purification et conservation des cultures bactériennes

Après isolement et dans le but de purifier les colonies prélevées, un screening est réalisé par plusieurs repiquages successifs sur milieu KingB en boîte de Pétri et en tube incliné. Les isolats sont conservés dans les milieux minimum Luria Bertani (LB) et levure Peptone Agar (LPA) en tube incliné.

- Identification biochimique des *Erwinia chrysanthemi*

*Examen cellulaire

La coloration de Gram facilite grandement l'observation microscopique des bactéries, cette coloration est réalisée sur frottis séchés et fixés et permet d'observer la forme des bactéries, également de les diviser en deux grands groupes taxonomiques différents : bactéries Gram positif et bactéries Gram négatifs.

Un examen à l'état frais est réalisé afin d'apprécier la mobilité des bactéries.

*Test de la Catalase

La mise en évidence d'une bactérie à catalase positive est réalisée en présence d'eau oxygénée, par observation d'une effervescence et d'un dégagement important d'oxygène.

*Réduction des nitrates

Une suspension bactérienne standardisée est ensemencée dans des tubes à essais contenant 5ml d'eau peptonée nitraté puis incubée à 27°C pendant 24 heures.

La révélation se fait par addition de quelques gouttes des réactifs Nit1 et Nit 2.

*Détermination de l'activité pectinolytique

Différents milieux sélectifs à base de pectine et de polypectate de sodium sont utilisés pour l'isolement et la détection des *Erwinia* pectinolytiques à partir du sol et des tissus végétaux.

Pour notre étude, nous avons opté pour le milieu Crystal Violet Pectate (CVP) : Les souches sont maintenues dans le bouillon LP sous agitation pendant 24h, des dilutions sont réalisées dans une solution tampon phosphate. 50µl de la dilution correspondant à une concentration de 10^3 cellules/ml sont déposés par étalement sur le milieu CVP en boîte de Pétri. L'incubation se fait à 27°C pendant 48h.

La croissance des souches d'*Erwinia* pectinolytiques se traduit par la formation de cavités caractéristiques et distinguables de celles formées par les *Pseudomonas* pectinolytiques (Hélias *et al.*,2005).

***Utilisation du malonate et du lactose**

Ce test permet la mise en évidence de l'utilisation du malonate, du lactose et la production d'indole à partir du tryptophane. Une suspension bactérienne est inoculée dans 2ml du milieu ALMT (Ayers lactose Malonate Tryptophane), puis incubée à 27°C pendant 48h.

***Activité lécithinase**

L'ensemencement est réalisé par dépôt d'amas de colonies bactériennes fraîches sur boîtes de Pétri, l'incubation se fait à 27°C pendant 2 à 7 jours.

Une activité lécithinase est visualisée par l'apparition d'une zone hautement turbide et dense qui entoure les colonies d'*Erwinia chrysanthemi*, le même test permet aussi de détecter la présence d'un enzyme, la lipoprotéinase (Ahmed,2001)

***Production d'indole**

Une suspension bactérienne est inoculée par piqûre centrale dans les tubes à essai contenant 5ml du milieu indole, puis les tubes sont incubés à 27°C pendant 48h.

La révélation se fait par l'ajout de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs (Lacroix et Vézina,2003).

***Tolérance au NaCl**

Une suspension bactérienne dense est inoculée dans des tubes à essais contenant une solution de bouillon nutritif additionné de NaCl à 5%. Après incubation à 27°C pendant 14 jours, une réaction positive se traduit par l'apparition d'une turbidité visible à l'œil nu (Ahmed,2001)

RESULTATS ET DISCUSSIONS

-RECHERCHE DES BACTERIES DU GENRE ERWINIA

Après screening et criblage des colonies, beaucoup d'isolats ont été éliminés par simple observation visuelle, soit par non-conformité à la couleur ou à l'aspect des colonies d'*Erwinia* sur milieu KingB ou bien à cause de croissance réduite. Selon Hélias (1999), les colonies de couleur blanche crémeuse donnant une suspension homogène.

***Identification biochimique des colonies purifiées**

Identification préliminaire

Après caractérisation morphologique et culturale, les tests préliminaires d'identification sont indispensables, ces examens comportent, l'observation de la mobilité, la coloration de Gram et le test de la catalase. (Tableau I)

Tableau I : Résultats des tests d'identification préliminaire
Test results of preliminary identification.

| Souche \ Test | Coloration de Gram | Catalase | Mobilité |
|---------------------|--------------------|----------|----------|
| <i>Ech 99.21</i> | - | + | + |
| S1/ S2 /S3 /S4 / S5 | - | + | + |

S : Souche

-Mise en évidence des *Erwinia* pectinolytiques

Trois souches de référence (*Eca* 86.20, *Ecc* 98.1 et *Ech* 99.21) sont utilisées pour la caractérisation biochimique. Ces souches type répondent de manière positive aux tests biochimiques d'indentification ;elles possèdent une activité pectinolytique, réduisent les nitrates en nitrites (Tableau II). Ces tests constituent des critères clefs de détermination des *Erwinia* pectinolytiques

Tableau II : Mise en évidence des *Erwinia* pectinolytiques/
Discovery of pectinolytic *Erwinia*

| Souche \ Test | Activité pectinolytique (CVP) | Nitrate réductase |
|---|-------------------------------|-------------------|
| <i>Eca</i> 86.20 <i>Ecc</i> 91.8 <i>Ech</i> 99.21 | + | + |
| S1/ S2 /S3 /S4 / S5 | + | + |

-Distinction entre *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*

Après détermination et mise en évidence des souches d'*Erwinia* pectinolytiques, la deuxième étape est la distinction entre les *Ec* et *Ech*. Le tableau III résume les résultats des tests de discrimination entre ces deux espèces

Les souches isolées localement (S1, S2, S3, S4 et S5) se comportent de la même façon et ont les mêmes réponses que la souche type *Ech* 99.21. Elles synthétisent de l'indole à partir du tryptophane par l'action d'une enzyme, la tryptophanase, ceci est conforme à la bibliographie (Cothier et Blakeney 1987).

Par ailleurs, ces mêmes souches produisent une lécithinase et sont incapables de croître en présence d'une grande concentration de NaCl. D'après Gouesbet *et al.*(1995) et Touzé *et al.*(2001), la croissance et les activités métaboliques des *Erwinia chrysantemi* sont complètement inhibées dans les milieux hypersalins.

Ces propriétés sont considérées par de nombreux auteurs comme étant spécifiques aux souches d'*Erwinia chrysanthemi*.

En tenant compte de l'ensemble de ces tests, les 5 souches isolées localement semblent appartenir à l'espèce *Erwinia chrysanthemi*. Ce résultat permet d'intégrer ces souches qui étaient absentes dans la collection effectuées antérieurement par Yahiaoui-Zaidi *et al.* (2003). Cependant, il reste encore prématuré de conclure sur la classification des espèces pectinolytiques d'*Erwinia* qui nécessite davantage de tests de confirmation

Tableau III : Différenciation entre les espèces *Ec* et *Ech*
Differentiation between two species *Ec* and *Ech*

| Souches \ Tests | <i>Eca</i> 86.20 | <i>Ecc</i> 91.8 | <i>Ech</i> 99.21 | S1/ S2/S3/S4/S5 |
|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| Lactose | + | + | - | - |
| Malonate | - | - | + | + |
| Indole | - | - | + | + |
| Lécithinase | - | - | + | + |
| Lipoprotéinase | - | - | + | + |
| Tolérance au NaCl% | + | + | - | - |

CONCLUSION

L'objectif de notre travail était de mettre en collection différentes souches appartenant au genre *Erwinia* pectinolytiques (*Pectobacterium*), isolées à partir des tubercules de pomme de terre en ALGERIE/BEJAIA

Les résultats obtenus, après une identification biochimique approximative, s'accordent pour confirmer la présence de cinq souches d'*Erwinia chrysanthemi*.

La pomme de terre, de par sa valeur nutritionnelle et son coût abordable, incite à l'élaboration d'un programme intégrant sa protection et sa conservation. La lutte contre les agents pathogènes passe en priorité par un ensemble de mesures prophylactiques permettant de limiter les risques d'apparition de la maladie et de ralentir sa propagation dans les parcelles et dans les chambres de conservation.

REMERCIEMENT

Il n'ya pas de travail sans succès comme il n'ya pas de succès sans travail. Merci Papa de me l'avoir si souvent répété.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed, M. E. E. (2001) : Detection and effects of latent contamination of potato tubers by soft rot bacteria, and investigation on the effect of hydrogen peroxide on lipopolysaccharides of *Erwinia carotovora* in relation to acquired resistance against biocides
Thèse de doctorat, Gottingen, Allemagne, 166p.

Castro, M.S. and Fontes, W. (2005): Plant defense and antimicrobial peptides.
Protein and Peptide Letters 12:11-16

Cothier, E.J. and Blakeney, A. B. (1987): The specific detection of indole production by *Erwinia* species and some other enterobacteria on agar.
Journal of applied Bacteriology 63: 329-334.

Gouesbet, G., Jebbar, M., Bonnassie, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Himdi-Kabbab, S., Blanco, C. (1995) : *Erwinia chrysanthemi* at high osmolarity : influence of osmoprotectants on growth and pectate lyase production.
Microbiology 141: 1407-1412.

Hélias, V. (1999): Mise au point d'outils de caractérisation et de détection d'*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* agent de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de terre. Application à l'étude de la transmission de la bactérie via la plante, du tubercule mère vers les tubercules fils en cours de culture.
Thèse de Doctorat, Renne, France, 190p

- Hélias, V., Croizat, F. and Montfort, F. (2005)**: Evaluation of a new polypectate formulation for isolation of soft rot *Pectobacterium* on CVP medium
European Association for Potato Research, Bilbao 17-22
- Hyman, L. J., Toth, I. K. and Pérombelon, M. C. M. (1998)**: Isolation and identification section 6, 66-77.in: Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp.*atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp.*atrosepticum*) on potato: a Scottish Crop Research Institute Occasional Publication N°10, 82 p.
- Lacroix, C et Vézina, L. (2003)**: Techniques de laboratoire pour le diagnostic des bactéries phytopathogènes, 50p.
- Perombelon, M. C. M. (1992)**: Diversity in Erwinias as plant pathogens Plant Pathogenic Bacteria, Versailles (France), June 9-12, 1992
- Touzé, T., Gouesbet, G., Boiangiu, C., Jebbar, M., Bonnassie, S. and Blanco, C. (2001)**: Glycine betaine loses its osmoprotective activity in a bspA strain of *Erwinia chrysanthemi*.
Molecular Microbiology 42: 87-99.
- Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B. and Andrivon, D. (2003)**: Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria
Plant Pathology (2003) 52, 28-40
- Walton, J. D. (1997)**: Biochemical Plant Pathology. Plant Biochemistry 487 p.

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF SOLANAPYRONE A
FROM CULTURE FILTRATES OF *ASCOCHYTA RABIEI***

M.-M. ZERROUG¹, Z. BOUZNAD², L. LAROUS¹, R.-N. STRANGE³

1- Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences,
Université de Sétif, Algérie, med.zerroug@gmail.com

2- Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, El-Harrach, Algérie

3- School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London,
Malet Street, WC1E 7HX, London, U.K.

SUMMARY

Ascochyta rabiei (agent of ascochyta blight) is the most serious pathogen on chickpea. Three Algerian isolates of *Ascochyta rabiei* were tested for the production of the solanapyrone toxins on Czapek Dox medium supplemented with five cations. All three isolates produced solanapyrone A in concentrations of 7.4 µg/ml – 15.0 µg/ml after incubation for 14 days after which the concentrations decreased. This was not matched by the toxicity of the culture filtrates of one isolate. This rose from 2,133 units/ml of culture filtrate to 5,074 units/ml by day 18

Key words: *Ascochyta rabiei*, solanapyrone A, toxicity

RÉSUMÉ

Ascochyta rabiei (agent de l'antracnose de pois chiche) est le champignon le plus dangereux sur cette culture. Trois isolats algériens ont été testés pour la production de les toxines solanapyrone en culture sur milieu Czapek Dox supplémenter de 5 cations. Les trois isolats produisent de la solanapyrone a à une concentration variant de 7.4 µg/ml – 15.0 µg/ml après 14 jours d'incubation, cette production diminué avec la période d'incubation. La toxicité du filtrat de la souche qui produise plus de toxine a été tester et cette toxicité augment de 2133 unités/ml à 5074 unités/ml après le 18 jours d'incubation.

Mots-clés : *Ascochyta rabiei*, solanapyrone A, toxicité

INTRODUCTION

Blight caused by *Ascochyta rabiei*, is still the most serious disease of chickpea in many parts of the world, especially in Western Asia, North Africa and the North West region of India and Pakistan (Nene, 1982; Nene and Reddy, 1987; Singh and Reddy, 1993). In cool and wet conditions losses may be total (Hawtin and Singh, 1984; SINGH and REDDY, 1990). The fungus attacks all aerial parts of the plant causing epinasty (drooping) of petioles and young branches, followed by water soaking and necrosis. Subsequently, stems and petioles are girdled by the infection and often break (Alam *et al*, 1989; Haware *et al*, 1986; Hamid and Strange, 2000). These symptoms are consistent with toxin production by the pathogen causing dysfunction of the host's membranes and leading to loss of cell turgor (analogous to a puncture in a tyre). Cell turgor is a necessary component of the support of stems and petioles, its loss giving rise to stem and petiole breakage which are typical symptoms of *Ascochyta* blight (Hamid and Strange, 2000). The toxins solanapyrones A, B and C were originally isolated from culture filtrates of the pathogen by Alam *et al* (1989) and Chen *et al* (1991).

MATERIAL AND METHODS

GROWTH OF THE FUNGUS ISOLATES

Three algerian isolates of *A. rabiei* (M11.92, M1-2 and 72) were grown on Czapek Dox medium supplemented with cations (HAMID and STRANGE, 2000). The medium was dispensed in flasks (30 ml/250 ml flask) and inoculated with pycnidiospore suspension (30 µl ; 10⁷ spores/ml; Alam *et al*, 1987). Flasks were incubated at 20°C for 14, 16 and 18 days.

PARTIAL PURIFICATION OF TOXINS BY SOLID PHASE EXTRACTION

Mycelium of the fungus was removed by filtration through four layers of muslin cloth and spores were removed from the filtrate by centrifugation at c. 10,000 g for 20 min. Supernatants were passed through end-capped Isolute cartridges (1 g: C 18: International Sorbent Technology, Duffryn Industrial Estate, Ystrad Mynach, Hengoed, Glamorgan, UK) which had been conditioned with 5 ml methanol, followed by 5 ml distilled water. After passing the sample remaining non-adsorbed material was washed free of the cartridge with distilled water (5 ml). Toxins were eluted in 2 ml acetonitrile (HPLC grade; Hamid and Strange, 2000).

PARTIAL PURIFICATION OF TOXINS BY LIQUID PHASE EXTRACTION

The pH of culture filtrates was adjusted to 3.00 with 1 M H₂SO₄ before portioning three times against 1/3 rd volumes of ethyl acetate. The ethyl acetate phases were combined, dried over anhydrous sodium sulphate and taken to dryness on a rotary evaporator at < 35°C. The residue containing the toxins was dissolved in 2 ml methanol (Hamid and Strange, 2000).

SEPARATION OF THE SOLANAPYRONE TOXINS BY FLASH CHROMATOGRAPHY

The methanol samples from 11 flasks of culture filtrate (22 ml) were evaporated to dryness and the residue was dissolved in dichloromethane (2 ml). The dichloromethane solution was injected onto a dry cartridge of silica gel with particle size 32-63 µm, pore size 60 Å and surface area 573m²/gm(40 g : Biotage UK Ltd., 15 Harforde Court, Foxholes Business Park, John Tate Road, Hertford, UK). The cartridge was washed with cyclohexane (110 ml) and toxins were eluted with dichloromethane, cyclohexane, ethyl acetate (3:3:1; 625 ml), dichloromethane, cyclohexane, ethyl acetate (1:1:1; 400 ml) and finally ethyl acetate (150 ml) under pressure from an air line. The eluates were collected as 25 ml fractions in universal glass bottles. The spectrum of each fraction (200 nm to 400 nm) was observed on a spectrophotometer (Hamid and Strange, 1997).

ANALYTICAL HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Toxin samples dissolved in acetonitrile were separated on a Philips HPLC equipped with a diode array detector essentially according to Hamid and Strange (2000) except that the solvent system consisted of water 60%, methanol 20.1%, tetrahydrofuran 18.1% and acetonitrile 1.8% (v/v/v/v) which was pumped at a flow rate of 1 ml/min. The stationary phase was an ODS column (Spherisob ODS 2 ; 150 x 4.5 mm diam.; Jones Chromatography, Glamorgan, UK) which was protected by a guard column (20 x 4.6 mm diam.).

The solanapyrone toxins were recognised by their UV spectra which were compared by superimposition on those of authentic samples.

TOXICITY OF SOLANAPYRONE A

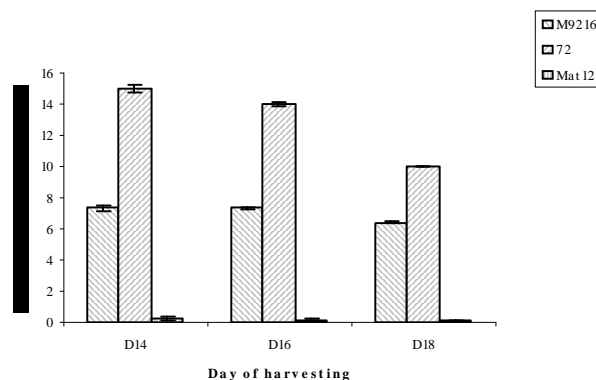
The toxicity of solanapyrone A was determined quantitatively with suspensions of chickpea cells (density 0.2 A units at 620 nm \approx 2.25×10^5 cells ml⁻¹) isolated from leaflets of newly-opened leaves of chickpea plants (33-35 days old) and expressed as units of activity essentially as previously described by Latif *et al* (1993). After dispensing a two fold dilution series of toxin preparation in holding buffer among wells of a microtest plate (50 μ l well⁻¹), a suspension of cells, freshly isolated from chickpea leaflets by enzymic digestion, was added to each well (50 μ l well⁻¹) and the microtest plate incubated for 3 h at 25°C. Fluorescein diacetate solution (FDA) was added to each well (50 μ l well⁻¹) for and incubated for 5 min. before scoring. FDA was prepared as a stock solution (5 mg/ml) in acetone, stored at -20°C and diluted (1:49) in holding buffer immediately before use. After incubation fluorescent (live) and non fluorescent (dead) cells scored under an inverted fluorescence microscope. Probit percent cell death, corrected for variability in control wells without toxin, was plotted against the log₂ toxin concentration to give a straight line from which LD₅₀ values, arbitrarily defined as 1 unit of activity, were extracted (Strange *et al.*, 1982).

RESULTS

PRODUCTION OF SOLANAPYRONE A

The three isolates grew well on Czapeck Dox medium supplemented with cations. Only solanapyrone A and sometimes a trace of solanapyrone C was produced. The highest toxin concentrations were found in 14 days old cultures, the earliest sampling date, and declined thereafter (Fig. 1).

Figure 1: Production of solanapyrone A by three Algerian isolates of *A. rabiei*.
Production de la solanapyrone A par trois isolats algériens d' *A. rabiei*.



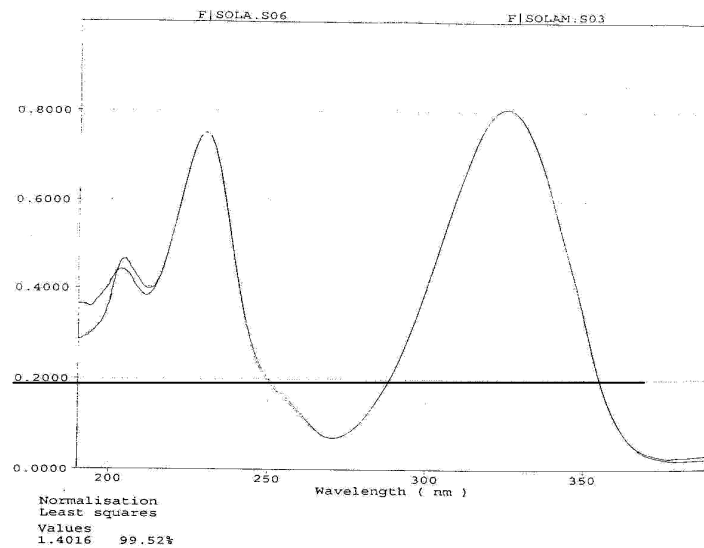
SEPARATION AND PURIFICATION OF SOLANAPYRONES A BY FLASH CHROMATOGRAPHY

Solanapyrone A was obtained in fractions 17 to 22 in amounts equivalent to 16.8 μ g/ml on the basis of an extinction coefficient of 9,400 at 327 nm.

CONFIRMATION OF THE PURITY OF SOLANAPYRONE A

The sample of solanapyrone A prepared by flash chromatography gave a single peak on HPLC which eluted at 13.37 min. and had a spectrum that was a 99.52% match with that of an authentic sample of the toxin (Fig 2).

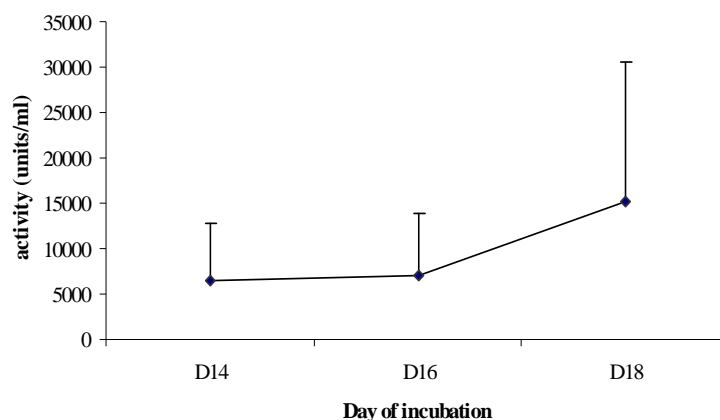
Figure 2: Spectrum of solanapyrone A (SOLAM) superimposed with an authentic sample (SOLA)
Spectre de la solanapyrone A (SOLAM) superposé avec une toxine standard (SOLA)



TOXICITY OF CULTURE FILTRATES

In this study only the eluates from solid phase extraction of culture filtrates of isolate 72 were used. In contrast to the concentration of solanapyrone A, the toxicity of the partially purified filtrates increased with the time of incubation from 2,133 units/ml at day 14 to 5,074 units/ml by day 18 (Fig 3).

Figure 3: Toxicity of culture filtrates for cells of chickpea
Toxicité du filtrat fongique sur les cellules de pois-chiche.



DISCUSSION

Ascochyta blight, caused by *A. rabiei*, is the most destructive disease of chickpea. The fungus has been reported to produce three toxins, solanapyrones A, B and C when it is cultivated on a defined medium (Chen and Strange, 1991). There is circumstantial evidence that these toxins play an important role in the pathogenicity or virulence of *A. rabiei* (Hamid and Strange, 2000). In this study the three isolates produced only solanapyrone A and occasionally a trace of solanapyrone C in contrast to the results of Alam *et al*, (1989) and Latif *et al*, (1993) who reported the production of solanapyrones A, B and C. This difference may be attributable to the isolates used. Solanapyrone A is more toxic than the other two toxins (Kaur, 1995; Strange and Alam, 1992; Hamid and Strange, 2000). Further studies should be made of the relationship solanapyrone production and virulence or pathogenicity of these three isolates, particularly as the preliminary evidence given above suggests that other components of the culture filtrate might be toxic. It will also be interesting to determine the range of sensitivity of local chickpea genotypes to these compounds.

REFERENCES

- Alam S.S., Strange R.N., Qureshi, S.H., 1987 - Isolation of *Ascochyta rabiei* and a convenient method for copious inoculum production. *The Mycologist*, 21, 20.
- Alam S.S., Bilton J.N., Slawin A.M.Z., Williams D.J., Sheppard, R.N., Strange, R.N., 1989 - Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry*, 28, 2627-2630.
- Chen Y., STRANGE, R.N., 1991 - Synthesis of the solanapyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* in response to metal cations and development of a defined medium for toxin production. *Plant Pathology*, 40, 401-407.
- Chen Y., Peh E.K., Strange, R.N., 1991 - Application of solvent optimisation to the separation of the phytotoxins, solanapyrones A, B and C from culture filtrates of *Ascochyta rabiei*. *Bioseparation*, 2, 107-113.
- Hamid, K., Strange R.N., 1997 - An easy method for isolating solanapyrone toxins from culture filtrates of *Ascochyta rabiei*. *ICPN*, 4, 20-22.
- Hamid, K., Strange R.N., 2000 - Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 235-244.

Haware P.M., Nene Y.L., Mathur, S.B., 1986 - Copenhagen, Denmark, N°1, pp. 8-15.

Hawtin, G.C., Singh, K.B., 1984 - Prospects and potential of winter sowing of chickpea in the Mediterranean region. pp. 7-16 *In: Ascochyta blight and winter sowing of chickpea* (M.C. Saxena and K.B. Singh Eds.) Nijhoff and Junk Publishers, The Hague. The Netherlands

Kaur, S., 1995 - Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Science*, 109, 23-29.

Latif Z., Strange R.N., Bilton J., Riazuddin S., 1993 - Production of the phytotoxins, solanapyrones A, and C and cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology*, 42, 172-180.

Nene Y.L., 1982 - A review of *Ascochyta* blight of chickpea. *Tropical Pest Management*, 28,: 61-70.

Nene Y.L., Reddy M.V., 1987 -Chickpea diseases and their control. pp.: 233-270. *In: The chickpea.* (M.C. Saxena and K.B. Singh Eds.) CAB International, Wallingford, U.K.

Singh K.B., Reddy M.V., 1990 - Patterns of resistance and susceptibility accessions and breeding lines of chickpeas. *Plant Dis.*, 74, 127-129.

Singh, K.B., Reddy M.V., 1993 - Susceptibility of the chickpea plant to *Ascochyta* blight at different stages of crop growth. *Phytopathologia Mediterranea*, 32, 153-155.

Strange R.N., Pippard D.J., Strobel G.A., 1982 - A protoplast assay for phytotoxic metabolites produced by *Phytophthora drechsleri* in culture. *Physiological Plant Pathology*, 20, 359-364.

Strange R.N., Alam S.S., 1992 - Toxins of *Ascochyta rabiei* and their putative role in screening chickpea for blight resistance. Proceedings of an International Consultancy Meeting on *Ascochyta* blight of Chickpea, 6-8 March 1989, pp 170-180. (Eds. K. B. Singh and M.C. Saxena). International Centre for Agriculture Research in the dry Area, Aleppo, Syria.

**INFECTIONS LATENTES D'*ERWINIA AMYLOVORA* : MISE EN ŒUVRE D'UN
PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE MÉTHODES D'EXTRACTIONS D'ADN**

C. DOUSSET⁽¹⁾ ; F. POLIAKOFF⁽¹⁾ ; A. DROUIN⁽¹⁾ ; H. SOUBELET⁽¹⁾ .

⁽¹⁾ Laboratoire national de la protection des végétaux - LNPV – 7 rue Jean Dixméras
49044 ANGERS Cedex 01. France. lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

RÉSUMÉ

Erwinia amylovora, agent causal du feu bactérien est une bactérie de quarantaine en Europe. Son contrôle exige l'éradication des réservoirs d'inoculum. De plus, la détermination de l'infection asymptomatique nouvellement prescrite par les règlements de l'UE pour assurer la qualité sanitaire des plants commercialisés, nécessite de disposer de protocoles appropriés de détection car dans le cas d'infections latentes de tissus ligneux la détection sur milieu ou par sérologie est difficile. Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet européen ERANET European Phytosanitary REsearch Coordination (EUPHRESKO- ERWINDECT) relatif à la recherche phytosanitaire pour cette bactérie qui vise à améliorer et développer de nouvelles méthodes de détection en biologie moléculaire incluant celles récemment revues par l'OEPP (2004), à les comparer et à les valider par des tests inter-laboratoires.

Un protocole d'évaluation des méthodes d'extraction de la bactérie et de son ADN préalables à l'analyse directe par biologie moléculaire (PCR) ou après enrichissement dans un milieu nutritif a été élaboré. La méthode d'évaluation et d'analyse statistique des résultats permettant de déterminer les critères de performance est présentée.

Mots-clés : *Erwinia amylovora*, extraction ADN, détection, PCR, évaluation.

SUMMARY

Erwinia amylovora, causal agent of fire blight, is a quarantine bacterium in Europe. Its control requires to eradicate of inoculum reservoirs. Moreover, determination of asymptomatic infection is newly mandated by EU regulations to ensure phytosanitary quality of traded plants. Appropriate detection protocols must be available because detection of latent bacteria in woody tissues by isolation on media or serological methods is difficult. This study is part of the european project ERANET European Phytosanitary REsearch Coordination (EUPHRESKO- ERWINDECT) dealing with phytosanitary research for this bacterium which aims to improve and develop new molecular methods of detection including the ones recently revised by EPPO (2004), to compare them and to validate them by ring testing.

An assessment protocol for bacteria and DNA extraction methods directly followed by PCR or associated with enrichment in nutrient medium was performed. The assessment method and statistical analysis of results allowing the determination of performance criteria is exposed.

Key words: *Erwinia amylovora*, DNA extraction, detection, PCR, assessment.

INTRODUCTION

Erwinia amylovora, agent pathogène du feu bactérien, est un organisme de quarantaine présent dans 43 pays (Van der Zwet, 2002) à l'exception du Portugal, de certaines zones de l'Espagne, de l'Amérique du Sud et de la plupart des pays d'Afrique et d'Asie. Il représente une menace pour les activités de production et les échanges commerciaux de pommes et poires. Le feu bactérien est probablement la maladie la plus grave affectant ces cultures fruitières dans de nombreux pays. Les symptômes de la maladie sont caractéristiques. Ils sont généralement suffisamment définis et spécifiques pour permettre d'identifier correctement la maladie et de la confirmer par une analyse de laboratoire faisant appel à la méthode traditionnelle de l'isolement.

Toutefois, il est connu que la bactérie *Erwinia amylovora* peut survivre sous forme épiphyte ou endophyte pendant des périodes dont la durée dépend des conditions environnementales (Thomson, 2000), sur tissus sans symptôme, particulièrement les stigmates des poires et pommes (Thomson, 1986 ; van der Zwet *et al.*, 1988), sur feuilles apparemment saines et sur fruits (Hale *et al.*, 1987 ; Sholberg *et al.*, 1988 ; van der Zwet *et al.*, 1990). Le pathogène est quiescent tout au long de la période de dormance de l'hôte (van der Zwet et Beer, 1995). Ces données ont amené l'union européenne à mettre en application la Directive (visant au renforcement des contrôles de pépinières et à l'obligation de confirmer l'absence d'*Erwinia amylovora* par analyse sur plants commercialisés et particulièrement pour ceux à destination de zones protégées. Dans le cas d'infection latente (absence de symptômes), la présence en faible quantité de cellules bactériennes dans le végétal rend difficile sa détection par méthode d'isolement ou d'autres méthodes (sérologie, biologie moléculaire).

Dans la plupart des études portant sur la survie d'*Erwinia amylovora* dans le calice de pommes mures, la viabilité du pathogène était évaluée uniquement sur la base de la méthode d'isolement. En l'absence de colonie visible, il était conclu à sa non survie. Cependant il a été montré *in vitro* qu'*Erwinia amylovora* a la capacité d'adopter une forme viable mais non cultivable (VBNC) (Wilson *et al.*, 2000) en conditions de stress (limitation de nutriments, température, traitements au cuivre) (Biosca *et al.* 2006 ; Ordax *et al.* 2006 ; Biosca *et al.*, 2008). Dans cet état, considéré comme une stratégie de survie, les cellules perdent leur capacité à se développer sur milieu mais restent viables (Roszak and Colwell 1987).

Ainsi, dans le cadre du projet européen EUPHRESKO (European Phytosanitary REsearch Coordination) –ERWINDECT (*Erwinia amylovora* detection) visant à soutenir durablement la coordination de la recherche dans le secteur de la quarantaine phytosanitaire à l'échelon transnational, les partenaires ont mis en commun leurs moyens afin de développer des méthodes de détection innovantes et d'améliorer celles publiées par l'OEPP (2004).

La sélection d'une méthode pour publication et application dans le cadre des analyses officielles doit s'appuyer sur une évaluation permettant de définir ses critères de performance. Désormais une réelle validation scientifique des méthodes harmonisées est mise en place, basée sur des données expérimentales et une analyse statistique.

Alors que les autres partenaires du projet EUPHRESKO avaient en charge l'évaluation de la PCR conventionnelle et de la PCR en temps réel pour la détection d'*Erwinia amylovora*, le LNPV s'est concentré sur l'étape clé pour la fiabilité des résultats d'analyse en biologie moléculaire : l'extraction d'ADN.

Il existe de nombreuses techniques décrites dans diverses publications scientifiques et notamment des kits commerciaux, pour l'extraction et la purification de l'ADN cible. Elles contribuent pour les échantillons complexes à l'élimination des inhibiteurs de la PCR, d'autres réactions enzymatiques et à la concentration de l'ADN cible dans l'extrait d'échantillon. Certaines substances présentes dans les plantes (tanins, polysaccharides, phénols..) sont inhibitrices de la PCR, bloquant l'hybridation des amorces sur le brin d'ADN cible ou limitant l'efficacité de synthèse de la polymérase pour la réplication de celui-ci.

MATERIEL ET MÉTHODE

Principe : A partir de matrices végétales issues de différentes plantes hôtes saines artificiellement contaminés par une souche de référence d' *Erwinia amylovora*, 6 protocoles d'extraction d'ADN avec et sans enrichissement préalable ont été testés.

Onze plantes hôtes différentes ont été utilisées : *Crataegus spp.*, *Cydonia oblonga*, *Cydonia oblonga* vieux, *Cotonéaster spp.*, *pyrus commun*, *Mespilus germanica*, *Pyrus spp.*1et 2, *Malus spp.* cidre, *Malus spp.* vieux , *Pyracantha spp.*, *Cydonia oblonga* sain (AGES).

Les broyats d'échantillons de ces différentes plantes hôtes ont ensuite été contaminés artificiellement à l'aide d'une suspension bactérienne contenant la souche de référence *Erwinia amylovora* CFBP 14.30, pour obtenir les niveaux de contamination suivants : N0-échantillon sain, N1=10² ufc/ml, N2=10³ ufc/ml, N3=10⁴ ufc/ml, N4=10⁵ ufc/ml, N5=10⁶ ufc/ml.

PREPARATION DES ECHANTILLONS CONTAMINES ARTIFICIELLEMENT

Pour chacune des matrices végétales, 0,5 g de matériel végétal a été placé dans un sac stérile de broyage pour chaque niveau de contamination.

Méthode sans enrichissement :

Le matériel végétal a été écrasé à l'aide d'un marteau après avoir ajouté 4,5 ml de tampon stérile PBS 10mM pH7,2 (NaCl : 8g , Na₂HPO₄,12H₂O : 2,7g , NaH₂PO₄,2H₂O : 0,4g , eau déminéralisée 1L). 500 µl de suspension bactérienne de concentration connue ont ensuite été additionnés pour obtenir le niveau de contamination attendu après homogénéisation (par exemple, à partir d'une suspension contenant 10³ ufc/ml, on obtient un macérat contaminé à 10² ufc/ml).

Méthode avec enrichissement :

Le matériel végétal a été écrasé à l'aide d'un marteau après avoir ajouté 4,5 ml de tampon antioxydant de macération stérilisé par filtration (Gorris et al., 1996) (polyvinylpyrrolidone PVP-10 : 20g , mannitol : 10g , acide ascorbique : 1,76g , glutathion réduit : 3g , PBS 10 mM pH 7,2 , eau déminéralisée 1L). La contamination a été réalisée comme décrite au paragraphe précédent.

2,5 ml d'extrait contaminé ont été transférés dans un tube à hémolyse stérile et additionnés de 2,5 ml de milieu d'enrichissement King B liquide stérilisé (King et al., 1954) (protéose peptone N°3 : 20g , glycérol : 10 ml , K₂HPO₄ 1,5g , MgSO₄,7H₂O : 1,5g, eau déminéralisée 1L, pH 7,2). Les tubes ont été placés en incubation à 25°C durant 72 heures sous agitation à 150 tr/min.

Les volumes de macérats utilisés pour l'extraction d'ADN sont définis par les différents protocoles d'extraction testés.

EXTRACTION DE L'ADN

Pour chaque échantillon préparé, il est réalisé deux extractions d'ADN soit Ext1 et Ext2, en suivant les protocoles décrits ci-dessous. Parmi les six protocoles d'extraction sélectionnés pour l'étude, figure le protocole de référence OEPP basé sur la méthode d'extraction d'ADN à l'isopropanol proposée par Llop *et al.* (1999).

Protocole OEPP(2004) à l'isopropanol selon Llop *et al.*,1999. (P1).

500 µl d'extrait végétal sont centrifugés à 13000 rpm durant 5 min à température ambiante. Après élimination du surnageant sans abîmer le culot obtenu, ce dernier est additionné de 250 µl de tampon d'extraction stérilisé par filtration (Tris HCL pH 7,5 24,2g, NaCl 14,6 g, EDTA 9,3 g, SDS 5 g, PVP 10 20 g, Eau 1 litre), vortexé et agité doucement pendant 1 heure à température ambiante (145 tours/min). Il est centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min à température ambiante puis 200 µl de surnageant sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf. 200 µl d'isopropanol sont ajoutés puis l'ensemble est mélangé doucement en retournant plusieurs fois et laissé 30 min à 1 heure à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 13000 rpm durant 5 min à température ambiante puis le surnageant est éliminé. Les tubes sont retournés et laissés à sécher pendant 1h (tube ouvert) à température ambiante. Au final, l'ADN purifié est re-suspendu avec 100 µl d'eau ultra pure. L'ADN ainsi extrait peut être conservé au congélateur jusqu'à la réalisation de la PCR.

Protocole Easy-DNA-Extraction Kit (Pastrik *et al.*,2000) (P2).

Dans un tube eppendorf de 2 ml, sont mélangés 100 µl d'extrait végétal et 220 µl de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8 1,21 g, NaCl 5,85g, EDTA pH 8 0,37 g, eau 1 litre) puis placés à 95°C durant 10 min, et refroidis à -18°C au moins 5 min. 80 µl de solution stock de lysosyme (50 mg/ml dans 10 mM Tris-HCl pH 8) sont additionnés et le mélange est homogénéisé et placé en incubation à 37°C durant 30 min.

L'ADN est ensuite purifié à l'aide du kit Easy -DNA- Extraction. 220 µl de solution A (kit) sont additionnés à la préparation, le tout est homogénéisé et placé en incubation à 65 °C pendant 30 min. Par la suite sont ajoutés 100 µl de solution B (kit) puis 500 µl de chloroforme suivi d'une homogénéisation. Après centrifugation à 20000 g pendant 20 min à 4 °C, la phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube. L'ADN est précipité avec de l'éthanol 96 % glacé (vol/vol) soit 1 ml. Il est mis au congélateur (-18°C) pendant 10 min après une brève homogénéisation au vortex. Une centrifugation à 20000 g pendant 20 min à 4°C permet d'éliminer l'éthanol. L'ADN est nettoyé avec de l'éthanol 80 % glacé (vol/vol) soit 500 µl, en mélangeant par de délicats retournements puis en centrifugeant à 20000 g pendant 20 min à 4°C. Au final, le surnageant est éliminé et le tube est laissé à sécher à l'air libre pendant au moins 15 minutes. L'ADN purifié est remis en suspension dans 100 µl d'eau ultra pure. Après stabilisation 20 minutes à température ambiante, il est conservé congelé (-18°C) jusqu'à l'analyse.

Protocole REExtract-N-Amp™ Plant PCR kit (Stöger *et al.*, 2006) (P3).

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml sont mélangés 100µL d'extrait végétal et 250 µl de solution d'extraction (kit) auquel sont additionnés 0,1 % (v/v) de Triton X-100 et 0,05 % (v/v) de Nonidet NP-40 Igepal. Le mélange est homogénéisé et incubé à 95°C pendant 30 min. Mettre dans un nouveau tube Eppendorf 5 µl d'extrait obtenu contenant l'ADN purifié et ajouter 50 µl de solution de dilution (kit). L'ADN ainsi extrait peut être conservé au congélateur -18°C jusqu'à la réalisation de la PCR.

Protocole OEPP, kit ultra clean TM15-MO BIO (Manceau *et al.*, 2005) (P4).

Dans un tube Eppendorf de 2 ml, déposer 100 µl d'extrait végétal, laisser macérer 30 min à température ambiante ou une nuit à 4°C et centrifuger à 13000g pendant 10 min à 4°C. Jeter le surnageant. Mettre le culot en suspension dans 120 µl de tampon de lyse (tampon Edwards : Tris -HCl : 24,2 g, NaCl : 14,6 g, EDTA : 9,3 g, SDS : 5 g, PVP 360 : 20 g,

eau 1 litre) homogénéiser et incuber 10 min à température ambiante. Ensuite, centrifuger 10 min à 13000 g à 4°C. Prélever 100 µl de surnageant, y ajouter 300 µl de solution dénaturante d'iodure de Na (**SALT du kit** : Na₂SO₃ : 0,15 M, NaI : 7,5 M) et 5 µl de suspension de silice (**BIND du kit** : 0,15 g/ml dans l'eau). Agiter doucement par inversion des tubes pendant 5 min à température ambiante. Centrifuger 2 min à 13000g à 4°C et éliminer ensuite le surnageant en renversant le tube. Laver l'ADN présent dans le culot avec 1 ml de solution de lavage (**WASH du kit** : Tris HCl PH 7,4 : 20mM, EDTA : 1mM, Ethanol 50%). Centrifuger pendant 2 min à 4°C à 13000g, puis éliminer le surnageant par renversement du tube. Laisser sécher à l'air minimum 15 min et mettre en suspension le culot en ajoutant 50 µl d'eau ultra pure, sans agiter mais en pipetant délicatement. Cette suspension est centrifugée à 13000 g pendant 2 min à 4°C et transférer 40 µl de surnageant dans un tube stérile. L'ADN ainsi extrait peut être conservé au congélateur jusqu'à la réalisation de la PCR.

Protocole (Taylor et al., 2001) (P5).

200µL d'extrait végétal et 500 µl de tampon d'extraction (NaCl : 8,19 g, KCl : 3,73 g, Tween20: 0,5 g, PVP10: 20 g, BSA : 4 g, eau 1 L) sont déposés dans un tube. L'ensemble est agité puis laissé 15 min à température ambiante. L'ADN extrait peut alors être conservé au congélateur (- 18°C) jusqu'à réalisation de la PCR.

Protocole Kit Microsynth (basé sur protocole OEPP, 2004) (P6).

Dans un tube Eppendorf, additionner 200µL d'extrait végétal avec 500µL de tampon d'extraction (Kit utilisé). Extraire l'ADN en déposant le tube dans un bloc chauffant pendant 20 min à 95 °C. Après 10 min, agiter le tube rapidement puis chauffer de nouveau 10 min, et finir en agitant (si le tampon devient visqueux ajouter un peu de tampon pour diluer). Agiter à la fin des 20 minutes. La solution obtenue peut être translucide, jaune ou brune. Centrifuger 2 min de 10000 à 17000 rpm à 4°C (soit 20000g = 13375 rpm) et transférer 500µL de surnageant dans un nouveau tube. L'ADN ainsi extrait peut être conservé au congélateur jusqu'à réalisation de la PCR. Avant d'effectuer l'analyse PCR, faire des dilutions au 1/10, 1/100, 1/1000 de l'extrait obtenu avec de l'eau ultra pure.

ANALYSE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE : Nested PCR

Après extraction de l'ADN, les échantillons sont soumis à une analyse par nested-PCR (PCR nichée) dans un seul tube (Llop *et al.*, 2000) décrite dans le protocole OEPP (2004) qui utilise deux jeux d'amorces par réaction. En raison des différentes températures d'appariement, les deux réactions de PCR sont réalisées consécutivement. Les amorces externes sont celles désignées par McManus and Jones (1995), les internes sont celles décrites par Llop *et al.* (2000). Les séquences sont les suivantes :

| | |
|------------------|---|
| Amorces externes | Aj75 : 5' CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT |
| | Aj76 : 5' ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA |
| Amorces internes | PEANT1 : 5' TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC |
| | PEANT2 : 5' GCA ACC TTG TGC CCT TTA |

Pour la nested-PCR, le mix et les conditions de réaction sont : eau 36,76µl ; tampon 10x 5µl ; MgCl₂ 50 mM 3µl ; dNTPs 10 mM 1 µl ; Aj75 0,1pmol/µl 0,32 µl ; Aj76 0,1pmol/µl 0,32 µl ; PEANT1 10 pmol/µl 1 µl ; PEANT2 10 pmol/µl 1 µl ; ADN polymérase 5 U/µl 0,6 µl. Le volume d'échantillon est composé d'1 µl d'extrait d'ADN dans 49 µl de PCR mix. Les conditions de réaction sont : une étape de dénaturation à 94°C pendant 4 min suivie de 25 cycles à 94°C de 30 s et à 72°C de 1 min. Ce premier tour de PCR est suivi dans le même thermocycleur par une seconde étape de dénaturation à 94°C pendant 4 min et de 40 cycles à 94°C de 30 s, à 56°C de 30 s, et à 72°C de 45 s. Une étape finale à 72°C pendant 10 min termine la réaction. La taille de l'amplicon est de 391 bp, bien que des variations existent.

Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sur table à UV après électrophorèse. En présence d'*Erwinia amylovora*, les amplicons spécifiques de 391 bp de la nested PCR de

Llop *et al* (2000) sont observés. Pour cela, un gel à 1,5% d'agarose est préparé dans le tampon TAE 0,5X. 3 µl de goutte de bleu de charge sont mélangées à 20 µl de produit de PCR puis déposés dans les puits du gel ainsi que des témoins positifs et négatif et un marqueur de taille. Après migration pendant 20 min à 120 V (plateau moyen : 15x10 cm) ou 40 min à 160 V (pour un gros plateau de gel ou une cuve à électrophorèse : 15x25 cm), plonger le gel dans une solution de bromure d'éthidium pendant 20 minutes.

RESULTATS

L'évaluation intra-laboratoire des différentes méthodes d'extraction, première étape de la validation, est établie par comparaison des résultats obtenus avec les résultats de référence,

| N° | Echantillons | N0 contamination zero | | N1 contamination 10 ² ufc/mL | | N2 contamination 10 ³ ufc/mL | | N3 contamination 10 ⁴ ufc/mL | | N4 contamination 10 ⁵ ufc/mL | | N5 contamination 10 ⁶ ufc/mL | |
|----|---------------------|-----------------------------|--------------|---|--------------|---|--------------|---|--------------|---|--------------|---|--------------|
| | | ADN ext 1 | ADN ext 2 | ADN ext 1 | ADN ext 2 | ADN ext 1 | ADN ext 2 | ADN ext 1 | ADN ext 2 | ADN ext 1 | ADN ext 2 | ADN ext 1 | ADN ext 2 |
| 1 | Aubepine- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 2 | Cognassier | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| 3 | Cognassier vieux | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | Cotoneaster | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| 5 | Poirier | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | - |
| 6 | Neflier | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| 7 | Poirier 1+2 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 8 | Pommier à cidre | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 | Pommier vieux | - | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 10 | Pyracantha | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 11 | Coing sain | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |

résultats attendus liés aux niveaux de contamination. Un exemple de traitement de résultat est présenté ci-dessous. Les résultats attendus pour les différents niveaux de contamination sont positifs à l'exception du niveau N0 pour lesquels ils sont négatifs.

Tableau I : Résultats de détection d'*Erwinia amylovora* selon le protocole d'extraction P2

Table I : Results of *Erwinia amylovora* detection following extraction protocol P2

L'analyse statistique des résultats obtenus avec les différents protocoles d'extraction permet de déterminer, selon les normes EN ISO 16140 et XP V03-111, les critères de performance suivants : le seuil de détection, la répétabilité, la justesse, l'exactitude relative, la spécificité et la sensibilité relatives des méthodes mises en œuvre.

S'agissant des résultats présentés ci-après, la table statistique et les sigles utilisés sont présentés dans le tableau VI.

Le seuil de détection est le niveau de contamination le plus bas pouvant être détecté par la méthode. Au risque $\alpha = 1\%$ (risque d'écarter une méthode satisfaisante), le seuil de détection est le niveau de contamination à partir duquel sont obtenus au plus 2 déviations entre doubles et au plus 2 accords négatifs entre doubles pour les échantillons positifs (pour $q = 95\%$) selon les indications statistiques du **tableau VI**.

Tableau II : Accords et déviations entre répétitions obtenus avec le protocole P2 pour les différents niveaux de contamination.

Table II : Accordances and deviations between doubles obtained with protocol P2 for different levels of contamination.

| | N0 | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 |
|---|----|----|----|----|----|----|
| Nombre d'accords entre doubles (+ +) (- -) | 11 | 10 | 9 | 9 | 10 | 10 |
| Nombre d'accords positifs entre doubles (+ +) | 0 | 0 | 3 | 4 | 8 | 8 |
| Nombre d'accord négatifs entre doubles (- -) | 11 | 10 | 6 | 5 | 2 | 2 |
| Nombre de déviations entre doubles (+ -) | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Total | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |

Pour le protocole P2, le seuil de détection correspond au niveau de contamination N4 soit environ 10^5 ufc/mL si $q=95\%$.

La répétabilité intra-laboratoire quantifie l'homogénéité des résultats d'essai obtenus dans des conditions similaires. Elle correspond à la proportion d'accord entre répétitions d'analyse de chaque échantillon.

Tableau III : Accords et déviations entre répétitions pour le protocole P2 et les différents niveaux de contamination.

Table III : Accordances and deviations between doubles for protocol P2 and different levels of contamination.

| | N0 | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 |
|--|-----|-----|-------|-------|-----|-----|
| Nombre d'accords entre doubles (+ +) (- -) | 11 | 10 | 9 | 9 | 10 | 10 |
| Nombre de déviations entre doubles (+ -) | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Total | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| $q=99\%$ $A=1$ | ok | ok | rejet | rejet | ok | ok |
| $q=95\%$ $A=2$ | ok | ok | ok | ok | ok | ok |
| $q=90\%$ $A=3$ | ok | ok | ok | ok | ok | ok |
| Répétabilité | 99% | 99% | 95% | 95% | 99% | 99% |

La justesse est définie par niveau de contamination en comparant les résultats de la méthode avec les résultats attendus pour $\alpha=1\%$.

Tableau IV : Evaluation de la justesse du protocole P2

Table IV : Assessment of accuracy for protocol P2

| | N0 | N1 | N2 | N3 | N4 | N5 |
|--|-------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| Nombre d'accords avec les résultats attendus | 22 | 1 | 8 | 10 | 17 | 17 |
| Nombre de déviations avec les résultats attendus | 0 | 21 | 14 | 12 | 5 | 5 |
| Total | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| $q=99\%$ $A=1$ | ok | rejet | rejet | rejet | rejet | rejet |
| $q=95\%$ $A=3$ | ok | rejet | rejet | rejet | rejet | rejet |
| $q=90\%$ $A=5$ | ok | rejet | rejet | rejet | ok | ok |
| Conclusion | Juste si $q=99\%$ | Non juste | Non juste | Non juste | Juste si $q=90\%$ | Juste si $q=90\%$ |

L'exactitude relative (AC) est le niveau de correspondance entre la réponse attendue et la réponse obtenue avec la méthode testée sur des échantillons identiques. Elle est obtenue par la formule : $AC = 100(PA+NA)/(NA+PA+PD+ND)$ (PA, accord positif, NA, accord négatif, PD, déviation positive, ND, déviation négative).

La sensibilité relative (SE) (selon la définition de la norme ISO 16140) correspond à la capacité de la méthode à détecter l'analyte lorsqu'il est considéré présent. Il est obtenu par la formule : $SE = 100 PA/(ND + PA)$.

La spécificité relative (SP) (ISO 16140) : correspond à la capacité de la méthode à ne pas détecter l'analyte lorsque l'échantillon est considéré non contaminé (échantillon sain). Il est obtenu par la formule : $SP = 100 NA/(NA+PD)$.

Tableau V : Critères de performances pour le protocole P2.

Table V : Performance criteria for protocol P2.

| | Exactitude relative (AC) | Spécificité relative (SP) | Sensibilité relative (SE) |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Protocole P2 | 56,8% | 100,0% | 48,2% |

Tableau VI : Statistiques

Table VI : Statistics

| n | | 10 | | | 20 | | | 30 | | | 40 | | |
|------------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| q (%) | | 99 | 95 | 90 | 99 | 95 | 90 | 99 | 95 | 90 | 99 | 95 | 90 |
| Valeur de A pour | $\alpha = 1 \%$ | 1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 5 | 2 | 4 | 7 | 2 | 5 | 9 |
| | $\alpha = 5 \%$ | 0 | 1 | 2 | 1 | 3 | 4 | 1 | 4 | 6 | 1 | 4 | 7 |
| | $\alpha = 10 \%$ | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 4 | 1 | 3 | 5 | 1 | 4 | 6 |

n : nombre d'échantillons analysés en double

q : estimation de la proportion d'accords entre doubles ou d'accords avec les résultats de référence ou attendus

A : nombre maximum de déviations sur n échantillons pour ne pas rejeter l'hypothèse que la méthode alternative ait une proportion d'accords voisine de q au seuil α .

α : risque de rejeter une méthode satisfaisante (considérer à tort qu'une méthode présente une proportion d'accords inférieure à la valeur q choisie)

DISCUSSION

Les critères de performance du protocole P2 présenté dans l'exemple ne répondent pas aux attentes en termes de sensibilité et d'exactitude. Malgré une répétabilité correcte, le seuil de détection reste insuffisant pour que la méthode permette de mettre en évidence des infections latentes. L'extension de ce travail à un panel de protocoles publiés ou proposés sous forme de kits par des fournisseurs permettra de préciser leur intérêt.

Les résultats obtenus seront confrontés à ceux des autres partenaires du projet ERWINDECT pour classement et sélection des meilleurs protocoles afin de passer à la deuxième étape de validation : l'évaluation inter-laboratoires.

CONCLUSION

Des outils innovants de détection de la bactérie *Erwinia amylovora* agent du feu bactérien sont en cours de développement, d'optimisation et de validation.

Le protocole d'évaluation et de validation de méthodes d'extraction d'ADN présenté dans cette étude fournit des éléments permettant de mieux appréhender leurs critères de performances. Le projet EUPHRESKO-ERWINDECT devrait aboutir à un choix de méthodes de détection performantes pour la révision du protocole de l'OEPP.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme. Norme EN ISO 16140. Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Octobre 2003.

Anonyme. Norme XP V03-111. Protocole d'évaluation intra-laboratoire d'une méthode alternative d'analyse par rapport à une méthode de référence. Octobre 1995.

Biosca, E.G., Marco-Noales, E., Ordax, M. and López, M.M., 2006. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in natural water. *Acta Hortica* 704, 20 107-112.

Biosca, E.G., Santander, R.D., Ordax, M., Marco-Noales, E., Águila, B., Flores, A. and López, M.M., 2008. Survival of *Erwinia amylovora* in rain water at low temperatures. In *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. World Scientific Publishing Group (*in press*).

EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2004. Diagnostic protocols for regulated pests: *Erwinia amylovora*. *Bull. OEPP/EPPO Bull* 34, 159-171.

Gorris, M.T., Cambra, E., Lopez, M.M., Paulin, J.P., Chartier, R., & Cambra, M., 1996. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Hortica* 411, 47-51.

Hale, C.N., McRae, E.M. and Thomson, S.V., 1987. Occurrence of *Erwinia amylovora* on apple fruit in New Zealand. *Acta Hortica* 217, 33-40.

King, E.O, Ward, M. & Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of puocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307.

Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., López, M.M., 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *App. Environ. Microbiol.* 66: 2071-2078

Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C., López, M.M., 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 37: 23-31

Manceau, C., Grall, S., Brin, C., Guillaumes, J., 2005. Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR Microwell plate detection system. - *OEPP/EPPO, Bulletin* 35,55-60.

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M. and Biosca, E.G., 2006. Copper induces the viable but nonculturable (VBNC) state in *Erwinia amylovora*. *20 Acta Hortica* 704, 205-210.

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M. and Biosca, E.G., 2006a. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 72, 3482-3488.

Pastrik, K.H and Maiss, E., 2000. Detection of *R.solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148;619-626.

- Roszak, B.D. and Colwell, R.R., 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51, 365-379.
- Sholberg, P.L., Gaunce, A.P., and Owen, G.R., 1988. Occurrence of *Erwinia amylovora* of pome fruit in British Columbia in 1985 and its elimination from the apple surface. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10, 178-182.
- Stöger, A., Schaffer, J. and Ruppitsch, W., 2006. A Rapid and Sensitive Method for Direct Detection of *Erwinia amylovora* in Symptomatic and Asymptomatic Plant Tissues by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology* 154:7-8, 469–473)
- Taylor R.K et al, 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*, 2001. Vol.29:35-43.
- Thomson, S.V., 1986. The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology* **76**, 476-482.
- Thomson, S.V., 2000. Epidemiology of fire blight, P.9-36. In J.L Nanneste (ed), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.
- van der Zwet, T., 2002. Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* n°590, 33-34.
- van der Zwet, T., Thomson, S.V., Covey, R.P. and Bonn, W.G., 1990. Populations of *Erwinia amylovora* on external and internal apple fruit tissues. *Plant Dis* 12 74, 711–716.
- van der Zwet, T., and Beer, S., 1995. Fire blight-its nature, prevention and control. *A Practical Guide to Integrated Disease Management*. USDA Agricultural Information Bulletin n° 631 Washington (US).
- van der Zwet, T., Zoller B.G; Thomson, S.V., 1988. Controlling fire blight of pear and apple by accurate prediction of the blossom blight phase. *Plant Disease* 72, 464–472.
- Wilson, M. and Lindow, S.E., 2000. Viable but nonculturable cells in plant-associated bacterial populations. In *Nonculturable microorganisms in the environment* ed. Colwell, R.R. and Grimes, D.J. pp. 229-241. ASM Press.

MATING TYPES ISOLATES OF *ASCOCHYTA RABIEI*

M.-M. ZERROUG¹, Z. BOUZNAD², L. LAROUS¹, R.-N. STRANGE³

1- Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences,
Université de Sétif, Algérie, med.zerroug@gmail.com

2- Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, El-Harrach, Algérie

3- School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London,
Malet Street, WC1E 7HX, London, U.K.

SUMMARY

Chickpea is attacked by several pathogens, of which *Ascochyta rabiei* is the most serious in many parts of the world. *Ascochyta rabiei* (forme parfaite: *Didymella rabiei*) is a heterothallic loculoascomycete with a bipolar mating system. Twenty one isolates of the fungus were tested for their mating type and determined by PCR with specific primers. Two Algerian isolates were both mating type 1, whereas both mating type were present among the nine Turkish isolates for which PCR bands were obtained (mating type 1, 3 isolates; mating type 2, six isolates).

Keywords: *Ascochyta rabiei*, mating types, DNA sequencing

RÉSUMÉ

Le pois chiche est attaqué par plusieurs pathogènes, parmi lesquels *Ascochyta rabiei* est le plus répandu dans le monde. *Ascochyta rabiei* (téléomorphe: *Didymella rabiei*) est heterothalique bipolaire. Le type sexuel de 21 souches a été déterminé par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Les souches Algériennes analysées étaient de type 1, et les souches turques étaient de type 1 (3 souches) et de types 2 (6 souches).

Mots-clés : ADN, *Ascochyta rabiei*, mating types, séquençage

INTRODUCTION

Ascochyta blight, caused by *Ascochyta rabiei*, is the most serious disease of chickpea in many parts of the world, especially in Western Asia, North Africa and the North West region of India and Pakistan (Nene, 1982; Nene and Reddy, 1987; Singh and Reddy, 1993). *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) is a heterothallic Loculoascomycete fungus with a bipolar mating system (Trapero-Casas and Kaiser, 1992). The primary inoculum for *Ascochyta* blight epidemics in most chickpea areas is thought to be ascospores which are forcibly ejected from pseudothecia and dispersed by wind. Ascospores are able to infect chickpea plants several hundred meters from the sources (Trapero-Casas *et al*, 1996). The finding of both mating types of *A. rabiei* in several countries demonstrates the feasibility of sexual reproduction as a means by which genotypic diversification may occur in *A. rabiei* populations. This may allow the pathogen to evolve increased virulence on resistant cultivars or to develop resistance to fungicides (Barve *et al*, 2003). *MAT* genes have been proposed as potentially useful regions of the genome for phylogenetic reconstruction as they are highly conserved within species but vary among closely related species (Turgeon, 1998).

The objective of this research was to determine the mating types of isolates of *A. rabiei*, from Algeria and Turkey by the polymerase chain reaction using specific primers.

MATERIALS AND METHODS

GROWTH OF FUNGI

Fungi were grown on Potato Dextrose Agar (PDA, 39 g/l Oxoid, Unipath Ltd, UK). The medium was dispensed in Petri dishes and inoculated with pycnidiospore suspensions (30 μ l; 10⁷ spores/ml; Alam *et al*, 1987) and incubated for 10 days at 20°C.

DNA EXTRACTION

For DNA extraction, five plugs of mycelium (6 mm diam) were cut from colonies growing on PDA and excess agar on the bottom of the plugs was removed. The plugs were transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes containing one measure (approximately up to the 0.1 ml mark on an Eppendorf tube) of glass beads (Sigma, Sigma-Aldrich Company Ltd., Fancy Road, Poole, Dorset, BH12 4QH, England). Chelex-Tris suspension (1 ml; Biorad Laboratories Ltd., Biorad house, Mayland Avenue, Hemel Hempstead, Herts, HP2 7TD; 3% chelex w/v, 1 mM Tris, pH 8.0) was added and the contents of the tube were mixed well by vortexing for 1 min. The tubes were frozen in liquid nitrogen for 1 min, left at room temperature for 1 min and boiled for 1 min in a boiling water bath. The alternate freezing and boiling was repeated twice more. After mixing the contents of the tubes by vortexing for 1 min they were incubated at 55°C in a water bath for 30-40 min. Tubes were centrifuged at 13,000 *g* for 5 min and 100 μ l of the supernatants were transferred to fresh Eppendorf tubes. DNA concentration and purity was ascertained by monitoring UV absorption at 260 and 280 nm and by electrophoresis in a 1% agarose gel containing ethidium bromide (0.2 μ g ml⁻¹ gel).

PCR

Mating type genes were amplified in a multiplex PCR reaction using the primers Com-1 (5'-GCATGCCATATCGCCAGT-3'), SP21 (5'-ACAGTGAGCCTGCACAGTTC-3') and Tail-5 (5'-CGCTATTTTATCCAAGACACACC-3'); MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany. Primers (10 pmole/reaction) and DNA samples (~ 50ng) were added to "Ready to Go" PCR beads and additional MgCl₂ to a final concentration of 4.5 mM.

The PCR conditions consisted of 45 cycles with an initial 2 min. at 94 °C for denaturation and a final 7 min. at 72 °C for extension in a Progene Thermal Cycler (Techne Cambridge Ltd, UK). Each cycle consists of 30 s at 94 °C followed by 45 s at 60 °C for annealing and 2 min. at 72 °C for extension (Barve *et al*, 2003).

PCR products were electrophoresed for 1.5 h at 74 V in agarose gels (1% or 1.7%) containing 2 µg/ml ethidium bromide with Tris-acetate-EDTA as buffer (TAE buffer; pH 8.5). Gels were examined on a transilluminator (UVP, Inc., Cambridge, England) and photographed.

RESULTS AND DISCUSSION

After electrophoreses of the PCR products on a 1% agarose gel, the isolates gave different values of migration which were estimated by a standard 100 bp ladder. The two Algerian isolates were both of mating type 1, since they gave a band at about 700 bp as were three Turkish isolates. Six further isolates from Turkey were mating type 1 (table 1).

Table 1. Mating types of Algerians and Turkish isolates of *A. rabiei*
Tableau 1. Types génétique des isolates Algériens et Turques

| Isolates | Mating type |
|----------|-------------|
| Ag1 | 1 |
| Ag2 | 1 |
| Tk 5 | 1 |
| Tk 7 | 1 |
| Tk 9 | 1 |
| Tk 1 | 2 |
| Tk 3 | 2 |
| Tk 4 | 2 |
| Tk 10 | 2 |
| Tk 12 | 2 |
| Tk 16 | 2 |

The DNA was successfully amplified from only 11 of the 21 isolates using specific primers, this is maybe due to the quality of the extracted DNA of these 10 isolates which were identified as *A. rabiei* on the basis of the production of the toxin solanapyrone A which was first described as products of *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of potato and tomato (Ichihara *et al.*, 1983), and may be confused with the genus *Alternaria*. Certainly the fungi differ taxonomically considerably, *Alternaria solani* belonging to the Hyphomycetes and *Ascochyta rabiei* belonging to the Coelomycetes. Furthermore the identity of the 10 isolates and their difference from *Alternaria solani* must be confirmed by alignment of rDNA of both species.

Mating type is related to the genetic diversity of *A. rabiei*. Kaiser (1995) reported that fertile pseudothecia of this fungus developed naturally on infected debris from a number of chickpea growing countries in North Africa, North America, West Asia, and East and West Europe, indicating that both mating types (Mat 1 and Mat 2) are widespread in nature. Until 2003, the only way to determine mating type was by culturing test isolates together with isolates of known mating type and checking for the production of pseudothecia. Using this technique Navas-Cortes *et al.* (1998) determined the mating types of 48 isolates of the fungus. Of 18 isolates from Spain, seven were mating type 1 and 11 were mating type 2, the 16 from India and Pakistan were all mating type 1 and of those from the USA four were mating type 1 and three mating type 2. Only 2 isolates from both Greece and Morocco were tested and all four were mating type 2. The remaining isolates were from France, Italy and Turkey each with one isolate. These were mating type 1, 2 and 1, respectively. Two Australian isolates were mating type 1 (Khan *et al.*, 1999). In 2003 Barve *et al.* published a paper describing the sequences of the two mating types and specifying primers which could be used in a multiplex PCR reaction to determine the mating type of any isolate. This technique has facilitated the determination of mating types in *A. rabiei* and was used in the present investigation with only a limited number of

samples. The two Algerian isolates were both mating type 1. However, since mating type 2 has been found in the neighbouring Maghreb countries of Morocco and Tunisia, it seems likely that mating type 2 will also be found in Algeria. Further investigation must be carried out in Algeria with a great number of *A. rabiei* isolates in order to confirm the existence of both mating type. Both mating types were found among Turkish isolates. As described in the introduction, the co-occurrence of both mating types in a population has important implications for the generation of isolates with different virulence characteristics and resistance to fungicides.

REFERENCES

- Alam S. S., Strange R. N., Gureshi S. H., 1987 - Isolation of *Ascochyta rabiei* and a convenient method for copious inoculum production. *The mycologist*, 21,20.
- Barve M. P., Arie T., Salimath S. S., Muehlbauer F. J., Peever, T. L., 2003 - Cloning and characterization of the mating type (*MAT*) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a *MAT* phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics and Biology*, 39, 151-167.
- Ichihara, A., Tazaki, H. and Sakamura, S. 1983. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. *Tetrahedron Lett.*, **24**: 5299-5432.
- Kaiser W. J., 1995 - Inter- and intranational spread of *Ascochyta* pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. *Can. J. Plant Pathol.*, 19, 215-224.
- Khan M. S. A., Ramsey M. D., Corbiere R., Infantino A., Porta-Puglia A., Bouznad Z., Scott, E. S - 1999. *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology*, 48, 203-234.
- Nava-Cortes J. A., Perez E., Jimenez-Diaz R. M., Llobell A., Bainbridge B. W., Heale J. B., 1998. Mating Type, Pathotype and RAPDs Analysis in *Didymella rabiei*, the Agent of *Ascochyta* Blight of Chickpea. *Phytoparasitica*, 26, 3, 199-212.
- Nene Y.L., 1982 - A review of *Ascochyta* blight of chickpea. *Tropical Pest Management*, 28, 61-70.
- Nene Y.L., M.V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control. In: M.C. Saxena and K.B. Singh Eds. *The Chickpea*. CAB International, Oxon, UK., 233-270.
- Singh K.B., Reddy M.V., 1993 - Resistance to six races of *Ascochyta rabiei* in the world germplasm collection of chickpea. *Crop Sci.*, 33, 186-189.
- Trapero-Casas A., Kaiser W.J., 1992 - Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology*, 82, 1261-1266.
- Trapero-Casas A., Navas-Cortes J.A., Jimenez-Diaz R.M., 1996 - Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as major sources of primary inoculum for *Ascochyta* blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 237-245.
- Turgeon B.G., 1998 - Applications of mating-type technology to problems in fungal biology. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 36, 115-137.

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**EVALUATION DE LA PHYTOTOXICITE D'UNE MOLÉCULE ISOLÉE DES FEUILLES
D'OLIVIER INFECTÉES PAR *CYCLOCONIUM OLEAGINUM* (CAST.)**

A. GUECHI

Laboratoire de Phytopathologie et de Microbiologie Faculté des Sciences, Université Ferhat
ABBAS, 19000, Sétif, ALGERIE, e-mail: guechibio@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Une substance phytotoxique ($C_{23}H_{44}O_3$) appelée "Substance A", a été purifiée de feuilles d'olivier infectées par *Cycloconium oleaginum* Cast. L'effet mutagène de cette substance a été détecté en utilisant les souches de *Salmonella* TA 100 et TA 102 dans le test d'Ames. Une autre substance présentant un effet mutagène a été détectée dans l'extrait de culture du *Cycloconium oleaginum*. Cette substance n'a pas été détectée dans l'extrait des feuilles d'olivier contaminée. La substance A, a provoqué une libération d'électrolytes à partir des cellules des tissus de feuilles d'olivier, manifestant ainsi sa phytotoxicité.

Mots-clés : Substance phytotoxique, feuilles d'olivier, effet biologique, *Cycloconium*.

SUMMARY

**PHYTOTOXICITY EVALUATION OF A MOLECULE ISOLATED FROM OLIVE LEAVES
PARASITIZED BY THE FUNGUS *CYCLOCONIUM OLEAGINUM* CAST.**

A phytotoxic substance ($C_{23}H_{44}O_3$) which is named "substance A", was purified from olive leaves infected with *Cycloconium oleaginum* Cast. The mutagenic effect of this substance was detected using TA 100 and TA 102 strains of *Salmonella* in the test of Ames. Another substance manifesting the mutagenic effect was found in the extract from the *Cycloconium oleaginum* culture. This substance was not detected in the extract from contaminated olive leaves. Substance A increased electrolytes leakage from tissue of olive leaves, thus manifesting its phytotoxicity.

Key words: Phytotoxic substance, olive leaves, biologic effect, *Cycloconium*

INTRODUCTION.

La production d'un métabolite secondaire (nommé substance A) par le champignon phytopathogène *C. oleaginum* Cast. a été décelée dans les feuilles d'olivier (Guéchi, 2003 ; Guéchi et Girre, 2005) et son activité biologique a été étudiée. Les métabolites secondaires produits par les micro-organismes phytopathogènes sont généralement des toxines qui rendent leurs producteurs plus agressifs et aggravent les maladies des plantes (Durbin, 1989). Les mécanismes de ce processus ne sont pas encore bien élucidés mais les résultats de nombreuses études montrent que le mode d'action primaire d'une toxine dépend de sa structure chimique (Bean et al, 1984 ; Kuti et al, 1987; Kuti et al, 1989; Mitchell, 1998). Pour comprendre le rôle de la substance A dans le développement de la maladie des feuilles d'olivier, nous avons déterminé son effet mutagène *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 et TA 102, ainsi que son effet sur la fuite des électrolytes des feuilles. De plus, la formule brute de ce métabolite a été précisée.

MATERIEL ET METHODES

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE LA SUBSTANCE A. La substance A a été isolée à partir d'un kg de feuilles d'olivier fraîches, récoltées en avril 1999, par la méthode décrite par (Guéchi et al, Guéchi, 2003 ; Guéchi et Girre, 2005). La purification partielle a été effectuée par CCM bidimensionnelle sur la silice Merck 60 G de 1 mm d'épaisseur (Guéchi, 2003 ; Guéchi et Girre, 2005). La substance A obtenue et solubilisée dans 2 ml de méthanol a été ensuite analysée par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) au Laboratoire de pharmacognosie et de Mycologie de l'Université de Rennes I en utilisant la pompe LDC Milton Roy Constametric III et la colonne semi préparative Spherisorb S5-ODS2-C18, 250 X 7,5 cm. La phase mobile utilisée est : acétonitrile-eau-acide acétique 60:40:2, le débit 3 ml / min. Le détecteur UV Erma Optical Works LTD ERC- 7210 a été utilisé à une longueur d'onde de 270 nm. 200 µl ont été injectés à travers l'injecteur Rheodyne. Les systèmes d'éluion utilisés ont été ultrafiltrés sur disques Durapore Hydrophile de porosité 0,22 µm. Le pic correspondant à la substance A a été récupéré et la purification a été répétée encore deux fois en utilisant les phases mobiles:

acétonitrile-eau-acide acétique 65:35:2 et 70 :30 :2. La substance A solubilisée dans le dernier système chromatographique a été récupérée, le solvant a été évaporé à siccité et la substance A a été solubilisée dans 3 ml d'éthanol après avoir été pesée. Cette solution est utilisée pour mesurer le spectre d'absorption.

Pour déceler l'effet mutagène des extraits, ces derniers ont été purifiés par filtration de gel sur agar à 2 % (Guéchi, 2003 ; Guéchi et Girre, 2005) et récupérés dans 0,5 ml de chloroforme.

L'extraction de 500 ml du milieu de culture du champignon a été effectuée 2 fois par le chloroforme. L'extrait concentré sous vide a été récupéré dans 1ml de chloroforme.

SPECTROMETRIE DE MASSE- Les spectres d'ionisation électronique ont été obtenus au centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (Rennes) sur le spectromètre de haute résolution Varian Mat 311 par l'insertion directe de 40 µg de la substance A purifiée par HPLC et solubilisée dans le chloroforme. Ce dernier a été évaporé sous azote avant l'insertion dans la chambre d'ionisation. La température dans la chambre a été de 170°C, la pression 6.10^{-7} mm Hg. L'ionisation a été effectuée à 70 eV. La température de la source d'électrons a été de 200°C

EFFET MUTAGENE. Plusieurs systèmes de bactéries ont été développés pour le dosage des substances mutagènes dans l'environnement (Ames, 1972; Levin et al, 1982; Maron et Ames, 1990 ; Rinkus et Legator, 1989; Shuter et Jager, 1992).

Tous ces tests sont basés sur le fait que les souches bactériennes, carencées en un ou plusieurs systèmes enzymatiques responsables de la réparation des dommages subis par leur ADN sont très sensibles aux agents qui effectuent ces modifications structurales, et qui peuvent se manifester par l'effet mutagène.

Nous avons utilisé deux systèmes différents de bactéries pour tester les propriétés mutagènes

des extraits des feuilles contaminées et de la substance A isolée.

Le test rec à été déjà effectué (Guéchi et Girre, 2005) et les propriétés mutagènes ont été observées chez la substance A, chez les extraits de feuilles d'olivier contaminées par *C. oleaginum* et chez le mycélium de ce champignon cultivé dans le milieu pour le système des souches de *Bacillus subtilis* M 45 rec-, arg-, try- et de *Bacillus subtilis* H 17 rec+, arg-, try-.

Une substance dont l'effet mutagène est plus important a été trouvée dans l'extrait du milieu de culture. Cette substance n'a pas été détectée de l'extrait des feuilles d'olivier contaminées.

Le test classique d'Ames (Maron et Ames, 1990) a été effectué avec des souches de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 et TA 102. Toutes ces souches ont un type différent de mutation dans l'opéron d'histidine et sont donc auxotrophes pour l'histidine. Les souches TA 98 et TA 100 ont aussi deux autres mutations; l'une, appelée rfa, augmente la perméabilité de leur membrane et l'autre, la délétion uvr B, les prive du système de réparation par excision. Toutes les souches possèdent le plasmide PKM 101, la souche TA 102 possède en outre le plasmide PAQL. Toutes ces propriétés des souches augmentent leur sensibilité aux mutagènes. Le test est basé sur la capacité du mutagène à effectuer une mutation reverse dans l'opéron d'histidine et à éliminer ainsi la mutation primaire. Cet effet se manifeste par l'augmentation du nombre de colonies sur le milieu comportant une petite quantité d'histidine permettant uniquement deux ou trois divisions cellulaires aux souchesensemencées, incapable de synthétiser cet acide aminé.

La substance A a été incorporée dans la gélose minimale avec 0,05 mM d'histidine et de biotine etensemencée par une des souches de *Salmonella* en quantité de 10^8 cellules par boîte de Pétri. Le dénombrement des colonies a été effectuée après 48 heures de développement à +37° C. Trois boîtes ont été préparées pour chaque souche et chaque concentration de la solution A.

EFFET DE LA SUBSTANCE A SUR LA FUITE DES ELECTROLYTES DES CELLULES DE FEUILLES D'OLIVIER L'étude de l'effet de la substance A sur la fuite des électrolytes des feuilles d'olivier a été faite selon la méthode décrite par Kuti et al, Kuti et al, 1989.

Des disques de 18 mm de diamètre sont coupés à partir des feuilles et répartis en 4 lots de 10. Ils sont agités dans 50ml d'eau bidistillée pendant 30 mn pour éliminer les électrolytes de la surface des feuilles, ensuite mis dans 25 ml d'eau bidistillée contenant 0, 0,5 , 1 µg/ml de la substance A. Après 2 et 4 heures d'agitation, 5 ml de chaque échantillon sont testés pour la conductivité à + 25° C avec un conductimètre type CD 6 NG Tacussel. Pour connaître la quantité totale d'électrolytes à l'intérieur des feuilles, 10 disques de 10 feuilles sont coupés, lavés, placés dans 25 ml d'eau bidistillée puis soumis à ébullition pendant 15 mn. La conductivité de cette solution correspond à 100 % d'électrolytes présents à l'intérieur des feuilles.

RESULTATS

EXTRACTION ET DETERMINATION DE LA FORMULE BRUTE DE LA SUBSTANCE A.

La substance A a été extraite et purifiée à partir des feuilles d'olivier contaminées par plus de 3 colonies de *C. oleaginum* et récemment récoltées. L'isolement d'une grande quantité de substance A n'a pas été possible à partir du milieu de culture du champignon à cause de son très lent développement et de la nécessité d'inoculer ce milieu par une souche nouvellement isolée (Guéchi, 2003). Le champignon perd en effet la capacité de produire la substance A après plusieurs repiquages dans le milieu de culture.

A partir de 1 kg de feuilles fortement contaminées, nous avons obtenu que 1.6 mg de substance A. Chaque étape de purification a été suivie par CCM pour contrôler les propriétés chromatographiques de la substance A et pour les comparer à celles de l'extrait brut des feuilles et du milieu de culture malté.

Le spectre d'absorption de la substance A dans l'éthanol présente quatre maxima dans la région ultraviolette à 290, 306, 340 et 375; l'absorption optimale étant à 306 nm.

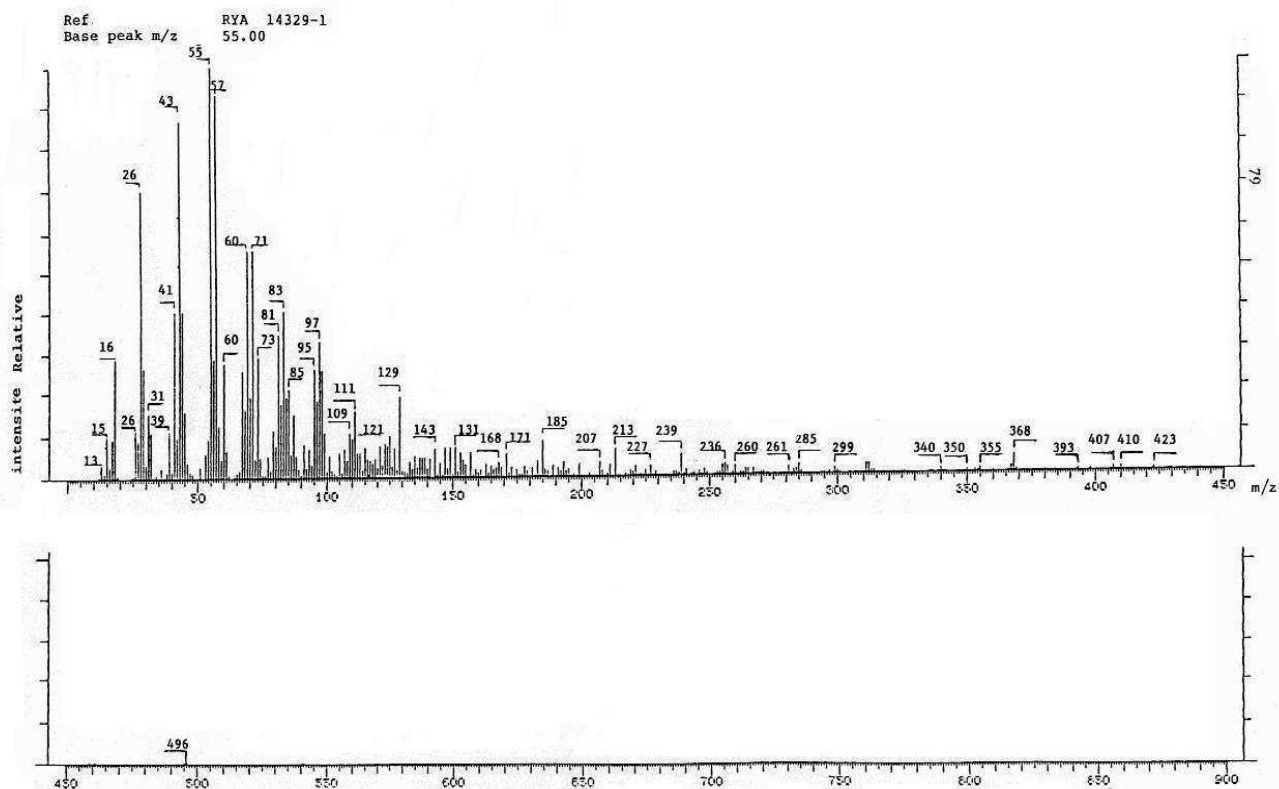


Figure 1 : Spectre de masse de la substance A

L'ion moléculaire, d'une masse de 368 m/z de faible intensité (4.18 % de l'intensité de l'ion de base), a été obtenu par la spectrométrie de masse de la substance A purifiée par HPLC. Le spectre a révélé une forte fragmentation de la molécule.

En nous basant sur la masse de l'ion moléculaire et sur les caractères des ions fragments, nous estimons que la formule brute est $C_{23}H_{44}O_3$.

EFFET MUTAGENE DE LA SUBSTANCE VIS A VIS DES SOUCHES DE SALMONELLA .

L'effet mutagène de la substance A a été observé aussi dans le test classique avec des souches TA 100 et TA 102 de *Salmonella* auxotrophe pour l'histidine (Tableau I). La substance A provient de 30 g de feuilles fraîches. L'extrait a été purifié par CCM bidimensionnelle, puis la substance A a été solubilisée dans 0,5 ml de chloroforme. Aucun effet n'a été observé avec la souche TA98. Le nombre de reversions des souches TA100 et TA102 a été augmenté respectivement de quatre et trois en présence de 10 µl d'extrait du milieu de culture. Ce nombre a été à peu près neuf fois plus grand chez la souche TA 100 en présence de 20 µl de l'extrait et cinq fois plus grand chez la souche TA102. Il semble, d'après ces résultats, que l'effet mutagène de la substance A est plus important pour les souches de *Salmonella* que pour les souches de *Bacillus subtilis*. La substance A contenue dans 10 µl de l'extrait correspond à 1,8 µg.

INFLUENCE DE LA SUBSTANCE A SUR LA FUITE DES ELECTROLYTES DES CELLULES DE FEUILLES D'OLIVIER. Les résultats du tableau II montrent que la substance A provoque une fuite des électrolytes des cellules des tissus de feuilles d'olivier. Cette perte d'électrolytes se

manifeste par une augmentation de la conductivité des solutions aqueuses dans lesquelles les feuilles sont agitées en présence de la substance pendant deux et quatre heures. Les résultats montrent que la conductivité de la solution est dépendante de la concentration en substance A. La conductivité de la solution aqueuse contenant $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de substance A est augmentée de 4,6 % par rapport au contrôle et celle obtenue avec une concentration de $1 \mu\text{l / ml}$ de substance A est augmentée de 20,9 % après deux heures d'agitation.

La conductivité obtenue après 4 heures d'agitation augmente légèrement dans la solution contenant $0,5 \mu\text{g / m1}$ de substance ; elle est constante dans la solution contenant $1 \mu\text{g / m1}$ de substance (Tableau II).

La conductivité d'une solution obtenue après une décoction de 10 disques de feuilles dans 25 ml d'eau bidistillée pendant 15 min, est de $265,4 \mu\text{S}$ (270) Guéchi,A., 2003 ; Kuti,et al, 1987.

Tableau I : Activité mutagène manifestée par la substance A dans le test classique d'Ames avec les souches de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 et TA 102.

| Extrait du milieu de culture (μl) (10 μl extrait = 1,8 μl substance) | Nombre de reversions des souches | | |
|--|----------------------------------|--------|-------|
| | TA 98 | TA 100 | TA102 |
| 0 | 32 | 106 | 235 |
| 10 | 28 | 416 | 620 |
| 20 | 34 | 960 | 1100 |

Tableau II : Influence de la substance A sur la fuite des électrolytes des cellules de feuilles d'olivier.

| Concentration de la substance A ($\mu\text{l/ml}$) | Conductivité (μS) | | | Fuite d'électrolytes (μS)/ (%) | | Fuite d'électrolyte provoquée par la toxine (μS)/ (%) | |
|--|--------------------------------|------|-------|---|------------|--|-----------|
| | T0 | T2 | T4 | T'2 | T'4 | T''2 | T''4 |
| 0 | 4.6 | 29.3 | 72.5 | 24.7/9.3 | 67.9/25.6 | - | |
| 0.5 | 4.6 | 41.6 | 86 | 37 /13.9 | 81.4/30.7 | 12.3/4.6 | 13.5/5.1 |
| 1 | 3.2 | 83.3 | 121.6 | 80.1/30.2 | 117.4/44.2 | 55.4/20.9 | 49.5/18.6 |

1 : 25 ml d'eau bidistillée + 10 disques de feuilles d'olivier (contrôle).

2 : 25 ml d'eau bidistillée + 10 disques + $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de la substance A.

3 : 25 ml d'eau bidistillée + 10 disques + $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de la substance A.

To : conductivité des solutions sans feuilles après 2 et 4 heures d'agitation.

T2 : conductivité des solutions après 2 heures d'agitation en présence des feuilles.

T4 : conductivité des solutions après 4 heures d'agitation avec les feuilles.

T'2 et T'4 : Le pourcentage d'électrolytes libérés respectivement après 2 et 4 heures d'agitation.

T''2 et T''4 : Le pourcentage d'électrolytes libérés sous l'effet de la substance A pendant 2 et 4 heures d'agitation.

DISCUSSION

Une grande quantité de fragments et une faible intensité de l'ion moléculaire de la substance A obtenues après son bombardement par les électrons de haute énergie, témoignent de la labilité de cette molécule. La labilité de la substance A pure a été obtenue aussi dans des solutions diluées par la disparition de sa fluorescence bleu-claire à 366 et 254 nm. En revanche, dans les extraits bruts et partiellement purifiés, la substance A est restée stable pendant 2 années.

En ce qui concerne la détermination structurale de la substance A, le spectre de masse (Fig. 1) n'apporte pas suffisamment d'information. Toutefois, le caractère des fragments obtenus montre que les liaisons entre les carbones sont presque toutes saturées. Il faut noter aussi, dans ce sens, la faible valeur du coefficient molaire d'absorption ($\epsilon = 726$) à son maximum de 306 nm.

Compte tenu du fait du très lent développement du champignon et de son incapacité à produire la substance A après deux cycles de culture, il a été impossible d'isoler une quantité suffisante de substance A pour effectuer les divers spectres de RMN nécessaires à l'élucidation de sa structure spatiale.

Cependant, certaines conclusions de la structure chimique de la substance A peuvent être déduites des effets mutagènes qu'elle manifeste vis à vis des souches de *Salmonella* TA 100 et TA 102 et des *Bacillus subtilis* rec- et rec+, sans sa métabolisation préalable par des enzymes de microsomes de foie fraction S9 (Ames, 1972).

Ces effets montrent que la substance A réagit avec les bases d'ADN et modifie ainsi l'information génétique de la cellule.

La capacité des substances à effectuer ces réactions est conditionnée par leur structure chimique (Ames, 1972 ; Maron et Ames, 1990 ; Rinkus, et Legator, 1989 ; Shuter et Jager, 1992). Les substances qui manifestent cette capacité sans être métabolisées auparavant par la fraction enzymatique S9 sont les nitrosamines, les dérivés de mélanine, d'hydrazine, les époxydes et des substances alkylantes (Shuter et Jager, 1992). Le spectre de masse montrant qu'il n'y a pas d'azote dans la molécule, nous pouvons supposer que les groupements responsables de l'effet mutagène peuvent être des époxydes ou d'autres structures ayant une capacité d'alkylation.

L'effet de la substance A sur la fuite des électrolytes des tissus de feuilles d'olivier montre qu'elle peut réagir avec les protéines responsables de la perméabilité membranaire. Kuti et al, (1987) qui ont étudié l'influence d'un trichothécène, la Roridine E, produit par *Myrothecium roridum*, sur la fuite des électrolytes des feuilles du *Cucumis melo*, ont trouvé que cette mycotoxine empêche la synthèse des protéines au niveau des ribosomes. Ils ont déduit de ces résultats que cette mycotoxine est responsable de la perte ou de la modification structurale de certaines protéines nécessaires à la régulation de la perméabilité membranaire, ce qui s'est manifesté par la fuite des électrolytes des cellules des tissus des feuilles.

Nous pouvons ainsi déceler certaines analogies entre l'action moléculaire de la Roridine E et celle de la substance A, cette dernière pouvant également produire une inhibition de la synthèse de protéines, mais à des niveaux différents de ceux de la Roridine E.

L'effet mutagène dû à la substance A peut se manifester de deux manières différentes : d'une part, par arrêt de la transcription de quelques gènes endommagés, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse des protéines correspondantes ; d'autre part, par le fait que le gène endommagé peut être transcrit, mais son information n'est pas correcte. La protéine synthétisée selon cette information sera inactive.

Ces deux éventualités ont la même conséquence: elles entraînent l'absence d'une protéine qui peut être indispensable pour le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et la régulation de la perméabilité cellulaire des feuilles d'olivier. La fuite des électrolytes causée par la substance A est donc une manifestation de sa phytotoxicité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Ames BN.,1972 -A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens.In : *Sutton,HE. Harris M (eds.). Effects of environmental contaminants* , New york : Academic Press, 57,66.
- 2- Bean, GA., Fernando,TA., Jarvis, BB. and Brutton, BD., 1984 - The isolation and identification of trichothecene metabolites from plant pathogenic strains of *Myrothecium roridum*. *J. Nat. Prod.*; 47: 727-29.
- 3- Durbin, RD., 1989 - Host specific toxins: Recognition and specificity factors *in plant disease*. *Tottari Université Japan*. 1:135-42.
- 4- Guéchi,A., 2003 - Extraction d'une substance phytotoxique produite par *C. oleaginum* Cast dans les feuilles d'*Olea europaea* L. *Rev. Uni. Sci. Technol. Université de Constantine* 7: 201-2007.
- 5- Guéchi A., Girre L., 2005 - Recherche et analyse d'un effet mutagène des extraits de feuilles d'olivier parasitées par le champignon *Cycloconium oleaginum* Cast. *Rev. Uni. Sci. Technol. Université de Constantine* 5: 17-29.
- 6- Kuti,JO.,Ng TJ , Bean, GA., 1987- Phytotoxic effects of trichothecene metabolite from pathogenic strains of *Mycothecium roridum* on *Cucumis melo*. *Biodeterioration. Res.*; 1: 213-22.
- 7- Kuti,JO.,Ng TJ , Bean, GA., 1989- Possible involvement of a pathogen-produced trichothecene metabolite in *Mycothecium* leaf spot of muskmelon. *Physiol. Molec . Plant Pathol.* ; 34 :41-54.
- 8- Levin DE., Yamasaki E., Ames BN., 1982 - A new *Salmonella* tester strain TA 97 for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation Res.*; 94:315-30.
- 9- Maron DM., Ames BN., 1990 - Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*; 113 , 173-215.
- 10-Mitchell RE., 1998 - The relevance of non host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology*, 22: 215-45.
- 11-Rinkus SJ.,Legator.,MS., 1989 - Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.*; 39: 3299-3318.
- 12-Scheffer RP.,1993 - Toxins as chemical determinants of plant disease. *In: Daley JM.(ed.) Toxins and plant pathogenesis*, New-York : 1-40.
- 13-Shuter W., Jager I.,1992 - Comparative evaluation of different pairs of AND repair-deficient and DNA repair-proficient bacterial tester strains for rapid detection of chemicalmutagens and carcinogens.*Mutation Res*; 97 : 1-18.

**AFFP-9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

**PROLIFERATION ET CONTROLE DE LA TAVELURE CYCLOCONIMIQUE DES FEUILLES
D'OLIVIER EN ALGERIE**

A. GUECHI

Laboratoire de Phytopathologie et de Microbiologie Faculté des Sciences, Université Ferhat
ABBAS, 19000, Sétif, ALGERIE, e-mail: guechibio@yahoo.fr

RESUME

L'œil de paon de l'olivier est une maladie d'importance économique majeure dans certaines régions d'Algérie causée par *Cycloconium oleaginum* Cast. Le taux de contamination varie d'un site à l'autre. La contamination est très forte dans plusieurs sites des départements de Béjaïa, Sétif et de Tizi-Ouzou. En revanche, l'infection est très rare et même négligeable dans les départements de Mascara, d'Oran et de Relizane. Dans les conditions de Sétif, il est possible de lutter contre la maladie avec de la bouillie bordelaise (1 pour cent) en deux traitements : 20 octobre et 29 décembre ont donné de bons résultats en année humide alors qu'en année sèche une seule application est nécessaire.

Mots clés : *Cycloconium*, œil de paon de l'olivier, contamination, fongicide.

SUMMARY

PROLIFERATION AND CONTROL OF THE CYCLOCONIMIC TAVELURE ON THE OLIVE LEAVES IN ALGERIA.

Olive peacock's eye is a disease caused by *Cycloconium oleaginum* Cast. of major economic importance in some regions of Algeria. The contamination rate varies from one site to another. It is very frequent in the province of Bejaia, Tizi-Ouzou, Sétif and Bouira but however, less frequent and rare in the province of Mascara, Oran and Relizane. Trials carried out in conditions of Sétif region with bordeaux mixture (1 per cent), copper oxychloride (0.3 per cent) and dithane (0.3 per cent) against *C. oleaginum* olives. It was demonstrated that bordeaux mixture (1 per cent) gave the best control and increased yield. In wet yet years, one spray in October 20th followed by one in December 29th gave the most efficient results while in dry year, only the first application was necessary.

Key words: *Cycloconium*- olive peacock's eye- contamination-fungicide.

INTRODUCTION:

L'olivier est un arbre caractéristique du paysage méditerranéen. Il est très cultivé en Algérie où il est considéré parmi les arbres les plus dignes d'intérêt. L'importance de la production oléicole en Algérie peut être illustrée par les 20 à 21 millions d'arbres qui occupent une superficie de 220.190 ha et produisent annuellement quelques 24.800 tonnes d'olives (Guéchi, 1990). Plusieurs auteurs soulignent la présence de tavelure au niveau des feuilles d'olivier dans les pays méditerranéens mais ne font aucune mention particulière de la présence de cette maladie en Algérie (Jaidi, 1968; Palti et al, 1949; Renaud, 1968).

La tavelure de *Olea europea* L. est due au champignon *C. oleaginum*. Les dégâts occasionnés par cette maladie se manifestent par une chute massive et précoce des feuilles. Il en résulte une réduction de la surface nécessaire à la photosynthèse ce qui influe sur la rigueur des arbres, leur floraison, et leur production de fruits (Guéchi et al, 1991; Wilson et Miller, 1949).

Les cultures intensives de l'olivier, le manque de taille, les terres basses mal aérées et les mauvaises herbes constituent un facteur favorisant l'évolution de la maladie

L'importance de la maladie et les dégâts provoqués par *C. oleaginum* Cast. diffèrent d'un pays à l'autre. En Egypte et au Maroc, cette maladie est considérée comme l'une des maladies les plus graves de l'olivier et cause parfois des pertes de production estimées à 20% (Jaidi, 1968; Renaud, 1968 ; Zayed et al, 1980).

En Algérie, les dégâts résultant de cette maladie sont très importants ce qui nécessite des traitements périodiques pour contrôler ce champignon ou du moins ralentir son développement (Guéchi, 1990 ; Guéchi et al, 1991).

MATERIEL ET METHODES

Dans le but de mettre en évidence la prolifération de la maladie de la tavelure sur l'olivier dans les différentes régions du pays, des enquêtes sur le terrain ont été effectuées au niveau des départements suivants : Béjaïa, Sétif, Skikda, Tizi-Ouzou, Boumerdes, Bouira, Blida, Ain Defla, Mostaganem, Chlef, Mascara, Oran et Relizane.

Une expérience a été menée durant la saison 2007-2008 sur un champ d'olivier de variété *Laedola* situé à Ammoucha (Sétif). Cette variété très sensible à la maladie de l'œil de paon et très répandue dans la région Est du pays a été soumise à l'action de quelques fongicides : bouillie bordelaise à 1 %, solution d'oxychlorure de cuivre à 0.3% et solution de dithane M45 à 0.3%. Dans un premier temps, les arbres ont été pulvérisés une seule fois (20 octobre 2007).

Dans un second temps, les arbres ont été pulvérisés deux fois (20 octobre 2007 et 29 décembre 2007). Chaque produit a été pulvérisé sur 4 arbres à raison de 5 litres de solution par arbre. La solution pulvérisée a été additionnée d'Agral à 0.3 % afin d'assurer une bonne diffusion du fongicide ainsi que son adhésion sur les feuilles. Les résultats ont été notés le 20 avril 2007 en récoltant 200 feuilles de façon aléatoire sur chaque arbre traité à une hauteur ne dépassant pas 2 à 3 mètres. Le taux de contamination ainsi que le nombre de tâches sur 100 feuilles ont été notés.

RESULTATS

En Algérie, la maladie provoque une réduction de la surface nécessaire à la photosynthèse, ce qui influe sur la vigueur des arbres, leur floraison et leur production des fruits. Cette maladie existe dans les différents départements du pays. Tableau I.

Tableau I : Répartition de la maladie de l'œil de paon des feuilles d'olivier dans les différents départements d'Algérie.

| Département | Site | Mois de Récolte | % de feuilles infectées |
|-------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| Béjaia | Darguina deux Fontaines | Avril 1998 | 48 |
| Béjaia | (Amredj) | Avril 1998 | 58 |
| Béjaia | (Aokas) | Avril 1998 | 56 |
| Sétif | (Amoucha) | Avril 1998 | 54 |
| Skikda | (Bouchaour) | Avril 1998 | 23 |
| Tizi-ouzou | (Draa-El-Mizane) | Avril 1998 | 61 |
| Boumerdes | (Boudoua-Souk-El Had) | Avril 1998 | 42 |
| Boumerdes | (Bordj-Meneil) | Avril 1998 | 02 |
| Bouira | (Lakhdaria) | Avril 1998 | 48 |
| Blida | (El-Madania) | Avril 1998 | 29 |
| Blida | (Bouarfa) | Juin 1998 | 36 |
| Ain-Defla | (Arrib) | Juin 1998 | 18 |
| Mostaganem | (Oued-El-Kebir) | Juin 1998 | 21 |
| Chlef | (Medina) | Juin 1998 | 19 |
| Mascara | (Mascara) | Juin 1998 | 0 |
| Relizane | (Relizane) | Juin 1998 | 0 |
| Oran | (Oran) | Juin 1998 | 0 |

Des études ont été effectuées afin d'envisager les moyens de lutte chimique les plus efficaces. Cependant les résultats sont variables et notamment en ce qui concerne les périodes et le nombre d'applications.

Il est possible de lutter contre la maladie avec la bouillie bordelaise, bouillie bordelaise à 1 %, solution d'oxychlorure de cuivre à 0.3% et solution de dithane M45 à 0.3 %.

Tableau II : Effets de quelques fongicides sur le traitement de la maladie de l'œil de paon.

| Fongicides (et nombre de pulvérisation utilisées) | % de feuilles contaminées | réduction du taux d'infection | Moyenne des tâches sur 100 feuilles | % de réduction nombre de tâches sur 100 feuilles |
|---|---------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| -Bouillie bordelaise | | | | |
| (1 pulvérisation) | 38 | 45 | 255 | 71.6 |
| (2 pulvérisations) | 32 | 54.3 | 167 | 81.3 |
| -Oxycloreure de cuivre | | | | |
| (1 pulvérisation) | 53 | 24.3 | 448 | 50.0 |
| (2 pulvérisations) | 46 | 34.3 | 356 | 60.2 |
| - Dithane M 45 | | | | |
| (1 pulvérisation) | 59 | 15.7 | 689 | 23.2 |
| (2 pulvérisations) | 55 | 21.4 | 937 | 28.98 |
| -Témoin | 40 | 0 | 897 | 0 |

DISCUSSION

Les résultats présentés dans le tableau I montrent que la maladie existe dans la plupart des différents départements visités. Le taux de contamination varie d'un site à l'autre. De façon générale, la contamination est très forte dans plusieurs sites du département de Béjaia où le taux varie de 48 à 58 %. La contamination est également forte dans le département de Tizi-Ouzou (commune de Draa El Mizane) avec un taux de 61 % , dans celui de Sétif (commune de Ammoucha) avec 54 % et de Bouira (commune de Lakhdaria) avec 48 %. En revanche, dans les autres départements visités, la contamination est relativement moins forte (18 à 36 %). L'infection est en particulier très rare à Boumerdes et aucune contamination n'est constatée dans les départements d'Oran, de Relizane et de Mascara, régions dans lesquelles les vergers d'olivier sont très bien entretenus et les intervalles entre les arbres de 10 à 20 mètres. De plus, les surfaces agricoles sont plates, assurant une bonne aération des arbres. La maladie n'a pas été observée dans la région Ouest du pays qui a reçu une faible pluviométrie au cours des 10 dernières années.

Il faut souligner également que les contaminations sont constatées près des oueds, dans des terrains encaissés, mal aérés et dans les régions à culture concentrée ou abandonnée. Ce phénomène est extrêmement net dans les départements de Béjaia, de Sétif et de Tizi-Ouzou. Les symptômes se manifestent dès le début du printemps depuis la mi-mars jusqu'au mois de mai par des tâches circulaires chlorotiques de 2 à 10 mm de diamètre à la face supérieure des feuilles comme cela a été reporté par Mijuskovic, 1968. Ces tâches vont commencer par se décolorer et se recouvrir d'un discret revêtement velouté puis vont ensuite se développer en tâches vert-foncé. Les tâches d'infection sont solitaires et minuscules au début de l'attaque et peu visibles. Ensuite, au fur et à mesure que la maladie progresse, les macules deviennent de plus en plus nombreuses au printemps et couvrent généralement une grande partie de la surface des feuilles, c'est à ce moment la période de formation intense des éléments de fructification. Les conidiophores et les conidies donnent un aspect cotonneux ou de duvet marron foncé. Les zones contaminées provoquent la formation de cercles concentriques de diverses couleurs d'où le nom de la maladie d'œil de paon donnée à cette affection par analogie avec les cercles concentriques diversement colorés des plumes de la queue du paon. L'allongement et le développement des tâches au cours des mois de mars, avril et début de mai sont suivis par le jaunissement des tissus des feuilles qui les entourent. Les feuilles tombent habituellement à la moindre secousse ou au moindre vent ou même sous leur propre poids après quelques mois de maladie. Ce sont les feuilles sévèrement contaminées qui chutent les premières au cours du mois de mai. Cette chute est maximale en juin. Les feuilles faiblement contaminées persistent sur l'arbre.

Le diamètre des tâches d'infection ne manifeste aucune augmentation au cours des mois d'été comme cela a été signalé par Miller, 1949. Les couleurs de ces tâches vont du gris au noir puis deviennent chlorotiques et dures. Le jaunissement des tissus des feuilles entourant les tâches est rare. Ces types de tâches sont généralement répandus à la fin du printemps. Les feuilles attaquées finissent par se dessécher de l'arbre à une époque où généralement l'olivier en a le plus besoin pour assimiler et fructifier comme dans notre champ d'expérimentation (Ammoucha). Guéchi et al, 1994 ont signalés que les feuilles des parties inférieures de l'olivier ne persistent souvent qu'une année au lieu de 2 ou 3 ans. Ce phénomène est du à la présence de conditions très favorables au développement de cette maladie, telles qu'une mauvaise aération, un branchage touffu peu ensoleillé, des arbres concentrés près d'un oued, un terrain encaissé et abandonné.

La détermination de toutes les périodes de contamination des feuilles est très importante pour adopter des mesures de contrôle efficaces. Toutefois, les résultats de plusieurs auteurs; (Guéchi, 1990 ; Jaidi, 1968; Miller, 1949; Zayed et al, 1980) indiquent que les périodes de nouvelles infections dépendent des conditions climatiques qui ne sont pas semblables chaque année dans une même région. Il est important de connaître la température optimale et l'humidité

relative de la production et de la germination des conidies. De ce fait, la période d'infection de nouvelles feuilles peut être envisagée en appliquant un traitement de contrôle en temps opportun.

Quant aux résultats présentés au tableau II, la bouillie bordelaise à 1% s'est révélée être le meilleur fongicide testé. Une seule pulvérisation avec cette solution provoque une réduction du taux de contamination des feuilles de 45 % et une réduction de 71,6 % du nombre de tâches sur 100 feuilles. Avec deux pulvérisations, son effet est encore meilleur, la réduction du taux de contamination des feuilles étant de 54,3 % et la réduction du nombre de tâches de 81,3 % sur 100 feuilles. Il ressort de ces résultats que la deuxième pulvérisation de la fin de décembre se manifeste par une réduction conséquente du taux d'infection.

Au cours de l'année de notre étude, l'humidité relative dans la région de Sétif pour les mois de septembre, octobre, et décembre a été de 50; 53.5 et 79 % respectivement. Ces résultats confirment ceux soulignés par Mijuskovic 1968 qui considère que la deuxième pulvérisation en fin de décembre est indispensable uniquement dans les années à forte pluviométrie. L'oxychlorure de cuivre à un effet nettement moindre : une seule pulvérisation a provoqué une réduction de taux de contamination des feuilles de 24, 3 % et du nombre de tâches de 50 % seulement alors que deux pulvérisations ont provoqué une réduction du taux des feuilles contaminées de 34,3% et du nombre de tâches de 60.2%. Par contre, l'effet de la solution de dithane M45 est faible. Ainsi avec deux pulvérisations, le taux de réduction de la contamination n'a pas dépassé 21,4 % et celui du nombre de tâches sur 100 feuilles n'ont pas dépassé 28,9 % ce qui est en accord avec les résultats de Zayed et al, (1980).

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Guéchi A., Abdelatif W.,1994 - Some biological characteristics of *Spilocaea oleaginea*, the causal agent of olive leaf spot. *Arab. J. Plant Protection*. 12 (2): 92-98.
- 2- Guéchi A., Abdelatif W., Girre L., 1991-Facteurs influençant la germination des conidies du champignon *Spilocaea oleaginea* agent de l'œil de paon de l'olivier. *Arab.J. Plant. Protection*. 9 (2) 88.94.
- 3- Guéchi A., Yahaoui R., Lukazova E., Girre L.,1991 - Mise en évidence d'un Métabolite secondaire substance A produite par *Cycloconium oleaginum* Champignon pathogène des feuilles d'olivier. *Rev. Uni. Sci. Technol. Université de Constantine* 2: 1-9.
- 4- Guéchi A., 1990 - Contribution à l'étude de quelques aspects de la biologie et de la chimie du *Cycloconium oleaginum* (Cast.) champignon parasite de l'olivier (*Olea europaea* L.). Thèse d'Université de Rennes I. 240 pp.
- 5- Guozdenovic F.,1901 - Report of the agricultural chemical experimental station in Spalato Ostrr. *Landw. Versuehsw. Ztsch.*,4, 254-272.
- 6- Jaidi A., 1968-Biological observations and trials on the control of olive leaf spot. *Al-Awamia*. 27, 41-50.
- 7- Mijuskovic M., 1968 - Contribution to the study of harmfulness and control of *Cycloconium oleaginum*, the causal agent of the peacock's eye of olive on the Adriatic coast of Montenegro. Sumary, 14, 1-29. *Int. Agr. Titograd, Yuggoslavia*.
- 8- Miller N.M.,1949 - Development of the leaf spot fungus in the olive leaf. *Phytopathology*. 49; 39; 403-410.
- 9- Palti J., Moeller S., Reichert I., 1949. Trials for the control of olive leaf spot. *Palestine J. Bot.* V 11 1-2, 167-173.
- 10- Renaud P., 1968-Ecologie de la maladie de l'Œil de paon et résistance variétale dans leurs incidences sur la culture de l'olivier .*Al-Awamia*, 26, 55-74.
- 11-Wilson E.E., Miller H.N., - 1949. Olive leaf spot and its control with flingicides *J. of Agr. Sci.*, 19-24.
- 12- Zayed M.A., El-Saied H.M.,Sawabi A.,Saeid S.,1980 - Reaction of olive cultivars to *Cycloconium oleaginum* Cast. and chemical control of olive leaf spot disease in Egypt, *Egypt.J.Phytopath.*, 12, 49-58.

PATHOLOGICAL AND GENETIC VARIABILITY AMONG ISOLATES OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CICERIS* CAUSING WILT OF CHICKPEA IN EGYPT

NOHER. A. MAHMOUD¹; ABDALLA, M. Y²; ABOU ATTIA, M. A¹ AND ABOU ZEID. N. M¹

1-Plant Pathology Res. Instit., ARC., Giza, Egypt.
2-Faculty of Environmental Agri. Scin., Suez Canal Univ.
Email: hadir1998@yahoo.com

SUMMARY

Ten isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*F.o.c.*) were isolated from infected chickpea plants collected from different Egyptian governorates. The tested isolates were proven to be pathogenic on Chickpea. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to assess genetic variability within the *Fusarium oxysporum* isolates, and used to determine the relationships between pathological characterization and molecular characterization. The genetic variation was evaluated with a set of 5 random-10 mer-primers to determine whether the tested isolates could be distinguished at the molecular level. No correlation between RAPD patterns and Pathogenicity of the tested isolates was found.

Key words: chickpea wilt, RAPD), molecular characterization, *Fusarium*.

INTRODUCTION

On a global basis chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the third most important pulse crop, only bean (*Phaseolus vulgaris* L.), and pea (*Pisum sativum* L.). The global production of bean, pea, chickpea and lentil has remained steady over the past 10 years at around 40 million tones per year. The percentage of total production for these crops in 2005-2006 was chickpea 21%, lentil 10%, pea 26% and bean 43%.

Chickpea is susceptible to a large number of biotic diseases. The two most important biotic diseases include *Ascochyta* blight caused by *Ascochyta rabiei* and *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Allen and Lenné 1998.). *Fusarium* wilt is a serious and wide spread disease of chickpea (*Cicer arietinum*) in all chickpea growing countries. It is reported to cause annual yield losses of about 10-15 percent. *Fusarium* wilt disease is both seed and soil borne. The causal fungus can survive in soil even in the absence of a host for more than three years. (Jalali and Chand 1992)

The disease can occur at all stages of plant growth with more incidence at flowering and podding stages, when temperature is high (>24°C) particularly under drought conditions killing more than 80 percent of the plants in some fields (Allen and Lenné 1998). Presently, eight pathogenic races for *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (0,1A, 1B/C, 2,3,4,5 and 6) have been identified by reaction on a set of differential chickpea cultivars. Races 0 and 1B/C cause yellowing symptoms and races 1A, 2,3,4,5 and 6 cause wilting symptoms. Races 2, 3 and 4 have been reported only in India (Haware and Nene, 1982). Races 0, 1B/C, 5 and 6 reported in (Lebanon, Morocco, Spain, Syria, Tunisia, Palestine, Turkey and California), race 1A reported in Lebanon, Morocco, Spain, Syria, Tunisia, Palestine, Turkey, California and India) (Jimenez-Gasco et al., 2001). Four Physiologic races (0, 2, 3 and 4) have been reported in Egypt from different governorates (Beheira, Ismailia, Giza and Alex.) (Abdel-Hadey, A. et al., 2000). Identification of pathogenic races has been mostly done by use of differential reaction to selected host genotypes. Several biotechnological tools like RAPD, RFLP and SSR have been increasingly used to study variability in pathogenic populations of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. (Jimenez-Gasco et al., 2003).

MATERIALS AND METHODS

• Isolation of the causal organism:

Diseased chickpea plants were collected from different Egyptian governorates (Giza, Beni-sweef, Assuit, Kafr-Elshikh, Sharkia, Gharbia and Behera). Roots and basal stems of diseased chickpea plants were washed carefully with running tap water to remove any adhering soil. All samples were cut into small pieces and surface sterilized by 0.5% sodium hypochlorite for 1-2 minutes, and washed twice in sterilized distilled water. They were then dried between two sterilized filter papers and directly plated on potato dextrose agar (PDA) media (250g of unpeeled potatoes, 20g of agar and 20g of dextrose), amended with streptomycin sulfate (150 ppm) to avoid bacterial contamination). Five pieces of plant were used per Petri dish, then incubated at 25°C for 7 days. The emerging fungi were isolated and purified on PDA plates, using single spore technique. (Abou-Zeid et al., 2002A). Each mono conidia culture of isolates were identified in the Unit of Identification using the BIOLOG™ system.

• Isolates Preservation.

Each monoconidial culture of *Fusarium oxysporum* isolates were stored in sterile 20% glycerol at -80°C and in sterile soil tubes at 4°C as well as in potato dextrose agar (PDA) slants at 5°C and deposited in the fungal collection Unit of Identification of Microorganisms, Plant Pathology Res., Inst., ARC., Giza, Egypt. (Woo et al., 1996; Balnce et al., 2006).

- **Pathogenicity tests for *Fusarium oxysporum* isolates:-**

- **Inoculum Preparation:-**

This experiment was done to determine the pathogenic potential of *Fusarium oxysporum* cultures isolated from diseased samples of chickpea plants. All *Fusarium oxysporum* isolates were tested against Giza 2 cultivar of chickpea (obtained from field crops Res. Inst., ARC., Giza, Egypt) to determine their pathological abilities using the following technique:-

A small agar disk cut from the edge of the colony growth (one week old culture grown on PDA) was transferred to a 500 ml bottle containing 150 g autoclaved sand – sorghum media (100 g of sorghum grains, 50 g of sand and 90 ml tap water incubated at 25°C for three weeks. Conidial suspensions were obtained by blending cultures of *Fusarium oxysporum* grown on sand- sorghum medium using sterile water and by filtration through three layers of cheese cloth. The suspensions were adjusted to a concentration of 10^6 conidia/ml using a haemocytometer slide .(Woo *et. al.*, 1996; Abou-zaid *et.al.*, 2002B).

The tested cultivar (Giza 2) was planted in autoclaved soil (at 121° C for 60 min for three continuous days) in 20 cm sterilized plastic pots with 10 seeds/pot of chickpea cultivar (Giza 2). Pots were sterilized by immersion in 5% formalin solution, ten days before use. Seeds were surface sterilized by immersion in 2% solution of sodium hypochlorite for three minutes and washed in distilled water before planting. The pots were kept under greenhouse conditions for 15 days. Pots were inoculated with 50 ml (10^6 spore/ml) of the previously prepared spore suspension for each pot. Three pots were used for each treatment as replicates. Data were recorded after 25 days from inoculation for early wilt and 60 days after inoculation for late wilt (Allen and Lenné 1998) and scored according to (Howare and Nene, 1982) as follows: R = Resistant (0-20 % infected plants), M= Moderately susceptible(21-50 % infected plants) S = Susceptible (>50% infected plants).

- **Molecular characterization with RAPD Technique:**

- **Mycelium production and DNA extraction:-**

Discs (5mm) taken from a 7 day old *Fusarium oxysporum* f sp ciceris culture grown on PDA medium, were transferred into 250 ml conical flasks containing 100 ml of potato dextrose broth and incubated at 25°C for 7 days. Growing mycelia were harvested by filtration through sterile cloth and washed with sterile deionized water and stored at -20 °C. DNA was extracted using freeze-dried ground mycelium (50 gm) and the DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN). DNA was then resuspended in sterile water and stored at -20°C. DNA concentration was estimated using a spectrophotometer and adjusted to 25 ng/ml in sterile water.

- **Polymerase chain reaction (PCR):**

Each reaction mixture (25µl) consisted of 1 µl (25 ng) of fungal DNA and 1µl (0.5 µM) of primer (the tested primers used in these RAPD reactions are shown in table (1) were added to the tablet PCR beads (manufactured by Amersham pharmacia Biotech) that contain all of the other necessary reagents for amplification reaction., the total volume was adjusted to 25 µl by adding sterile distilled water. Amplifications were performed in a thermalcycler (Biometra™, T-Gradient Thermoblock) at 94°C for 5 min for initial denaturation followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, Annealing at 37 °C for 1 min and Extension at 72 °C for 2 min with an elongation of final Extension at 72 °C for 10 min. Amplification products and 1kb molecular weight ladder (Fermentas, GeneRuler™) were separated by electrophoresis (Pharmacia Biotech™) on 1.5 % agarose gel(1.5 g agarose gel+100ml TAE buffer 1x) at 75 volt and 60 mA , then stained with ethidium bromide (0.5µg/ml) and visualized under UV light in gel documentation system (Uvitec™, Uvipro Platinum). The different molecular weights of bands were determined against a DNA standard (1kb) molecular weight ladder. (Bhim *et al.*, 2006).

Table 1: the tested primer used in these RAPD reactions.

| Primers No. | Sequences | |
|-------------|---------------------------|---|
| | 5 | 3 |
| 1 | [GTTTCGCTCC] [\] | |
| 2 | [GTAGACCCGT] [\] | |
| 3 | [AAGAGCCCGT] [\] | |
| 4 | [AACGCGCAAC] [\] | |
| 5 | [CCCGTCAGCA] [\] | |

RESULTS AND DISCUSSION

• Pathogenicity tests for *Fusarium oxysporum* isolates:

Wilt diseases can be differentiated from other root diseased by careful examination of the infected plants. Chickpea genotypes show different rates of symptom expression after infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and can be classified into early and late wilting categories on the basis of days from sowing or inoculation. Wilt can be observed in a susceptible cultivar within 25 days after sowing in infected soil or within 25 days after inoculation and this is known as early wilt (Haware and Nene, 1982). *Fusarium* wilt may also occur during reproductive growth or after 30-60 days after inoculation and is then known as late wilt (Allen and Lenné, 1998; Sharma *et al.*, 2004).

Ten pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Table 2) were isolated and evaluated on the highly susceptible chickpea cultivar (Giza 2) under favorable greenhouse conditions.

Results given in (Table 2), showed that all isolates were pathogenic to the tested cultivar at different levels. All tested isolates caused wilt symptoms on chickpea plants when compared with the check treatment. Isolate No. F4 (isolated from Sedes, Beni-Sweef) caused the highest percentage (92 %) of early wilt. While isolate No. F1 did not cause any early wilt to artificially inoculated plants. On the other hand in case of late wilt disease, isolate No. F1 (isolated from Giza) caused the highest percentage of late wilt (100 %), while isolate No. F4 caused the least percentage (8 %) of late wilt.

Based on the above mentioned results, tested isolates in this study were divided into two main groups according to their virulence. The first group included all isolates that caused high percentage of early wilted plants (F2 isolated from Giza, F3 isolated from Beni-Sweef, F4 isolated from Beni-Sweef, F6 isolated from Assiut, F7 isolated from Behera and F9 isolated from Sharkia) caused only foliar yellowing and drooping of leaves after 25 days of inoculation. The second group included isolates that caused high percentage of late wilted plants (after 60 days of inoculation) and consisted of two sub-groups, first sub-group included isolates No (F5 isolated from Beni-Sweef) caused foliar yellowing and drooping of the leaves in the upper part of plants and the lower leaves also become chlorotic. The second sub-group included Isolates No. (F1 isolated from Giza, F8 isolated from Behera and F10 isolated from Sakha) caused foliar yellowing and wilt. Obtained results (Table 2) indicated that there was no correlation between early or late wilt symptoms and geographical origin. These results were matched with those reported by other researcher (El-Morsy *et al.*, 1997, Abou Zeid, 1997 and Ismail 2007). The phenotypic difference among isolates may suggest that they could be classified into pathotypes or race groups (Jimenez-Diaz *et al.*, 1993). The prevalence of foliar yellowing more than wilting in Egyptian population of *F.o.c* isolates revealed the existence of more than one race of *F.o.c* in Egypt. These results are in consistence with those reported by (Halila and strange 1996 and Jimenez-Diaz *et al.*, 1993) who pointed out those races 0 and 1B/ C which included the yellowing syndrome are common in the Mediterranean region and have been reported in Syria, Tunisia and Turkey. (Allen, D. J. and Lenné, J. M. 1998).

- **Molecular characterization for *Fusarium oxysporum* isolates:**

Genetic variability for all *F. o. c* isolates was determined, using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, to ascertain if the genetic and pathogenic characterization of *F.o.c* isolates was correlated. Five primers (fig. 1- 5) were used to characterization of all tested isolates. All isolates were successfully amplified with all primer (fig. 1- 4) except primer No. 5 (fig. 5): eight isolates out of ten showed amplification with this primer.

With the exception of isolates No. F7 and F8. All the remaining isolates clustered into tow main groups in the dendrogram generated from the data obtained with Primer 5 and using UPGMA clustering method (fig. 6) (produced by using gel decommentation software UV mab)

Table 2: Pathogenicity test of *Fusarium oxysporum* isolates on chickpea cv. Giza 1 under greenhouse condition.

| Isolates NO. | Geographic origin | Wilted plant % | |
|------------------------|--------------------------|---|--|
| | | Early wilt (%) 25 days after inoculation | Late wilt (%) 60 days after inoculation |
| F1 | Giza | - | 100 |
| F2 | Giza | 78 | 22 |
| F3 | Beni-Sweef | 65 | 35 |
| F4 | Beni-Sweef | 92 | 8 |
| F5 | Beni-Sweef | 30 | 70 |
| F6 | Assiut (Koseia) | 57 | 43 |
| F7 | Gharbia (Gemeiza) | 56 | 44 |
| F8 | Behera (Etai El-barood) | 30 | 70 |
| F9 | Sharkia (Kafer Sakr) | 75 | 25 |
| F10 | Kafer El-Shikh (sakha) | 28 | 72 |
| LSD (5%) = 7.9 | | | |

The first main group divided into tow sub- groups. The first sub- group included one isolate was isolate No. F1 (isolated from Giza). The second sub-group divided into tow parts, the first one included isolates No. F3(isolated from Beni-Sweef) and F5 (isolated from Beni-Sweef) with similarity 62%. The second part included isolates No. F9 (isolated from Sharkia) and F10 (isolated from Kafer El-Shikh) with similarity 100 %. The second main group divided into tow sub- groups. The first sub- group included isolates No. F2 (isolated from Giza) and F6 (isolated from Assiut) with similarity 54 %. The second sub-group included one isolate was isolate No. F4 (isolated from Beni- Sweef) only.

Based on the above mentioned results, all isolates were classified into groups based on their DNA banding patterns except isolates No. and F7 (isolated from Qharbia) and F8 (isolated from Behera) because theses isolates not amplified with this primer.

Cluster analysis dendrogram using SPSS software (fig. 7) show that all isolates with five primers separated into two main groups: The first main group divided into tow sub-group. The first sub- group included isolates no. F1 (isolated from Giza) only. The second sub-group divided into tow sub- sub- group. The first sub sub group included: isolates No. F2 (isolated from Giza) and F6 (isolated from Assiut), isolates No. F7 (isolated from Gharbia) and F8 (isolated from Behera). The second sub- sub group: included isolates No. F3 (isolated from Beni-Sweef), F9(isolated from Sharkia) , F5 (isolated from Beni- Sweef) and F10 (isolated from Kafer El-Shikh). The second main group included only one isolate was isolate NO. F4 (isolated from Beni- Sweef). Base of Cluster analysis of both RAPD data for all primer with together indicated that no correlation between RAPD patterns and Pathogenicity characterization. These results were in harmony with those recorded by Ismail (2007) who found not a clear relationship between the results of molecular analysis and the Pathogenicity tests for *F.oxysporum* f. sp. *ciceris* especially for Egyptian isolates but not for

the Syrian isolates. Woo *et al.*, (1996) who found not a clear relationship between the results of molecular analysis and the Pathogenicity tests for *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates and the same results founded by Namiki *et al.*, (1998) and Zamani *et al.*, (2004) .

Who found no correlation between RAPD patterns and virulence or geographic origin within Japanese populations of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* or among 15 Iranian isolates of *F. o. c* respectively. The base of the mention results the study suggest that the Egyptian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* contain pathogenic variation not distinguished by DNA fingerprint. RAPD analysis was very useful in analyzing and assessing the diversity of these pathogen isolates, in addition to contributing to the understanding of this casual pathogen and improving crop productivity.

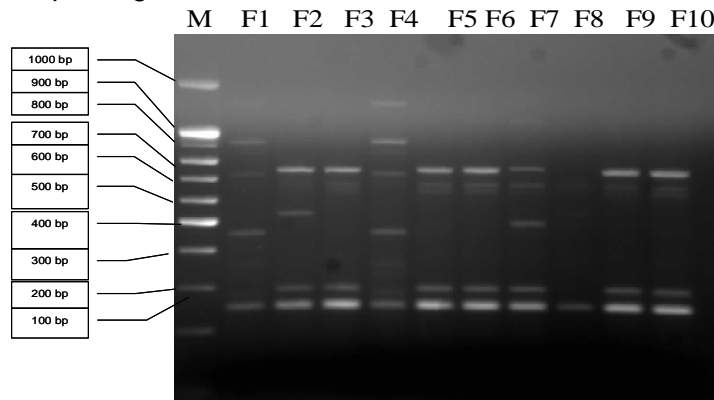


Fig. 1: Representative RAPD profile for 10 *F. oxysporum* f sp *ciceris* isolates. Amplification of the genomic DNA was performed using primer No.1. Lane1= 1kb marker(M), lane 2-11 (*Fusarium oxysporum* isolates).

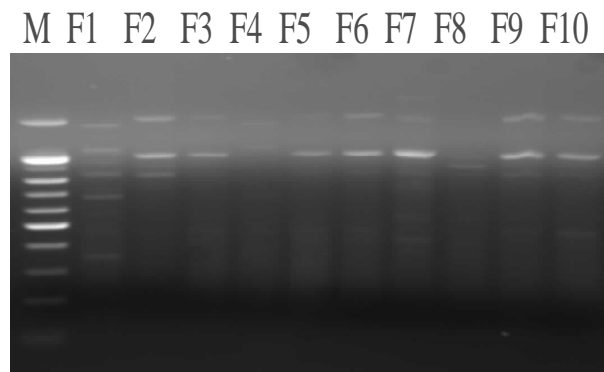


Fig. 2: Representative RAPD profile for 10 *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates. Amplification of the genomic DNA was performed using primer No.2. Lane1= 1kb marker (M), lane 2-11 (*Fusarium oxysporum* isolates).

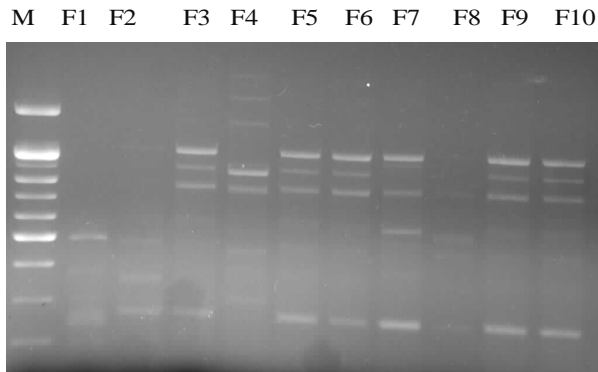


Fig.3: Representative RAPD profile for 10 *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates. Amplification of the genomic DNA was performed using primer No.2. Lane1= 1kb marker (M), lane 2-11 (*Fusarium oxysporum* isolates).

In further studies we are needed to make complementary studies between pathological and molecular characterization for more understanding to biodiversity of causal pathogen, these information can help us to produce resistant cultivars for all structures of the pathogen population.

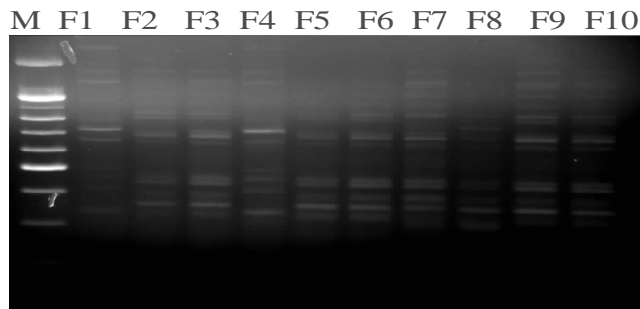


Fig.4: Representative RAPD profile for 10 *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates. Amplification of the genomic DNA was performed using primer No.4. Lane1= 1kb marker (M), lane 2-11 (*Fusarium oxysporum* isolates).

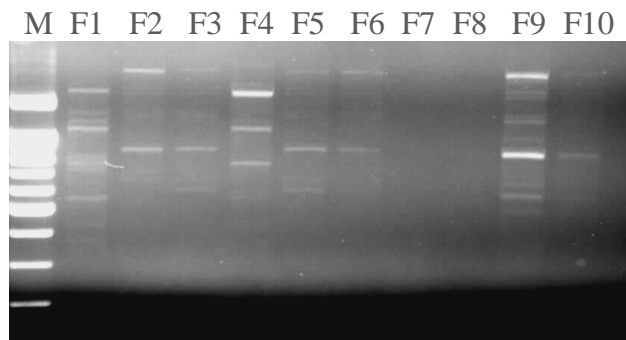


Fig.5: Representative RAPD profile for 10 *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates. Amplification of the genomic DNA was performed using primer No.5. Lane1= 1kb marker (M), lane 2-11 (*Fusarium oxysporum* isolates).

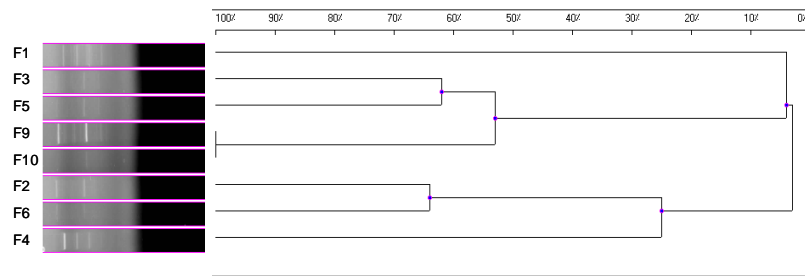


Fig. 6: Dendrogram of ten isolates of *Fusarium oxysporum* f sp *ciceris* with primer 5 based on polymorphism of RAPD marker.

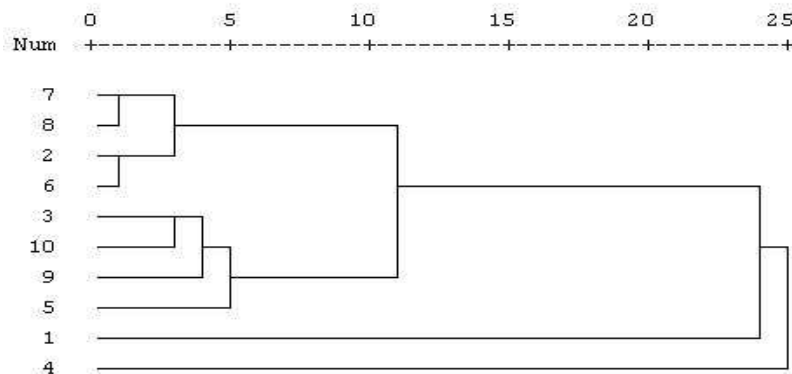


Fig. 7: Dendrogram of ten isolates of *Fusarium oxysporum* f sp *ciceris* with all five primers based on polymorphism of RAPD marker.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to staff members of Unit of Identification of Microorganisms and Biological Control, Plant Path. Res. Institut., ARC. Particularly **Dr. Ahmed Beshar** for his sincere cooperation in DNA extraction and Polymerase chain reaction that made this work possible. This research was supported and funded by the Biological Control of Chocolate Spot Disease on Faba Bean Project (A. R. C.).

REFERENCE

- Abdel-Hadey A., Omar S. A., Omar M. R., (2000) - Separation of four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by protein electrophoresis. *Minufiya J. Agric. Res.*, 25,13-20.
- Abou-Zeid N. M., Halila H., Sohir k., (2002 A) - Screening chickpea entries and cultivar for resistance to *Fusarium* wilt under greenhouse conditions. Nile Valley and Red Sea, International Center for Agricultural research in Dry Areas. ICARDA, Cairo, Egypt.
- Abou-Zeid N. M., Halila, H., Khalil, M. S., (2002 B) - Characterization by RAPD-PCR of races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* infecting chickpea. Disease resistance in plant pathology. Proceedings of the 6th Conference of European Foundation for Plant Pathology, Prague, Czech Republic, 8-14 September 2002. *Plant-Protection-Science*. 38,2, 297-301.
- Abou-Zeid N. M., Hassanein, A. M., Arafa M. K., (1997) - Survey and identification of major organisms causing wilt/ root – rot diseases and their relative importance in faba bean, lentil and chickpea in Egypt. Nile valley and red sea regional program on cool season food legumes and cereals, Annual report (1996/1997).
- Allen D. J., Lenné J. M., (1998) - The pathology of food and pasture legumes: Diseases of chickpea. CAB International, Wallingford, UK., 473- 515.
- Bhim, P., Singh R., Saikia M., Yadav R., Singh V. S., Chauhan, Dilip K., A., (2006) - Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f sp *ciceri* causing wilt of chickpea. *African Journal of Biotechnology*, 5, 6, 497-502.

- Blanca B., Landa Juan A. N., María d., Jiménez-Gasco, Jaacov K., Baruch R., Rafael M. J., (2006) - Temperature Response of Chickpea Cultivars to Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, Causal Agent of Fusarium Wilt. *Plant Disease J.*, 90, 3, 365-374.
- El-Morsy G. A., Abou-Zeid N. M., Hassanein A. M., (1997) - Race identification and pathogen variability of *Fusarium oxysporum* the causal pathogen of wilt disease in faba bean, lentil and chickpea crops. Nile valley and red sea regional program on cool season food legumes and cereals, Annual report (1996/1997).
- Halila M. H., Strange R. N., (1996) - Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *phytopathol. Mediterr.*, 35, 67- 74.
- Haware M. P., Nene Y. L., (1982) - Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease J.*, 66, 9, 800-810.
- Jalali B. L., Chand H., (1992) - Chickpea wilt: Diseases of cereals and pulses, Singh U.S.; Mukhopadhyay, A. N.; Kumar, J. and Chaube, H. S. (eds). Prentice Hall, Englewood Cliffs, Nj., 420-444.
- Jimenez-Gasco M. M., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R. M., Del-M-Jimenez-Gasco, M., (2001) - Identification of pathogenic races 0,1B/C,5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD).*Eur.J.Plant Pathology*, 107, :237-248.
- Jimenez-Gasco M., Del M., Jimenez-Diaz R. M., (2003) - Development of a specific polymerase chain reaction based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0,1A,5 and 6. *Phytopathology J.*, 93, 2, :200-209.
- Ismail M. A., (2007) - Pathological, biochemical and molecular studies on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of chickpea wilt. Ph.D. thesis Faculty of Agriculture, Cairo Univ. Cairo, Egypt, 55 pp.
- Jimenez-Diaz R. M., Crino P., Halila M. H., Mosconi C., Trapero-Casas A. T., Singh K. B., and Saxena, M.C. (1993). Screening for resistance to *Fusarium* wilt and *Ascochyta* blight in chickpea. *Breeding for stress tolerance in cool season food legumes*, 77-95.
- Woo S. L., Zoina A., Del-Sorbo G., Lorito M., Nanni B., Scala F., Noviello C., (1996) - Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD. *Phytopathology J.*, 86, 966-973.
- Namiki F., Shiomi T., Nishi K., Koyamura T., Tsuge T., (1998) - Pathogenic and genetic variation in the Japanese strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology J.*, 88, 804-810.
- Sharma K. D., Winter P., Kahl G., Muehlbauer F.J., (2004) - Molecular mapping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 3 resistance gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics J.*, 108, 7, 1243-1248.
- Zamani M. R., Motallebi M., Rostamian A., (2004) - Characterization of Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of RAPD analysis, virulence and vegetative compatibility. *Phytopathology J.*, 152, 8/9, 449-453.

LE MILDIOU DE L'ARTICHAUT : ÉTAT DES LIEUX DE NOS CONNAISSANCES

C. MONOT⁽¹⁾, G. BARBEYRON⁽¹⁾, M.-C. CARRARA⁽¹⁾, S. HALLIER⁽¹⁾, S. BOURY⁽¹⁾,
N. MEZENECV⁽²⁾ et J.-M. COLLET⁽³⁾

⁽¹⁾ Bretagne Biotechnologie Végétale, 29250 Saint Pol de Léon, France, monot@bbv.fr

⁽²⁾ Chambre d'Agriculture du Finistère, Kergompez 29250 Saint Pol-de-Léon, France,
nicolas.mezenecv@finistere.chambagri.fr

⁽³⁾ Comité d'Action Technique et Economique CTIFL/CATE, Vézendoquet, 29250 Saint Pol-de-Léon, France, jean-michel.collet@cate.fr

RÉSUMÉ

Le mildiou est l'une des principales maladies qui affectent l'artichaut en Bretagne mais il est très peu présent dans le reste du monde. C'est pourquoi, un projet d'étude a été initié depuis quelques années, dans le but de mieux connaître ce pathogène. En se basant sur les connaissances publiées sur le mildiou de la laitue, les conditions d'infestation ont pu être recréées dans nos salles de culture. Des souches ont alors été collectées en Bretagne, sur différentes variétés d'artichaut et de cardon. Le protocole d'infestation est maîtrisé sur jeune plante entière, et une mise au point sur disques foliaires est également en cours. Ces tests permettront en particulier de déterminer la durée du cycle du mildiou en fonction des conditions climatiques. Des essais de protection par l'évaluation de l'efficacité de produits sur plants d'artichaut peuvent également être entrepris. Par ailleurs, des travaux ont été menés pour caractériser les souches de mildiou de l'artichaut par les techniques de biologie moléculaire et ainsi vérifier qu'il s'agit bien d'un *Bremia lactucae*, inféodé à l'artichaut.

Mots-clés : *Bremia lactucae*, cycle, marqueur moléculaire, laitue, symptôme

SUMMARY

REPORT OF OUR KNOWLEDGE ON DOWNY MILDEW OF ARTICHOKE

Downy mildew (*Bremia lactucae*) is the main disease of artichoke cultures in Brittany. Because this disease is rare in the rest of the world, only few teams work on this subject. It's the reason why a study program was initiated. The aim of this project is to improve our knowledge on the *Bremia lactucae*, pathogen of artichoke. Forty isolates of *Bremia lactucae* were collected in all Brittany region, on different varieties of artichokes and cardoon. Isolates of *Bremia lactucae* of artichoke and lettuce were characterised and compared with molecular techniques. Based on the publications on *B. lactucae* on lettuce, we identified suitable conditions for downy mildew infection in our growth chambers. The method of inoculation of entire young plants of artichoke is now set up. A second test on foliar disk is already on trail. These tests will help, on one side, to evaluate the life cycle of *Bremia lactucae* of artichoke, and, on the other side, to evaluate the efficiency of phytosanitary products, conventional chemicals or alternative products.

Keywords: *Bremia lactucae*, biology, molecular marker, lettuce, symptom

INTRODUCTION

Downy mildews are common diseases in the world, affecting many different crops. Downy mildew of artichoke is not very well known, even if it was described in Argentina on commercial varieties in 1999 (Carranza *et al*, 2001). It is, though, economically important in the North of Finistere and, in a larger extend, in Brittany. Because of suitable climate conditions of this area, downy mildew is commonly observed. While there are many literature studies in international revues concerning *Bremia lactucae* of lettuce, only few articles concern *Bremia lactucae* of artichoke. The purpose of this study is to improve our knowledge on the biology of *B.lactucae* of artichoke and to compare, by molecular markers, strains of *Bremia lactucae* coming from artichoke with strains of *B.lactucae* coming from lettuce.

MATERIALS AND METHODS

COLLECTION OF ISOLATES AND PLANT MATERIAL FOR MOLECULAR STUDY

Collection of 23 isolates of *B. lactucae* was built up from different varieties of artichokes (Camus, Castel or Petit Violet de Provence) and cardoons grown in Brittany and in Spain between 2004 and 2008. Isolates came from infested heads or leaves. 4 isolates from our collection of *B.lactucae* of lettuce were used as controls. Spores of each isolate were produced on 2 or 3-weeks-old "Gros Vert de Laon" (Voltz) plantlets for artichoke and cardoon or on 7-days-old "Campionas" seedlings (Rijk Zwaan) for lettuce. Plantlets and seedlings were all grown in greenhouse.

Other artichoke fungal pathogens were studied: *Fusarium oxysporum*, *Mucorale*, *Aschochyta Hortorum*, *Botrytis allii*. They were grown on potato dextrose agar medium. For the leaf-disk assay, disks were removed from mature leaves of artichokes. They were rinsed twice in sterile distilled water. Disks were then placed in Petri dishes with the upper side on agar surface (agar 1%, Benzimidazole 50 mg/L-Sigma).

INOCULUM PREPARATION AND INOCULATION OF PLANTS / LEAF DISKS

Spores were washed off by checking sporulating cotyledons or sporulating young leaves in sterile distilled water. The conidial suspension was adjusted to 2×10^4 spores mL⁻¹ after counting with a hema-cytometer.

Plants, placed in propagators were inoculated by spraying 0.5 ml/ plant of a spore suspension for artichoke or 0.25 mL/ plant for lettuce. Each leaf-disk of artichoke was inoculated with droplets of a suspension of spores (100µL per disk).

After inoculation, propagators and Petri dishes were placed in a growth chamber in the dark for at least 8 h, then under a 12h photoperiod (18°C day/ 15°C night). After 7 to 10 days, downy mildew appears on cotyledons, first leaves or leaf-disks.

RAPD AMPLIFICATIONS

The 23 *B. lactucae* isolates from artichoke plants and the 4 *B. lactucae* isolates from lettuce were produced as described in "inoculum preparation". Then the conidia suspension was concentrated by centrifugation (15mn / 1,200 r/mn) and subsampled fractions prepared in sterile distilled water and stored at -20°C.

100 mg of DNA samples of each fungal mycelium or 400,000 conidia from *B. lactucae* isolates were extracted using nucleospin plant kit (Macherey Nagel). After maceration in liquid nitrogen, the cells were grounded with a tungsten bead in the grinder Rescht (30 rtp/mn- 3 minutes- twice). DNA samples were eluted in 100µL buffer CE.

Each amplification reaction mixture contained: 0.7µL DNA, 0.5µM primer OPERON, 1X PCR buffer Bioline, 2%Blotto, 1.5mM MgCl₂ Bioline, 0.03U/µL taq DNA Polymerase Bioline, in a final volume of 15 µL. Amplification was performed in a PTC 100MJ research according to the following amplification program: (94°C/3mn; 94° C/30s; 35°C/45s; 72°C/1mn30s) x 45cycles followed by 72°C during 5 mn. Each reactio n sample was run on a 1.4% agarose

gel (Eurobio), in 0.5X TBE, 130 Volts for 2h30mn using 1Kb ladder (Invitrogen) as molecular size marker.

DNAs were amplified using 30 RAPD X 2 primers.

ITS2 SEQUENCING

In fungal genomes, the highly conserved rRNA genes are separated by two less conserved internal transcribed regions: the internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1, ITS2). They are suitable for polymorphism studies among species.

Each amplification reaction mixture contained: 0,7 µL DNA; 0,4µM each primer, 1X PCR Buffer Bioline; 1,5mM MgCl₂ Bioline, 0,03U/µL taq DNA polymerase Bioline, (final volume of 15 µL). Amplification was performed in a PTC 100MJ Recherche according to the following amplification program: (95°C /5mn; 95°C /1 mn; 54°C /1mn; 72°C; 2mn) x 35 cycles; 72°C /4 mn. Each reaction sample was run on 1,4% agarose gel (Eurobio) in 0,5X TBE ,130Volts for 2h30mn using 1Kb ladder (Invitrogen) as molecular size mark. In order to sequence PCR fragment, after ethidium bromide staining the selected band was extracted with a sterile scalpel and purified with the Nucleospin extract kit (Macherey Nagel).The purified product was sequenced by MWG Eurofins.

Sequences were compared using Blast with NCBI data base.

SPECIFIC MARKERS OF *B. LACTUCAE* FROM ARTICHOKE BY SCAR

Two RAPD markers were transformed to create specific markers of *B. lactucae* from artichoke. After cloning and sequencing RAPD markers, longer primers (20pb) could be designed to specifically amplify the sequence characterized and amplified region (SCAR).

In order to sequence the RAPD markers, after ethidium bromide staining, selected band was picked up with a tip and amplified with the same RAPD primers.

The band was extracted with a sterile scalpel and purified with the nucleospin extract kit (Macherey Nagel). The purified product was cloned using Ta cloning Kit (Invitrogen) (vecteur pCR 2.1) and sequenced by MWG Eurofins.

SEQUENCES OF DIFFERENT PRIMERS USED IN THE STUDY

ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

PpITS2F: 5'- AAGCGTGACGATACTAATTTG-3'

ITS2: 5' –GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

ITS5 / 5 –GGAAGTAAAAGTCGTAACG-3'

RESULTS AND DISCUSSION

SYMPTOMS

Symptoms on leaves come first with yellowish spots which become brownish on the upper side of the leaves. On the lower side, we can observe white sporulations. Concerning artichoke heads, downy mildew grows in the internal bracts. Grey/purple colorations appear on the external bracts. Symptoms of white mildew can then happen in case of high hygrometry.

The disease development can lead to a plant defoliation and then to its weakening, ending with harvest losses. Infected heads are not marketable, and become openings to other secondary pathogens such as *Ascochyta* or *Botrytis*.

White sporulations of downy mildew are sometimes confused with powdery mildew.

SET UP OF DISEASE INFECTION IN LABORATORY CONDITIONS

Downy mildew is an obligate pathogen, unable to grow away from its host plant. Optimisation of growth chamber conditions, as described in « material and method », leads to a laboratory artificial inoculation test on young plants. This test enables us to reproduce, in controlled conditions, field symptoms at an early state of the plant. In order to have a non-destructive test, the inoculation of leaf disk was developed. The protocol described by Agnola *et al* , 2003, was adapted to our experiments. The phase of disinfection with 3% calcium hypochloride solution was not necessary in our conditions, presumably due to the fact that plants were grown in greenhouse, being therefore relatively clean. Evaluation of disease development was assessed by using a scale corresponding to visible symptoms on the two faces of the cotyledons and the leaves.

COMPARISON OF ISOLATES FROM ARTICHOKE AND LETTUCE

In the first part of the study, we compared RAPD patterns of our *Bremia lactucae* collection. The 23 RAPD patterns obtained from artichoke isolates were very similar, likewise for the 4 RAPD patterns from lettuce isolates.

The DNA fingerprintings of the two groups were always very different. These results showed that *B. lactucae* isolated from artichoke is genetically distinct from *B. lactucae* isolated from lettuce.

In their work on phylogenetic relationships of downy mildew pathogens, Voglmayr *et al*., 2004, analysed the nuclear large subunit region (LSU). Their results lead to a similar conclusion: *Bremia lactucae* isolated from *Lactuca sativa* belongs to a different clade than *Bremia lactucae* isolated from the genus *Carduus*.

Amplification of the ITS1 spacer showed no difference between isolates from the two hosts, artichoke and lettuce. The amplification using the combination of two primers (ITS2, ITS5) revealed a common PCR product of 320 bp for all the samples of *B. lactucae*. ITS2 region was amplified with the two following primers: ITS3, ITS4. The PCR product of this amplification was a band of 2136 pb.

The primer PpITS2F is an internal primer of this spacer, developed for specific amplification of *Peronospora parasitica* (Casimiro *et al*., 2004). When we used the combination of primer: PpITS2,ITS4, we observed a band of 1,438 bp for *B. lactucae* from lettuce and two bands of 220 pb and 750 pb for *B. lactucae* from artichoke.

In conclusion, the sequencing of ITS2 spacer of *B. lactucae* from artichoke showed strong homology with the sequence of ITS2 spacer of *B. lactucae* from lettuce, confirming that *B.lactucae* from artichoke and *B.lactucae* from lettuce belong to the same specie.

The fungus isolated from artichoke is a *Bremia lactucae* but belongs to a distinct clade of *bremia lactucae* than the fungus hosting the lettuce.

SPECIFIC MARKERS OF B. LACTUCAE FROM ARTICHOKE BY SCAR

Two RAPD markers were transformed to create specific markers of *B. lactucae* from artichoke. Those markers will allow the distinction of the two clades.

LITERATURE CITED

Agnola, B., Boury, S., Monot, C., Quillévéré, A., Hervé, Y. and Silué, D. 2003. Evidence that a leaf-disk test allows assessment of isolate-specific resistance in *Brassica oleracea* crops against downy mildew (*Peronospora parasitica*). *European Journal of Plant Pathology*, 109, 471-478.

Carranza, M., Larran, S. and Alippi, H. 2001. First report of artichoke downy mildew caused by *bremia lactucae* in Argentina. *Plant Disease*, ,85, 446.

Casimiro, S., Mour, M., Zé-Zé, L., Tenreiro, R. and Monteiro, A. A. 2004. Internal transcribed spacer 2 amplicon as molecular marker for identification of *Peronospora parasitica* (crucifer downy mildew). *Journal of Applied Microbiology*, 96, 579:587.

Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiss, M. and Oberwinkler, F. 2004. Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 108, 1011-1024.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge for financial support the Conseil régional de Bretagne, the Conseil général du Finistère, the Cerafel, the OBS and Viniflor. Special thanks to M. Polman for her valued commitment in the setting up of the laboratory test.

**PEPEIRA: UNE ANALYSE DE RISQUE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE
DU PEPINO (PEPMV)**

X. TASSUS⁽¹⁾, R. VAN DER VLUGT⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire national de la protection des végétaux, 7 rue Jean Dixmèras, 49044 ANGERS
cedex 01, France, xavier.tassus@agriculture.gouv.fr

⁽²⁾ Plant Research International B.V., P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands,
email: Rene.vanderVlugt@wur.nl

RÉSUMÉ

Le virus de la mosaïque du pépino (PepMV) pourrait causer des pertes économiques importantes sur culture de tomate en Europe. Pour cette raison, le comité permanent phytosanitaire de la commission européenne par décision, a classé cet organisme de quarantaine sur semences, et a demandé la réalisation d'une analyse de risque phytosanitaire. Le projet PEPEIRA a ainsi été initié afin d'acquérir les données nécessaires à la réalisation de ce travail.

Mots-clés : PEPEIRA, PepMV, Virus, ARP, tomate

SUMMARY

PEPEIRA : A EUROPEAN PEST RISK ANALYSIS FOR PEPINO MOSAIC VIRUS (PEPMV)

Pepino mosaic virus would induce economical losses on tomato crops in Europe. For this reason permanent phytosanitary committee of the european commission by decision class this virus like a quarantine pest on seeds and ask for a pest risk analysis. In this way, the PEPEIRA project has been initiated for working on missing datas.

Key words: PEPEIRA, PepMV, Virus, PRA, tomato

INTRODUCTION

Le virus de la mosaïque du pépino connu jusqu'à lors pour un être un nouveau virus causant peu de dommage, est devenu depuis un problème majeur pour l'industrie de la tomate.

Des instituts de recherche ont pu montrer l'apparition de nouvelles souches du PepMV qui peu à peu sont retrouvées à travers le monde. La présence de ces nouveaux variants a déjà été reportée dans plusieurs pays européens.

Au sein de l'Europe, le réel danger représenté par le PepMV est en cours de discussion. C'est pour cette raison que la Commission Européenne, qui décide du statut de quarantaine des maladies des plantes, a demandé la réalisation d'une analyse de risque phytosanitaire (ARP). Pour répondre à cette demande, un projet nommé PEPEIRA a été initié. Il est financé par le sixième programme cadre de l'UE (FP6). Ce projet implique 20 partenaires de 17 pays européens.

LE PROJET DE RECHERCHE

PEPEIRA a débuté le 1er février 2007 et s'achèvera à la fin du mois de janvier 2010. L'ensemble des partenaires a pu faire état des avancés du projet au cours de 3 réunions qui se sont successivement tenues à Wageningen (Pays-Bas), Valence (Espagne) et Larnaca (Chypre).

Les objectifs de recherche

Sont de:

- Déterminer de façon précise les dommages causés par le virus sur les plants et les fruits de tomate ainsi que sur le rendement de production en culture sous différentes conditions climatiques (Pays-Bas, Royaume-Unie, Espagne et Hongrie).
- Identifier le danger d'introduction de nouvelles souches du PepMV sur tomate mais également sur d'autres espèces végétales.
- Evaluer le taux de transmission du PepMV de la semence à la plantule.
- Identifier les différentes souches du PepMV présentes en Europe.
- Décider quelles méthodes et techniques sont les plus adaptées à la détection et l'identification du PepMV
- Créer un modèle économique afin de prédire et déterminer les dommages causés par le virus dans différents pays européens

Un premier bilan des actions en cours

Les essais au champ en Hongrie sont terminés et les essais conduits en Espagne, au Royaume-Unie et aux Pays-Bas sont en cours. L'essai d'étude de la transmission du PepMV de la semence à la plantule est terminé et un taux moyen de 0,026% a pu être évalué (www.pepeira.wur.nl). Un essai inter-laboratoire dans lequel est impliqué le LNPV sera menée d'ici la fin de l'année 2009 afin d'évaluer les différentes techniques employées pour détecter le PepMV.

CONCLUSION : ANALYSE DE RISQUE PHTOSANITAIRE

Le projet PEPEIRA devrait fournir des éléments permettant de mieux appréhender l'épidémiologie et l'impact économique du PepMV dans l'Union Européenne. A partir de ces données, une analyse de risque sera réalisée au sein du consortium qui devra servir de base aux futures décisions prises concernant le statut réglementaire de ce virus dans l'Union Européenne.

**ENDOPHYTIC MYCOFLORA OF ATLAS CEDAR (*CEDRUS ATLANTICA*
MAN.) IN BELEZMA MASSIF (AURES, ALGERIA)**

D. HARZALLAH ⁽¹⁾, O. A. BENSSACI ⁽²⁾ and S. BOUHARATI ⁽¹⁾

^(1,3) Faculté des sciences, département de biologie, Université Ferhat
Abbas, Sétif, 19000,

⁽²⁾ Faculté des sciences, département d'Agronomie, Université El-
Hadj Lakhdar, Batna, 05000, Algérie. harzaldaoud@yahoo.co.uk

SUMMARY

Endophytic fungi were detected, isolated and collected from needles of Atlas cedar (*Cedrus atlantica* Man.), from three separated locations in Belezma massif (Aurès, Algeria). More than 20 fungal genera were obtained. The range of fungal taxa is dominated by Mitosporic group. The lower endophyte diversity in BOUMERZOUG site is eventually related to the degraded physiological status of Cedrus as a result of forest decline phenomena occurred recently in Belezma forests. The composition of studied fungal endophytes in *Cedrus atlantica* is mostly represented by some common genera such as *Lophodermium*, which is common in conifers. The genera *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium* and *Phomopsis* were potential pathogens, while the presence of entomopathogenic fungus *Beauveria* is a sign of a probably protecting roles against phytophagous insects in sampled trees.

Key words: Endophytic fungi , *Cedrus atlantica*, Bélezma, colonization frequency, biodiversity

RÉSUMÉ

**LA MYCOFLORE ENDOPHYTE DU CÈDRE DE L'ATLAS (*CEDRUS ATLANTICA* MAN.)
DANS LE MASSIF DE BELEZMA (AURÈS, ALGÉRIE)**

Les champignons endophytes ont été détectés et isolés à partir de la trame foliaire de cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Man.) au niveau de trois sites du massif de Bélezma (Aurès, Algérie). Plus de 20 mycotaxons endophytes ont été identifiés, dont la grande part taxinomique est prédominée par le groupe des champignons Mitosporiques. La diversité peu signifiante des mycoendophytes au niveau de la station de Boumerzoug est attribuée éventuellement aux conditions phytosanitaires de la cédraie majoritairement affectée par le phénomène de Dépérissement que connaissent les peuplements de cèdre dans le Bélezma. La composition de la mycoflore endophyte étudiée chez le cèdre de l'Atlas exhibe certains Genres communs tels que, *Lophodermium*, lié aux Conifères. D'autres genres ; *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium* et *Phomopsis* sont considérés potentiellement pathogènes. La présence de *Beauveria* à confirme le switch du comportement trophique de certains champignons endophytes.

Mots-clés : Champignon endophyte, *Cedrus atlantica*, Bélezma, fréquence de colonisation, biodiversité.

INTRODUCTION

Endophytic fungi form an ecologically important component of mycobiota in forest ecosystems. This fungal group plays important roles in forestlands diversity and functions (Stone *et al.*, 1996). They contribute by several ways in plant protection against various phytophagous insects, phytopathogenic microbes and in abiotic stress tolerance (Carroll, 1986 in Deckert, 2000; Clay, 1999; Wilson, 1997; Azevedo *et al.*, 2000). Endophytic Fungi are also reputed by their contributions in plant nutrition and synthesis of plant growth hormones (Malinowsky and Belesky, 2000; Tan and Zou, 2001).

Atlas cedar (*Cedrus atlantica* Man.) is one of the most conifer tree species of North African landscape. *C. atlantica* Man. native of Algerian and Moroccan Atlas mountains. Early data concerning *C. atlantica* repartition in Algeria, mentioned by Boudy (1952) in Bentouati and Oudjih (1999) showed that this *Pinaceae* occupy approximately an area of 33000 ha, of which the most area is located in Aurès mountains (17000 ha). However, it is too imperative to indicate that these data should be taken with prudence because of the lack of sufficient information, especially after Atlas cedar decline phenomena.

Endophytic fungi of conifer trees, including *Pinus*, *Picea* and *Abies* species, have been examined in various studies (Sieber-Canavesi *et al.*, 1991; Petrini *et al.*, 1992; Wilson, 1997; Sieber *et al.*, 1999; Ganley and Newcombe, 2006). Nothing is known however, about this microbial group in *Cedrus atlantica*. The main objectives of this work are to demonstrate, for the first time, the occurrence of endophytic fungi in healthy needles of *C. atlantica* in Belezma National Park, BNP, (east of Algeria). A study was designed to examine the endophytic fungal species composition and frequencies in healthy needles of Atlas cedar in three sites of BNP. Species distribution and specificity of colonisation patterns have been studied and compared between sites.

MATERIALS & METHODS

SITE CHARACTERISTICS

For Belezma National Park, Three sites have been chosen for *C. atlantica* needles sampling (1) BOUMERZOUG; (2) TALMET and (3) THOUGGAR . Theses sites (table I) exhibits generally identical vegetation but different edaphic and microclimate conditions. The woody species are *C. atlantica*, *Quercus ilex* (Fagaceae), *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) and *Fraxinus xanthoxylloides* (Oleaceae).

Table I: Sites characteristics

| Caractéristiques des sites | | | |
|----------------------------|--------------|--------------|-----------|
| Site | Altitude (m) | Latitude | Longitude |
| BOUMERZOUG | 1510 | 35°35' 32" N | 6°05' E |
| TALMET | 1740 | 35°35' 21" N | 6°02' E |
| THOUGGAR | 1480 | 35°34' 38" N | 6°03' E |

NEEDLE COLLECTIONS

10 trees of *C. atlantica* are randomly selected at each of the three sites. With different ages (20 years to more than 150 years). For each tree, 5 branches are chosen randomly, they must have two needles categories: young- and old or adult healthy needles. It is assumed that endophyte colonisation is more important in oldest needles (Stone, 1986; Johnston and Whitney, 1992 in Wilson, 1997). Needle samples were stored at 4°C and processed within 24- 48 h after collection. For each age category, 10 rosettes are mixed; we proceed after that to needle separation in laboratory.

SURFACE-STERILIZATION

Needles were surface-sterilized by soaking first for 2 min in 95% (v/v) ethanol, then for 3 min in a solution of sodium hypochlorite (NaOCl) and finally for 30 s in 95% (v/v) ethanol. Each treatment is followed by a rinsing in sterile distilled water. Once dried, each *C. atlantica* needle were cut aseptically into 2 to 4-mm-long segments and put into Petri dishes (90 mm diameter) containing a PDA (Potato Dextrose Agar) medium, prepared after Smith and Onion protocol (1994), and amended by 50 mg l⁻¹ Tetracycline® to inhibit Bacteria. Each Petri dish contains 20 needle-segments from the same age class. Then, we have finally 400 segments by site (1200 segments in total). Petri dishes were incubated at 24°C in the dark and examined daily during colony development. Pure cultures were prepared from the original mycelia which grew from the needle segments by transferring them to Petri dishes with PDA. Colonisation frequency (%) was calculated after Fisher and Petrini (1987) as the number of colonized needle segments divided by the number of total examined needles multiplied by 100. Fungal taxa are identified after microscopic observations, by means of morphological features (Lanier *et al.*, 1976, 1978). If sporulation failed, sterile forms were isolated and categorized as Mycelium Sterile (MS) based on cultural characteristics such as texture and hyphal pigmentation.

DATA ANALYSIS

Relative percentage of occurrence (RPO) of a fungal group was calculated using the following formula: $PRO = FCs / FCt \times 100$. *FCs* is the colonisation frequency of fungal group, while *FCt* represents colonisation frequency of all groups of fungi. SIMPSON (λ) and SHANNON-WEAVER (H') diversity indices were calculated to measure species diversity of endophytic mycobiota of Atlas cedar needles, using the method of Ludwig and Reynolds (1988) in Barengo *et al.*, (2000) using Colwell's Estimates software v. 7.5 (Colwell, 2005). Analyse of variance (ANOVA) was effected to show effect of needle age and sites in endophyte colonization using Statistica 5.1 software.

RESULTS

According to our results, all trees hosted endophytes. More than one third of needle segments of *C. atlantica* are infected by endophytic fungi in the three sites. Colonization frequency is 57% in BOUMERZOUG; 64.75% in Talmet and 65% in THOUGGAR site.

No differences between sites are detected regarding overall colonization by endophytic fungi ($P < 0.05$), this indicates that site do not determine numerical aspects of needles infection by endophytes, for the average age ($F = 2.23$, $p = 0.12$), young needles ($F = 0.62$, $p = 0.54$) or adult needles ($F = 1.20$, $p = 0.31$).

Obtained results demonstrate that endophytic colonization frequency of *C. atlantica* needles changes according to needle age. In fact, it seems that aged needles are more densely infected compared to young needles. This difference – statistically significant – is signalled for both studied sites (table II).

Table II: Colonization frequency (%) of *C. atlantica* needles by endophytic fungi
Fréquence de colonisation (%) des aiguilles de *C. atlantica* par champignons endophytes

| Sites | Colonization frequency (%) | | |
|------------|----------------------------|---------------|---------|
| | Young needles | Adult needles | Average |
| Boumerzoug | 28 ± 6.28 | 86 ± 7.14 | 57 |
| Talmet | 34 ± 5.15 | 95.5 ± 3.02 | 64.75 |
| Thouggar | 36 ± 4.20 | 94 ± 2.21 | 65 |

Analysis of variance and Newman-Keuls test (5%) illustrate a significant difference which scoring the endophyte infection of Atlas cedar needles according to age class. Thus, there is a general tendency for a more importantly colonisation spectrum for adult needles, this increased colonisation is probably linked to morphological and physiological development of *C. atlantica* needles.

Twenty-two endophytic fungal taxa were detected and isolated from the 1200 needle segments examined; most for these fungi are detected from *C. atlantica* for the first time, such as: *Verticillium* sp.; *Alternaria alternata*; *Aureobasidium pullulans*; *Epicoccum nigrum*; *Bipolaris* sp. and *Beauveria* sp. the endophytic mycoflora of *C. atlantica* needles is predominated by four taxa: *Aspergillus* sp.; *Alternaria alternata*; *Epicoccum nigrum* and *Lophodermium* sp. which occurred in 4 % of more of the needle segments.

Specific composition of fungal endophytes isolated differs clearly between three sites. Most endophytic fungi were recorded in TALMET, with 19 taxa, 14 fungal taxa were detected in THOUGGAR site, in BOUMERZOUG site only 09 taxa were recorded.

Most endophytes are belonged to Mitosporic fungi, especially to Hyphomycetes: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Bipolaris*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Gliocladium*, *Arthrinium* and *Verticillium*. The Coelomycetes records two genera: *Phomopsis* and *Phyllosticta*. Two other taxa are ranged to Ascomycota: *Lophodermium* and *Chaetomium*. *Mucor* is the unique genus recorded among Zygomycota phylum (table III).

Table III: General composition of fungal endophytes isolated from Atlas cedar needles in National Park of Belezma.

La composition générale des champignons endophytes isolée des aiguilles du Cèdre de l'Atlas dans le Parc National de Belezma.

| Mycotaxons | BOUMERZOUG | TALMET | THOUGGAR |
|--------------------------------|-------------------|---------------|-----------------|
| <u>Hyphomycetes</u> | | | |
| <i>Alternaria alternata</i> | + | + | + |
| <i>Alternaria</i> sp. | - | + | - |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | + | + | + |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | + | + | + |
| <i>Aspergillus</i> sp. | + | + | + |
| <i>Cladosporium</i> sp. | - | + | + |
| <i>Curvularia</i> sp. | - | + | + |
| <i>Bipolaris</i> sp. | - | + | + |
| <i>Penicillium</i> sp. | - | + | + |
| <i>Fusarium</i> sp. | - | + | + |
| <i>Beauveria</i> sp. | - | + | - |
| <i>Cylindrocarpon</i> sp. | - | + | + |
| <i>Gliocladium</i> sp. | - | + | + |
| <i>Arthrinium</i> sp. | + | - | - |
| <i>Verticillium</i> sp. | - | + | - |
| <u>Coelomycetes</u> | | | |
| <i>Phomopsis</i> sp. | + | - | - |
| <i>Phyllosticta</i> sp. | - | + | - |
| <u>Ascomycota</u> | | | |
| <i>Lophodermium</i> sp. | + | + | + |
| <i>Chaetomium</i> sp. | + | - | - |
| <u>Zygomycota</u> | | | |
| <i>Mucor</i> sp. | - | + | - |
| <u>STERILE MYCELIA</u> | | | |
| MSI (colored by TB) | - | + | + |
| MSII(not colored by TB) | + | + | + |

+: present, -: absent, MS: mycelium sterile, TB: trypan blue.

Relative percentage of occurrence (RPO) for each of the most recorded endophytic fungi is presented in table IV.

Table IV: Relative percentage of occurrence recorded for most mycoendophyte taxa
 Pourcentage relatif d'occurrence (PRO) calculé pour la mycoflore endophyte

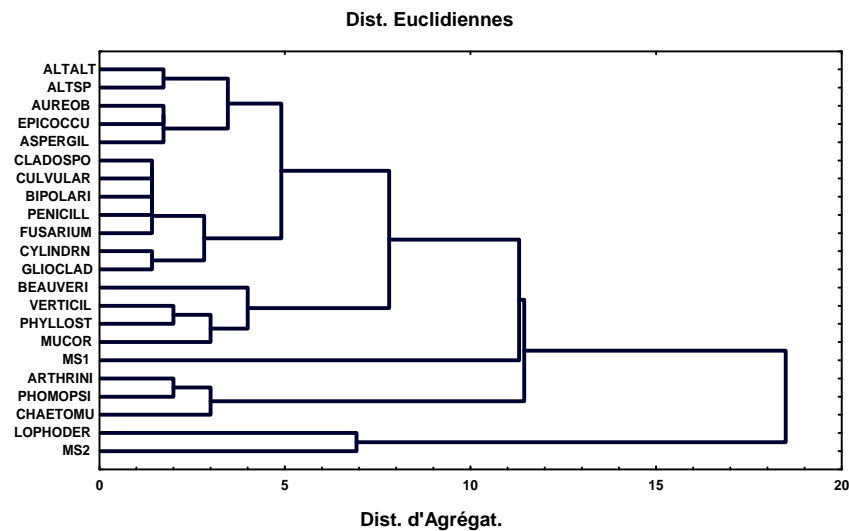
| Fungal taxa | Young needles | Adult needles | Average |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------|
| <i>Aspergillus</i> sp. | 59.75 | 61.41 | 60.58 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 28.11 | 41.77 | 34.94 |
| <i>Lophodermium</i> sp. | 10.23 | 13.45 | 11.84 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | 31.58 | 19.82 | 25.7 |

SHANNON-WEAVER diversity index (H') records for TALMET site has the maximum value (0.47), although there is no significant difference compared to THOUGGAR site (0.40), in contrast to BOUMERZOUG site where we have recorded the most lower value of H' (0.33). Talmet site records a small value of SIMPSON index (λ) with 0.19. It is possible to deduce that colonization frequency is not linked to endophytic diversity.

Fungal endophyte distribution along *C. atlantica* needles is not static according to such spatial and temporal scales. Our results showed differences between the number of taxa, and in fact, at the level of diversity of endophytes between sites. The followed dendrogram shows the most fungal groups from Atlas cedar needles and their classification according to occurrence in sites (figure 1).

Figure 1: Most fungal groups from Atlas cedar needles and their classification according to occurrence in sites

Classification de la majorité des groupes des champignons du cèdre de l'Atlas selon leur présence sur sites



ALTALT : *Alternaria alternata*, ALTSP : *Alternaria* sp., AUREOB : *Aureobasidium pullulans*, EPICOCCU : *Epicoccum* sp., ASPERGIL : *Aspergillus* sp., CLADOSPO : *Cladosporium* sp., CURVULAR : *Curvularia* sp., BIPOLARI : *Bipolaris* sp., PENICILL : *Penicillium* sp., FUSARIUM : *Fusarium* sp., CYLINDRN : *Cylindrocarpon* sp., GLIOCLAD : *Gliocladium* sp., BEAUVERI : *Beauveria* sp., PHYLLOST : *Phyllosticta* sp., VERTICIL : *Verticillium* sp., MUCOR : *Mucor* sp., MS1 : Mycelium sterile I, ARTHRINI : *Arthrini* sp., PHOMOPSI : *Phomopsis* sp., CHAETOMU : *Chaetomium* sp., LOPHODER : *Lophodermium* sp., MS2 : Mycelium sterile II.

Dendrogram shows three principal groups of endophytic fungi in *C. atlantica* needles for three sites: the first group is essentially composed by those taxa which are recorded in two sites or all sites (*Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Gliocladium* sp., *Lophodermium* sp., as well as both sterile forms.

The second group includes fungal taxa isolated from TALMET site, represented by *Alternaria* sp., *Beauveria* sp., *Phyllosticta* sp., *Verticillium* sp. and *Mucor* sp.

The third group is constituted by fungi which are detected from BOUMERZOUG site: *Arthrinium* sp., *Phomopsis* sp. and *Chaetomium* sp.

DISCUSSION

This present study demonstrates for the first time, the occurrence of endophytic fungi of *Cedrus atlantica* phyllosphere. The overall frequency of colonization by fungal endophytes is marked by such differences between sites, even there seems to be little considered, there may be attributed to several factors which are in the majority of the site origins such as relief, altitude of site, hygrometry, as well as edaphic condition, which determinates source of primary endophytes inoculums. For other Pinaceae trees, such similar results were obtained (Carroll and Carroll, 1978; Petrini *et al.*, 1981; TODD, 1988; Legault *et al.*, 1989 in Deckert, 2000; Sieber *et al.*, 1999; Jurc *et al.*, 2000).

Other site characteristics may be implicated in needles infection variations, such as tree population density. THOUGGAR site recorded an important population density of *C. atlantica* especially in sampling points where Atlas cedar forest is dominated by young and middle age class trees. BOUMERZOUG site (with CF = 57%) is marked by a heavy decline of Atlas cedar estimated to 90 – 95%, only few individuals dwelling yet healthy, but very scattered in the North versant and at low altitude. Needle age is a determinant factor of endophyte infection copiousness for all sites and adult needles seems to be more densely infected by fungi. The age of tissues clearly had a great influence on endophyte frequency. The influence of the age of tissues on frequency and species composition of endophyte assemblages has been reported in several studies (Espinosa-Garcia & Langenheim, 1990; Sieber-Canavesi & Sieber, 1993). The needles of Pinaceae trees which are belonged to several age classes, varies in respect to exposition time to a so called the “optimum fungal inoculum charge” from which establishment of the symbiosis held. This bioecological characteristic is more linked to physical and chemical components of needles (Arnold & Herre, 2003). Leaf age is a good predictor of endophyte infection levels, which seem to increase universally with the age of the leaf (Bernestein & Carroll, 1977; Stone, 1987; Hata & Futai, 1993 in Deckert, 2000). This approach suggests in an intuitive sense, that foliar part of *C. atlantica* had a tendency to accumulate endophyte colonization with needle age, in a parallel to leaf morphological and physiological development and growth. Similar approach was adopted for *Pinus strobes* and *P. monticola* and *Abies alba* (Stone, 1987; Sieber-Canavesi & Sieber, 1993 Deckert, 2000)). We can explain the concentrated endophyte infection of old needles of *C. atlantica* at both anatomical and physiological levels by the deterioration of physical barriers integrity of needles such as waxed and cuticle layers (Miller & Roy, 1982, Kierstiens, 1996). In the other hand, physical factors can't exclusively explain the low colonisation levels of young needles of Atlas cedar in BNP, especially after a chronologically large exposition to aerial inoculum. Physical and / or biochemical factors could be also considered (Wilson, 1997; Deckert, 2000).

It is possible that a relatively few endophytic mycotaxa are detected (Carroll & Carroll, 1978; Petrini *et al.*, 1992; Johnson & Whitney, 1992). This indicates a remarkable dominance of some fungal species which can eliminate and reduce consequently other fungal taxa. Laboratory conditions as well as sampling and culture methods are probably implicated (Petrini *et al.*, 1982, 1992 in Wilson, 1997).

The general composition of endophytic mycobiota of *C. atlantica* needles in BNP shows between site differences. While BOUMERZOUG site knows a severe decline of Atlas cedar forest since 2002/2003, there have been a massive degradation of “*Cedrus*” landscape, and

even our sampled trees appears healthy in our point of view, then there can be affected by this phenomenon in future. It seems difficult to categorize the general phytosanitary state of trees because our data are based on simple diagnostic description. BOUMERZOUG site recorded the poor endophyte diversity testifying a declining in physiological status which induces indirectly to a loss in endophyte community. Natural or induced alteration of conifer needles provokes an entry to a senescent phase implicating slight or radical changes in endophyte composition (Wilson, 1993, 2000 in Deckert, 2000). *C. atlantica* needles in TALMET site - with a good phytosanitary and ecological conditions - shelter more diverse fungal endophytes, Wilson (2000) in Deckert, (2000) demonstrates that *Pinus strobes* needles harbour a great number of fungal endophyte species in well structured sites.

In this work, most mycoendophyte groups belonging to Mitosporic fungi. Several works report the specific dominance of this group in Conifer needles (Sieber-Canavesi & Sieber, 1993; Stone *et al.*, 2004). Sexual fructifications of this artificially introduced assemblage (TAYLOR *et al.*, 2004) were never observed on needles, implying other means of *in vivo* propagation suggesting in the same time a loss of sexual reproduction as a strategy of coevolution with *C. atlantica* in Belezma Mountains. But Wilson (1997); Ganley & Newcombe (2006) demonstrates Ascomycota dominance of endophytic fungi in *Pinus resinosa* and *P. monticola*, respectively. In our point of view, the dominance of mitosporic fungi among endophytes is probably attributed to the fact that the endophytism as a symbiotic strategy with plant partner requires a resort to asexual reproduction parallel to permanent presence of the evergreen host as an ecological niche.

The presence of entomopathogenic fungus *Beauveria* sp. under endophytic form in *C. atlantica* needles is of a great importance; this suggests a possible compatibility of association between this entomopathogenic organism and Atlas cedar as plant partner. Endophytic *Beauveria* have been recently isolated from *Pinus resinosa* (Ganley & Newcombe, 2006), this same genus have also been detected as endophyte with two other entomopathogenic fungi: *Lecanicilium dimorphum* and *L. c. f. psalliotae* in date palm leaves (Gómez-Vidal *et al.*, 2006). *Lophodermium* (anamorph = *Leptostroma* and *Leptostromella*) is commonly detected in *C. atlantica* needles for all sites. It is more frequently occurred under sexual form of in letters and senescent needles. *Lophodermium* is commonly associated to Conifer species (Lanier *et al.*, 1978; Wilson, 1997) and it was reported in several Pinaceae needles: *Pinus strobes*, *P. resinosa*, *P. strobes*, *P. mugo*, *Picea glauca*, *Abies alba* and *A. balsamea* (Sieber-Canavesi & Sieber, 1991; Wilson, 1997; Sieber *et al.*, 1999 Deckert & Peterson, 2000; Ganley & Newcombe, 2006). *Lophodermium cedrinium* was reported in *C. atlantica* in Algeria (Maire, 1912 in Spaulding, 1961). The life cycle of *Lophodermium* is well documented (Minter & Millar, 1980; Stone, 1988; Osorio & Stephan, 1991; Johnston, 1994; Deckert, 2000).

Suryanarayanan & Thennarasan (2004) showed that RPO is less important for plants harbouring maximum fungal diversity. This phenomenon can be explained by the occupation patterns of tissues (Yang *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2002). The value of RPO at TALMET site (29.89%) indicates that endophytes recovery for the most four isolated taxa is insignificant, in the same site we have recorded maximum diversity of endophytic fungi. By reading H' and λ indices, we deduce that fungal endophytes diversity in TALMET site indicates an ecological balance and good functioning ecosystem especially when considering seasonality effects.

Between-site differences among fungal communities were already evident. TALMET and BOUMERZOUG sites were characterized by a special assemblage suggesting site-specific assemblages. A similar pattern of endophyte colonization was observed also on other conifers (Sieber, 1988; Sieber *et al.*, 1999). This study demonstrates that specificity of endophyte infection can be influenced by a combination of genetic predisposition and some environmental factors, but geographically determined also.

This study provided us with information about quantitative and qualitative composition of Endophyte mycobiota in Atlas cedar phyllosphere at different locations, and confirmed that Atlas cedar represents a reservoir for a relatively broad range of fungal endophytes including potential pathogens, saprotrophytes as well as some biological control agents. The species composition depends on tissue age. We assume that species composition and the formation

of distinctly different endophyte associations is due to site-specific conditions. Future research should concentrate on finding the mechanism of fungal infection and the switch from different biotic regimes (asymptomatic to symptomatic colonization) that would permit an eventual use of endophytic fungi as biocontrol agents and in reforestation (Boddy & Griffith, in Shamoun & Sieber, 2000).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Thomas N. Sieber (*Department of Forest and Wood Sciences, Forest Pathology and Dendrology, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland*) and Mrs. Laabed A. and Boukarkar H. (*Belezma National Park, Batna, Algeria*) for technical help.

REFERENCES

- ARNOLD A. E. & HERRE E. A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95(3): 388-398.
- AZEVEDO J. L., MACCHERONI JR. W., PEREIRA J. O. & DE ARAUJO W. L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (1): 40-65.
- BENTOUATI A. & OUDJHIH B. 1999. Premières études de la croissance et de la productivité du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti) dans le massif de Bélezma (Aurès).
- CARROLL G. C. & CARROLL F. E. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany* 56: 3034-3043.
- CLAY K. & HOLAH J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285: 1742-1744.
- COLWELL R. K. 2005. *EstimateS*: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5.
- DECKERT R. J. 2000. Structural and ecological aspects of the relationship of phyllosphere fungi with their host, *Pinus strobus* L. PhD. thesis University of Guelph (Canada). 172 pp.
- ESPINOSA-GARCIA F. J. & LANGENHEIM J. H. 1990. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population – diversity and spatial patterns. *New Phytologist* 116: 89-97.
- FISHER, P.J., & PETRINI, O. 1987. Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. *Mycological Research* 89: 246-249.
- GANLEY R. J. & NEWCOMBE G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 110: 318-327.
- GOMEZ-VIDAL S., LOPEZ-LLORCA L. V., JANSSON H.-B. & SALINAS J. 2006. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. Article in press. *Micron* xxx: 9 pp.
- JOHNSON J. A. & WHITNEY N. J. 1992. Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Botany* 70: 1754-1757.
- JURC D., JURC M, SIEBER T. N. & BOJOVIC S. 2000. Endophytic *Cenangium ferruginosum* (Ascomycota) as a reservoir for an epidemic of *Cenangium* dieback in Austrian pine. *Phyton* 40 (4): 103-108.
- KIERSTIENS G. 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure function relationship. *Trends in Plant Science* 1: 125-129.
- LANIER L., JOLY P., BONDOUX P. & BELLEMERE A. 1978. *Mycologie et Pathologie Forestière*, Volume I : Mycologie forestière. Edition Masson. 487 pp.
- LANIER L., JOLY P., BONDOUX P. & BELLEMERE A. 1976. *Mycologie et Pathologie Forestière*, Volume II : Pathologie forestière. Edition Masson. 478 pp.
- MALINOWSKI D. P. & BELESKY D. P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40 (4): 923-940.

- MILLER W. A. & ROY K. W. 1982. Mycoflora of soybean leaves, pods, and seeds in Mississippi. *Canadian Journal of Botany* 60: 2716-2723.
- PETRINI O., SIEBER T. N., TOTI L. & VIRET O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1: 185-196.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A.-K. , KROHN K. 2002. Review: Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.
- Shamoun S. F. & Sieber T. N. 2000. Colonisation of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. *Mycological Research* 104 (7): 841-845.
- Sieber T. N., Rys J. & Holdenrieder O. 1999. Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *Uncinata*. *Mycological Research* 103 (3): 306-310.
- Sieber T. N. 1988. Endophytische Pilze in gesunden und geschädigten Fichten (*Picea abies* (L.) Karst.). *European Journal of Forest Pathology* 18: 321-342.
- Sieber-Canavesi F., Petrini O. & Sieber T. N. 1991. Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. *Mycologia* 83 (1): 89-96.
- Sieber-Canavesi F. & Sieber T. N. 1993. Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.). *New Phytologist* 125: 149-161.
- Smith D. & Onions A. H. S. 1994. *IMI Technical Handbooks No. 2: The preservation and maintenance of living fungi*. CAB International. Wallingford. 122 pp.
- Stone J. K. 1987. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir. *Canadian Journal of Botany* 65: 2614-2621.
- Stone J. K. 1988. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir with observations on uninfected epidermal cells. *Canadian Journal of Botany* 66: 45-54.
- Stone J. K., Sherwood M. A. & Carroll G. C. 1996. Canopy microfungi: function and diversity. *Northwest Science* 70: 37-45.
- Stone J. K., Polishook J. D. & White J. F. 2004. Endophytic fungi. In Mueller G. M., Bills G. F. & Foster M. S. (eds.) *Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. pp 241-269.
- Suryanarayanan T. S. & Thennarasan S. 2004. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal diversity* 195-202.
- Tan R. X. & Zou W. X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- Taylor J. W., Spatafora J., O'Donnell K., Lutzoni F., James T., Hibbett D. S., Geiser D., Bruns T. D. & Blackwell M. 2004. The fungi. In CRACRAFT J. & DONOGHUE M. J. (eds.) *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press. pp 171-194.
- Wilson R. 1997. Endophytic fungi from four tree species in New Brunswick and a comparison of two methods of identification of *Leptostroma* isolates of *Pinus resinosa*: morphology and molecular probing. PhD. thesis. University of New Brunswick (Canada). 131 pp.

**PROTOCOLE D'ÉVALUATION DES RÉACTIFS SÉROLOGIQUES :
ESSAI SUR DEUX MODÈLES VIRAUX ET UN MODÈLE BACTÉRIEN**

C. FRANÇOIS⁽¹⁾, V. HERAU⁽¹⁾, D. ROBERT, J. BUREAU, I. RENAUDIN⁽¹⁾,
V. MOLINERO-DEMILLY⁽¹⁾ et H. SOUBELET⁽¹⁾

⁽¹⁾ LABORATOIRE NATIONAL DE LA PROTECTION DES VÉGÉTAUX, 7 rue Jean
Dixmèras, 49 044 ANGERS, FRANCE,
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

RÉSUMÉ

En tant que laboratoire national de référence, le laboratoire national de la protection des végétaux (LNPV), a engagé des travaux méthodologiques sur le contrôle de la conformité des réactifs utilisés dans le cadre d'analyses officielles pour la protection des végétaux. Après avoir rédigé un projet de guide sur la vérification de la conformité des réactifs, le LNPV procède à une évaluation de ce guide à travers plusieurs modèles hôtes/ pathogènes pour les techniques sérologiques. Le présent document résume le protocole choisi sur 2 des modèles choisis, à savoir en virologie le Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) et en bactériologie *Erwinia amylovora* (agent du feu bactérien) au travers de la technique ELISA. Des travaux complémentaires portent sur d'autres modèles d'étude (TYLCV notamment) et une autre technique sérologique (immunofluorescence) avant d'envisager une extension des travaux aux techniques moléculaires (PCR notamment).

Mots-clés : réactifs sérologiques, ELISA, contrôle de conformité, BNYVV, *Erwinia amylovora*

SUMMARY

PROTOCOL FOR THE EVALUATION OF REAGENTS : FIRST ASSAYS WITH SEROLOGICAL TECHNIQUES ON 2 VIRAL AND 1 BACTERIAL MODELS

As a national reference lab, the LNPV (National Plant Health Laboratory) has started working on quality insurance of the reagents used in official analyses for pests detection or identification.

After having written a draft guide, the LNPV has chosen several technique/pathogen models to test its applicability and efficiency. This paper presents the methodology used to compare the different existing ELISA commercial kits for the detection of *Erwinia amylovora* on the one hand and Beet Necrotic Yellow Vein Virus on the other.

Some complementary works are currently being done on other models with another pathogen (TYLCV) and another serological technique (IF) ; the extension of the work to molecular techniques is also envisaged.

Key words: serological reagents, ELISA, quality controls, BNYVV, *Erwinia amylovora*

INTRODUCTION

Le décret 2007-311 du 05 mars 2007 définit les modalités de contrôle de la conformité des réactifs utilisés dans le cadre des analyses de diagnostic en santé publique vétérinaire et en protection des végétaux. Outre l'accréditation/certification des fabricants, importateurs ou distributeurs de réactifs, ce décret prévoit que les réactifs les plus importants fassent l'objet d'une évaluation visant à en garantir la performance et la sécurité : attestation initiale de conformité voire contrôle systématique des lots par le Laboratoire National de Référence (LNR).

En tant que LNR, le LNPV s'est engagé dans la démarche de définition et d'identification des réactifs susceptibles d'être évalués puis dans la rédaction d'un guide basé sur le travail déjà mené en matière d'évaluation de méthodes au sein des LNR (détermination des critères de performance).

Dans ce cadre, le LNPV a débuté ses travaux par les réactifs sérologiques et réalisé une comparaison relative des kits ELISA et *antisera* présents sur le marché pour différents modèles d'étude en vue d'une évaluation plus fine des réactifs retenus afin de permettre leur validation pour une utilisation dans le cadre d'analyses officielles.

Le présent poster résume la démarche suivie pour procéder à l'évaluation de kits ELISA par comparaison.

MATERIEL ET MÉTHODE

CHOIX DES MODELES D'ETUDE

Objectifs et critères de choix des modèles

Le choix des modèles d'étude s'est basé sur plusieurs critères :

- l'intérêt du modèle d'étude pour le laboratoire (utilisation en cours ou envisagée pour des analyses officielles) ;
- la disponibilité de plusieurs réactifs (kits / antisera) commerciaux ;
- le statut des analyses de dépistage (majoritairement confiées à des laboratoires agréés) ;
- et enfin la disponibilité d'échantillons positifs naturellement contaminés pour chacun des modèles.

Modèles retenus

Des travaux ont été conduits au sein du LNPV en virologie sur le Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) et le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) par la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et en bactériologie sur *Erwinia amylovora* par les techniques d'IF (Immunofluorescence) et ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Seuls sont présentés ici les résultats obtenus pour le BNYVV et *Erwinia amylovora* avec la technique ELISA.

LE PROTOCOLE D'ESSAI

La problématique et choix du protocole dans le guide

La qualité du résultat d'un ELISA dépend étroitement de la qualité des réactifs sérologiques, en particulier du ou des *sera* (ou *antisera*) utilisés. Chaque lot d'antiserum peut avoir des performances modifiées par rapport à un schéma classique.

Dans la mesure où les résultats obtenus sur les kits ELISA testés dans le cadre des travaux méthodologiques seront également exploités pour le choix des réactifs utilisés pour les analyses officielles, tous les kits existant sur le marché pour les modèles d'étude ont été inclus. En revanche, la réalisation d'une évaluation complète de tous les kits n'étant pas envisageable du fait de la lourdeur des manipulations, il a été décidé de faire appel à un protocole reposant sur deux phases :

- une phase de sélection visant à exclure les kits les moins performants ;
- une seconde complète pour les kits sélectionnés lors de la première phase.

L'ELISA est une technique utilisée en routine pour le dépistage d'organismes nuisibles, dans la mesure où il s'agit d'une technique simple à mettre en œuvre et est assez peu onéreuse. Elle est cependant rarement utilisée en confirmation du fait :

- de son seuil de détection théorique plus élevé (moins bon) que d'autres techniques (ex : PCR) ;
- de l'existence de résultats douteux dont le statut n'est pas aisé à déterminer. Le statut de douteux étant lié au recours à 2 seuils différents pour l'interprétation des résultats.

C'est la raison pour laquelle les critères de performance choisis pour procéder à la sélection des kits lors de la première phase ont été :

- l'inclusivité ;
- le seuil de détection (absolu ou relatif), sur la base de résultats répétables.

Dans la seconde phase, les autres critères de performance pertinents seront calculés (sensibilité, spécificité, reproductibilité).

Phase 1 : sélection de kits (1^{er} semestre 2009)

En bactériologie, pour *Erwinia amylovora*, 4 kits ELISA ont été identifiés sur le marché.

Ces kits ont été testés sur les 5 mêmes souches de la collection LNPV à 5 niveaux de concentration successifs permettant d'encadrer le seuil de détection théorique de la technique (10^5 ufc / ml), à savoir 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 et 10^3 ufc / ml.

Deux puits ont été déposés par souche et par niveau de concentration, les manipulations ayant également été effectuées 2 fois.

En l'absence de méthode officielle précisant, pour la détection d'*Erwinia amylovora* par ELISA, les temps de lecture, les préconisations des fournisseurs ont été utilisées. S'agissant des critères d'interprétation, 7 méthodes d'interprétation différentes ont été testées, dont 2 habituellement utilisées au LNPV.

En virologie, pour le BNYVV, 8 méthodes distinctes ont été testées : 6 kits commerciaux ainsi que le DAS-ELISA (double antibody sandwich) et le TAS (triple antibody sandwich) officiels.

Ces kits ont été testés sur les 5 mêmes échantillons issus de la collection LNPV à 5 niveaux de concentration successifs permettant d'encadrer le seuil de détection théorique. Ce seuil de détection relatif a été déterminé pour chaque échantillon par des manipulations préliminaires

effectuées avec le TAS officiel. Les échantillons ont ainsi été testés à des concentrations allant de 1/1 à 1/50 000^e, les dilutions ayant été effectuées dans du tampon de broyage. Deux puits ont été effectués par échantillon et par niveau de concentration, les manipulations ayant également été effectuées 2 fois.

Les résultats ont été interprétés à 2h avec les seuils définis par la méthode officielle :

Seuil 1= $MTS + (3 \times \text{écart type des D.O. des TS})$

Seuil 1 bis= $MTS \times 1,1$

Seuil 2= $MTS \times 2$

NB : Le seuil 1 choisi est la valeur la plus élevée de S1 ou S1 bis

Légende :

MTS : la moyenne des TS

TS : valeur des différents témoins sains présent sur la plaque

Bien entendu, dans tous les cas, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus, les kits ont été testés dans les mêmes conditions, à partir des solutions-mères de suspensions bactériennes de différentes souches ou de solutions de broyage d'échantillons aliquotées.

Phase 2 : détermination des critères de performance (2^{ème} semestre 2009)

Les critères de performance de sensibilité, spécificité, reproductibilité seront déterminés pour chacun des réactifs conservés lors de la première phase. Pour ce faire, au moins 20 échantillons positifs et 10 négatifs, et 2 réplicats seront testés, les manipulations étant effectuées 2 fois par deux opérateurs et à des moments différents.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus à ce stade n'étant que partiels, ils ne sont pas présentés. En revanche, les observations faites à l'issue de la première phase permettent de conclure :

- que tous les kits ne sont pas identiques en terme de performance de seuil de détection, voire d'inclusivité ;
- que le protocole retenu permet de comparer voire choisir le kit le plus approprié en fonction des besoins de l'utilisateur ;
- que les performances des kits semblent être indépendantes de la méthode d'interprétation des résultats retenue.

Il a été observé, comme il pouvait être attendu, que l'augmentation du temps de lecture, augmente la sensibilité des tests. Mais l'impact sur la spécificité n'était pas déterminé au moment de l'impression du document.

Sur la base de ces observations, le guide d'évaluation a été réajusté en fonction des difficultés rencontrées dans le but d'arriver à la comparaison des critères de performances déterminés avec des critères cibles prédéfinis. Un réactif ne peut être déclaré conforme que lorsque les critères cibles (pré-déterminés) sont atteints ou dépassés.

CONCLUSION

Le protocole élaboré par le LNPV concernant les contrôles de conformité des réactifs sérologiques est adapté pour effectuer des comparaisons de différents kits ou de différents lots du même kit.

Les travaux menés en parallèle sur d'autres modèles et techniques devraient permettre de faire aboutir le guide sur les techniques sérologiques. Il est à noter toutefois que les

comparaisons de sera utilisés en IF est plus délicate dans la mesure où cette technique fait appel à des critères qualitatifs de reconnaissance.

Ce guide pourra être mis à disposition des laboratoires utilisateurs de la technique ELISA une fois les autres parties validées.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme. Décret n° 2007-311 du 5 mars 2007 relatif au contrôle de conformité des réactifs destinés aux analyses réalisées dans les domaines de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux et modifiant le code rural (JORF du 07/03/2007)

Anonyme. Norme EN ISO 16140. Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Octobre 2003.

Anonyme. Norme XP V03-111. Protocole d'évaluation intra-laboratoire d'une méthode alternative d'analyse par rapport à une méthode de référence. Octobre 1995.

REMERCIEMENTS

La station d'Angers du LNPV remercie Jennifer Bureau et Delphine Robert pour l'aide qu'elles ont apportée pour la réalisation des manipulations au cours de leur stage de BTS Bio-analyse.

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**MISE SOUS ASSURANCE QUALITÉ DES TRAVAUX MÉTHODOLOGIQUES AU LNPV ET
ACCREDITATION EN TANT QU'ORGANISATEUR D'ESSAIS INTER-LABORATOIRES**

V. HERAU ⁽¹⁾ et A. LEGUAY⁽¹⁾

⁽¹⁾ LABORATOIRE NATIONAL DE LA PROTECTION DES VÉGÉTAUX, 7 rue Jean
Dixmèras, 49 044 ANGERS , France, lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

RÉSUMÉ

En tant que laboratoire national de référence, le LNPV est engagé dans une démarche d'assurance de la qualité. Les modalités de sa mise en place dans le secteur chargé de développer les méthodes ainsi que celles liées à l'extension du périmètre actuel de l'accréditation du laboratoire pour l'organisation d'essais inter-laboratoires (d'aptitude et de validation de méthodes) sont présentées ici.

Une analyse des processus a été conduite pour identifier les tâches unitaires effectuées et a permis de rédiger des documents (procédures, fiches de fonction, ...) adaptés à ces activités et de définir une organisation répondant aux exigences de la norme requise.

La mise sous assurance qualité et *a fortiori* l'accréditation d'une activité d'un laboratoire permettent de prouver à ses clients la fiabilité des tâches exécutées et d'optimiser son fonctionnement.

Mots-clés : assurance qualité, laboratoire national de référence, méthodologie, essais inter-laboratoires, protection des végétaux

SUMMARY

**QUALITY INSURANCE DEVELOPMENT FOR METHODOLOGICAL WORK AND
ACCREDITATION AS RING TESTS ORGANIZER AT LNPV**

As a national reference laboratory, the National Plant Health Laboratory (LNPV) has decided to extend the scope of quality insurance to the methodological works in order to prepare accreditation for ring tests organization.

The way to achieve those goals is presented here. A processus analysis has been done for each test and has lead the laboratory to write logigrams, procedures and documents as referred to different normes.

Quality insurance and accreditation are a good way to prove to the clients of a laboratory its competency and help putting in place an internal efficient organization.

Key words: quality insurance, national reference laboratory, methodology, ring tests, plant health

INTRODUCTION

La Laboratoire National de la Protection des végétaux (LNPV), est un laboratoire d'Etat du Ministère chargé de l'agriculture. Il est le laboratoire national de référence français dans le domaine de la protection des végétaux. Il est composé de plusieurs stations sur le territoire national, ayant différentes activités (bactériologie, virologie, OGM à la station d'Angers, nématologie à Rennes, entomologie et malherbologie à Montpellier, mycologie à Nancy, bactériologie et virologie sur plantes exotiques à La Réunion, quarantaine à Clermont-Ferrand).

Les principales missions du LNPV sont :

- la détection d'organismes nuisibles, principalement de quarantaine, sur matrices végétales et l'animation du réseau de laboratoires agréés pour ces activités ;
- la mise au point, le développement et l'optimisation des méthodes de détection, identification et confirmation des organismes nuisibles ;
- l'expertise et l'analyse de risque phytosanitaire.

Ces missions structurent l'organisation du LNPV, chacune étant assurée par un pôle de coordination inter-stations. La station d'Angers, composée du nombre d'agents le plus important, a décliné ces activités autour de trois secteurs.

Le secteur « Analyses et animation du réseau de laboratoires agréés » a mis en place une démarche qualité débouchant sur une accréditation pour plusieurs lignes d'analyses en bactériologie. Une extension du périmètre d'accréditation est en cours pour la virologie et est envisagée pour les OGM.

La montée en puissance des activités de développement de méthodes, d'expertise et la mise en place du réseau de laboratoires agréés nécessite une organisation qui puisse offrir une garantie pour les clients sur la qualité des travaux produits. C'est l'objectif visé par le LNPV par la mise sous assurance de la qualité des activités méthodologiques et d'organisation d'essais inter-laboratoires.

MATERIEL ET MÉTHODE

MISE EN PLACE D'UNE ORGANISATION INTERNE

Organisation interne de la station d'Angers du LNPV

Le développement des activités méthodologiques a conduit à la création d'un secteur dédié à ces activités au sein de la station d'Angers. La mise sous assurance de la qualité de ces activités a conduit à la nomination d'un responsable qualité placé auprès du responsable de secteur.

Objectifs, choix du référentiel

L'objectif principal est de pouvoir donner confiance aux clients du LNPV, mais également d'harmoniser les modalités selon lesquelles les travaux méthodologiques et les essais inter-laboratoires sont conduits.

S'agissant des référentiels, d'une part, les grandes lignes de l'organisation d'essais inter-laboratoires peuvent être certifiées ; l'accréditation ISO CEI 17025 / LAB CIL rev 02, incluant la compétence technique de l'organisation, peut néanmoins être envisagée par ligne d'analyse.

S'agissant des travaux méthodologiques d'autre part, le référentiel ISO : 9001 (certification) est celui qui a été jugé comme le plus approprié ; l'accréditation ISO/CEI n°17025 ne peut quant à elle être envisagée que pour une partie très limitée et non spécifique : le laboratoire peut demander une accréditation de portée flexible pour une ligne d'analyse et de fait inclure les travaux préliminaires de comparaison, optimisation et évaluation de la méthode utilisée.

Fonctions

Plusieurs fonctions ont été identifiées pour conduire les travaux méthodologiques. Outre le responsable de secteur et l'adjoint chargés du pilotage et de la validation technique des documents / prestations fournis, ont été décrites les fonctions :

- de responsable de projet méthodologique ;
- d'opérateur technique.

Le premier a en charge l'élaboration des protocoles méthodologiques en lien avec les normes et textes réglementaires en vigueur, le second appuie le responsable de projet pour les recherches bibliographiques et les activités de laboratoire.

ANALYSE DES PROCESSUS

Identification des prestations et offre

Le secteur méthodologie du LNPV est en mesure de fournir :

- des pré-études méthodologiques (revues bibliographiques de méthodes existantes pour un ou des pathogènes identifiés) ;
- des travaux de mise au point, optimisation, comparaison de méthodes ;
- l'évaluation (détermination des critères de performance) de méthodes, les essais inter-laboratoires y étant intégrés ;
- des avis, des expertises sur les méthodes ;
- des guides méthodologiques sur des techniques, des méthodes et des réactifs.

Identification des clients

Le principal client du secteur méthodologie est le donneur d'ordre, à savoir la Direction générale de l'Alimentation au sein du Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche. Toutefois, le secteur méthodologie intervient également comme prestataire de service pour les secteurs analyse ou expertise du LNPV.

Les laboratoires participant à un essai inter-laboratoire organisé par le LNPV deviennent également ses clients.

Analyse des processus, identification des documents à mettre en place

Pour chacune des prestations pouvant être assurée par le secteur, une analyse des processus (succession d'étapes à suivre pour élaborer le produit fini = service) a été conduite afin d'identifier pour chacune des opérations unitaires les procédures et enregistrements à mettre en place.

RESULTATS

CONSTRUCTION DU SYSTEME QUALITE

Réorganisation et système qualité

Toute réorganisation au sein d'une structure nécessite des ajustements en terme de qualité. La montée en puissance des activités méthodologiques au sein du LNPV a conduit à revoir une partie du système qualité pré-existant pour l'activité analytique et en particulier :

- d'articuler les systèmes qualité mis en place pour ces nouvelles activités avec celles existantes (manuel et plans qualité) ;
- d'identifier les éventuelles procédures communes, notamment les fonctions support (préparation de milieux, utilisation du matériel,...).

Rédaction des documents

Sur la base des constats précédents, les procédures existantes ont été modifiées pour intégrer les nouvelles activités et de nouvelles procédures, spécifiques des activités intégrées dans le système qualité, ont été rédigées. Au-delà des procédures, les modèles d'enregistrement sont très utiles pour harmoniser les pratiques et gagner en efficience.

MISE EN ŒUVRE ET AMELIORATION DU SYSTEME

Les procédures et modèles de documents ont nécessité un temps de rédaction assez important. Les documents produits, à usage interne, commencent maintenant à être testés. L'usage permettra d'identifier les points d'amélioration à apporter.

DISCUSSION

Le choix du référentiel pour la reconnaissance d'activités autres qu'analytiques dans un laboratoire n'est pas aisé. Il dépend surtout des objectifs visés. Dans tous les cas, la mise sous assurance de la qualité d'une activité, une fois la phase de mise en place terminée, permet de gagner en efficacité. Les bénéfices tirés de ces travaux ne sont en revanche pas immédiats et pas toujours aisément quantifiables. Sont néanmoins envisagés à cet effet :

- un suivi de l'évolution des délais de rendu des avis ou autres travaux méthodologiques ;
- le suivi de la satisfaction des clients.

CONCLUSION

La mise sous assurance de la qualité des travaux méthodologiques au sein du LNPV a pour double objectif :

- de sécuriser le processus de rendu des avis et de réalisation des prestations ;
- à terme, de gagner en efficacité par l'intermédiaire de la mise à disposition de documents types et procédures pré-établies.

La mise sous assurance de la qualité d'un service est un processus long qui nécessite un investissement important dans sa phase de construction. Les documents produits n'ayant pas

encore tous été mis à l'épreuve de l'usage, les bénéfices attendus n'ont pas encore été observés mais devraient l'être dans les mois à venir.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 2000. Norme ISO 9001 : Systèmes de management de la qualité — Exigences.

Anonyme, 2005. Norme NF EN ISO/CEI 17025 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (Septembre 2005). Indice de classement : X 50-061.

Anonyme, 2007. LAB CIL REF 02 révision 02 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (septembre 2007) COFRAC.

**AFPP – 9^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

**L'ANALYSE DU RISQUE PHYTOSANITAIRE (ARP) : UN OUTIL POUR DIMINUER LES
RISQUES D'INTRODUCTION DE NOUVELLES MALADIES**

C. LE FAY-SOULOY, P. REYNAUD

Laboratoire National de la Protection des Végétaux
7 rue Jean Dixméras - 49044 Angers cedex 01

RÉSUMÉ

Face à l'enjeu majeur représenté par le risque d'introduction d'organismes allochtone, le principal outil d'aide à la décision des Organisations Nationales de Protection des Végétaux (ONPV) est l'Analyse du Risque Phytosanitaire (ARP). Elle consiste à déterminer, selon des normes internationales, si un organisme nuisible doit être réglementé et la sévérité des mesures éventuelles à prendre à son égard.

L'ARP est un outil scientifique au service du gestionnaire du risque qui permet une homogénéité et une traçabilité des études et de futures mises à jour. C'est une source d'information disponible et vérifiable qui autorise une comparabilité et une complémentarité des analyses entre pays. L'ARP est le passage obligé pour modifier les listes de quarantaine et c'est un outil de négociation lors de l'importation de nouvelles filières végétales.

Cette communication présente les 3 étapes classiques d'une ARP : initiation, évaluation et gestion.

Mots-clés : Analyse du risque, norme internationale, réglementation

SUMMARY

To manage the major risk of introduction of allochthonous plant pests, the main instrument of National Plant Protection Organizations to select management measures is the Pest Risk Assessment (PRA). It consists in determining (using international standards) whether a pest should be regulated and the strength of any phytosanitary measures to be taken against it.

This scientific tool is used by the risk manager for decision-making. It enables to realise homogeneous investigations whose results would be updated later on if necessary and also to certify traceability. This information source can be checked and provides scientific results which enables to compare the assessments of different countries. The quarantine lists are only amended on this assessment basis and new plant pathways are internationally negotiated according to PRA conclusions.

This communication presents the three PRA stages: initiation, assessment and management.

Key words: Risk assessment, international standard, regulation

INTRODUCTION

L'ancienneté des échanges commerciaux de végétaux et produits végétaux pourrait conduire à penser que toutes les espèces potentiellement nuisibles occupent déjà leur biotope potentiel. En fait, la mise en place permanente de nouvelles filières¹ commerciales combinée à un nombre très important d'espèces potentiellement nuisibles provoque continuellement l'émergence de nouveaux parasites ou l'adaptation de parasites connus à de nouvelles cultures.

Face à ce défi, le **gestionnaire du risque** (c'est à dire le plus souvent l'Organisation Nationale de Protection des Végétaux = ONPV) est chargé de prendre des décisions en vue de prévenir et gérer les risques phytosanitaires sur le territoire national.

Ces décisions doivent impérativement respecter les principes qui régissent les pratiques commerciales au niveau international. Ils sont précisés par l'Accord SPS (accord Sanitaire et Phytosanitaire), entré en vigueur au moment de la création de l'Organisation mondiale du commerce, le 1er janvier 1995. Cet accord impose un certain nombre de règles visant à éviter les obstacles au commerce non justifiés.

Ainsi, les mesures phytosanitaires mises en oeuvre par l'ONPV sur son territoire doivent être fondées sur des bases scientifiques. L'**analyse du risque phytosanitaire** (ARP) réalisée selon des techniques internationalement reconnues est l'outil par excellence permettant aux gouvernements de maintenir une protection phytosanitaire reconnue comme « appropriée » tout en réduisant le risque de décisions arbitraires et en encourageant la cohérence au niveau de la prise de décisions.

L'ANALYSE DU RISQUE PHYTOSANITAIRE : UNE EVALUATION SCIENTIFIQUE DES RISQUES

L'analyse du risque phytosanitaire consiste à déterminer, selon des normes internationales (CIPV², 2004), si un organisme nuisible doit être réglementé et la sévérité des mesures éventuelles à prendre à son égard.

Les pays les plus avancés en la matière disposent de scientifiques regroupés au sein d'instances spécialisées dans le domaine de l'analyse du risque phytosanitaire (cas de l'Angleterre, de la Hollande ou de la France par exemple).

L'analyse du risque est décomposée classiquement en trois étapes :

- **L'évaluation du risque** qui est un processus d'évaluation, avec l'identification des incertitudes afférentes, de la probabilité et de la sévérité d'un effet ou d'un événement adverse pour les productions végétales à la suite d'une exposition à une source de risques (des bioagresseurs) selon des conditions rapportées. Ce processus se déroule lui-même en 3 étapes (Figure 1) présentées par la suite.
- La **gestion du risque** est le processus de prise de décision qui englobe notamment l'étude des différentes politiques ou actions alternatives à la lumière des résultats de l'évaluation des risques. Elle prévoit si nécessaire les mesures de contrôle adaptées
- La **communication sur le risque** est définie comme un échange d'informations et d'opinions tout au long du processus d'analyse concernant le risque. Elle devrait impliquer non seulement les évaluateurs et les gestionnaires, mais aussi les parties prenantes actuelles et potentielles (producteurs, consommateurs...).

¹ Filière : tout moyen par lequel un organisme nuisible peut entrer ou se disséminer

² Convention Internationale pour la Protection des Végétaux : <https://www.ippc.int/>

La suite de cette communication présente plus particulièrement la partie « évaluation du risque ». Il convient de rappeler ici que les phases de « gestion des risques » et de « communication » relèvent de la seule décision publique. L'instance en charge de l'analyse du risque, quoique fournissant des informations utiles à la gestion du risque, n'est jamais associée à la phase décisionnelle.

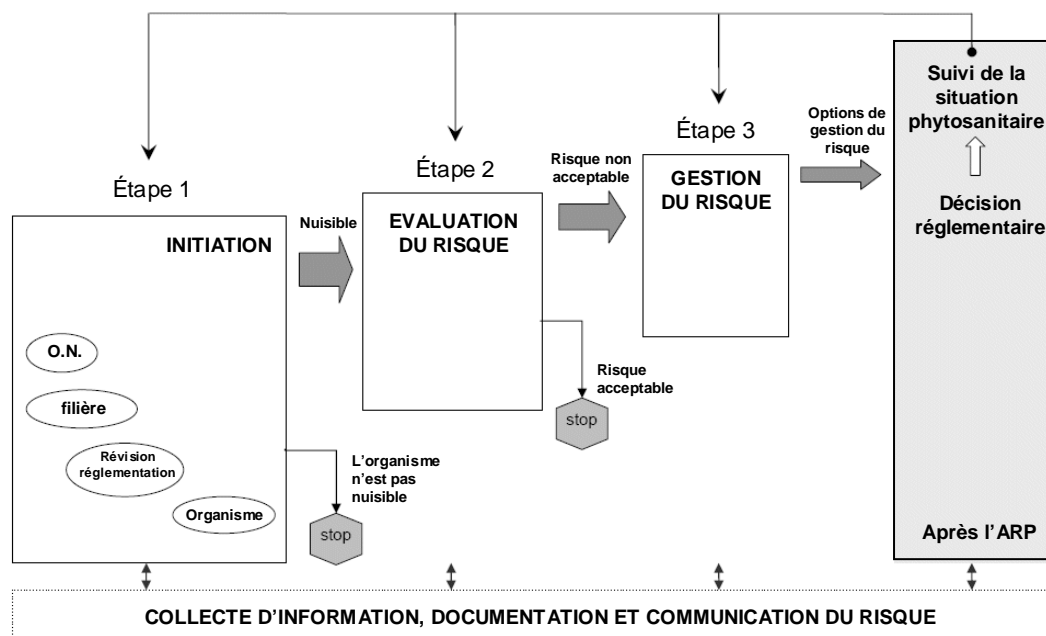


Fig 1. L'évaluation des risques phytosanitaires est destinée à alimenter la phase de gestion des risques et de communication qui relèvent de la décision publique. La réalisation d'une Analyse du Risque Phytosanitaire selon les normes internationales en vigueur passe par 3 étapes.

PRELUDES A UNE ANALYSE DU RISQUE : L'INITIATION

Avant toute analyse, l'évaluateur détermine précisément une « zone ARP » sur laquelle portera l'étude. Il s'agit souvent d'un pays entier (la France, le Maroc) ou bien d'un ensemble de pays (l'Union Européenne, l'Afrique du Nord...).

La phase d'initiation permet d'identifier l'organisme nuisible et/ou les filières qui sont d'intérêt phytosanitaire et doivent être considérées pour l'analyse du risque en relation avec la zone ARP identifiée. Cette première phase peut être initiée pour une ou plusieurs raisons, les plus fréquentes étant :

- L'identification d'une filière (p. ex. de nouvelles espèces végétales sont importées)
- L'identification d'un organisme nuisible (p.ex. une infestation est découverte dans la zone ARP)
- L'examen ou la révision d'une politique (p.ex. proposition de déréglementation d'un organisme nuisible ou bien un différend entre pays apparaît sur des mesures phytosanitaires)

L'ÉVALUATION DU RISQUE

C'est l'étape la plus importante et la plus complexe. Elle comporte globalement 5 phases (Figure 2).

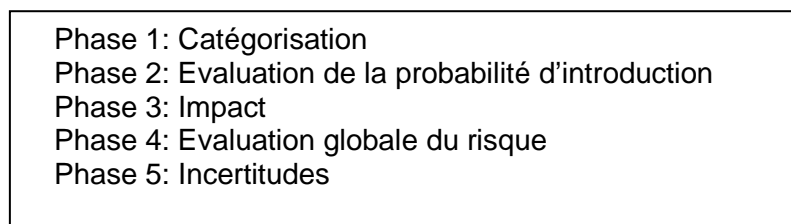


Fig 2. L'étape d'évaluation des risques phytosanitaires proprement dite comporte plusieurs phases successives et interdépendantes qui permettent d'obtenir une évaluation globale du risque ainsi que l'estimation d'un niveau d'incertitude.

La **catégorisation** est une évaluation rapide basée sur des questions simples qui permet de déterminer si une ARP complète doit être ou non entreprise. Elle permet d'éliminer des organismes qui ne présentent pas toutes les caractéristiques d'un organisme nuisible. L'un des avantages de la catégorisation est d'être effectuée, avec relativement peu d'informations. La catégorisation est particulièrement utile lors de l'évaluation d'une filière associée à une marchandise végétale. Face à un grand nombre d'organismes potentiellement présents, la catégorisation permet d'en éliminer rapidement un grand nombre avant un examen approfondi de la filière lors des phases suivantes.

L'**évaluation de la probabilité d'introduction** d'un organisme nuisible correspond, selon le glossaire FAO (IPPC, 2006), à la probabilité d'entrée dans la zone ARP suivie de la probabilité d'établissement dans cette même zone. On peut y associer la probabilité de dispersion, qui aura des conséquences sur l'impact de l'organisme nuisible dans la zone ARP.

La probabilité d'entrée est grossièrement fonction de plusieurs paramètres :

- Probabilité d'association avec la filière végétale à l'origine
- Probabilité de survie durant le transport de la marchandise
- Probabilité de survie aux procédures actuelles de contrôle phytosanitaire aux frontières

Les sources d'informations nécessaires à l'évaluation de ces probabilités incluent des données fournies par le pays exportateur (pratiques culturales, occurrence des organismes nuisibles, mesures phytosanitaires) ainsi que des données sur les conditions de transport (durée, température) et le type de contrôle phytosanitaire à l'arrivée (observations visuelles, analyses de laboratoire...).

La probabilité d'établissement est complexe à évaluer car elle repose sur :

- Les caractéristiques intrinsèques de l'organisme (type de reproduction, besoins climatiques...)
- Les caractéristiques de l'hôte végétal (disponibilité, pratiques culturales, répartition...)
- Les caractéristiques de l'environnement (facteurs biotiques et abiotiques)

Il existe des outils (cartes climatiques, modèles de comparaison climatique, modèles bioclimatiques type CLIMEX ou MAXENT...) qui permettent de matérialiser, éventuellement au travers d'un système SIG, les « zones en danger » à l'intérieur de la zone ARP. Ces cartes doivent cependant être interprétées par des experts pour en évaluer les incertitudes.

Le taux et la magnitude de la dispersion potentielle sont évalués en fonction :

- Du type de dispersion (naturelle, anthropique ...)
- De la vitesse de dispersion (capacités de vol, transport par le vent, par le sol, par les outils ...)
- Des caractéristiques de l'environnement (plante-hôte dispersée ou bien massivement présente)
- De l'existence ou non de barrières naturelles (mer, montagne)

L'évaluation de la dispersion peut être réalisée par une simple analyse comparative avec des espèces proches (dont on connaît déjà la dynamique de dispersion) ou bien en utilisant des modèles prédictifs plus complexes (mais aussi rarement disponibles) fonction des informations biologiques disponibles.

L'évaluation de l'**impact** consiste à étudier le potentiel de nuisance direct ou indirect ainsi que l'impact commercial, social ou environnemental de l'organisme nuisible. Une information qualitative ou quantitative est collectée sur :

- Les effets directs sur la plante ou la marchandise (rendement, qualité)
- Les effets directs sur les habitats naturels ou sur des cultures ornementales en milieu urbain
- Les effets indirects sur la commercialisation, l'exportation ou le tourisme
- Les effets indirects sur les biotopes (perturbation de cycles biologiques ou hydrologiques)

L'**évaluation globale du risque** (Figure 3) associe la probabilité d'introduction de l'organisme nuisible avec les conséquences de cette introduction (l'impact). Cette partie doit être particulièrement soignée car elle est un instrument de décision essentiel pour le gestionnaire du risque. L'évaluation peut être qualitative (échelle textuelle) ou quantitative (affectation de « notes »). Dans tous les cas, le niveau de risque acceptable (déterminé par le gestionnaire du risque) détermine l'amplitude des mesures phytosanitaires à prendre.

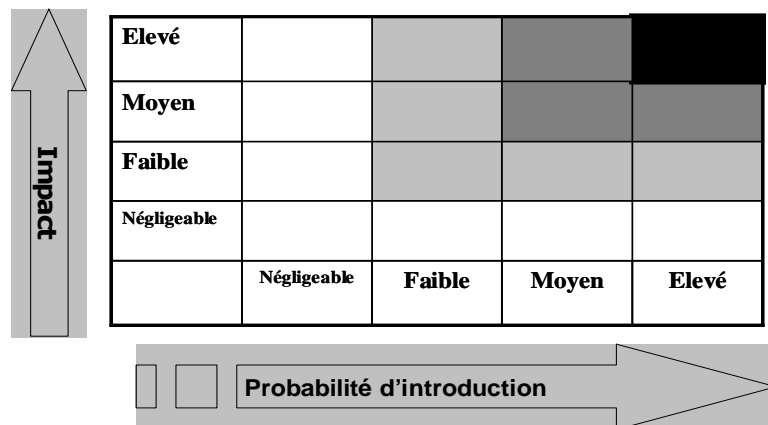


Fig 3. Matrice résultant de l'évaluation globale du risque. Le niveau de risque acceptable est déterminé par le gestionnaire du risque. Il peut correspondre à la zone la plus foncée de la matrice (= un risque élevé est acceptable) ou bien à une zone plus claire (dans ce cas, le risque identifié comme acceptable est plus faible).

Les **incertitudes** sont inhérentes à l'ARP car une information complète est rarement disponible. Par essence, l'ARP utilise des données anciennes pour prédire le futur, ou des données se rapportant à une zone géographique pour prédire le comportement d'un organisme nuisible dans une autre zone géographique. L'incertitude est systématiquement notée pour chacune des questions dans certaines normes internationales (cas de la norme OEPP³). Pour réduire les incertitudes, l'analyste du risque essaye de collecter plus d'informations ou consulte des experts. Si l'incertitude subsiste, l'analyste doit décrire tous les scénarios plausibles et formuler clairement des suppositions.

LA GESTION DU RISQUE

Si le risque est considéré comme acceptable par l'ONPV (voir Figure 1), l'ARP est terminée et l'étape de gestion du risque n'est pas débutée : aucune mesure n'est justifiée. Dans le cas contraire, l'analyse du risque se poursuit par l'identification des options qui peuvent être mises en œuvre (i) à l'origine ou dans le pays exportateur, (ii) au point d'entrée ou (iii) dans le pays importateur ou la zone envahie. Elle se termine par l'évaluation de l'efficacité de ces actions et l'identification des options les plus appropriées. Un jugement sur la fiabilité (efficacité, faisabilité et reproductibilité) de chaque mesure potentielle est fourni. Les limites (techniques ou économiques) d'application en pratique sont notées. Une fois que toutes les mesures potentielles sont identifiées, leur rapport coût-efficacité est évalué. Si une mesure seule n'est pas suffisante, elle peut être combinée avec une ou plusieurs autres mesures.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A l'issue de l'ARP, le risque d'introduction est évalué, l'impact potentiel connu et les incertitudes citées. Des mesures de diminution du risque ont été identifiées et évaluées. Ces mesures pourront être sélectionnées par le gestionnaire du risque. L'ARP apporte ainsi une homogénéité et une traçabilité des études et permet de futures mises à jour en fonction des nouvelles connaissances. C'est une source d'information disponible et vérifiable qui autorise une comparabilité et une complémentarité des analyses entre pays.

Il faut néanmoins souligner que la « science du risque » est encore jeune dans le domaine phytosanitaire. Elle pâtit donc toujours d'un manque d'outils et de procédures qui permettraient de faciliter l'utilisation des normes internationales.

Pour contourner cette difficulté, 13 pays de l'Union Européenne se sont associés au travers d'un projet européen intitulé « **PRATIQUE** » (Enhancements of **Pest Risk Analysis Techniques**). Ce projet a débuté en mars 2008 et se prolongera sur 3 ans (Baker et al., 2009). Il vise à :

- Réunir des données scientifiques, techniques et économiques nécessaires à la réalisation d'ARP valides sur l'ensemble de l'Union Européenne
- Entreprendre des recherches multidisciplinaires pour améliorer les techniques utilisées pour les ARP
- S'assurer que le schéma d'ARP retenu soit opérationnel et convivial pour l'utilisateur final

³ Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Baker R. H. A., Battisti A., Bremmer J., Kenis M., Mumford J., Petter F., Schrader G., Bacher S., De Barro P., Hulme P. E., Karadjova O., Lansink A. O., Pruvost O., Pysek P., Roques A., Baranchikov Y., Sun J.-H., 2009 - PRATIQUE: a research project to enhance pest risk analysis techniques in the European Union. *EPPO Bulletin* 39(1) : 87-93.

CIPV, 2004 - Analyse du risque phytosanitaire pour les organismes de quarantaine, incluant l'analyse des risques pour l'environnement et des organismes vivants modifiés. *NIMP n°11* (Ed. 2007), FAO, Rome. 137-163.

CIPV, 2006 - Glossaire des termes phytosanitaires. *NIMP n°5* (Ed. 2007), FAO, Rome. 65-88.

**IMPACT DES ITINERAIRES TECHNIQUES SUR LA DEGRADATION DES MOLECULES
PHYTOSANITAIRES DANS LES VINS**

M. GRINBAUM⁽¹⁾, P. COTTEREAU⁽²⁾, P. VUCHOT⁽³⁾

Institut Français de la Vigne et du Vin

⁽¹⁾IFV Orange - 04 90 11 46 25 - mgrinbaum@inter-rhone.com

⁽²⁾IFV Rodilhan - 04 66 20 67 07 - philippe.cottereau@vignevin.com

⁽³⁾Inter Rhône - 04 90 11 46 37 - pvuchot@inter-rhone.com

RÉSUMÉ

Certains itinéraires de vinification, notamment ceux qui utilisent le chauffage, peuvent entraîner une dégradation des molécules phytosanitaires et la formation de métabolites qui peuvent être plus ou moins toxiques que la molécule mère. L'étude mise en place en 2003 par l'IFV a pour objectif d'évaluer l'impact du chauffage sur la dégradation de quelques molécules fongicides dans les vins. Les techniques de vinification étudiées sont très utilisées dans les régions méridionales comme la MPC (Macération Préfermentaire à Chaud), la thermovinification ou encore la flash-détente. Les trois premières années d'étude montrent que la température et la durée de chauffage n'ont aucune influence sur la transformation du folpel en phtalimide ou de la procymidone en 3,5 dichloroaniline. En revanche, une dégradation plus importante du mancozèbe en son métabolite l'éthylène thiourée (ETU) est observée. L'enquête réalisée sur site en 2006, dans des caves coopératives qui utilisent ces techniques, confirme ces résultats en situation pratique. Toutefois, les teneurs en ETU retrouvées dans les vins sont le plus souvent négligeables et très éloignées des teneurs constatées en conditions expérimentales.

Mots-clés : résidu, métabolite, ETU, chauffage.

SUMMARY

Certain routes of winemaking and notably those using heating can lead to deteriorate phytosanitary products and forming metabolites putatively more or less toxic than the initial molecule. The goal of this work performed in 2003 by IFV was to assess the impact of heat on the destruction of some fungicidal molecules in wines. The winemaking studied here, are currently used in the southern regions, such as pre-fermentation maceration under heat, thermovinification or flash-release. Results of the three former years showed that the temperature as well as the heating period did not influence neither the transformation of folpel in phtalimide nor procymidone in 3.5 dichloroaniline. On the other hand, a more important degradation of mancozebe in corresponding metabolite ethylene thiourée (ETU) is noticed. Cooperative cellars using such winemaking were interviewed in 2006 and they validated this study led in experimental conditions. However, the contents of ETU found in wines were usually much lower than the contents noted in experimental conditions.

Key words: residue, metabolite, heating, ETU.

INTRODUCTION

La recherche de résidus de produits phytosanitaires dans les vins a fait l'objet de nombreuses enquêtes et études qui ont permis de cerner les molécules qui peuvent se retrouver dans les vins. En revanche, l'étude des produits de dégradation de ces molécules fait l'objet de peu de recherches. Aussi, peu de données sont actuellement disponibles sur ce sujet. L'objectif de cette étude est de connaître l'impact des techniques de vinification utilisant le chauffage, sur le devenir de quelques molécules fongicides et la formation de leurs métabolites. Les techniques comme la MPC (Macération Préfermentaire à Chaud), la thermovinification ou encore la flash-détente, sont très utilisées, notamment dans les régions méridionales.

MATERIEL ET METHODES

Le choix des molécules

Le choix des matières actives (tabl.1) s'est fait à partir des résultats de la synthèse bibliographique réalisée avant le début de l'étude:

- le folpel est présent sur raisin, puis disparaît très vite pendant la vinification dite classique pour s'hydrolyser en phtalimide (Bertrand, Darriet et al, 1997 ; Cabras, Angioni et al, 1997 ; Viviani-Nauer, Hoffmann-Boller et al, 1997).
- les dithiocarbamates (mancozèbe) peuvent se retrouver dans les raisins et les vins et se transforment après chauffage en éthylène thiourée (ETU), produit classé cancérigène et plus toxique que la molécule de départ (Duffour, 1991).
- la procymidone est souvent présente dans les raisins et les vins et se transforme en 3,5 dichloroaniline (3,5 DCA) pendant la fermentation (Pirisi, 1986).

L'étude en laboratoire

Cette étude permet de vérifier l'effet de la température sur les molécules étudiées. Elle est réalisée sur moût synthétique dans lequel sont ajoutées les molécules à deux niveaux de concentrations : D1 (dose faible) et D2 (dose forte). D1 représente les teneurs pouvant être rencontrées dans les raisins à la récolte, D2 correspond à la valeur de la LMR raisins en vigueur au moment de l'étude (tabl.2).

Deux plans de chauffe encadrant les extrêmes sont ainsi mis en place en 2003 et 2004:

- 60°C pendant 20 h et 30 min
- 90°C pendant 1 h et 5 min.

Des prélèvements de moût synthétique avant et après ajout, ainsi qu'avant et après chauffage, sont réalisés pour analyser les résidus.

L'étude en plein champ et en cave expérimentale

Cette étude conduite en cave expérimentale, avec des applications de plein champ, permet de comparer dans les conditions de la pratique la vinification classique avec la thermovinification, la M.P.C. ou la flash-détente vis-à-vis de leur effet sur les niveaux de résidus. Deux régions sont étudiées de manière à tester deux itinéraires techniques différents très utilisés dans chacune d'elles. Des prélèvements à différents stades sont effectués permettant de suivre l'évolution de la molécule mère et de son métabolite, tout au long du process de transformation.

Région PACA

Lieu : Lycée Vitivinicole d'Orange

Cépage : Grenache

En 2003 et 2004, deux parcelles de 6000 m² (témoin et traité) sont mises en place afin de récolter environ 700 kg de vendange pour la flash-détente et 60 kg pour la mini-vinification classique.

En 2005, deux parcelles (témoin et traité) de 1 ha (environ 1500 kg de vendange chacune) sont mises en place, afin de récolter environ 700 kg de vendange pour la flash-détente et la thermovinification et 80 kg pour la MPC et la mini-vinification classique.

Région Languedoc-Roussillon (LR)

Lieu : Lycée Agricole de Rodilhan

Cépage : Merlot

En 2003 et 2004, deux parcelles (témoin et traité) d'environ 120 kg de vendange chacune pour les mini-vinifications classique (60 kg) et MPC (60 kg) sont mises en place.

En 2005, deux parcelles (témoin et traité) d'environ 240 kg de vendange chacune pour les mini-vinifications classique (80 kg), thermovinification (80 kg) et MPC (80kg) sont mises en place.

Le même programme et la même stratégie de traitement sont appliqués sur les parcelles traitées des essais d'Orange et de Rodilhan (tabl. 3).

Méthode d'élaboration des vins

Les trois premières années les mini vinifications suivantes sont réalisées par région, sur les deux lots de vendanges témoin et traité (tabl. 4) :

Flash détente : chauffage à 90°C pendant 10 minutes, détente permettant de faire le vide et de refroidir la vendange à 25°C, pressurage direct puis levurage à 10 g/hL.

Thermovinification : chauffage pendant 30 minutes à 70°C (sans détente donc la vendange sort chaude) puis pressurage direct après refroidissement à 40°C.

MPC : chauffage et macération pendant 7 h à 70°C (région PACA) et 12h à 70°C (région LR) puis levurage et pressurage après refroidissement à 25°C.

Vinification traditionnelle : vendange éraflée, foulée puis sulfitée entre 3 et 7 g/hL, selon son état sanitaire. Les raisins sont levurés puis mis à macérer 7 jours avec un remontage quotidien. Après assemblage des jus de goutte et jus de presse, les vins sont soutirés puis mis en bouteilles.

Remarque : en région PACA un pilote est mis à disposition par les Etablissements FABRI pour la flash-détente et la thermovinification. Débit : 1,5 T/h de vendange éraflée non égouttée.

En 2006, pour la dernière année d'étude, l'action a lieu sur site dans des caves coopératives de PACA et Languedoc Roussillon.

Les caves sont choisies en fonction des deux critères suivants :

- utilisation de techniques de vinification par chauffage (flash détente, thermovinification) comparées à une vinification traditionnelle sans chauffage de la vendange.
- utilisation par les adhérents des caves de dithiocarbamates (mancozèbe, métirame de zinc, manèbe, propinèbe) en proportion significative.

Après enquête, 7 caves ont été sélectionnées (dont 3 en Languedoc Roussillon et 4 en Vallée du Rhône). Le choix a porté préférentiellement sur celles pour lesquelles l'utilisation des dithiocarbamates était avérée dans les calendriers de traitement. Les pourcentages de coopérateurs utilisant des dithiocarbamates varient de 20 à 85 % selon les caves étudiées.

Méthode de détermination des résidus

Des analyses de résidus des molécules mères et de leurs métabolites respectifs sont réalisées sur les moûts synthétiques, les raisins, les moûts avant chauffage, les moûts après chauffage et les vins. Elles sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et liquide (HPLC) ou par spectrophotométrie UV, selon des méthodes spécifiques et validées en interne (tabl. 5).

RESULTATS ET DISCUSSION

Etude en laboratoire

En 2003, on constate que le folpel se dégrade très vite en phtalimide, dès son ajout dans le moût synthétique, avant même les premiers chauffages et quelle que soit la dose (Fig.1). Aucun résidu de folpel n'est plus détecté à la Limite de Quantification (LQ), dans les modalités chauffées, quelles que soient la température et la durée du chauffage du moût. Enfin, on n'observe pas de différence significative entre les teneurs en phtalimide retrouvées dans les différentes modalités chauffées (0,120 mg/L de moyenne pour D1 et 1,2 mg/L de moyenne pour D2). La durée et la température du chauffage ne semblent donc avoir aucune influence sur la transformation du folpel en phtalimide.

En 2003 et 2004, le mancozèbe se dégrade également en ETU dès son ajout dans le moût synthétique, avant même les premiers chauffages et ceci pour les deux doses D1 et D2 (fig.2). Pour le rajout à la dose D1, le mancozèbe n'est plus détecté à la LQ dans le moût chauffé, à l'exception de la modalité chauffée 30 min à 60°C, pour laquelle il reste encore 0,125 mg/L en 2003 et 0,155 mg/L en 2004. Par contre, pour les rajouts à la dose D2, le mancozèbe est décelé lors des deux années d'étude, dans toutes les modalités chauffées, à l'exception de la modalité 60°C pendant 20 h. En 2003 et 2004, toutes les modalités chauffées contiennent des résidus d'ETU. Ils se retrouvent en quantité plus importante dans les modalités 90°C pendant 1 h et 60°C pendant 20 h, et ceci pour les deux doses D1 et D2. Le chauffage entraîne donc une nette diminution des résidus de mancozèbe dans les moûts et une apparition d'ETU d'autant plus importante que le chauffage est intense et sa durée longue.

En 2004, des résidus de procymidone sont détectés dans toutes les modalités, chauffées ou non et quelles que soient la température et la durée du chauffage du moût (fig. 3). Les teneurs en procymidone retrouvées dans les différentes modalités ne présentent pas de différence significative (0,44 mg/L de moyenne pour D1 et 4,0 mg/L de moyenne pour D2). La procymidone ne semble pas se dégrader, car on ne détecte aucun résidu de 3,5 DCA dans les moûts avant et après chauffage et ceci pour les deux doses.

Etude en plein champ

Les résultats des analyses de résidus des trois premières années d'étude menée en conditions expérimentales montrent que des résidus de folpel, procymidone et mancozèbe sont retrouvés dans les **raisins** traités des deux essais. Toutefois, aucun dépassement de LMR (Limite Maximale de Résidu) n'est constaté (fig. 4). On note également la présence de phtalimide. Ceci montre que le folpel est déjà métabolisé en partie dans le raisin en phtalimide. En 2003, aucun résidu de folpel n'est détecté, dans aucune des modalités de **vin**. En revanche, des résidus de **phtalimide** sont décelés dans les moûts et les vins traités, mais il n'y a pas de différence significative entre les modalités chauffées ou non chauffées, quel que soit le mode de vinification et la région (tab.6). En 2004, des résidus de procymidone sont décelés dans les moûts et les vins traités, mais on ne constate pas de différence significative entre les modalités chauffées ou non chauffées, les modes de chauffage et les régions. En 2005, pour l'essai de Rodilhan, aucun résidu de **procymidone** n'est détecté dans les vins finis quel que soit le type de vinification, avec ou sans chauffage. Pourtant, les raisins contiennent bien de la procymidone mais à des teneurs beaucoup plus faibles (5 à 7 fois moins) que ceux de l'essai d'Orange ou issus des essais 2004. Pour l'essai d'Orange, des résidus sont décelés dans les vins traités mais on ne constate pas de différence significative entre les modalités chauffées ou non chauffées. En ce qui concerne la **3,5 DCA**, en 2004, des teneurs sont décelées dans les vins en fin de fermentation alcoolique, traités et chauffés des 2 régions mais à des niveaux faibles, proches de la LQ. Les différences observées ne sont pas significatives. En 2005, aucun résidu de 3,5 DCA n'est décelé dans les vins finis (tab.6).

Pendant les trois années d'étude expérimentale, aucun résidu de mancozèbe n'est retrouvé dans les **vins** chauffés ou non des deux régions (tab.6). Des teneurs en ETU sont par contre décelées dans tous les vins traités de Rodilhan et d'Orange (fig. 5). On constate des teneurs

plus importantes en ETU dans les vins chauffés que dans les vins non chauffés (environ 3 à 5 fois plus). Les teneurs retrouvées vont de 0,026 à 0,038 mg/L (9 à 13 % de la DJA [Dose Journalière Acceptable]) pour les vins traditionnels et de 0,044 à 0,159 mg/L (16 à 56 % de la DJA) pour les vins issus de vendange chauffée (cf. encart DJA).

Enquête sur site

Les résultats des analyses d'ETU réalisées lors de l'étude sur site en 2006 montrent :

- dans les cuvées prélevées dans les caves en PACA (résultats non montrés) : l'absence de résidus d'ETU dans tous les vins issus de vinification traditionnelle ainsi que dans la majorité des vins issus de vendange chauffée. Quelques traces d'ETU proches de la LQ (0,004 mg/l) sont toutefois retrouvées dans quelques cuvées flashées ou thermovinifiées.
- dans les cuvées prélevées dans les caves en Languedoc-Roussillon (fig. 6) : la présence d'ETU dans la quasi-totalité des vins qu'ils soient issus de vendange chauffée ou pas. De plus, les résidus détectés dans les vins issus de vendange chauffée sont plus élevés que ceux détectés dans les vins issus de vendange classique.

Les teneurs retrouvées en PACA (0,004 mg/L à 0,008 mg/L) sont plus basses qu'en Languedoc Roussillon (0,004 mg/L à 0,056 mg/L). Cela peut s'expliquer par le fait que les dithiocarbamates sont beaucoup moins utilisés en PACA (entre 20 et 53 % des viticulteurs) qu'en Languedoc Roussillon (75 à 85 % des viticulteurs).

On peut constater également que dans l'ensemble, les vendanges flashées contiennent des teneurs en ETU plus importantes que les vendanges thermovinifiées, lesquelles contiennent des teneurs en ETU plus élevées que les vendanges vinifiées traditionnellement. Cela confirme les résultats obtenus en conditions expérimentales : **la formation d'ETU est liée à la température de chauffage de la vendange. Plus celle-ci est élevée, plus les teneurs en ETU sont importantes.**

Les teneurs retrouvées dans l'ensemble des caves restent toutefois faibles et sont très en deçà des teneurs constatées en conditions expérimentales. Les vins issus de vendange chauffée ne représentent plus qu'1 à 20 % de la DJA contre 1 à 8 % pour les vins traditionnels (cf. encart DJA). Ces différences observées en condition de grand volume, semblent montrer un effet dilution, dû au fait qu'un certain pourcentage seulement de viticulteurs utilise les dithiocarbamates. De plus, en conditions expérimentales, le mancozèbe était appliqué 3 fois pendant la campagne à la dose de 1000g/ha (soit un apport cumulé de 3000 g/ha) alors que sur site, les viticulteurs l'utilisent entre une et 6 fois dans la campagne mais avec des doses cumulées variables, souvent inférieures à 3000 g/ha.

CONCLUSION

Les trois premières années d'étude menées en conditions expérimentales montrent que la température ou la durée du chauffage n'ont aucune influence sur la dégradation du folpel en phtalimide, et très peu sur celle de la procymidone en 3,5 DCA. En effet, les résultats en laboratoire ne laissent pas apparaître de différence entre les modalités chauffées et non chauffées, ce qui est confirmé par l'étude plein champ, pour laquelle aucune différence significative n'a été constatée entre les techniques de vinification classique, MPC, thermovinification et flash-détente. En revanche, une dégradation plus importante du mancozèbe en son métabolite l'éthylène thiourée est constatée dans les vins issus de vendange chauffée.

L'enquête réalisée en 2006 dans des caves coopératives utilisant les dithiocarbamates et des techniques de vinification par chauffage de la vendange, a permis de confirmer la transformation des résidus de dithiocarbamates (mancozèbe, manèbe, métirame de zinc) en ETU dans les vins, surtout si la vendange a été chauffée. Toutefois, les teneurs d'ETU retrouvées dans les vins sont le plus souvent négligeables et très loin des teneurs

constatées en situation pilote. Ces résultats sont plutôt rassurants et démontrent qu'il ne devrait pas y avoir de problème de résidus d'ETU dans les vins obtenus avec des itinéraires techniques utilisant le chauffage en cave coopérative, surtout en année à faible pression phytosanitaire.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été conduite grâce à la collaboration de la société Fabbri, d'Inter-Rhône et des lycées vitivinicole d'Orange et de Rodilhan.

BIBLIOGRAPHIE

- Bertrand A., Darriet Ph., Dubourdieu D. & Hatzidimitriou E., 1997. Hydrolyse du folpel. Incidences sur le déclenchement de la fermentation alcoolique. *J. In. Sci. Vigne et Vin* **31** (1), 51-55.
- Cabras P., Angioni A., Garau V., Melis M., Pirisi F., Farris Giovanni A., Sotgui C. & Minelli E., 1997. Persistence and metabolism of Folpel in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 476-479.
- Duffour Grégoire J., 1991. Résidus des dithiocarbamates et de l'éthylène thiourée. Aspects toxicologiques et analytiques. Thèse présentée pour le doctorat de l'Université de Montpellier I.
- Pirisi F., 1986. Dégradation of dicarboximidic fongicides. *Pestic. Sci.* **17**, 109-118.
- Viviani-Nauer A., Hoffmann-Boller P. & Gafner J., 1997. In vivo detection of folpet and its metabolite phthalimide in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **48** (1).

Encart :

DJA : un outil pour évaluer le risque pour le consommateur.

Rappelons que la DJA est la Dose Journalière Acceptable qui correspond à la Dose sans Effet (dose à laquelle on n'observe aucun effet chez l'animal de laboratoire le plus sensible soumis au test le plus sévère) divisée au minimum par 100. La DJA d'une substance active correspond à la quantité de résidus pouvant être ingérée par une personne d'un poids donné, chaque jour de sa vie, sans risque pour sa santé. Les DJA sont fixées soit par la Commission Européenne, soit par des instances communautaires. L'apport journalier maximum théorique ou AJMT doit être inférieur à 100 % de la DJA. La DJA de l'ETU étant de 0,002 mg/kg de poids corporel/jour, un homme de 60 kg peut donc consommer jusqu'à 0,12 mg d'ETU par jour à travers son alimentation. Si l'on tient compte de la consommation en vin au percentile 97,5 (0,423 L/personne/jour) et des autres sources potentielles d'apport d'ETU dans l'alimentation (épinard, tomate, pomme, haricot ...), il ne faudrait pas dépasser une valeur de l'ordre de 0,1 mg/L d'ETU dans les vins soit 35 % de la DJA. A titre d'exemple, pour une consommation de 0,423 L /jour d'un vin (soit environ 4 verres de vin) contenant la valeur maximale d'ETU retrouvée sur site dans cette étude cela correspond à un apport journalier de 0,0237 mg d'ETU soit 20 % de la DJA.

| Année d'étude | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
|-------------------------------|---|---|---|------|
| Molécules + Métabolites | Folpel + Phtalimide + Mancozèbe + ETU | Procymidone + 3,5 DCA + Mancozèbe + ETU | Procymidone + 3,5 DCA + Mancozèbe + ETU | ETU |

ETU: éthylène thiourée – DCA: dichloroaniline

* Le mancozèbe appartient à la famille des dithiocarbamates. Le chauffage des dithiocarbamates avec une solution de chlorure stanneux et d'acide chlorhydrique produit du sulfure de carbone ou CS₂. Les limites maximales en résidus sont établies pour l'ensemble des composés de ce groupe et se réfèrent au CS₂. Pour le raisin la LMR du mancozèbe est de 2,0 mg/kg de CS₂.

Tableau 2 : Concentrations de molécules phytosanitaires ajoutées dans le moût synthétique - Concentration of phytosanitary molecules added in the synthetic must

| Années | 2003 | | 2004 | |
|--|------|-----|------|-----|
| | D1 | D2 | D1 | D2 |
| Doses d'ajout en mg/kg | | | | |
| Folpel | 0,3 | 3,0 | | |
| Procymidone | | | 0,5 | 5,0 |
| Mancozèbe* (exprimé en sulfure de carbone CS ₂) | 0,5 | 2,0 | 0,5 | 2,0 |

Tableau 3 : Programme de traitement appliqué sur les parcelles traitées des essais d'Orange et de Rodilhan - Program of treatment applied on treated plots of Orange and Rodilhan

| Années | 2003 | 2004 | 2005 |
|---|---|---|---|
| Anti-mildiou 3 applications du début floraison à la fermeture de la grappe (4 en 2003) | Mikal à 4,0 kg/ha (25 % de folpel , 50 % de fosétyl-al) | | |
| | Rhodax à 4,0 kg/ha (25 % de mancozèbe , 50 % de fosétyl-al) | Rhodax à 4,0 kg/ha (25 % de mancozèbe , 50 % de fosétyl-al) | Rhodax à 4,0 kg/ha (25 % de mancozèbe , 50 % de fosétyl-al) |
| Anti-botrytis Une application au stade C (début véraison) | | Kimono à 1,5 L /ha (500 g procymidone) | Kimono à 1,5 L /ha (500 g procymidone) |

Tableau 4 : Types de mini-vinifications réalisées en PACA et en Languedoc-Roussillon – Sorts of mini-winemaking performed in PACA and Languedoc-Roussillon

| Région | 2003 | | 2004 | | 2005 | |
|-----------------------------|------|----|------|----|------|----|
| | PACA | LR | PACA | LR | PACA | LR |
| Vinification traditionnelle | * | * | * | * | * | * |
| Flash-détente | * | | * | | * | |
| thermovinification | | | | | * | * |
| MPC | | * | | * | * | * |

| Tableau 5 : Méthodes de détermination des résidus – Methods of determination of residues | | |
|--|-------------------------------|--|
| Matière active et métabolite | Méthode de détermination | Limite de Quantification (LQ) en mg/L ou mg/kg |
| Folpel | CPG / capture d'électrons | 0,040 Raisins et moûts |
| | | 0,004 Vins et moûts synthétiques |
| <i>Phtalimide</i> | CPG / détecteur thermoïonique | 0,050 Raisins et moûts |
| | | 0,050 Vins et moûts synthétiques |
| Procymidone | CPG/ capture d'électrons | 0,020 Raisins et moûts |
| | | 0,020 Vins et moûts synthétiques |
| <i>3,5 DCA</i> | CPG/ capture d'électrons | 0,020 Raisins et moûts |
| | | 0,010 Vins et moûts synthétiques |
| Mancozèbe* (exprimé en CS2) | Spectrophotométrie visible | 0,200 Raisins et moûts |
| | | 0,100 Vins et moûts synthétiques |
| <i>Ethylène Thiourée (ETU)</i> | HPLC/ barrettes de diodes | 0,020 Raisins et moûts |
| | | 0,020 Vins et moûts synthétiques |
| | | 0,004 en 2006 |

*Les LQ du mancozèbe sont exprimées en CS2, sachant que 1 mg de CS2 correspond à 1,776 mg de mancozèbe.

Figure 1 : Dégradation du folpel en phtalimide (mg/L) - moût synthétique – 2003
Deterioration of folpel in phtalimid (mg/L) – synthetic must - 2003

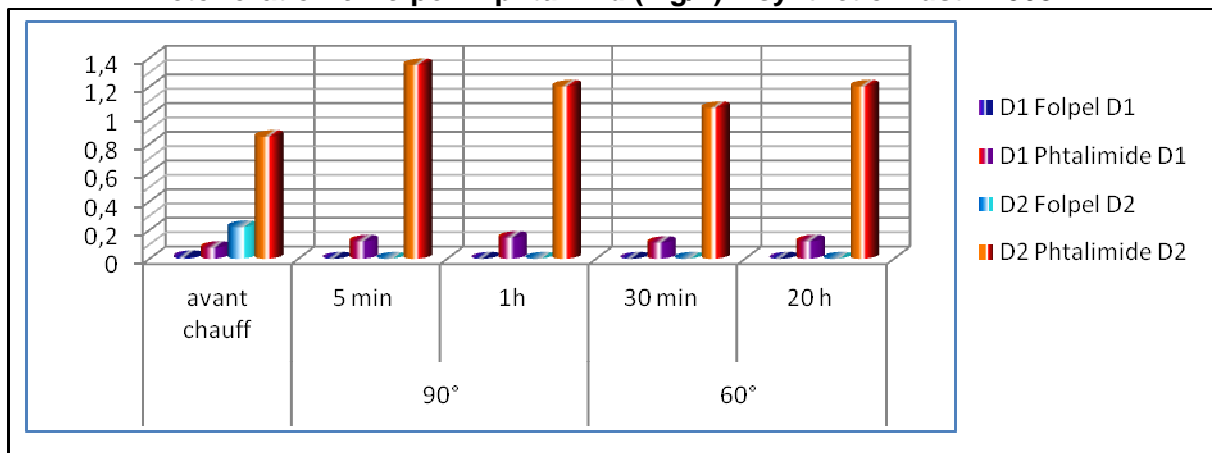


Figure 2 : Dégradation du mancozèbe en ETU (mg/L) - moût synthétique – 2003-2004
Deterioration of mancozeb in ETU (mg/L) – synthetic must -2003-2004

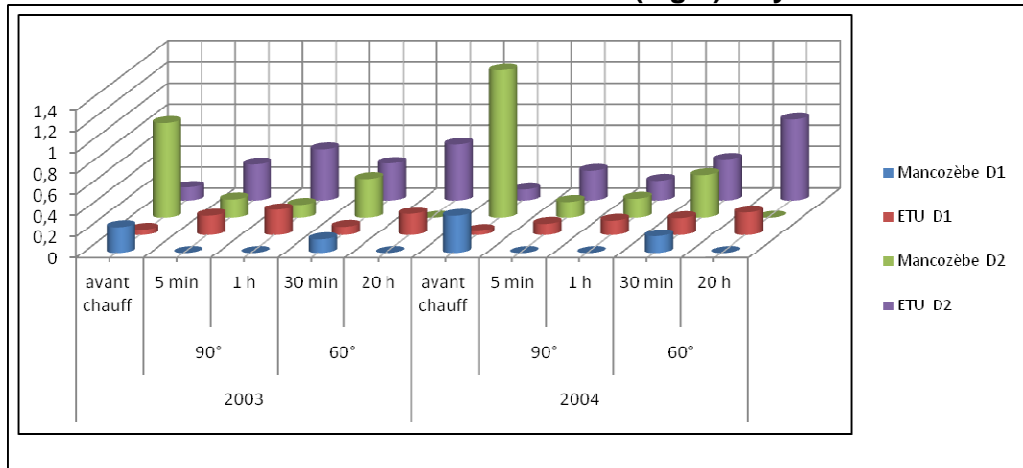


Figure 3: Dégradation de la procymidone en 3,5 DCA (mg/L) - moût synthétique – 2004
Deterioration of procymidon in 3.5 DCA (mg/L) – synthetic must - 2004

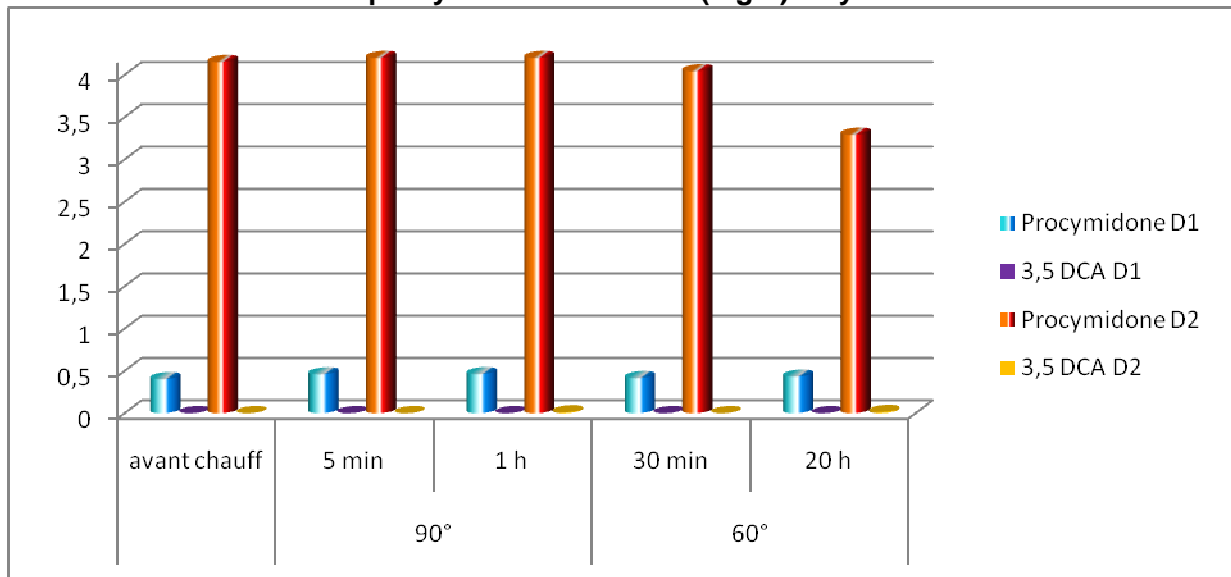


Figure 4 : Moyenne des résidus retrouvés dans les raisins en mg/kg-2003-2004-2005
Average of residues found in grapes in mg/kg – 2003-2004-2005

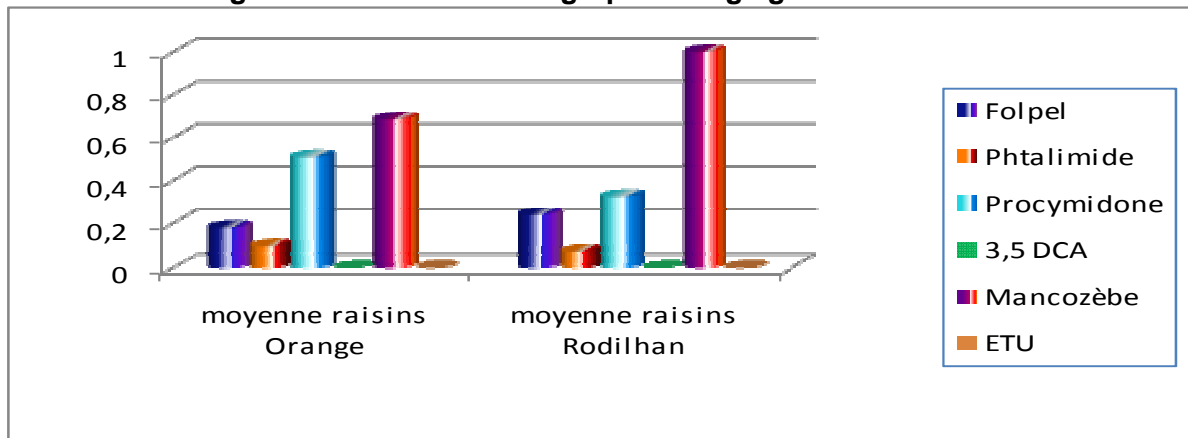


Figure 5 : Teneurs en ETU dans les vins en mg/L- Essais Orange et Rodilhan 2003-2004-2005

Contains of ETU in wines in mg/L – Orange and Rodilhan 2003-2004-2005

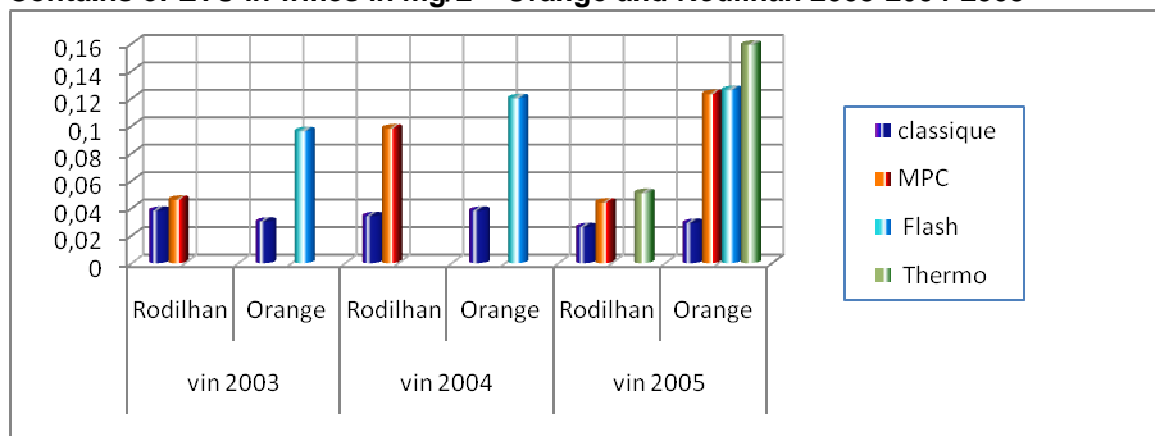


Figure 6 : teneurs en ETU dans les vins en mg/L- Cave coopérative Languedoc-Roussillon – 2006

Contains of ETU in wines in mg/L- Cooperative cellars Languedoc-Roussillon - 2006

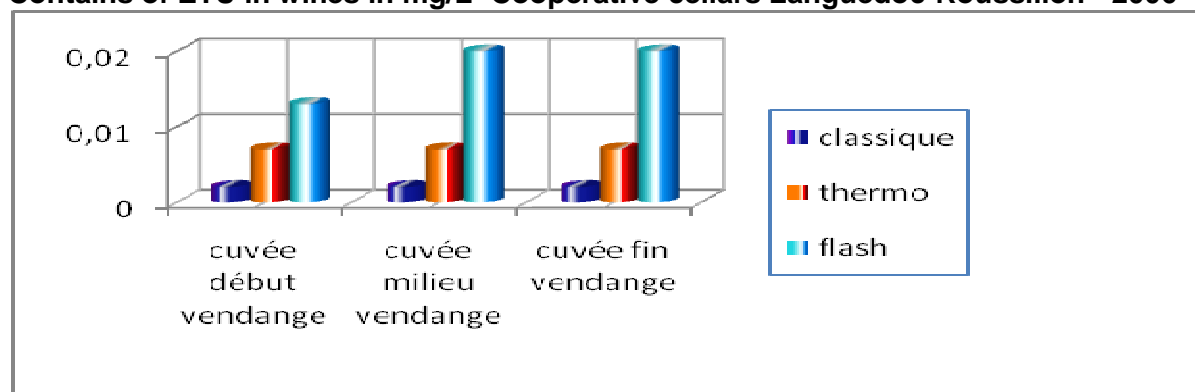


Tableau 6 : Présence de résidus dans les raisins et les vins analysés-synthèse 2003 - 2006

Residues in grapes and wines- synthesis 2003-2006

| | année | molécule | raisins | Vins | Vins chauffés | résultat | |
|----------------------|------------------|-------------|---------|------|--|--|-----|
| Etude en plein champ | 2003 | folpel | + | - | - | DNS | |
| | | phtalimide | + | + | + | DNS | |
| | 2004, 2005 | procymidone | + | + | (2004 et 2005 orange) - (2005 rodilhan) | (2004 et 2005 orange) - (2005 rodilhan) | DNS |
| | | 3,5 DCA | - | + | +(2004) -(2005) | +(2004) -(2005) | DNS |
| | 2003, 2004, 2005 | mancozèbe | + | - | - | - | DNS |
| | | ETU | - | + | + | + | > |
| Enquête sur site | 2006 | ETU PACA | | - | + | +(traces) | > |
| | | ETU LR | | + | + | + | > |

+ : présence

- : absence

DNS : différences non significatives entre modalités (chauffées ou non, entre modes de chauffage, entre régions)

> : Concentrations supérieures à celles des vins non chauffés

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TRICHODERMA BIOCONTROL ISOLATES USING
RAPD PROCEDURE

N. M. ABOU-ZEID¹; A.Y. AHMED¹; E. M. GADO² AND A. A. MOSA²

¹- Plant Pathology Research institute, Agriculture Research Center, Giza, Egypt.

²- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ain shams University, Cairo, Egypt.
Email: nagiabouzeid@link.net

SUMMARY

A collection of *Trichoderma* isolates, obtained from different geographic regions in Egypt, with different biocontrol capabilities, were characterized by molecular methods. The RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) procedure with 6 arbitrary primers, were used to distinguish between *Trichoderma* species. Primer No. 4 was able to distinguish among species of *Trichoderma*. Nine of *T. harzianum* were characterized as exhibited in one group, However, one isolate from *T. harzianum* group joined *T. hamatum* group, On the other hand *T. aureoviride* group have only two isolates , among the groups of *T. viride*, *T. atroviride* and *T. strictipile* have only one isolet for each.

Keywords: *Trichoderma*, Biocontrol, molecular identification, RAPD.

INTRODUCTION

Trichoderma spp. are free-living fungi that are highly interactive in root, soil and foliar environments (Kubicek and Harman, 1998 Vol.1&2 and Harman et al, 2004). *Trichoderma* species have long been recognized as agents for the control of plant disease (Chet, 1990 and Herman et al, 2004). Many biocontrol strains have no known sexual stage and therefore, in nature, the fungi persist as clonal, often heterocaryotic, individuals and populations that probably evolve independently in the asexual stage (Harman et al, 1998).

Identification of *Trichoderma* species has had a chequered history and the literature contains conflicting identification (Rifai 1969, Bissett 1984 and Kubicek and Harman, 1998 Vol.1&2). *Trichoderma* has been classified into nine species aggregates by Rifai (1969), based on morphological descriptions of colony growth and conidiophores. This implies that each species name may correspond to a number of different species. The taxonomies of *Trichoderma* spp. have been revised significantly, and many new species have been recognized (Domsch et al, 1980 and Bissett, 1984; 1991 a&b). However, classical approaches based on the use of morphological criteria are, as in several other fungi, difficult to apply to *Trichoderma*, due to the plasticity of characters (Druzhinina and Kubicek, 2004). Because of the growing interest in using *Trichoderma* species as biocontrol agents, a reliable and precise system for strains identification is important. Molecular characterization and identification has gained popularity over the past decade and reliable differentiation between and among *Trichoderma* isolates has been reported (Maymon et al, 2004 and Kubicek et al, 2008). A comparison of *Trichoderma* strains using isoenzyme patterns (Zamir and Chet 1985 and Siddiquee et al 2007), recognition of *Trichoderma* antigens by specific antiserum (Carter & Lynch 1991) has been suggested for strains identification but this comparison is useful only under standardized conditions. With the recent advent of a reliable, DNA aided identification systems for all known taxa of *Trichoderma* and *Hypocrea* (the telomorph of some *Trichoderma* spp.), it became now possible to study some of the biological fundamentals of the diversity in this fungal genus in more detail (Kubicek et al, 2008). In this paper we demonstrate the use of the RAPD technique (Williams et al, 1990), as an identification method for a diverse collection of *Trichoderma* isolates collected from different regions and sources in Egypt. This procedure, which incorporates the PCR (polymerase chain reaction) technique, does not depend on DNA sequence information and can generate amplification patterns from only a small amount of DNA (Gilly et al, 1996).

MATERIAL AND METHODS

Fungal cultures and growth conditions

Out of 81 isolates of single spore *Trichoderma* spp. isolated from rhizosphere and phyllosphere of various plant species grown in different districts in Egypt, were selected nineteen isolates. These isolates were previously identified based on morphological criteria and BIOLOG System (Verena et al, 2006) and was classified into six species (Ahmed, A.Y, unpublished data). The isolates include ten isolates of *T. harzianum* Rifai, four of *T. hamatum* (Bonord.) Bainier, two of *T. auroveride* Rifai and one isolates of *T. atroviride* P. Karsten, *T. viride* Persoon and of *T. strictipile* Bissett. All cultures were maintained on potato dextrose agar (PDA) slants at 4°C (Table 1).

Extraction of DNA

One hundred ml of potato dextrose broth in 250-ml Erlenmeyer flasks were inoculated with mycelial disks of each of the cultures derived from colony margins and incubated at 26°C for 5 days in the dark. Mycelial mats were collected on filter paper in a Buchner funnel, washed with distilled water and freeze-dried overnight.

DNA was extracted using freeze-dried ground mycelium (50 mg) and the DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN).

Table1: Isolates of *Trichoderma spp.* isolated from different Source and origins in Egypt.

| Isolate No. | <i>Trichoderma</i> Species and origin | * Isolate code | Source and origins |
|-------------|---------------------------------------|----------------|---------------------|
| T19 | <i>T. harizianum</i> | F T19 | Behaira/ Faba bean |
| T101 | <i>T. harizianum</i> | F T101 | Behaira/ Faba bean |
| T44, | <i>T. harizianum</i> | F T44 | Minufya/ Citrus |
| T48, | <i>T. harizianum</i> | F T48 | Minufya/ Citrus |
| T104 | <i>T. harizianum</i> | F T104 | Minufya/ Citrus |
| T55, | <i>T. harizianum</i> | F T55 | Bani-Suef/ Lentil |
| T72, | <i>T. harizianum</i> | F T72 | Bani-Suef/ Chickpea |
| T77 | <i>T. harizianum</i> | F T77 | Bani-Suef/ Chickpea |
| T78 | <i>T. harizianum</i> | F T78 | Sakha/ Faba bean |
| T24 | <i>T. harizianum</i> | F T24 | Sharkia/ Faba bean |
| T52, | <i>T. hamatum</i> | F T52 | Minufya/ Citrus |
| T54, | <i>T. hamatum</i> | F T54 | Bani-Suef/ Lentil |
| T73 | <i>T. hamatum</i> | F T73 | Bani-Suef/ Lentil |
| T36 | <i>T. hamatum</i> | F T36 | Bani-Suef/ Chickpea |
| T100 | <i>T. strictipile</i> | F T100 | Sakha/ Flax |
| T2 | <i>T. viride</i> | F T2 | Behaira/ Faba bean |
| T41 | <i>T. aureoviride</i> | F T41 | BRCS |
| T51 | <i>T. aureoviride</i> | F T51 | Sharkia/ Flax |
| T58 | <i>T. atroviride</i> | F T58 | Bani-Suef/ Chickpea |

* **Isolate code:** code of Biological Resource Center Standard Project.

****BRCS:** Biological Resource Center Standard Unit, Plant Pathology Research Institute, ARC, Egypt.

Primers

Six random primers of 10 nucleotides each, obtained from Amersham Pharmacia Biotech. were used. Sequences of the representative primers are: 1: 5'-d (GGTGCGGGAA)-3' , 2: 5'-d (GTTTCGCTCC)-3', 3: 5'-d (GTAGACCCGT)-3', 4: 5'-d (AAGAGCCCGT)-3', 5: 5'-d (AACGCGCAAC)-3', and primer 6; 5'-d (CCCGTCAGCA)-3',

PCR amplification

One μ l from extracted DNA (25 mg/ μ l) and primers (25 mMol) was added to the tablet PCR beads (manufactured by Amersham pharmacia Biotech) that contain all of the necessary reagents for amplification reaction. The total volume was completed to 25 μ l using sterile distilled water.

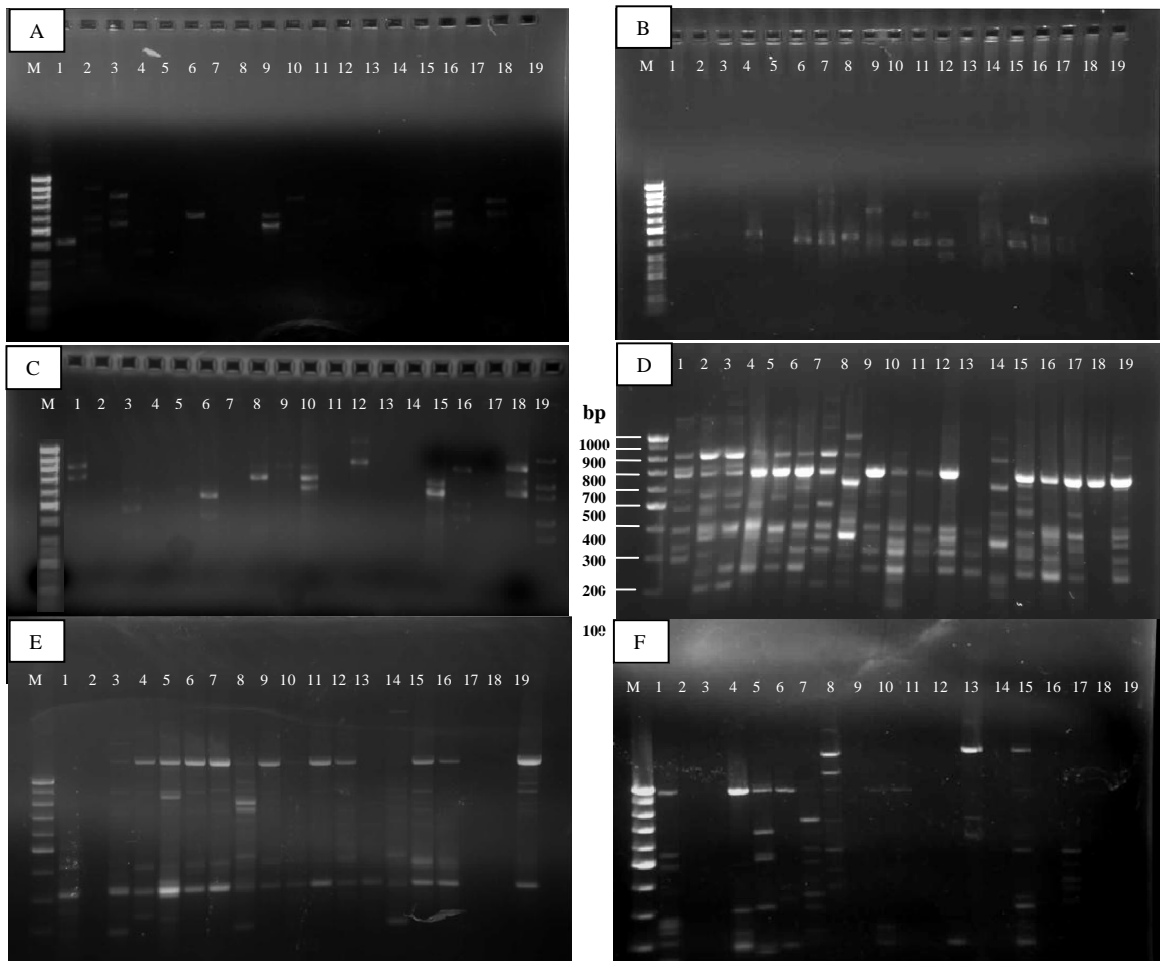
PCR unit II Biometra thermo cycler was used for DNA amplification as following: one cycle of denaturation at 94° for 7 min, low stringency annealing of the primer at 35° for 1 min, and extension at 72° for 1 min. Forty additional cycles were run, at the end of these cycles, an additional run at 72° was conducted for 5 min. the products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and detected by staining with ethidium bromide. 100pb DNA ladder was obtained by Sib Enzyme.

RESULTS and DISCUSSION

Six arbitrary primers were used for amplification of DNA extracted from 19 isolates belong to six species of *Trichoderma* collected from different governorates of Egypt as shown in (Fig 1), Primers No. 4 and 5 gave the best amplification results since they gave the higher number of DNA bands. In this respect primer No. 4 was the most promising. Therefore, DNA bands of primer 4 were subjected to analysis of average linkage (between groups), and from the results obtained, Dendrogram of the 19 isolates was drawn using SPSS computer package system. Dendrogram resulted from primer 4 showed very interesting phenomenons, it separates *T. strictipile* in a very far branch and other *Trichoderma* isolates in other branch. From the group containing the rest of *Trichoderma* isolates, *T. viride* separated in dependent branch.

Two isolates of *T. aureoviride* separated together in special branch with low similarity. *T. atroviride* was separated from the main group of *Trichoderma* isolates. In this respected, **shalini et al, (2006)**, using RAPD primer was able to discriminate *T. aureoviride* from the rest of *T. viride* and *T. harzianum* isolates. The rest of *Trichoderma* isolates (i.e. *T. harzianum* and *T. hamatum*) were segregated together in special branch, this branch was branched into two brachiates, the first one contain *T. harzianum* isolates at the other contain *T. hamatum* isolates. Very high similarity was observed between *T. harzianum* 48 and 55, 19 and 78 and *T. hamatum* 36 and 54 although they were isolated from different geographical regions.

Fig.1. PCR fragments of *Trichoderma* strains generated with primers No. 1,2,3,4,5 and 6 (A-f) respectively. Lanes 1-19 represent *Trichoderma* strains: 24, 36, 54, 77, 72, 52,73,58,48,44,19,78,2,41,55,104,101,100 and51. respectively. M= size markers.



Hermosa, et al, (2000), have studied the molecular characterization of *Trichoderma* spp. isolates using specific primers for ITS1 and ITS4. They found that isolates of *T. harzianum* and *T. inhamatum* were isolated together in specific group far from other *Trichoderma* isolates.

El-Fiky et al, (2006), carried out cluster analysis using RAPD markers, they found that all isolates of *T. harzianum* (4 isolates) were separated in one cluster.

using primer (4) *T. auroviride* characterized by the presence of special band with molecular weight 994.575 bp, *T. atroviride* characterized by the presence of band with 1036.361 bp and *T. viride* characterized by the presence of special band with 300.483 bp and primer (5) led to appear of special band with molecular weight 749.434 bp.

Fig.2: Dendrogram of the nineteen accessions based on primer N. 4 analyses.

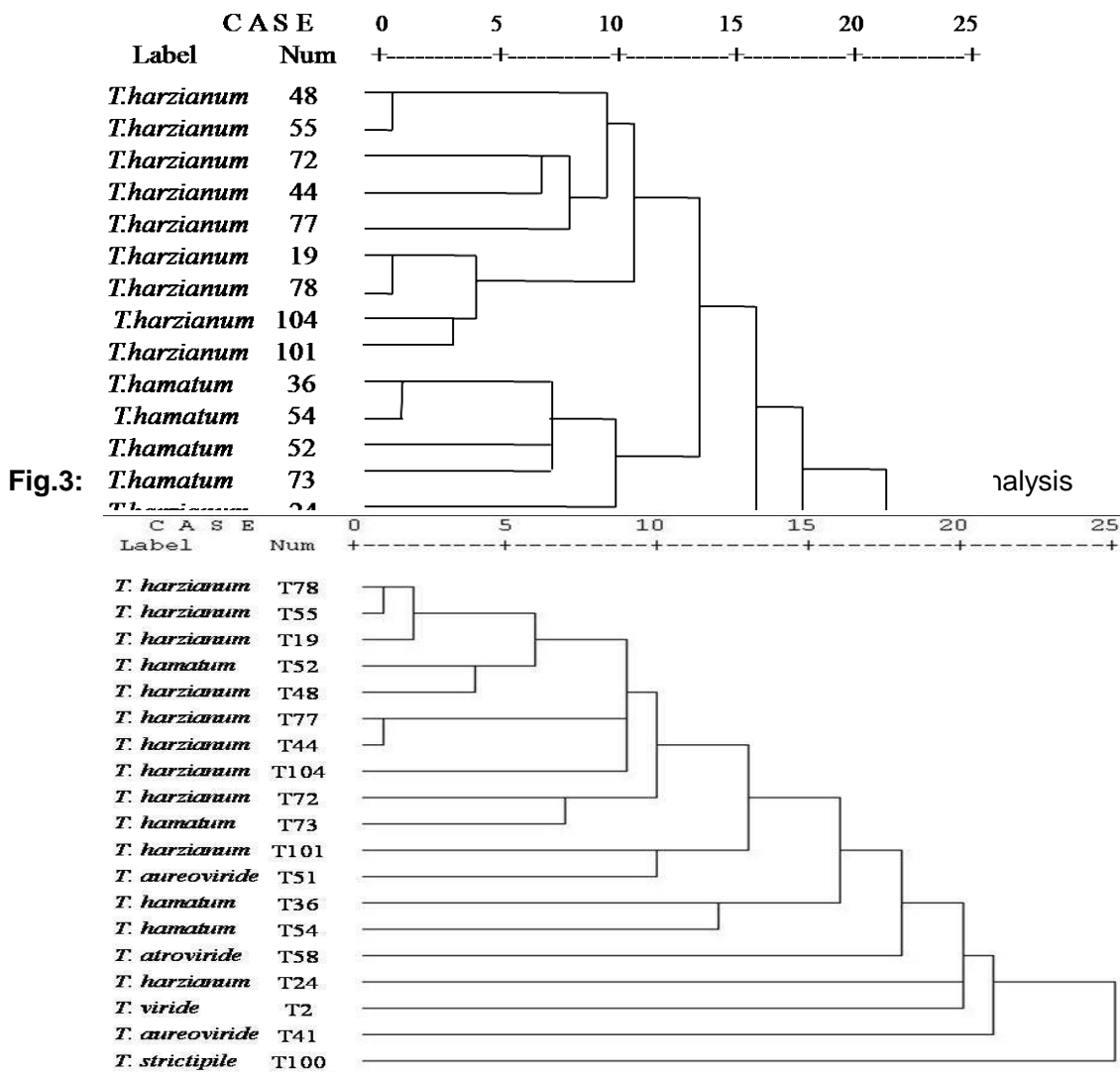


Fig.3:

The dendrogram resulting from the analysis of data generated by the six primers indicated that *T. strictipile* showed the lowest similarity with the other isolates of *Trichoderma*. *T. auroviride* was segregated in special filial out of other *Trichoderma* isolates. *T. viride* showed also lower similarity with either of *T. hamatum* or *T. harzianum*. *T. harzianum* T78, T55, T77 and T44 isolates showed the higher degree of similarity, although they were isolated from separated geographical areas.

In general, isolates of *T. harzianum* showed the higher degree of similarity as they segregated in very closely related group.

ACKNOWLEDGMENT

This research is part of M.Sc. thesis to be submitted by the first author to Ain Shams University and This research was supported and funded by the Biological Control of Chocolate Spot Disease on Faba bean Project. We thank Dr. Noher Abd El-Nazier for her support and Dr. A. Bisher for DNA Extraction and kind help. And thanks also due to Prof. Dr. Mostafa H. Mostafa for critical reading of this manuscript.

REFERENCE

- Bissett, J., (1984) - A revision of the genus *Trichoderma* L. Section Longibrachiatum Sect. Nov. Canadian Journal of Botany, 62, 924–931.
- Bissett, J., (1991a) - A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can J Bot., 69, 2357-2372.
- Bissett, J., (1991b) - A revision of the genus *Trichoderma*. III. sect. *Pachybasium*. Can J Bot., 69, 2373-2417.
- Carter, J. P. and Lynch, J. M., (1991) - Substrate-dependent variation in the protein profile and antigens of *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microbial Technology, 13, 537–543.
- Chet, I., (1990) - Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. In Biological control of soilborne plant pathogens. Hornby, D. (Ed.) Wallingford: CAB International, pp., 15-25.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H., (1980) - *Trichoderma*. In Compendium of Soil Fungi (ed. K. H. Domsch, W. Gams, T. H. Anderson), PP. 794–809. Academic Press: London, U.K.
- Druzhinina, I., Kubicek C. P., (2004) - Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. Journal of Zhejiang University SCIENCE 6B, 2, 100-112.
- El-Fiky, Z. A., Shalaby O. Y., N. Ahmed F., (2006) - Biochemical and Molecular Characterization of some *Trichoderma* isolates antagonistic to *Rhizoctonia solani* the causal of Bean Root-Rot. Proceeding of the second conference on farm integrated pest management 16-18 Jan 2006, 154 - 171.
- Gilly Z., Elad Y., Chet I., (1996) - Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology, 86, 1255-1260.
- Harman E. G., Hayes C. K., Ondik K. L., (1998) - *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1. eds. by Kubicek C. P., Harman G. E., Taylor and Francis, London, 243–270.
- Harman E. G., Howell R. H., Viterbo A., Chet I., Lorito M., (2004) - *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2, 43-56.
- Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I., (2000) - Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology, 1890-1898.
- Kubicek, C. P., Harman G. E., (1998) - *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol.1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis, London, 243–270
- Kubicek, C. P., Harman G. E., (1998) - *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol.2 Enzymes, Biological Control and commercial applications Taylor and Francis, London, PP. 400.
- Kubicek C. P., Zelazowska M. K., Druzhinina I. S., (2008) - Fungal genus *Hypocrea* / *Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 9, 753-763.

- Maymon M., Minz D., Barbul O., Zveibil A., Elad Y., Freeman S., (2004) - Identification of *Trichoderma* Biocontrol Isolates to Clades According to ap-PCR and ITS Sequence Analyses. *Phytoparasitica*, 32,4,370-375
- Rifai, M. A., (1969) - A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute Mycological Papers, 116, 1–56.
- Shalini, Narayan K. P., Lata, and Kotasthane A. S., (2006) - Genetic relatedness among *Trichoderma* isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. *African journal of Biotechnology*. 5, 580-584.
- Siddiquee, S., Abdullah F., Guan T. S., See L. M., (2007) - Allozyme Variations of *Trichoderma harzianum* and its Taxonomic Implications. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1, 30-37.
- Verena, S., S. Druzhinina I., Kubicek C. P., (2006) - A screening system for carbon sources enhancing b-N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). *Microbiology*, 152, 2003–2012.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990) - DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6535.
- Zamir D., Chet I., (1985) - Application of enzyme electrophoresis for the identification of strains in *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 578–580.
- Zhang C. I., Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Xu T., (2005) - *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 251–257.

**TEMPERATURE ADAPTATION AND TELIOSORE PRODUCTION APTITUDE OF
Puccinia striiformis F.SP. *tritici* POPULATIONS IN RELATION TO THEIR
GEOGRAPHICAL AND PHYLOGENETIC POSITION**

S. ALI, M. LECONTE, J. ENJALBERT and C. de VALLAVIEILLE-POPE

UMR 1290 BIOGER-CPP, INRA-AgroParisTech, Equipe Epidémiologie BP 01,
78 850 Thiverval-Grignon, France
sajid.ali@grignon.inra.fr

SUMMARY

The recent expansion of yellow rust epidemics (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* : PST) in new areas with a climate considered so far as too hot (South USA, West Australia, South Africa) has been related to the emergence and global spread of new high temperature adapted races from a narrow genetic basis (Hovmøller et al. 2008). Furthermore, Mboup (2008) and Bahri (2008) reported the presence of a gradient of diversity in PST populations from North-western Europe to Pakistan and China, along with a higher teliosore production for recombinant (Chinese) than clonal (French) isolates. We report an overall variability for temperature adaptation in terms of germination rate (at 20°C and 25°C) and relative infection efficiency (RIE) for the isolates in accordance with their phylogenetic position and geographical origin. A non-significant difference among geographical origins was observed for germination rate at 8°C. The isolates from Nepal, Middle-East and Pakistan, the regions having hot climate, were high temperature adapted with even higher germination rate and/or RIE than the two high temperature adapted reference isolates. This suggests that the high temperature adapted isolates could be a result of migration from the already adapted populations present in these three regions. In the case of teliosores, isolates from Pakistan, Nepal and China had high teliosore production, while the clonal populations of Northern France and Mediterranean region had very low teliosore production. This represents a correspondence between the gradient in teliosore production and the gradient of genetic diversity already described (Bahri, 2008, Mboup, 2008), suggesting a strong relation between genetic diversity and teliosore production aptitude. The phylogenetic position of most of the isolates was in accordance with their geographical origin with some off-type isolates. A general concordance found between phenotypic profile and genetic structure along with the climatic conditions of sampled locations reveals the presence of local adaptation in PST populations for high temperature adaptation and teliosore production. The probable expansion risk of aggressive isolates from the zones with higher diversity (Asia) to the areas with clonal populations should thus be considered in the context of climatic change and durable crop protection.

Keywords: wheat yellow rust, geographical distribution, spore germination rate, microsatellites

The recent expansion of yellow rust epidemics (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* : PST) in new areas with a climate considered so far as too hot (South USA, West Australia, South Africa) has been related to the emergence and global spread of new high temperature adapted races from a narrow genetic basis (Hovmøller et al., 2008). Similarly, the strong divergence observed in virulence pattern of southern and northern French isolates, latter confirmed as genetic divergence by Enjalbert et al. (2005) has been shown to be due in part to the high temperature adaptation of Southern French PST population (Mboup, 2008). This raises the question about the origin of this climatic adaptation capacity and its variation over different regions of the world and contrasted climatic conditions, which can put light on the emergence of PST epidemics in new areas. Such information will also help comprehend the role of adaptation to environmental conditions on geographical substructure of a plant pathogen species.

Adaptation capacity for any pathogen is linked with the reproductive cycle, as sexual reproduction allows to produce rapidly advantageous gene combinations (McDonald & Linde, 2002) while clonality leads to rapid amplification of strongly fitted individuals (de Meeüs et al., 2007). In addition, sexual cycle often involves the differentiation of specific robust structures, enabling survival of the population during adverse environmental/host conditions. PST is considered to reproduce asexually through dicaryotic uredospores on wheat, the almost exclusive host (Stubbs, 1985) with teliosores produced at the end of cropping season which bear teliospores. These teliospores can germinate to form haploid basidiospores, which could serve to attack an alternative host for sexual reproduction, as in the case of stem rust and leaf rust, but not described so far for PST (Fig. 1) (Stubbs, 1985). Thus PST was so far considered to reproduce asexually and consequently, a strictly clonal PST population structure has been described with the help of molecular markers in North-Western Europe (Newton et al., 1985, Hovmøller, 2002, Enjalbert et al., 2005, Hovmøller & Justesen, 2007), the USA (Chen et al., 1993), Australia and New Zealand (Steele et al., 2001). However, PST populations of Middle East (Bahri et al., 2009) and Pakistan (Bahri, 2008) have been shown to be more diverse, while highly panmictic populations were reported for China (Mboup et al., 2009). They further showed a higher aptitude of teliosore production for the panmictic (Chinese) population compared to the clonal (French) population. Thus it will be interesting to assess the teliosore production aptitude of PST populations, representative of different world origins.

Finally, considering the genetic structure of PST across the three continents, it will be interesting to assess the relationship of the phenotypic profile for high temperature adaptation and teliosore production with geographical and phylogenetic position of isolates and populations, to understand the relationship between natural selection forces and the neutral genetic diversity.

We studied the variability for high temperature adaptation and teliosore production in relation to their geographical origins and phylogenetic position for PST isolates from six geographical origins. A total number of 56 isolates (15 isolates from China; 11 from Pakistan; 4 from northern France; Eight from Nepal, Middle-East and Mediterranean region) were selected from six geographical origins over three continents, Europe, Africa and Asia, attempting to maximise the sampled diversity already described by de Vallavieille-Pope and colleagues. Two isolates from Denmark, kindly provided by M. Hovmøller, sampled in Denmark, were included as reference for high temperature adapted isolates. These isolates have been reported to be high temperature adapted (Milus et al., 2009). High temperature adaptation was assessed through their germination rate at 20°C and 25°C through their inoculation on slides and relative infection efficiency at 20°C through their inoculation on wheat cv. Cartago. Similarly, the same set of isolates was studied for their teliosore production aptitude at four to seven weeks after inoculation. Furthermore, these isolates were genotyped as described by Enjalbert et al. (2002) using 16 simple sequence repeats (SSR) markers

reported by Enjalbert et al. (2002) and Bahri et al. (2008) to assess the link between the phenotypic profile and phylogenetic position of the isolates.

We report an overall variability for temperature adaptation in terms of germination rate (at 20°C and 25°C) and relative infection efficiency (R IE) for the isolates in accordance with their phylogenetic position and geographical origin. A non-significant difference among geographical origins was observed for germination rate at 8°C with among the geographical origins, suggesting that this temperature could be the optimum temperature for most of the PST isolates of these geographical regions. The isolates from Nepal, Middle-East and Pakistan, the regions having hot climate, were high temperature adapted, with even higher germination rate and/or RIE than the two reference isolates representing the reference clones recently spread in warm areas of United States (Hovmøller et al., 2008) and Australia (Wellings, 2007). This suggests that the high temperature adapted isolates could be a result of migration from the already adapted populations present in these three regions.

In case of teliosores, we report the presence of highly significant differences for teliosore production among the tested isolates from six geographical regions with a strong repeatability of the experiment ($R^2 = 0.96$). There was increasing leaf coverage by teliosore across the four scoring dates, with clearly distinct patterns for each geographical origin. The previously described clonal Northern French (Enjalbert et al., 2002) and Mediterranean isolates (Bahri et al., 2009) had very low or no teliosore production. On the other hand, isolates from Pakistan, Nepal and China, the populations described to be with higher diversity (Bahri, 2008, Mboup, 2008) had high teliosore production. Similarly, the recombinant isolates were having a high teliosore production. This represents a correspondence between the gradient in teliosore production (shown as area under teliosore production curve, Fig. 2) and the gradient of genetic diversity (Fig. 3) already described (Bahri, 2008, Mboup, 2008), suggests a strong relation between genetic diversity and teliosore production aptitude.

The phylogenetic position of most of the isolates was in accordance with their geographical origin with some off-type isolates as assessed through different genetic analyses on SSR data i.e., Factorial correspondence analysis, tree generated through neighbour joining and *Fst* estimated for the populations with some off-type isolates. The presence of off-type isolates displaying a contrasted phenotype when compared to the rest of the group could be either due to migration or due to local variation for adaptation depending upon the PST genetic structure of the area and geographical features of the region. Overall, these results were in accordance with the population structure described previously (Bahri, 2008, Mboup, 2008). The control isolates were found to be closer, both genotypically and phenotypically, to isolates from the Middle-East. The phenotypic distance estimated through Mahalanobis distance and Nei genetic distance were found to be significantly correlated as assessed by Mantel test. A general concordance found between phenotypic profile (temperature adaptation and teliosore production) and genetic structure along with the climatic conditions of sampled locations reveals the presence of local adaptation in PST populations for high temperature adaptation and teliosore production. The probable expansion risk of aggressive isolates from the zones with higher diversity (Asia) to the areas with clonal populations should thus be considered in the context of climatic change and durable crop protection.

LITERATURE CITED

- Bahri B, 2008. *Adaptation et structuration spatiale des populations méditerranéennes de rouille jaune du blé (Puccinia striiformis f.sp. tritici)*. Paris, France: PhD thesis. Université Paris-Sud 11, France.
- Bahri B, Leconte M, De Vallavieille-Pope C and Enjalbert J, 2008. Isolation of ten microsatellite loci in an EST library of the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis f.sp. tritici*. *Technical note, Conservation Genetics*.

- Bahri B, Leconte M, Ouffroukh A, De Vallavieille-Pope C and Enjalbert J, 2009. Geographic limits of a clonal population of wheat yellow rust in the Mediterranean region. *Molecular Ecology*, In press.
- Chen X, Line Rf and Leung H, 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, 83, 1489-97.
- De Meeûs T, Prugnolle F and Agnew P, 2007. Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Science*, 64, 1355–72.
- Enjalbert J, Duan X, Giraud T, Vautrin C, De Vallavieille-Pope C and Solignac M, 2002. Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology Notes*, 2, 563-5.
- Enjalbert J, Duan X, Leconte M, Hovmøller Ms and De Vallavieille-Pope C, 2005. Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) within France. *Molecular Ecology*, 14, 2065-73.
- Hovmøller Ms and Justesen Af, 2007. Appearance of atypical *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* phenotypes in north-western Europe. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58, 518-24.
- Hovmøller Ms, Justesen, A. F., Brown, J. K. M., 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology*, 51, 24-32.
- Hovmøller Ms, Yahyaoui Ah, Milus Ea and Justesen Af, 2008. Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus. *Molecular Ecology*, 17, 3818-26.
- Mboup M, 2008. *Influence des pressions de selection et de la survie inter-epidemie sur la diversite genetique des populations de rouille jaune du ble : Puccinia striiformis f.sp. tritici*. Paris, France: Ph.D. Thesis. Université Paris-Sud 11, France, Ph.D.
- Mboup M, Leconte M, Gautier A, et al., 2009. Evidence of genetic recombination in wheat yellow rust populations of a Chinese overwintering area. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 299-307.
- Mcdonald Ba and Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349-79.
- Milus Ea, Kristensen K and Hovmøller Ms, 2009. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology*, 99, 89-94.
- Newton Ac, Caten Ce and Johnson R, 1985. Variation for isozymes and double-stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. *Plant Pathology*, 34, 235–47.
- Steele Ka, Humphreys E, Wellings Cr and Dickinson Mj, 2001. Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Plant Pathology*, 50, 174-80.
- Stubbs Rw, 1985. Stripe rust. In: Roelfs A. P. and Bushnell W. R., eds. *The Cereal Rusts, Diseases, Distribution, Epidemiology and Control*. Academic Press, London, UK, 61–101. (2.)
- Wellings Cr, 2007. *Puccinia striiformis* in Australia: A review of the incursion, evolution and adaptation of stripe rust in the period 1979-2006. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58, 567-75.

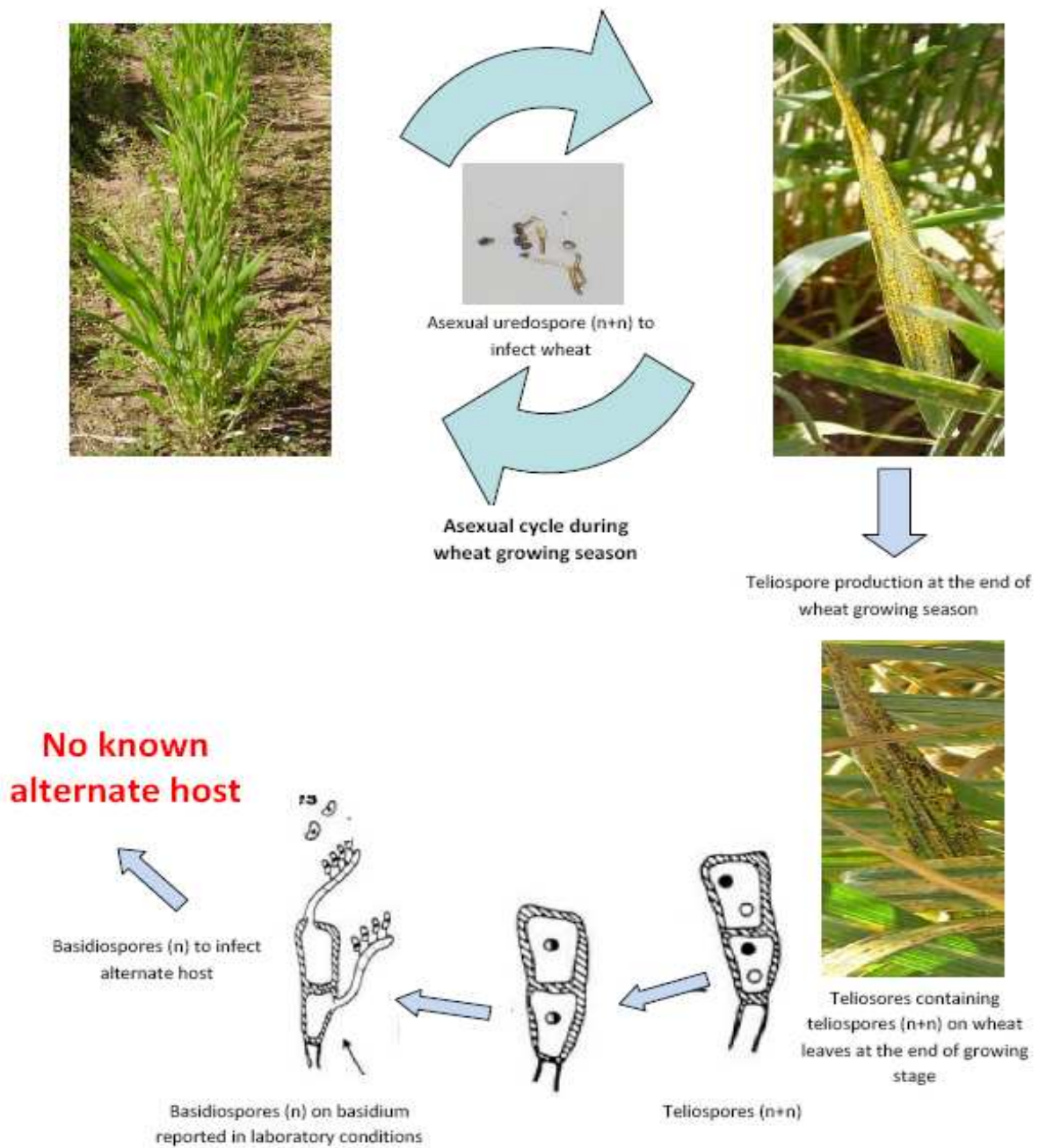


Fig. 1. Life cycle of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, showing the asexual cycle, as described by Stubbs (1985).

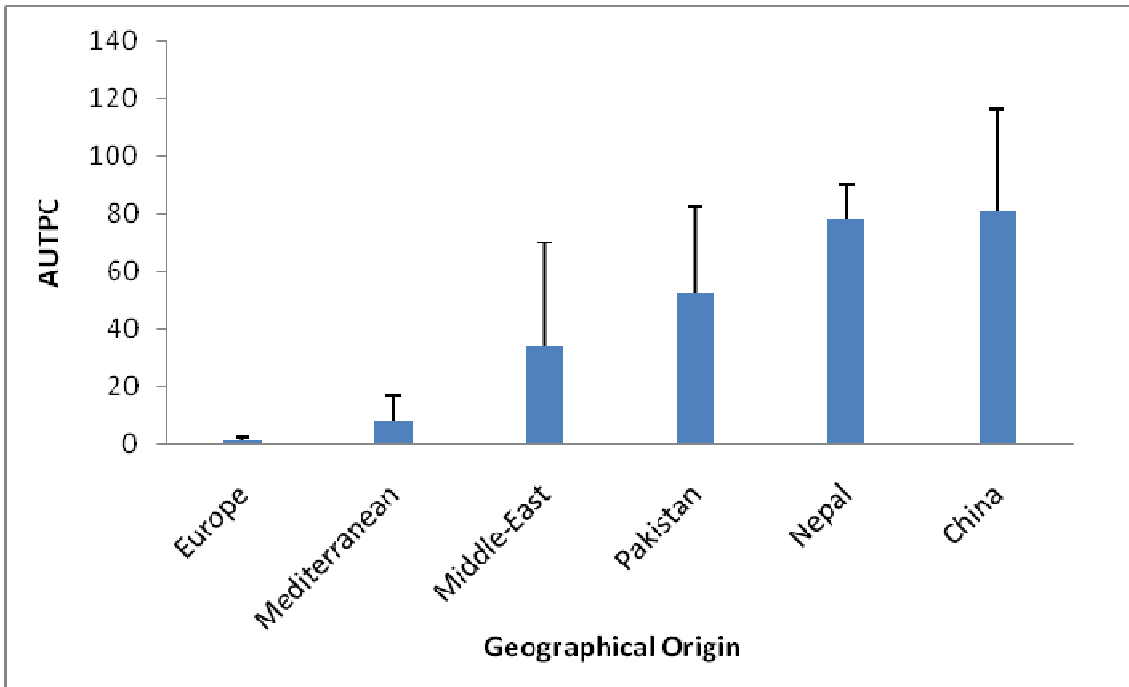


Fig. 2. Area under teliospore production curve for PST isolates from six geographical origins.

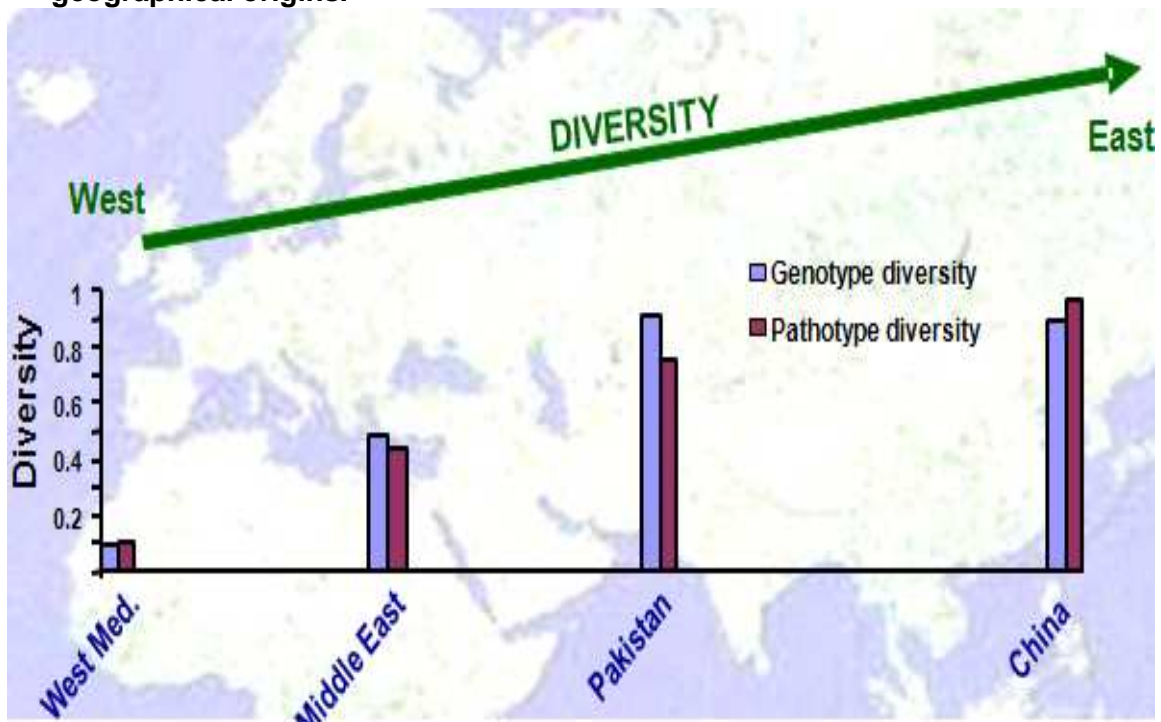


Fig. 3. Gradient in genotypic and pathotypic diversity from Western European and Mediterranean area to Eastern Asia, described by Mboup (2008) and Bahri (2008).

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**L'ENQUETE BOTRYTIS OU QUALITE[®], 7581 PARCELLES ETUDIEES EN 3 ANS DANS
5 VIGNOBLES FRANÇAIS**

G. GASTALDI¹

1 Institut National d'Horticulture et de Paysage (Agrocampus Ouest)
2, rue André Le Nôtre, 49000 Angers, guillaume.gastaldi@syngenta.com

RÉSUMÉ

La protection des cultures fait aujourd'hui face à des enjeux de plus en plus forts en particulier en ce qui concerne la sécurité des applicateurs et des consommateurs, mais également d'un point de vue environnemental. De plus, le contexte économique actuel impose l'optimisation des itinéraires culturaux en particulier la protection phytosanitaire du vignoble. L'enquête *Botrytis ou Qualité*[®] est une illustration de la volonté de Syngenta Agro de répondre à ces nouvelles attentes. Dans le cadre de cette enquête, 7581 parcelles ont été référencées en 3 années avec des données concernant les caractéristiques parcellaires, les mesures prophylactiques, la protection chimique anti-*Botrytis* et les paramètres de qualité de la vendange.

Cette étude concerne 5 vignobles : Alsace, Beaujolais, Bordelais, Pays de Loire et Sud-ouest. L'analyse de ces données permet de comparer les pratiques mises en place à la parcelle et leurs conséquences sur le taux de pourriture grise, le rendement, le degré des moûts et l'acidité totale.

L'intérêt des mesures prophylactiques, en particuliers enherbement, effeuillage et ébourgeonnage, est démontré dans le cadre de protection de la vigne contre *Botrytis cinerea*. De plus, nos résultats montrent que certaines stratégies de protection chimique contre le *Botrytis* sont plus efficaces que d'autres tant d'un point de vue stade d'application que de la spécialité utilisée.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, vigne, prophylaxie, fongicides, qualité

SUMMARY

THE BOTRYTIS OU QUALITÉ[®] SURVEY, 7581 PRODUCERS FIELDS STUDIED FOR 3 YEARS IN 5 FRENCH VINEYARDS

Nowadays, crop protection faces to strong issues: products users' safety, consumers' security and environmental protection. Moreover, economic context forces to agricultural practices optimization, particularly crop protection. *Botrytis ou Qualité*[®] survey illustrates Syngenta Agro will to answer these new expectations. In this survey, 7581 fields had been studied for 3 years. Fields characteristics, prophylaxis, chemical protection against *Botrytis* and grapes quality data were collected.

This study concerns 5 vineyards: Alsace, Beaujolais, Bordelais, Pays de Loire and Sud-ouest. Data analysis permits to study fields' practices effect to rate of *Botrytis*, yields, degree and total acidity. Budding, grassing and defoliation results in a reduction of grapes *Botrytis* rate. Moreover, a better effect of certain chemical protection strategy against *Botrytis* is showed in our study.

Key-words: *Botrytis cinerea*, grapevine, prophylaxis, fungicides, quality

**INTERACTIONS BIDIRECTIONNELLES INDIRECTES
ENTRE BIOAGRESSEURS DU ROSIER**

N. DESNEUX ⁽¹⁾, R. MOUTTET ⁽¹⁾, P. BEAREZ ⁽¹⁾
¹ Unité de Recherches Intégrées en Horticulture, INRA
400 route des chappes, 06903 Sophia-Antipolis, France.
nicolas.desneux@sophia.inra.fr

RÉSUMÉ

Dans les agro-écosystèmes, des interactions indirectes entre phytophages et pathogènes peuvent se produire lorsqu'une infestation par un premier bioagresseur altère la qualité de la plante hôte commune, affectant un deuxième bioagresseur qui est séparé spatialement ou temporairement du premier. Le scénario le plus communément évoqué est celui de l'induction des défenses de la plante.

Nous avons ainsi mené au laboratoire des infestations croisées sur de jeunes plants de rosier visant à mesurer l'impact des interactions biotiques indirectes sur des traits d'histoire de vie de trois bioagresseurs: un pathogène nécrotrophe (*Botrytis cinerea*), un puceron (*Rhodobium porosum*) et un thrips (*Frankliniella occidentalis*). Nous avons mis en évidence (1) une interaction bidirectionnelle négative entre *B. cinerea* et *R. porosum* (réduction du taux de croissance des pucerons, et diminution de la taille des lésions) et (2) un effet indirect négatif de *B.cinerea* sur le comportement des insectes

Mots-clés : bioagresseurs; interactions tripartites; coordination des défenses; réponses induites; protection intégrée

SUMMARY

In agroecosystems, indirect interactions between phytopathogenic microorganisms and herbivorous arthropods occur when infestation by a first attacker alters the shared host in a way that affects a second attacker that is often spatially or temporally separated from the first. The most commonly invoked scenario involves the induction of plant defence reactions.

We carried out experiments under controlled conditions on young rose plants in order to assess the impact of such indirect interactions on life history traits of several pests: a necrotrophic fungus -*Botrytis cinerea*-, an aphid -*Rhodobium porosum*- and a thrips -*Frankliniella occidentalis*-. We highlighted (1) a bidirectional negative interaction between *B. cinerea* and *R. porosum* which is expressed by a reduction of aphid growth rate and a decrease in fungal lesion area as well as (2) a negative indirect effect of *B.cinerea* on insect's behaviour.

Key words: pests; tripartite interactions; tuning of defences; induced responses; integrated pest management

INTRODUCTION

Dans les agro-écosystèmes, les interactions biotiques directes mais aussi indirectes entre les organismes sont nombreuses (Wootton, 1994). Ces dernières, souvent méconnues, sont pourtant susceptibles d'induire des effets très variables (négatif, positif, neutre) sur les populations présentes dans le milieu (Barbosa *et al.*, 1991).

Notamment, des interactions indirectes entre pathogènes et phytophages peuvent se produire lorsque l'infestation par un premier bioagresseur induit des changements au niveau de la plante hôte affectant un deuxième bioagresseur qui est séparé spatialement ou temporairement du premier (Hatcher 1995 ; Rostas *et al.*, 2003). Considérant la présence de bioagresseurs multiples sur une plante comme la norme au sein des agroécosystèmes, de telles interactions sont fortement susceptibles de s'établir (Fournier *et al.*, 2006). Du point de vue des mécanismes sous-jacent, le scénario le plus communément évoqué est celui de l'induction des défenses de la plante, avec un rôle prépondérant accordé aux voies de signalisation ainsi qu'aux métabolites secondaires qui en sont issus (Paul *et al.*, 2000 ; Biere *et al.*, 2004). Les voies de signalisation induites diffèrent selon le type de bioagresseur et se chevauchent de façon à déterminer l'issue de ces interactions (Hatcher *et al.*, 2004 ; Taylor *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, notre projet s'est orienté sur l'étude de telles interactions indirectes sur modèle rosier, en utilisant un champignon phytopathogène de type nécrotrophe, *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr.), ainsi que deux insectes phytophages : le puceron *Rhodobium porosum* (Sanderson) et le thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Les objectifs ont consisté à définir des patterns généraux d'interactions et évaluer leur impact sur la dynamique de populations de bioagresseurs. Les hypothèses de départ sont que (1) les interactions indirectes sont susceptibles de se produire principalement entre des bioagresseurs induisant les mêmes voies de signalisation et que (2) les distributions spatiales et temporelles des infestations peuvent avoir un impact sur ces interactions. Nous avons donc réalisé des expériences d'infestations croisées sur des plantes associées à des expériences de comportement afin d'évaluer si l'infestation par un premier bioagresseur est apte à affecter la performance et/ou le comportement d'un second bioagresseur, en prenant en compte des facteurs comme le type de blessure infligé à la plante ainsi que la distribution spatiotemporelle des attaques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

PLANTES ET BIOAGRESSEURS

Les plantes utilisées sont de jeunes rosiers, *Rosa hybrida* L. cv. Sonia, issus de bouturage ou de cultures in vitro. Ils sont maintenus en chambre climatique jusqu'à utilisation ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, HR : 65%, photopériode 16L : 8D). Une attention particulière est portée afin d'éviter tout stress biotique ou abiotique avant utilisation, afin de minimiser l'occurrence de toute induction de réponse par la plante.

Les pucerons (*R. porosum*) et les thrips (*F. occidentalis*) sont élevés en chambre climatique ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, HR : 65% photopériode 16L : 8D) sur plants de rosiers. Une souche de *Botrytis cinerea* (souche T4, Onesto J.P., communication personnelle) est maintenue en culture sur du milieu malt (20g/L). Pour les expériences, un inoculum de *B. cinerea* est préparé à partir des boîtes de culture en ajoutant du milieu Potato Dextrose Broth, autoclavé 30 minutes à 110°C , suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 6000 rpm. La concentration en spores, de l'ordre de 10^5 spores/mL, est déterminée sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez®.

EXPERIENCES D'INFESTATIONS CROISEES

Le protocole général consiste en l'infestation d'une plante par un premier bioagresseur, phytophage ou pathogène, l'attaque étant suivie par une infestation par l'autre bioagresseur, pathogène ou phytophage respectivement. Les deux attaques sont séparées dans le temps et l'espace. D'un point de vue spatial, nous distinguons les infestations locales se réalisant sur deux folioles de la même feuille des infestations systémiques réalisées quant à elles sur deux étages foliaires différents. Afin de contraindre les bioagresseurs sur leurs folioles respectives, ces derniers sont placés au sein de clip cages, constitués d'un couvercle de boîte de Pétri (D : 43mm) sur lequel est apposé un ruban de mousse sur le pourtour. Pour les insectes, le clip cage présente une ouverture circulaire de 2,5 mm de diamètre recouverte de filet anti-thrips (de maille de 350 μ m). L'ensemble clip cage / bioagresseur / foliole est solidarisé grâce à des pinces à cheveux et un support en carton (de dimension 4,5x4,5 cm), le tout étant fixé à un tuteur en fibre de verre à l'aide de ruban adhésif. D'un point de vue temporel, la dissociation entre les deux infestations est soit de courte durée (1 jour) soit de longue durée (7jours) (ce dernier cas a été étudié uniquement pour les interactions phytophages \rightarrow pathogène). L'infestation par le pathogène consiste en un dépôt d'une gouttelette de 10 μ L d'inoculum sur la surface adaxiale d'une foliole. Les insectes sont quant à eux prélevés directement à partir des élevages et contraints sur la face abaxiale d'une foliole.

Un paramètre de performance du second bioagresseur est alors relevé et comparé au même paramètre en l'absence de préinfestation par le premier bioagresseur. Dans le cas où l'on évalue les interactions phytophages \rightarrow pathogène, 10 insectes (larves et adultes) sont prélevés afin de réaliser la préinfestation sur une plante. Le pathogène est ensuite inoculé. Le paramètre de performance mesuré est alors la taille de la lésion, relevé quatre jours après l'inoculation. Pour les interactions pathogène \rightarrow phytophages, le pathogène est d'abord inoculé sur une plante puis ce sont 3 pucerons adultes ou 10 thrips adultes qui sont prélevés afin de réaliser l'infestation. Le paramètre de performance mesuré est alors l'effectif des populations d'insectes après 4 jours pour les pucerons, et après 10 jours pour les thrips. Dans le cas particulier où l'on évalue l'effet d'une préinfestation de *B. cinerea* sur la performance de *F. occidentalis*, le design expérimental diffère quelque peu. De par la difficulté de contraindre les thrips dans des « clip cages » en assurant leur reproduction, nous avons opté pour un système de microcosme (plante encagée dans un tube de plastique de diamètre 10cm et hauteur 23cm, aéré via des ouvertures recouvertes de filet anti-thrips) où les thrips ont accès à l'ensemble de la plante à l'exception de la zone inoculée par le pathogène. Dans un tel cas, il est alors impossible de faire la distinction entre effet local et systémique, l'infestation étant généralisée.

EXPERIENCES DE COMPORTEMENT

Des expériences de choix ont été réalisées dans des boîtes de Pétri (D : 53mm) où sont disposés deux disques de foliole (D : 25mm) prélevés à l'emporte-pièce et préalablement infectés ou non par *B. cinerea* durant quatre jours. Les insectes, après avoir été mis à jeûner pendant 24 heures, sont déposés au nombre de 10 au centre de la boîte, et l'effectif présent sur chaque disque ainsi que hors des disques est relevé à 1 puis 5, 10 et 15 minutes. Trois modalités sont testées deux à deux : disques issus de plantes saines (control C), disques issus de folioles saines de plantes infestées localement (L), disques issus de folioles saines de plantes infestées systématiquement (S).

ANALYSE STATISTIQUE

Pour les expériences d'infestations croisées, les variables à expliquer (taille des lésions et effectifs de pucerons) sont des variables quantitatives suivant des lois de Poisson. La variable explicative d'intérêt est celle de la position des infestations (ayant trois modalités : control, local, systémique). D'autres variables sont également prises en compte : l'étage foliaire, la longueur des folioles et la date. L'analyse des données a été réalisée en utilisant un modèle linéaire généralisé, avec comme fonction de lien la fonction log. Le tableau d'analyse de la déviance permet d'évaluer la significativité des éléments du modèle. L'hypothèse principale testée est H_0 : 'il n'y a pas de différence dans les moyennes du paramètre de performance mesuré selon les modalités de position' (soit : 'la préinfestation par un premier bioagresseur n'impacte pas le paramètre de performance mesuré pour le second bioagresseur'). Si nécessaire, un test de comparaison multiple de Tukey est réalisé sur le modèle où seuls les éléments significatifs sont maintenus, afin de comparer les modalités de position deux à deux. Dans le cas particulier de l'effectif de thrips, ne suit pas de loi normale même après transformation ni de loi de Poisson, l'analyse statistique a consisté en un test non paramétrique de Wilcoxon. Seule la variable de position a été prise en compte.

Pour les expériences de comportement, la distribution des insectes sur les disques de folioles ne suivant pas non plus de loi normale, les médianes du nombre d'individus présents sur chaque disque ont été comparées grâce au test non paramétrique de Wilcoxon. L'hypothèse H_0 est : 'il n'y a pas de différence dans la répartition moyenne des insectes selon l'origine des disques' (soit : 'la préinfestation par le pathogène n'induit aucune adaptation comportementale de la part des insectes')

L'ensemble de l'analyse statistique a été conduit sur le logiciel R.

RÉSULTATS

INTERACTIONS PATHOGENE → PHYTOPHAGES

Interactions *B. cinerea* → *R. porosum*

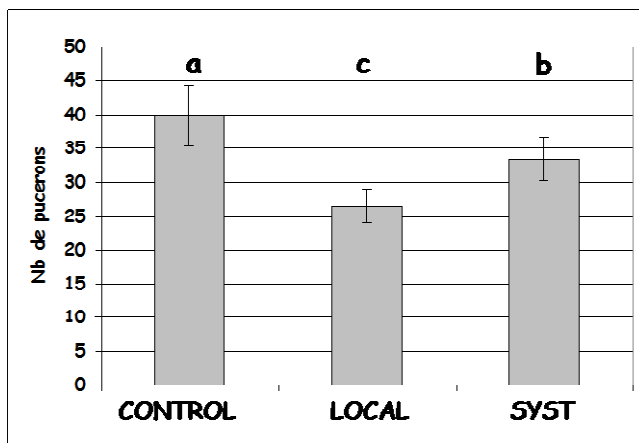


Figure 1. *B. cinerea* → *R. porosum* courte durée : effectif moyen de pucerons à j+4 selon les modalités (±SEM)

Concernant les expériences d'infestations croisées avec une dissociation temporelle entre les infestations de courte durée (1 jour), l'analyse du modèle linéaire généralisé révèle un effet significatif de la variable position ($P(>|\text{Chi}|) < 10^{-4}$ sur le nombre moyen de pucerons sur les plantes ayant subi ou non une préinfestation par *B. cinerea*. Le nombre moyen de pucerons présents sur les plantes saines est significativement plus élevé que sur les plantes préalablement infestées localement et systématiquement ($z\text{-value}=7,948$, $\text{Pr}(>|z|) < 10^{-4}$ et $z\text{-value}=3.944$, $\text{Pr}(>|z|)=0,0003$ respectivement). La différence est aussi significative entre les plantes infestées

localement et systématiquement, le nombre moyen de pucerons étant plus important sur ces dernières ($z\text{-value}=4,048$, $\text{Pr}(>|z|)=0,0001$) (Figure 1). Ainsi, on constate l'existence d'une

interaction indirecte négative : *B. cinerea* inhibe la croissance des populations de *R. porosum*. L'effet est à la fois local et systémique, mais est plus marqué localement.

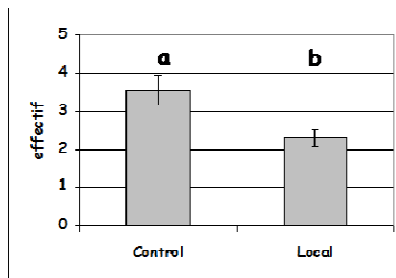


Figure 2. Répartition moyenne des pucerons sur les disques C/L après 15 minutes (\pm SEM)

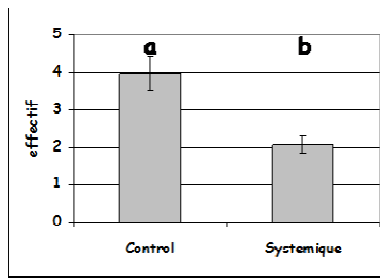


Figure 3. Répartition moyenne des pucerons sur les disques C/S après 15 minutes (\pm SEM)

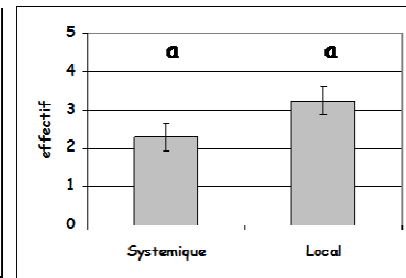


Figure 4. Répartition moyenne des pucerons sur les disques S/L après 15 minutes (\pm SEM)

Pour les expériences de comportement, les répartitions moyennes des pucerons sur les disques foliaires présentent également des différences significatives suivant les modalités de position. En effet, le nombre moyen de pucerons présents sur les folioles issus de plantes saines est plus élevé que sur les folioles issus de plantes préalablement infestées par du *Botrytis*, que ce soit de manière locale ou systémique ($W=505$, $P=0,014$ et $W=547,5$, $P=0,001$ respectivement) (Figures 2 et 3). Par contre, la différence entre le nombre moyen de pucerons présents sur les disques infestés localement et systématiquement n'est pas significative au seuil de 5% ($W=261$, $P=0,071$) (Figure 4). Ainsi, on constate qu'en situation de choix, les pucerons se positionnent majoritairement sur du tissu de rosier sain plutôt qu'infesté localement ou systématiquement par *B. cinerea*.

Interactions *B. cinerea* → *F. occidentalis*

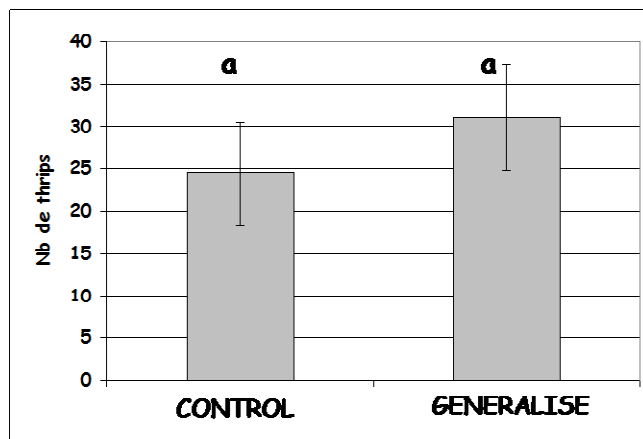


Figure 5. *B. cinerea* → *F. occidentalis* courte durée : effectif moyen de thrips à j+10 selon les modalités (\pm SEM)

Concernant les expériences d'infestations croisées avec une dissociation temporelle entre les infestations de courte durée (1 jour), on constate que les effectifs moyens de thrips sur les plantes ayant subi ou non une préinfestation par *B. cinerea* ne sont pas significativement différents ($W=487,5$, $P=0,142$) (Figure 5). Ainsi, aucun effet indirect n'est mis en évidence dans ce cas.

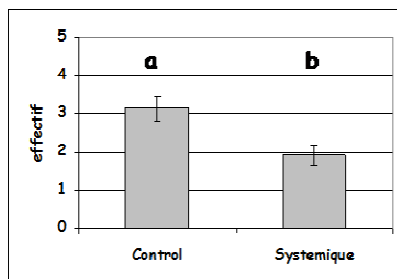


Figure 6. Répartition moyenne des thrips sur les disques C/L après 15 minutes (\pm SEM)

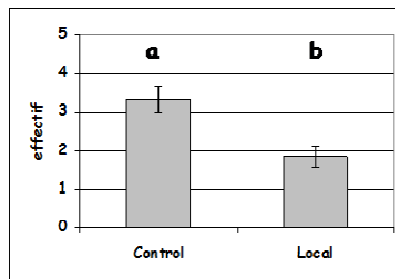


Figure 7. Répartition moyenne des thrips sur les disques C/S après 15 minutes (\pm SEM)

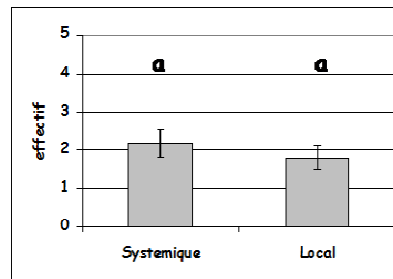


Figure 8. Répartition moyenne des thrips sur les disques S/L après 15 minutes (\pm SEM)

Pour les expériences de comportement, les répartitions moyennes des thrips sur les disques foliaires présentent quant à eux des différences significatives suivant les modalités de position. En effet, le nombre moyen de thrips présents sur les folioles issus de plantes saines est plus élevé que sur les folioles issus de plantes préalablement infestés par du *Botrytis*, que ce soit de manière locale ou systémique ($W=500,5$, $P=0,002$ et $W=489$, $P=0,005$ respectivement) (Figures 6 et 7). Par contre, la différence entre le nombre moyen de thrips présents sur les disques infestés localement et systématiquement n'est pas significative ($W=376$, $P=0,485$) (Figure 8). Ainsi, on constate qu'en situation de choix, les thrips se positionnent majoritairement sur du tissu de rosier sain plutôt qu'infesté localement ou systématiquement par *B. cinerea*.

INTERACTIONS PHYTOPHAGES → PATHOGENE

Interactions *R. porosum* → *B. cinerea*

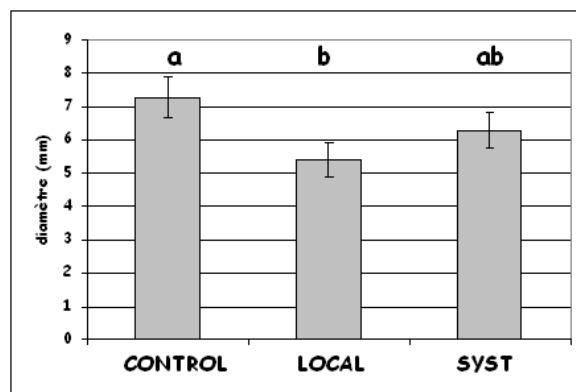


Figure 9. *R. porosum* → *B. cinerea* courte durée : taille moyenne des lésions de *Botrytis* à j+4 selon les modalités (\pm SEM)

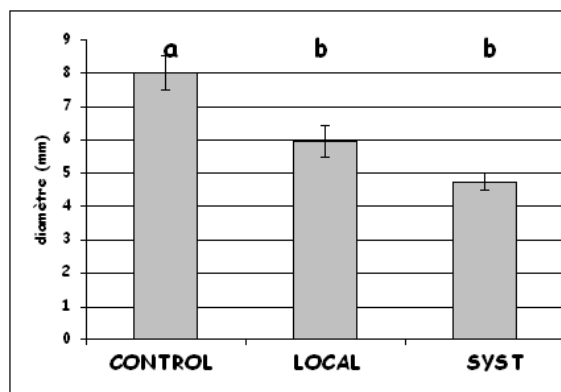


Figure 10. *R. porosum* → *B. cinerea* longue durée : taille moyenne des lésions de *Botrytis* à j+4 selon les modalités (\pm SEM)

Lorsque la dissociation temporelle entre les infestations est de courte durée (1 jour), l'analyse du modèle linéaire généralisé révèle un effet significatif de la variable position ($P(>|\text{Chi}|)=0,009$ sur la taille moyenne des lésions de *Botrytis* sur les plantes ayant subi ou non une préinfestation par *R. porosum*. La taille moyenne des lésions sur les plantes saines est significativement plus élevée que sur les plantes préalablement infestées localement ($z\text{-value}=2,522$, $\text{Pr}(>|z|)=0,031$). Par contre les différences entre les plantes saines et infestées systématiquement ainsi qu'entre les plantes infestées systématiquement et localement ne sont pas significatives (Figure 9). Ainsi, on constate l'existence d'une

interaction indirecte négative : *R. porosum* engendre une diminution de la taille des lésions de *B. cinerea*. Cet effet ne se retrouve qu'à un niveau local.

Lorsque la dissociation temporelle entre les infestations est de longue durée (7 jours), l'analyse du modèle linéaire généralisé révèle un effet significatif de la variable position ($P(>|Chi|) < 10^{-4}$) sur la taille moyenne des lésions de *Botrytis* sur les plantes ayant subi ou non une préinfestation par *R. porosum*. La taille moyenne des lésions sur les plantes saines est significativement plus élevée que sur les plantes préalablement infestées localement et systématiquement (z-value=2.637, $Pr(>|z|)=0,023$ et z-value=4,409, $Pr(>|z|) < 10^{-3}$ respectivement). La différence entre les plantes infestées localement et systématiquement, n'est quant à elle pas significative (z-value=0,127, $Pr(>|z|)=0,174$) (Figure 10). Ainsi, lorsque la dissociation temporelle entre les infestations est plus grande, on retrouve une interaction indirecte négative à la fois locale mais également systémique, *R. porosum* engendrant une diminution de la taille des lésions de *B. cinerea*.

Interactions *F. occidentalis* → *B. cinerea*

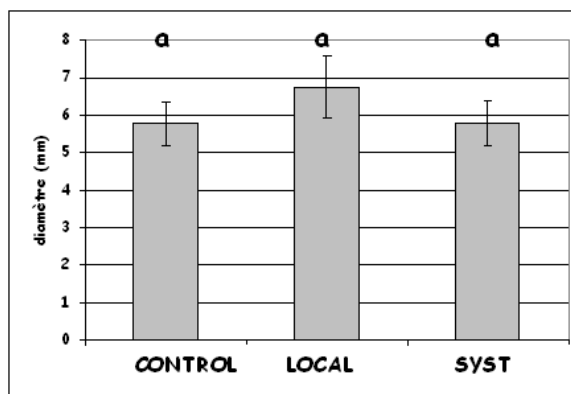


Figure 11. *F. occidentalis* → *B. cinerea* courte durée : taille moyenne des lésions de *Botrytis* à j+4 selon les modalités (\pm SEM)

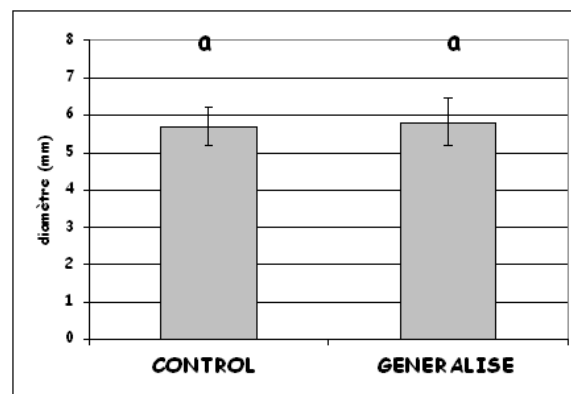


Figure 12. *F. occidentalis* → *B. cinerea* longue durée : taille moyenne des lésions de *Botrytis* à j+4 selon les modalités (\pm SEM)

Lorsque la dissociation temporelle entre les infestations est de courte durée (1 jour), la variable position ne présente aucun effet significatif ($P(>|Chi|)=0,306$). Les tailles moyennes des lésions de *Botrytis* ne sont pas significativement différentes entre les plantes ayant subi ou non une préinfestation par *F. occidentalis* (Figure 11). Ainsi, aucune interaction indirecte n'est mise en évidence.

De la même façon, lorsque la dissociation temporelle entre les infestations est de longue durée (7 jours), la variable de position ne présente aucun effet significatif ($P(>|Chi|)=0,883$). Les tailles moyennes des lésions de *Botrytis* ne sont pas significativement différentes entre les plantes ayant subi ou non une préinfestation par *F. occidentalis* (Figure 12). Ainsi, aucune interaction indirecte n'est mise en évidence.

DISCUSSION

Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une interaction négative entre un pathogène nécrotrophe et un insecte piqueur suceur, l'effet s'exerçant à un niveau local sur l'insecte, et à un niveau local et systémique sur le pathogène. Ils mettent également en évidence une action locale et systémique du pathogène sur le comportement d'insectes piqueurs suceurs et videurs de cellules. Pour autant, les mécanismes à l'origine de ces effets restent peu clairs. Un couplage entre approche écologique et approche biochimique a été envisagé via la réalisation d'analyses hplc sur différents échantillons issus des expériences d'infestation croisées (travaux en cours en coopération avec l'unité Interactions Biotiques et Santé Végétale, INRA Sophia Antipolis). Mais les méthodes d'analyses ainsi que les connaissances acquises sur les espèces modèles telles que le tabac ou la luzerne ne sont pas forcément transposables sur toute plante, et notamment sur rosier, ce qui a constitué un obstacle dans la progression et l'exploitation des analyses réalisées. La majorité des connaissances concernant les défenses induites a été acquise sur des plantes herbacées (Leitner et al., 2005), le rosier étant quant à lui une plante semi ligneuse dont la stratégie défensive n'est pas à notre connaissance caractérisée. On peut cependant émettre un certain nombre d'hypothèses concernant les mécanismes mis en jeu. Avant toute chose, notre hypothèse de départ était que des interactions indirectes phytophage-pathogène seraient susceptibles de se produire principalement entre des bioagresseurs induisant des voies de signalisation similaires (Walling, 2000 ; Koornneef & Pieterse, 2008) bien qu'il soit difficile d'émettre des règles générales avec certitudes. C'est notamment sur ce point que l'étude de ces interactions revêt d'un intérêt et d'un certain attrait : à ce jour, les connaissances sont encore trop limitées pour avoir une valeur prédictive (Pieterse & Dicke, 2007). Néanmoins, les effets mis en évidence suggèrent que des modifications s'exerçant au niveau de la plante aboutiraient à une altération de la qualité nutritive de cette dernière (Hatcher et al., 1995). En plus du chevauchement des voies de signalisation, les composés défensifs induits par le premier bioagresseur pourraient avoir un spectre d'action large et donc s'avérer toxiques ou antiappétents pour le deuxième bioagresseur (Zhu-Salzman et al., 2008). On peut également suggérer pour les insectes que l'effet négatif sur la performance soit en partie dû à un accroissement du temps alloué à leur déplacement au détriment du temps alloué à leur reproduction (les insectes préférant du tissu sain à du tissu infesté localement ou systématiquement).

CONCLUSION

L'étude réalisée met ainsi en évidence :

(i) un effet négatif indirect de *B. cinerea* sur la performance de *R. porosum* : une préinfestation de courte durée par *B. cinerea* conduisant à une réduction de la croissance des populations, l'effet étant local et systémique mais d'autant plus marqué localement.

(ii) un effet négatif indirect de *R. porosum* sur la performance de *B. cinerea* : une préinfestation par *R. porosum* conduisant à une réduction de la taille des lésions, exprimée localement si la préinfestation est de courte durée puis de manière généralisée si elle est de longue durée.

(iii) un effet indirect de *B. cinerea* sur le comportement de *R. porosum* et *F. occidentalis*, les insectes se positionnant majoritairement sur du tissu sain plutôt que préalablement infesté en situation de choix.

Ces résultats présentent un double intérêt. D'un point de vue fondamental, ils permettent d'identifier des interactions indirectes s'établissant entre un pathogène nécrotrophe et un insecte piqueur suceur qui sont médiées par une plante de type semi-ligneuse. L'impact de la disposition spatiotemporelle des attaques est également mis en évidence. D'un point de vue appliqué, l'intérêt provient de l'impact potentiel que de telles interactions revêt sur la dynamique des populations de bioagresseurs, et de l'influence qu'une modulation des facteurs mis en jeu peut présenter sur la robustesse d'un agroécosystème face à des perturbations biotiques. En effet, la favorisation des

interactions indirectes négatives mises en évidence, notamment celle de *R. porosum* sur *B. cinerea*, apparaît comme une piste intéressante en terme de protection intégrée des cultures. Cela est notamment valable sur rosiers, où les intrants de type fongicide sont largement utilisés avec parfois un traitement par semaine et où il n'existe que peu d'agents de lutte biologique pour gérer les pathogènes sous serre (Brun & Mary, 2003).

Dans cette optique, la transposition des résultats obtenus à des échelles plus réalistes apparaît comme une étape essentielle dans nos travaux futurs. La réalisation d'expérimentations en serres, où les conditions environnementales sont moins contrôlées et où s'exercent de nombreuses autres interactions (notamment des interactions directes entre les bioagresseurs), est primordiale pour la mise au point d'une méthode visant à moduler des interactions indirectes entre bioagresseurs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Laura Marin, Cécile Thomas et Annie Henri pour leur aide logistique lors des expérimentations. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un financement « Projet Innovant » du département Environnement et Agronomie de l'INRA.

REFERENCES

- Barbosa, P., Krischik, V.A., Jones, C.G. (1991). *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions*. New York:Wiley.
- Biere, A., Marak, H.B., & van Damme, J.M.M. (2004). Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia*, *140*, 430-441.
- Brun, R., & Mary, L. (2003). La rose sous serre pour la fleur coupée. Edition Quae, 145-196.
- Fournier, V., Rosenheim, J.A., Brodeur, J., Diez, J.M., & Johnson, M.W. (2006). Multiple plant exploiters on a shared host: Testing for nonadditive effects on plant performance. *Ecological Applications*, *16*, 2382-2398.
- Hatcher, P.E. (1995). Three-way interactions between plant-pathogenic fungi, herbivorous insects and their host plants. *Biological Reviews*, *70*, 639-694.
- Hatcher, P.E., Paul, N.D., Ayres, P.G., & Whittaker, J.B. (1995). Interactions between rumex spp, herbivores and a rust fungus - the effect of uromyces-rumicis infection on leaf nutritional quality. *Functional Ecology*, *9*, 97-105.
- Hatcher, P.E., Moore, J., Taylor, J.E., Tinney, G.W., & Paul, N.D. (2004). Phytohormones and plant-herbivore-pathogen interactions: Integrating the molecular with the ecological. *Ecology*, *85*, 59-69.
- Koornneef, A., & Pieterse, C.M.J. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, *146*, 839-844.
- Leitner, M., Boland, W., & Mithofer, A. (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, *167*, 597-606.
- Paul, N.D., Hatcher, P.E., & Taylor, J.E. (2000). Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives. *Trends in Plant Science*, *5*, 220-225.
- Pieterse, C.M.J., & Dicke, M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science*, *12*, 564-569.
- Rostas, M., Simon, M., & Hilker, M. (2003). Ecological cross-effects of induced plant responses towards herbivores and phytopathogenic fungi. *Basic and Applied Ecology*, *4*, 43-62.
- Taylor, J.E., Hatcher, P.E., & Paul, N.D. (2004). Crosstalk between plant responses to pathogens and herbivores: a view from the outside in. *Journal of Experimental Botany*, *55*, 159-168.

- Walling, L.L. (2000). The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 195-216.
- Wootton, J.T. (1994). The nature and consequences of indirect effects in ecological communities. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, 443-466.
- Zhu-Salzman, K., Luthe, D.S., & Felton, G.W. (2008). Arthropod-inducible proteins: Broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiology*, 146, 852-858.

**UNITE MIXTE TECHNOLOGIQUE PIVERT : UN OUTIL DE COLLABORATION INTER
STRUCTURES POUR LA PROTECTION INTEGREE DES ROTATIONS A BASE DE BLE
ET DE COLZA**

H. GOYEAU ⁽¹⁾ et X. PINOCHET ⁽¹⁾

⁽¹⁾ animateurs, UMT PIVERT, Campus de Grignon, 78850 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE
goyeau@grignon.inra.fr , pinochet@cetiom.fr,

RÉSUMÉ

L'UMT Pivert est une structure de collaboration entre plusieurs unités de recherche INRA, le CETIOM, Arvalis-institut du végétal, et Agro Paris Tech sur le campus de Grignon dédiée à la promotion de travaux dans le domaine de la protection des rotations à partir de blé et de colza, et à la gestion durable des résistances variétales aux pathogènes. Elle travaille à partir d'un portefeuille de projets de recherche qu'elle a contribué à monter, qu'elle coordonne ou auxquels elle participe. Les échelles de travail vont du gène au système de culture, et les approches le plus souvent multidisciplinaires. L'UMT s'efforce également de promouvoir des actions de formation en matière de protection intégrée des cultures, aussi bien au niveau des étudiants d'Agro Paris Tech que dans le cadre de la formation continue.

Mots-clés : protection intégrée, blé, colza, gestion durable

SUMMARY

**UMT PIVERT: A TOOL FOR CLOSED INTER-STRUCTURES COLLABORATIONS IN THE
FIELD OF INTEGRATED PROTECTION OF ROTATIONS WITH WHEAT AND WINTER
OILSEED RAPE**

The technological mixte unit Pivert is a structure to support closed collaborations between Reseach units from INRA, technical institutes like CETIOM and Arvalis institut du vegetal, and Agro Paris Tech, on Grignon's campus, to promote join research works in the fields of crop protection for rotation based on winter wheat and winter oilseed rape, and of durable management of plant resistances to pathogens. Work is carried out in several research projects that the UMT has built, that it coordinates or to which it contributes. Working scales are going from genes to cropping systems, with multidisciplinary approaches. The UMT Pivert is also involved in the field of teaching for Agro Paris Tech students as well as for specific training for private actors.

Key words: integrated plant protection, wheat, oilseed rape, durable management

INTRODUCTION

Les UMT sont des structures contractuelles créées par le ministère de l'agriculture à partir de 2006 entre des structures de recherche publiques et d'enseignement supérieur, et des structures du développement agricoles. Les UMT sont définies par une note de la DGER de mai 2005 : « Les UMT sont de nouvelles formes d'association des partenaires de la recherche, de la formation et du développement agricole ayant pour objectif, dans un même lieu de fluidifier et d'intensifier les collaborations et travaux communs pour favoriser les innovations et le travail multidisciplinaire »

L'UMT Pivert a été labellisée en juillet 2006, en même temps qu'une première génération de 5 autres UMT, sur une proposition de programme comprenant des actions de formation, des travaux de recherche en partenariat en matière de gestion durable des résistances variétales aux pathogènes, et des réflexions et des actions à lancer dans le domaine de la protection intégrée des rotations à base de blé et de colza. La labellisation portait sur une première phase de 3ans (2006-09) qui vient d'être prolongée jusqu'en 2011.

Les partenaires sont :

- Agro Paris Tech,
- Arvalis institut du végétal,
- Le CETIOM
- L'UMR INRA –Agro Paris Tech EGC (Environnement Grandes Cultures)
- L'UMR INRA BIOGER-CPP (BIOlogie et GEstion des Risques en agriculture - Champignon Pathogènes des Plantes).
- L'UMR INRA-Agro Paris Tech Agronomie

Les moyens humains consacrés par chaque structure à l'UMT sont compris entre 3 et 6 ETP, pour un total de 25 ETP. Cette communication présente succinctement les principaux programmes de travail de l'UMT ainsi que ces activités de formation.

LES PROJETS INITIAUX

Au départ, l'UMT a été constituée avec les projets communs qui démarraient en même temps que la labellisation ou qui avaient démarré l'année précédente. Ces projets portaient essentiellement sur les questions de gestion durable des résistances variétales aux pathogènes. Ils sont aujourd'hui terminés ou en voie de l'être (Dec 2008 à Dec 2009). Ces projets donnent lieu, au cours de cette conférence, à de nombreuses communications orales ou sous forme de posters, ainsi qu'à une démonstration de didacticiels élaborés pour aider à la formation sur la distinction de symptômes.

Le projet CASDAR 05391(2006-2009 «Mise au point et utilisation d'outils de biovigilance et de gestion durable des résistances variétales aux pathogènes ») est orienté vers la mise au point ou l'amélioration d'outils utiles pour gérer durablement les résistances variétales. Il s'agit d'outils pédagogiques facilitant l'identification de symptômes, de méthodes d'évaluation variétales, de marqueurs de virulences, et de modèle spatio temporel d'aide à la conception de stratégies de gestion innovantes. Ces outils sont mis en œuvre aussi dans le cadre de suivis d'opérations pilotes sur le terrain. Les couples plante-pathogènes pris en compte sont les rouilles sur blé, le Phoma du colza et le mildiou du tournesol.

Le projet FSOV (2005-2007 «durabilité de la résistance partielle à la rouille brune du blé ») a permis de caractériser les virulences de 300 à 400 isolats par an pendant 3 ans de Rouille brune collectés à partir de réseaux d'essais variétés, et de travailler sur les méthodes d'évaluation des variétés d'abord au champ, puis en conditions contrôlées. Ce travail a permis de mettre en évidence une variabilité importante de la résistance partielle à la rouille parmi 94 variétés françaises testées. Les composantes de l'agressivité des souches ont été évaluées. On a montré qu'il y a des variations de ces composantes selon le génotype utilisé suggérant ainsi que ces résistances partielles sont contournables par sélection d'isolats agressifs.

Les équipes de l'UMT ont apporté des contributions au projet ADD CEDRE (2005-2008 « exploitation durable des résistances aux maladies chez les végétaux »), projet à large échelle comportant de nombreux modèles biologiques différents qui cherchait à aborder les questions de gestion durable des résistances par des approches pluridisciplinaires allant de la biologie à la sociologie. Ce projet a permis de mettre à disposition d'une communauté plus large les efforts de modélisation faits autour du Phoma du colza dans le cadre de l'UMT et de montrer la généralité de ce modèle par un début de transposition au cas du Phytophthora de la pomme de terre. Il nous a également permis de dialoguer avec les sociologues et les économistes sur les freins à l'acceptabilité des stratégies de gestion.

Un deuxième projet CASDAR (coordonné par le CETIOM) a été soumis en même temps que le dossier de l'UMT. Il avait pour objet de consolider les monitorings en matière de résistances des bioagresseurs aux pesticides dans lesquels les instituts techniques et l'UMR BIOGER sont fortement impliqués, de développer des règles de décisions ou des stratégies d'évitement permettant de réduire les applications et d'inciter à leur bonne gestion. Ce projet a permis davantage d'échanges entre filières sur des monitorings ayant les mêmes objectifs, de développer la communication autour des résultats obtenus, et de soutenir les stratégies d'évitement amorcées pour la septoriose du Blé et de voir comment élargir ce type d'approche sur le colza, soit pour la lutte contre les effets des meligèthes, soit pour ceux dus au Sclerotinia (forte implication de l'UMR EGC).

Tableau n°1 : Portefeuille de projets réalisés ou en cours dans le cadre de l'UMT Pivert . List of research projects carried out in the frame of UMT Pivert .

| Periode | TYpe | titre | coordination | Participants UMT |
|---------|----------------|--|--------------|------------------------------------|
| 2005-08 | ADD-ANR | CEDRE (gestion durable des résistances variétales aux pathogènes) | Rennes BIO3P | BIOGER, Agronomie, CETIOM, Arvalis |
| 2006-09 | CASDAR | Outils Gestion durable des résistances | CETIOM | BIOGER, Agronomie |
| 2007-09 | CASDAR | Gestion des pesticides: surveillance des résistances, emploi raisonné | CETIOM | Arvalis, BIOGER, EGC, agronomie |
| 2005-07 | FSOV | durabilité de la résistance partielle à la rouille brune du blé | BIOGER | Arvalis |
| 2008-11 | ANR genoplante | Avirlep (<i>Leptosphaeria maculans</i>) | BIOGER | CETIOM |
| 2009-11 | FSOV | Résistance partielle à la rouille brune : sources de résistance, utilisation en sélection et durabilité | BIOGER | Arvalis |
| 2009-11 | FSOV | Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par <i>Mycosphaerella graminicola</i> | Arvalis | BIOGER, EGC |
| 2008-11 | CTPS | Evolep (Phoma du colza) | CETIOM | BIOGER, Agronomie |
| 2008-10 | INRA SPE | <i>Leptosphaeria maculans</i> : diversité des virulences et fitness | BIOGER | CETIOM |
| 2009-11 | CASDAR | Protection Intégrée des rotations avec Colza et blé tendre : Conception et évaluation multicritères d'itinéraires techniques | CETIOM | EGC, Agronomie |
| 2009-11 | ANR Genoplante | Twist (Septoriose) | BIOGER | Arvalis |
| 2008-11 | CTPS | Tolérance du blé tendre aux stress biotiques et abiotiques | Arvalis | EGC |
| 2007-11 | UE | REX ENDURE participation concertée à différents working groups | INRA | Tous |

LES NOUVEAUX PROJETS

Outre les projets présents à la création de l'UMT, les différentes structures se sont efforcées de débattre, de concevoir et de lancer des projets nouveaux sur les thématiques définies pour le travail de l'UMT. Les projets se répartissent autour de 4 axes principaux :

Insectes

Les difficultés rencontrées pour la maîtrise des populations de meligèthes depuis le début des années 2000, la raréfaction des molécules disponibles (arrêt de la plupart des insecticides à l'exception des pyrèthrines) et les problèmes de résistance rencontrés avaient amené un début de réflexion entre les partenaires de l'UMT sur les thématiques de recherche à promouvoir pour des protections alternatives contre les insectes du colza et du blé. L'UMR d'agronomie avait commencé un travail dans le cadre du colza biologique. Toutes les pistes de réflexions ne se sont à ce jour pas concrétisées. Deux projets de thèses ont été lancés avec le soutien de l'école doctorales ABIES d' Agro Paris Tech. L'une porte sur les interactions entre populations de méligèthes et paysage, et l'autre sur des approches d'écophysiologie permettant d'analyser les processus de compensation des effets des méligèthes. Ces approches ont été intégrées au moins en partie dans le projet CASDAR 8053 Picoblé.

Septoriose

L'ensemble des réflexions sur les maladies des céréales a abouti concernant la septoriose à un programme concerté Arvalis, UMR BIOGER et UMR EGC et à des réponses à appels d'offre au printemps 2008. 2 projets ont été acceptés l'un au FSOV en association avec les semenciers et un partenaire Hollandais, coordonné par Arvalis et l'autre à l'AO ANR-génoplane coordonné par l'UMR BIOGER. Ces projets démarrent début 2009. Les volets ayant pour objectif la construction d'un modèle ecophysiologique permettant de concevoir des itinéraires techniques minimisant l'impact de la maladie ont pu démarrer dès 2007 avec un projet CASDAR coordonné par le CETIOM associant sur ce point Arvalis et l'UMR EGC. La consolidation de ce volet se poursuit dans le cadre du projet CASDAR Picoblé démarrant en 2009, ainsi qu'avec l'apport d'une thèse qui démarrera en 2009, financé par Arvalis et en collaboration entre l'UMR BIOGER, l'UMR EGC et Arvalis.

Protection intégrée

Au départ de l'UMT, les travaux étaient très orientés gestion durable des résistances variétales aux pathogènes. L'UMR d'agronomie avait par contre des acquis en matière de conception de système de culture et d'itinéraires techniques innovants. Ils avaient amorcé des travaux sur le blé et plus récemment sur colza. Dans le cadre de l'UMT, le CETIOM et l'UMR d'agronomie ont monté un projet CASDAR ayant pour objectif principal la conception d'itinéraires techniques innovants en blé et en colza. L'originalité du projet repose sur une conception d'itinéraires en boucle, avec débats d'experts, tests d'hypothèses à l'aide de différents modèles disponibles, tests sur le terrain, suivis d'évaluations et de bilan qui viennent nourrir le cycle suivant de conception. Ce projet Picoblé a été accepté et a démarré début 2009, avec un partenariat large, en particulier au niveau des chambres d'agricultures.

Phoma

Le Phoma du colza était avant l'UMT l'objet de collaborations assez anciennes entre le CETIOM, l'UMR BIOGER et l'UMR d'Agronomie. Plusieurs initiatives permettent de poursuivre le travail effectué dans le cadre des projets se finissant. Le projet CTPS EVOLEP (coordination CETIOM) permet de réactualiser la connaissance des profils de virulence des populations présentes sur les principaux sites d'évaluation variétale, de poursuivre la mise au point de marqueurs moléculaires, en particulier pour la virulence 7, de poursuivre les surveillances d'un site Pilote de gestion, et enfin d'améliorer le modèle spatio temporel de minimisation du risque pour aller à un stade suffisant qui permette de passer à l'étude virtuelle d'un grand nombre de scénarios de gestion. Le projet Génoplane Avilep (Coordination BIOGER) est plus amont et cherche à exploiter les connaissances récentes sur le génome du champignon, d'une part pour identifier de nouveaux gènes d'avirulence et

être en mesure de préparer par anticipation les outils de suivi, et d'autre part aborder les questions du déterminisme de l'agressivité chez le champignon. Ces projets ont été complétés par un soutien du département SPE de l'INRA dans le cadre d'un appel d'offre propre à ce département INRA.

FORMATION

L'UMT Pivert a souhaité également valoriser son travail par le biais de la formation. Ces formations rentrent soit dans le cadre des enseignements d'AgroParisTech et dans le cadre de l'Option de 3eme année "Protection des cultures" commune à AgroParisTech, AgroCampus Rennes et SupAgro Montpellier, soit dans le cadre des propositions de stages de formation continue. Les propositions de stage sont complémentaires de celles de l'ACTA. Elles sont publiées dans le catalogue commun CETIOM-Arvalis. Elles portent actuellement d'une part sur les questions de reconnaissance de symptômes et d'autre part sur la gestion durable des résistances variétales aux pathogènes. Les structures de l'UMT restent ouvertes à la conception de stages sur mesure en fonction des sollicitations.

REMERCIEMENTS

Les acteurs de l'UMT remercient l'ACTA et le Ministère de l'agriculture, ainsi que l'ensemble des bailleurs de fonds soutenant leurs projets.

**OBSERVATIONS RELATIVES À L'IMPACT DU TRAVAIL DU SOL ET À LA GESTION
DES RÉSIDUS DE RÉCOLTE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU PIÉTIN VERSE, DE LA
SEPTORIOSE, DE L'HELMINTHOSPORIOSE ET DE LA FUSARIOSE DU BLÉ TENDRE,
DANS LE CADRE D'UN ESSAI ROTATION DE LONGUE DURÉE**

C. MAUMENE ⁽¹⁾, G. BEAUVALLET⁽¹⁾, J. LABREUCHE⁽¹⁾, B. ORLANDO ⁽¹⁾

⁽¹⁾ ARVALIS - Institut du végétal, Boigneville, 91720 BOIGNEVILLE, France

RÉSUMÉ

L'utilisation de fongicides n'est pas le seul recours possible pour lutter contre les maladies du blé tendre. Les techniques culturales et notamment le travail du sol et la gestion des résidus de cultures en interaction avec le précédent peuvent influencer largement sur la pression de maladie. L'impact du précédent et du travail du sol sur le développement du piétin verse, de la septoriose, de l'helminthosporiose et de la fusariose de l'épi, est mesuré dans le cadre d'un dispositif rotation de longue durée, où le blé intervient derrière un précédent betterave, maïs et en monoculture, combiné à différents régimes de travail du sol et de gestion des résidus de cultures. Les résultats sont analysés en fonction de la présence des résidus. Dans le cas de l'helminthosporiose du blé, l'efficacité d'un labour équivaut à celle résultant de l'application de fongicides. Parce qu'elles interviennent très tôt en saison, l'importance de ces techniques n'est pas toujours considérée à sa juste valeur. L'importance du devenir des résidus de culture est discutée.

Mots-clés : maladies du blé, travail du sol, rotation, résidus de culture.

SUMMARY

The use of fungicides is not the only way possible to control wheat diseases. The agronomic practices, especially the soil cultivation and the management of the crop residues, in interaction with the previous crop, may have a great influence on the disease pressure. The incidence of the previous crop on the development of eyespot, septoria (*Mycosphaerella graminicola*), *Drechslera tritici-repentis*, and *Fusarium* head blight, is assessed in a long term rotation trial where wheat is included after sugar beet, maize and in continuous crop, according with different cultivations and crop management techniques. The results are analysed according to the presence of crops residues. In some cases, ploughing is giving a better control than fungicides. In the case of tan spot on wheat, the efficacy of ploughing is equivalent to those of spraying fungicides. Because, they take place very early in the season, the importance of these techniques is not always regarded at his real value. The importance of the residues is discussed.

Key words: wheat diseases, soil cultivation, rotation, crop residues.

INTRODUCTION

La pression sociale pour une moindre utilisation des produits phytosanitaires a conduit à des évolutions réglementaires qui se sont concrétisées par un plan interministériel de réduction des produits phytosanitaires puis par le plan Ecophyto de réduction de l'usage des pesticides 2008-2018, issu des tables rondes du « Grenelle de l'environnement » d'octobre 2007. Il propose un objectif de réduction de moitié des usages des pesticides dans un délai de 10 ans si possible, et notamment en accélérant la diffusion des méthodes de lutte alternatives. La protection contre les maladies représente environ 40 % des consommations de produits de protection des plantes sur le blé sur environ 5 millions d'ha. Réduire l'utilisation des fongicides, sans considération des risques encourus peut conduire à des pertes économiques graves. Pratiquer des baisses d'intrant, tout en limitant leur impact économique suppose de bien évaluer les risques, voire de les maîtriser, en ayant recours à des techniques de lutte dites « alternatives », qui mobilisent généralement les grands principes de l'agronomie. Nous proposons de rassembler ici des données relatives aux maladies du blé tendre, acquises sur un dispositif de longue durée, mettant en œuvre différentes rotations, incluant du blé sous différents régimes de travail du sol. Ces données pourront soutenir des conseils de prévention des risques, notamment grâce à une bonne gestion des résidus de cultures, en amont de l'utilisation des produits phytosanitaires.

MATERIEL ET MÉTHODE

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le dispositif expérimental est un dispositif en parcelles de taille moyenne (50 m X 16 m), situé sur la station expérimentale de Boigneville (Labreuche et al, 2003) et permettant de faire intervenir des matériels identiques à ceux utilisés dans les exploitations agricoles. Le blé intervient en rotation avec du maïs, dans un système blé/maïs grain ou en rotation avec de la betterave, de l'orge de printemps et de la féverole d'hiver (le pois de printemps a cédé la place à la féverole à partir de 2007) dans une succession betterave/blé/féverole d'hiver/orge de printemps. Le blé intervient également dans le dispositif en monoculture. Chaque succession est répétée pour permettre chaque année de disposer d'un blé pour chacune des successions. Chaque répétition est sub-divisée en sous-blocs, où sont testés différents régimes de travail du sol : L0 (labour, 21 cm), L1 (travail superficiel 5-10 cm), L2 (semis direct, rotasemis, Huard SD 300 jusqu'en 2007), L2' (semis direct, Horsch SE (Semeato TDNG depuis 2007)). Dans le cas du travail du sol simplifié pour un précédent maïs, l'intérêt d'un broyage des résidus du précédent (en l'absence de broyage sur la machine de récolte) est testé.

VARIABLES MESUREES

Les variables mesurées correspondent à des observations de l'intensité des différentes maladies présentes sur le dispositif et observées, pour les données présentées les plus anciennes, depuis 2001. Les observations antérieures n'ont pas été prises en compte pour cette communication.

Le piétin verse (*Oculimacula yallundae* et *Oculimacula acuformis*) fait l'objet d'un échantillonnage de 200 tiges par modalité au stade 1-2 nœuds (16-23 avril) et au stade floraison + 10 jours (8-21 juin) sur la période de 2004 à 2009. La fréquence de la maladie est observée à chaque période. Au stade floraison + 10 jours, une estimation de la section nécrosée par la maladie est réalisée.

L'helminthosporiose (*Drechslera tritici-repentis*) a fait l'objet d'observations ponctuelles en 2003, 2005 et 2006, en fonction de la présence de la maladie sur le dispositif, dépendant principalement de la sensibilité de la variété retenue pour l'ensemble de l'essai. L'intensité de la maladie est réalisée sur un échantillon de 60 feuilles prélevées aléatoirement, par estimation de la surface malade sur les étages foliaires les plus discriminants.

Des observations sur la septoriose (*Mycosphaerella graminicola*) ont été réalisées en 2009, selon un mode opératoire identique à celui suivi conduit sur l'helminthosporiose, par estimation de la surface malade sur un échantillon de feuilles prélevées aléatoirement. L'ensemble des successions culturales reçoit une protection fongicide (à l'exception des monocultures de blé : conduites traitées et non traitées). Pour mieux apprécier la pression de maladie, une zone de réserve de 50 m² environ (bâchée au moment des traitements) a été aménagée dans les parcelles de blé de maïs après labour et semis direct.

La fusariose de l'épi est estimée par dénombrement moyen d'épilllets malades par épi, rapporté au nombre d'épilllets moyen par épi. Les observations portent sur 200 épis, uniquement les années où la présence de symptômes est considérée comme suffisante pour justifier des observations comparatives en systèmes. Des observations ont eu lieu en 2002, 2003, 2004, et 2008.

Pour évaluer la teneur en toxines de *Fusarium*, chaque modalité fait l'objet d'un prélèvement de grain à la récolte (3 kg environ). L'échantillon est ensuite homogénéisé, nettoyé pour retirer les impuretés (pailles glumes, petits grains, grains cassés, poussières...) puis divisé de manière à obtenir 1,5 kg de grain pour analyse. Celui-ci est d'abord broyé à l'aide d'un broyeur équipé d'une grille de 1 mm, puis un sous-échantillon de 500 g de ce broyat a été prélevé pour analyse des trichothécènes par chromatographie en phase gazeuse jusqu'en 2006, puis en chromatographie en phase liquide à partir de 2007. Les teneurs en déoxynivalénol (DON), mycotoxine la plus fréquemment rencontrée sur blé, sont donc disponibles pour l'ensemble de ces échantillons.

RESULTATS

Piétin verse

Tab.1 : % de tiges touchées (présence sur gaine ou tige) par le piétin verse au stade 1-2 nœuds de 2004 à 2009, en fonction du précédent, du travail du sol, de la gestion des résidus de récolte, et des traitements fongicides.

| | Précédent | Travail du sol | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | Moyenne |
|----|-----------|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|
| | | | 21/04/2004 % tiges malades | 22/04/2005 % tiges malades | 27/04/2006 % tiges malades | 16/04/2007 % tiges malades | 23/04/2008 % tiges malades | 22/04/2009 % tiges malades | |
| 1 | Maïs | Labour L0 | 4 | 0 | 6 | 2 | 0 | 3 | 3 |
| 2 | | Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 0 | 4 | 14 | 2 | 1 | 4 |
| 3 | | Technique simplifiée L1 non broyé | 2 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 3 |
| 4 | Betterave | Semis direct L2 | 2 | 0 | 2 | 6 | 0 | 1 | 2 |
| 5 | | Labour L0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 | 0 | 1 |
| 6 | | Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 7 | Blé | Labour L0 | 4 | 0 | 0 | 20 | 20 | 2 | 8 |
| 8 | | Labour L0 non traité | 2 | 4 | 0 | 28 | 24 | 5 | 11 |
| 9 | | Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 0 | 2 | 22 | 0 | 3 | 5 |
| 10 | | Technique simplifiée L1 broyé non traité | 6 | 0 | 2 | 28 | 2 | 2 | 7 |
| 11 | | Semis direct L2 traité | 4 | 0 | 0 | 30 | 2 | 1 | 6 |
| 12 | | Semis direct L2 non traité | 0 | 0 | 4 | 36 | 0 | 0 | 7 |

En début de saison, le piétin est généralement peu présent sur l'ensemble des années pour lesquelles des observations sont disponibles. La fréquence sur tige ne dépasse qu'exceptionnellement le seuil de fréquence de 30 % (seuil de traitement). Celui-ci est atteint en monoculture de blé, en semis direct, en 2007 seulement. Malgré les faibles fréquences observées, l'effet du précédent est sensible à ce stade.

Le piétin verse est, en effet, plus fréquent en monoculture de blé qu'en blé assolé (précédent betterave ou maïs). En tendance le labour est plus favorable à la maladie dans le cas de la monoculture de blé qui est le seul cas où la pression de maladie permet de juger des différences induites par le travail du sol.

Tab.2 : % de section nécrosée par le piétin verse au stade floraison + 10 à 20 jours, de 2004 à 2009, en fonction du précédent, du travail du sol, de la gestion des résidus de récolte, et des traitements fongicides.

| | Précédent | Travail du sol | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | Moyenne |
|----|-----------|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| | | | 08/06/2004 | 21/06/2005 | 13/06/2006 | 16/06/2007 | 09/06/2008 | 10/06/2009 | |
| 1 | Maïs | Labour L0 | 5 | 8 | 3 | 15 | 50 | 43 | 21 |
| 2 | | Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 0 | 1 | 2 | 35 | 5 | 7 |
| 3 | | Technique simplifiée simplifié L'1 non broyé | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| 4 | Betterave | Semis direct L2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 27 | 4 | 6 |
| 5 | | Labour L0 | 1 | 16 | 0 | 10 | 44 | 23 | 16 |
| 6 | | Technique simplifiée L1 broyé | 1 | 2 | 3 | 1 | 65 | 7 | 13 |
| 7 | Blé | Labour L0 | 7 | 9 | 6 | 15 | 59 | 45 | 24 |
| 8 | | Labour L0 non traité | 15 | 30 | 16 | 19 | 80 | 68 | 38 |
| 9 | | Technique simplifiée L1 broyé | 1 | 20 | 16 | 29 | 35 | 14 | 19 |
| 10 | | Technique simplifiée L1 broyé non traité | 19 | 28 | 9 | 39 | 68 | 53 | 36 |
| 11 | | Semis direct L2 traité | 2 | 16 | 9 | 35 | 20 | 14 | 16 |
| 12 | | Semis direct L2 non traité | 15 | 33 | 10 | 42 | 56 | 48 | 34 |

Au stade floraison, la pression de maladie est plus élevée, mais reste en moyenne inférieure au seuil de 30 % de section nécrosée, considéré comme le seuil de nuisibilité. Il est cependant atteint et dépassé en moyenne en l'absence de traitement fongicide sur toutes les parcelles de la monoculture. Les blés assolés sont sensiblement moins attaqués.

S'agissant de l'effet du travail du sol, le labour est particulièrement favorable à la maladie dans le cas de la rotation maïs/blé. Dans le cas de la rotation betterave/blé/féverole/orge de printemps, l'impact du labour est peu marqué. En monoculture, les parcelles labourées sont en moyenne un peu plus concernées par la maladie (lorsque le blé est traité), mais les différences observées restent très limitées.

L'impact des traitements fongicides sur le piétin verse est nettement perceptible en monoculture. L'efficacité des traitements reste malgré tout modeste et avoisine 45 % sur l'ensemble des données disponibles.

Helminthosporiose du blé

La maladie a été observée en 2003, 2005 et 2006 dans la monoculture exclusivement. Les 3 années concernées correspondent à des années où la variété de blé retenue (Caphorn) était particulièrement sensible à la maladie. Les autres successions de cultures n'ont jamais présenté de symptômes.

Tab 3 : Incidence du travail du sol et de la protection fongicide sur l'intensité de l'helminthosporiose du blé (% de surface malade) observée sur les 4 derniers étages foliaires du blé, au stade épiaison-floraison, en 2003, 2005 et 2006, sur la monoculture de blé.

| | 2003 | | | moyenne | 2005 | | | moyenne | 2006 | | | | moyenne | 2003 à 2006 moyenne |
|--|------|-----|-----|---------|------|-----|-----|---------|------|-----|-----|-----|---------|------------------------|
| | %F1 | %F2 | %F3 | | %F2 | %F3 | %F4 | | %F1 | %F2 | %F3 | %F4 | | |
| Labour L0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 4 | 0 | 2 | 14 | 65 | 20 | 8 |
| Labour L0 non traité | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 38 | 13 | 1 | 2 | 13 | 69 | 21 | 12 |
| Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 5 | 14 | 7 | 0 | 1 | 9 | 64 | 19 | 9 |
| Technique simplifiée L1 broyé non traité | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 15 | 55 | 25 | 2 | 5 | 20 | 89 | 29 | 19 |
| Semis direct L2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 4 | 11 | 37 | 17 | 1 | 6 | 20 | 59 | 22 | 13 |
| Semis direct L2 non traité | 6 | 11 | 10 | 9 | 6 | 24 | 70 | 33 | 2 | 7 | 28 | 89 | 32 | 25 |

En moyenne sur les 3 années, le semis direct présente davantage de symptômes, que les 2 autres modalités de travail du sol. La maladie est moins présente sur le labour, que dans le système de travail du sol simplifié en 2003 et 2005, mais dans une moindre mesure en 2006.

Dans tous les cas, la protection contre les maladies a réduit l'intensité de la maladie, avec une efficacité variable et en moyenne proche de 40 %.

Septoriose

Les premières observations ont été réalisées en 2009, en fin de saison sur l'ensemble des parcelles traitées. Seules quelques modalités ont pu être observées en l'absence de protection fongicide, dans des zones réservées à cet effet.

Tab 4 : Incidence de la rotation et du travail du sol, sur l'intensité de septoriose (*Mycosphaerella graminicola*, % de surface malade) observée sur les 3 derniers étages foliaires, le 17 juin 2009.

| | | F1 | F2 | F3 | moyenne |
|-----------|--|----|----|----|---------|
| Maïs | Labour L0 | 1 | 8 | 33 | 14 |
| | Labour L0 non traité | 16 | 62 | 94 | 58 |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 2 | 28 | 10 |
| | Technique simplifiée L'1 non broyé | 0 | 4 | 29 | 11 |
| | Semis direct L2 | 1 | 3 | 9 | 4 |
| | Semis direct L2 non traité | 3 | 10 | 39 | 17 |
| Betterave | Labour L0 | 1 | 5 | 44 | 17 |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 1 | 3 | 25 | 10 |
| Blé | Labour L0 | 2 | 20 | 59 | 27 |
| | Labour L0 non traité | 9 | 64 | 98 | 57 |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 1 | 12 | 67 | 27 |
| | Technique simplifiée L1 broyé non traité | 2 | 20 | 72 | 31 |
| | Semis direct L2 | 1 | 13 | 60 | 25 |
| | Semis direct L2 non traité | 9 | 48 | 87 | 48 |

La pression de maladie est sensiblement plus importante en monoculture de blé. L'intensité moyenne de la maladie est en moyenne de 25 % dans les parcelles traitées, tous étages foliaires confondus (45 % en l'absence de traitement). Après maïs et betterave, l'intensité de la maladie est en moyenne plus modérée respectivement de 9 et 13 % sur l'ensemble des modalités traitées.

En monoculture, et en l'absence de traitement, l'intensité de la maladie est la plus forte en système labouré (57 %), contre (31 %) en technique simplifiée et (48 %) semis direct.

En présence de traitements, ces différences ne sont plus perceptibles.

Pour les blés avec précédent maïs et betterave, le labour est en tendance un peu plus favorable à la maladie avec respectivement 14 et 17 %, contre 10 % et 10 % en travail du sol simplifié. L'écart reste ici modeste pour des parcelles traitées mais apparaît beaucoup plus important en l'absence de traitement pour la partie maïs : 58 % de surface malade en système labouré contre 17 % en semis direct.

Fusariose

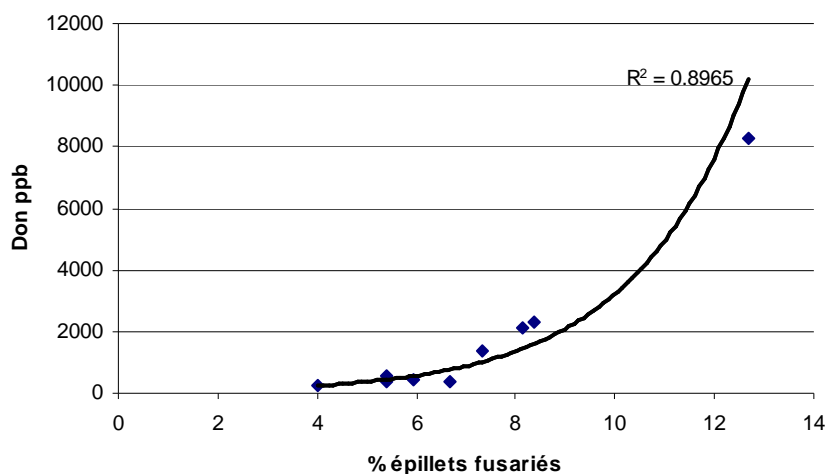
Tab 5 : Incidence de la rotation et du travail du sol, sur l'intensité de fusariose du blé (*Fusarium graminearum* principalement), % d'épillets malades et la teneur en DON (ppb) observée depuis 2002.

| Précédent | Travail du sol | 2002 | | 2003 | | 2004 | | 2008 | | 2002 à 2008* | |
|-----------|--|---------------------|------|---------------------|-------|---------------------|------|---------------------|-------|---------------------|------|
| | | % épillets fusariés | DON | % épillets fusariés | DON | % épillets fusariés | DON | % épillets fusariés | DON | % épillets fusariés | DON |
| Maïs | Labour L0 | 4 | 600 | 12 | 4600 | 16 | 1100 | 2 | 2110 | 8 | 2103 |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 6 | 800 | 12 | 4800 | 13 | 1400 | 3 | 2230 | | |
| | Technique simplifiée L1 non broyé | | | 19 | 11900 | 17 | 1800 | 7 | 6880 | | |
| | Semis direct L2 | 5 | 1600 | 24 | 17300 | 13 | 3100 | 8 | 11200 | | |
| Betterave | Labour L0 | 0 | 100 | | 4600 | 8 | 250 | 3 | 427 | 13 | 8300 |
| | | | | | | | | | | | |
| Blé | Labour L0 | 1 | 60 | 7 | 1100 | 9 | 90 | 6 | 259 | 5 | 377 |
| | Labour L0 non traité | 1 | 60 | 16 | 4800 | 9 | 90 | 3 | 593 | | |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 0 | 60 | 4 | 590 | 10 | 80 | 2 | 383 | | |
| | Technique simplifiée L1 broyé non traité | 1 | 60 | 8 | 1000 | 9 | 160 | 5 | 429 | | |
| | Semis direct L2 | 0 | 70 | 4 | 1600 | 9 | 60 | 8 | 410 | | |
| | Semis direct L2 non traité | 1 | 80 | 2 | 970 | 9 | 140 | 15 | 327 | | |

Les observations réalisées sur les épis font apparaître l'influence du précédent sur le risque de fusariose. Le % d'épillets malades est plus élevé après maïs, que derrière un précédent blé ou betterave. Derrière maïs, le semis direct favorise encore davantage la fusariose de l'épi. En travail superficiel, le broyage des résidus de récolte, permet de diminuer la pression de maladie, à un niveau comparable à celui observé après labour.

Noter que les teneurs en DON sont corrélées aux fréquences des épillets malades selon une loi de type exponentielle semble-t-il (Fig 1).

Fig. 1 : Relation entre le % d'épillets fusariés et la teneur en DON sur la moyenne des observations réalisées sur 4 années (2002, 2003, 2004, 2008).



Tab 6 : Incidence de la rotation et du travail du sol, sur la teneur en DON (ppb) à la récolte observée entre 1999 et 2008.

| Précédent | Travail du sol | | | | | | | | | | | MOYENNE |
|-----------|--|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|-----------|
| | | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2003-2008 |
| Maïs | Labour L0 | 1700 | 300 | 10 | 600 | 4600 | 1100 | 310 | 1800 | 241 | 2110 | 1694 |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 3975 | 770 | 10 | 800 | 4800 | 1400 | 80 | 3000 | 345 | 2230 | 1976 |
| | Technique simplifiée L1 non broyé | | | | | 11900 | 1800 | 240 | 960 | 448 | 6880 | 3705 |
| | Semis direct L2 | 2875 | 1800 | 10 | 1600 | 17300 | 3100 | 43 | 1700 | 483 | 11200 | 5638 |
| Betterave | Labour L0 | 600 | 100 | 10 | 100 | 4600 | 250 | 20 | 75 | 747 | 427 | 1020 |
| | | 260 | 30 | 10 | 60 | 1100 | 90 | 23 | 110 | 32 | 259 | 269 |
| Blé | Labour L0 non traité | 30 | 10 | 60 | 4800 | 90 | 26 | 150 | 138 | 593 | 966 | |
| | Technique simplifiée L1 broyé | 200 | 30 | 10 | 60 | 590 | 80 | 20 | 120 | 69 | 383 | 210 |
| | Technique simplifiée L1 broyé non traité | | | | | | | | | | | |
| | | | 130 | 10 | 60 | 1000 | 160 | 20 | 85 | 86 | 429 | 297 |
| | Semis direct L2 | 300 | 110 | 10 | 70 | 1600 | 60 | 23 | 0 | 47 | 410 | 357 |
| | Semis direct L2 non traité | | 30 | 10 | 80 | 970 | 140 | 20 | 95 | 57 | 327 | 268 |

Les moyennes en dernière colonne correspondent aux années 2003 à 2008 pour lesquelles toutes les modalités comparées étaient présentes.

Les teneurs en DON sont d'abord dépendantes de l'année, ce qui est logique puisque le développement de la fusariose est fonction des conditions climatiques de l'année. En 2001, 2005 et 2007, toutes les parcelles présentent des teneurs inférieures à la limite maximale réglementaire de 1250 ppb pour une utilisation en alimentation humaine. En 2003 et 2008, tous les précédents maïs, quel que soit le travail du sol, sont au dessus de cette limite.

Globalement les précédents maïs présentent en moyenne des teneurs en DON 3 fois supérieures à celles observées après un précédent betterave et 6 fois supérieures à celle observée après un blé. En fréquence le seuil de 1250 ppb est atteint 7 années sur 10 après maïs, contre 1 année sur 10 derrière betterave ou en monoculture de blé.

L'effet travail du sol est particulièrement net. Les teneurs en DON en semis direct sont très nettement supérieures à celles observées après un labour. Derrière maïs, le travail superficiel lorsqu'il s'accompagne d'un broyage des résidus, permet d'obtenir un résultat proche de celui obtenu avec un labour. En revanche sans broyage des résidus de maïs, la teneur en DON se rapproche de ce qui est observé en semis direct. En fréquence le seuil de 1250 ppb est atteint 7 années sur 10 en semis direct derrière maïs et 4 années sur 10 en système labouré derrière maïs, contre 1 fois sur 10 seulement derrière betterave en monoculture de blé (avec labour).

DISCUSSION

D'une manière générale les données relatives à l'effet des successions de cultures doivent prendre en compte l'importance du travail du sol et l'influence qu'il exerce sur la disponibilité de l'inoculum. En effet selon la nature du travail exercé (superficiel ou labour) il peut en résulter une remontée ou un enfouissement des résidus infectés et dont l'influence dépendra de la succession de cultures retenues.

Cas du piétin verse : l'inoculum de piétin verse est porté par les résidus de cultures (chaumes). Le champignon saprophyte survit sur les débris de la culture sous forme de mycelium pendant une durée maximale de 3 ans. La forme parfaite du champignon, qu'il s'agisse d'*Oculimacula yallundae* ou d'*Oculimacula acufornis*, bien qu'elle ait été observée ne jouerait qu'un rôle mineur dans la propagation de la maladie. Si l'on ajoute à cela la faible capacité de dispersion des spores asexuées du champignon, le devenir des résidus de récolte apparaît comme déterminant sur le niveau d'inoculum primaire. Dans le cadre de cet essai, l'importance du précédent combiné au travail du sol est vérifiée. La monoculture de blé présente les niveaux d'attaque les plus importants par comparaison aux autres successions de culture. Le travail du sol ne semble pas avoir d'impact déterminant dans ce cas. En système labouré, si les résidus laissés par le blé précédent sont enfouis en fond de labour, en revanche les résidus de l'ante précédent blé sont remontés en surface. La sporulation du champignon est, semble-t-il, stimulée lors du retour des chaumes infectés en surface (Schrödter et Fehrmann, 1971a, 1971b) et pourrait expliquer que l'on observe autant de piétin verse voire légèrement plus dans le système labouré, comparé aux systèmes sans labour, en semis direct ou en travail superficiel.

Dans la cas de la rotation maïs/blé, la partie labourée est la plus attaquée. Là encore la remontée de résidus infectés en surface par le labour est certainement la principale explication. En l'absence de labour, les résidus laissés en surface se décomposent et disparaissent progressivement pour ne représenter qu'un danger mineur pour la culture de blé suivante (alors qu'ils se conservent en fond de labour pour réapparaître l'année suivante dans un système labouré).

Après betterave, le travail du sol semble sans importance particulière. Il est vrai que dans ce cas l'ante précédent est une orge de printemps, espèce moins sensible à la maladie et, qui plus est, implantée au printemps.

L'inoculum porté par les résidus d'orge de printemps est très certainement limité, de même que celui résultant de la culture de blé, 3 ans auparavant (si toutefois il est encore présent). Le labour, dans ces conditions, est logiquement sans influence.

Cas de l'helminthosporiose : dans le cas de *Dreschera-tritici repentis* le champignon se conserve principalement sur les résidus de culture et produit au printemps de l'année suivante la forme sexuée du champignon. Les pseudothécies formées, vont libérer sous l'action de la pluie, des ascospores transportées par le vent. Compte tenu de la biologie de ce champignon, il est logique de constater la présence de la maladie en blé/blé et surtout en l'absence de travail du sol. Les résidus infectés sont alors présents en surface et en quantité. Le semis direct semble, dans notre cas, plus favorable que le travail du sol simplifié qui produit une incorporation partielle des débris de culture et facilite leur décomposition.

On observe, par ailleurs, que cette différence entre travail superficiel et labour est moins marquée en 2006, qu'en 2003 et 2005 où l'état sanitaire de la parcelle labourée est nettement plus favorable. Il est possible que l'effet positif du labour, se soit exprimé plus nettement à l'installation de la maladie sur le site. La maladie étant installée sur le dispositif, les résidus remontés en surface par le labour sont potentiellement infectés. Le labour ne joue plus alors son rôle prophylactique initial.

S'agissant de la protection fongicide, son efficacité est variable et proche de 48 % en semis direct. Par comparaison, l'efficacité du labour, sur les 3 années est estimée en moyenne à 47 %, On obtient ainsi des efficacités comparables, démontrant dans ce cas précis, l'efficacité équivalente des techniques de lutte agronomique avec la lutte chimique. Notez enfin qu'à partir de 2007, la variété Isengrain résistance à l'helminthosporiose a succédé à Caphorn et provoqué la disparition de la maladie sur l'essai. Remplacée en 2009 par la variété Mercato, des symptômes de la maladie ont à nouveau été observés dans la monoculture de blé en l'absence de labour sur ce même dispositif.

Cas de la septoriose : les observations réalisées en 2009, ont permis de différencier la monoculture des autres précédents. Il est généralement admis que la phase sexuée du champignon est à l'origine des contaminations primaires à l'automne. Les ascospores étant dispersées par le vent, on s'attendrait à une certaine homogénéité des attaques quel que soit le précédent en raison de la dominance des apports d'inoculum exogènes à la parcelle. Il s'avère finalement que l'effet du précédent est perceptible sur le niveau de maladie (plus de septoriose en monoculture), suggérant une certaine importance de l'inoculum endogène à la parcelle. L'effet du labour vient en quelque sorte confirmer cette idée et souligne l'importance des résidus de culture comme source d'inoculum primaire. En effet, après labour la pression de maladie est plus importante, en particulier dans le cas de la succession maïs/blé lorsqu'il est comparé au semis direct (en l'absence de traitement). Tout se passerait comme dans le cas du piétin verse ou la remontée des résidus en surface constituerait une source significative d'inoculum. L'absence de répétition dans le temps doit inciter à la prudence et à renouveler les mesures pour confirmer cette hypothèse, qui ne trouve pour l'instant pas de confirmation dans la bibliographie. Elle reste néanmoins compatible avec la biologie connue de ce parasite. Plus de données sont nécessaires pour mieux préciser l'importance relative de l'historique parcellaire et de celle de son voisinage sur le développement de la maladie.

Cas de la fusariose : plus encore que pour les autres espèces de champignons pathogènes, la gestion des résidus de récolte infectés est déterminante. Si l'enfouissement des résidus a un effet assainissant, il ne permet pas d'éliminer totalement le risque. En système labouré, les résidus enfouis en années n-2 sont, en effet, susceptibles de revenir en surface, et d'assurer la contamination de la culture de blé en place. Les observations réalisées sur le dispositif ont montré que la quantité de résidus de maïs retrouvée en surface était de l'ordre de 10 g de MS/m² derrière maïs après labour au moment du semis, contre 600 g pour un semis direct derrière maïs (Caron, 2006). Cette quantité résiduelle est vraisemblablement à l'origine des contaminations des épis en système labouré.

En travail du sol superficiel, le broyage des résidus conduit à une diminution significative de la quantité de débris de maïs résiduelle au moment de la floraison de la céréale suivante (Caron, 2006). L'effet positif observé sur la fréquence d'épillets touchés et les teneurs en DON est très certainement lié à la disparition de résidus infectés. En semis direct, le broyage des résidus ne peut cependant pas être retenu en pratique. Il rend en effet plus difficile la réussite de la levée de la culture. Des essais de broyage après semis ont donc été tentés ces dernières années et semblent donner des résultats convaincants (non présentés). En 2008, en semis direct, le pourcentage d'épillets fusariés est passé de 8 % à 4.5 % grâce au broyage post-semis. La teneur en DON est passée parallèlement de 11200 ppb à 7430 ppb.

Enfin, bien que le blé soit une plante hôte de *F.graminearum*, il apparaît ici comme un précédent peu favorable. Un résultat semble-t-il en contradiction avec certains résultats canadiens ou américains, qui considèrent le blé comme un précédent à risque intermédiaire. Les travaux conduits par ARVALIS - Institut du végétal (D. Caron, 2006) ont clairement montré que la quantité de résidus laissés par un blé, en semis direct, est quantitativement très inférieure à celle laissée par un précédent maïs en semis direct également. Sur le plan qualitatif, le pouvoir infectieux des chaumes de blé est aussi très inférieur à celui des résidus de maïs (Caron, 2006). Il n'est donc pas très surprenant que le blé soit un précédent moins favorable que le maïs. Il se peut également que la divergence de point de vue, entre les travaux nord américains soit liée aux conditions climatiques qui dans nos conditions favorisent la décomposition des pailles, et sont globalement moins favorables aux attaques de fusariose.

De même, on explique mal le classement intermédiaire du précédent betterave, ou plus exactement de la succession betterave/blé/féverole d'hiver (ou pois)/orge de printemps. Cette observation converge néanmoins avec les résultats d'enquêtes agronomiques qui classent en effet la betterave comme un précédent à risque intermédiaire (Gourdain, 2008).

CONCLUSION

Pour trois champignons pathogènes du blé tendre, dont certains majeurs comme la fusariose de l'épi, le rôle des résidus de récolte dans le déclenchement et l'évolution finale des épidémies est déterminant. Celui-ci est d'autant plus important que la contribution de l'inoculum exogène à la parcelle est limitée dans le développement épidémique (cas de la fusariose, mais aussi du piétin verse et de l'helminthosporiose). Dans le cas de la septoriose, les observations réalisées laissent penser que l'inoculum endogène à la parcelle pourrait jouer également pour cette espèce un rôle significatif. Dans tous les cas une grande attention doit être apportée à la gestion des résidus de récolte au plan pratique. Les mesures qui favorisent leur décomposition doivent être encouragées pour limiter la survie de l'inoculum et indirectement la pression de maladie et le recours à des solutions fongicides dont l'efficacité n'est pas toujours assurée.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Agence du Développement Agricole et Rural (ADAR) qui assure le financement de programmes portant sur la recherche appliquée et sur la diffusion des innovations techniques auprès des exploitants agricoles ; qu'elle en soit remerciée.

BIBLIOGRAPHIE

Caron D., Dupont De Dinechin L., Malavergne D., 2006. *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs et en fonction du travail du sol. AFPP 8^{ème} conférence internationale sur les maladies de plantes - Tours - 5 et 6 décembre 2006, 293-303.

Colbach N., Lucas P., Cavelier N., 1994. Influence des successions culturales sur les maladies du pied et des racines du blé d'hiver. *Agronomie*, 14, n°8, 524-540

Colbach N., 1995. Modélisation de l'influence des systèmes de culture sur les maladies du pied et des racines du blé tender d'hiver. –Thèse Institut National de Paris Grignon, Paris, 258 p.

Colbach N., 1996. Travail du sol : incidence sur les maladies du pied et des racines du blé. *Perspectives agricoles*, **287**, 64-67

Schrödter H., Ferhmann H. 1971a, Ökologische Untersuchungen zur Epidemiologie von *Cercospora herpotrichoides*. II Die Abhängigkeit des Infektionsfolges von einzelnen meteorologischen Faktoren - *phytopathology* **71**,97-112

Dick-Macky R. and Jones R.K., 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 84, 71-76.

Gourdain E., 2008. Blé tendre/blé dur : donner la réplique au DON. *Perspectives agricoles*. **346**. 32-34.

Schrödter H., Ferhmann H. 1971b, Ökologische Untersuchungen zur Epidemiologie von *Cercospora herpotrichoides*. III Die relative Bedeutung der meteorologischen Parameter und die komplexe Wirkung ihrer Konstellationen auf den Infektionserfolg – *phytopathology* **71**,203-222.

Hunter T., Coker R.R. and Royle D.J., 1999, Studies on the sexual phase of leaf blotch in UK winter wheat. *Septoria* on Cereals: a study of Pathosystems, edited by J.A Lucas, P.Bowyer and H.M.Anderson, CABI publishing, p108-114.

Jorgensen L.N., Jahn M., Clark B., Antichi D., Goral T., Schepers H., Lucas P., Rolland B., Gouache D., Horanok L., 2008. Report on best control practices of diseases in winter wheat in 8 countries in the EU. European Network for Durable Exploitation of crop protection strategies, project number 031499.

Labreuche J., Maumené C. et Caron D., 2005. Broyer et incorporer les résidus pour préserver la qualité. *Perspectives agricoles*, **315**,58-61.

Labreuche J., Maumené C. et Couleaud G., Seguin B. 2003.Tirer partie des rotations pour éviter les maladies du blé. *Perspectives agricoles*, **288**, 58-60.

Labreuche J., Couture D., Bodet J.M., 2003. Essai travail du sol de longue durée de Boigneville, *Perspectives Agricoles*. **286**, p 56-58.

**DURABILITÉ ET GESTION DE LA RÉSISTANCE GÉNÉTIQUE DU BLÉ À LA ROUILLE
BRUNE CAUSÉE PAR *Puccinia triticina***

H. GOYEAU, C. LANNOU, B. PARIAUD, G. AZZIMONTI ⁽¹⁾ P. DU CHEYRON,
G. COULEAUD, C. MAUMENÉ. ⁽²⁾

⁽¹⁾ INRA UMR BIOGER – BP 01 78850 Thiverval Grignon FRANCE goyeau@grignon.inra.fr

⁽²⁾ ARVALIS Institut du Végétal, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt France
p.ducheyron@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

Un réseau de surveillance, associant l'INRA, Arvalis ainsi que les sélectionneurs, a permis de montrer l'évolution rapide des populations sous l'effet de la pression de sélection exercée par les résistances des variétés cultivées, et aide à prévoir l'efficacité des combinaisons de gènes de résistance spécifique. Cependant il est communément admis que la résistance partielle présente une bien meilleure durabilité que les résistances spécifiques. Nous avons donc mis au point une méthodologie d'évaluation des composantes de la résistance partielle sur plantes adultes en serre. Par ailleurs en mesurant les composantes de l'agressivité chez le pathogène, nous avons démontré l'existence d'une capacité d'adaptation chez *P. triticina* à la résistance quantitative. Ce travail suggère donc qu'il importe de préserver la durabilité de la résistance partielle, en la diversifiant et en l'associant à des résistances spécifiques.

Mots-clés : virulence, résistance spécifique, résistance partielle, agressivité

SUMMARY

DURABILITY AND MANAGEMENT OF GENETIC RESISTANCE TO WHEAT LEAF RUST

An annual survey conducted by INRA, Arvalis and the breeders has shown the rapid evolution of *P. triticina* populations, related to the selection pressure exerted by the cultivars, and helps to evaluate the efficiency of specific resistance genes combinations. Partial resistance is generally considered as being more durable than specific resistance. Thus we set up a methodology to measure the components of partial resistance on adult plants in the greenhouse. The measure of the aggressiveness components of the pathogen has shown that *P. triticina* was able to quantitatively adapt to its host. As a consequence it is important to preserve durability of partial resistance by diversification of resistance sources, and association with specific resistance.

Key words: virulence, specific resistance, partial resistance, aggressiveness

INTRODUCTION

La protection fongicide contre les maladies du blé en végétation représente un poste très important (en 2007, en moyenne 68 €/ha). Les maladies foliaires les plus préoccupantes actuellement et justifiant en moyenne 2 traitements en végétation sont la rouille brune (causée par *Puccinia triticina*), et la septoriose. La rouille brune est présente chaque année pratiquement sur l'ensemble du territoire français, et provoque de très fortes épidémies en cas de conditions climatiques favorables (en moyenne une année sur cinq). L'année 2007, où la rouille brune était pratiquement la seule maladie foliaire présente, permet d'évaluer les pertes de rendement liées à cette maladie : on a noté en moyenne 23 qx/ha de perte de rendement en l'absence de traitement fongicide sur les essais variétés Arvalis 2007. La résistance génétique est, avec les fongicides, le moyen le plus efficace de réduire drastiquement les populations des agents pathogènes responsables des maladies foliaires. Dans l'objectif de modérer le recours aux intrants phytosanitaires, la réduction des traitements fongicides du blé en végétation passe donc nécessairement par la culture de variétés avec un bon niveau de résistance aux principales maladies.

La résistance d'une variété peut reposer sur des gènes de résistance dits spécifiques : elle s'exprime alors par une réponse de tout ou rien (résistant/sensible). La résistance spécifique a été très utilisée en raison de son déterminisme génétique simple (monogénique), et du haut niveau de résistance conféré (résistance totale). Dans les variétés cultivées en France, une dizaine de gènes *Lr* de résistance spécifique à la rouille brune sont présents dans les variétés, seuls ou en combinaisons de deux ou trois gènes (Goyeau et al., 2006). Toutefois le contournement de ce type de résistance est extrêmement fréquent et parfois rapide, après seulement 2 à 3 années de culture (Kolmer 2001). En effet les populations du parasite sont diversifiées pour les virulences et certains pathotypes cumulent jusqu'à 13 virulences. L'évaluation de l'efficacité d'une stratégie basée sur des gènes de résistance spécifique nécessite donc un suivi des populations pathogènes.

Les résistances de type non spécifique, comme les résistances dites partielles, ou slow-rusting pour les rouilles, sont réputées plus durables que les résistances spécifiques (Kolmer 1996). Elles s'expriment par une quantité réduite de maladie, et reposent sur un petit nombre de gènes mineurs (Kolmer 1996). Après 25 années de sélection pour ce type de résistance vis-à-vis des rouilles des céréales, Le CIMMYT considère que la combinaison de quelques gènes de résistance partielle à effet additif permet d'obtenir une résistance durable (Singh et al. 2005). Les mécanismes impliqués sont une augmentation de la période de latence, et une réduction de la quantité de spores produites et/ou de l'efficacité d'infection de ces spores. La prise en compte de ce type de résistance dans les programmes d'amélioration variétale est donc recommandée mais pose plusieurs questions :

- on connaît très peu de choses sur la durabilité effective des résistances partielles. On sait par expérience que le niveau de résistance d'un cultivar varie dans le temps et que la résistance partielle est susceptible de s'éroder au cours des années (Mundt *et al.*, 2002). Par contre, on ne sait pas à quelle vitesse ni comment une population pathogène s'adapte à une résistance partielle.

- on ne sait rien sur la diversité des populations parasites en termes de réponse à une résistance partielle. Un niveau de spécificité a parfois été montré pour certains QTL de résistance (Manzanares *et al* 2000, Pflieger *et al* 1999), mais la variabilité des composantes de l'agressivité n'a jamais été décrite à l'échelle d'une population parasite. Tous les individus ont-ils la même agressivité sur une variété partiellement résistante ou bien existe-t-il une diversité susceptible de conduire à une érosion rapide du niveau de résistance (Lannou 2001)?

Dans l'objectif d'évaluer l'efficacité et la durabilité des résistances génétiques, de type spécifique et de type partiel, nous avons donc :

- Maintenu et intensifié un réseau pré-existant de suivi des virulences des populations pathogènes
- Développé une méthodologie d'étude de la résistance partielle en conditions contrôlées
- étudié le niveau d'agressivité¹ comme caractère quantitatif dans les populations parasites. On suppose en effet que l'érosion d'une résistance partielle résulte d'une sélection pour l'agressivité chez le parasite.

MATERIEL ET MÉTHODE

RESEAU DE SUIVI DES POPULATIONS PATHOGENES

Les feuilles portant des pustules de rouille brune sont prélevées dans les parcelles non traitées des réseaux d'essais : principalement sélectionneurs du Club 5, du CETAC et les coopératives associées à leurs réseaux, ainsi qu'Arvalis Institut du Végétal, mais également SRPV, Chambres d'Agriculture, Sociétés Phytosanitaires. L'échantillonnage est plus particulièrement ciblé sur les variétés les plus cultivées, (sur la période 2006-2008, Apache, Caphorn, Orvantis, ainsi que Aubusson et Sankara à partir de 2007) tout en gardant des variétés de référence suivies sur le long terme (Soissons, Isengrain, Trémie, Charger). L'accès à ces réseaux d'essais permet ainsi une bonne couverture géographique du territoire avec 16 à 20 régions représentées selon les années. Pour chaque site de prélèvement et chaque variété, un isolement monopustule est réalisé, donnant un isolat par lieu et par variété. Tous les isolats sont conservés sous forme de spores en collection à -80°C.

Les isolats collectés sont inoculés au stade plantule en serre à une série de 27 lignées ou variétés composant la gamme d'hôtes différentiels. La formule de virulence/avirulence sur 18 lignées de cette gamme permet de déterminer le pathotype (=combinaison de virulences) des isolats. La nomenclature des pathotypes est explicitée dans Goyeau et al. (2006).

MESURE DE LA RESISTANCE PARTIELLE EN CONDITIONS CONTROLEES

A l'issue de campagnes d'essais au champ menées en 2005 et 2006, une série de 7 variétés et lignées, ayant exprimé au champ une gamme de niveaux de résistance partielle, a été sélectionnée pour quantifier les composantes de cette résistance, en conditions contrôlées, à l'aide d'une méthodologie simplifiée dérivée de celle mise au point par Pariaud et al. (2009 b). L'expérimentation a été menée en serre en 2007 avec le pathotype P3, et en 2008 avec les pathotypes P3 et P4, le couple P1 x Soissons étant inclus comme référence (agressivité élevée, voir Pariaud et al. 2009 b) chaque année.

Pour chacune des variétés ou lignées Andalous, Ciento, Morocco (témoin sensible), Trémie, Soissons, Apache, PBI, et LD7, quinze plantes adultes ont été inoculées au stade floraison par application au pinceau d'un mélange de spores/poudre de lycopodium, sur une zone de 9 cm de la feuille drapeau du maître brin (concentration 1 :80mg) et du tallole 1 (concentration 1 :160mg). Immédiatement après l'inoculation, les plantes ont été mises en chambre de rosée à 15°C entre 14 et 18 heures, puis replacées dans la serre jusqu'à la fin de l'expérience.

L'efficacité d'infection a été définie comme le rapport entre le nombre de lésions sporulantes, estimé sur la moitié proximale de la feuille drapeau du tallole 1 en fin de période de latence, et la quantité de spores déposées par unité de surface pour chaque individu, estimée sur la moitié distale de la feuille drapeau du tallole 1, coupée juste après l'inoculation pour comptage des spores sous la loupe binoculaire. Ces deux mesures (quantité de spores déposées sur feuille et quantité de lésions sporulantes) ont été faites sur 10 plantes de chaque traitement (variété x pathotype).

¹ Par agressivité, on entend l'importance quantitative des symptômes produits sur une plante sensible par un individu parasite. Dans le cas de la rouille brune, parasite biotrophe strict, la notion d'agressivité se confond avec celle de fitness, telle qu'elle est utilisée en génétique des populations (Pariaud et al., 2009 a).

La période de latence, définie par le temps au bout duquel 50% des lésions sont apparues (T50, Shaner, 1980), a été estimée en comptant le nombre de lésions sporulantes sur un cm² de feuille choisi au hasard dans la zone inoculée de la feuille, une fois par jour, à partir de l'apparition des premières lésions et jusqu'à la stabilisation de leur nombre, sur la feuille drapeau du maître brin de 15 plantes de chaque traitement (variété x pathotype).

La quantité de spores produite a été estimée en pesant les spores récoltées dans des sachets de cellophane ouverts placés autour des feuilles drapeaux entre 17 et 21 jours après inoculation (jai). La surface sporulante a été estimée à 21 jai. Les feuilles ont été coupées et photographiées à l'aide d'un scanner. Les images ont été analysées avec le logiciel Optimas (programmes d'analyse développés par P. Belluomo, EGC, INRA Grignon). La sporulation a été définie comme le rapport entre la quantité de spores produite et la surface sporulant par feuille drapeau.

L'analyse exploratoire des données et la sortie des graphiques a été effectuée avec le logiciel S plus (© Insightful Corp.). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel JMP5 (© SAS Institut inc., Cary, NC, USA). Une transformation logarithmique des variables a été opérée pour respecter les conditions de linéarité du modèle. Les facteurs testés ont été le pathotype et la variété, la densité de lésions à la fin de la période de latence étant testée en covariable dans toutes les analyses. Les autres facteurs également pris en compte ont été : le stade de développement du talle à l'inoculation (épiaison ou floraison) et la présence ou l'absence de lésions d'oïdium sur la plante.

MESURE DE L'AGRESSIVITE DANS LES POPULATIONS PARASITES

Notre étude s'est basée sur l'analyse de la structure des populations de *P. triticina* en France, qui a montré que sur la variété Soissons un pathotype (073100, codé P1 dans la présente étude) dominait largement (Goyeau et al., 2006). La question de l'adaptation différentielle a été abordée en 2 étapes successives : 1) le pathotype P1 est-il plus agressif sur Soissons que deux autres pathotypes, P2 et P3, virulents sur Soissons, mais présents en fréquence plus faible ou nulle sur cette variété ? 2) d'une manière plus générale, les pathotypes ont-ils une variété de prédilection ?

Les caractères quantitatifs indiqués sur la Figure 2 ont été mesurés en serre sur des plantes de blé adultes, selon la méthodologie décrite par Pariaud et al. (2009 b)

RESULTATS

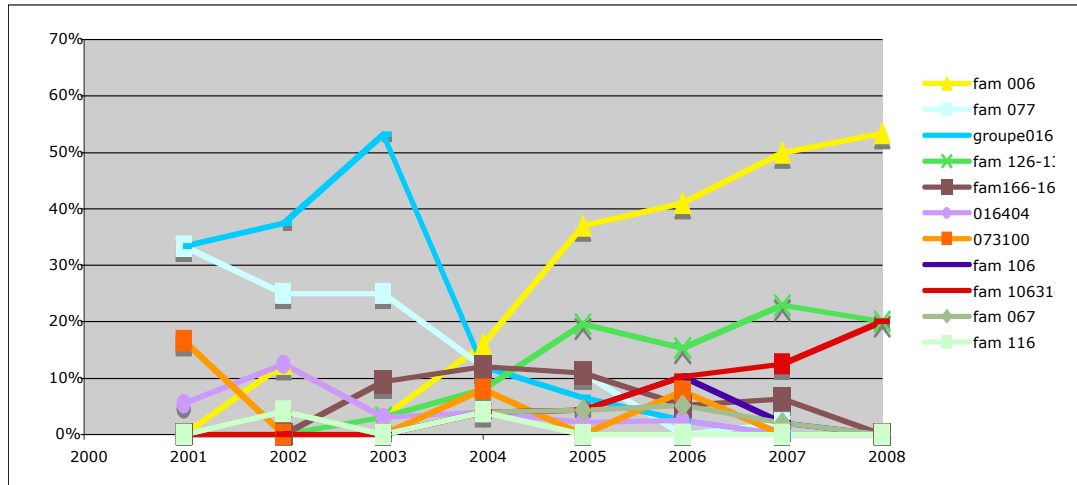
EVOLUTION DES POPULATIONS PATHOGENES ET EFFICACITE DES RESISTANCES SPECIFIQUES

Le nombre d'isolats analysés a été de 306, 418 et 238 respectivement en 2006, 2007 et 2008. Sur Soissons et Isengrain, le pathotype 073100 (codé P1), toujours prépondérant en 2006 (30-40%), n'a cessé de décliner par rapport aux années où Soissons dominait le paysage variétal pour ne plus représenter que 15% de la population sur cette variété en 2008. En 2006, une famille, composée presque exclusivement du pathotype 106314 (codé P4 dans les études de résistance partielle) est devenue dominante. Ce pathotype, apparu en 2003, est surtout inféodé à Caphorn et Trémie-Charger. Sur Apache et Orvantis, c'est la famille 006, elle aussi d'apparition récente (2002), qui est devenue la plus fréquente. L'évolution s'est poursuivie en 2007, et les deux familles de pathotypes 106314 et 006 sont devenues très dominantes, pratiquement sur toutes les variétés. La famille de pathotypes 126-136 (pathotypes complexes avec 12 à 13 virulences) représentait environ 20% de la population en 2007, mais elle a régressé (6%) en 2008. En 2008 La famille 106314 a poursuivi sa très forte progression sur toutes les variétés, en doublant sa fréquence par rapport à 2007, (aux dépens de la famille 006) pour représenter 70 à 80% de la population sur Caphorn et Aubusson.

La modification de la composition de la population pathogène sur la variété Orvantis s'est accompagnée d'une évolution du comportement de cette variété dans le réseau d'essais Arvalis, depuis la résistance en 2001 jusqu'à une sensibilité totale en 2007 (Figure 1).

Figure 1 : Evolution de la composition en pathotypes de la population de *P. triticina* collectée sur Orvantis, et de la sensibilité de cette variété dans le réseau d'essais Arvalis sur la période 2001-2008
 (Distribution of frequencies of pathotypes of *P. triticina* in the population collected from Cv Orvantis over 2001-2008 , and evolution of the susceptibility of this Cv in the field in Arvalis fieldplot network)

Fréquence des principaux pathotypes (ou familles de pathotypes) dans la population collectée sur chaque variété

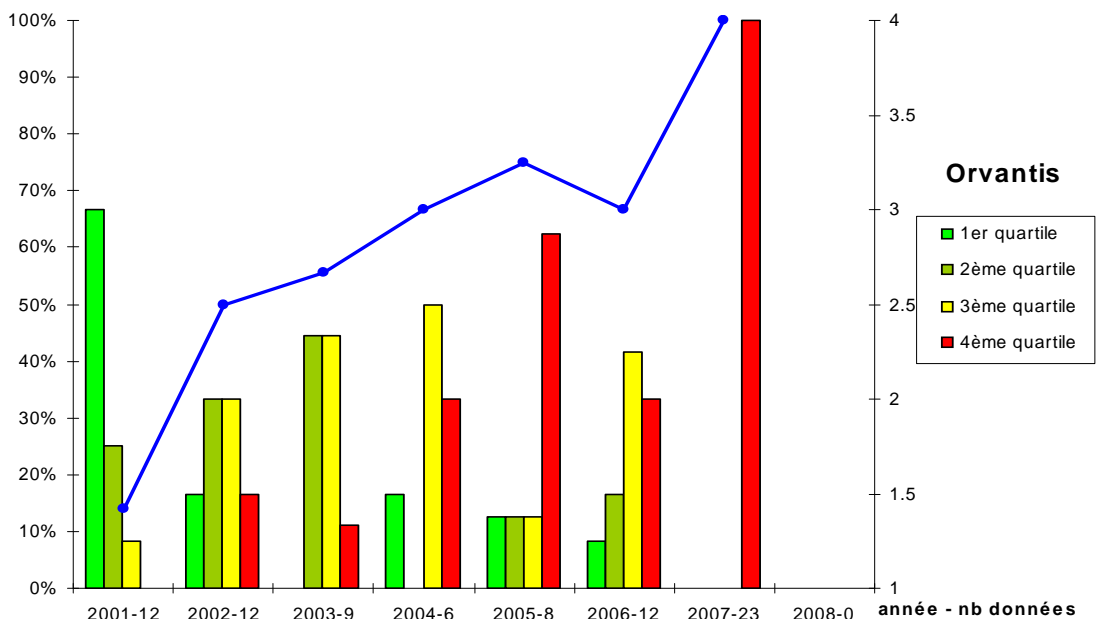


% de données dans chaque quartile

Quartile 1 : parmi les variétés les plus résistantes
 Quartile 4 : parmi les variétés les plus sensibles

Indice de sensibilité

(1 : résistant; 4 : sensible)



ANALYSE DES COMPOSANTES DE LA RESISTANCE PARTIELLE EN CONDITIONS CONTROLEES

La variété, la densité de lésions, et l'interaction variété x pathotype ont eu un effet significatif sur l'efficacité d'infection (ei), mais pas le pathotype (Tableau I). L'ei du pathotype P3 a été significativement meilleure sur Soissons (0.75) que sur Morocco (0.20, P=0.0068) et sur Trémie (0.21, P=0.0005). L'ei du pathotype P4 a été significativement supérieure sur PBI (0.62) par rapport à Apache (0.21, P=0.05). L'interaction variété x pathotype est due au

fait qu'une différence significative ($P=0.001$) entre P3 et P4 n'existait que pour la variété Trémie, l'ei du P4 (0.37) étant supérieure à celle du P3 (0.21). L'ei du P1 sur Soissons, notre référence pour une interaction compatible très agressive, a été équivalente à celle du P3 et du P4. Les ei moyennes, toutes variétés confondues, pour P1, P3 et P4 ont été de 0.34, 0.35 et 0.39 respectivement. Sur Morocco, notre témoin sensible, les ei des deux pathotypes ont été faibles (0.20 pour P3 et 0.28 pour P4) et pas significativement différentes des autres variétés, sauf avec Soissons pour P3.

Tableau I : Probabilités critiques associées à l'analyse de la variance pour les différentes variables mesurant la résistance partielle.
(P-values associated to the ANOVA of variables measuring partial resistance)

| Facteurs | Efficacité d'infection | Période de latence | Sporulation |
|----------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
| Variété (7) | 0.0321 | <0.0001 | <0.0001 |
| Pathotype (1) | 0.3515 | 0.0003 | 0.0073 |
| Variété x pathotype (7) | <0.0001 | 0.2050 | 0.4897 |
| Densité de lésions (1) | 0.0041 | <0.0001 | 0.4212 |
| Stade de développement (1) | - | 0.3864 | 0.5323 |
| Présence d'oïdium | 0.3656 | 0.3929 | 0.7771 |

Le pathotype, la variété et la densité de lésions ont eu un effet significatif sur la période de latence (T50), mais pas l'interaction variété x pathotype (Tableau I). Le pathotype P4 a eu un T50 significativement plus long (218.9 degrés-jours) que P3 (201.7 dj, $P=0.0254$). Les deux pathotypes ont un T50 plus long que P1 sur Soissons (164.6 dj). Les variétés où le T50 est significativement supérieur par rapport à Morocco (168.9 dj), le témoin sensible, sont Apache ($P<0.0001$), LD7 ($P<0.0001$) et PBI ($P=0.0014$), avec des moyennes de 225, 241 et 207.6 dj respectivement.

La sporulation a été significativement différente entre les différents pathotypes et entre les différentes variétés (Tableau I), mais la densité de lésions et l'interaction variété x pathotype n'ont pas eu d'effet significatif. Le pathotype P4 a eu une sporulation significativement plus importante que P3 ($P=0.0086$) avec des moyennes de 99.2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ et 92.2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ respectivement. Les deux pathotypes ont eu une sporulation moins élevée que P1 sur Soissons (122.4 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$). Andalou est la seule variété qui a une sporulation significativement moins forte que Morocco ($P=0.0012$) avec des moyennes de 76.1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ et 104.9 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ respectivement.

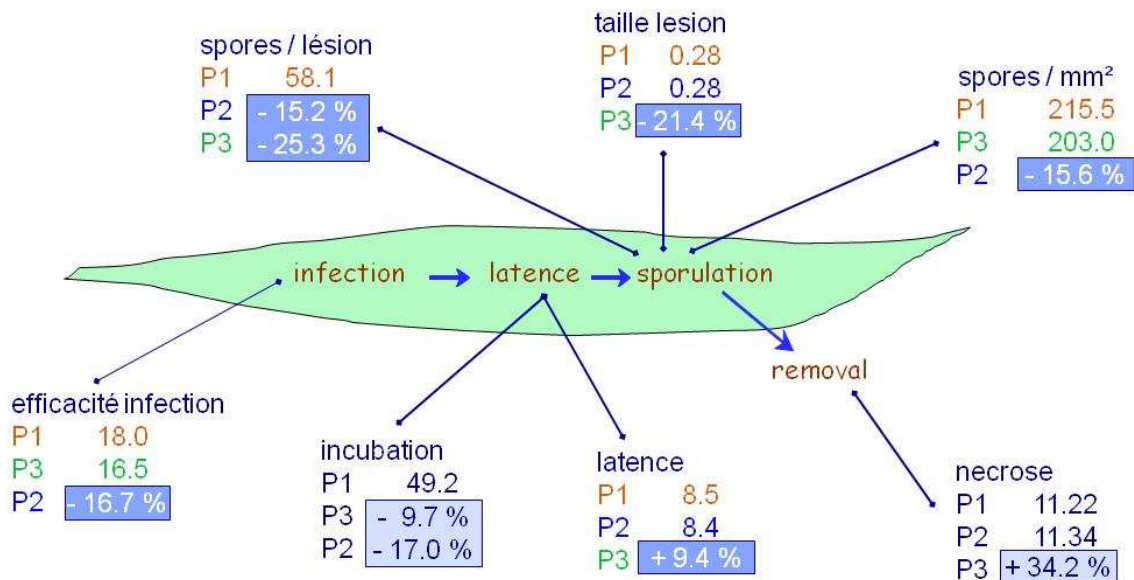
AGRESSIVITE DE P. TRITICINA ET ADAPTATION DU PARASITE A SON HOTE

Adaptation du pathotype P1 à la variété Soissons

Ce travail est décrit en détail dans la publication de Pariaud et al. (2009 b). Nous avons montré que le pathotype P1 (073100), majoritaire sur Soissons dans les populations naturelles, depuis 1999, est plus agressif que les deux autres pathotypes minoritaires P2 (014103) et P3 (166336). Les différences d'agressivité sont de 10 à 25% environ selon les paramètres d'agressivité considérés (Figure 2).

Figure 2 : Mesure de l'agressivité relative des pathotypes de *P. triticina* P1, P2 et P3 sur la variété Soissons, pour différentes variables.
(Relative aggressiveness of *P. triticina* pathotypes P1, P2 and P3 on Cv Soissons, for different variables)

agressivité relative des pathotypes P1, P2, P3 (les différences significatives avec P1 sont encadrées de bleu)



Etude de l'adaptation différentielle pour les caractères quantitatifs

En utilisant toujours la même méthodologie que ci-dessus, nous avons mesuré l'adaptation quantitative des pathotypes P1, P2 et P3 à diverses variétés. En raison de leurs différences pour les virulences, le test de l'adaptation différentielle de ces pathotypes aux variétés a été fait sur des séries de variétés différentes pour chacun des 3 pathotypes. L'agressivité du pathotype P1 a été mesurée sur Soissons d'une part, et sur trois autres variétés sensibles dépourvues de gènes de résistance spécifique d'autre part (Scipion, Morocco et Festival). L'agressivité du pathotype P2, supposé avoir été adapté à la variété Thésée, a été comparée sur les variétés Soissons, Morocco, Thésée et Altria. Enfin le pathotype P3, originaire de la variété Trémie, a été évalué pour son agressivité sur Soissons et Trémie.

Nous avons montré que P1 était significativement plus agressif sur sa variété d'origine Soissons pour la période de latence, la taille de lésion et la quantité de spores produite (Figure 3A). Les composantes de l'agressivité du pathotype P2 étaient toujours dans les plus élevées sur la variété Thésée, avec une taille de lésion significativement plus élevée pour cette variété (Figure 3B). L'agent pathogène présente donc bien la capacité à s'adapter à son hôte d'origine pour des caractères quantitatifs. Par contre cette adaptation ne s'est pas produite pour le pathotype P3, qui s'est au contraire montré significativement moins performant sur sa variété d'origine Trémie (Figure 3C). Ce résultat est d'ailleurs cohérent avec l'observation de la disparition de ce pathotype des populations naturelles seulement 3 ans après son apparition. Ce pathotype complexe doté de 13 virulences s'est comporté comme un pathotype généraliste capable d'attaquer de nombreuses variétés, mais peu agressif, alors que le pathotype P1 adapté à la variété Soissons s'est maintenu fortement dominant sur cette variété, à la quelle il est resté inféodé puisqu'il n'avait pas les virulences nécessaires pour attaquer les variétés qui ont succédé à Soissons.

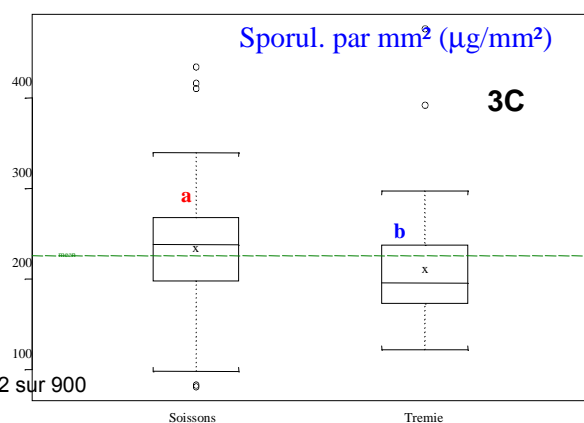
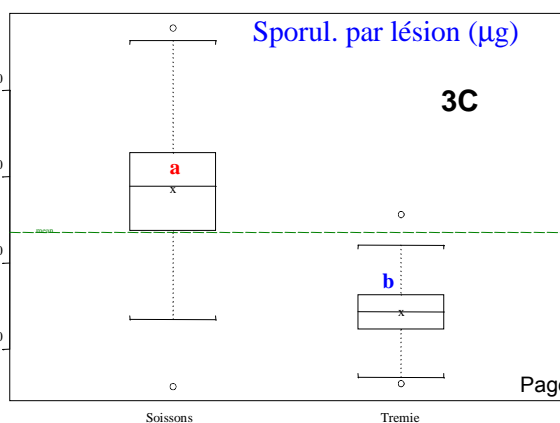
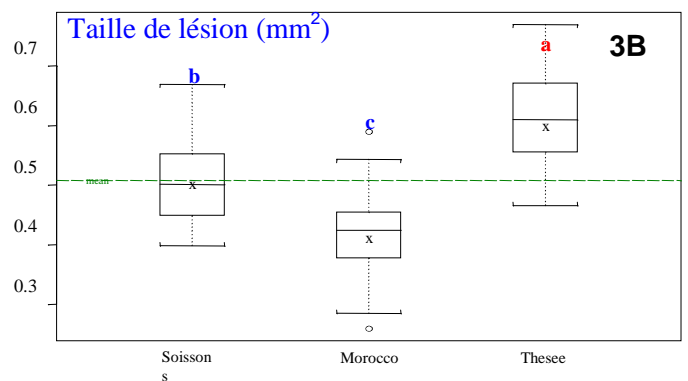
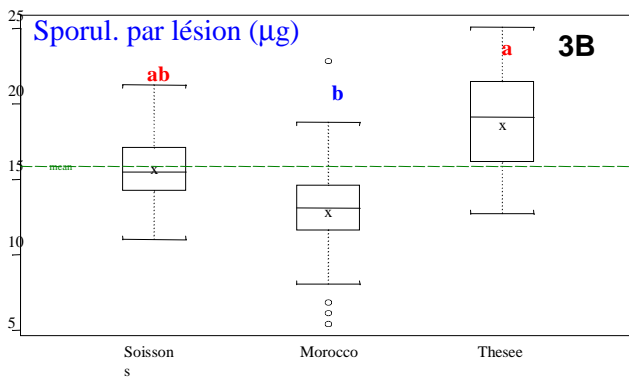
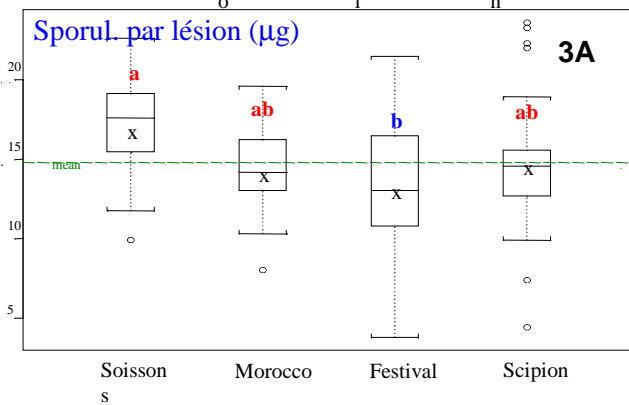
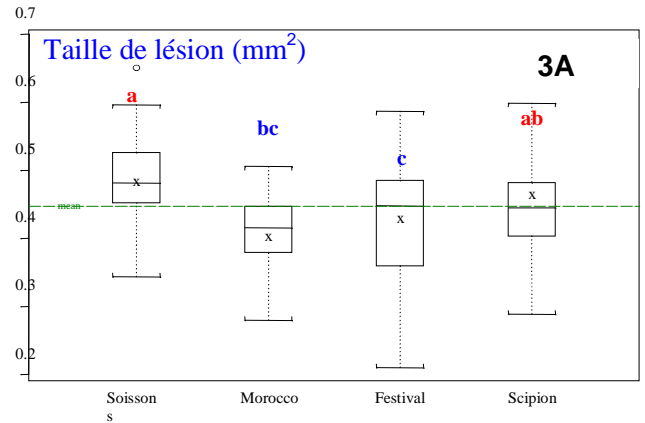
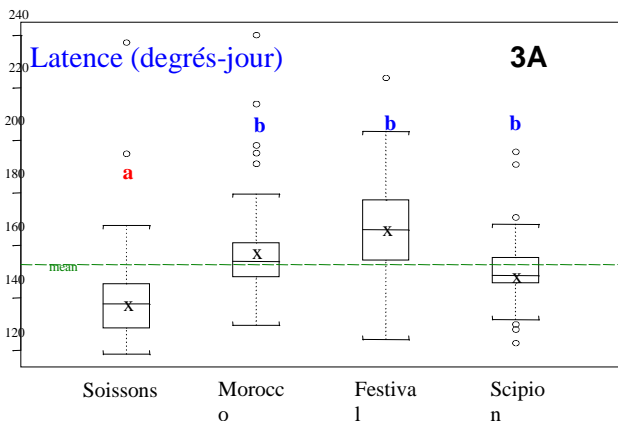
Figure 3 : Composantes de l'agressivité. Les distributions repérées par une même lettre ne sont pas significativement différentes.

(Aggressiveness components of pathotypes P1, P2 and P3 on different cultivars. Distributions with the same letter are not significantly different)

3A : pathotype P1 sur les variétés Soissons, Morocco, Festival et Scipion

3B : pathotype P2 sur les variétés Soissons, Morocco et Thésée.

3C : pathotype P3 sur les variétés Soissons et Trémie



DISCUSSION

EFFICACITE ET DURABILITE DES RESISTANCES SPECIFIQUES

L'étude des populations de *P. triticina* sur 2006-2008 a mis en évidence une forte évolution des populations par rapport aux années antérieures (1999-2005), avec la prédominance de deux familles (106314 et 006), qui cumulent les virulences correspondant aux gènes de résistance des principales variétés cultivées (*Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr37*). Ces résultats illustrent à nouveau les capacités d'évolution de l'agent pathogène avec un cas classique de contournement de gène de résistance spécifique : Orvantis, porteur des gènes *Lr10*, *Lr13*, *Lr37* a été protégé par *Lr37*, jusqu'à l'apparition de pathotypes virulents 37 à partir de 2000. Le réseau de suivi des populations de *P. triticina*, fruit de la collaboration des différents partenaires recherche, sélection et développement, est un outil indispensable pour prévoir l'efficacité des résistances de type spécifique : il renseigne sur les combinaisons de virulences présentes dans la population, ainsi que leur fréquence. Il reste cependant difficile de prédire la durabilité de combinaisons de gènes de résistance spécifique. En effet des combinaisons de virulence peuvent apparaître, mais ne pas augmenter en fréquence (voire disparaître) en raison d'une faible agressivité. Ceci peut être illustré par le cas de la variété Caphorn : cette variété est sensible aux pathotypes de la famille 126-136, mais nous avons montré que la fréquence de cette famille se maintient au champ à un niveau relativement faible, sans doute en raison d'une agressivité moindre. Ceci pourrait expliquer le comportement de Caphorn dans le réseau Arvalis, qui semble évoluer vers une moindre résistance (résultats non montrés) : Caphorn exprimerait un niveau de maladie élevé dans certains essais où cette famille de pathotypes est présente, mais resterait bien résistant dans la majorité des essais en raison de la faible fréquence de la famille 126-136. Nous avons cherché à compléter l'information apportée par les suivis de population à l'aide d'essais variétaux mis en place par Arvalis à partir de 2008, chaque essai étant inoculé par un seul pathotype. L'objectif premier de ces essais est d'évaluer la résistance partielle des variétés, mais ils permettent également de confirmer (ou non) au champ les informations concernant la résistance spécifique acquises en conditions contrôlées. Les combinaisons de gènes de résistance spécifique restent une ressource à exploiter, leur efficacité peut être estimée grâce au réseau de suivi des populations, mais leur durabilité n'est pas toujours facile à évaluer en raison du manque de données sur l'agressivité des pathotypes.

EFFICACITE ET DURABILITE DES RESISTANCES PARTIELLES

La méthodologie utilisée a permis de retrouver en conditions contrôlées la résistance partielle préalablement détectée au champ, et d'en analyser les composantes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la résistance partielle des différentes variétés et lignées étudiées s'exprimait sur différentes composantes : la résistance partielle se traduit par une réduction de l'efficacité d'infection du pathotype P3 sur Trémie, une augmentation de la période de latence de P3 et P4 sur Apache, LD7 et PBI, et une réduction de la production de spores de P3 et P4 sur Andalou. Ces résultats montrent que l'on peut évaluer la résistance partielle en conditions contrôlées, mais les mesures restent toutefois assez lourdes. De plus l'existence d'une interaction variété x pathotype pour certaines composantes suggère que des relations de type spécifique existent aussi pour les résistances de type quantitatif. Le niveau de résistance partiel d'une variété peut donc varier selon le pathotype auquel elle est confrontée. En l'absence de connaissances plus précises sur le déterminisme génétique des sources de résistance présente dans le matériel génétique utilisé en France, ces mesures permettent d'assurer une diversification des sources en recherchant des résistances basées sur des composantes diversifiées (efficacité d'infection, latence, sporulation).

Nous avons également démontré que les pathotypes présentaient un certain niveau de spécialisation pour un fond génétique de l'hôte donné, et qu'il existait donc une adaptation différentielle pour les caractères quantitatifs. Il s'ensuit donc un risque d'érosion de la résistance quantitative en cas de culture à une grande échelle, d'où l'importance de conserver un objectif de diversification des sources de résistances pour préserver la durabilité des résistances de type quantitatif.

CONCLUSION

L'utilisation de toutes les ressources génétiques de résistance à la rouille brune disponibles, nécessaire pour limiter le risque épidémique sur blé, doit s'accompagner d'une vigilance en ce qui concerne la résistance de type spécifique. Celle-ci nécessite la pérennité du réseau de suivi des virulences dans les populations tel que celui présenté ici associant recherche, sélection et développement pour un maximum d'efficacité. Il sera utilement complété par des essais variétaux (Arvalis – INRA) avec pathotypes séparés pour améliorer l'estimation de la durabilité. Une méthodologie d'étude des composantes de la résistance partielle en serre sur plantes adultes est maintenant au point, mais elle reste assez lourde et ne peut être appliquée qu'à un nombre limité de combinaisons pathotype x variété. Cette même méthodologie a permis de démontrer l'existence d'une capacité d'adaptation chez *P. triticina* à la résistance quantitative. Ce travail suggère donc que la résistance partielle n'est pas durable en soi, et qu'il importe de préserver sa durabilité en diversifiant les sources de résistance utilisées, et en les associant à des résistances de type spécifique.

REMERCIEMENTS

Le financement de cette étude a été en grande partie assuré par le CAS DAR 391 « Mise au point et utilisation d'outils de biovigilance et de gestion durable des résistances variétales aux pathogènes. » Les auteurs tiennent également à remercier le GNIS - FSOV (Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale), qui a également fortement contribué au financement des travaux présentés. Enfin et surtout, un grand merci à tous les collaborateurs du réseau de collecte des échantillons de rouille pour leur collaboration efficace et durable !

BIBLIOGRAPHIE

- Goyeau H., Park R., Schaeffer B., Lannou C., 2006 - Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology* 96,264-273.
- Kolmer J.A. 1996 - Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology* 34, 435-455
- Kolmer J.A., 2001 - Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Canada. *Can. J. Bot.* 79, 917–926.
- Lannou C., 2001 - Intrapathotype Diversity for Aggressiveness and Pathogen Evolution in Cultivar Mixtures. *Phytopathology* 91, 500-510.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F., Thomas G., 2000 - Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 885-891.
- Mundt C.C., Cowger C., Garrett K.A., 2002 - Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* 124, 245-252.
- Pflieger S., Lefebvre, V., Caranta C., Blattes A., Goffinet B., Palloix A. 1999 - Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42, 1100-1110.
- Pariaud B., Ravigne V., Halkett F., Goyeau H., Carlier J., Lannou C., 2009 a - Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens *Plant Pathology* 58, 409–424
- Pariaud B., Robert C., Goyeau H., Lannou C., 2009 b - Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* 99, 869-878
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Williams H.M., 2005 - Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turk J Agric For* 29, 121-127

AFPP - 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT DISEASES
TOURS, FRANCE, 8 AND 9 DECEMBER 2009

BIOLOGICAL AND CHEMICAL MANAGEMENT OF *PHYTOPHTHORA* ROOT ROT
/COLLAR ROT IN CITRUS NURSERY

R.-M. GADE

Department of Plant Pathology,
Dr.Panjabrao Deshmukh Krishi Vidyapeeth, Akola (MS) INDIA -444 104

SUMMARY

Citrus jambhiri Lush is the most widely used root stock for most of citrus scion in India. The root stock is highly susceptible to *Phytophthora parasitica* causing root rot / collar rot disease in *Citrus jambhiri*. The disease commonly spreads through the supply of disease planting material. Soil samples were collected from nurseries of Vidarbha region in India. Almost all samples were found associated with *P.parasitica* (28-46 cfu/g soil) when tested on PARPH medium. Population level was found higher where; nurseries were raised on same location years together. Root stocks have significant role in managing the disease. Rangpur lime was found tolerant root stock whereas, *Citrus jambhiri* was found susceptible to the disease. The ability of *Trichoderma* spp. (*T. virens*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T.hamatum*) was tested to manage the disease. Antagonism was assessed *in vitro* on different medium (Corn meal agar, Potato dextrose agar, V-8 juice and 2 % Agar). *In vitro* antagonism showed that *P.parasitica* was completely inhibited by *T.harzianum* and *T. virens*. The bioagents overgrown on test pathogen at 14 DAI. However, intensity of antagonism was different as per medium. In nursery, it was found that there is a continuous reduction in pathogen population from 41 to 8 propagules /g soil with reduction in root rot /collar rot in *Citrus jambhiri*. In absence of bioagent the reduction in dry weight of seedlings was 47.3 % suggesting that *T. spp.* are effective to reduce the disease in citrus nursery. An experiment was also carried out to assess the potential of bacterial antagonists *Pseudomonas fluorescens* to control *P. parasitica*. All Thirty seven native isolates were found positive for production of IAA, HCN and Siderophore. These isolates were screened initially on the basis of dual culture assay. Pf IV and Pf XXVI were found effective to manage the disease in addition to increased growth response under glass house condition. Among chemicals, seed treatment with Metalaxyl @2.5 g/ Kg seed *f.b.* spraying of metalaxyl at 45 and 90 days after emergence and Fosetyl- AL at 75 DAE was found effective to manage the disease at considerable level. It was also noticed that both the fungicides had very less effect on soil population of *P.parasitica*.

Key words: *Citrus jambhiri*, *Phytophthora parasitica*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, Fungicides.

INTRODUCTION

Phytophthora spp. are the causal agents of several serious diseases of citrus in India. *Phytophthora parasitica*, *P. citrophthora* and *P. palmivora* have been mostly involved in causing damping off, collar rot and root rot in citrus Naqvi (1988). It remains a threat and a persistent problem wherever, citrus is grown that can result in substantial tree loss particularly trees on susceptible rootstock Whiteside (1974). Supply of poor quality sampling may result foot rot, root rot or gummosis in orchard. These are the most important soil borne diseases of citrus causing mortality of newly planted trees and a slow decline and yield loss of mature trees (Graham & Menge 1999). Epidemics of *Phytophthora* on heavy black cotton soils play an important role in citrus root stock failure. Survey have been undertaken to see the association of *Phytophthora* spp. in Vidarbha region where nearly 80 lakhs grafts are being raised for sale every year. Management of *Phytophthora* diseases includes the use of tolerant rootstocks and fungicides, but biological controls are not commercially available. Applications of the systemic fungicides metalaxyl and fosetyl-AI have been shown to increase fibrous root weight of citrus rootstocks and to reduce propagules of *P. parasitica* Sandler (1989). However, fungicides may not always be economically justifiable (Graham & Menge 1999). Therefore, applications are not recommended unless populations of *P. nicotianae* exceed a threshold of 10 to 15 propagules/cm³ of soil (Graham & Menge 1999; Sandler *et al.*, 1989). Several potential biological agents have been investigated for the control of *Phytophthora* root rot of citrus. The ability of introduced antagonists to establish and colonize the rhizosphere soil is an important factor in successful biological control (Graham, 2004, Lewis & Papavizas, 1984). Studies involving control of *Phytophthora* root rot of citrus confirm the limitations of introduced biocontrol agents (Nemec *et al.* 1996; Steddom, 2002). Weekly applications of *Pseudomonas putida* through the irrigation system were necessary to sustain the antagonist in the rhizosphere Steddom (2002). In the present study, the main objective was to identify resistant root stocks to *Phytophthora* spp. Biocontrol agents were also evaluated to manage the disease when susceptible but popular root stock (*Citrus jambhiri*) is being used.

MATERIALS AND METHODS

Field nursery samples were taken from primary nursery of the citrus up to transplantation of seedling in secondary nursery beds. The number of samples collected varied with the size of nursery. At least 10 soil cores were taken from root zone from several rows of the field nursery. The samples were placed in plastic bags to maintain soil moisture, transported to laboratory, and assayed as described Timmer (1988). 10 g soil from each sample was diluted in 90 ml water having 0.25 % agar. One ml aliquot was spread on each of 10 plates of PARPH selective medium (Kannwischer & Mitchell, 1978). The plates were incubated at 28°C for 2-3 days and no. of colonies of *Phytophthora* was counted. Soil in the second core was flooded with water, baited with pieces of citrus leaves, and placed in the incubator for 48 hrs (Grimm & Alexander, 1973). The leaves were transferred to Petri dishes and examined for the presence of papillate sporangia.

SCREENING OF ROOT STOCKS

Seeds of rough lemon (*Citrus jambhiri*), cleopatra mandarin (*C. reticulata* Blanco), and rangpur lime (*Citrus limonia*) were sown in pots. Pure culture of *Phytophthora parasitica* was maintained on V-8 juice agar by serial transfer. Chlamydo spores of each isolate were produced in V-8 juice broth by the method of Tsao (1971) for use as inoculum. The soil was mixed manually to produce an inoculum concentrate. To determine the propagule concentration, 1 g samples of the inoculum concentrate were plated on a selective medium containing pimaricin, ampicillin, rifampicin, pentachloronitrobenzene and hymexazol (PARPH) (Timmer *et al.* 1988). The inoculum concentrate of each isolate was added to autoclaved fine sand to provide a density of 31-33 propagules /g of soil. Non inoculated pots were treated as control. For all treatments, 10 single seedlings in each replication and seven

replications per treatment were used for each of the rootstock and placed in a completely random design in the greenhouse. Each pot was watered to runoff twice a day. Greenhouse conditions ranged from 25 to 35°C and 60 to 100% relative humidity. Seedlings were evaluated 4 weeks after emergence. Seedlings were fully removed from the soil to avoid breakage of roots, and roots were washed free of the adhering soil. Root tips were examined and the percentage of root rot was calculated. Observations on growth parameters were also recorded. Data for the three rootstocks were analyzed in randomized block design.

GROWTH INHIBITION TEST

Purified cultures were maintained on corn meal agar. A 5 mm disc of *Phytophthora* culture was placed at one side of the previously plated 90 mm diameter with 20 ml of different media (V-8 juice, CMA, PDA and 2% Agar) and 5 mm disc of *Trichoderma* (individual species) was placed at opposite side of *Phytophthora* disc. These petri plates were incubated at 25°C. Three plates were used for each replication and three replications were used for each treatment.

CHARACTERIZATION OF PSEUDOMONAS

Siderophore Production- Production of siderophore by *P. fluorescens* was assessed by Plate assay method as described by Schwyn & Neilands (1987).

Hydrocyanic acid production- HCN production was tested by the method of Castic & Castric (1983).

Indole Acetic Acid production- Indole Acetic acid production was tested according to (Gorden & Webber, 1957).

Gelatin liquefaction- The test indicated utilization of protein and production of proteolytic enzymes by bacterium and to differentiate *Pseudomonas fluorescens* and *P.putida*

Oxidase test:-Take a inoculating loop or toothpick. Then touch and spread a well isolated colony on a oxidase disk (Disk contains N, N-dimethyl-p-phenylenediamine oxalate and α -naphthol).The reaction was observed within 2 minutes at 25-30°C. Deep purple blue indicate positive reaction.

Arginine test: - For Arginine test media was made according to the method of Fay & Berry (1972). Purple colour indicates positive reaction and yellow colour or no colour change indicate negative reaction.

Nitrate Reduction: The nitrate broth medium will be inoculated with the bacteria and inoculated at 37°C for 48 hours or until the next period. To each tube 1ml of sulphanic acid and naphthylamineacetate is to be added. Reduction of nitrite to nitrate is indicated by the production of distinct red colouration. Comparison was made with the blank.

On the basis of characteristics and by dual culture test antifungal activity of *P. fluorescens* isolates were identified and selected on the basis of their inhibition activity for further study.

USE OF ANTAGONIST AND FUNGICIDES FOR DISEASE MANAGEMENT

Citrus jambhiri seeds which is a susceptible root stock to *Phytophthora* bacterized with *P. fluorescens* isolates (Pf-I, Pf-IV, Pf-XXVI) @10g/seed and for *Trichoderma* spp. seeds were treated @4g/Kg seed. For fungicides, seeds were treated with the formulation of metalaxyl @2.5 g/Kg seed and 2g/l water for spraying similar concentrations were used for fosetyl - Al. Similar procedure was followed as described in screening of root stock for development of sickness in soil.

RESULTS

Survey of Amravati and Nagpur district citrus nurseries was done where nearly 80 lakhs grafts of citrus are being produced every year. All most all the samples in Nagpur and Amravati district were tested positive to *Phytophthora*. Propagule densities of soil was in the range of 28.00-38.67 cfu/g soil in Amravati and 29.11 to 46.33 cfu/g soil in Nagpur district. However, *Phytophthora* was not detected in each one of the field nursery of Amravati and Nagpur district. The leaf baiting technique detected more positive samples as compared to selective medium when the propagule density was high. It was failed to produce results when the propagule density was low (Table I).

TableI- Occurrence of *Phytophthora* among citrus nurseries in Amravati and Nagpur District of Vidarbha region.

| Locations District Amravati | No. of samples | Selective Media | | Positive in leaf baiting technique |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------|--------------------|--|
| | | No of positive samples | Propagules /g soil | |
| 1. | 09 | 08 | 28.00 | 06 |
| 2. | 13 | 13 | 38.67 | 13 |
| 3. | 06 | 04 | 31.50 | 05 |
| 4. | 10 | 08 | 34.50 | 09 |
| 5. | 04 | 04 | 29.67 | 03 |
| 6. | 15 | 11 | 34.67 | 13 |
| 7. | 08 | 06 | 32.83 | 06 |
| 8. | 11 | 07 | 36.29 | 10 |
| 9. | 06 | 05 | 28.67 | 02 |
| 10. | 05 | 04 | 35.50 | 05 |
| 11. | 09 | 07 | 34.86 | 08 |
| 12. | 08 | 06 | 34.67 | 07 |
| 13. | 01 | 00 | 0.00 | 00 |
| 14. | 06 | 06 | 35.67 | 06 |
| 15. | 10 | 07 | 35.29 | 09 |
| District Nagpur | | | | |
| 1. | 08 | 08 | 35.33 | 08 |
| 2. | 06 | 05 | 30.00 | 01 |
| 3. | 04 | 02 | 34.67 | 03 |
| 4. | 03 | 00 | 0.00 | 02 |
| 5. | 05 | 04 | 29.11 | 02 |
| 6. | 04 | 04 | 33.11 | 04 |
| 7. | 04 | 02 | 36.50 | 03 |
| 8. | 06 | 04 | 29.67 | 02 |
| 9. | 03 | 01 | 46.33 | 02 |
| 10. | 03 | 03 | 30.67 | 01 |

SCREENING OF ROOT STOCK

All three rootstock screened in this experiment were polyembryonic and produce high proportion of seedlings. Seedling emergence began at nearly 21 DAS. Post emergence seedling root rot were noted in all three rootstocks. In the first two weeks after emergence of the seedlings death was preceded by severe leaf yellowing and necrosis at collar region of the seedlings (Table II). Per cent root rot was significantly higher in *Citrus jambhiri* (43.33 %) as compared to other two root stock under screening. Root rot per cent was significantly low in rangpur lime (24.67%). However, significant increase in root fresh wt (2.56 g), root length (46.20 cm), shoot fresh wt (8.25 g) and shoot length (37.77 cm) was found in cleopatra mandarin

TableII- Response of citrus root stock to *Phytophthora parasitica*

| Rootstock | Root | | Shoot | | Root rot (%) |
|--------------------|--------------|-------------|---------------|-------------|------------------|
| | Fresh wt (g) | Length (cm) | Fresh wt. (g) | Length (cm) | |
| Rangapur Lime | 2.07 | 41.60 | 7.15 | 30.93 | 24.67 (29.76) |
| Rough lemon | 2.19 | 38.57 | 6.93 | 36.60 | 43.33 (41.16) |
| Cleopatra mandarin | 2.56 | 46.20 | 8.25 | 37.77 | 31.33 (33.99) |
| CD (P=0.01) | 0.10 | 1.03 | 0.96 | 2.74 | 1.44 |

Values in parenthesis are arc sin means

Observations on average colony diameter and per cent growth inhibition were recorded. All *Trichoderma* spp. under the test showed their efficacy to check the mycelial growth of the pathogen on the entire medium under test. The data presented in Table III indicate that all treatments were effective to inhibit the mycelial growth of *P. parasitica* except control. *T. virens* was found significantly superior to inhibit the mycelial growth of *P. parasitica* on the entire medium (V-8 Juice 16.70mm, CMA 17.40mm, PDA 10.30 mm, 2 % Agar 5.20 mm) as compared to all other treatments.

TableIII- Assessment of Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora parasitica* on different medium.

| Antagonists | Mean colony diameter of <i>P.parasitica</i> (mm) | | | | Per cent inhibition | | | |
|------------------------------|--|-------|-------|---------|---------------------|-------|-------|---------|
| | V-8 juice | CMA | PDA | 2% Agar | V-8 juice | CMA | PDA | 2% Agar |
| <i>Trichoderma virens</i> | 16.70 | 17.40 | 10.30 | 5.20 | 81.44 | 80.67 | 85.39 | 37.35 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 17.30 | 18.00 | 10.60 | 6.10 | 80.78 | 80.00 | 84.96 | 26.51 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 17.30 | 17.60 | 10.60 | 6.00 | 80.78 | 80.44 | 84.96 | 27.71 |
| <i>Trichoderma hamatum</i> | 18.00 | 18.60 | 13.00 | 6.50 | 80.00 | 79.33 | 81.56 | 21.69 |
| Control | 90.00 | 90.00 | 70.50 | 8.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| CD(P=0.01) | 0.41 | 0.49 | 0.28 | 0.62 | - | - | - | - |

CHARACTERISTICS OF FLUORESCENT PSEUDOMONADS

Out of 37 *Pseudomonas* species 19 were *P. fluorescens* 11 were *P. putida* and 7 were *P. aurigonosa* on the basis of biochemical test. The results of the test are shown in Table IV. All *Pseudomonads* were found positive to oxidase where, microdase disk were turned to deep purple blue; IAA production, where, development of cherry red colour was observed when Kovac's indole reagent was added; HCN production, where, change in colour from yellow to light brown, brown or reddish brown of filter paper soaked in 0.5 % picric acid in 1 % Na₂CO₃ was observed and siderophore production where orange colour zone after 48 hr. of incubation was observed around the colonies. However, *P. aeruginosa* was found negative to Arginine and positive to *P. fluorescens* and *P. putida* whereas *P. putida* was found negative to gelatin liquefaction and nitrate reduction and also *P. fluorescens* was found negative to nitrate reduction (TableIV).

TableIV- Characteristics of *P. fluorescens*, *P. putida* and *P. aeruginosa*

| Characteristics | <i>P. fluorescens</i> | <i>P. putida</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
|----------------------|-----------------------|------------------|----------------------|
| No.of Isolates | 19 | 11 | 7 |
| Oxidase | + ve | + ve | + ve |
| Nitrate reduction | -ve | -ve | + ve |
| Gelatin liquefaction | + ve | -ve | + ve |
| Arginine test | +ve | +ve | -ve |
| IAA | + ve | + ve | + ve |
| HCN | +ve | + ve | + ve |
| Siderophore | + ve | + ve | + ve |

All *Trichoderma* spp and *P. fluorescens* significantly reduce root rot and stimulated the growth of the seedlings of *Citrus jambhiri*. *T. virens* was found effective to lower down propagule count of *Phytophthora* in the soil (8 cfu/g soil). Seed treatment with metalaxyl @ 2.5 g/Kg seed f.b. spraying @ 0.2 % at 45 and 90 DAE was found significantly superior to manage root rot per cent than all other treatments but at par with seed treatment with metalaxyl @2.5g/Kg seed f.b. spraying of fosetyl-AI @0.2% at 75 DAE. Amongst bioagents *P. fluorescens* XXVI (16.80%) was found effective to lower down the root rot incidence f.b. *T. virens* (17.50%). Root (2.92g) and shoot fresh wt.(8.51g) were found maximum in *P. f.* XXVI (Table V).

TableV. Effect of bioagents and fungicides on occurrence of *Phytophthora* propagules /g soil, root and shoot fresh wt and per cent root rot due to *P. parasitica*

| Bioagents/ Fungicides | Cfu/g soil | Root rot (%) | Root fresh wt (g) | Shoot fresh wt.(g) |
|---|------------|---------------|-------------------|--------------------|
| <i>Trichoderma virens</i> | 08 | 17.50 (24.73) | 2.72 | 7.92 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 12 | 19.60 (26.26) | 2.54 | 7.20 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 11 | 26.40 (30.91) | 2.65 | 7.25 |
| <i>Trichoderma hamatum</i> | 21 | 32.70 (34.87) | 2.36 | 6.93 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> -I | 22 | 29.20 (32.70) | 2.33 | 6.10 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> - IV | 16 | 24.10 (29.38) | 2.87 | 8.34 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> XXVI | 12 | 16.80 (24.19) | 2.92 | 8.51 |
| Seed treatment with metalaxyl @2.5g/Kg seed f.b. spraying @0.2% at 45 and 90 DAE | 11 | 8.56 (17.01) | 2.56 | 7.16 |
| Seed treatment with metalaxyl @2.5g/Kg seed f.b. spraying of Fosetyl-AI @0.2% at 75 DAE | 21 | 9.71 (18.14) | 2.40 | 6.92 |
| Control | 41 | 44.20 (41.67) | 1.38 | 3.95 |
| CD(P=0.01) | - | 1.67 | 0.62 | 1.05 |

Values in parenthesis are arc sin means
DAE- Days after emergence

DISCUSSION

Field nurseries were found contaminated with *Phytophthora*. It may be due to raising of nurseries on same piece of land and to the roadside to attract the customer and also there is no restriction to any person to enter in the nursery. Ridings *et al.* (1977) showed that even with strict sanitary practices, recontamination of disinfected areas occurred when it was present near the nursery. The use of selective medium was as effective in the detection of *Phytophthora* as the leaf baiting technique. Therefore, selective medium would be useful for detection of *Phytophthora* spp. where laboratory facilities are available (Zitko *et al.*, 1987). Three citrus rootstocks were screened to identify those that were highly resistant to root rot. Root rot incidence was observed low in Rangpur lime as compared to Rough lemon and Cleopatra mandarin. It suggests that Rangpur lime show potentiality as superior root stock because of their high tolerance to *Phytophthora* root rot. Cleopatra mandarin and sour orange are said to be highly resistant to infection by *Phytophthora* (Timmer *et al.*, 1988). However, Cleopatra mandarin was recognized as susceptible to *Phytophthora* (Anonymous, 1991). CMA and V-8 Juice was found suitable medium for the growth of *Phytophthora*. Faster growth was observed on CMA, whereas, lowest growth rate was recorded in 2 % Agar (Naqvi, 2005). Meyer and Abdallah (1978) reported that *Pseudomonas* spp. are all members of the same intrageneric homology group. They include *P. aeruginosa*, *P. putida* and *P. fluorescens*. They are well known for production of broad spectrum antibiotics. It is proved to be a major mechanism involved in their biocontrol activity (O' Sullivan and O' Gara, 1992). HCN and siderophore produced by *Pseudomonas* spp. were also involved in their antifungal activity. Voisard *et al.* (1989) observed suppression of black rot of tobacco was due to the production of HCN by *P. fluorescens*, and also HCN induced resistance in the host plant. In the present study, all selected antifungal *Pseudomonas* isolates were observed to produce HCN *in vitro*, which might have contributed for their biocontrol ability in addition to antibiotics. One of the proposed mechanisms of plant growth promotion by bacteria was production of IAA, cytokinin and Gibberellins (Glick, 1991). All four species of *Trichoderma* tested in the experiment provide significant disease control and enhanced plant growth. The reduction of root rot by *T.* spp. may be due to high antagonistic potential that includes antibiosis, parasitism and production of lytic enzymes (Singh *et al.*, 2004). *P. fluorescens* XXVI and IV were also found effective to manage the disease in addition to plant growth promotion activity. Yang *et al.* (1994) reported that *Pseudomonas putida* 6909 and *Pseudomonas fluorescens* 09906 suppressed population of *Phytophthora parasitica* in the citrus rhizosphere, suggesting these bacteria may be useful in control of citrus root rot. Amongst fungicides, seed treatment with metalaxyl @2.5g/Kg seed *f.b.* spraying @0.2% at 45 and 90 DAE was found effective. Naqvi (1993) conducted to determine effect of certain systemic and non systemic fungicide on soil population of *Phytophthora parasitica* and found that metalaxyl was more promising than fosetyl-Al because metalaxyl directly kills the pathogen *in vivo*. However, Graham and Timmer (2003) reported that metalaxyl and fosetyl Al are highly effective against *Phytophthora* spp., they are often used routinely by nurserymen to suppress *Phytophthora* populations and reduced root rot damage in citrus nursery stock. Gade & Giri (2005) observed significant reduction in population of *Phytophthora* sp. (11.25 cfu / g soil) in beds priorly treated with solarization and then drenched with metalaxyl @ 0.2% alternate at bimonthly interval. Significant decrease in mortality was also recorded in same treatment (5.78%) with added benefit of increase in height and girth of *Citrus jambhiri* seedlings. Drenching of metalaxyl @ 0.2 per cent reduced mortality in citrus caused due to *Phytophthora* (13.9%) with added benefit of plant height (52.9cm) and girth (Gade *et al.* 2005). From the survey of citrus nurseries it is observed that field nurseries must have an alternative which is found to be contaminated with *Phytophthora*. Root stocks study warranted the use of *Citrus jambhiri* which is found susceptible to *Phytophthora*. Production of antibiotics, IAA, HCN and siderophore by *P. fluorescens* and production metabolites by *Trichoderma* spp. will play major role in suppression of root rot and enhancement of plant growth in citrus nurseries.

REFERENCES

- Anonymous., 1991- *Integrated pest management for citrus*. 2nd ed. Division of Agriculture and natural resources, Publ. 3303. Oakland, CA.
- Castric K.-F. and P.-A. Castric., 1983 - Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45,700-702.
- Fay G.-D. and Barry, A.-L., 1972 - Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of Enterobacteriaceae. *Applied microbiol.*, 23,710-713.
- Gade, R.-M. and G.-K. Giri., 2005 - Integration of soil solarization and fungicides for management of *Phytophthora* sp. in citrus nursery. *Indian Phytopath.*, 58, 1, 114-116.
- Gade, R.-M., G.-K. Giri and V.-R. Sangle., 2005 - Management of *Phytophthora* and root rot in citrus nursery. *Pesticide Res. J.*, 17,1, 28-29.
- Glick,R.-B., 1991 - The enhancement of plant growth promotion by free living bacteria. *Can.J.Micobiol.*, 41,109-117.
- Gordan, A.-S. and Weber, R.-P., 1951 - Colorimetric estimation of Indole acetic acid. *Plant Physiol.*, 26, 192-195.
- Graham, J.- H., 2004 - *Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes*. Pages 562-586 in: Principals and Applications of Soil Microbiology, 2nd ed. D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, and D. Zuberer, eds. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Graham, J.- H., and Menge, J.- A., 1999 - Root health: Fungal diseases. Pages 126-135 In: Citrus Health Management. L. W. Timmer and L. W. Duncan, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Graham, J.- H., Timmer, L.- W., Drouillard, D.- L., and Peever, T.- L., 1998 - Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. *Phytopathology.*, 88,724-729.
- Grimm, G.-R. and A.-F. Alexander., 1973 - Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. *Phytopathology.*, 63, 540-541.
- Kannwischer, M.-E. and K.-J. Michell., 1978 -The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology.*, 68, 1760-1765.
- Lewis, J.-A., and Papavizas, G.-C.,1984 - A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology.*, 74, 1240- 1244.
- Meyer, J.- M. and M.-A. Abdallah., 1978 – The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*; Biosynthesis, purification and physico chemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, 107, 319-328.
- Naqvi,S. A.M.-H., 1988 - Prevalence of *Phytophthora* spp. Pathogenic to citrus in orange groves of Vidarbha region, Maharashtra. *Indian J. Mycol. Pl. Pathol.*, 18,3, 274-276.
- Naqvi, S.A.M.-H.,1993 - Efficacy of some fungicides in control of *Phytophthora* diseases of Nagpur mandarin in Central India. *Indian Phytopathology.*, 430-434
- Naqvi, S.A.M.-H., 2005-A report on *P.capsici* leomian causing root rot of mandarin in north East Hills. *J.Mycol.Pl.Pathol.*,35,2,210-213
- Nemec, S., Datnoff, L.- E., and Strandberg, J., 1996 - Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Prot.*, 15, 735-742.
- O'Sullivan, D. -J. and O' Gara, F., 1992 - Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, 56, 662-676.
- Ridings, W.-H. N.-C.Schenck, R.-R. Snell, W.-M. Keen, and J.-A. Cornell., 1977 - Reinvation of Methyl bromide treated soil by soil borne fungi and their subsequent effect on citrus seedling growth. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 90,70-74.
- Sandler, H. – A., Timmer, L.- W., Graham, J. -H., and Zitko, S.- E., 1989 - Effect of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica*, and on feeder root densities and fruit yields of citrus trees. *Plant Dis.*, 73, 902-906.
- Schwyn, B. and J. Neilands., 1987 - Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Annal. Biochem.*, 16, 47-56.

- Singh, U.-S., Zaidi, N. -W. Joshi, D., Khan, T. John, D. and Bajpai, A. (2004) Annual Rev. *Plant Pathol.*, 3, 33-75.
- Steddom, K., Becker, O., and Menge, J. -A., 2002 - Repetitive applications of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 0 and effects on populations of *Phytophthora parasitica* in citrus orchards. *Phytopathology.*, 92,850-856.
- Timmer, L.-W. and Menge, J.-A., 1988 - Phytophthora-induced diseases. Pages 22-24 In: Compendium of Citrus diseases.
- Timmer, L.-W., Sandler, H. -A., Graham, J. -H., and Zitko, S. -E., 1988 - Sampling of citrus orchards in Florida to estimate populations of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology.*,78,940-944.
- Tsao, P.-H., 1971 - Chlamydospore formation in sporangium-free liquid cultures of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology.*, 61,1412-1413.
- Voisard, C., Keel, C., Hass, D. and Defago, G., 1989 - Cyanide production by *P. fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic condition. *EMBO J.*,8,351-358.
- Whiteside, J.-O., 1974 - Zoospore inoculation techniques for determining the relative susceptibility of citrus rootstocks to foot rot. *Plant Dis. Rep.*, 58, 713-717
- Yang, C., J.A. Menge and D.A. Cooksey., 1994 - Mutations affecting hyphal colonization and Pyoverdine production in *Pseudomonas* antagonistic toward *Phytophthora Parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*,60 (2), 473-481.
- Zitko, S.-E., L.-W. Timmer and W. -S. Castle., 1987 - Survey of Florida citrus nurseries for *Phytophthora* spp. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 100,82-85.

**LA RAMULARIOSE DES ORGES EN FRANCE :
IMPORTANCE ET MANAGEMENT DE *RAMULARIA COLLO-CYGNI***

D. CARON*, C. MAUMENE**, J.-Y. MAUFRAS*, G. BEAUVALLET**
ARVALIS Institut du végétal,

* :6 ch. Côte Vieille, 31450 Baziège, FRANCE, d.caron@arvalisinstitutduvegetal.fr

** : 91720 Boigneville, France, c.maumene@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

La ramulariose (*Ramularia collo-cygni*) a été identifiée en France sur les orges à partir de 2001. Sa faible présence les années précédentes a peut-être conduit à confondre les symptômes avec d'autres taches brunes. Son expansion a été rapide, car en 2003 une enquête a révélé sa présence sur l'ensemble du territoire français du Sud au Nord.

Les essais effectués depuis lors ont montré qu'il y a une large gamme de sensibilité parmi les variétés, et notamment parmi les variétés brassicoles.

Les essais fongicides ont montré une bonne efficacité de quelques matières actives. On peut citer le prothioconazole, le chlorothalonil, le boscalid qui entrent dans la composition de nombreux produits commerciaux et qui peuvent apporter jusqu'à 98 % d'efficacité.

Les symptômes de la ramulariose deviennent plus importants autour de l'épiaison et dessèchent les plantes rapidement. Mais cette maladie n'est pas la seule à cette époque l'helminthosporiose et les grillures y sont particulièrement importantes. Comme il est difficile de prévoir l'importance qu'elles vont prendre, il est nécessaire d'apporter des produits efficaces contre toutes ces maladies dans le traitement de pré épiaison. À l'époque du 1er traitement en début montaison, c'est la rhynchosporiose qui est surtout à considérer et selon les variétés et les maladies en présence il est possible de déterminer si ce traitement est utile ou non.

Mots-clés : *Ramularia collo-cygni*, orge, fongicides, variétés.

SUMMARY

IMPORTANCE AND MANAGEMENT OF *RAMULARIA COLLO-CYGNI* IN FRANCE

Ramularia collo-cygni was identified on barley in France since 2001. It seems that in the years before, the disease was present at a low level and the symptoms confused with others brown spots. Its expansion seem to have been rapid. In 2003 an investigation revealed its presence throughout the territory from south to north. The trials carried out since then have shown that there is a large range of susceptibility among varieties and also among the varieties used for malting an brewing. Fungicide trials showed good efficacy for some active ingredients. These include prothioconazole, chlorothalonil, boscalid which can provide in mixture with others fungicides up to 98 % of efficacy. During the season, the symptoms of *Ramularia* become more important around heading and the plants die-back quickly. This disease is not the only one to affect barley at that time: net blotch and abiotic leaf spots are particularly important. As it is difficult to predict the importance of these different diseases, it is recommended to use at T2 (GS 45) products effective against all these diseases. At T1 treatment (GS 31), *Rhynchosporium* is still the main disease and according to varieties and visible diseases it is possible to determine if the treatment is useful or not.

Key words : *Ramularia collo-cygni*, barley, fungicides, cultivars.

INTRODUCTION

Une augmentation de la présence de taches brunes abiotiques et de grillures sur les feuilles supérieures des orges a été observée vers la fin des années 90 et le début des années 2000. Ces taches ont peut-être masqué la présence des symptômes de ramulariose sur les feuilles quand la maladie était encore peu fréquente.

À la même époque, la ramulariose est rencontrée partout en Europe avec une incidence sur les rendements (Oxley 2002, Pinnschmidt et Jørgensen 2009, *Havis et al.* 2009). De plus, la maladie semble s'être développée un peu partout dans le monde et elle est signalée notamment en Amérique du Sud et en Nouvelle Zélande (Sachs 2006).

En France, pendant ces années avec faible fréquence de la maladie, les symptômes de ramulariose ont probablement été confondus avec les taches abiotiques comme les grillures ou les grillures polliniques, ou éventuellement encore, avec des taches brunes atypiques de la rhynchosporiose ou de l'helminthosporiose. En 2002 nous avons identifié pour la première fois les spores du champignon sur un champ d'orge d'hiver en Eure et Loir, au centre de la France. Les spores étaient facilement observables sous les 2^{èmes} feuilles alors que les 1^{ères} feuilles n'étaient pas encore sporulantes et couvertes de grillures abiotiques cachant les symptômes. En 2003, nous avons observé les mêmes schémas de symptômes sur plusieurs champs d'orge, nous avons alors enclenché une enquête de détection de l'agent pathogène sur l'ensemble des Régions françaises.

Dans les années qui ont suivi, les agents techniques ont été entraînés à reconnaître la maladie et ont mis en place des essais fongicides pour évaluer les matières actives et bâtir des programmes de traitement contre cette nouvelle maladie et ses dégâts.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

ÉCHANTILLONS DE FEUILLES :

- Feuilles fraîches : provenant de toutes les Régions françaises en 2003.
10 feuilles avec symptômes suspectés autour de l'épiaison.
Niveau foliaire : 1^{ère} feuille F1, F2 et F3.
Toutes variétés : orges d'hiver et de printemps, 2 et 6 rangs.
Envoyées à plat dans une enveloppe en papier.
- Feuilles d'herbier séchées : 2002 et 2001.

METHODES D'ANALYSE :

- Observations à l'oeil nu.
- Observations des symptômes et des bouquets de conidiophores à la loupe binoculaire (x7 à x45).
- Observations des bouquets de conidiophores et des conidies au microscope (x450 et x 1100).
- Détection PCR :
2003 : Laboratoires AgroServices Bayer CropScience France, amorces RAM1 (2003).
2004 à 2008: Laboratoire Arvalis à Baziège, amorces rcc5 et rcc1 (Havis & al. 2006).

ESSAIS FONGICIDES ET VARIETAUX :

- Les essais ont été réalisés sur plusieurs lieux de la moitié Nord de la France en Bretagne, dans le Centre et en Champagne.
- Mode expérimental : parcelles de 20 m², 3 répétitions, blocs de Fisher, 1 facteur.
- 2 applications fongicides: S 31-32 and S 45-49.
- Analysis statistique : anova.

RESULTATS

PREMIERES DETECTIONS : ENQUETE *RAMULARIA* EN 2003

La première découverte au champ a été effectuée en 2002. Une enquête Ramulariose a été mise en place en 2003. Des échantillons d'herbiers de 2002 et de 2001 lui ont été adjoints. Les résultats sont présentés sur la figure 1. Il en résulte que la ramulariose est détectée en France depuis 2001 et qu'elle est trouvée presque partout en 2003. Actuellement en 2009, la maladie peut être présente partout.

Figure 1 : Résultats de l'enquête de détection de la ramulariose en 2003 ainsi que pour 1 échantillon en 2002 (2) et pour 1 échantillon en 2001 (1) sur orge d'hiver (2 et 6 rangs) et orge de printemps.

Results of the 2003 Ramularia survey and for 1 sample in 2002 (2) and 1 sample in 2001 (1) on winter barley (2 and 6 rows) and spring barley.

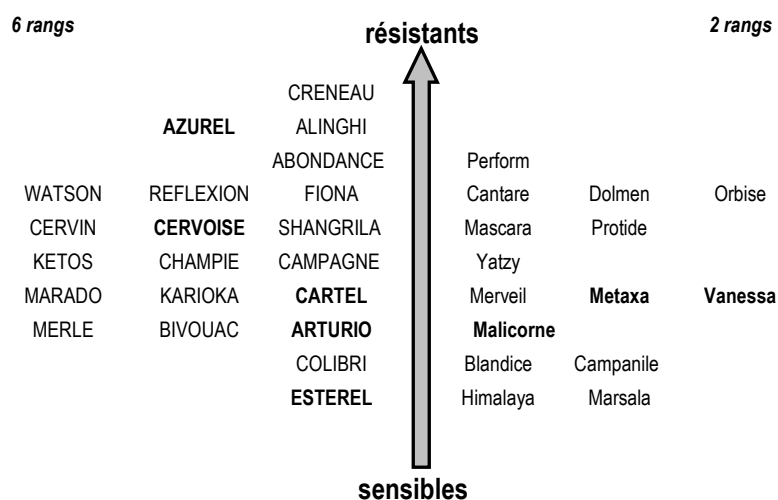


VARIETES :

Il est difficile de faire la part des symptômes de ramulariose de ceux des grillures et des autres taches brunes dans les complexes de maladies, qui sont pratiquement toujours présents dans les essais. L'évaluation devrait être faite par biologie moléculaire mais ce n'est pas réalisable au champ. Ainsi les notations variétales à la ramulariose doivent être examinées avec précaution. De ces évaluations, il ressort que la sensibilité à la ramulariose (Figure 2) de

l'ensemble des orges est étalée sur une assez grande étendue entre les sensibles et les résistants et que les orges brassicoles suivent ce même schéma.

Figure 2: Niveau de sensibilité relative des variétés d'orge à la ramulariose en France en 2008.
Relative levels of barley cultivar susceptibility to Ramularia disease in France in 2008.



En gras : brassicoles

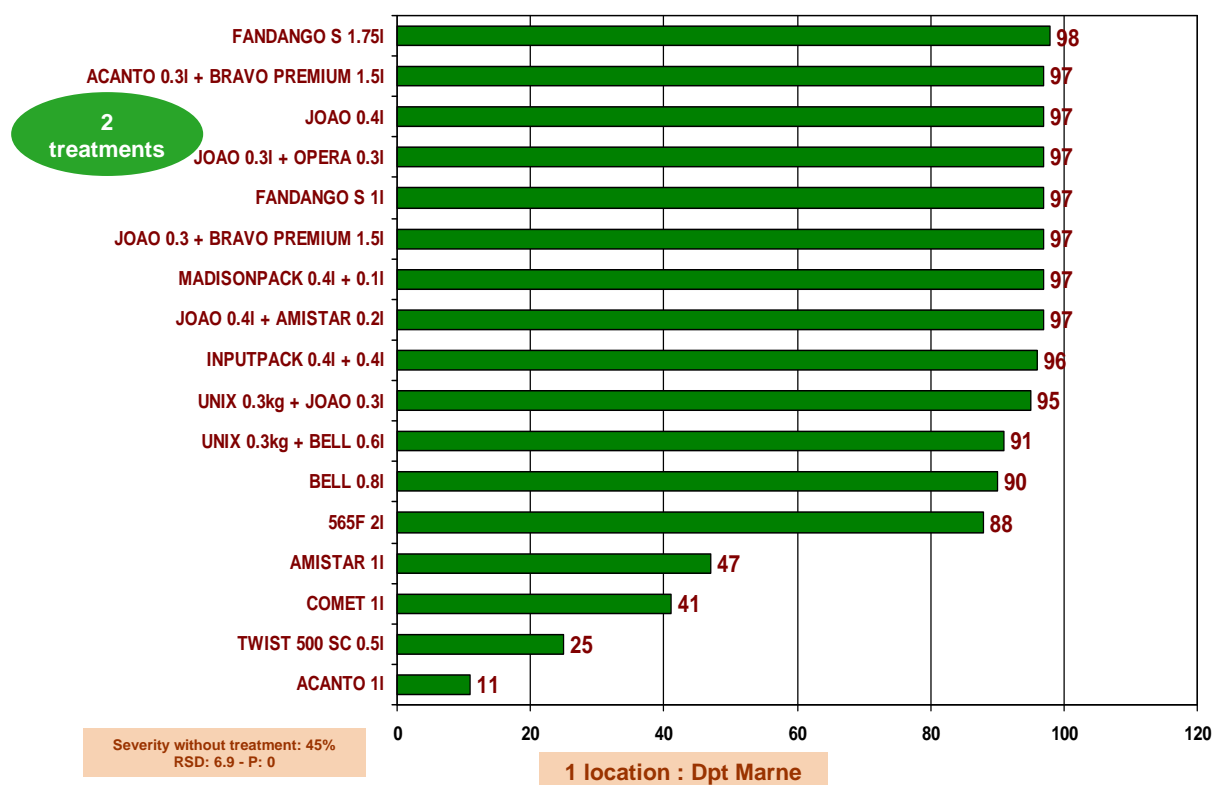
Source : Arvalis, essais pluriannuels avec 9 essais 2008

EFFICACITES FONGICIDES EN 2008 :

Les essais sur la ramulariose sont effectués depuis 2003. Basés sur les symptômes visuels, les résultats des essais fongicides sont exprimés en % d'efficacité. Les résultats de 2008 sont montrés sur la figure 3.

Figure 3: Efficacités fongicides sur la ramulariose en 2008. Le niveau de maladie dans les non traités est de 45 %. L'ETR est de 6,9 et les différences entre traitements est H.S. (P=0).

Fungicides efficacy on Ramularia in 2008. The disease severity in the non treated plots is 45 %. The Residual standard deviation is 6.9 and the difference between treatment is very highly significant (P = 0).



Les correspondances entre les noms des produits commerciaux et les matières actives sont données dans le tableau 1.

Tableau 1: Matières actives des produits commerciaux.

Table 1 : active ingredients used in commercial chemicals :

| | |
|---|--|
| Acanto (DuPont Solutions SAS): | Picoxystrobine 205 g/l |
| Amistar (Syngenta Agro SAS) | Azoxystrobine 250 g/l |
| Bell (BASF Agro) | Epoxiconazole 67 g/l + boscalid 233 g/l |
| Bravo premium (Syngenta Agro SAS): | Propiconazole 62.5 g/l + chlorothalonil 250 g/l |
| Comet (BASF Agro): | Pyraclostrobin 250 g/l |
| Fandango (Bayer CropScience): | Prothioconazole 100 g/l + fluoxastrobin 50 g/l |
| Inputpack (Bayer CropScience): | = Joao + Virtuose |
| Joao (Bayer CropScience): | Prothioconazole 250 g/l |
| Madisonpack (Bayer CropScience): | = Joao + Twist 500 SC |
| Unix (Syngenta Agro SAS): | Cyprodinil 75 % |
| Twist 500 SC (Bayer CropScience) | Trifloxystrobine 500 g/l |
| Virtuose (Bayer CropScience): | Spiroxamine 500 g/l |
| 565 F (BASF Agro) (unregistered in France): | Epoxiconazole 62.5 g/l + metrafenone 75 g/l + fenpropimorphe 200 g/l |

DISCUSSION

DISTRIBUTION IN FRANCE:

La maladie a été observée pour la première fois au champ dans le Centre de la France en 2002 et ses fructifications blanches ont été observées sur des feuilles d'herbier dans un essai du Sud de 2001. Les symptômes y étaient masqués par des grillures et d'autres taches brunes non spécifiques. Comme ce schéma de symptômes recouvrants est fréquent, nous ne pouvons pas savoir si la maladie était présente à un faible niveau non détecté visuellement depuis plusieurs années ou si elle est apparue soudainement. Toutefois, la généralisation de la

maladie s'est opérée très rapidement en 2 années, puisqu'en 2003 elle était largement fréquente sur l'ensemble du pays. La transmission par la semence avec croissance interne et pratiquement sans symptôme jusqu'à l'épiaison suivi d'une forte dispersion conidienne entre variétés précoces et tardives (Havis et al. 2009, Nyman et al. 2009) a vraisemblablement contribué à cette dispersion rapide. En 2008, la maladie était observée partout en France, sans être systématique. Il est vraisemblable qu'une absence de contaminations primaires (semences saines, résidus de culture non contaminés) ou des conditions climatiques défavorables soient l'origine de ces champs épargnés.

VARIETES :

Les symptômes de la ramulariose et les grillures abiotiques à la face supérieure des feuilles sont souvent présentes ensemble. Bien qu'il soit relativement aisé de les distinguer à la face inférieure des feuilles où les grillures sont absentes ou moins prononcées, ceci gêne considérablement les notations des essais. D'autant plus que la ramulariose se distingue mal des plus petites taches brunes d'*Helminthosporium teres* ou d'autres maladies, après floraison et que des interférences avec toutes ces maladies biotiques ou abiotiques sont suspectées (Pinnschmidt et Sindberg 2009). Pour toutes ces raisons, les résultats de sensibilité des variétés ne peuvent être considérés comme très précis et ne sont pas définitifs.

Nous constatons que la sensibilité des variétés à la ramulariose (figure 2) est assez proche de celle des grillures (Arvalis 2008) mais que certaines variétés s'en éloignent sensiblement comme Karioka, moyennement sensible à la ramulariose mais résistante aux grillures ou Himalaya sensible à la ramulariose mais résistante aux grillures.

FONGICIDES :

Certains produits fongicides utilisables sur orge ont une efficacité sur la ramulariose. La figure 3 montre clairement que les produits à base de prothioconazole, de chlorothalonil ou de boscalid, en 2 traitements (S 31-32 et S 38-48), ont une efficacité qui dépasse les 90 % et peut même atteindre jusqu'à 98 %. À l'inverse, les strobilurines ne sont pas efficaces contre la ramulariose et sont inférieures à 50 % d'efficacité.

Le plus souvent, les matières actives sont utilisées en associations dans les produits commerciaux, ce qui permet de prendre en compte les effets additionnels de chacun, mais aussi d'intégrer l'ensemble des maladies des orges dans le programme de traitement.

RESISTANCE AUX QOI :

L'analyse effectuée par le laboratoire du Scottish Agricultural College, basée sur des échantillons de feuilles d'orge attaquées provenant de Picardie d'une part et de Bretagne d'autre part ont permis d'identifier une résistance de *R. collo-cygni* aux strobilurines (et plus généralement aux Qoi). Les tests ont été réalisés par biologie moléculaire pour les 2 sites. La résistance est causée par la mutation du gène du cytochrome b de l'agent pathogène en position G143A comme dans le cas de la septoriose ou de l'oïdium. La mutation est généralisée dans les 2 populations étudiées avec presque 100 % de présence.

Les 2 lieux échantillonnés ne sont pas suffisants pour savoir si la résistance est disséminée partout mais ce serait en accord avec le comportement irrégulier des strobilurines rapporté en 2006 par Jørgensen et Christiansen et par les rapports du FRAC qui ont déjà signalé la présence de cette résistance en 2006 (FRAC 2008).

MANAGEMENT :

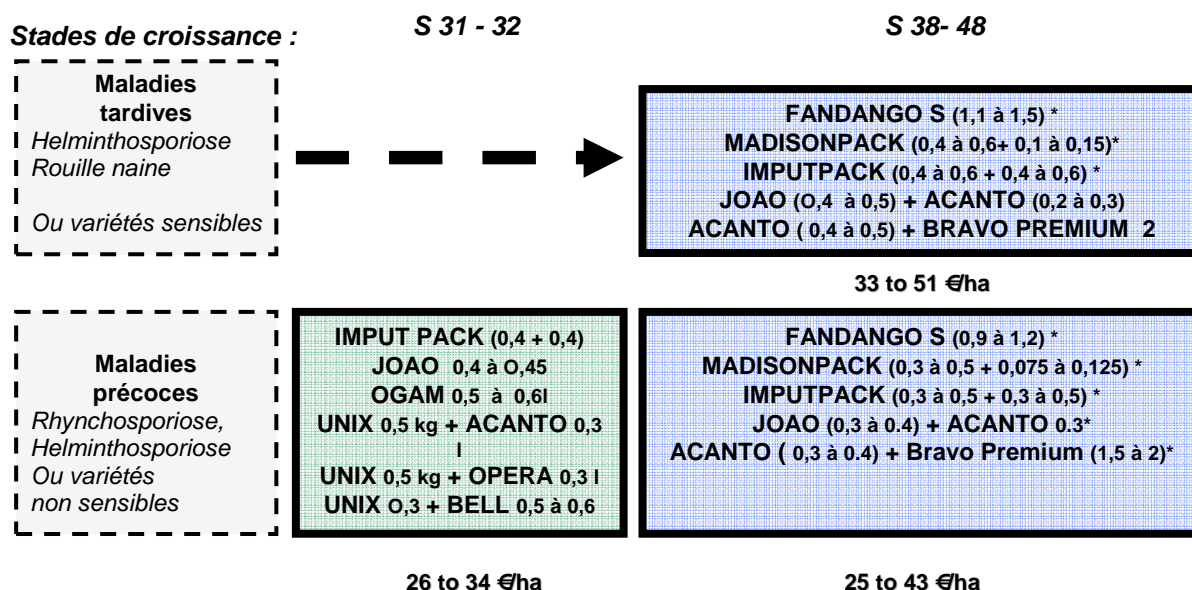
La méthode de lutte couramment utilisée actuellement contre la ramulariose consiste en une protection fongicide en végétation avant l'épiaison. (Maumené 2008, McCabe 2009, Christiansen et al. 2009). Toutefois, La ramulariose n'est responsable que d'une des maladies présentes autour de l'épiaison. Pour préserver les orges, il faut aussi tenir compte de l'helminthosporiose, de la rhynchosporiose, de la rouille et des grillures.

D'autre part, en fonction du climat, les maladies peuvent être précoces ou tardives. Le nombre de traitements sur l'orge en végétation peut alors varier de 1 à 2. Le traitement de pré épiaison est presque toujours nécessaire, mais le premier traitement en début montaison n'est pas toujours utile.

Ainsi, le programme fongicide (figure 4) peut éviter si possible le premier traitement et doit tenir compte de l'helminthosporiose, de la ramulariose, des grillures abiotiques et dans certaines zones de la rouille pour le deuxième traitement car elles sont difficilement prévisibles. La rhynchosporiose dans le cas du premier traitement est plus facile à considérer car les symptômes sont typiques et le climat qui permet son évolution est mieux connu.

Pour décider de leurs traitements, les conseillers et les agriculteurs peuvent prendre en compte les résultats des essais de produits et de matières actives rassemblés dans le tableau 2 et ceux des programmes de traitement rassemblés dans la figure 4.

Figure 4: Programmes de traitements sur maladies de l'orge. *Management of treatments on barley diseases.*



Bien que les traitements de pré épiaison soient indispensables pour lutter contre le complexe parasitaire de l'orge et que l'on en profite pour y inclure le raisonnement contre la ramulariose, les traitements en végétation ne devraient pas rester les seuls moyens de lutte contre cette maladie. Ces traitements interviennent en bout de chaîne de multiplication de *R. collo-cygni*, ce qui n'est pas très logique, on pourrait envisager des traitements de semences qui éviteraient de disséminer la maladie dès sa source. L'inconvénient est que cela n'empêcherait pas le traitement de pré épiaison et qu'il faudrait veiller à ne pas rajouter de matière active supplémentaire par cette voie au cours de la campagne. Dans ce sens P. Frei 2009 a testé des traitements des semences par thermothérapie (52°C 10mn) qui donnent des résultats légèrement supérieurs aux fongicides et qui pourraient intéresser les producteurs de l'agriculture biologique.

Comme la maladie peut passer par les repousses et les résidus très tôt en automne sur les plantes, il faudrait envisager un travail du sol assainissant très tôt en saison. Ceci est d'autant plus important que les spores aériennes légères sont très facilement disséminées.

CONCLUSION

Ramularia collo-cygni est devenu très rapidement important en France au début des années 2000 sur l'ensemble du pays. Comme il est souvent présent en même temps que les grillures abiotiques, une certaine confusion existe dans la reconnaissance des symptômes visuels et le classement dans les essais reste difficile.

Les variétés ont des niveaux de résistance assez variables, même dans les variété brassicoles. La résistance à cette maladie devrait donc être prise en compte par les sélectionneurs dans les programmes d'amélioration.

Les fongicides ont une bonne efficacité contre la ramulariose. Mais d'autres maladies sont aussi présentes, elles doivent absolument être prises en compte dans le raisonnement et le choix du traitement. Cependant nous manquons encore d'informations sur l'épidémiologie de la ramulariose nous permettant de mieux prévoir sa présence, son importance, ainsi que les voies préférentielles de contamination pour orienter la recherche vers les traitements de semences ou la gestion des résidus de culture.

Les méthodes de détection moléculaires pré symptomatiques devrait aider à répondre à ces questions.

Tableau 2: Efficacité relative des produits commerciaux utilisables sur les maladies de l'orge.
Relative efficacy of chemicals used on barley diseases.

| | Helmintho. teres | Powdery mildew | Rhynchosporium | Brown rust | Abiotic scorch/ Ramularia |
|------------------------------|------------------|----------------|----------------|------------|---------------------------|
| OPUS 1 | + | + | +++ | +++ | + |
| BELL 1.5 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++++ |
| BELL 0.75 | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| BELL 0.8 + COMET 0.2 | +++ | +++ | ++++ | +++ | +++ |
| AMISTAR 1 | +(+) | + | + | ++ | + |
| TWIST 500 SC 0.5 | ++(+) | + | ++ | +++ | + |
| COMET 1 | ++(+) | + | | +++ | + |
| ACANTO 1 | +++ | + | ++ | +++ | + |
| ACANTO 0.3 + BRAVO PREMIUM 1 | ++(+) | + | ++++ | ++ | ++++ |
| UNIX 0.5 + OPUS 0.5 | + | ++ | ++++ | ++ | + |
| UNIX 0.3 + BELL 0.6 | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| UNIX 0.3 + JOAO 0.3 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| JOAO 0.4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| JOAO 0.8 | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| MADISON PACK 0.4 + 0.1 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ |
| MADISON PACK 0.7 + 0.175 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| INPUTPACK 0.4 + 0.4 | +++ | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| INPUTPACK 0.8 + 0.8 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| FANDANGO S 1 | +++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ |
| FANDANGO S 1.75 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

REMERCIEMENTS

Nous remercions Simon Oxley et son équipe pour l'aide qu'ils nous ont apportés dans la détermination moléculaire de la résistance de *R. collo-cygni* aux Qol.

REFERENCES :

Arvalis, Institut du végétal, 2008. Choisir 2008, Variétés et traitements d'automne, Champagne-Ardenne, Lorraine, pp.62-65.

Caron D., 2003. *Ramularia* disease (*Ramularia collo-cygni* Sutton et Waller), a new barley disease in France. Proceedings of the AFPP 7th international Conference on Plant Diseases in Tours 3-5 December 2003:

Christiansen A., Jørgensen Lise. N., Von Tiedeman A., Balz T., Liebermann B. & Miethbauer S., 2009. Fungicide impact on yield and *Ramularia* leaf spot, fungal biomass and rubellines. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.33-39.

FRAC (fungicide Resistance Action Comitee), 2008. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents, revised January 2008., p21.

http://www.frac.info/frac/publication/anhang/List_of_Resistant_Plant%20Pathogens.pdf

Frei Peter, 2009. *Ramularia collo-cygni* on barley: a seed-borne disease. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.109-110.

Havis Neil. D., Oxley Simon. J. P., Piper Stephen. R., and Langrell Stephen. R. H. 2006. Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiology letters* 256:217-233.

Havis N. D., Taylor J. M. G., Nyman M. & Oxley S. J. P., 2009. Epidemiology of *Ramularia collo-cygni*. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.1-7.

Jørgensen Lise. N., Christiansen A., 2006. Control of *Ramularia* in winter barley and spring barley using different fungicides – Experience from Denmark. Proceedings of the 1st European *Ramularia* Workshop, March 2006, Göttingen. Germany, pp. 113-119.

Maumené C., Maufras J. Y., 2008. Fongicides 2008, retour sur la campagne. *Perspectives agricoles*, N°350, novembre, p: 42-56.

McCabe T., 2009. Fungicide strategies for the control of *Ramularia collo cygni* to optimise grain yield and quality on spring barley in Ireland. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.133-136.

Nyman M., Havis Neil. D. & Oxley Simon. J. P., 2009. Importance of seed-borne infection of *Ramularia collo-cygni*. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.91-96.

Oxley S.J.P., Havis ND, Sutherland K G, Nuttal M., 2002: Development of a rationale to identify the causal agent of necrotic lesions in spring barley and to identify control mechanisms. HGCA Project report 282

Oxley Simon. J. P. & Havis N. D., 2009. Understanding *Ramularia collo-cygni* in the past, present and future. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.141-146.

Pinnschmidt Hans O. et Jørgensen Lise. N., 2009. Yield effects of *Ramularia* leaf spot on spring barley. The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp.57-66.

Pinnschmidt Hans O. et Sindberg Suzanne A., 2009. Assessing *Ramularia* leaf spot resistance of spring barley cultivars in the presence of other diseases. . The 2nd European *Ramularia* Workshop, Edinburgh. Association of Applied Biologists, Aspects of Applied Biology 92, pp. 71-80.

Sachs Edelgard, 2006. The history of research into *Ramularia* leaf spot on barley. Proceedings of the 1st European *Ramularia* Workshop, March 2006, Göttingen. Germany, pp. 9-15

**DATE DE SEMIS, PRESSION DE SEPTORIOSE ET POTENTIEL DE RENDEMENT : DE
LA COMPREHENSION A LA PRECONISATION OPERATIONNELLE**

D. GOUACHE ⁽¹⁾, P. GATE ⁽¹⁾, C. ROBERT ⁽²⁾, C. FOURNIER^(2,3)

⁽¹⁾ ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL

Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, France

⁽²⁾ UMR 1091 INRA-AgroParisTech Environnement et Grandes Cultures
78850 Thiverval-Grignon, France

⁽³⁾ UMR 759 INRA-SupAgro Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress
Environnementaux ; Montpellier, France

Contact : d.gouache@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

Retarder les dates de semis du blé est un moyen de limiter les épidémies de septoriose, mais qui réduit aussi généralement les potentiels de rendement. La démarche exposée ici permet de mieux comprendre et raisonner ce dilemme. Dans un premier temps, un modèle couplé plante – maladie (Septo3D) comportant une description détaillée du couvert a permis de mettre en évidence que la vitesse d'émission des feuilles, était le principal trait permettant à la plante « d'échapper » à la maladie en semis tardif. Un second modèle reprenant notamment cet effet, « SeptoLIS », a permis de simuler le développement de la maladie dans une large gamme de dates de semis. L'utilisation de ce modèle couplée à un modèle agroclimatique de prévision de rendement met en évidence de fortes disparités régionales, qui pourront être déclinées en préconisations.

Mots-clés : blé (*Triticum aestivum*), septoriose (*Mycosphaerella graminicola*), date de semis, rendement, phyllotherme, simulation

SUMMARY

**SOWING DATE, DISEASE PRESSURE AND YIELD POTENTIAL: FROM
UNDERSTANDING TO RECOMMENDATIONS**

Late sowing is often considered as a means to reduce septoria attacks on winter wheat, but which implies reduced attainable yield. The work presented here has allowed to better understand and quantify these elements. The use of a coupled plant – pathogen model (Septo3D), which includes a precise description of the canopy, shows that the faster speed at which leaves emerge for late sowings allows disease escape. Leaf emergence rate, used in the “SeptoLIS” model, permits its use for a large window of sowing dates. This model, coupled with agroclimatic predictions of yield shows strong regional variability in yield potential – septoria trade-offs, that can be deployed as operational recommendations.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*), septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*), sowing date, yield, phyllochron, simulation

INTRODUCTION

En France, la septoriose, causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est la maladie fongique foliaire la plus dommageable sur blé tendre, (*Triticum aestivum*), pouvant engendrer des pertes de rendement de l'ordre de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la maladie est essentiellement basé sur la lutte chimique. Cependant, cette lutte chimique est doublement remise en cause. Le développement de résistances aux matières actives par le pathogène a induit des baisses d'efficacité importantes (Maufras *et al.*, 2006 ; An., 2009). De plus, la pression sociétale s'est concrétisée par l'engagement pris lors du Grenelle de l'Environnement de réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques de 50% (An., 2007). La mise en oeuvre de méthodes de lutte non-chimiques est donc d'autant plus importante.

L'effet bénéfique de semis tardifs sur la diminution de pression de septoriose est rapporté dans la littérature. (Murray *et al.*, 1990 ; Gladders *et al.* 2001; Peters, *et al.* 1996 ; Mohamed *et al.*, 2000). En 2006 sur le site de Vraignes (80) un semis retardé du 17 octobre au 23 novembre permettait une réduction de l'écart traité – non-traité de 10.7 q/ha, aboutissant à une réduction possible de consommation de fongicides de 64 à 40 €/ha. Des semis trop tardifs peuvent aussi induire des pertes de potentiel de rendement. En effet, des épiaisons plus tardives exposent la culture à des épisodes de sécheresse et d'échaudage thermique plus marqués (Gate, 2007 ; Gate *et al.* 2008). Ainsi, l'enquête SCEES de 2006 (Agreste, 2006), année à stress de fin de cycle marqués, montre, en moyenne sur 3487 parcelles agricoles, un rendement moyen entre 71 et 72 q/ha pour des semis antérieurs au 15 octobre, et entre 67 et 68 q/ha pour des semis postérieurs à cette date. Cependant, cette tendance générale masque une variabilité forte selon les sites et les climats (Fig. 1). Par exemple, les stress de fin de cycle sont bien moins importants dans les secteurs de bordure maritime du nord-ouest de la France que dans le Centre ou le sud (Gate *et al.*, 2008). Le raisonnement de la date de semis vis à vis du contrôle de la septoriose et des rendements doit donc se faire pédoclimat par pédoclimat et pour une large gamme de conditions climatiques. Nous proposons ici de traiter cette question par une démarche modélisation. Dans un premier temps, à l'aide d'un modèle détaillé de développement du blé couplé à un modèle de maladie, Septo3D, nous avons cherché à mieux comprendre les raisons pour lesquelles il y avait réduction de l'intensité de l'épidémie. Dans un second temps, en reprenant uniquement les principaux facteurs mis en évidence dans la première étape, nous avons réalisé des simulations sur plusieurs sites et 20 années climatiques. L'étude fréquentielle des pertes/bénéfices permet de proposer des recommandations région par région

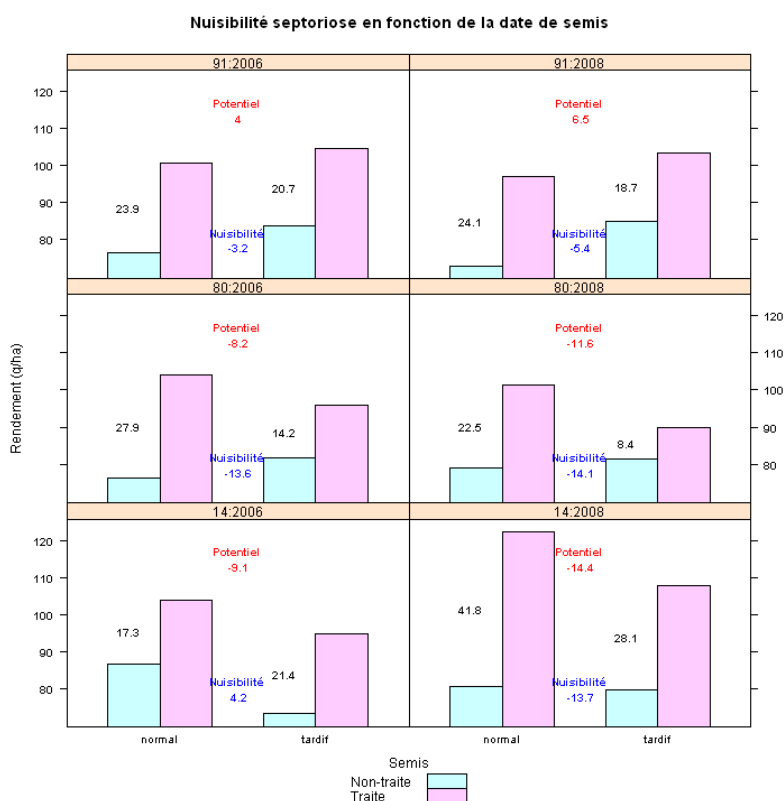


Figure 1 : Rendements traités et non-traités en semis normaux et tardifs sur 3 sites – Villiers (91), Vraignes (80), Rots (14) – en 2006 et 2008. *Treated and untreated yields for normal and late sowing dates for 3 sites and 2 years.*

MATERIEL ET MÉTHODE

LE MODELE SEPTO-3D

Le modèle Septo3D (Robert *et al.* 2008 ; Robert *et al.* 2009) correspond à un modèle couplé décrivant le développement des épidémies de septoriose dans des couverts de blé précisément décrits en termes de structure. Il comporte un module décrivant le cycle infectieux de la septoriose (infection, incubation, sporulation, production de nécroses), un module de dispersion des spores, et un module de développement et de croissance du blé en trois dimensions. Il utilise comme entrée des données météorologiques horaires (température, pluie, humidité) et des paramètres de description de la structure 3D du couvert. Il permet notamment de faire varier différents paramètres du développement et de la croissance du blé « toutes choses égales par ailleurs » afin de déterminer l'impact relatif de ces paramètres sur les épidémies de septoriose. Pour hiérarchiser les facteurs, différents paramètres de développement du couvert (longueur de feuilles, largeur de feuilles, hauteur de tige, vitesse d'extension de tige, phyllotherme = intervalle en degré-jours entre l'émergence des feuilles) ont été variés (70% et 130 % d'une valeur de référence habituellement observée en conditions agricoles) un par un ou en combinaison pour des simulations de développement d'épidémies sur dix années de climat sur le site de Grignon (78).

SIMULATIONS DU RENDEMENT ET DE LA SEPTORIOSE

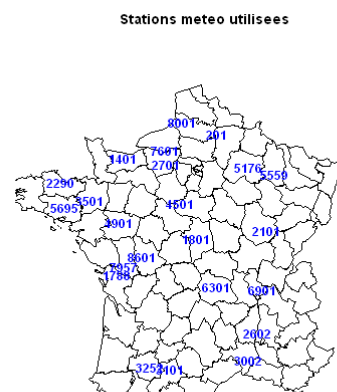
Le modèle « SeptoLIS » (Gouache et Couleaud, 2009) décrit, en fonction des pluies et des températures journalières, le développement de la septoriose (dispersion, infection, incubation, sporulation et production de nécroses) sur les feuilles successives du blé, dont le rythme d'émergence est prédit avec le modèle de Gate (1995). Les règles de décision de déclenchement de traitements intégrées dans le modèle permettent d'évaluer la possibilité de réaliser une impasse sur le premier traitement contre la septoriose.

Ce modèle a été utilisé simultanément avec les modèles de stades et d'élaboration du rendement décrits dans Gate *et al.* 2008 sur 20 années de données climatiques (1989 – 2008) sur différents sites (Fig. 2) et pour 3 types de sol (superficiel, intermédiaire, profond). Le modèle quantifie différents risques climatiques préjudiciables au blé et permet ainsi, en le faisant fonctionner pour différentes dates de semis (du 10 septembre au 30 novembre, par intervalles de 10 jours) de déterminer les plages de dates de semis pour lesquelles ces risques sont minimisés (Table I).

Table I : Critères agroclimatiques pris en compte pour le calage des plages de dates de semis optimales.
Criteria used to determine optimal sowing dates.

| Risque climatique | Critère utilisé |
|--|--|
| Gel d'épis | On n'accepte pas d'occurrence du risque plus de 2 années sur 10 |
| Sécheresse en cours de montaison | Regroupement en pertes de rendement : on n'accepte pas de perdre plus de 10% du potentiel de l'année 2 années sur 10 |
| Sécheresse en cours de remplissage du grain | |
| Echaudage thermique en cours de remplissage du grain | |

Figure 2 : Localisation des différentes stations météorologiques de l'étude.
Localisation of weather stations used.



Les probabilités de réaliser une économie de traitement et d'occurrence des différents risques climatiques ont ensuite été modélisées en fonction de la date de semis par

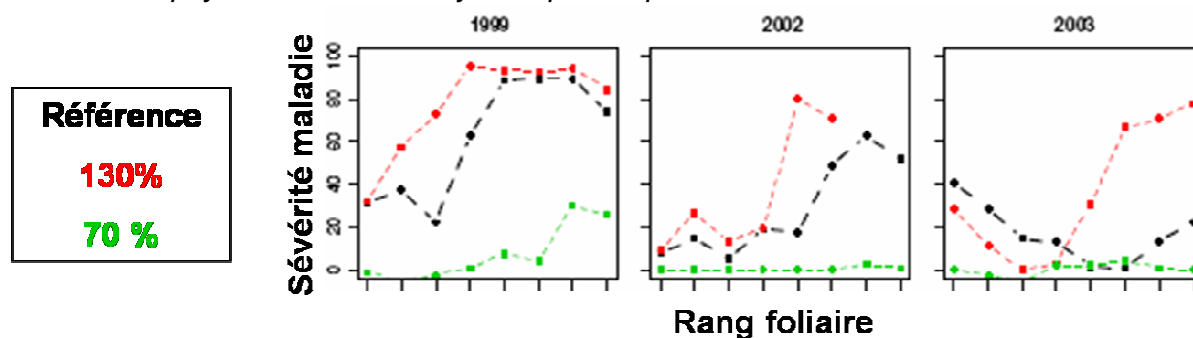
régression logistique avec le logiciel R (fonction glm). Les résultats présentés ici correspondent à ceux pour une précocité de type Soissons.

RESULTATS

LE RYTHME D'ÉMISSION DES FEUILLES EST UN ÉLÉMENT CLÉF DE LA RÉDUCTION DE LA NUISIBILITÉ EN SEMIS TARDIF

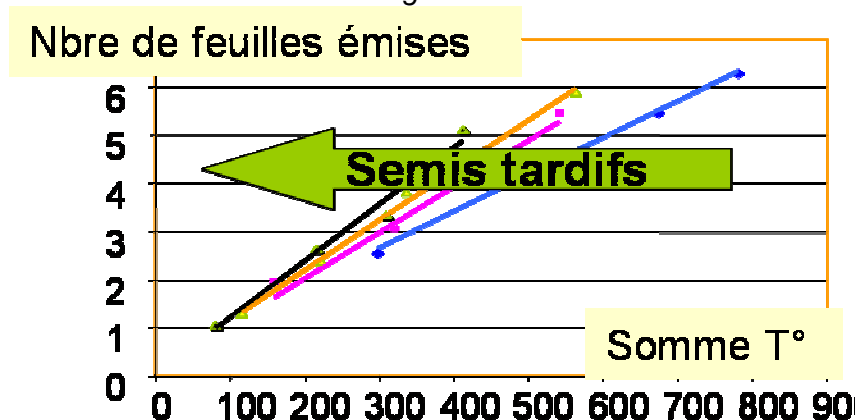
Parmi tous les paramètres de croissance et de développement du blé testés pour leurs effets sur la septoriose, c'est le phyllotherme qui a, de loin, la plus grande influence sur les épidémies de septoriose. Lorsque le phyllotherme augmente, la vitesse de développement de la plante est réduite dans son ensemble (baisse de la fréquence d'émission des feuilles, des vitesses d'allongement des organes et de la vitesse de sénescence des feuilles) et on observe que les feuilles sont plus fortement touchées par la maladie. Au contraire, lorsque la vitesse d'émergence des feuilles est plus rapide (phyllotherme plus petit), la plante se développe plus vite et réussit à échapper à la maladie (Fig. 3).

Figure 3 : Impact du phyllotherme sur la sévérité d'épidémies de septoriose sur 3 années (le rang foliaire va du plus bas au plus haut de la gauche vers la droite) (adapté de Robert *et al.* 2008)
Influence of phyllochron on severity of Septoria epidemics



Or, on observe dans des essais que plus on sème tard, plus l'émergence des feuilles se fait rapidement (Fig. 4). Les valeurs couramment observées de phyllotherme dans les essais varient de 85°C pour les semis les plus tardifs à 125°C pour les semis les plus précoces, ce qui se rapproche de la gamme de variation utilisée dans les simulation (80°C à 140°C). On peut donc supposer que le principal effet de la réduction de septoriose en semis tardif est lié à la variation du phyllotherme.

Figure 4 : Influence de la date de semis sur le rythme d'émergence des feuilles. *Influence of sowing date on leaf emergence rate.*



ÉVOLUTION DE LA PRESSION DE SEPTORIOSE ET DU POTENTIEL DE RENDEMENT EN FONCTION DES DATES DE SEMIS DANS DIFFÉRENTS CONTEXTES PEDO-CLIMATIQUES

Les simulations réalisées nous ont permis de déterminer en fonction de la date de semis la probabilité d'économiser un traitement contre la septoriose deux années sur dix, cinq années sur dix et huit années sur dix (exemple : Fig. 5). La date de semis permettant d'économiser un traitement deux années sur dix peut être interprétée comme la date permettant d'éviter un recours systématique au fongicide du fait d'une pression toujours très élevée. La date de semis permettant une impasse huit années sur dix peut être interprétée comme une date de semis à partir de laquelle la pression de septoriose est réduite de façon suffisamment

efficace pour prévoir *a priori* un programme fongicide allégé. Ces dates ont été confrontées aux dates de semis les plus tardives permises pour assurer un potentiel de rendement suffisant d'après les critères agroclimatiques décrits plus haut. Les possibilités d'adaptation apparaissent très différentes en fonction des contextes pédo-climatiques (Table II).

Ainsi, dans les secteurs de bordure maritime nord, qui offrent de fortes marges de manoeuvre en terme de dates de semis, la pression de septoriose étant à la fois forte, précoce et régulière, les semis de la deuxième moitié de novembre ne permettent qu'une économie de traitements 2 années sur 10. Les secteurs du Nord-Ouest de la France plus éloignés de la bordure maritime (en allant vers l'Eure et l'Aisne) offrent eux une marge de manoeuvre presque aussi forte, mais la pression de septoriose étant moins systématiquement précoce, les semis les plus tardifs pourraient justifier une révision à la baisse des programmes fongicides.

Certains secteurs offrent a contrario peu de possibilités de semis tardifs sans réduction substantielle du potentiel de rendement. En Poitou-Charentes, cela, conjugué à la pression souvent précoce de septoriose, ne laisse aucune possibilité d'économies de traitement. Dans d'autres cas (du Centre au Nord-Est), on met en avant le fait que les semis les plus précoces (de Septembre en particulier) impliquent une intervention systématique, alors que de légers reculs offrent déjà une possibilité d'économies de traitement deux années sur 10. Les Pays de Loire, intermédiaires entre Poitou-Charentes et Centre, offrent également des possibilités assez limitées d'adaptation.

Figure 5 : Probabilité d'économie du 1^{er} traitement contre la septoriose en fonction de la date de semis (Variété Soissons, sites de Bourges(18) et Plélo (22)). La courbe correspond au résultat de la régression logistique. Les croix correspondent aux années individuelles : elles ont été légèrement bruitées afin de faciliter la visualisation. *Probability of avoiding the 1st anti-Septoria treatment as a function of sowing date.*

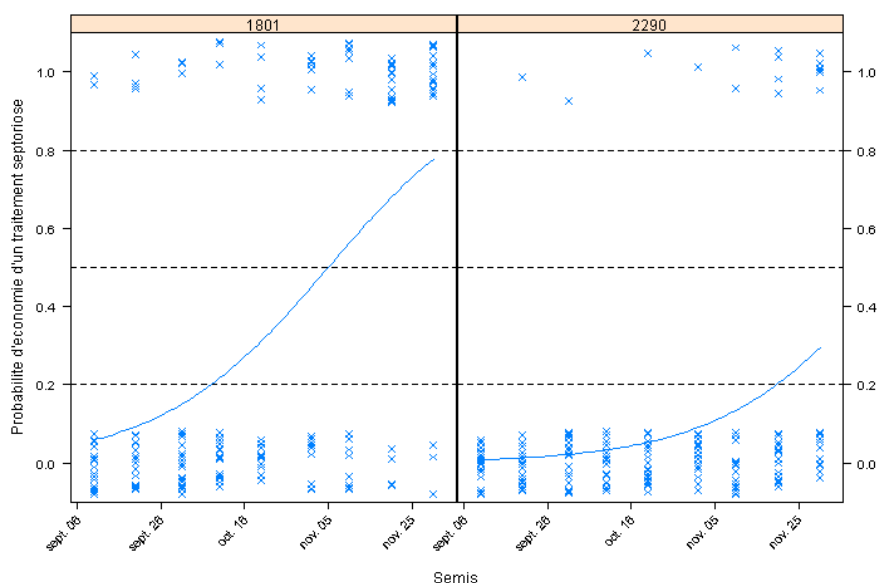


Table II : Synthèse des possibilités d'économie de traitement anti-septoriose et de préservation du potentiel de rendement en fonction des dates de semis (cas d'une précocité de type Soissons). (^a indication moyenne : les marges de manoeuvre sont légèrement plus réduites en sols superficiels et plus larges en sols profonds). *Synthesis of possibilities of avoiding the 1st anti-Septoria treatment and preservation of yield potential as a function of sowing date.*

| Secteur | Caractéristiques | Economie de 1 ^{er} traitement septoriose | | | Semis les plus tardifs possibles en terme de potentiel de rendement ^a | Bilan |
|--|--|---|---------------------|-----------------|--|--|
| | | 2 années sur 10 | 5 années sur 10 | 8 années sur 10 | | |
| Bordure maritime Nord : Nord Bretagne, Plaine de Caen, Seine Maritime, Somme | Forte marge de manoeuvre en terme de potentiel de rendement mais pression de septoriose régulièrement forte et précoce | mi Nov | – | – | fin Nov | Possibilité de limiter les interventions systématiques pour les semis de la 2 ^{ème} moitié de Nov |
| Nord-Ouest hors bordure maritime (Eure, Picardie) | Forte marge de manoeuvre en terme de potentiel de rendement et pression de septoriose parfois tardive | mi Oct | fin Oct – début Nov | mi Nov | fin Nov | Possibilités d'économies significatives, pouvant aller jusqu'à une refonte du programme pour la 2 ^{ème} moitié de Nov |
| Centre, Berry, Bourgogne, Sud Bretagne (Pays de Loire) | Marge de manoeuvre moyenne et pression intermédiaire | début Oct | fin Oct | | mi Oct | Les semis de Sept impliquent une intervention systématique pouvant être évitée avec des semis de début Oct |
| Nord-Est (Champagne, Lorraine) | Marge de manoeuvre limitée & pression tardive | fin Sept | fin Oct | mi Nov | mi Oct | Les semis de Sept impliquent une intervention systématique pouvant être évitée avec des semis de début Oct |
| Poitou-Charentes, (Pays de Loire) | Marge de manoeuvre limitée & pression précoce | début Nov | – | – | mi à fin Oct | Pas de réduction de pression possible sans pertes de rendement significatives |

DISCUSSION

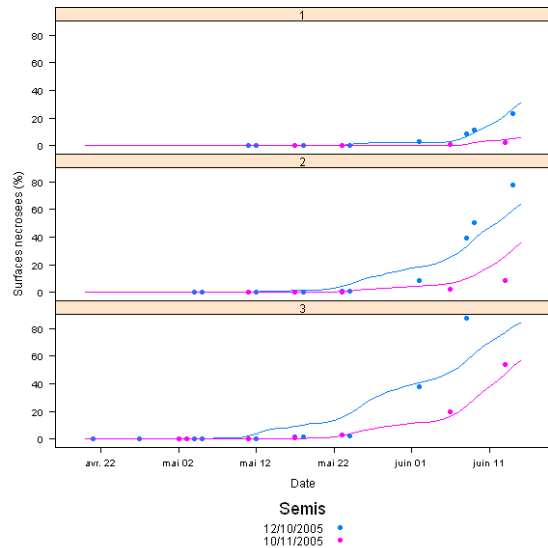
La date de semis, présentée comme pouvant contribuer à une réduction de pression phytosanitaire, est aussi un élément clef pour le potentiel de rendement. La démarche présentée ici a permis d'identifier un facteur clef explicatif de la réduction de pression de septoriose en semis tardifs : le phyllotherme. On observe ainsi que plus les feuilles du blé émergent rapidement, ce qui est le cas en semis tardif, plus elles échappent à la maladie, corroborant les hypothèses formulées par Shaw et Royle (1993) et Lovell *et al.* (1997). Le phyllotherme est effectivement systématiquement intégré dans les modèles de prévision de la septoriose (Audsley *et al.*, 2005; Moreau et Maraite, 1999; Rouzet et Murer, 1988). Le modèle de phyllotherme de Gate (1995), qui gère les effets de la date de semis, permet de bien simuler la maladie pour une large gamme de dates de semis (Fig. 6).

L'utilisation fréquentielle de modèles a souvent été utilisée pour l'étude des impacts des dates de semis (Rieu et Gate, 1997 ; Bassu *et al.* 2009) en termes de productivité. Ici, ce type d'étude a été couplé avec un travail équivalent sur la pression d'une maladie foliaire, la septoriose du blé. D'autres éléments peuvent également être pris en compte. Par exemple, les jours disponibles pour réaliser les chantiers de semis sont un critère de grande importance, qu'il est également possible d'étudier via des modèles, comme cela a été fait dans Rieu et Gate (1997). Ensuite, dès lors que des lois de réponses agroclimatiques existent, d'autres types de bioagresseurs influencés par la date de semis, comme les ravageurs ou les adventices (Gate, 2008), peuvent être étudiés de cette manière. Le développement de ce type de démarche prend une importance croissante dans le contexte actuel de changement climatique (Gate, 2007 ; Brisson et Caubel, 2008). Leur actualisation fréquente sera sans doute nécessaire. L'utilisation de données météorologiques futures (jusqu'en 2100), issues des projections du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat), pourra s'avérer utile pour évaluer la pérennité des stratégies basées sur la date de semis.

CONCLUSION

La démarche présentée ici, conduite conjointement entre institut de recherche et institut technique, consiste en des allers-retours entre acquis de la recherche et déclinaison opérationnelle. Ici, comme dans le cas de la nuisibilité de la septoriose (Gate *et al.*, 2006), des travaux permettent de hiérarchiser les facteurs les plus importants à prendre en compte pour étudier un phénomène aux interactions complexes. Dans le cas de la nuisibilité de la septoriose, cela a permis de déboucher sur un indicateur simple pour l'étude de la nuisibilité et de la tolérance à la maladie (Gate *et al.*, 2006 ; Bancal *et al.*, 2009). Ici, l'identification de la vitesse d'émergence des feuilles comme un facteur clef a permis d'assurer la mise au point d'un modèle opérationnel pouvant être utilisé pour l'étude de stratégies de réduction de pression parasitaire via une pratique qu'est la date de semis, débouchant donc sur de possibles préconisations par milieu pédo-climatique.

Figure 6 : Exemple de simulations sur les 3 derniers étages foliaires pour des parcelles (Villiers (91)) semées à 2 dates différentes. Les lignes représentent les valeurs simulées et les points les observations. *Example simulation of Septoria symptoms over top 3 leaf layers for 2 sowing dates.*



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Il a été soutenu par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. »

Les auteurs tiennent à remercier William Lee pour son travail sur les premières analyses de sensibilité du modèle Septo-3D, et François Piraux pour l'inspiration de la régression logistique.

BIBLIOGRAPHIE

Agreste, 2006. Enquête SCEES sur les pratiques culturales en 2006

Anonyme, 2007. Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » in : Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »
http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf

Anonyme. 2009. Note commune : état des lieux et recommandations pour 2009. *Perspectives Agricoles* 354, 48-52.

Audsley, E., A. Milne, and N. Paveley. 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. *Aspects of Applied Biology* 147 (2).

Bancal, M.O., P. Bancal, R. Ben Slimane, P. Gate, D. Gouache. 2009. Tolérance du blé à la septoriose. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Bassu, S., S. Asseng, R. Motzo, F. Giunta. 2009. Optimising sowing date of durum wheat in a variable Mediterranean environment. *Field Crops Research* 111 (1): 109-118.

Brisson N., J. Caubel, 2008. Quelle adaptation de notre agriculture au changement climatique ? *Oléagineux Corps gras, Lipides*, 15(5) :324-326

Gate, P. 1995. Ecophysiologie du blé. ITCF, Tec&Doc/Lavoisier (Eds.)

Gate P. 2007. Dossier Le blé face au changement climatique. *Perspectives Agricoles* 336 : 20-56.

Gate P. 2008. Date et densité de semis : une étape clef pour le succès d'une culture. *Perspectives Agricoles* 348 : 46-49.

Gate, P., A. Blondlot, D. Gouache, O. Deudon, L. Vignier. 2008. Impacts du changement climatique sur la croissance et le développement du blé en France. Quelles solutions et quelles actions à développer ? *Oléagineux Corps gras, Lipides* 15 (5) : 332-336.

Gate, P., D. Gouache, C. Robert, M. O. Bancal, C. Lannou, B. Ney. 2006. Quel indicateur plante pour rendre compte de la nuisibilité de la septoriose ? In 8ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Gladders, P., N. D. Paveley, I. A. Barrie, N. V. Hardwick, M. J. Hims, S. Langton, and M. C. Taylor. 2001. Agronomic and meteorological factors affecting the severity of leaf blotch caused by. *Aspects of Applied Biology* 138:301-311.

Gouache, D., G. Couleaud. 2009. Le positionnement des traitements fongicides : enjeu pour la septoriose et intérêt du modèle « SeptoLIS ». In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Jorgensen, L.N., Jahn, M., Clark, W., Antichi, D., Goral, T., Schepers, H., Lucas, P., Rolland, B., Gouache, D., Hornok, L., 2008. Endure Wheat Case Report

Lovell, D. J., S. R. Parker, T. Hunter, D. J. Royle, R. R. Coker. 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* 46 (1):126-138.

Maufras J. Y., Maumene C., Couleaud G., Bousquet N, 2006. Comment résister à la résistance? *Perspectives Agricoles* 328, 30-36

Mohamed, L. B., M. Rouaissi, A. Sebei, S. Hamza, and M. Harrabi. 2000 Effet du génotype, de la date de semis, de la fertilisation azotée et potassique et des fongicides sur le développement de *Septoria tritici*. *Cahiers Options méditerranéennes Seminar on Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*: 349-356.

Moreau, J. M., Maraite, H.. 1999. Integration of knowledge on wheat phenology and *Septoria tritici* epidemiology into a disease risk simulation model validated in Belgium. *Aspects of Applied Biology* 55, 1-6.

Murray, G.M., R.H. Martin, and B.R. Cullis. 1990. Relationship of the severity of *Septoria tritici* blotch of wheat to sowing time, rainfall at heading and average susceptibility of wheat cultivars in the area. *Australian Journal of Agricultural Research* 41 (2):307-315.

Peters, B.A., R. Loughman, and P. DiPrinzio. 1996. Leaf development in relation to infection by *Stagnospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 47:1169-1179.

R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rieu, C., P. Gate. 1997. Choix de la date de semis : Quels éléments faut-il prendre en compte ? *Perspectives Agricoles* 227: 50-55.

Robert C., Fournier C., Andrieu B., Ney B. 2008. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant–pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology* 35: 997–1013.

Robert C., C. Fournier, D. Gouache, P. Gate, B. Andrieu, B. Ney. 2009. Septo3D: un modèle pour analyser les effets de la structure des couverts végétaux sur les épidémies. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Rouzet, J, F. Murer. 1988. Etude d'un modèle permettant la simulation d'une épidémie de *Septoria* (Pre-sept) *tritici* sur blé d'hiver. In 2ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Bordeaux (France): ANPP.

Shaw, M. W., D. J. Royle. 1993. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 42 (6):882-899.

**APPROCHE MULTIFACTORIELLE DES ORIGINES DE LA VERTICILLIOSE DU LIN,
*LINUM USITATISSIMUM***

E. CARIOU-PHAM⁽¹⁾, M. BANSARD⁽²⁾ et M. BROCHARD⁽²⁾

(1) Antenne ITL au CETIOM, Centre de Grignon, Avenue Lucien Brétignières 78 850
Thiverval Grignon, France, emmanuelle.cariou@lin-itl.com

(2) ITL 2, chemin du Moulin 27 170 Ecardenville la Campagne, France.

RÉSUMÉ

La verticilliose due à *Verticillium dahliae*, champignon ascomycètes, est une maladie tellurique émergente sur les cultures de lin en France. Elle touche toutes les régions de culture et peut compromettre la récolte de lin dans certaines zones. Afin d'identifier les facteurs biotiques et abiotiques favorisant l'apparition de la verticilliose, nous avons réalisé une enquête entre 2004 et 2008 sur 22 parcelles naturellement infestées et 3 parcelles témoins. Des analyses physico-chimiques comparées sur les zones saines et malades provenant de 19 parcelles naturellement infestées semblent montrer qu'il existe quelques différences sur la composition physico-chimique des sols. Ainsi, les zones plus réceptives à la maladie seraient caractérisées par un pH plus élevé, et une teneur en limon et en argile (sol profond) plus importante. L'itinéraire technique et le passé culturel de la parcelle révèlent certaines pratiques à haut risque comme l'enfouissement des pailles et un labour profond. Inversement, l'irrigation et une récolte précoce tendent à ralentir la maladie. Suite à cette enquête, des propositions se dégagent pour modifier l'itinéraire technique du lin sur les parcelles à risque.

Mots-clés : *Verticillium dahliae*, *Linum usitatissimum*, réceptivité des sols, itinéraire technique

SUMMARY

INFLUENCE OF CROP MANAGEMENT AND SOIL COMPOSITION ON VERTICILLIUM FLAX WILT

Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae*, ascomyceta fungi, is an emerging problem on flax culture in France. Most culture areas are contaminated so that sometimes harvesting is not possible. In order to identify abiotic factors responsible for Verticillium wilt, we investigated several naturally contaminated fields analysing soil properties and crop management. Chemical and physical soil properties were compared between healthy and diseased soil. Susceptible soil is characterized by high pH level, and high silt and clay (deep soil) level contents. Compared crop management on different field with no disease (control) or high disease level pointed out that straw burial's and deep plowing are considered as high-risk cultural practices. Indeed irrigation and early harvest tend to slow down the disease. Following this investigation, proposals emerged to change crop management on highly wilt contaminated fields.

Key-words: *Verticillium dahliae*, *Linum usitatissimum*, susceptible soil, crop management.

INTRODUCTION

Depuis 6 ans la verticilliose due à *Verticillium dahliae*, champignon de la famille des ascomycètes est une maladie en recrudescence sur les cultures de lin. Elle touche toutes les régions de culture et peut compromettre la récolte de lin dans certains cas. On estime que 10% des producteurs de lin ont des surfaces contaminées par le champignon soit environ 600 agriculteurs. Cette maladie se manifeste en fin de végétation et surtout pendant la phase de rouissage à terre qui suit l'arrachage des plantes. Les tiges de lin se dessèchent et prennent une couleur bleu-gris (Figure 1) caractéristique de la maladie. Les rendements en fibre peuvent être affectés à hauteur de 50% et la fibre issue de plantes malades est souvent détruite ou peu résistante. Actuellement, il n'existe pas de méthodes de lutte pour combattre *V. dahliae*. La verticilliose du lin est une maladie connue en Grande Bretagne et dans le reste de l'Europe à climat continental mais en France elle est passée totalement inaperçue jusqu'à ces dernières années (Gklipathi, 2002). Afin d'identifier les facteurs abiotiques favorisant l'apparition de la verticilliose, nous avons réalisé une enquête de 2004 à 2008 auprès de 25 liniculteurs représentatifs de l'ensemble du territoire français touché par la maladie, Picardie, Normandie, Nord-Pas de Calais. Les résultats portent sur l'analyse physico-chimique comparée des sols sains et malades ainsi que sur une enquête des pratiques agricoles (amendement, itinéraire et précédent) sur des parcelles dont le niveau d'infestation est variable.



Figure 1 : Tiges de lin infectées par la verticilliose à gauche et microsclérotas de *V. dahliae* à droite. Infected flax stems (left) and *V. dahliae* microsclerotia (right).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

FACTEURS EDAPHIQUES

Des analyses (physico)-chimiques de sols naturellement infectés et sains ont été réalisées auprès du laboratoire du SAS à Ardon. Parmi les 25 parcelles, seules 19 d'entre elles ont été utilisées pour cette analyse, les 6 parcelles restantes, - 3 parcelles témoin ne présentant pas de maladie et 3 parcelles très infestées où aucune zone saine n'a pu être identifiée- ne pouvant être utilisées pour cette étude. Au total 38 analyses ont été réalisées, les parcelles naturellement infectées étant découpées en 2 zones, une zone d'attaque et une zone saine ou présentant peu de symptômes. Les données ont été analysées à l'aide de statistiques exploratoires du type ACP (Analyse en Composantes Principales sur le logiciel STAT BOX Pro) ou de représentations graphiques plus simples sous excel.

PRATIQUES AGRICOLES

Nous avons distribué un questionnaire d'enquête auprès des agriculteurs concernés afin d'identifier les pratiques à risque pour le développement de la verticilliose. Cette enquête est basée sur la comparaison de 25 parcelles contaminées à des degrés différents sur la base des précédents culturaux et des interventions culturales. Les éléments portent sur l'historique de la parcelle : la durée de rotation entre deux cultures de lin, le type de précédent, la période de labour, les engrais apportés. Les données étant à la fois quantitatives et qualitatives, nous avons déterminé des classes pour chacune des variables analysées (tableau I). Les variables ont été séparées en deux groupes pour faciliter la lecture des graphiques : le premier groupe porte sur les "amendements" et le deuxième concerne "l'itinéraire et le précédent" de la parcelle. Des Analyses de Correspondances Multiples (ACM) ont été réalisées sur le logiciel STAT BOX Pro à partir des deux groupes de données prédéfinis.

| Variables | Symbole | Unité | <u>Modalités pour les classes qualitatives</u> | | | |
|-------------------------------|---------|------------------|--|---------------|---------------|-------|
| | | | a | b | c | d |
| Dose de semis | Ds | Kg/Ha | 110 | 120 | 130 | / |
| Date de semis | S | / | 10 au 20 Mars | 21 au 30 Mars | 1 au 10 Avril | / |
| Longueur des rotations | R | Ans | 1 ^{ère} Année | / | 6-7 | / |
| Précédent hôte | H | Nbre de cultures | 0 | 1 | 2 | 3-4 |
| Précédent céréale | C | Nbre de cultures | 1-3 | 4-6 | 7-9 | / |
| Profondeur du labour | Pl | Cm | / | 16-20 | 21-25 | 26-30 |
| Nb passages du tracteur | T | / | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Période de végétation du lin* | V | Jours | 95-109 | 110-124 | 125-139 | / |
| Devenir des résidus | Res | / | Enfouis | Enlevés | / | / |
| Irrigation | Eau | / | Non | Oui | Drainage | / |
| Engrais N | N | Kg/Ha | 0 | 5 - 20 | 21 - 50 | > 50 |
| Engrais P | P | Kg/Ha | 0 | 10 - 50 | 51 - 90 | > 90 |
| Engrais K | K | Kg/Ha | 0 | 5 - 100 | 101 - 200 | > 200 |

* Nombre de jours entre le semis et l'arrachage de la parcelle.

Tableau I : Description des variables utilisées pour les A.C.M. Variable description used for MCA.

RESULTATS

FACTEURS EDAPHIQUES

Analyses chimiques

Les résultats sur les analyses chimiques du sol (Figure 2) mettent en évidence des différences entre zone de prélèvement. L'ACP permet de distinguer deux groupes avec d'une part la majeure partie des zones malades et d'autre part une grande partie des zones saines. Il semblerait que les différences entre ces groupes, portent sur quelques variables : le pH, la teneur en Magnésium (MgO) et peut être la Capacité d'échange cationique (CEC). La valeur du pH est directement corrélée aux éléments disponibles pour l'alimentation de la plante, eux-mêmes caractérisés par la CEC du sol. Dans les zones où le pH est basique, la teneur en éléments disponible est généralement plus élevée ce qui favorise une meilleure alimentation de la plante. L'amélioration de la végétation des plantes semble corrélée à la présence d'épidémie de verticilliose plus importante. Cette constatation apparemment contradictoire, n'est pas unique. Des observations similaires ont été effectuées sur la brûlure du lin, une autre maladie tellurique de cette plante cultivée, (Cariou *et al.* 2000 et Cariou 2001). Ce phénomène peut être lié à une meilleure multiplication des spores de *V. dahliae* en condition basique (Gklipathi, 2002), mais peut être également due à une contamination précoce de la plante en raison d'une évapotranspiration plus importante.

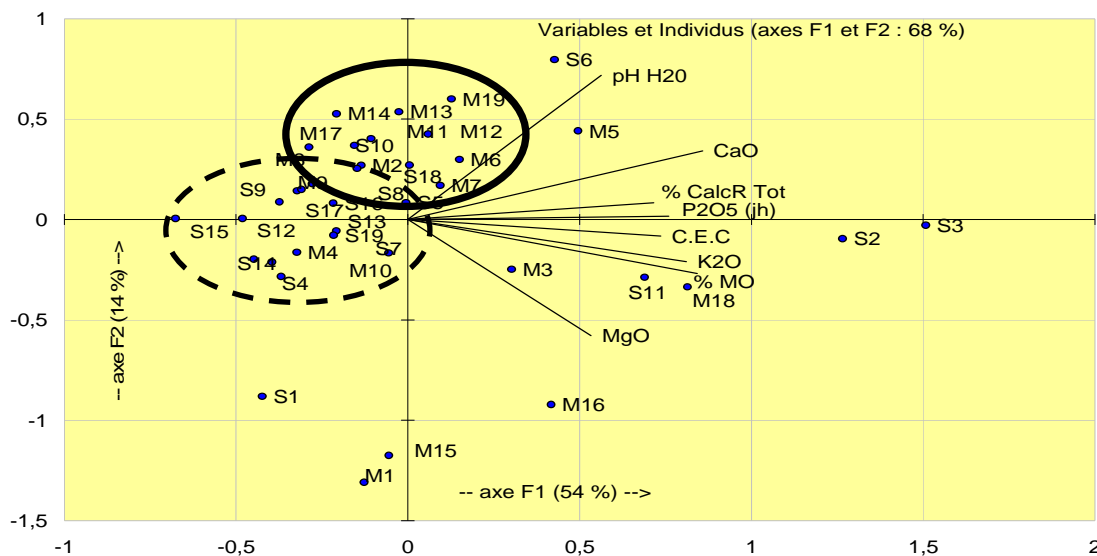


Figure 2 : ACP (Analyse en composantes principales) sur 38 individus (19 zones parcelaires classées S saines ou M malades), pour 8 variables chimiques (CEC, pH...). Les individus (S1 à S19 et M1 à M19) sont représentés dans le système d'axes réduits contenant 68% de la variabilité des données. Les variables chimiques sont codées suivant la dénomination suivante : pH, %CalcR tot % de calcaire total, CaO teneur en chaux, P2O5 teneur en phosphates, K2O teneur en potassium, %MO teneur en matière organique, MgO teneur en magnésium, CEC capacité d'échange cationique. Les cercles représentent l'ensemble des zones saines (en pointillé) respectivement malades (ligne unie) sur le plan de l'ACP. PCA from 38 points (19 field plots with diseased plants: M or no diseased plants: S), for 8 chemical variables (CEC, pH ...). Individuals (S1 to S19 and M1 to M19) are represented in the reduced axis system containing 68% of data variability. Chemical variables were encoded as follow: pH, %CalcR tot: limestone total, CaO: calcium content, P2O5: phosphate content, K2O: potassium content, MO%: organic matter content, MgO: magnesium content, CEC: cation exchange capacity. Circles represent healthy points (dotted line) or diseased points (solid line).

Analyse Physique

L'analyse des données physiques du sol permet de mettre en évidence quelques caractéristiques du sol relatifs à la teneur en argile, la teneur en sable et en limon fin des sols naturellement infestés (Figure 3). En effet, on observe que, à l'exception de la parcelle 14 atypique et très sableuse, les zones malades sont situées sur des sols plutôt limoneux argileux que sableux. Ainsi, les courbes de la teneur en limon fin et de la teneur en sable associées aux zones malades sont situées respectivement sur la partie haute et la partie basse des graphes. A l'exception de la parcelle 14, les teneurs en limon fin et en sable varient de 25 à 40% et de 5 à 14% respectivement. Les teneurs en argile sont beaucoup plus variables. Cependant les sols malades semblent en contenir d'avantage que les sols sains.

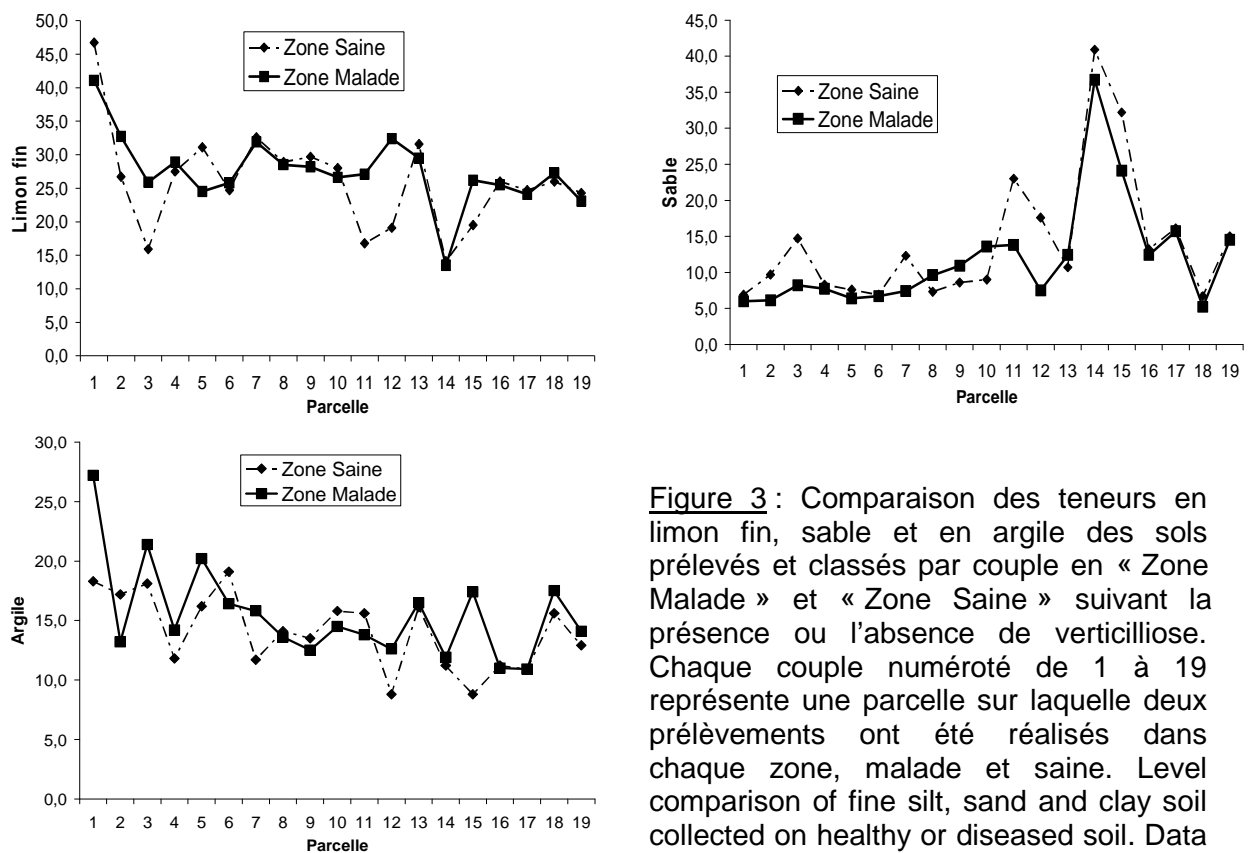


Figure 3 : Comparaison des teneurs en limon fin, sable et en argile des sols prélevés et classés par couple en « Zone Malade » et « Zone Saine » suivant la présence ou l'absence de verticilliose. Chaque couple numéroté de 1 à 19 représente une parcelle sur laquelle deux prélèvements ont été réalisés dans chaque zone, malade et saine. Level comparison of fine silt, sand and clay soil collected on healthy or diseased soil. Data are from 19 naturally infected fields.

ENQUETES SUR LES PRATIQUES CULTURALES CONSEQUENCES SUR L'ITINERAIRE TECHNIQUE DU LIN

Les figures 4 et 5 présentent les résultats des ACM (Analyse des Correspondances Multiples) relatifs aux résultats pour les pratiques culturelles « amendements » et « itinéraire et précédent ».

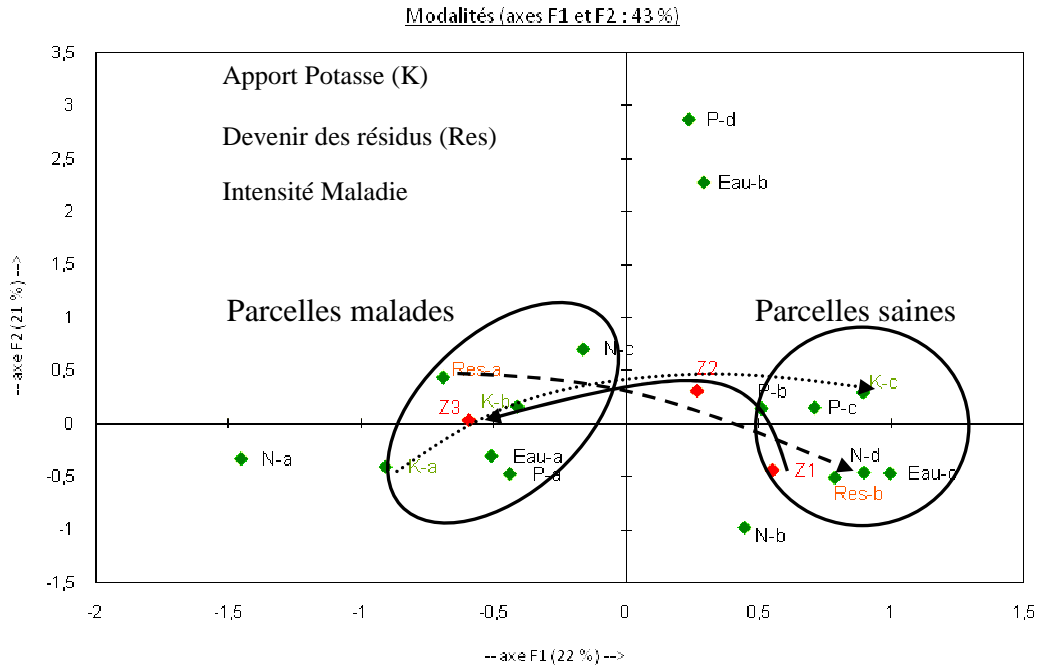


Figure 4 : ACM pour les variables "Amendements" : N (Azote), P (Phosphore), K (Potassium), Eau (Irrigation) et Res (devenir des résidus) Avec Z1, zone saine - Z2, zone avec quelques ronds de maladie et Z3, zone entièrement touchée. CMA Analysis with N (Nitrogen), P (Phosphorus), K (Potassium), Water (Irrigation) and Res (straw burial's).

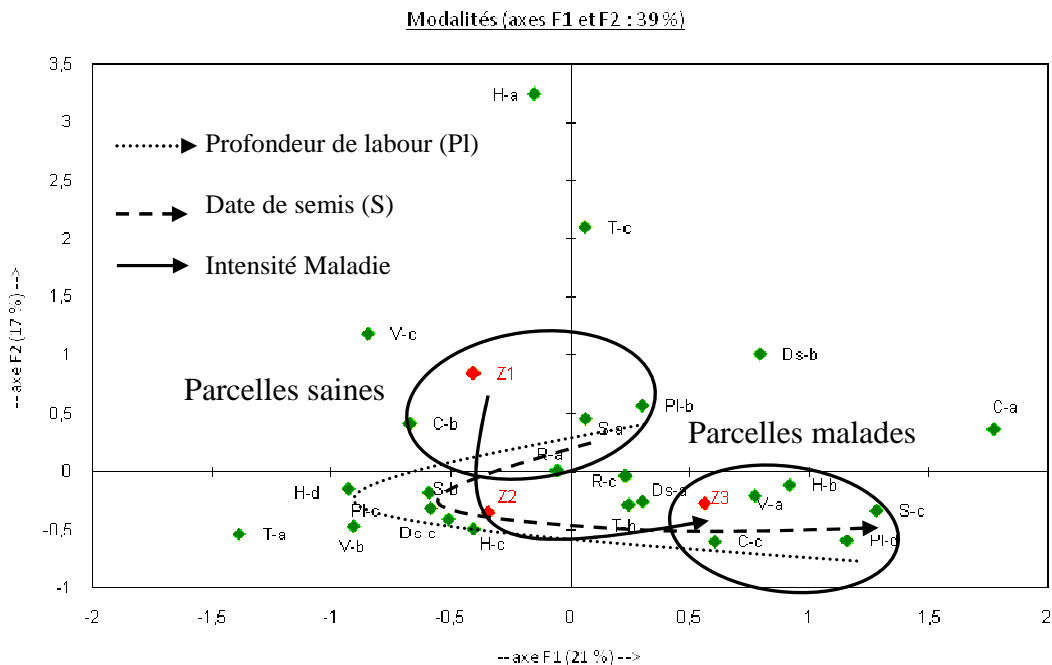


Figure 5 : ACM pour les variables "Itinéraire et Précédent" : Ds (dose de semences), S (date de semis), R (longueur des rotations), H (précédent hôte), C (précédent céréale), PI (profondeur du labour), T (nombre de passages du tracteur), V (durée d'implantation du lin). CMA analysis with Ds (seeds amount), S (sowing date), R (length rotation), H (previous host), C (previous cereal), PI (depth plowing), T (sowing field preparation), V (flax growing season).

Effet des amendements sur la gravité de la maladie

Les points représentant les modalités d'une variable sont reliés par une ligne brisée dans l'ordre des modalités (Volle, 1989). La variable expliquée dans chaque ACM (Figure 4 et 5) est une variable notation de la verticilliose définie par la proportion totale de surface malade sur la parcelle. Ainsi, 3 classes de modalités ont été définies, z1, parcelle apparemment saine, z2, parcelle avec quelques ronds de verticilliose et z3, parcelle entièrement attaquée. Par exemple, sur la figure 3, la variable apport de potasse (K) semble varier dans le sens inverse (K prend les modalités croissantes Ka, Kb et Kc) de la progression de la maladie (variable z prenant successivement les valeurs z3, z2 et z1) dans un champ. Il en est de même pour les variables apport d'azote (N) et apport de phosphates (P). Ce qui signifie que plus les apports en N, P et K augmentent, plus on tend vers des zones défavorables au développement de la maladie. On peut définir deux groupes de parcelles « apparemment saines » et « malades » correspondant à des pratiques culturales différentes des agriculteurs. Le premier groupe comprend les agriculteurs qui apportent des quantités élevées d'azote (modalité Nd), de potassium (modalité Kc) et de phosphore (modalité Pc). Ces agriculteurs ont pu faire une irrigation de leur parcelle ou un drainage (Eau c), l'alimentation en eau n'est donc pas un problème sur ces parcelles. Ces pratiques culturales que l'on peut qualifier d'intensives, sembleraient être associées aux formes les moins graves de la maladie (z1). Ces parcelles probablement plus pauvres sont bien connues de l'exploitant qui compense ces difficultés en irriguant et en apportant des amendements plus élevés qu'ailleurs ce qui assure une meilleure végétation de la culture.

Sur les parcelles saines, les liniculteurs préfèrent enlever les pailles (Resb) plutôt que de les enfouir. Il peut y avoir un précédent hôte alternatif pour le champignon pathogène (Ha, Hc ou Hd) sans conséquences pour la culture de lin. Enfin on se trouve sur des zones où il y a des céréales mais où une diversification des rotations est maintenue. Au contraire, sur les parcelles infestées, les liniculteurs ne déchaument pas mais enfouissent les pailles (Resa). Il existe au moins un hôte pour l'espèce pathogène dans la succession des rotations (Hb) et il y a toujours beaucoup de céréales dans le précédent cultural (Cc).

Itinéraire et précédent, impact sur la gravité de la maladie

Dans la figure 5, parmi les variables testées, certaines comme la dose de semis (Ds) et le nombre de passages du tracteur (T), ne semblent pas intervenir pour expliquer les différences entre parcelle pour leur niveau de contamination par la verticilliose.

Par contre, les variables V, durée de végétation du lin, et S date de semis, sont associées à la présence de verticilliose dans les champs (variable z1, z2, z3 à proximité respectivement de Vc, Vb, Va et Sa, Sb, Sc). Ainsi, les linières semées tardivement les plus touchées par la maladie (mi-avril) ont probablement été récoltées plus tôt en raison d'un dessèchement accru des plantes. La verticilliose étant une maladie de fin de végétation, les agriculteurs prennent un risque supplémentaire en semant tardivement leur linière et en retardant de ce fait la végétation dont le développement final se fera dans les conditions de chaleur encore plus favorable à la verticilliose.

La profondeur du labour semble jouer un rôle sur le développement de la verticilliose (variables z1, z2, z3 à proximité respectivement de Plb, Plc et Pld). La plupart des parasites telluriques, se situent dans l'horizon 0-30cm du sol. Pratiquer un labour profond a plusieurs conséquences, entre autres il modifie la structure du sol qui peut être plus défavorable pour l'implantation du lin et son enracinement en provoquant un léger retard de végétation. Le mélange profond de la terre lors d'un labour permet de ramener à la surface des inoculum de *V. dahliae* et favorise aussi un réchauffement du sol et une reprise de l'activité microbienne en particulier des populations de parasites.

DISCUSSION- CONCLUSION

Le tableau II résume l'ensemble des pratiques culturales associées à la présence de verticilliose dans une parcelle. On peut définir deux groupes de parcelles selon le degré de gravité de la verticilliose associées à des pratiques culturales différentes des agriculteurs.

| linières avec peu ou pas de verticilliose | linières avec présence importante de verticilliose |
|--|---|
| - Zones moins sèches, drainées. | - Zone sèche, pas d'irrigation. |
| - Résidus enlevés. | - Résidus enfouis. |
| - Labour peu profond (<20 cm) | - Labour profond (>25 cm). |
| - Bien pourvues en éléments N, P, K. | - Apports N.P.K faibles voire nuls. |
| - Rotation diversifiée avec 4 à 5 céréales | - Beaucoup de céréales (7 à 8 sur 8 ans) |
| - présence de plantes hôtes dans la rotation sans conséquences pour le lin | - Au moins 1 culture de plantes hôtes dans la rotation. |
| - Semis précoce | - Semis tardif. |
| - Durée de végétation plus longue. | - Durée de végétation plus courte. |

Tableau II : Profils respectifs des parcelles en fonction de la gravité de la verticilliose détectée sur les linières. Field profiles according to disease severity.

Parmi l'ensemble de ces constatations, l'irrigation et l'enlèvement des pailles représentent probablement les deux éléments les plus importants dans l'enquête. En effet, on sait que la sécheresse est un facteur favorable à la maladie (Goud, 2003 et Schnathorst, 1981). L'enlèvement des pailles représente également un élément important, puisque lorsque des attaques sur un précédent cultural ont eu lieu que se soit sur une plante hôte comme la pomme de terre, ou sur le lin, le déchaumage empêche le maintien d'inoculum de *V. dahliae* dans le sol. Ceci expliquerait également pourquoi la présence d'un précédent hôte alternatif n'est pas toujours néfaste sur la culture de lin suivante. En effet lorsque les résidus de culture sont enlevés, il pourrait rester beaucoup moins d'inoculum pathogène dans le sol.

Des compléments d'approche avec des modèles plus précis que ceux définis ici notamment en intégrant le facteur climatique qui n'est pas complètement pris en compte, devrait permettre de proposer aux agriculteurs une grille de risque d'apparition de la verticilliose sur leur terre prenant en compte les pratiques agricoles et les propriétés physico-chimiques des sols (sol profonds argileux parfois à faible potentiel de rétention d'eau) afin de leur proposer un choix de variétés et de pratiques (mesures prophylactiques) adaptés à la culture du lin dans les zones à risque.

Une proposition de modification de l'itinéraire technique du lin pourrait être la suivante : en situation de risque de maladie, l'utilisation combinée de variétés moins sensibles telles que Loréa, Drakkar, Andréa (Figure 6), variétés de lin de printemps associées à des mesures prophylactiques adaptées : absence d'apport de poussière de lin sur les parcelles, arrachage précoce et déchaumage, permettraient de limiter la gravité de la verticilliose. En effet, l'arrachage précoce des cultures, en coupant l'alimentation de la plante devrait empêcher la montée du champignon pathogène depuis les racines jusqu'au sommet de la tige de lin et éviter l'apparition des microsclérotés responsable de la dépréciation de la fibre pendant le rouissage à terre (opération microbienne d'attaque du bois préalable à l'extraction de la fibre de lin). Le déchaumage sur le précédent céréale mais aussi pour toutes les cultures entrant dans la rotation avec le lin devrait diminuer considérablement les quantités d'inoculum contenues dans le sol. Des études sont actuellement en cours pour vérifier ces deux hypothèses.

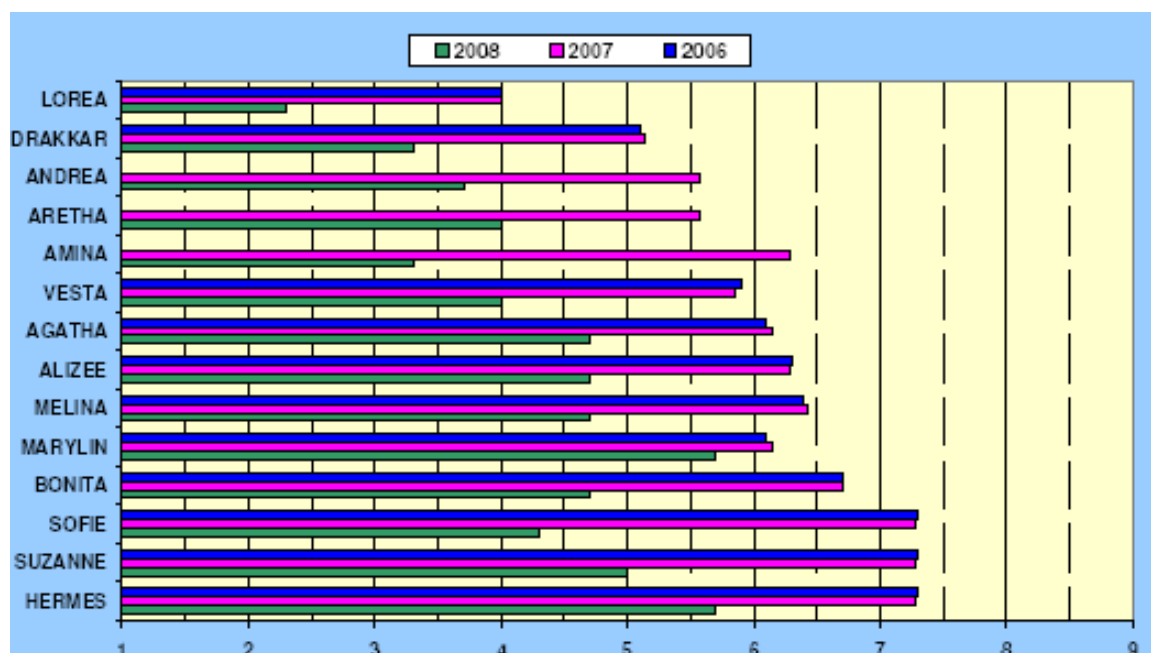


Figure 6 : Sensibilité des variétés de lin du catalogue européen pour la verticilliose au cours de 3 années d'étude de 2006 à 2008. Note 1 : très peu sensible à 9 : très sensible (d'après Thiébault, 2006 ; Bansard, 2007 ; Brochard, Communication personnelle). European Flax cultivar susceptibility to *Verticillium* wilt in field trials (2006 - 2008). Level 1: low sensitivity, level 9: high sensitivity.

En situation de fort risque, les variétés de lin d'hiver (exemple de Boréal, Violin) étant moins sensibles que les variétés de lin de printemps (note de sensibilité variant de 1 à 6 et de 1 à 4 respectivement, Brochard, Communication personnelle), l'utilisation d'une culture de lin d'hiver, moins productive comme alternative au lin de printemps, pourrait être une solution en association avec les mesures prophylactiques déjà décrites ci dessus.

BIBLIOGRAPHIE

- Bansard M. 2007. Etude de la sensibilité variétale du lin vis à vis de la verticilliose- Mémoire de fin d'études, Université de Reims, 50p.
- Cariou E, Foucher S., Verger S., Brygoo Y. et Raynal G. 2000. Analyse du complexe parasitaire responsable de la brûlure du lin. AFPP – 6^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des Plantes, Tour.
- Cariou. E. 2001. La brûlure du lin : étiologie, épidémiologie et stratégies de lutte. Thèse de l'AGRO PARISTECH, 101p.
- Gkilpathi D., 2002. Factors affecting the pathogenicity of *Verticillium Dahliae* to spring linseed. Phd Thesis, University of Nottingham, 151p.
- Goud J.C. 2003. *Verticillium* wilts in trees - Detection, prediction and disease management- Phd Thesis, Wageningen Universiteit, 163p.
- Schnathorst W.C. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*- *Fungal wilt disease of plants*, Academic Press New-York.
- Thiebaut R. 2006. Sensibilité variétale du lin à la verticilliose, Mémoire de fin d'études, ESA Angers, 34p.
- Volle M. 1989. Analyse des données, 3^{ème} édition, 323p.

**GESTION DURABLE DU RISQUE MILDIU DU TOURNESOL :
INFLUENCES DES FACTEURS AGRONOMIQUES ET DES CHOIX VARIÉTAUX SUR LE
DÉVELOPPEMENT QUANTITATIF ET QUALITATIF DE L'INOCULUM**

J. MOINARD ⁽¹⁾, E. MESTRIES ⁽²⁾, D. TOURVIEILLE DE LABROUHE ⁽³⁾, A. PENAUD ⁽²⁾,
P. WALSER ⁽³⁾, X. PINOCHET ⁽²⁾, et C. THIERY⁽⁴⁾, M. DORDOLO⁽⁴⁾, G. MARAGE⁽⁵⁾

- ⁽¹⁾ DRAAF-SRAL Midi-Pyrénées, Bd Armand Duportal, 31074 Toulouse Cedex, France
jacques.moinard@agriculture.gouv.fr
- ⁽²⁾ CETIOM, Centre de Grignon, avenue L. Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon, France
mestries@cetiom.fr ; penaud@cetiom.fr ; pinochet@cetiom.fr
- ⁽³⁾ INRA, Unité GDEC 1095, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France
tourvie@clermont.inra.fr ; walser@clermont.inra.fr
- ⁽⁴⁾ Montpellier SupAgro, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 02, France
- ⁽⁵⁾ Université de Reims, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 REIMS, France

RÉSUMÉ

Le contrôle de *Plasmopara halstedii*, agent responsable du mildiou du tournesol, est principalement basé sur une lutte génétique et chimique. L'apparition d'isolats résistants au traitement chimique, et de nouvelles races capables de contourner les résistances variétales, respectivement à la fin des années 1990 et début des années 2000, ont obligé les acteurs de la filière à envisager une gestion plus durable de la maladie, faisant appel notamment à des moyens de lutte agronomiques. Le bilan du travail réalisé de 2007 à 2009 dans le cadre de l'opération pilote « Mildiou du tournesol et gestion durable du risque à la parcelle », présenté ici, a permis de valider à l'échelle d'un bassin de production, les moyens propres à réduire le risque au niveau de la parcelle, en tenant compte des difficultés de mise en œuvre dans les conditions réelles de production.

Mots-clés : tournesol, *Plasmopara halstedii*, mildiou, résistance, gestion durable

SUMMARY

**SUSTAINABLE MANAGEMENT OF SUNFLOWER DOWNY MILDEW RISK :
INFLUENCES OF AGRONOMICAL FACTORS AND VARIETAL CHOICES ON THE
QUANTITATIVE AND QUALITATIVE DEVELOPMENT OF THE INOCULUM**

Plasmopara halstedii is the causal agent of the sunflower downy mildew. Its control is essentially based on the use of genetical and chemical tools. The appearance of strains resistant to the chemical treatment and new races able to overcome varietal resistances, respectively in the late 90s and the early 2000s, have required all the partners involved in the sunflower crop to look for a more sustainable management of this disease, using especially agronomical means. The assessment of a 3 years work (2007-2009) within the pilot plan "Sunflower downy mildew and sustainable management of the risk at the plot level" is presented hereafter. The specific agronomic tools involved in the reduction of the risk at the plot level have been checked at a production area scale. The difficulties in its application in real production conditions are taken into account.

Key words: sunflower, *Plasmopara halstedii*, mildew, resistance, sustainable management

INTRODUCTION

Le tournesol est la seconde culture oléagineuse en France derrière le colza, avec une production en 2008 de 1,6 millions de tonnes de graines pour une surface moyenne annuelle de 630 000 ha. Son essor a été menacé à plusieurs reprises par le mildiou depuis 1966, date de la première détection de ce pathogène dans la Drôme et le Vaucluse, et dernièrement en 2004 dans le Sud-Ouest. Cependant, depuis 2005, la maladie est bien contrôlée et les pertes de rendement à l'échelle nationale sont minimales.

Les dommages dépendent du type d'attaque : en cas d'attaque systémique, primaire ou secondaire précoce, ils sont directement liés à la perte de pieds ou à la présence de capitules stériles. Les surfaces fortement attaquées restent limitées en France. Les cas les plus graves, heureusement très ponctuels, peuvent entraîner jusqu'à 50 % de pertes de rendement, voire la perte totale de récolte. La nuisibilité des attaques plus tardives est moins évidente, les pertes étant estimées à 0,5 % du potentiel de rendement pour 1% de pieds touchés (Meliala *et al.*, 2000). Les contaminations aériennes à un stade de développement avancé n'ont aucune incidence sur le rendement, mais elles contribuent à augmenter le niveau d'inoculum du sol.

Classé par l'Union Européenne comme « organisme nuisible de quarantaine », *Plasmopara halstedii* est le parasite responsable de cette maladie. À ce titre, il est soumis à une réglementation stricte en matière de circulation et d'importation de semences de tournesol.

Il n'existe aucun moyen de lutter contre le mildiou une fois celui-ci exprimé dans une parcelle et aucun traitement chimique curatif n'est autorisé. Ce pathogène est très évolutif, particulièrement depuis le début des années 2000, et comporte de nombreuses races physiologiques. Son contrôle est basé principalement sur une lutte génétique et chimique, également réglementée sur le territoire national.

Les premiers hybrides résistants obtenus à partir de 1973 ont permis de résoudre le problème en culture, jusqu'à l'apparition à la fin des années 80 de races nouvelles capables de contourner les résistances variétales, puis des premiers isolats résistants au traitement chimique au milieu des années 90.

Dès 1990, cette situation a conduit le ministère chargé de l'agriculture (DGAL/SDQPV) à mettre en place un réseau de surveillance sur l'ensemble du territoire avec la mobilisation de tous les acteurs de la filière de production du tournesol. Depuis près de 20 ans, ce réseau s'est maintenu sans discontinuité et permet un suivi régulier de la situation du mildiou en France (Penaud *et al.*, 2003).

Une gestion durable de la maladie rendue nécessaire par son évolution et ses caractéristiques fait notamment appel à des moyens de lutte agronomiques visant à réduire le risque au niveau de la parcelle. Cependant, l'influence exacte sur l'inoculum des méthodes agronomiques habituellement préconisées sur la base d'études en milieu contrôlé, devait être évaluée en conditions réelles de production. Pour atteindre cet objectif, une opération pilote nommée « Mildiou du tournesol et gestion durable du risque à la parcelle (MOP) » a été mise en place en Midi-Pyrénées sur 3 campagnes successives de 2007 à 2009.

Le travail présenté dresse le bilan de cette étude qui fait partie intégrante du projet ADAR (2006-2008) sur la « Mise au point d'outils de biovigilance et de gestion durable des résistances variétales aux pathogènes » et qui a réuni le Service chargé de la Protection des Végétaux de Midi-Pyrénées, le CETIOM, l'INRA à Clermont-Ferrand, coopératives et agriculteurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Le travail réalisé de 2007 à 2009 a eu pour but l'étude de l'influence des facteurs agronomiques et des choix variétaux sur l'inoculum de *P. halstedii* et les risques de contaminations primaires en culture. Pour répondre à ces objectifs, l'opération pilote mildiou (MOP) s'est déclinée en deux démarches complémentaires :

1. recueil des informations sur les pratiques agronomiques et choix variétaux grâce à une enquête auprès des agriculteurs.
2. caractérisation des risques de contaminations primaires et de l'inoculum, assurée par deux méthodes :
 - **tests-terre** pour caractériser le potentiel infectieux du sol quantitativement (estimation du risque) et qualitativement (identification de la race ou du complexe de races) et palier l'absence éventuelle de maladie en culture
 - **suivi en végétation** au sein du bassin de production pour estimer la fréquence et l'intensité des attaques sur chaque parcelle, éventuellement complété en cas d'attaque par un **prélèvement de feuilles atteintes** pour déterminer les pathotypes présents (tests feuilles).

Les données recueillies sont mises en relation de manière descriptive et statistique, afin de répondre au but final du projet : apporter aux agriculteurs, sur la base de ce travail, un conseil sur les méthodes efficaces et réalistes pour limiter l'inoculum et les risques d'attaque.

MISE EN PLACE DE L'ÉTUDE

Choix du réseau parcellaire

L'opération pilote s'appuie sur la participation de 2 coopératives, Qualisol et Gersycoop (anciennement CAFA). Le réseau parcellaire choisi couvre 2 secteurs : le premier, situé dans le Tarn-et-Garonne près de Beaumont-de-Lomagne correspond au secteur de Qualisol ; le second se trouve dans le Gers près de Fleurance, et regroupe principalement les agriculteurs de Gersycoop.

Sur la période 2007-2009 le réseau comporte 225 parcelles appartenant à 47 agriculteurs. Trois critères principaux ont déterminé le choix des parcelles : le type de sol, la rotation et le passé mildiou des sites.

Enquêtes

Le recueil d'informations auprès des agriculteurs du bassin de production est réalisé à l'aide d'un questionnaire conçu pour évaluer *a priori* le risque mildiou sur chaque parcelle du réseau (Thiery, 2007). Une partie des informations demandées concerne l'exploitation, l'autre (itinéraires techniques) est propre à chaque parcelle suivie. En 2009, la partie concernant l'opinion et la vision des agriculteurs sur cette maladie a été approfondie. Elle a permis d'obtenir des éléments sur leurs connaissances en la matière et leurs capacités à modifier ou non leurs pratiques pour une gestion durable du risque.

CARACTÉRISATION DE L'INOCULUM

Suivi de l'expression du mildiou en végétation

- Suivi des parcelles

Chaque parcelle du réseau a fait l'objet d'une visite entre les stades « apparition du bouton floral » et « début floraison » afin d'y repérer les attaques de mildiou. Une codification des attaques de type GxFy (avec des valeurs comprises entre 0 et 4 pour x et y) est mise en œuvre, combinant le taux d'attaque général de la parcelle (G) et le taux d'attaque en foyer (F), avec l'échelle de notation suivante :

- 0 : absence de maladie

- 1 : moins de 3 % des pieds sont atteints
- 2 : entre 3 et 10 % (exclu) des pieds sont atteints
- 3 : entre 10 et 30 % (exclu) des pieds sont atteints
- 4 : 30% des pieds ou plus sont atteints.

- Tests feuilles

Un prélèvement d'une quinzaine de feuilles sporulées est effectué sur les parcelles où le taux d'attaque est au moins de 3 %. Les échantillons sont analysés en laboratoire pour la détermination sur gamme d'hôtes différentiels (Gulya *et al.*, 1991) des pathotypes en présence.

Tests-terre

- Protocole de prélèvement

90 parcelles ont été sélectionnées pour ces tests sur 3 ans. Les prélèvements sont effectués dans la zone de la parcelle supposée les plus à risque mildiou, dans l'horizon 2-8 cm correspondant au lit de semences. Chaque échantillon est constitué de 4 fois 1 litre de terre prélevé sur 4 placettes réparties aux 4 coins d'un carré de 5 m de côté.

- Analyses quantitatives

Les tests-terre (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008) consistent à reproduire en conditions contrôlées les conditions de réalisation des infections primaires, afin de permettre à l'inoculum présent dans l'échantillon de sol prélevé de s'exprimer sur une variété sensible à toutes les races de mildiou. Le taux d'attaque est obtenu par comptage des plantules sporulées.

- Analyses qualitatives

L'inoculum présent sur les cotylédons des plantes malades issues des tests-terre est récupéré par lessivage des cotylédons. La suspension de zoosporanges ainsi obtenue est passée sur une gamme d'hôtes différentiels en laboratoire pour la détermination des pathotypes présents.

MÉTHODE DE TRAITEMENT DES DONNÉES

Conditions climatiques lors des semis

Les variables précipitations et températures ont une influence déterminante sur le cycle d'infection de *P. halstedii* (Zimmer et Hoes, 1978 ; Kolte, 1985). Les données météorologiques sont donc relevées sur les stations proches de la zone d'étude et sont mises en relation avec les dates de semis des parcelles du réseau pour évaluer le risque climatique (analyse descriptive).

L'étude des cumuls de précipitations dans les 10 jours et 20 jours encadrant la date de semis permet de vérifier que les conditions climatiques sont réunies pour la réussite des attaques primaires de mildiou. C'est en effet dans ces 2 intervalles de temps que la pluviométrie est un facteur de risque pour le mildiou, surtout si celle-ci dépasse les 50 mm dans les 10 jours autour du semis (Délos *et al.*, 2000).

Mise en relation des données

- Facteurs et variables retenus pour les analyses statistiques

Après collecte des informations sur l'inoculum et sur les facteurs agronomiques, l'analyse statistique a permis de tester l'influence de ces facteurs agronomiques sur l'inoculum et les risques de contaminations primaires.

Ces analyses ont été faites sur les données recueillies pendant les 3 ans de l'étude, ces données ayant été obtenues de manière identique.

Les variables analysées concernant l'inoculum sont :

- fréquence et intensité des attaques en parcelles (suivi de végétation, effectif 225 parcelles - variable qualitative)
- potentiel infectieux du sol (tests-terre, effectif 90 parcelles - variable quantitative)
- races détectées (tests feuilles et terre - variable qualitative)

Les facteurs agronomiques retenus sont ceux qui, *a priori*, peuvent avoir la plus grande influence sur l'inoculum, et sont les mieux renseignés par les agriculteurs, de la manière la plus sûre et sans lacune sur la durée de l'étude :

- type de sol (2 classes : argilo-calcaire, argilo-limoneux + limoneux)
- travail du sol (2 classes : labour, non-labour)
- longueur de la rotation (2 classes : 1/2, 1/3 + >1/3)
- vitesse de ressuyage du sol (3 classes : lente, moyenne ou rapide).

- Tests statistiques et analyses factorielles

L'explication des attaques de mildiou grâce aux variables explicatives passe par la réalisation d'analyses statistiques (Thiery, 2007 ; Dordolo, 2008 ; Marage, 2009).

L'indépendance des variables explicatives entre elles est vérifiée à l'aide d'un test χ^2 .

Une AFCM (analyse factorielle des correspondances multiples) est effectuée pour tenter de dégager des tendances quant à l'influence des pratiques agronomiques sur l'inoculum. Les tendances perçues ont à leur tour été testées par test de χ^2 pour les variables qualitatives et par analyse de variance pour les variables quantitatives. Compte tenu de la sur-dispersion des données, un modèle linéaire généralisé (GLM) avec loi quasi-binomiale a dû être utilisé.

Influence de la succession d'un même profil de résistance variétal sur l'apparition des nouvelles races

Les successions des profils de résistances des variétés de tournesol implantées depuis 10 ans sur les parcelles du réseau (47 au total pour cette analyse) ont été étudiées pour examiner leur influence sur l'apparition de races nouvelles. Les variétés ont été classées en 2 groupes différant notamment par leur résistance ou leur sensibilité aux 2 races les plus fréquemment retrouvées dans la zone prospectée : la race « ancienne » 703 (présente dans le Sud-Ouest de la France depuis 20 ans) et la race « nouvelle » 304, (apparue dans la région en 2000).

L'hypothèse analysée est que la succession (dans le cadre de la rotation) de variétés résistantes à la race ancienne, mais sensibles à la nouvelle, favorise l'apparition et l'extension de la nouvelle race. Un test χ^2 est utilisé pour tester cette hypothèse (Dordolo, 2008 ; Marage, 2009).

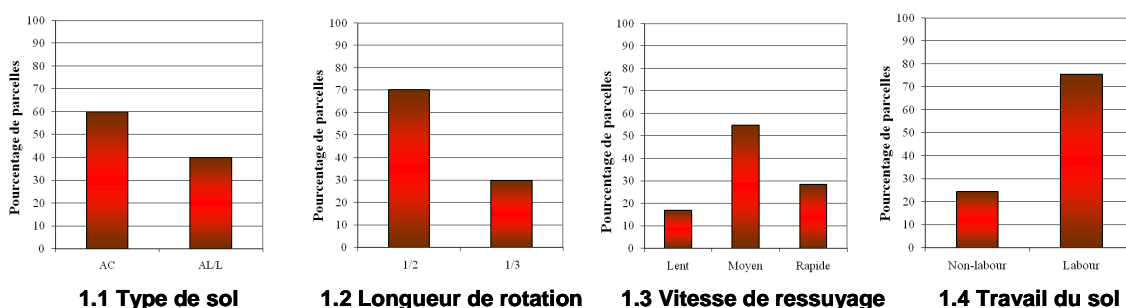
RÉSULTATS

CARACTÉRISATION DU RÉSEAU PARCELLAIRE ÉTUDIÉ

Les résultats 2007-2009 concernant la typologie de l'ensemble des parcelles pour les 4 facteurs agronomiques servant de variables explicatives sont présentés dans la **figure 1**.

Le type de sol majoritairement rencontré dans la zone d'étude est de type argilo-calcaire. Les rotations sont essentiellement courtes avec alternance tournesol/blé. Ces caractéristiques ont rendu difficile l'obtention d'un jeu de données équilibré malgré le souci de rééquilibrer l'échantillonnage d'année en année.

Figure 1 : Facteurs agronomiques des 225 parcelles du projet MOP (2007-2009)
Agronomical factors concerning the 225 plots of the MOP project (2007-2009)



CARACTÉRISATION DE L'INOCULUM

Suivi de l'expression du mildiou en végétation

- Suivi des parcelles

54 % des 225 parcelles n'ont présenté aucune attaque (fréquence moyenne d'attaque globale = 46 %). 12 % des parcelles ont subi des attaques significatives (x ou $y \geq 2$). 2 parcelles ont présenté des foyers à plus de 30 % (F4), 1 seule accompagnée d'une intensité globale >10 % (G3F4).

- Tests feuilles

Sur 19 parcelles analysées, la race 703 (ancienne) est présente sur 7 d'entre elles, les autres parcelles portent des races nouvelles (714, 304, 307 ou 707 non encore officiellement reconnue).

Tests-terre

- Analyses quantitatives (potentiel infectieux du sol)

Le taux de levée moyen sur les 3 ans est de 77,3 %. Au total, 10 % des terrines dépassent la barre des 30% d'attaque, avec un maximum de 66,8 %, alors que 32 % apparaissent saines. 22 % des terrines sont à moins de 5 % d'attaque, 22 % présentent un taux d'attaque entre 10 et 30 %.

- Analyses qualitatives (détermination des races présentes)

Les résultats des 61 tests-terre sur lesquels des isolats de mildiou ont pu être analysés sont assez homogènes sur l'ensemble de l'étude. La race 703 est la plus fréquemment détectée (50% des terrines analysées), mais la race 304 est également bien installée (détectée dans 44% des terrines). La race 704 (nouvelle) et les races "anciennes" 100, 700, 300 sont également présentes, mais de façon très ponctuelle. 30 % des tests révèlent la présence d'un complexe de 2 ou 3 races. Enfin, ce projet a permis la confirmation d'une nouvelle race (707) présente seule ou en mélange dans plus de 10 % des tests.

ANALYSES DES DONNÉES

Influence de la pluviométrie en période de semis

En 2007 il y a une assez bonne corrélation entre les parcelles touchées par le mildiou et un cumul de pluies supérieur à 50 mm dans les 20 jours encadrant les semis. Cette corrélation est moins évidente en 2008 et 2009, avec peu de parcelles touchées et des niveaux d'attaque très faibles.

Analyses statistiques : facteurs agronomiques et risque mildiou

Les résultats des tests d'indépendance des facteurs agronomiques révèlent deux dépendances significatives : la rotation et le labour d'une part, le type de sol et la vitesse de ressuyage d'autre part.

- Influence des facteurs agronomiques sur l'intensité des attaques en végétation

Une AFCM a été réalisée avec les variables « type de sol » et « longueur de rotation » (les deux autres variables étant dépendantes de celles-ci). Il ressort de cette analyse que les parcelles « attaquées » sont associées de manière plus fréquente au type de sol argilo-calcaire (AC) et aux rotations courtes (1/2) ; à l'inverse l'absence d'attaque serait plus en relation avec les sols argilo-limoneux/limoneux (AL/L) et les rotations longues (1/3) (**fig. 2**).

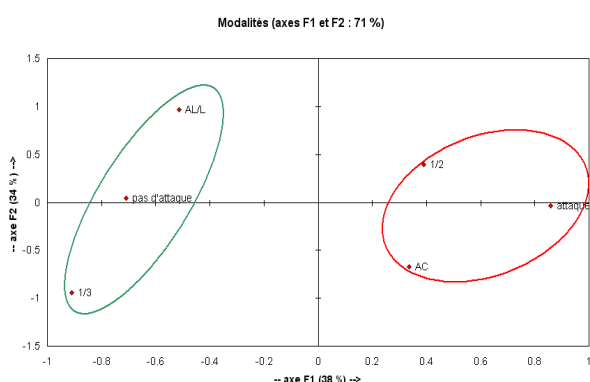


Fig. 2 : AFCM : influence des facteurs agronomiques sur l'intensité des attaques en végétation
AFCM : influence of agronomical factors on the intensity of attack on plants (field)

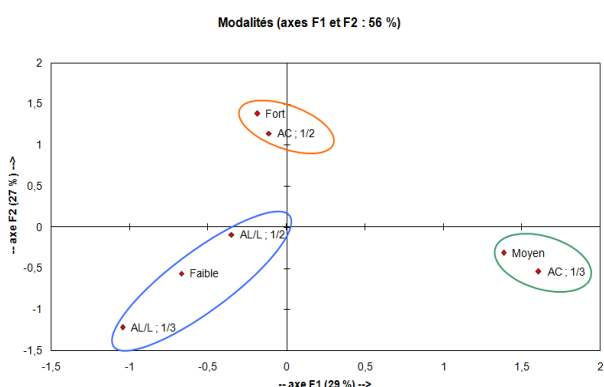


Fig. 3 : AFCM : influence des facteurs agronomiques sur les attaques en tests-terre
AFCM : influence of agronomical factors on the intensity of attack on plants (bioassay)

- Influence des facteurs agronomiques sur le niveau d'inoculum (tests-terre)

Les résultats de l'analyse GLM confirment que le type de sol et la longueur de rotation sont les 2 facteurs qui ont une influence significative sur la probabilité de subir une infection de mildiou en tests-terre.

Les sols argilo-calcaires seraient plus propices à la survie et à l'expression de l'inoculum, que les sols argilo-limoneux/limoneux (pourcentage d'attaque moyen de 13,3 % et 6,7 % respectivement). Le fait que la parcelle avec le plus haut taux d'attaque des tests-terre soit en sol argilo-limoneux/limoneux indique cependant que le type de sol n'est pas le seul facteur agronomique à jouer un rôle sur le taux d'attaque.

L'AFCM réalisée avec les facteurs ayant une influence démontrée sur le potentiel infectieux d'après l'analyse GLM, confirme ces résultats, avec 56 % de la variabilité du nuage de points expliqués par les deux axes principaux : les sols argilo-calcaires et les rotations courtes semblent associés aux taux d'attaques les plus importants, alors que les cultures sur sol argilo-limoneux/limoneux (rotations longues ou courtes) se regroupent avec les faibles attaques (**fig. 3**).

Résultats de l'étude sur le lien entre profils de résistance variétaux et apparition de nouvelles races

Le test χ^2 réalisé indique que l'apparition de nouvelles races dépend de manière significative de la répétition de variétés possédant un même profil de résistance. Les résultats statistiques révèlent que les parcelles où des variétés possédant le gène *P16* ou *P17* seul (donc résistantes aux races 703 et 710 mais sensibles à la race 304) ont été implantées de manière répétée sur les 10 dernières années, possèdent une probabilité plus importante de voir apparaître une nouvelle race que les parcelles où ces variétés alternent avec des variétés d'un autre type. La répétition d'un profil de résistance semble donc clairement favorable à l'apparition de nouvelles races. Les variétés résistantes à des races anciennes, dont la 703 prise comme référence dans cette étude car très répandue au niveau régional, semblent favoriser l'émergence de la race nouvelle 304, en exerçant une pression de sélection répétée sur l'inoculum de la parcelle.

DISCUSSION

Pour les 3 années de l'étude, les attaques en végétation ont été très rares et très peu intenses sur les parcelles suivies puisque 88% des parcelles ne présentaient aucun symptôme ou moins de 3 % de plantes attaquées. C'est certainement ce qui explique l'absence de résultats significatifs avec cette variable. Le manque de dégâts provoqués par le mildiou s'explique principalement par le **facteur variétal**. Les variétés implantées sont résistantes aux races dites « anciennes » : 100, 703 et 710, et un très grand nombre sont également résistantes à la race 304 (race la plus fréquente avec la 703). Ainsi, ces variétés n'ont pas permis l'expression des races dominantes sur le bassin de production étudié.

Bien que d'autres facteurs puissent également expliquer l'absence de maladie sur certaines parcelles comme la pluviométrie limitante et le traitement de semences, le filtre variétal est le facteur principal de cette quasi absence de symptômes.

La réalisation des tests-terre a permis de s'affranchir du filtre des résistances variétales et de mettre en relation les différents facteurs agronomiques avec les variables étudiées. Les influences de la rotation et du type de sol ont été mises en évidence grâce à ces tests-terre. Lourds à mettre en œuvre, ils n'ont pu être réalisés que sur 90 parcelles.

Parmi les facteurs agronomiques, les **rotations** courtes (type "tournesol/blé", avec quatre ou cinq tournesols sur 10 ans) sont plus favorables au maintien de l'inoculum que les rotations longues (3 tournesols ou moins en 10 ans). Cependant l'inoculum reste toujours présent puisqu'il peut se conserver de 6 à 10 ans dans le sol (Cohen et Stackson, 1974).

Les **sols** argilo-calcaires apparaissent plus favorables à la conservation du parasite en comparaison des sols à tendance limoneuse. Bien que les raisons exactes de ce phénomène ne soient pas connues, au moins une hypothèse peut être émise : les sols limoneux qui possèdent une capacité de ressuyage plus lente sont de ce fait soumis à une présence d'eau prolongée après les périodes de pluie, ce qui pourrait accélérer l'épuisement de l'inoculum. Au contraire, les sols argilo-calcaires à tendance filtrante de cette région ont une capacité de ressuyage plus rapide, la durée d'eau libre dans le sol est donc beaucoup plus courte et l'épuisement de l'inoculum moins rapide.

Bien que l'analyse des profils variétaux ait mis en évidence une **influence de la répétition d'un profil variétal identique sur l'apparition de races nouvelles**, cette conclusion est à prendre avec prudence. Le faible effectif des parcelles incorporées dans l'analyse (47) ne permet pas de tirer de conclusion définitive. Cependant, ces résultats vont dans le sens de l'étude réalisée en 2004 en conditions contrôlées sous tunnel (Tourvieille *et al.*, 2004) qui mettait en évidence l'apparition de nouvelles races au bout de quatre années seulement de monoculture avec des variétés aux profils de résistance identiques (gènes *P16* et/ou *P17*) ; en revanche, comparée à la monoculture d'un même profil ou au pyramidage des gènes de résistance, la stratégie d'alternance des gènes de résistance utilisés permet de limiter significativement les attaques à long terme et la sélection de races dites nouvelles. L'intérêt d'une telle stratégie réside dans le fait que les isolats sélectionnés une année sont confrontés à une nouvelle source de résistance au cycle suivant.

CONCLUSION

Au cours de ces 3 années d'étude, les attaques de mildiou en culture ont été assez rares et faibles grâce au contrôle variétal. Cependant le mildiou est bien présent dans les sols du bassin de production retenu pour cette étude.

Les tests-terre ont permis d'établir des relations entre la quantité d'inoculum primaire et certaines caractéristiques agronomiques des parcelles (rotation et type de sol).

Les races détectées majoritairement sur le réseau parcellaire sont les races 703 "ancienne" et 304 "nouvelle", bien installées dans la région.. L'installation de races nouvelles semble liée à l'utilisation répétée sur une même parcelle de variétés à même profil de résistance spécifique. Ce résultat obtenu en conditions réelles de culture est cohérent avec les travaux en parcelles expérimentales (Tourvieille *et al.*, 2004).

Si la maladie semble aujourd'hui bien maîtrisée grâce à la génétique et au traitement de semences, le risque reste toujours présent. L'efficacité de ces méthodes de lutte est précaire : moins de dix ans pour un gène de résistance spécifique, environ 5 ans pour le traitement de semences (Tourvieille, 2004). Le potentiel infectieux élevé de certaines parcelles en témoigne de même que l'apparition d'une nouvelle race 707 et d'isolats de races récentes résistantes au méfénoxam (SPV-CETIOM-INRA, 2009). Ces méthodes doivent donc être utilisées de manière raisonnée.

L'impact des facteurs agronomiques sur le risque mildiou, confirmé par cette étude en condition réelle de production, nous permet de proposer un modèle de gestion durable de risque à la parcelle (**tableau I**). Celui-ci reste à discuter et à valider avec l'ensemble des acteurs de la filière afin de pouvoir évaluer à terme son aspect opérationnel et son efficacité.

La gestion durable du risque mildiou nécessite l'implication de tous les acteurs pour assurer la pérennité de la culture de tournesol. L'importance des coopératives dans le relais des informations et des conseils auprès des agriculteurs apparaît ici capitale.

| Type de sol (maintien de l'inoculum) | Conseil (impact) | Pratique agriculteur | Conseil (impact) | Pratique agriculteur | Conseil (impact) | Pratique agriculteur | Risque final |
|--|---|---|--|---|--|---|--------------|
| | Allonger les rotations <i>1-diminuer le risque 2- éviter l'évolution des races</i> | Rotation | Alterner les profils de résistance variétale <i>1-éviter l'évolution des races 2-diminuer le risque</i> | Succession variétale | Destruction des repousses et des adventices <i>diminuer le risque</i> | Destruction des repousses et des adventices | |
| Argilo-calcaire (très favorable) | ++++ | 1/2 - AFCM : risque fort - augmentation de l'inoculum - augmentation du risque d'évolution des races | ++++ | Même profil de résistance <i>(augmentation du risque d'évolution des races)</i> | +++ | Non | Risque fort |
| | | | | Alterne les profils de résistance <i>(réduction du risque d'évolution des races)</i> | | Oui | Risque fort |
| | | ≥ 1/3 - AFCM : risque moyen - diminution de l'inoculum - réduction du risque d'évolution des races | ++ | Même profil de résistance | ++ | Non | Risque fort |
| | | | | Alterne les profils de résistance | | Oui | Risque fort |
| Argilo-limoneux / limoneux (peu favorable) | ++ | 1/2 - AFCM : risque faible - augmentation de l'inoculum - augmentation du risque d'évolution des races | ++++ | Même profil de résistance | ++ | Non | Risque fort |
| | | | | Alterne les profils de résistance | | Oui | Risque fort |
| | | ≥ 1/3 - AFCM : risque très faible - Diminution de l'inoculum | ++ | Même profil de résistance | + | Non | Risque fort |
| | | | | Alterne les profils de résistance | | Oui | Risque fort |

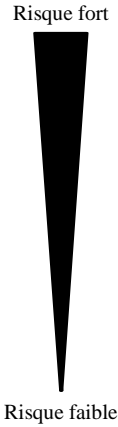


Tableau I : Modèle d'outil de gestion durable du risque mildiou à la parcelle
Proposed model of a sustainable management tool of the risk at the plot level

Italique : caractérisation du risque (maintien de l'inoculum pour le type de sol et impact pour le conseil)
 +, ..., +++++ : niveau d'importance de la mise en œuvre du conseil par l'agriculteur
 Le code couleur du risque final identifie les pratiques allant d'un risque fort (rouge) à un risque très faible (vert)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le CAS-ADAR (2006-2008), dans le cadre du projet n°391 "Mise au point d'outils de biovigilance et de gestion durable des résistances variétales aux pathogènes". Nous remercions l'ensemble des acteurs professionnels qui ont contribué, grâce à leur participation active, à la réussite de cette étude, et tout particulièrement les agriculteurs et techniciens des coopératives Qualisol et Gersycoop (anciennement CAFA).

BIBLIOGRAPHIE

- Cohen Y. et Sackston W.E., 1974 – Seed infection and latent infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany*, 52, 231-238
- Délos M., Eychenne N. et Fabry C., 2000 – Etude des facteurs expliquant les fluctuations des attaques de *Plasmopara halstedii* en France. In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse (France)*, I, 43-48
- Dordolo M., 2008 – Mildiou du tournesol et gestion durable du risque à la parcelle – Influences des facteurs agronomiques et des choix variétaux sur l'inoculum et les risques de contaminations primaires. *Mémoire de stage présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, spécialisation Inter-agro protection des plantes et environnement, Montpellier SupAgro, soutenu le 24 septembre 2008 à Montpellier*
- Gulya T.J., Miler J.F., Firanyi F. et Sackston W.E., 1991 – Proposed internationally standardized method for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14, 11-20
- Kolte S.J., 1985 – Diseases of annual edible oilseed crops. *Sunflower, safflower and nigerseed diseases, Boca Raton, USA*, 3
- Marage G., 2009 – Mildiou du tournesol et gestion durable du risque à la parcelle – Influences des facteurs agronomiques et des choix variétaux sur l'inoculum et les risques de contaminations primaires. *Mémoire de stage présenté pour l'obtention du diplôme de master P : Amélioration et production des agroressources, Université de Reims Champagne-Ardenne, soutenu le 28 septembre 2009 à Reims*
- Meliala C., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., 2000 – Secondary infection of sunflower downy mildew : symptomatology, epidemiology and its economic risks. In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse (France), 12-15 June*, vol II, 73-78
- Penaud A., Moinard J., Molinero-Demilly V., Pauchet I., Bataillon C. et Tourvieille de Labrouhe D., 2003 – Evolution du mildiou du tournesol en France : le point sur les dernières données du réseau de surveillance. *AFPP – 7^{ème} conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours (France) 3-4-5 décembre 2003*
- SPV-CETIOM-INRA, 2009 - Mildiou du Tournesol (*Plasmopara halstedii*). *Note Commune 2009*.
- Thiery C., 2007 – Mildiou du tournesol et gestion durable du risque à la parcelle – Influences des facteurs agronomiques et des choix variétaux sur l'inoculum et les risques de contaminations primaires. *Mémoire de stage présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, spécialisation Protection des plantes et environnement, ENSA Montpellier, soutenu le 26 septembre 2007 à Paris*
- Tourvieille de Labrouhe D., 2004 – El mildiu del girasol, manejar el control en pos de una eficacia durable. In: *Proceedings of the Segundo Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires (Argentina)*, 63-70
- Tourvieille de Labrouhe D., Walser P., Mestries E., Gillot L., Penaud A., Tardin M.C. et Pauchet I., 2004 – Sunflower downy mildew resistance gene pyramiding, alternation and mixture : first results comparing the effects of different varietal structures on changes in the pathogen. In: *Proceedings of the 16th International Sunflower Conference, Fargo (USA), 29 août-2 septembre*, 1, 111-116
- Tourvieille de Labrouhe D., Penaud A., Walser P., Mestries E., Moinard J., Serre F., Thiery C., Garric B., Delmotte F., Pinochet X., 2008 - Determining the « sunflower downy mildew » risk by soil analysis. In: *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference, Córdoba (Spain), 8-12 June*, 1, 169-174
- Zimmer D.E. et Hoes J.A., 1978. Diseases. *Sunflower science and technology* (Ed. by Carter, J.F.), 225-262. *American Society of Agronomy, Madison (USA)*

COMPARISON OF ARTIFICIAL INOCULATION WITH *PHOMA MACDONALDII* TO
REPRODUCE SUNFLOWER PREMATURE RIPENING

C. SEASSAU¹, P. DEBAEKE², E. MESTRIES³ and G. DECHAMP-GUILLAUME⁴

⁽¹⁾ INRA, UMR AGIR, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
celia.seassau@toulouse.inra.fr

⁽²⁾ INRA, UMR AGIR, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
philippe.debaeke@toulouse.inra.fr

⁽³⁾ CETIOM, ENSAT, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France, mestries@cetiom.fr

⁽⁴⁾ ENSAT, INPT, UMR AGIR, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
dechamp@ensat.fr

SUMMARY

Three inoculation methods were evaluated to reproduce sunflower premature ripening (PR) and determine the type of inoculum leading successfully to plant death. Evaluations were conducted on a susceptible cultivar to PR in replicated, multilocal experiments under greenhouse conditions. Plants were artificially inoculated either with *Phoma macdonaldii* mycelium, pycniospore, residues at the stem base or buried residues. Inoculation with mycelium and 1×10^6 spores/ml caused significantly more PR than lower spore concentrations and infected residues ($P < 0.05$). Amending soil with residues induced root necrosis but no PR. *P. macdonaldii* was mainly isolated at the stem base and above but rarely on root systems. The overall results demonstrate a clear role of aerial infection in PR compared with soilborne inoculum and inoculation at the stem base with spore suspension could be used for screening genotypes with high levels of partial resistance to PR.

Key words: *Leptosphaeria lindquistii*, *Helianthus annuus* L., disease assessment, inoculation methods, greenhouse

RÉSUMÉ

Trois méthodes de contamination ont été évaluées pour reproduire le dessèchement précoce du tournesol (RP) et déterminer le type d'inoculum qui conduit à la mort de la plante. Les évaluations, faites sur une variété sensible au PR, ont été répétées en serre sur plusieurs sites. Les plantes ont été inoculées artificiellement avec du *Phoma macdonaldii*, soit par du mycélium, des pycniospores, des résidus à la base de la tige ou des résidus enfouis. L'inoculation par le mycélium et 1×10^6 spores/ml ont causé beaucoup plus de PR qu'avec de plus faibles concentrations en spores ou des résidus infectés ($P < 0,05$). L'enfouissement des résidus a induit des nécroses racinaires, mais pas de PR. *P. macdonaldii* a été principalement isolé à la base de la tige et au-dessus mais rarement au niveau racinaire. L'ensemble des résultats démontre l'importance des contaminations aériennes dans le PR comparé à un inoculum racinaire. La contamination à la base de la tige par une suspension de spores pourrait être utilisée pour la sélection de génotypes résistant au PR.

Mots-clés : *Leptosphaeria lindquistii*, *Helianthus annuus* L., évaluation de la maladie, méthodes d'inoculation, serre.

INTRODUCTION

Sunflower premature ripening (PR) is regarded as one of the most widespread and detrimental diseases in sunflower production. *Phoma macdonaldii* Boerema (teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) has been reported as the causal agent of sunflower PR (gulya et al., 1984). Sackston (1950) first described a wilt and stalk rot of unknown etiology as “premature ripening” (PR), and earlier evidence showed that stem base girdling canker caused by *P. macdonaldii* was its primary cause. Before PR, crops show loss of vigour from mid- to late summer, leaves become wilted and necrotic, the stalk turns dark brown to black, and this is followed by senescence and plant death a few weeks before physiological maturity (Donald et al., 1987).

Sunflower residues have long been regarded as the major source of primary inoculum in *P. macdonaldii* epidemics. Primary inoculum originates from overwintering fungal structures (perithecia, pycnidia and mycelia) in crop debris. Inoculations by infected buried residues should result in less *P. macdonaldii* attacks than residues left at the soil surface (Pérès et Poisson, 2000). Although spore infections were reported to be pathogenic (Pérès et Le Sourné, 2000; Pérès et Poisson, 2000), but uncertainty remains about the relative importance of pycniospores, ascospores and mycelium in causing sunflower PR.

Donald et al. (1987) first observed that the root systems of the girdled plants were poorly developed, necrotic. Conversely, Pérès and Poisson (2000) showed that roots of girdled plants were well developed. This reopens the controversy about PR origin as the result of root system attacks (soilborne) or the consequence of stem base infection (aerial). Actually, it remains unclear whether PR is due to direct root infection, to basal stem infection progressing towards the roots, or to basal stem girdling inhibiting nutrient transport into the roots and thus starving the roots to death.

Recent investigations showed that crop management can significantly influence the incidence of *P. macdonaldii* attacks and PR such as additional nitrogen and limited water supply after anthesis (Seassau et al. unpublished). Taking account of these agronomic factors promoting the disease, the first objective of this study was to assess the efficacy of artificial inoculation methods (from infected residues, mycelium or pycniospores) in reproducing PR on a cultivar susceptible to *P. macdonaldii* under controlled environment. The second objective was to better understand the origin of PR and determine if it comes from an initial root system infection then a spread of the pathogen into the stem, or directly from stem base girdling followed by plant wilting and death.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design and crop management systems

Four greenhouse experiments were conducted: at INRA Station in Auzeville in 2007 (Auz-07) and 2008 (Auz-08) (Haute-Garonne, France), at CETIOM station in En-Crambade (Haute-Garonne, France) in 2007 (EC-07) and at Grignon station (Yvelines, France) in 2008 (Gri-08). Seeds of cv. Heliasol RM had been described as susceptible to *P. macdonaldii* and premature ripening by previous variety assessment in field conditions. Four seeds were sown into 15 liters pots filled with a mixture of 50 % clay to silty-clay soil uncultivated for more than 30 years, 40 % potting compost and 10 % sand in Auzeville and Grignon sites, and into 12 liters pots filled with 60 % potting compost and 40 % sand in En-Crambade.

In the greenhouse of Auzeville and Grignon, photoperiod, temperature and air humidity were regulated while in En-Crambade the experiment was carried out in a hoop tunnel. Mineral fertilization was supplied by three applications of NPK solution (50 kg N, 20 kg P, 20 kg K /ha) until star bud stage. Plants were irrigated daily to fulfill the plant water requirements until flowering. Then, water irrigation amounts were reduced and the fraction of transpirable soil water was kept between 30 and 50 %.

Fungal isolates

One single *P. macdonaldii* monopycniospore (MPH2) strain was used in this study, selected for its severe aggressiveness. The strain was isolated from an infected sunflower stem base residue exhibiting severe black stem lesions which was collected near Auzeville. The strain was performed according to the protocol of Roustae et al. (2000) and stored at - 80 °C with Glycerol (V/V, Becton Dickinson and Company).

Inoculum

Residues. Residues were collected from field located close to the experimental site. Before inoculation, stalk residues were slit and pith was removed; the material was chosen according to the density of *P. macdonaldii* pycnidia and to the visual absence of any other fungus.

Mycelium. Mycelium production was derived from the frozen suspension of pycniospore MPH2 at 10^6 spores/ml conserved with Glycerol. Inoculum was plated on Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) (Difco) (39 g/liter of PDA, 150 mg/liter of streptomycin, pH 6) and grown at 25 °C for 10 days in the dark.

Spores. A drop of MPH2 suspension was incubated on PDA at 25 °C alternating 12 h light and dark cycles for 15 days to induce pycnidia. Spores were harvested and the concentration of pycniospores in suspension was determined using a hemacytometer and adjusted with sterile, DI water to 1×10^6 spores/ml.

Infected residues and mycelium inoculum experiment.

Three experiments were carried out to evaluate the relative importance of infected residues and mycelium on PR incidence. Inoculation methods were: (i) a 6 mm diameter disk of PDA with *P. macdonaldii* mycelium was placed at the stem base and drying of the disk was avoided by applying a moist cotton wool plug covered with aluminum foil around the stem base, (ii) ten fragments of stalk sunflower residues of 10 to 15 cm long infected with *P. macdonaldii* were buried per pot, and (iii) ten fragments of stalk sunflower residues of 10 to 15 cm long infected were left at the soil surface per pot. In Gri-08, the three methods were tested on cv. Heliasol RM. In Auz-07 and EC-07, inoculation methods (i) and (ii) were tested except that in method (ii), some fragments of residues were remaining at the soil surface. In Gri-08, residues remaining at the soil surface were water-sprayed twice a week to maintain the moisture required for spore emission. The burial of residues in method (ii) was prior planting. Stem base inoculation with a disc of mycelium (i) as well as disposal of residues at the soil surface (iii) were achieved at star bud stage. The disc of mycelium was left for seven days and residues remained throughout the experiment.

The experimental lay-out was a randomized complete block design in three blocks in Auz-07 and Gri-08 and four blocks design in EC-07. Eight plants (Auz-07, Gri-08) and 20 plants (EC-07) per block were evaluated for each inoculation method and disease-free treatment (control).

Pycniospores dose-response experiment

To determine the amount and type of inoculum required for maximizing disease incidence and premature ripening, four concentrations of pycniospores in suspension were evaluated in comparison with a mycelium inoculation in Auz-08. The experiment was a randomized complete block design in four blocks. Eight plants per block were evaluated for each inoculation method and disease-free treatment (control). The methods used were: (i) a 6 mm diameter disk of PDA with MPH2 mycelium placed at the stem base and (ii) pipetting 70 µl of pycniospores suspension on a 6 mm-diameter disc of cellulose sterilized applied at plant stem base with Parafilm®M. Four pycniospore concentrations at 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 and 1×10^6 spores/ml were prepared fresh before inoculation. Control plants received a disc of 70 µl of sterile DI water fixed at plant stem base with Parafilm®M. Plants were inoculated at star bud stage with mycelium or pycniospore

suspension. The discs of mycelium or of monopycniospores were kept at the stem base for seven days.

Isolation

Sunflowers infected with buried residues and mycelium in Auz-07 and EC-07 were dissected as plant died and isolations of *P. macdonaldii* were performed on a sample of plants. Small sections of the plant were removed at the stem base, stem level (4 to 5 cm above stem base necrosis) and root level. Tissues were laid onto PDA medium and incubated for 10 days at 25°C under alternating periods of illumination and darkness to induce sporulation.

Disease assessment and data analyses

The development of necrotic areas at the stem base induced by *P. macdonaldii* inoculation was assessed steadily using a visual 0-3 scale: 0 = healthy plant, 1 = less than $\frac{3}{4}$ of the stem base circumference black, 2 = spots girdling the stem base, 3 = all leaves wilted and plant completely dry. Disease severity (DS) was the percent of plants with Phoma girdling necrosis at the stem base of the plant (scale 2) and premature ripening (PR) was the percent of plants completely dry before physiological maturity with lesions girdling the stem base (scale 3). In infected residues and mycelium inoculum experiment, the assessment was made weekly from inoculation at the stem base up to 83 days post inoculation (DPI). In pycniospores dose-response experiment, eight recordings were taken up to 78 DPI. DS and PR were assessed by the area under disease progress curve (AUDPC) (Campbell and Madden, 1990).

The independent variables AUDPC_{DS}, AUDPC_{PR}, DS and the final percent of PR plants were analyzed with analyses of variance via the General Linear Model procedure of Statgraphics Plus 5.1 statistical software (Rockville, MA, USA) with replicate as a random variable. For each analysis of variance, homoscedasticity by Levene's test (confidence level of 0.95) and the normality of the residuals by the Shapiro-Wilks test (confidence level of 0.95) was tested. Prior to ANOVA, square-root transformations were carried out to AUDPC_{DS} and AUDPC_{PR}, and arcsine transformations were applied to the final percent of DS and PR of pycniospores in infected residues and mycelium inoculum experiment. Where the *F* ratio was significant ($P < 0.05$), differences among treatment means were determined using protected least significant differences (LSD). Data were also analyzed separately by year and site.

RESULTS

Infected residues and mycelium inoculation

Disease symptoms at the stem base became apparent 7 days after artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium disc and all plants presented necrosis. Upwardly expanding necrotic lesions above the leading edge of the infection extended as much as 15 cm on the stem above the surface. Plants grown with *P. macdonaldii* infected residues did not exhibit consistently stem base and root symptoms. Artificial inoculation with buried residues and a few fragments left at the soil surface in Auz-07 and EC-07 induced 52 % and 3.3 % of black lesions at the stem base respectively. In Gri-08 experiment, plants grown with infected buried residues presented 8.3 % of stem base necrosis whereas inoculation with residues left at the soil surface induced 78.3 % of stem base symptoms. Some root plants inoculated with buried residues presented black bulges and necrosis through contact with infected residues. In the three experimental sites, AUDPC_{DS} and final DS based on the percent of plants with Phoma girdling necrosis at the stem base was highly contrasted according to inoculation methods. Inoculation with *P. macdonaldii* mycelium significantly ($P < 0.0001$) affected AUDPC_{DS} and DS. Plants inoculated with residues left at the soil surface in Gri-08 had significant ($P < 0.0001$) higher AUDPC_{DS} and DS than plants inoculated with buried residues in the three experiment sites (Table I).

Table I. AUDPC_{DS}, final percent of girdling necrosis (Final DS), AUDPC_{PR} and final percent of premature ripened (final PR) of cv. Heliasol RM following artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium at stem base at early bud stage; residues buried (SB) before sawing in Auzeville, En-Crambade and Grignon; residues left at soil surface at early bud stage (Gri-08); or non-inoculated plants (Control).

(AUDPC_{DS}, Pourcentage final de nécrose encercclantes (final DS), AUDPC_{PR} et pourcentage final de PR (final PR) pour cv. Heliasol RM après contamination artificielle avec du mycélium de *P. macdonaldii* à la base de la tige au stade bouton étoilé; résidus enfouis à Auzeville, En-Crambade et Grignon, des résidus laissés à la surface du sol au stade bouton étoilé, (Gri-08), ou les plantes non inoculées (Control)).

| Inoculation method | AUDPC _{DS} ^{x,z} | Final DS (%) ^{y,z} | AUDPC _{PR} ^{x,z} | Final PR (%) ^{y,z} |
|--|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Auzeville (Auz-07) | | | | |
| Mycelium | 64.15 a | 96.3 a | 24.04 a | 64.0 a |
| Residues buried and a few left at soil surface | 3.17 b | 16.7 b | 0.27 b | 4.0 c |
| Control | 0 b | 0 b | 0 b | 0 c |
| En-Crambade (EC-07) | | | | |
| Mycelium | 45.18 a | 96.7 a | 1.49 a | 32.2 b |
| Residues buried and a few left at soil surface | 0.16 b | 1.7 b | 0 a | 0 c |
| Control | 0 b | 0 b | 0 a | 0 c |
| Grignon (Gri-08) | | | | |
| Mycelium | 57.00 a | 82.7 a | 2.49 a | 82.6 a |
| Residues left at soil surface | 6.59 b | 35.1 b | 0.91 b | 30.4 b |
| Residues Buried | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c |
| Control | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c |

^x AUDPC was calculated according to Campbell and Madden (1990) up to 83 days post inoculation. Disease severity (DS) is based on the percentage of plants with Phoma necrosis girdling stem base and premature ripening (PR) is based on the percent of plants dry before physiological maturity.

^y The final DS and PR was taken 83 days from the start of epidemic

^z Within each column. mean values followed by different letters in a column are significantly different from one another based on LSD. _{0.05}.

These differences between inoculation methods were observed also for AUDPC_{PR} and the final PR percent variables. Inoculation with mycelium at the stem base significantly ($P < 0.0001$) induced the highest AUDPC_{PR} and final PR, followed by inoculation methods with infected residues left at the soil surface (Gri-08) and buried residues in Auz-07. Plants with buried residues in EC-07 were lightly infected by Phoma necrosis, and remained symptomless in Gri-08 and non-inoculated plants. All PR plants showed encircling stem base necrosis and Pearson's correlation coefficient for the percent of plants with Phoma necrosis girdling stem base and PR at 83 DPI was $r = 0.967$ (Auz-07), $r = 0.887$ (EC-07) and $r = 0.994$ (Gri-08).

In Auz-07 and EC-07, samples of plants inoculated with *P. macdonaldii* mycelium, buried residues and non-inoculated plants were used for pathogen isolation. Mycelium inoculation induced the highest plant mortality while plants inoculated with buried residues presented stem base necrosis or not. *P. macdonaldii* was highly isolated at the leading edge of the infection and into the stem when plants inoculated presented stem base necrosis Table II.

Table II. Plant mortality and isolation of *P. macdonaldii* from sunflower cv. Heliasol RM following artificial inoculation with *P. macdonaldii* mycelium at stem base at early bud stage. infested residues buried and a few left at soil surface before sawing presenting stem base necrosis or not; or non-inoculated plants (Control) in Auzeville (Auz-07) and En-Crambade (EC-07).

(Mortalité des plantes (PR) et l'isolement de *P. macdonaldii* P. sur cv. Heliasol RM après contamination artificielle avec du mycélium de *P. macdonaldii* à la base des tiges au stade bourgeon étoilé, des résidus infestés enfouis à la surface du sol avec ou sans présence de nécrose au bas de tige, et plantes non contaminées (Control) à Auzeville et En-Crambade)

| Inoculation methods | Plant mortality | Isolation from plants - Auzeville ^a | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|--|--------|-------|-------------------|--------|------|------|-----------|--------|
| | | stem base ^b | | | Stem ^c | | | Root | | |
| | | Epiderm | Cortex | Pith | Epiderm | Cortex | Pith | Hair | Rhizoderm | Cortex |
| Auzeville (Auz-07) | | | | | | | | | | |
| Mycelium | 6/8 | 8/8 | 7/8 | 4/8 | 7/8 | 3/8 | 2/8 | 0/8 | 0/8 | 1/8 |
| Residues buried (total) | 1/8 | 2/8 | 2/8 | 2/8 | 2/8 | 1/8 | 1/8 | 2/8 | 2/8 | 2/8 |
| Plants with stem base necrosis | 1/4 | 2/4 | 2/4 | 2/4 | 2/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| Plants without stem base necrosis | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| Control | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 |
| En-Crambade (EC-07) | | | | | | | | | | |
| Mycelium | 17/27 | 25/27 | 2/2 | 16/27 | - | - | - | 8/27 | - | - |
| Residues buried (total) | 0/15 | 5/15 | - | 0/15 | - | - | - | 1/15 | - | - |
| Plants with stem base necrosis | 0/2 | 2/2 | - | 0/2 | - | - | - | 0/2 | - | - |
| Plants without stem base necrosis | 0/13 | 3/13 | - | 0/13 | - | - | - | 1/13 | - | - |
| Control | 0/3 | 0/3 | - | 0/3 | - | - | - | 0/3 | - | - |

^a Values are the number of plants from which *P. macdonaldii* was recorded out of the total number of plants sampled.

^b At the leading edge of the infection

^c At 4 to 5 cm above stem base necrosis

The presence of the pathogen was mainly observed on superficial tissues (epiderm and cortex) of the stem base and above. Conversely, *P. macdonaldii* was seldom isolated from hair roots, rhizoderm and cortex roots. In plants inoculated with buried residues that did not present stem base necrosis with inoculation, *P. macdonaldii* was not isolated from pith compared with plants presenting Phoma girdling. Noninoculated control plants remained symptomless and *P. macdonaldii* was not recovered.

Pycniospores and mycelium inoculation

Necrotic stem base lesions appeared as early as 7 days after inoculation with *P. macdonaldii* pycniospore suspensions and mycelium. Necrotic lesions could extend several centimeters above the leading edge of the infection with both inoculation methods. However, plants inoculated with low doses of spores (1×10^1 and 1×10^2 spores/ml) had small lesions that spread slowly compared with plants inoculated with higher doses (1×10^3 and 1×10^6 spores/ml) and mycelium. Differences on DS evolution were observed whatever inoculation methods and spore concentrations. From 43 days post inoculation (DPI), DS of plants with Phoma girdling increased significantly ($P = 0.0012$) when plants were inoculated with 1×10^3 , 1×10^6 spores/ml and mycelium (Fig. 1). More than 92 % of plants inoculated with mycelium and 1×10^6 spores/ml had Phoma necrosis girdling stem base and no significant differences were observed between both methods. Conversely, plants inoculated with 1×10^1 spores/ml had the lowest DS with 14 % at 78 DPI.

Premature ripened plants were observed from 55 DPI with inoculation $\geq 1 \times 10^2$ spores/ml and mycelium and from 66 DPI with 1×10^1 spores/ml. AUDPC_{PR} integrating PR occurrence over time up to 78 DPI varied significantly ($P = 0.0005$) after spore concentrations and mycelium inoculation. The lowest and highest AUDPC_{PR} was observed with 1×10^1 and 1×10^6 spores/ml, respectively (Fig. 2). The final percent of PR plants differed also significantly ($P < 0.0001$) with inoculation methods. The total number of PR plants increased linearly with increasing levels of inoculum concentration. Final PR was the lowest and the highest when plants were inoculated

with 1×10 and 1×10^6 spores/ml, respectively. No significant differences were observed between inoculation with mycelium and 1×10^6 spores/ml. All PR plants showed girdling stem base necrosis and Pearson's correlation coefficient for the percent of plants with Phoma necrosis girdling stem base (Fig. 1) and PR was $r = 0.871$ at 49 DPI and increased up to 78 DPI with $r = 0.941$.

Figure 1. Effect of artificial inoculation at stem base with mycelium, different pycniospore concentrations of *P. macdonaldii* and not inoculated (control) on the percent of sunflower cv. Heliasol RM with Phoma necrosis girdling stem base. Vertical bars indicate the ($LSD_{0.05}$). (Effet de la contamination artificielle à la base de la tige par du mycélium, des concentrations croissantes de pycniospore de *P. macdonaldii* sur le pourcentage de plantes cv. Heliasol RM présentant des nécroses encerclantes à la base de la tige. Les barres verticales indiquent la valeur du $LSD_{0.05}$).

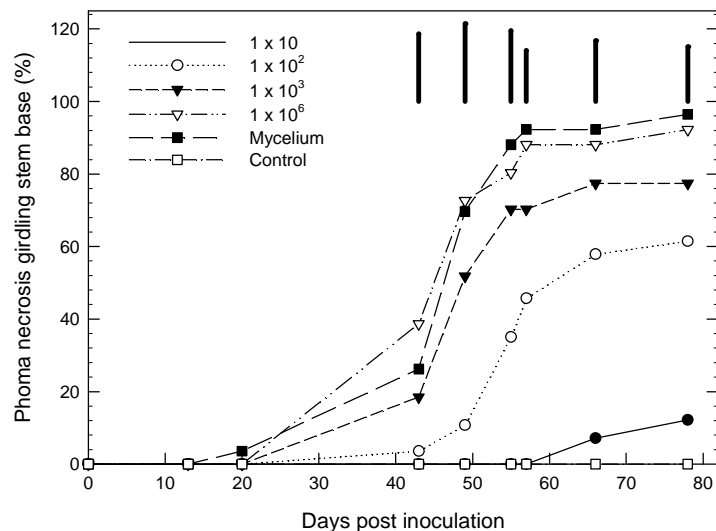
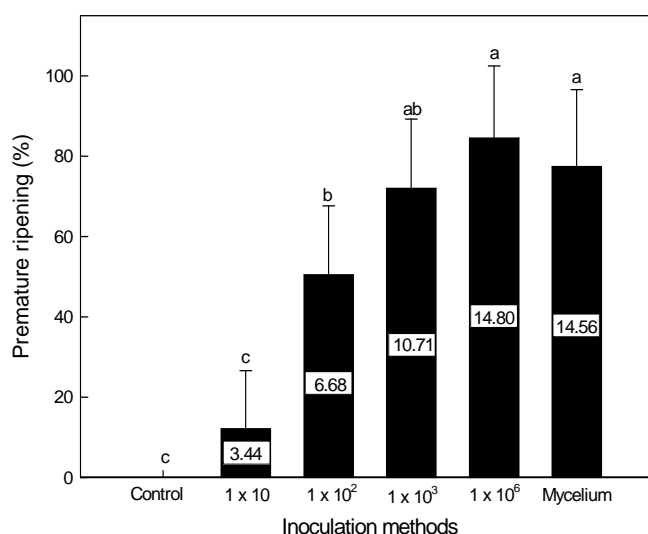


Figure 2. Effect of artificial inoculation at cv. Heliasol RM stem base with different monopycniospore concentrations, mycelium of *P. macdonaldii* or not inoculated (control) on the final percent of premature ripening at 78 days post inoculation (DPI). Premature ripening (%) means with different letters are significantly different with Fisher's protected $LSD_{0.05}$ test. Values into vertical bars are the $AUDPC_{PR}$ calculated according to Campbell and Madden (1990) and based on the percent of plants premature ripened from inoculation to 78 DPI.

(Effet de la contamination artificielle par différentes concentrations en pycniospore, mycélium de *P. macdonaldii* appliqué à la base de la tige sur cv. Héliasol RM, ou non contaminés (control), sur le pourcentage final de dessèchement précoce à 78 DPI. Les moyennes du pourcentage de plantes atteintes de dessèchement précoce (PR) ont été comparées avec un test de Fisher ($LSD_{0.05}$) et les barres avec des lettres différentes sont significativement ($P \leq 0,05$) différentes. Les valeurs inscrites dans les barres verticales correspondent aux $AUDPC_{PR}$ calculées selon Campbell et Madden (1990) sur la base du pourcentage de plantes atteintes de dessèchement précoce à 78 DPI).



DISCUSSION

This study aimed to reproduce sunflower premature ripening in greenhouse conditions for a better understanding of disease emergence with contrasted inoculum type and artificial inoculation methods. Results showed that infected residues, mycelium and pycniospores of *P. macdonaldii* can infect sunflower at the stem base and root tissues, and induce symptoms that may lead to plant death. These findings agree with earlier studies in other sunflower production areas (Gulya et al., 1984; Pérès et Poisson, 2000). The existence of a fungus complex (*Phoma macdonaldii*, *Fusarium* sp. and *Macrophomina phaseoli*) has long been associated to sunflower PR (Donald et al., 1987; Pérès et al., 2000). But this study showed that *P. macdonaldii* is highly involved in premature death and can reproduce PR by oneself.

Symptoms and spread of the disease after inoculation at the stem base, and time to PR emergence in greenhouse were similar to field results with cv. Heliasol RM and other cultivars under high level of N fertilization and water regime limited post anthesis (data not shown). Inoculation with mycelium and spores concentration at 1×10^3 and 1×10^6 spores/ml were identified as the methods that significantly ($P < 0.0001$) promoted establishment of the pathogen leading to PR while inoculation with spore concentrations at 1×10 , 1×10^2 spores/ml, buried residues or residues left at the soil surface resulted in low PR rates. Even though this study was conducted using one cultivar, these results are in agreement with a previous report (Pérès et Poisson, 2000), where inoculation with pycniospores suspension of *P. macdonaldii* at the stem base induced more girdling necrosis and PR than inoculation with infected residues. Inoculation methods at the stem base with mycelium or spores suspension at 10^6 spores/ml could thus be suitable for the efficient evaluation of a large number of sunflower genotypes for resistance to PR. Currently, only genetic variability for partial resistance to Phoma black stem have been reported in both field and controlled conditions. Disease resistance screening program to Phoma black stem are using spore suspension at 1×10^6 pycniospores/ml deposited at the intersection of the leaf petiole and the stem (Larfeil, 2003). Because further researches to screen genotypes partially resistant to PR are needed, resistance to Phoma black stem and PR could be screen with the same inoculum and crop management. Because breeding genotypes partially resistant to PR is necessary, this study provided an efficient method with spores inoculum to screen resistance to Phoma black stem and PR in a suitable crop management that favor the disease progress and final injury.

Disease severity was used in addition to AUDPC_{DS} to evaluate efficient inoculation methods with *P. macdonaldii* leading to PR. The relationship between DS and PR was established in greenhouse condition and in the field (Donald et al., 1987; Pérès and Poisson, 2000). Strong correlation between plants with girdling necrosis at the stem base and the final percent of PR

was observed after inoculation with mycelium and spores. Disease severity could be used as an early and quantifiable indicator to estimate plant susceptibility to PR and screen resistant genotypes before PR emergence because breeding programs are more likely to work with single-date assessments. Furthermore, it has been shown that whatever the phenological plant stage, behaviors towards pathogen spread between plantlets and mature sunflowers did not change (Larfeil, 2003). It should be thus interesting to carry on experiment and test if correlation between *Phoma* girdling and PR is back up with early inoculation. Ability to reproduce disease symptoms and sunflower PR in greenhouse could allow rapid progress in breeding plants for disease resistance. Screening is most commonly conducted under field conditions; however, field screening has limitations depending on natural occurrence of suitable environment conditions and pathogen inoculum, and can be conducted once in a year. Despite a limited number of plants can be evaluated under greenhouse condition, experiments could be carried out twice a year for a primary screening of genotypes before field evaluation.

Extensive necrosis of the stem tissues spread several centimeters above the leading edge of the infection after inoculation with spores, mycelium and infected residues left at the soil surface. Conversely, plants inoculated with infected buried residues had few stem base necrosis and solely plants with fragments of residues remaining at the soil surface in Auz-07 and EC-07 presented girdling necrosis. The highest AUDPC_{DS} and DS in Auz-07 with buried residues may have been favored by controlled air humidity and temperature in the greenhouse. Drier climatic conditions in the hoop tunnel of EC-07 with temperature up to 40°C may have restricted fungus spread into the plant (Roustaei et al., 2000) and could explain that this experimental site resulted in the lowest final PR whatever inoculation methods. Apart from growing conditions, plants inoculated with buried residues presented well-developed root balls that may present black bulges and necrosis through contact with infected residues. *P. macdonaldii* was isolated from these bulges and roots necrosis; however the fungus was rarely isolated from roots tissues compared with stem tissues when plants presented girdling necrosis. Despite, sparsely inoculation of *P. macdonaldii* in roots, buried residues can infect root systems (Pérès and Le Sourné, 2000) that are an infection pathway for the pathogen. However, the fungus was not isolated into the stem after inoculation with buried residues. Within stem base, a chemical protection zone, also call barrier zone, is formed by the parenchyma that contains phenol compounds, which helps the plants to stop the fungal progression (Delflorio et al., 2009). This phenomenon, mainly studied for tree pathogens, could explain limited progression of the fungus to the stem. Despite high quantity of inoculum buried with residues, girdling stem base necrosis was needed to lead to sunflower PR. These findings allowed a better understanding of sunflower premature death origin that should primary be ascribed to aerial infections at the stem base than to soilborne ones.

Maric et al. (1981) revealed the presence of perithecia and pycnidia on residues aged several years and support the way that residues can be long-term sources of inoculum. High amount of residues left at the soil surface in Gri-08 favored PR more than in Auz-07 and EC-07 where very few infected residues were remaining. This supported the finding that the spreading of the disease was highly dependent on the amount of infected residues remaining at the soil surface. In southwestern France, sunflower is mainly planted in rotation with wheat. Short rotations and simplified soil tillage of wheat crops tended to increase the amount of inoculum by leaving infected sunflower residues on the soil surface. As soil tillage plays on the vertical distribution of residues, a pronounced effect on disease spreading is expected. Contact of residue with soils, especially when buried, promotes greater microbial activity, accelerating decomposition. Residues in no-till systems decompose more slowly than residues under reduced-tillage systems. Buried residues then brought back to soil surface were less infectious than non-buried residues (Poisson-Bammé and Pérès, 2000). Thus, residues in no-till systems likely would support the survival of *P. macdonaldii* and inoculum production for longer periods of time.

CONCLUSION

Based on the study findings, sunflower premature ripening tend to be ascribed to aerial infections more than soilborne ones. Residues left at the soil surface that produce ascospores, pycniospores and mycelium are the main source of *P. macdonaldii* inoculum. Cultural practices that can minimize the amount of these residues could reduce sunflower infection at the stem base and better control emergence of sunflower PR. Practices such as tillage, sunflower residue management and crop sequence could play significant roles in reducing the risk of the disease. Moreover, this study showed that artificial inoculation at the stem base with high pycniospores concentration and mycelium of *P. macdonaldii* could be used for screening genotypes having high levels of partial resistance to PR. Inoculation at 1×10^6 spores/ml was at least the most effective method of artificial inoculation and would likely be more practical for Phoma black stem and PR screening.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CETIOM, Midi-Pyrénées government and PROMOSOL association. We are grateful to the technical staff (M. Labarrère, P. Perrin, A. Doumenc, A. , J. Sanyas, A. Bammé, V. Demoisson, A. for their assistance in experimental procedures We would like also to thank N. Seguin, A. Sirvent, A. Pauvert and C. Jourda for their collaboration.

LITERATURE CITED

- Campbell C., and Madden L.V., 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, New York.
- Delflorio G., Franz E., Fink S., and Schwarze F.W.M.R., 2009. Host responses in the xylem of trees after inoculation with six wood decay fungi differing in invasiveness. *Botany* 87:26-35.
- Donald P. A., Venette J. R., and Gulya T. J., 1987. Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower in North Dakota. *Plant Dis.* 71:466-468.
- Gulya T., Charlet L., Donald P. A., and Venette, J. 1984. What do we know about sunflower premature ripening? *The sunflower* (Dec. 1984):20-21.
- Larfeil C., 2003. La maladie des taches noires du tournesol causée par *Phoma macdonaldii* Boerema: Variabilité phénotypique et moléculaire – Evaluation de la sensibilité des génotypes à la maladie – Modalités de l'infection. Ph.D Thesis. Toulouse National Polytechnic Institute.
- Maric A. D., Masiveric S. and Fayzalla S., 1981. Presence of *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi, last stage of *Phoma macdonaldii* Boerema, causal agent of Black spot of sunflowers in Yugoslavia. (in Serbo-Croatian). *Zastija bilja.* 32:329-344.
- Pérès A., and Le Sourné V., 2000. The Phoma of sunflower: a study of pseudothecia and pycnidia in the contamination process (in French). Pages 314-321 in : Proc : VI Int. Plant Disease Conf., Tours, France.
- Pérès A., and Poisson B., 2000. The early withering of sunflower ("dry plant"): the part played by Phoma and study of the contamination (in French). Pages 323-329 in : Proc : VI Int. Plant Disease Conf., Tours, France.
- Pérès A., and Poisson B., and Drolon G., 2000. The dry plant syndrome on sunflower: study of causes and approach of the incidence (in French). Pages 489-495 in : Proc : VI Int. Plant Disease Conf., Tours, France.
- Poisson-Bammé B., and Pérès A., 2000. Survey of Phoma (*Leptosphaeria lindquistii*) on sunflower stubbles (in French). Pages 331-338 in : Proc : VI Int. Plant Disease Conf., Tours, France.
- Roustae A., Costes S., Dechamp-Guillaume G., and Barrault G., 2000. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant. Pathol.* 49:227-234.
- Sackston W. E., 1950. Sunflower diseases in Manitoba in 1949. *Can. Plant Dis. Surv.* 28:31-35

**STUDY OF THE RICE CULTIVAR RESISTANCE TO *PYRICULARIA GRISEA* IN DELTA
EBRO AREA (SPAIN)**

PLA E.¹, CATALÀ M.-M.¹, TOMÀS N.¹, MARTÍNEZ M.¹, MARÍN J.-P.², ALMACELLAS J.³
¹IRTA, ²Lleida University, ³Agricultural Department

SUMMARY

Rice blast, caused by *Pyricularia grisea* (Cooke) sacc., is a damaging disease in Ebro Delta (Spain) rice fields. The damage is variable and yield losses due to this disease could be severe, until 50% of yield in Ebro Delta area. Blast can be found on rice in the seedling stage and may infect leaves, neck, sheath and panicle. An important method to prevent the disease is the use of resistance rice varieties. However, populations of the pathogen are pathotypically diverse and this diversity may be due to continuous generation of new pathogenic variation. The aim of the present study is to know the susceptibility to blast of the most cultivated varieties in Ebro Delta area during the last 8 years. During this time a set of 11 different varieties had been cultivated. Field studies indicated that blast damages were variable in time and the major part of cultivars presented a moderate performance to *Pyricularia grisea*.

Key words: rice, blast, field resistance

RÉSUMÉ

**ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE DES VARIÉTÉS DE RIZ A *PYRICULARIA GRISEA* DANS
LE DELTA DEL EBRO (ESPAGNE)**

Les dommages causés par la brûlure sont très variables et les pertes dues à cette maladie pourraient être graves, jusqu'à 50% de rendement dans Ebro Delta. La brûlure peut être trouvée sur le riz dans le stade de plantules et infecter les feuilles, la tige et la panicule. Une méthode importante de prévention de la maladie est l'utilisation de la résistance des variétés de riz. Toutefois, les populations de l'agent pathogène sont diverses et ces diversités peuvent être dû à la production continue de nouveaux pathogènes. L'objectif de l'étude est de connaître la sensibilité des variétés cultivées dans le Delta de l'Ebre au cours de 8 années. Pendant ce temps, 11 variétés ont été cultivées et les études ont indiqué que les dommages ont été variables dans le temps. La plupart des cultivars ont montré une résistance modérée à *Pyricularia grisea*.

Mots-clés : riz, brûlure, résistance

INTRODUCTION

Due to the importance of rice crop in Ebro Delta area, from 2000 IRTA in collaboration with UdL (Lleida University) and DAR (Agriculture Department) is studying the blast resistance of the most cultivated varieties in the Ebro Delta. The damage produced by *Pyricularia grisea* varied mainly in function of the variety, fertilizing practices and climatic conditions. The rice cultivars show, front *Pyricularia grisea*, different resistance according to its genetic information.

It is unknown the defence mechanism in relation with the resistance capacity to different diseases of each variety. Anatomical, physiological and biological factors may be involved; the density and chemical constitution of cell walls can mean a barrier to entry of fungal agent. The resistance consists of some defence mechanisms, where the parasite attack is produced, like little necrotic spots derived from the mycotic penetration (Tiranelli, 1989).

The fact that a variety has some resistance character in his obtaining moment does not mean that it was constant and permanent in the time. A variety can reduce its resistance capacity as a consequence of the parasite agent modification. The different races of *Pyricularia grisea* can spontaneously appear by some occasional mutations and they behave with different intensity and virulence, unpredictable a priori (Tiranelli, 1989). One of the blast control strategies is the use of resistance cultivars, but the great variability shown by the pathogen permits that this crop resistance could be exceed (Correa, 2002). The fungus races mainly depend on the kind of cultivar spread in the area and its resistance to the pathogen. Consequently, the fungus creates a population where one or more races dominate attacking the more spread cultivar in the area (Benavidez, 2006). In this sense, rice varieties cultivated in Ebro Delta during 2000-2008 have constantly varied (Català *et al*, 2007). The aim of the present study is to know the susceptibility to blast of the most cultivated varieties in Ebro Delta area during 8 rice seasons.

MATERIAL AND METHODS

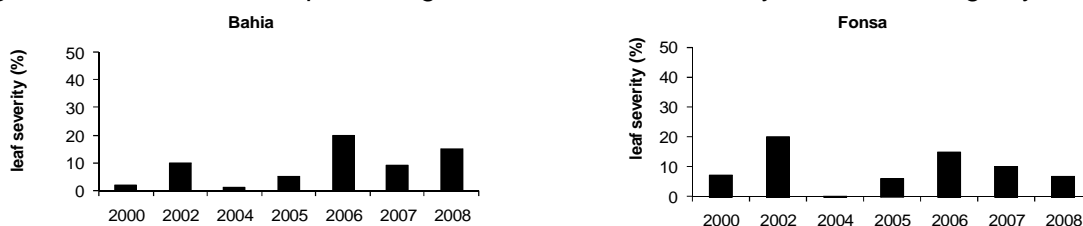
The trials were carried out from 2000 to 2008. The vegetal material has been chosen according to the main varieties sown in the Ebro Delta (Català *et al*, 2007).

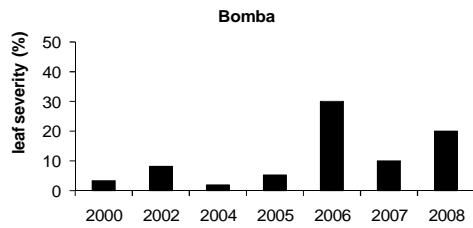
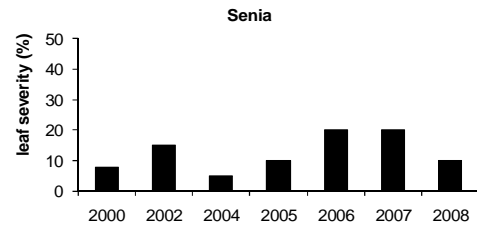
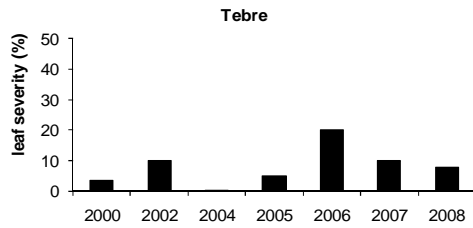
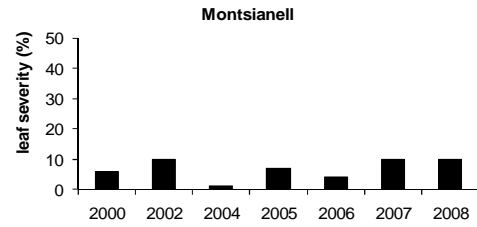
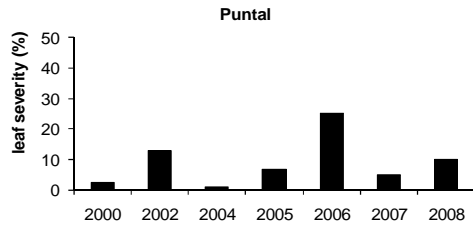
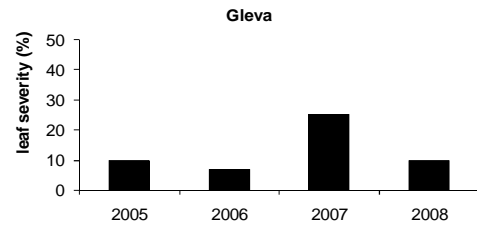
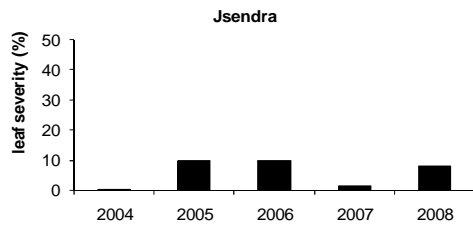
The experiment was conducted in IRTA rice fields located in Ebro Delta under conditions that increase the blast spore production: late transplant, high nitrogen fertilization and around the trial a susceptible rice cultivars as "spreaders". Varieties were distributed in three rows, 5 plants per row. Each plot was surrounded by the spreader variety (Bomba, Baixet, Thaiperla or Maratelli). The number of the location of trials varied from 1 to 5, depending on the season.

Measurements have been done in all affected organs and at different development stages. It was evaluated severity (the maximum percentage of the foliar area affected) and incidence (percentage nodes, necks and panicles affected by blast according to the total number of stems of each variety).

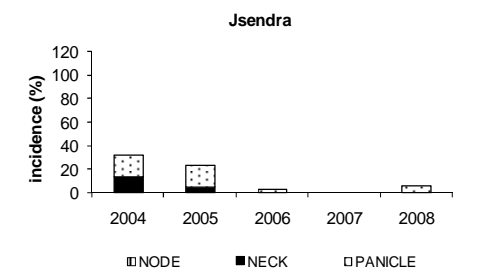
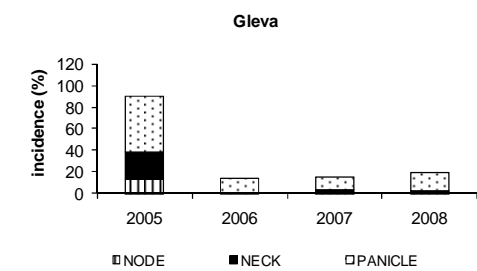
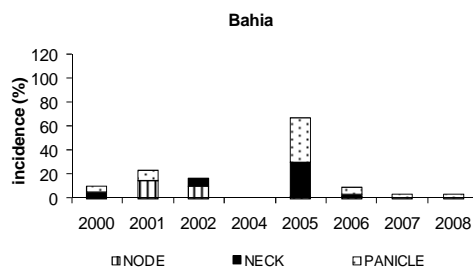
RESULTS

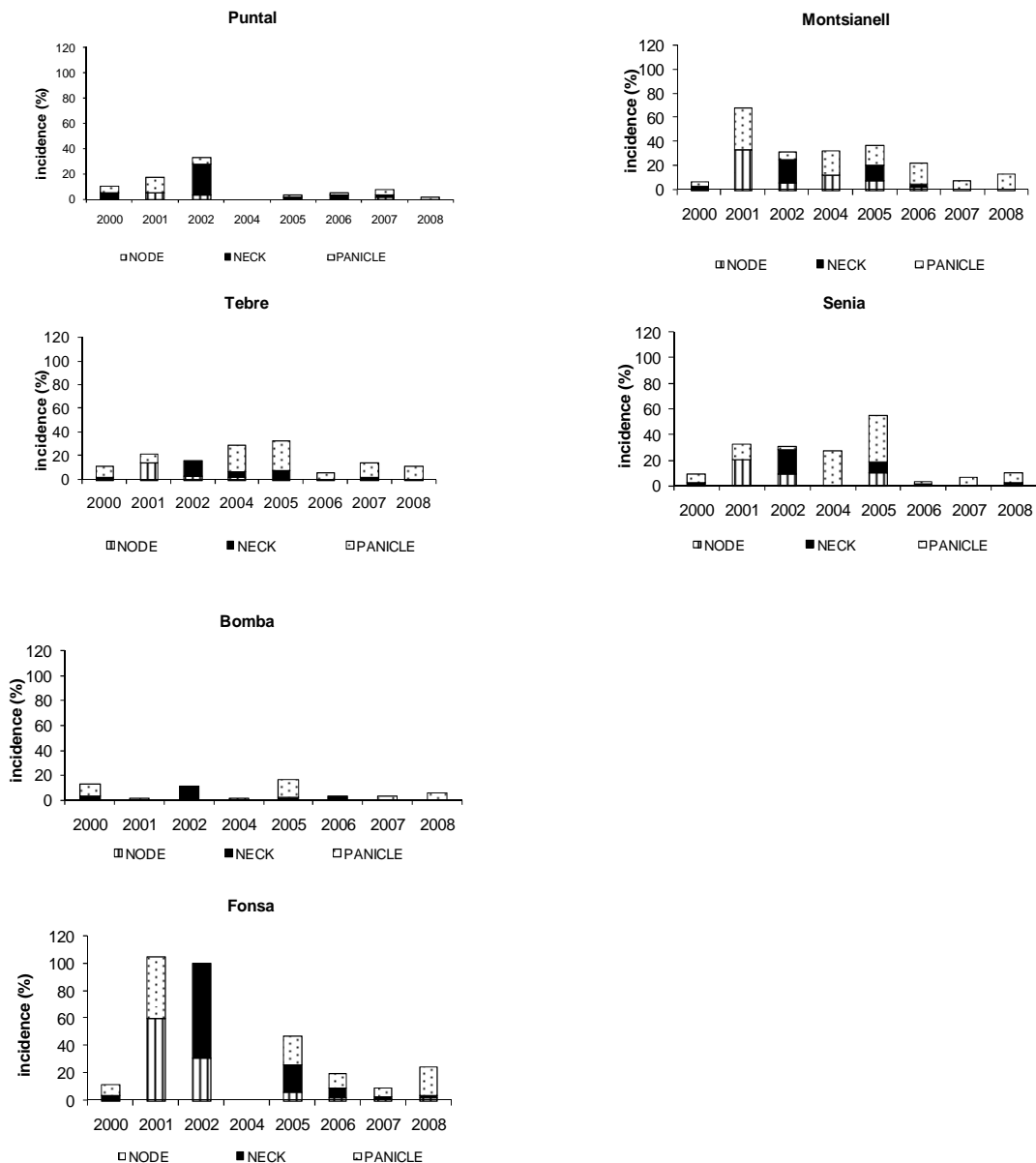
Figures 1 to 9. Maximum percentage of foliar area affected by blast according to year.





Figures 10 to 18. Percentage of nodes, necks and panicles affected by blast respect to the total number of stems according to year.





CONCLUSION

The results shown in figures 1 to 18 are referred to the maximum value of foliar severity and neck, node and panicle incidence in the different valuations done in each season. As we can see in the results, blast damages in the different varieties have been changing during the period of study, as well in the leaf as in neck, node and panicle. Nor disease evolution or tendency was seen because blast resistance is a dynamical and changing concept depending on the area, plot and season (Català, 2008). For this reason, it is very difficult to classify the different varieties depending on its blast resistance or susceptibility. The fungus attacks almost all the plant parts, but most frequently damages occurred in leaves and panicles (Correa, 2002). The variety response to blast is different depending on the part of the plant affected (Galimany *et al*, 2006). For this reason, the results from different season experiments showed that in the same variety blast symptoms in leaf are not related to panicle symptoms. In general, more blast symptoms in leaf were observed in 2002 and 2006 while in panicle were in 2001, 2004 and 2005. In reference to blast damages, the most part of varieties in Ebro Delta showed a moderate performance in this period 2000-2008 in panicle, node and neck. It is worth to point up that, by one hand Fonsa and Gleva

varieties showed more blast damage in stem and panicle than the other ones; and by the other hand, Bomba showed less than 20% of incidence in node, neck and panicle in all trials.

Taking in account that results showed that the most part of varieties had a moderate performance, it is interesting to consider the field resistance concept, referring to cultivate some varieties with a moderate blast resistance holding the levels under a proper economical threshold (Galimany *et al*, 2006). In any case, under risk conditions (humidity over 90% and 15-28°C temperatures during more of 14 hours) it will be necessary to protect these varieties from the blast attack.

Some authors state that a combination of different varieties with different genetic and agronomical features can be used as a blast control strategy (Zhu, 2003). This situation is found in Ebro Delta area where pattern of grown varieties changes within and across years (Català *et al*, 2007).

BIBLIOGRAPHY

Benavidez, R. 2006. *El arroz*. Ediciones UNL., 1.

Català, MM.; Jardí, M.; Pla, E. 2007. Evolución de las variedades de arroz cultivadas en el Delta del Ebro durante los últimos 20 años. *Agrícola Vergel*, 303, 132-135.

Correa, F.; Tharreau, D.; Martínez, C.; Vales, M.; Escobar, F.; Prado, G.; Aricapa, G. 2002. Combinaciones de genes en arroz para el desarrollo de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 26, 2, 47-54.

Galimany, G.; Matamoros, E.; Almacellas, J.; Marín, J.P.; Català, M.M; Tomàs, A.; Solanelles, F.; Gràcia, F.J.; Camp, F. y Llorach, T. 2006. Estratègies per al control de les principals malalties de l'arròs. Dossier Tècnic, Nous avenços en el cultiu de l'arròs. DAR-Generalitat de Catalunya, 12, 6-12.

Tiranelli, A. 1989. *El arroz*. Ediciones Mundi-Prensa. 2nd edition.

Zhu, Y.; Chen, H.; Fan, J.; Wang, Y.; Li, Y.; Fan, J.; Yang, S.; Ma, G.; Chen, J.; Li, Z.; Lu, B. 2003. The Use of Rice Varietal Diversity for Rice Blast Control. *Agricultural Sciences in China*, 2, 4, 400-408.

**AFPP-9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

**DECIPHERING THE GENETIC BASIS OF FIELD RESISTANCE TO BLAST IN
EUROPEAN RICE VARIETIES TO IMPROVE BREEDING FOR DURABLE RESISTANCE**

CATALÀ M.M.¹, PLA E.¹, CARRERES R.², BRETÓ M.P.², DOMINGO C.², THARREAU D.³,
AGUILAR M.⁴, BAIXAULI C.⁵, MARQUÉS L.⁶, OSCA J.M.⁷, ARÚS P.¹

¹ IRTA, ² IVIA, ³ CIRAD-INRA, ⁴ CIFA-IFAPA, ⁵ FUNDACIÓN RURALCAJA, ⁶ COPSEMAR, ⁷ UPV

SUMMARY

Rice blast (caused by *Magnaporthe grisea*) is the most damaging fungal disease of rice. The use of resistant rice varieties is a cost effective method to control the disease and can be incorporated as a component of an integrated pest management (IPM) strategy, avoiding fungicide applications in such fragile areas. Determining the genetic and molecular basis of resistance in European varieties and including this knowledge in breeding programs is of primary importance to develop rice varieties durably resistant to blast. This project aims at using the appropriate genomic tools to identify the important genes for durable blast resistance and to start creating resistant varieties adapted for European growing conditions, through the combined efforts of different teams and using different methods.

Key words: rice, blast, durable resistance, genomic

RÉSUMÉ

**LE DÉCODAGE DE LA BASE GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE DE LA BRÛLURE DE
VARIÉTÉS DE RIZ POUR INDUIRE UNE RÉSISTANCE DURABLE**

La brûlure du riz (*Magnaporthe grisea*) est la plus dommageable maladie fongique du riz. L'utilisation de variétés de riz résistantes est un moyen efficace pour lutter contre la maladie et peut être intégrée comme un élément d'une gestion intégrée des maladies, en évitant les applications de fongicides dans ces zones fragiles. La détermination de la base génétique et moléculaire de la résistance dans la construction européenne, et d'inclure ces connaissances dans les programmes d'amélioration est de première importance pour le développement des variétés de riz durable de la résistance à la brûlure. Ce projet vise à utiliser les outils de génomique pour identifier les gènes importants pour la résistance durable et de commencer à créer des variétés résistantes adaptées aux conditions de la culture européenne, grâce aux efforts conjugués des différentes équipes et l'utilisation de différentes méthodes.

Mots-clés : riz, brûlure, résistance durable, génomique

INTRODUCTION

Rice blast disease caused by *Pyricularia grisea* (Cooke) Saccardo is a serious disease in Europe. The main rice growing areas in Europe are humid areas and river deltas with special environmental protection. Obtaining efficient and durable resistance is a difficult task due to the complexity of the plant response as well as the variability of the pathogen population (Zeigler et al., 1994). The rapid occurrence of new virulent isolates is due to either selection of virulent mutants or the use of inappropriate resistance genes for which virulent isolates were already present at low frequency in the local rice blast fungus populations. Thus, knowing the virulence of the pathogen population is an important factor to determine the resistance genes to use, alone or in combination. But the evolution of the pathogen population can not be stopped and the populations will always tend to adapt to the host. Therefore, resistance deployment strategies must be aimed at obtaining a durable control of the disease. By definition, there is no other way to test resistance durability but to evaluate cultivars in the field for several years on a large scale. This makes very difficult to breed for durable resistance directly. Some examples of durable resistance to blast exist (Bonman and Mackill, 1988; Lee et al., 1989). These durably resistant cultivars seem to combine several specific-complete resistance genes and a high level of partial resistance (Wang et al., 1994). Thus, breeding for broad spectrum specific-complete resistance and partial resistance at the same time seems a possible way to create durably resistant cultivars.

In this project the main objective is to obtain pre-competitive rice plant materials that incorporate efficient and durable blast resistance. To accomplish this goal, a coordinate multidisciplinary team will develop and use innovative tools derived from genomic studies and integrate them with plant genetics and plant pathology approaches. The following specific objectives will contribute to general objective:

1. To characterize specific, partial and field resistance of some European rice cultivars.
2. To identify genes of interest for breeding for specific-complete and partial resistance to blast.
3. To characterize allelic variability among European cultivars in known resistance genes and candidate genes related to defense mechanisms against blast.
4. To confirm genetically the interest of the candidate genes by testing their co-localization with QTLs involved in the resistance of rice to European blast races.

This work will contribute significantly to the understanding of the genetic and molecular basis of resistance to blast in European rice cultivars by combining classical approaches and tools derived from genomic studies. Up to now little is known about resistance to blast in European cultivars and this is a major problem for the development of rice cultivars with durable resistance to blast.

MATERIAL AND METHODS

To characterize specific, partial, and field resistance of some European rice cultivars several assays will be conducted in three Spanish rice growing areas (Delta Ebro, Valencia, and Sevilla) during three years of the project. These trials are designed to induce the infection of *M. grisea* in rice by using adequate growing conditions and spreader varieties highly susceptible to blast. The assays will include: 1) a set of 20-25 commercial varieties (with known different susceptibility to blast), 2) the donors of resistance for the genetic studies, 3) a collection of differential varieties (lines carrying a single specific resistance gene supplied by the International Rice Research Institute- IRRI), 4) the selected lines derived from the segregating populations and 5) a set of 5-7 promising material with pyramided genes. Rice plants will be evaluated in the different location according to the same scale. Rice resistance will also be evaluated in greenhouse with known races of the pathogen to determine potential specific resistance genes and to evaluate partial resistance.

In reference to study the expression pattern of genes involved in defence mechanisms, preliminary results tend to show that partial resistance of rice varieties to blast correlates with the high expression level of some signaling and defense genes before any contact with the pathogen. These genes are expected to be more amenable to Marker Assisted Selection,

because measuring a basic level of expression is easier to do routinely than measuring a differential expression that is highly dependant on the environment and requires the inoculation of the material. Microarrays and mutant studies from previous projects have allowed the identification of a number of rice genes involved in specific and partial resistance to blast. The basic expression level of these genes before inoculation will be correlated with the level of resistance measured in field and controlled conditions to determine the best candidates to be used for Marker Assisted Selection. These genes will be mapped in *silico* and their co-localization with QTLs identification will be tested.

The analysis of natural allelic variability of candidate genes among European cultivars will contribute to characterization of allelic variability. The correlation between polymorphisms and the resistance level obtained for each cultivar by measurements in different conditions, will allow the identification of functional alleles of genes potentially useful for characterizing performed component of partial resistance.

To QTL analysis and to obtain resistant breeding segregating populations derived from crosses, different donors will be obtained, potentially representing a wider number of resistance genes, and utilized for QTL detection and to generate pre-competitive resistant rice lines. Co-localization of QTLs and defense genes expressed with high level of basal expression will be tested to validate the hypothesis of a role of these genes in performed resistance. Two populations will be chosen according to their size and response of the parents to inoculation in controlled conditions, and screened for SSRs markers evenly distributed along the rice genome, with higher density in chromosomal regions where specific resistance genes have been previously found, and for markers generated from candidate genes. The populations will be evaluated for resistance to representative blast isolates using a quantitative evaluation of symptoms. Both set of data will be combined for QTL mapping and for selecting lines carrying putative resistance genes; these lines will be further marker-characterized and challenged to field and controlled blast assays, to advance and select resistant breeding lines.

PRELIMINARY RESULTS AND CONCLUSIONS

We have characterized the isolates of *M. oryzae* from three rice growing areas of Spain.

The preliminary analyses show that:

1. Populations from the South, seem genetically different from populations from Central and North regions of Spain.
2. Most of the isolates sampled belong to genetic groups already identified in Europe, but
3. New groups are also sampled.

The level of partial resistance to blast is relatively high in most commercial varieties as revealed by the field and inoculation trials conducted. Transcriptomics data has been analyzed to identify potential candidate genes to measure preformed partial resistance. Among thousands of genes, we identified 20 that are potentially interesting to measure performed partial resistance in rice. But, we did not observe any correlation between gene expression and partial resistance.

In order to detect association between molecular markers and resistance to *Magnaporthe*, a QTL analysis is underway. A first step has been to find polymorphic markers between a set of resistant and, susceptible but well adapted, rice varieties. More than one hundred of SSRs markers, distributed along the whole rice genome, have been tested in 12 varieties. After screening one segregating populations for the polymorphic markers and determining their level of resistance in inoculation and fields trials, the development of linkage maps and detection and characterization of QTLs involved in blast resistance are in progress.

REFERENCES

- Bonman, J.M., and D.J. Mackill. (1988) Durable resistance to rice blast disease. *Oryza* 25, 103-110.
- Lee, E.J., Q. Zhang and T.W.Mew (1989) Durable resistance to rice disease in irrigated environments, in *Progress in Irrigated Rice Research*, International Rice Research Institute, Manila, Philipines, 93-110.
- Zeigler R., Leong S. Tang P. (1994). *Rice Blast Disease*. CAB International, Wallingford, UK, in association with the International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines. 167-186
- Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ. (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar. *Genetics*. 136, 1421-1434.

**METHODS D'EVALUATION VARIETALE VIS-A-VIS DU PHOMA DU COLZA :
OU EN SOMMES-NOUS ?**

X. PINOCHET(1), M. H. BALESSENT(2), T. ROUXEL(2), H. BRUN (3), R. DELOURME(4)

(1) CETIOM, UMT PIVERT, 78850 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE

(2) UMR BIOGER INRA AGROPARISTECH, UMT PIVERT, 78850 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE

(3) INRA-AGROCAMPUS OUEST-UNIV. RENNES 1, UMR1099 BIO3P, 35653 LE RHEU, FRANCE

(4) INRA-AGROCAMPUS OUEST-UNIV. RENNES 1, UMR APBV, 35653 LE RHEU, FRANCE

RÉSUMÉ

L'évaluation des variétés de colza vis-à-vis du Phoma est principalement réalisée au champ via un index de sévérité de la nécrose au collet : l'indice G2. Cet indice est la résultante des effets de résistances quantitatives et de résistances spécifiques partiellement ou totalement efficaces. Lorsqu'une résistance spécifique efficace est présente, les notes G2 sont toujours excellentes. Cette approche ne permet donc pas d'évaluer le niveau des résistances quantitatives des variétés possédant une résistance spécifique efficace mais qui pourrait être contournée par l'évolution des populations du champignon. Le CETIOM et l'INRA se sont associés pour mettre au point et réaliser des évaluations en conditions contrôlées permettant d'évaluer chaque type de résistance. Un bilan des identifications de résistances spécifiques dans les variétés commercialisées est tiré. Pour les résistances quantitatives, le test permet d'identifier les génotypes très sensibles mais les résultats se heurtent à un défaut de précision des méthodes utilisées pour une évaluation fiable. Néanmoins, la connaissance des profils de résistances spécifiques et les évaluations au champ permettent une bonne estimation des niveaux de résistance quantitative pour la plupart des génotypes.

Mots-clés : colza, *Leptosphaeria maculans*, résistances, évaluation, conditions contrôlées

SUMMARY

EVALUATION METHODS IN CONTROLLED CONDITIONS FOR OILSEED RAPE RESISTANCE TO BLACKLEG: STATE OF THE ART

Variety testing for blackleg resistance is mainly done in the field using a severity G2 index. This index is global and results from quantitative as well as specific resistances. When an efficient specific resistance is present, this index is always excellent. It is then not possible to evaluate the level of quantitative resistance, before a possible breakdown of the specific resistance. CETIOM and INRA collaborate to promote methodologies in controlled conditions to be able to evaluate individually both types of resistances. We present the main results for the specific resistances in commercial varieties. For quantitative resistance results, very susceptible genotypes can be identified but there is a lack of precision for a confident evaluation. Nevertheless with both field evaluations and specific resistance profiles it is possible to have a rather good estimation of the quantitative resistance levels, except for few cultivars.

Key words: Oilseed rape, *Leptosphaeria maculans*, resistances, evaluation, controlled conditions

INTRODUCTION

L'évaluation des variétés de colza vis-à-vis du Phoma, maladie principale du colza, est principalement réalisée au champ via un index de sévérité de la nécrose au collet : l'indice G2 (Pierre et Regnault 1982). Cet indice est robuste et fiable comme l'ont montré plusieurs études (Aubertot 2004, Lô-Pelzer et al 2009). Il est la résultante des effets de résistances quantitatives et de résistances spécifiques partiellement ou totalement efficaces. Lorsqu'une résistance spécifique efficace est présente, les notes G2 sont toujours excellentes. Cette approche ne permet donc pas d'évaluer le niveau des résistances quantitatives des variétés possédant une résistance spécifique efficace mais qui pourrait être contournée par l'évolution des populations du champignon. Le CETIOM et l'INRA se sont associés pour mettre au point et réaliser des évaluations en conditions contrôlées permettant d'évaluer chaque type de résistance. Un bilan des identifications de résistances spécifiques dans les variétés commercialisées est tiré. Pour les résistances quantitatives, plusieurs modalités de test en conditions contrôlées ont été testées. Elles doivent fonctionner avec des isolats du champignon à profils de virulences différents et adaptés, de façon à avoir toujours la souche permettant de s'affranchir de la présence de la résistance spécifique. Les résultats d'une méthode encore perfectible sont présentés ici.

MATERIEL ET MÉTHODE

GENOTYPES UTILISES

Pour l'identification des résistances spécifiques présentes, le travail a porté sur 155 variétés commerciales inscrites en France de 2001 à 2007 ou sur le catalogue communautaire, en général en Angleterre, et commercialisées en France sur la même période. Les semences utilisées sont les semences certifiées fournies par les semenciers pour les réseaux d'évaluation post inscription du CETIOM.

Pour l'évaluation des résistances quantitatives 17 génotypes différents ont été utilisés. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous. Il y a d'une part des variétés commercialisées bien connues de ces 15 dernières années et d'autre part des génotypes de référence souvent utilisés dans les études de génétiques (Source INRA Rennes).

Tableau n°1 : Caractéristique des génotypes utilisés pour l'évaluation des résistances quantitatives. Main traits of tested genotypes for quantitative resistance assessment.

| Génotype | Type | Qualité | Gène Rlm | Niveau de résistance quantitative |
|----------|-----------|---------|------------|-----------------------------------|
| A30 | Lignée HD | ++ | / | TS |
| Astrid | Variété | « 00 » | / | TPS |
| Aviso | Variété | « 00 » | / | TPS |
| C119 | Lignée HD | ++ | / | TPS |
| Colombus | Variété | « 00 » | Rlm1, Rlm3 | TPS |
| Darmor | Variété | « 00 » | Rlm9 | TPS |
| Jet Neuf | Variété | « 0+ » | Rlm4 | TPS |
| Gaspard | Variété | ++ | ND | TPS |
| Goéland | Variété | « 00 » | Rlm9 | TPS |
| Capitol | Variété | « 00 » | Rlm1, Rlm3 | S |
| Falcon | Variété | « 00 » | Rlm4 | PS |
| Eurol | Variété | « 00 » | Rlm2, Rlm3 | S |
| Vivol | Variété | « 00 » | Rlm1, Rlm3 | S |
| Samourai | Variété | « 00 » | Rlm2, Rlm9 | S |
| Yudal | Variété | ++ | / | TS |
| Olphi | Variété | « 00 » | Rlm1 | ND |
| Roxet | Variété | « 00 » | Rlm7 | ND |

ISOLATS FONGIQUES.

Pour l'identification des résistances spécifiques, 11 isolats différents de *Leptosphaeria maculans* dont les profils de virulences sont connus, sont utilisés (Tableau 2)

Tableau n°2: Profil de virulence des isolats de référence de *Leptosphaeria maculans* utilisés pour l'identification des résistances spécifiques. Virulence profiles of *Leptosphaeria maculans* reference strains used to identify specific resistances. nd: non determine/not determined.

| | JN2 | v23.2.1 | v38.4.11 | v23.11.9 | Nz-T4 | 19.4.24 | v45.62 | v45.30 | v39.39 | v58.1.1 | 1223 |
|--------|-----|---------|----------|----------|-------|---------|--------|--------|--------|---------|------|
| AvrLm1 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| AvrLm2 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| AvrLm3 | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | - |
| AvrLm4 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| AvrLm5 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| AvrLm6 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| AvrLm7 | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| AvrLm8 | + | + | - | + | + | + | - | - | nd | + | + |
| AvrLm9 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |

Pour les expérimentations d'évaluation des résistances quantitatives 2 isolats ont été utilisés, l'un étant avirulent pour *Rlm1* (*AvrLm1*) et l'autre virulent (*avrLm1*) : P27D : (race Av1-5-6-7-(8)-10 selon la nomenclature de Balesdent et al, 2005); et 290 : (race Av5-6-7-(8)-10).

CULTURE ET INOCULATION DES PLANTES, VARIABLES MESUREES.

Pour l'identification des résistances spécifiques, les cotylédons de jeunes plantules de 15 jours sont inoculés avec une goutte de 10 µL contenant 10⁵ conidies. La variété de colza est soit Westar (variété témoin sensible), soit la variété à tester, ainsi que des variétés à profil de gène de résistance connus servant également de témoins. Les symptômes sont notés sur 10 à 12 plantes par couple plante/isolat à 14 et 21 jours après inoculation en utilisant une échelle de 1 (résistant) à 6 (sensible), avec une règle de décision telle que définie précédemment (Balesdent et al, 2006).

Pour les résistances quantitatives, les plantes sont cultivées en chambre de culture à 20 C° et une alternance jour / nuit de 16h/8h. Les plantes sont inoculées à l'aide d'une goutte d'inoculum de 10 µL contenant 10⁷ conidies à l'aisselle du pétiole légèrement blessé de la deuxième feuille vraie sur des plantes au stade B3-B5 à raison de 3 fois 6 plantes par couple plante/isolat. La méthode d'inoculation est celle décrite par Newmann (1984). Les notations sont faites à partir de 50 jours après inoculation. En fin d'expérimentation deux mois après inoculation, différentes variables sont mesurées dont la longueur de la nécrose externe ou interne, et transformées ou non en note selon l'échelle de Newman (1984).

RESULTATS

EVALUATION DES RÉSISTANCES SPÉCIFIQUES

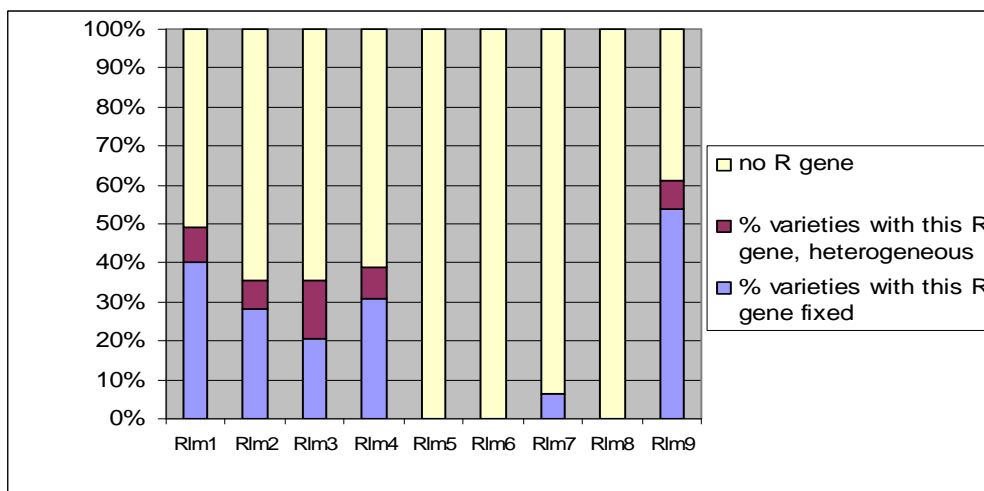
Neuf résistances spécifiques ont été recherchées (Figure 1). Trois d'entre elles n'ont jamais été détectées : *Rlm5*, *Rlm6* et *Rlm8*. Elles correspondent à des résistances spécifiques non encore utilisées commercialement et pour lesquelles les populations du pathogène en

France et en Europe sont encore principalement avirulentes (Balesdent et al 2006, Stachowiak et al 2006).

Rlm7, récemment introduit commercialement (Avec Roxet inscrite en 2002 en Grande Bretagne), est maintenant présent dans une dizaine de génotypes. Roxet est une lignée de Syngenta. Caïman, Hearty, Heaven sont des lignées éruciques de Monsanto. Les autres sont de nouveaux hybrides restaurés Ogu INRA de ces deux sociétés.

Rlm9 est présent dans 61% des génotypes testés. *Rlm2* et *Rlm3* ont été détectés chacun dans 35% des génotypes mais seulement 13 variétés (5 lignées et 8 hybrides) ont les deux résistances à la fois.

Figure n°1: Pourcentage de génotypes testés portant une résistance spécifique donnée. Percentage of genotypes tested with a given specific resistance.

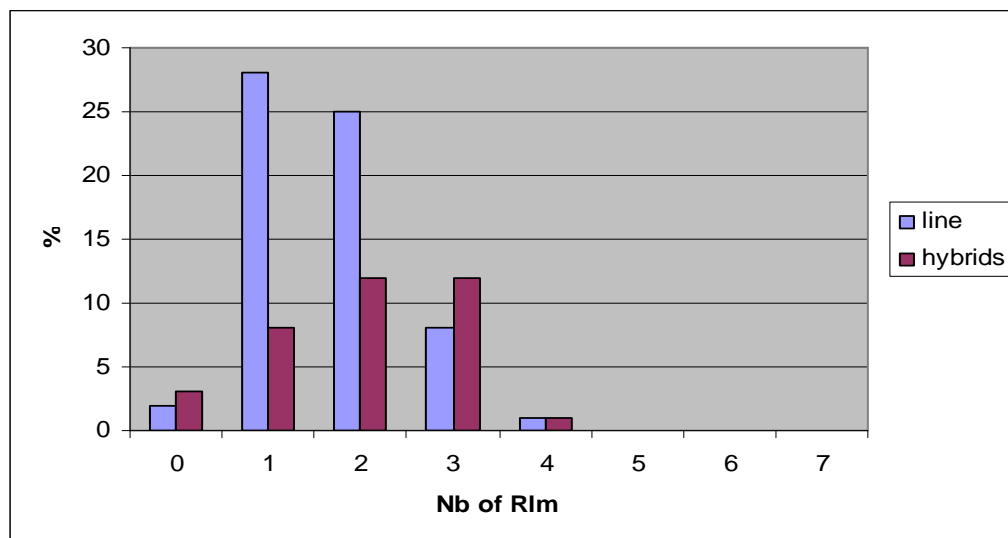


Rlm1, introduite la première fois dans Maxol (inscrite en France en 1992), contournée à la fin des années 90 (Rouxel et al 2003), est présente dans 49% des génotypes testés. *Rlm4* est présent dans 39 % des variétés. Seulement 11 cultivars (5 lignées, 5 hybrides, et une association variétale).ont à la fois *Rlm1* et *Rlm4*

Comme on peut le constater sur la figure n°1, on peut observer parmi les plantes testées d'un même génotype des hétérogénéités de réponse pour une ou plusieurs résistances spécifiques. Ceci a été le cas pour 45 génotypes et a été plus fréquemment trouvé pour les hybrides. C'est également systématique pour les associations variétales qui sont l'association d'un hybride mâle-stérile pour 70 ou 80% des plantes avec deux lignées pollinisatrices.

Le nombre moyen de résistances spécifiques identifiées par génotype est plus faible dans les lignées que pour le matériel hybride : 1,74 contre 2,55, respectivement. Les lignées expriment en général le phénotype d'une ou deux résistances, alors que dans les hybrides, où l'on peut introduire les résistances par chacun des parents, elles sont en général plus nombreuses. (Figure n°2).

Figure n°2 : Distribution des géotypes (hybrides ou lignées) en fonction des nombres de résistances spécifiques présentes. Distribution of genotypes (lines or hybrids) for the number of specific resistance per genotype.



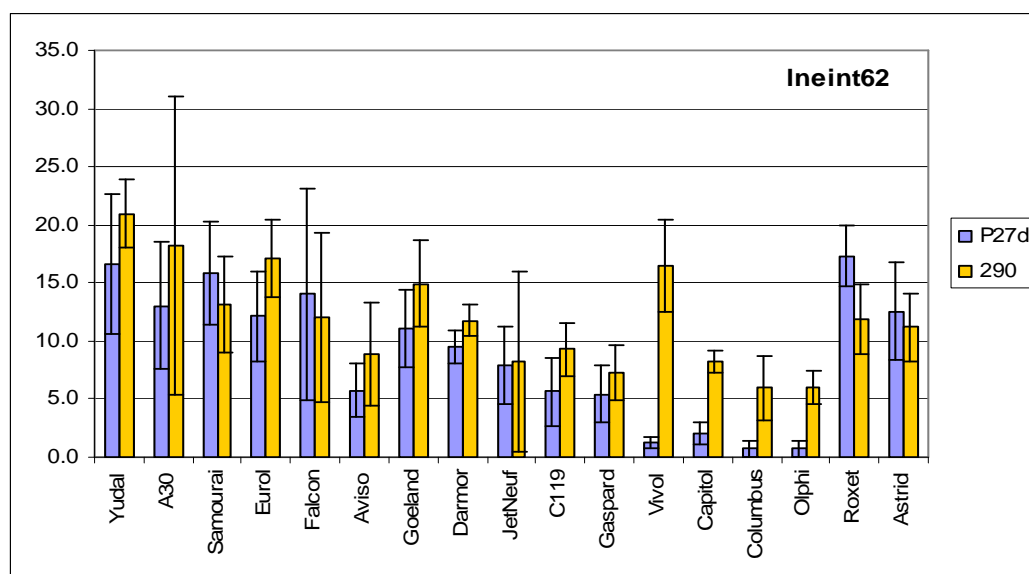
EVALUATION DES RESISTANCES QUANTITATIVES

Sur une première série expérimentale comprenant 8 géotypes de référence, 63 jours après inoculation, on trouve des différences significatives pour la taille de la nécrose entre d'un côté les variétés très peu sensibles et de l'autre côté les variétés sensibles ou moyennement sensibles (Tableau n°3). Sur une deuxième expérimentation comprenant 18 géotypes, la variabilité intra géotype ne permet pas une distinction aussi nette (Figure n°3). Lorsque l'on utilise la souche *AvrLm1*, la longueur des nécroses mesurées sur les variétés portant *Rlm1* sont nettement plus faibles, alors que l'utilisation de la souche virulente sur ces mêmes géotypes aboutit à des nécroses de taille voisines de celles enregistrées pour les variétés sensibles (cas de Vivol par exemple, Figure 3).

Tableau 3 : Evaluation des niveaux de résistance quantitative par la note de la longueur de la nécrose externe de 8 géotypes en conditions contrôlées 63 jours après inoculation (moyenne des 2 souches). ¹ Les géotypes avec la même lettre ne sont pas statistiquement différents. Evaluation of quantitative resistance through external necrosis note on 8 genotypes in controlled conditions. Stem necrosis is measured 63 days after inoculation (average of the 2 isolates). ¹ The genotypes with same letter are not significantly different.

| Géotype | Note de la nécrose externe à 63 jours (test de Duncan 5%) |
|----------|---|
| Falcon | 5,6 a ¹ |
| Yudal | 5,2 ab |
| Samourai | 4,7 ab |
| A30 | 4,4 b |
| Eurol | 4,1 b |
| Jet Neuf | 3,0 c |
| Darmor | 2,8 c |
| C119 | 2,6 c |

Figure 3 : Evaluation des niveaux de résistance quantitative (moyennes +/- écart-types) de 18 géotypes en conditions contrôlées par mesure de la longueur de la nécrose externe (en mm) 63 jours après inoculation d'un isolat portant (P27D) ou ne portant pas (290) l'avirulence *AvrLm1*. Evaluation of quantitative resistance (means +/- standard deviations) of 18 genotypes in controlled conditions. Stem necrosis (in cm) is measured 63 days after inoculation with an isolate having or not the *AvrLm1* allele.



DISCUSSION

L'identification des résistances spécifiques à *Leptosphaeria maculans* dans les variétés de colza d'hiver est basée sur le principe de la relation gène pour gène (Flor 1971). Cette identification nécessite de disposer des pathotypes adéquats à profils de virulences connus. Certains profils peuvent être trouvés dans des souches naturelles, d'autres nécessitent la réalisation de croisements entre souches sexuellement compatibles pour sélectionner dans la descendance les combinaisons souhaitées avec un minimum d'allèles avirulents (tel la souche v45.62, Tableau 2). Du fait de la liaison génétique entre certains gènes d'avirulence il n'est pas toujours possible d'obtenir les combinaisons souhaitées. Par ailleurs la diminution du nombre d'allèles avirulents peut se traduire par une réduction de l'agressivité des souches même sur variétés sensibles. Enfin, ces souches doivent être maintenues en conditions de confinement suffisant.

Des gènes de résistances spécifiques déjà contournés comme *Rlm1* ou *Rlm4* sont toujours présents dans un grand nombre de variétés. Ceci est en particulier vrai pour *Rlm1* présent dans la moitié des géotypes. Quand cette résistance a été introduite commercialement au début des années 90, le déterminisme génétique des résistances au Phoma n'était pas connu. Des variétés comme Maxol, Vivol ou Capitol purent donc, après leur inscription, être utilisées comme matériel résistant dans de nombreux départs de croisements en sélection, ce qui explique largement la dissémination de *Rlm1*. L'utilisation très répandue des haploïdes doublés a probablement favorisé cette tendance. Le caractère de gène majeur de la résistance *Rlm1* n'a été identifié qu'après (Ansan-Melayah et al 1998). En comparaison, on peut affirmer que la fréquence de *Rlm4* est finalement assez faible si on se souvient que cette résistance a été portée par des leaders de marché tels que Jet Neuf, Synergy ou plus récemment Pollen (Balesdent et al 2005).

La caractérisation des populations de *L. maculans* dans 21 sites en France a permis de disposer des fréquences des allèles *AvrLm1* et *AvrLm4* (Balesdent et al 2006). Parmi les motivations qui avaient amené le CETIOM à faire une recommandation d'alternance dès 2002, il y avait l'espoir que, compte tenu du coût écologique lié à la virulence, il pourrait être possible de produire une réaugmentation de la fréquence des phénotypes *AvrLm1* et *AvrLm4*, pour peu que l'on arrive à lever suffisamment la pression de sélection via les variétés utilisées (Pinochet et al 2004, Gladders et al 2006). Huang YJ et al (2006, 2009) ont démontré l'existence de coûts liés à la virulence pour *avrLm4*, et dans une moindre mesure pour *avrLm1*. Néanmoins, la présence à une haute fréquence dans les différentes variétés commercialisées des résistances *Rlm1* et *Rlm4* suggère qu'il sera difficile d'arriver à lever suffisamment la pression de sélection pour atteindre le résultat escompté.

Une nouvelle résistance spécifique efficace, *Rlm7*, a été introduite à partir de 2002, mais surtout à partir de 2004 via de nouveaux hybrides. Depuis cette période, chaque année, nous évaluons les nouvelles variétés pour identifier leurs résistances spécifiques. Il est important que les acteurs concernés aient en temps réel l'information de façon à accompagner le développement des variétés de conseils de gestion visant à limiter le risque de contournement. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des hybrides qui par ailleurs ont d'excellents résultats agronomiques.

Le développement des hybrides a également une autre conséquence : le nombre de résistances spécifiques cumulées dans une même variété augmente. Il est en effet plus facile de pyramider les gènes d'un caractère dominant en utilisant chacun des deux parents. Dans nos résultats nous avons pour certaines confrontations génotype / isolats des hétérogénéités entre plantes. Celles-ci se retrouvent logiquement pour les associations variétales. Par contre pour les lignées HD elle doit être absente. Ces hétérogénéités sont retrouvées pour 17% des variétés testées, sans que l'on puisse dire si la source se situe au niveau de la fixité du matériel dans le processus de sélection. L'origine de la variété (HD, sélection sur descendance, ou back cross) n'est pas du domaine public.

Delourme et al (2004) ont montré que plusieurs gènes de résistances spécifiques, dont *Rlm3* et *Rlm4* sont situés dans un même cluster de la carte génétique du colza. Néanmoins les cartes utilisées manquent de précision, et l'absence de recombinaison dans la zone ne permet pas de dire si ces deux résistances spécifiques sont bien distinctes ou constituent deux allèles différents d'un même locus. Pour les lignées fixées inscrites, nos résultats montrent que les deux phénotypes *Rlm3* et *Rlm4* ne sont jamais présents ensemble dans la même lignée. Cet élément constitue un argument dans le sens de la seconde hypothèse, celle de deux allèles d'un même gène.

De nombreux génotypes ont une seule résistance spécifique, inefficace compte tenu des fréquences des allèles avirulents dans les populations naturelles (Balesdent et al, 2006), comme *Rlm9* (61%), *Rlm2* ou *Rlm3*. Néanmoins, ces variétés montrent lors des évaluations au champ des niveaux très bas d'index G2, et sont classées Très Peu Sensible ([www://cetiom.fr](http://www.cetiom.fr)). Ce résultat contribue à souligner la réussite des programmes de sélection dans leur recherche de haut niveau de résistance quantitative.

Les tests d'évaluation des résistances quantitatives effectués soulignent l'intérêt et le bien fondé du choix de l'isolat du pathogène sur son profil de virulence pour s'affranchir des résistances spécifiques présentes. En effet les variétés portant *Rlm1* sont clairement résistantes à la souche *AvrLm1* avec ce test, alors que lors d'une inoculation avec l'isolat virulent *avrLm1*, des différences de réponses peuvent être observées (par exemple entre Vivol et Capitot ou Olphi, figure 3). Des résultats équivalents ont été obtenus avec des variétés portant ou ne portant pas *Rlm6* (résultat non montré). Ceci signifie que l'identification des résistances spécifiques est un préalable à l'utilisation de ce test. Néanmoins cela peut présenter l'inconvénient d'évaluer les résistances quantitatives de deux variétés, avec deux souches différentes, si les deux variétés ont des résistances spécifiques différentes. Il faudra alors veiller à ce que ces deux isolats aient, dans les conditions de l'expérimentation, des agressivités comparables, sans interactions avec les génotypes.

Par ailleurs les résultats obtenus sont plutôt encourageants pour distinguer les génotypes très sensibles des génotypes avec un fort niveau de résistance quantitative, mais il reste une

variabilité non contrôlée suffisamment importante pour empêcher, pour l'instant, une évaluation précise et en routine. Les difficultés ont plusieurs sources. Il y a d'abord la durée de l'expérimentation (environ 3 mois) qui rend difficile la conduite de l'expérimentation sans interférence avec un bioagresseur dans la chambre de culture. Il peut également y avoir des interactions non maîtrisées avec les conditions de culture ((substrat, modalités de fourniture d'azote).

CONCLUSION

Les évaluations de la résistance au Phoma au champ via l'index G2 et l'identification des résistances spécifiques se font depuis quelques années en routine. Dès le début de la commercialisation on peut donc fournir aux agriculteurs et à leurs conseillers des informations précises et utiles, permettant entre autres, une première étape vers des stratégies de gestion durable des résistances spécifiques. Par contre les méthodologies d'évaluation des résistances quantitatives en conditions contrôlées nécessitent encore du travail. Leur intérêt serait surtout de pouvoir prédire le comportement d'une variété après contournement de la résistance spécifique efficace, avant que ce phénomène ne se soit produit, en travaillant pour cela avec un isolat virulent.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère de l'Agriculture qui a contribué au financement de ces travaux dans le cadre d'un projet CASDAR, et d'un Projet CTPS.

BIBLIOGRAPHIE

- Aubertot JN., Schott JJ., Penaud A., Brun H., Doré T. 2004 Methods for sampling and assessment in relation to the spatial pattern of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*) in oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 110, n° 2, p. 183-192.
- Ansan-Melayah D., Balesdent M.H., Delourme R., Pilet M.L., Tanguy X., Renard M. et Rouxel T. (1998) Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breed* 117: 373-378
- Balesdent M.H., Barbetti M.J., Li H., Sivasithamparam K., Gout L., Rouxel T. (2005) Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology* 95: 1061-1071.
- Balesdent M.H., Louvard K., Pinochet X., Rouxel T. (2006) Large-scale survey of race structure of *Leptosphaeria maculans* in France. *European Journal of Plant Pathology* 114: 53-65.
- Delourme R., Pilet-Nayel M.L., Archipiano M., Horvais R., Tanguy X., Rouxel T., Brun H., Renard M., Balesdent M.H. (2004) A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* 94: 578-583.
- Delourme R., Chèvre A.M., Brun H., Rouxel T., Balesdent M.H., Dias J.S., Salisbury P., Renard M., Rimmer S.R. (2006). Major gene and polygenic resistance to *L. maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*) *European Journal of Plant Pathology* 114: 41-52.
- Fitt B.D.L., Brun H., Barbetti M.J., Rimmer S.R. (2006) World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 03-15.
- Flor H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Gladders P., Evans N., Marcroft S.J., Pinochet X. (2006). Dissemination of information about management strategies and changes in farming practices for the exploitation of

- resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). *European Journal of Plant Pathology* 114: 117-126.
- Howlett B.J. (2004) Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol. 26, n° 3, p. 245-252
- Huang Y.J., Li Z.Q., Evans N., Rouxel T., Fitt B.D.L., Balesdent M.H. (2006) Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* 114: 117-126.
- Huang Y.J. et al, (2009) Fitness cost of virulence differs between the AvrLm1 and AvrLm4 loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* (in press)
- Leflon M., Brun H., Eber F., Delourme R., Lucas M.O., Vallée P., Ermel M., Balesdent M.H. et Chevre A.M. (2007) Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor Appl Genet* 115: 897-906.
- Lô-Pelzer E, Aubertot, JN, Bousset L, Pinochet X, Jeuffroy MH, 2009: Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*/L *biglobosa*) of oilseed rape (*Brassica napus*): is the G2 Disease Index a good indicator of the distribution of the observed canker severities? *European Journal of Plant Pathology* sous presse On line June 2009 DOI 10.1007/s10658-009-9499-y
- Newmann P.L., 1984, Differential host-parasite interactions between oilseed rape and *Leptosphaeria maculans*, the causal fungus of stem canker. *Plant Pathology*, Vol. 33, p. 205-210,
- Pierre J.G. et Regnault Y. 1982 Contribution à la mise au point d'une méthode de plein champs destinée à mesurer la sensibilité des variétés de colza au Phoma. *Informations Techniques CETIOM*, n°81, p. 03-18
- Pinochet X., Mestries E., Penaud A., Delourme R., Chèvre AM., Renard M., Brun H., Bousset L., Balesdent M.H., Rouxel T., Aubertot J.N. (2003) Towards a durable management of genetic resistances to *Leptosphaeria maculans*. *OCL* 10(3):208-211
- Pinochet X., Balesdent M.H., Salvi F., Mestries E., Rouxel T. (2004) Identification of specific resistance to Phoma among oilseed rape varieties : interest for variety testing and for a promotion of a first step of a durable management of resistances. IOBC meeting Rothamsted UK march 2004 P11. *IOBC Bulletin* 27:101-108
- Rimmer S.R. (2006) Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol. 28, n° Suppl. S, p. S288-S297,
- Rouxel T., Penaud A., Pinochet X., Brun H., Gout L., Delourme R., Schmit J., Balesdent M.H. (2003) A ten year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* 109 : 871-881
- Sprague S.J., Balesdent M.H., Brun H., Hayden H.L., Marcroft S.J., Pinochet X., Rouxel T., Howlett B.J. (2006) Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* 114: 33-40
- Stachowiak A., Olechnowicz J., Jedryczka M., Rouxel T., Balesdent M.H., Happstadius I., Gladders P., Latunde-Dada A., Evans N. (2006) Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 114: 67-75.

**EVALUATION DE LA RESISTANCE QUANTITATIVE DU TOURNESOL
AU MILDIOU (*PLASMOPARA HALSTEDII*)**

D. TOURVIEILLE de LABROUHE⁽¹⁾, V. GRIMAUT⁽²⁾, F. SERRE⁽¹⁾, A. PENAUD⁽³⁾,
S. PERROT⁽²⁾, P. WALSER⁽¹⁾ et E. MESTRIE⁽⁴⁾

⁽¹⁾ INRA – UMR 1095 – 435 avenue du Brézet – 63100 Clermont-Ferrand – France
(dtourvie@clermont.inra.fr)

⁽²⁾ GEVES-SNES – Rue Georges Morel – BP 90024 – 49071 Beaucouzé Cedex – France
(valerie.grimault@geves.fr)

⁽³⁾ CETIOM, UMT pivert, 78850 Thiverval-Grignon, France (penaud@cetiom.fr)

⁽⁴⁾ CETIOM, UMT Tournesol, UMR Arche INRA/ENSAT – BP 32607 18, chemin de Borde-
Rouge - 31326 Auzeville-Tolosane (mestries@cetiom.fr)

RÉSUMÉ

Le tournesol (*Helianthus annuus* L.) présente une grande variabilité dans sa résistance quantitative vis-à-vis du mildiou indépendante des gènes *PI* de résistance race spécifique. Dans les programmes de sélection, cette résistance polygénique serait exploitable dans la mesure où nous disposons de méthodologie permettant de phénotyper les géotypes de tournesol.

Le développement d'outils de phénotypage en chambre de culture pour ce parasite classé comme organisme de quarantaine, est en cours. Cet article montre la complexité de cette mise au point et les avancées obtenues. L'infection foliaire précoce, au stade « 1^e paire de feuilles étalées » et l'observation du taux de plantes présentant des symptômes systémiques de mildiou apparaissent comme une méthodologie prometteuse.

Mots-clés : biotest, *Helianthus annuus*, résistance partielle, organisme de quarantaine, phénotypage

SUMMARY

EVALUATION OF QUANTITATIVE RESISTANCE TO DOWNY MILDEW (*PLASMOPARA HALSTEDII*) IN SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS*)

Sunflower show a large variability for resistance to downy mildew that is independent of major *PI* genes giving race specific resistance in breeding programmes. This quantitative resistance could be used in breeding programmes if a simple method to phenotype progenies became available. Methodological studies are in progress in confined growth chambers necessary for this quarantine parasite. This article describes their complexity and the results obtained so far. Infection of the first pair of true leaves and observation of the proportion of plants showing systemic downy mildew symptoms appear as a promising technique.

Key words: biotest, *Helianthus annuus*, partial resistance, quantitative parasite, phenotype

INTRODUCTION

Jusqu'à peu, la sélection du tournesol pour la résistance au mildiou était exclusivement basée sur l'exploitation des gènes *PI* de résistance complète (Vear et al., 2008). La capacité du parasite à surmonter ce type de résistance conduit à l'apparition de nouveaux pathotypes (Tourvieille de Labrouhe et al., 2005) mettant à mal la culture du tournesol dans les régions où les conditions printanières sont favorables au Mildiou (Délou et al., 2000). Des travaux récents (Tourvieille de Labrouhe et al., 2008, Vear et al., 2008) ont mis en évidence chez l'*Helianthus* cultivé des niveaux de résistance partielle très élevés et exploitables en sélection. Cette résistance qui apparaît additive, reste difficilement mesurable en plein champ. D'une part, du fait de la lourdeur du protocole qui doit respecter la réglementation liée à son statut de parasite de quarantaine et d'autre part, parce que le parasite présente une variabilité importante tant au niveau de sa virulence (Tourvieille de Labrouhe et al., 2000) que de son agressivité (Sakr et al., 2009 ; Tourvieille de Labrouhe et al., 2009). L'objectif de cette présentation est de faire le bilan des méthodes développées pour mesurer la résistance quantitative. La fiabilité des tests apparaît comme l'élément majeur qui doit permettre de phénotyper les hybrides proposés à la commercialisation. Deux méthodologies développées en chambre de culture sont comparées avec les observations d'attaques naturelles obtenues sous pression parasitaire élevée.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

MATERIEL FONGIQUE

Le pathotype de *Plasmopara halstedii* présent dans les expérimentations en plein champ a été caractérisé comme étant de la race 710 grâce à l'introduction dans l'essai de lignées différentielles reconnues internationalement. (Gulya et al. 1998). Pour les tests en chambre de culture, nous avons travaillé avec ce même pathotype.

MATERIEL VEGETAL

L'expérimentation a porté sur 54 hybrides issus des croisements entre 6 lignées mâles (83HR4, 90R18, Paz2, PR56, Psu7 et Pur5) et 9 lignées femelles (BT, Ha89, H52, Friga, FU, GU, GX, IR et SL72), correspondant à la variabilité de comportement connue dans les hybrides modernes. Toutes les lignées sont sensibles à la race de *Plasmopara halstedii* utilisée dans l'expérimentation.

OBSERVATION D'ATTAQUES NATURELLES

La méthodologie mise en œuvre est celle décrite par Tourvieille de Labrouhe et al. (2008). La résistance quantitative au mildiou est mesurée en calculant le pourcentage de plantes présentant des symptômes de fonte de semis, de jaunissement, de sporulation ou de nanisme typique d'infection primaire de mildiou. (Tourvieille de Labrouhe et al. 2000). Le nombre total de plantes levées par parcelle est compté 3 semaines après le semis (lorsque les plants sont au stade première paire de feuilles étalée). Le nombre de plantes sans symptômes est ensuite compté deux semaines après (au stade deux paires de feuilles) et par déduction nous obtenons le nombre de plantes malades. L'expérimentation a été reconduite deux années sur des parcelles du domaine de l'Inra à Clermont Ferrand, hébergeant la seule race 710. Afin de tenir compte d'une éventuelle hétérogénéité du niveau d'infestation du sol, dans chaque répétition 4 lignées sensibles (FU, GB, PR56, PSU7) sont implantées dans chaque répétition, les pourcentages de plantes malades des génotypes étudiés sont rapportés à la moyenne des taux d'attaque des 4 lignées de référence.

ESSAIS EN CHAMBRE DE CULTURE

Les chambres de cultures sont celles couramment utilisées pour les tests sur graines germées mises en œuvre pour caractériser le comportement des génotypes de tournesol aux différentes races de *Plasmopara halstedii* (Roche et al. 2005). L'éclairage assure un minimum de 12 000 lux en jour long (16h/24h) et la température voisine les 18°C avec une humidité qui varie de 65 à 90 %. Les plantules sont élevées dans des terrines sur substrat horticole ([Klasmann Seedlingsubstrat NF U 44-551](#)).

Infection racinaire : L'expérimentation reprend le protocole d'infection décrit par Cohen et Sackston (1973). Les graines sont mises à pré germer à l'humidité à 24-25°C. La contamination a lieu lorsque les germes atteignent 0,3 à 0,5 cm de longueur. L'homogénéisation du stade de germination est obtenue en plaçant les génotypes ayant une énergie germinative élevée au réfrigérateur. En effet, Serre et al. (2008) ont montré que le stade de germination avait une grande importance sur l'expression des symptômes. Les graines germées sont immergées durant 3 heures dans une suspension fraîche ajustée à 100 000 zoosporanges par ml. Elles sont ensuite repiquées dans le substrat préalablement humidifié puis élevée durant 12 jours dans les conditions normales de la chambre de culture. L'expérimentation a été reconduite deux fois à l'Inra à Clermont Ferrand. 4 génotypes sont analysés par terrine de 30x30 cm.

Infection foliaire : Les plantes sont élevées dans les mêmes conditions que pour l'infection racinaire. Cependant elle est réalisée au stade « première paire de feuilles étalée », 14 jours après le semis. Les plantules sont pulvérisées jusqu'à ruissellement avec une suspension de zoosporanges ajustée à 10 000 zoosporanges / ml. Immédiatement après, l'humidité saturante est maintenue par ensachage hermétique de la terrine durant 24 heures. Les plantes sont ensuite élevées dans les conditions normales de la chambre de culture durant 12 jours. L'expérimentation a été conduite sur deux sites différents : Inra (Clermont-Ferrand) et Geves (Angers). Afin d'assurer une croissance normale des plantules sur une période de 4 semaines, seuls 2 génotypes sont analysés par terrine de 30x30 cm. Pour des raisons de disponibilité de place (et de semences) seuls 36 hybrides ont été analysés en infection foliaire.

La lecture des symptômes se fait après 48 heures d'humidité saturante. Elle porte sur la fonte de semis et/ou la présence de sporulation sur la première paire de feuilles pour l'infection racinaire = vraies sensibles (VS) selon Tourvieille de Labrouhe et al. (2009) et sur la présence de sporulation ou de chlorose systémique pour l'infection foliaire.

RÉSULTATS

COMPARAISON DE LA PRESSION D'ATTAQUE POUR CHAQUE TYPE D'ESSAI (TABLEAU 1)

L'« agressivité » des tests dépend de nombreux facteurs qui sont soit liés aux conditions de cultures : le type de sol, la température et la pluviométrie pour les essais en plein champs ; le substrat, l'humidité et le type d'éclairage pour les essais en chambre, soit liés au pathogène : niveau d'infestation de la parcelle en infection naturelle ou niveau d'agressivité de la souche utilisée en test de laboratoire.

Tableau I : Comparaison du comportement de 54 hybrides de tournesol vis-à-vis d'attaques naturelles de mildiou et d'infections artificielles réalisées en chambre de culture.

| Hybrides | Infection naturelle (rapport aux témoins) | | Infection racinaire (% de malades) | | Infection foliaire (% sporulation) | | Infection foliaire (% de systémie) | |
|-------------------|--|-------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|----------|
| | 2006 | 2007 | Série 1 | Série 2 | Geves | Inra | Geves | Inra |
| BT x 83HR4 | 76,9 | 95,5 | 19,6 | 66,8 | - | - | - | - |
| BT x 90R18 | 27,2 | 65,6 | 19,7 | 13,7 | - | - | - | - |
| BT x PAZ2 | 82,1 | 64,0 | 4,9 | 3,1 | - | - | - | - |
| BT x PR56 | 61,2 | 42,4 | 29,2 | 85,0 | - | - | - | - |
| BT x PSU7 | 158,1 | 144,9 | 41,2 | 62,5 | - | - | - | - |
| BT x PUR2 | 94,5 | 87,6 | 29,5 | 50,0 | - | - | - | - |
| FRIGA x 83HR4 | 107,1 | 239,2 | 44,0 | 74,0 | 100,0 | 13,3 | 0,0 | - |
| FRIGA x 90R18 | 77,9 | 75,0 | 62,5 | 61,7 | 100,0 | 8,3 | 0,0 | - |
| FRIGA x PAZ2 | 54,3 | 38,9 | 6,8 | 27,3 | 100,0 | 5,0 | 0,0 | - |
| FRIGA x PR56 | 69,6 | 201,0 | 7,5 | 54,8 | 100,0 | 15,0 | 0,0 | - |
| FRIGA x PSU7 | 155,9 | 195,1 | 7,3 | 29,2 | 100,0 | 6,7 | 10,0 | - |
| FRIGA x PUR2 | 74,3 | 142,8 | 55,8 | 53,6 | 100,0 | 13,3 | 0,0 | - |
| FU x 83HR4 | 73,5 | 37,4 | 47,5 | 70,1 | 50,0 | 16,7 | 20,0 | - |
| FU x 90R18 | 39,5 | 22,7 | 15,1 | 23,4 | 100,0 | 8,3 | 30,0 | - |
| FU x PAZ2 | 74,8 | 68,0 | 14,1 | 7,5 | 100,0 | 11,7 | 10,0 | - |
| FU x PR56 | 41,0 | 49,3 | 0,0 | 2,1 | 90,0 | 25,0 | 0,0 | - |
| FU x PSU7 | 121,9 | 269,5 | 0,0 | 63,1 | 100,0 | 33,3 | 40,0 | - |
| FU x PUR2 | 95,4 | 92,1 | 12,5 | 50,1 | 60,0 | 23,3 | 0,0 | - |
| GU x 83HR4 | 150,8 | 49,5 | 57,9 | 71,4 | 10,0 | 13,3 | 50,0 | - |
| GU x 90R18 | 78,6 | 109,7 | 21,1 | 94,4 | 80,0 | 10,0 | 12,5 | - |
| GU X PAZ2 | 134,0 | 90,4 | 7,5 | 83,9 | 100,0 | 11,7 | 10,0 | - |
| GU x PR56 | 103,8 | 86,7 | 18,0 | 51,4 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | - |
| GU X PSU7 | 143,5 | 219,0 | 9,5 | 49,9 | 80,0 | 35,0 | 90,0 | - |
| GU X PUR2 | 142,8 | 216,7 | 35,0 | 28,9 | 90,0 | 35,0 | 20,0 | - |
| GX x 83HR4 | 87,1 | 103,3 | 27,7 | 42,8 | 50,0 | 0,0 | 0,0 | - |
| GX x 90R18 | 62,1 | 92,3 | 0,0 | 42,6 | 100,0 | 8,3 | 0,0 | - |
| GX x PAZ2 | 70,1 | 39,1 | 18,2 | 78,3 | 100,0 | 3,3 | 12,5 | - |
| GX x PR56 | 37,6 | 52,8 | 17,5 | 28,6 | 40,0 | 13,3 | 0,0 | - |
| GX x PSU7 | 113,8 | 208,0 | 19,0 | 92,7 | 100,0 | 13,3 | 10,0 | - |
| GX x PUR2 | 72,1 | 89,2 | 22,5 | 84,6 | 100,0 | 23,3 | 0,0 | - |
| H52 x 83HR4 | 108,8 | 119,8 | 36,4 | 49,4 | - | - | - | - |
| H52 x 90R18 | 110,4 | 113,6 | 70,8 | 100,0 | - | - | - | - |
| H52 x PAZ2 | 146,2 | 89,6 | 13,4 | 19,0 | - | - | - | - |
| H52 x PR56 | 149,1 | 88,4 | 37,5 | 43,7 | - | - | - | - |
| H52 x PSU7 | 174,1 | 175,2 | 37,5 | 59,5 | - | - | - | - |
| H52 x PUR2 | 124,6 | 135,3 | 47,3 | 54,8 | - | - | - | - |
| HA89 (CD) x 83HR4 | 106,6 | 79,0 | 45,0 | 29,0 | - | - | - | - |
| HA89 (CD) x 90R18 | 94,5 | 55,8 | 10,0 | 41,4 | - | - | - | - |
| HA89 (CD) x PAZ2 | 74,7 | 83,4 | 10,0 | 19,0 | - | - | - | - |
| HA89 (CD) x PR56 | 80,9 | 84,3 | 17,5 | 9,4 | - | - | - | - |
| HA89 (CD) x PSU7 | 173,5 | 158,9 | 9,5 | 45,0 | - | - | - | - |
| HA89 (CD) x PUR2 | 119,8 | 95,3 | 41,9 | 24,5 | - | - | - | - |
| IR x 83HR4 | 87,9 | 34,4 | 27,9 | 74,4 | 60,0 | 10,0 | 10,0 | - |
| IR x 90R18 | 28,2 | 11,8 | 0,0 | 40,9 | 100,0 | 10,0 | 0,0 | - |
| IR x PAZ2 | 72,4 | 36,5 | 0,0 | 32,6 | 100,0 | 8,3 | 0,0 | - |
| IR x PR56 | 72,5 | 29,6 | 10,0 | 54,2 | 100,0 | 36,7 | 10,0 | - |
| IR x PSU7 | 92,4 | 53,9 | 47,5 | 92,5 | 100,0 | 26,7 | 20,0 | - |
| IR x PUR2 | 38,1 | 28,5 | 2,5 | 55,6 | 100,0 | 13,3 | 0,0 | - |
| SL72 x 83HR4 | 132,4 | 264,5 | 60,5 | 91,7 | 100,0 | 45,0 | 37,5 | - |
| SL72 x 90R18 | 122,8 | 124,3 | 24,3 | 82,5 | 90,0 | 16,7 | 0,0 | - |
| SL72 x PAZ2 | 86,3 | 218,0 | 2,6 | 61,3 | 100,0 | 28,3 | 20,0 | - |
| SL72 x PR56 | 116,3 | 195,1 | 10,4 | 70,8 | 70,0 | 33,3 | 0,0 | - |
| SL72 x PSU7 | 170,1 | 192,8 | 31,5 | 60,0 | 90,0 | 43,3 | 30,0 | - |
| SL72 x PUR2 | 112,9 | 136,5 | 26,2 | 67,0 | 91,7 | 55,0 | 0,0 | - |
| Moyenne | | | 23,9 | 52,3 | 85,0 | 19,1 | 12,8 | - |

Infection naturelle : Les deux années se caractérisent par des pressions d'attaque très différentes. Les 4 témoins montrent 49,8 % d'attaque en 2006 pour seulement 29,2 % en 2007. Les hybrides extrêmes sont en 2006 : « BTx90R18 » à 27 % des témoins et « Ha89xPsu7 » à 173 % des témoins ; en 2007 : « Irx90R18 » à 12 % des témoins et « FuxPsu7 » à 269 % des témoins. Les deux observations sont hautement corrélées : $R = 0,594$ HS. Celles réalisées en chambres de culture seront comparées à la moyenne des 2 années.

Infection racinaire : Les deux tests ont été réalisés avec des souches différentes et dans des chambres de culture différentes. Les « agressivités » des tests varient du simple au double. En effet, pour les 54 hybrides analysés, nous avons observé un taux de plantes présentant les symptômes VS de 24 % pour la première expérimentation et du double (52 %) pour la deuxième expérimentation. Les deux observations sont hautement corrélées : $R = 0,408$ HS. Les moyennes des deux observations seront comparées aux moyennes des 2 années d'infection naturelle.

Infection foliaire : Les deux tests ont été réalisés avec des souches et dans des laboratoires différents. Les « agressivités » des tests montrent une très grande variabilité. Pour les 36 hybrides analysés, nous n'avons obtenu que 19 % de plantes présentant des sporulations à l'Inra alors que plus de 85 % des plantes ont montré des sporulations au Geves. Les taux observés au Geves sont beaucoup trop élevés pour être discriminants. Nous nous sommes donc intéressés au symptôme « chlorose systémique avec ou sans sporulation » : à l'Inra, seules quelques plantes ont montré ce type de symptôme pour près de 13 % au Geves en moyenne. Pour chaque site, nous avons retenu l'observation la plus discriminante : taux de plantes présentant une sporulation pour l'Inra (de 0 à 55 %) et taux de plantes présentant des symptômes systémiques pour le Geves (de 0 à 90 %). Ces deux séries de données sont corrélées : $R = 0.353$ S). Les moyennes des deux observations seront comparées aux moyennes des 2 années d'infection naturelle.

COMPARAISON DES OBSERVATIONS D'ATTAQUES NATURELLES AVEC LES ESSAIS EN CHAMBRE DE CULTURE

Infection racinaire : La figure 1 compare les observations d'infection naturelle avec les taux moyens de plantes présentant des symptômes « VS » au test mildiou classique : infection de graines germée. Les deux séries de données sont corrélées significativement $R = 0,295$ S.

Infection foliaire : La figure 2 compare les observations d'infection naturelle avec les taux moyens de plantes présentant des symptômes discriminants aux infections foliaires réalisées en chambre de culture. Les deux séries de données sont corrélées significativement $R = 0,550$ HS.

Comportement des génotypes extrêmes : Le tableau II présente les valeurs moyennes des 10 hybrides les plus résistants en infection naturelle et des 10 hybrides les plus sensibles.

Figure 1 : Comparaison du comportement vis-à-vis du mildiou de 54 hybrides de tournesol, en infection naturelle et lors de tests sur graines germées en chambre de culture.

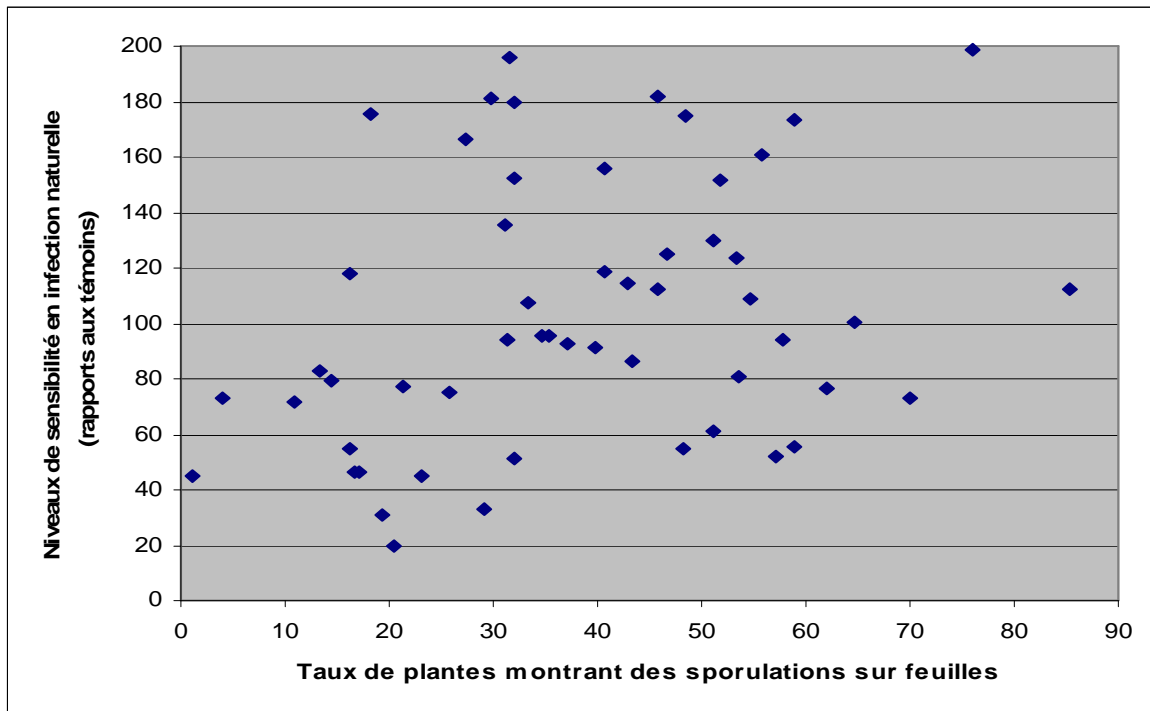


Figure 2 : Comparaison du comportement vis-à-vis du mildiou de 36 hybrides de tournesol, en infection naturelle et lors de tests sur plantules en chambre de culture.

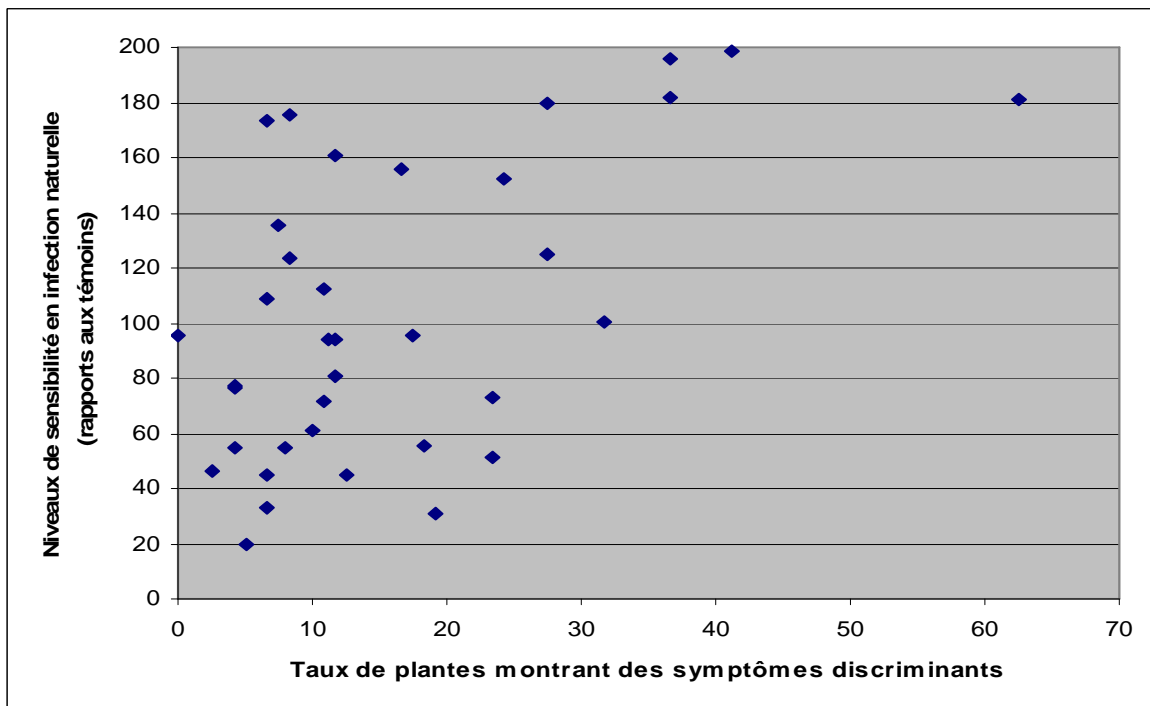


Tableau II : Comparaison du comportement vis-à-vis du mildiou des 20 hybrides de tournesol ayant un comportement extrême en infection naturelle vis-à-vis des infections artificielles réalisées en chambre de culture.

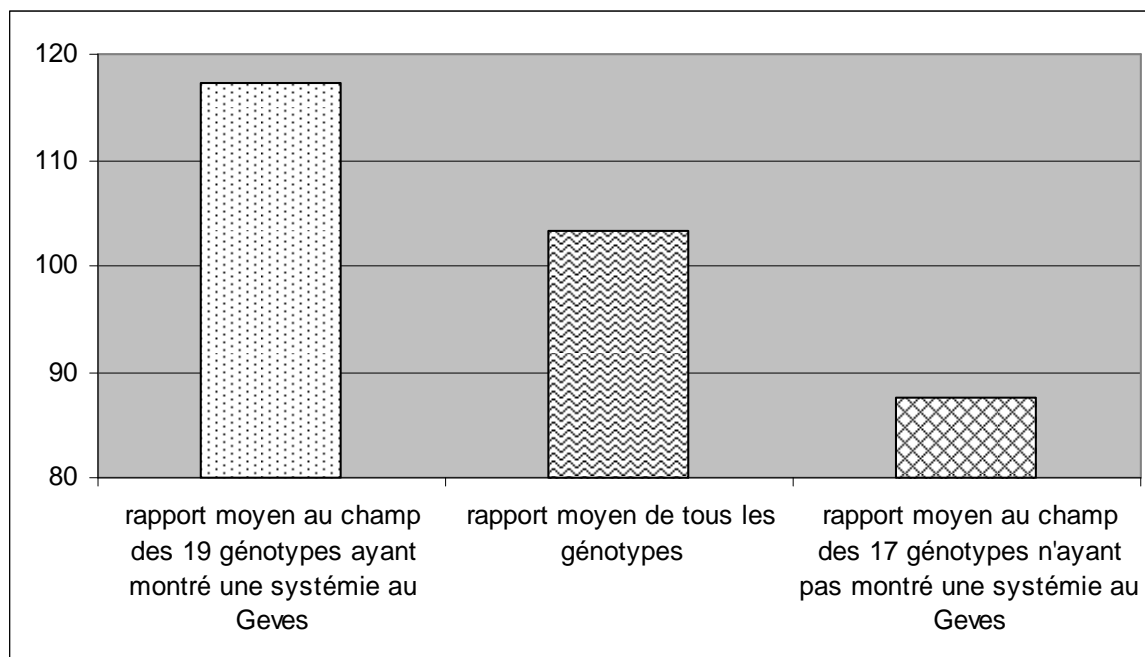
| Observations aux champs | Infections racinaires (%) en chambre de culture | | | Infections foliaires (%) en chambre de culture | | |
|---------------------------------|--|-------------|-------------|---|-------------|-------------|
| | mini | moy | maxi | mini | moy | maxi |
| 10 meilleurs hybrides | 1,0 | 23,2 | 57,1 | 4,2 | 10,6 | 23,3 |
| <i>10 plus mauvais hybrides</i> | <i>18,2</i> | <i>42,4</i> | <i>76,1</i> | <i>6,7</i> | <i>27,2</i> | <i>62,5</i> |

INTERET DU CRITERE « SYMPTOMES SYSTEMIQUE » POUR L'EVALUATION DE LA RESISTANCE PARTIELLE

Ce critère n'a pu être observé que dans l'expérimentation en infection foliaire menée au Geves. C'est le caractère systémique de la progression du parasite dans la plante qui est responsable des pertes de rendement en culture car il conduit au nanisme et à la stérilité du capitule.

Il est intéressant de noter que seulement la moitié de 36 hybrides ont montré ces symptômes. La figure 3 montre qu'ils apparaissent fortement liés à la sensibilité mesurée en infection naturelle.

Figure 3 : Comparaison des observations de symptômes systémiques de mildiou obtenus en chambre de culture et de la résistance partielle (rapport au 4 témoins de référence) mesurée au champ, chez 36 hybrides de tournesol.



DISCUSSION

Les interactions « horizontales » Robinson (1973) des génotypes de *Helianthus annuus* avec ses parasites sont dépendantes des facteurs environnementaux. De ce fait, les tests en laboratoire sont souvent peu fiables en rapport aux expérimentations en plein champ souvent multi locales et pluriannuelles (Ladsous et al., 1991 ; Viguié et al., 2000 ; Eva, 2002 ; Serre et al., 2004). Cependant, *Plasmopara halstedii* est un parasite de quarantaine dont la manipulation est très réglementée. De plus il présente de nombreuses races physiologiques spécifiques de telle ou telle région de production. Il apparaît donc difficile de mettre en place les expérimentations en plein champ nécessaire au phénotypage de variétés de tournesol. Nous nous sommes intéressés à la réponse d'hybrides de tournesol vis-à-vis du mildiou en absence de gène majeur efficace et dans des conditions de laboratoire. Serre et al. (2008) ont montré que lors des tests sur graines, la réponse des génotypes dépend, du stade du germe au moment de l'infection. Cette dépendance s'explique par le fait que le parasite envahit la plantule au niveau de l'extrémité de la radicule (Allard, 1978) et que pour provoquer les symptômes caractéristiques systémiques, il doit atteindre rapidement le méristème apical, or c'est sur ces symptômes que l'on juge le niveau de résistance partielle. Afin de développer un test indépendant de la vigueur germinative nous avons étudié le comportement des hybrides lors d'infections aériennes précoces (stade 1ere paire de feuille étalée) dans des enceintes respectant les normes de confinement imposées pour le mildiou du tournesol.

De nombreux critères ont été observés ; couleur, taille des plantes, poids, ..., seuls les syndromes de mildiou sont apparus pertinents. Si Serre et al. (2008) regrettaient que quelques génotypes présentant un intérêt indéniable apparaissent passablement sensibles au test sur graines germées, il semble que ce n'est pas le cas avec le test foliaire. En effet, tous les génotypes qui présentent, en infection naturelle, un rapport aux témoins inférieur à 50 %, montrent un taux de malades en infection foliaire en chambre de culture inférieure à 15 %. Par contre ce test foliaire apparaît peu discriminant lorsque l'objectif est de repérer les génotypes très sensibles puisque trois génotypes montrant un niveau de sensibilité supérieur au triple de la moyenne des témoins, présentent un taux de malades en infection foliaire inférieur à 15 %. Par contre si on cumule les informations obtenues avec les deux tests en chambre, seul un hybride (Friga x Psu7) apparaît plus résistant en laboratoire qu'en plein champ. Les résultats obtenus en infection foliaire apparaissent prometteurs. Il apparaît nécessaire de définir les conditions qui permettent d'obtenir les symptômes de systémie afin de gagner en fiabilité. De plus, nous avons montré que les souches de *Plasmopara halstedii* présentent une forte adaptabilité aux conditions des tests (Tourvieille de Labrouhe et al., 2009). L'agressivité des souches a doublé sur une dizaine de cycles. Ces résultats montrent qu'il est absolument nécessaire, comme cela a été démontré pour les observations en attaques naturelles (Tourvieille de Labrouhe et al., 2008), de disposer de génotypes de référence qui permettent de quantifier le niveau d' « agressivité » du test.

La résistance partielle observée lors des infections sur plantules doit découler de nombreux facteurs tels que la réceptivité des tissus et la résistance à l'invasion qui dépendent de très nombreux gènes de résistance (Mazeyrat et al. 1999). Ces facteurs sont difficilement analysables au champ et leurs études nécessiteront de disposer de protocole spécifique de laboratoire.

CONCLUSION

En 2000 nous avons affirmé, aux vues de l'évolution du mildiou sur le territoire français, que la seule utilisation de la résistance monogénique complète était une erreur stratégique (Tourvieille de Labrouhe, 2000). Les observations qui ont suivi ont confirmé l'absence de durabilité de cette méthode de lutte lorsqu'elle est utilisée seule (Tourvieille de Labrouhe et al., 2005). La mise en évidence d'une résistance non-race spécifique même partielle apporte un complément utile pour une utilisation plus raisonnée de l'ensemble des moyens de lutte disponibles : culturale, chimique et génétique. Aux vues de résultats préliminaires, il apparaît important d'améliorer notre méthodologie de test en laboratoire, afin de disposer d'un nouvel outil pour une gestion durable du mildiou du tournesol.

REMERCIEMENTS

Cette étude est soutenue par Promosol et par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (programme CASDAR).

BIBLIOGRAPHIE

- Allard, C. 1978. Invasion et colonisation systémique de la plantule de tournesol (*Helianthus annuus* L.) par le *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Toni. *Ann. Phytopathol.* 10, 197-217.
- Cohen Y. and WE Sackston. 1973. Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Bot.*, 51, 15-22.
- Délos M., N. Eychehenne I. Birba and C. Fabry. 2000. Etude des facteurs expliquant les fluctuations des attaques de *Plasmopara halstedii* en France. In : Proc. 15th Int. Sunf. Conf., Toulouse, France. Edit :Int. Sunfl. Assoc., Paris, France, 143-148.
- Eva B., 2002: The evolution of pathogenic agents attack in some sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids, under conditions of the agricultural research and development station of Podu-Iloaiei, Iasi District. *Cercetari Agronomice in Moldova* 35, 3-4.
- Gulya T.J., D. Tourvieille de Labrouhe, S. Masirevic, A. Penaud, K.Y. Rashid and F. Virányi, 1998. Proposal for Standardized Nomenclature and Identification of Races of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). p. 130-136. In: Proc of ISA, Symposium III, Sunflower Downy Mildew. Fargo, ND, USA. Edit :Int. Sunfl. Assoc., Paris, France, 130-136.
- Ladsous O., F. Vear and D. Tourvieille de Labrouhe. 1991: Heredity of resistance to *Botrytis cinerea* in sunflower (*Helianthus annuus*) measured by artificial infections. *Plant Breeding* 107, 235-241.
- Robinson R. A., 1973: Horizontal resistance. *Revue of Plant Pathology*, 52, 483-501.
- Roche S, Walser P, Serre F. 2005. Test de résistance du tournesol au mildiou (*Plasmopara halstedii*) en conditions contrôlées. *Cahier des techniques INRA N°spécial 2005* : 101-105.
- Sakr N., M. Ducher, J. Tourvieille, P. Walser, F. Vear and D. Tourvieille de Labrouhe. 2009. A Method to Measure Aggressiveness of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). *Journal of Phytopathology*. 157, 2, 133-136.
- Serre, F., P. Walser, D. Tourvieille de Labrouhe, and F. Vear, 2004: *Sclerotinia sclerotiorum* capitulum resistance tests using ascospores: Results over the period 1991-2003. p. 129-134. In: *Proceeding of the 16th Int. Sun. Conf.*, Fargo, ND, USA.
- Serre F., P. Walser, S. Roche, F. Vear and D. Tourvieille de Labrouhe, 2008. Research on a growth chamber test to measure quantitative resistance to sunflower downy mildew. In :

- Proc. 17th Int. Sunf. Conf., Cordoba, Spain. Edit: Junta de Andalucia - Consejeria de Agricultura y Pesca - Spain, 109-114.
- Tourvieille de Labrouhe, D. 2000. Disease control concerns everybody: The example of sunflower downy mildew. p. PL.C-1 – Pl.C-8. In: *Proceeding of the 15th Int. Sunf. Conf.* Toulouse, France.
- Tourvieille de Labrouhe D., E. Mestries and P. Walser, 2005: Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? *Oléagineux Corps gras Lipides* 12, 85-93.
- Tourvieille de Labrouhe D., E. Pilorgé, P. Nicolas and F. Vear. 2000. *Le mildiou du tournesol*. INRA and CETIOM, Paris, France, 176p.
- Tourvieille de Labrouhe D. F. Serre, P. Walser, S. Roche and F. Vear. 2008. Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica*, 164, 2, 433-444.
- Tourvieille de Labrouhe, D., P. Walser, F. Serre and J. Tourvieille, 2009. Variabilité de l'agressivité de *Plasmopara halstedii*, étude de sa stabilité en test de laboratoire. *Oléagineux Corps gras Lipides* 16, 1, 52-57.
- Vear F., H. Serieys, A. Petit, F. Serre, JP. Boudon, S. Roche, P. Walser and D. Tourvieille de Labrouhe, 2008. Origins of major genes for downy mildew resistance in sunflower. In : Proc. 17th Int. Sunf. Conf., Cordoba, Spain. Edit: Junta de Andalucia - Consejeria de Agricultura y Pesca - Spain, 125-130.
- Vear F., F. Serre I. Jouan P.F., Bert S., Roche, P. Walser, D. Tourvieille de Labrouhe, and Vincourt P. 2008. Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica*, 164, 2, 561-570.
- Viguié A., F. Serre, P. Walser, F. Vear, and D. Tourvieille de Labrouhe, 2000: The use of natural infections under controlled conditions and of artificial infections to estimate *Phomopsis* resistance of sunflower hybrids : conclusion after ten years of trials. p. K78 – K83. In: *Proceeding of the 15th Int. Sunf. Conf.*, Toulouse, France.

**UN NOUVEL INDICATEUR DE CLASSEMENT VARIÉTAL VIS-A-VIS DE LA
SEPTORIOSE PRENANT EN COMPTE LA PRECOCITE VARIETALE**

D. GOUACHE ⁽¹⁾, C. ROBERT ⁽²⁾

⁽¹⁾ ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, France

⁽²⁾ UMR 1091 INRA-AgroParisTech Environnement et Grandes Cultures ; 78850 Thiverval-Grignon, France

RÉSUMÉ

Résistance à la septoriose et précocité variétale sont souvent confondues dans les essais au champ, rendant la caractérisation variétale vis-à-vis de cette maladie difficile. Deux types d'expérimentation ont permis de proposer un indicateur de classement variétal. Cet indicateur est l'estimation de la durée en temps thermique entre l'émergence d'un étage foliaire et la chute de sa surface verte de 10%. L'émergence est calculée grâce à la notion de phyllotherme. La chute de surface verte est estimée avec l'ajustement d'une courbe de Gompertz aux notations. Sur 7 essais avec 6 à 9 variétés de précocités et de résistances variés où la maladie a été notée régulièrement, l'indicateur explique bien les variations de rendement. La démarche a été testée sur des essais comportant uniquement deux notations de maladie, ce qui a permis de donner des recommandations pour l'utilisation de l'indicateur.

Mots-clés : blé (*Triticum aestivum*), septoriose (*Mycosphaerella graminicola*), variété, précocité, phyllotherme

SUMMARY

A NEW INDICATOR TO EVALUATE WHEAT CULTIVAR RESISTANCE TO SEPTORIA THAT ACCOUNTS FOR DIFFERENCES IN EARLINESS

Resistance to septoria and earliness often have confounding effects at the field level, impairing efficient varietal evaluation. Two experiments were set up to propose an indicator decorrelating these phenomena. It is calculated as the thermal time from leaf layer emergence to initiation of disease-induced green area loss. Leaf layer emergence is calculated using the notion of phyllochron. Green area loss is calculated by fitting a Gompertz curve to observations. 7 trials with 6 to 9 cultivars of contrasting resistance and earliness showed that this indicator is strongly related to untreated yield. The indicator was also applied on data from typical variety trials that include only 2 disease observations. This allowed for recommendations to be formulated for the use of the indicator.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*), septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*), cultivar, earliness, phyllochron

INTRODUCTION

En France, la septoriose, maladie fongique foliaire causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est la plus dommageable sur blé tendre (*Triticum aestivum*). Elle peut engendrer des pertes de rendement de l'ordre de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la maladie est essentiellement basé sur la lutte chimique. Cependant, cette lutte chimique est doublement remise en cause. Le développement de résistances aux matières actives par le pathogène induit des baisses d'efficacité importantes (Maufras *et al.*, 2006 ; An., 2009). De plus, la pression sociétale s'est concrétisée par l'engagement pris lors du Grenelle de l'Environnement de réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques de 50% (An., 2007). La mise en oeuvre de méthodes de lutte non-chimiques est donc cruciale. Parmi ces méthodes de lutte complémentaire, le déploiement de variétés résistantes à la septoriose est une solution d'intérêt majeur. Dans des essais réalisés sur le site de Vraignes (80) sur 3 années, l'utilisation de variétés résistantes a permis de réduire l'investissement fongicide de l'ordre de 20 €/ha (Jorgensen *et al.* 2008). De plus, dans ces essais, la pression de maladie est moins variable d'une année à l'autre avec une variété résistante : entre les 3 années la nuisibilité des maladies variait de 35 q/ha sur les variétés sensibles mais seulement de 14 q/ha sur les variétés résistantes.

Identifier des génotypes résistants à la septoriose est donc un enjeu important. Mais, la sélection de résistances à la septoriose est un exercice difficile (Goodwin, 2007). Van Ginkel et Rajaram (1999) soulignent trois difficultés. La première est l'existence de corrélations entre le niveau d'attaque observé au champ à une date donnée et la précocité variétale. Cette corrélation, largement rapportée par la littérature (Arraiano *et al.* 2006, Simon *et al.* 2004, Danon *et al.* 82), entraîne des difficultés méthodologiques pour comparer le niveau de résistance des variétés. Arama *et al.* (1999), en notant une collection variétale non pas à la même date mais au même stade phénologique, montrent que cet effet n'est que corrélatif et n'est pas du à une liaison génétique entre résistance et précocité. Ce travail démontre l'importance de la prise en compte de la phénologie pour caractériser les variétés vis-à-vis de la septoriose. Mais la méthodologie proposée (notation au même stade phénologique) semble inadaptée pour une caractérisation variétale à grande échelle.

Plus spécifiquement, c'est la date d'émergence des étages foliaires qui joue un rôle clé dans la progression de la maladie (Shaw et Royle, 1993 ; Lovell *et al.*, 1997 ; Moreau et Maraite, 1999 ; Robert *et al.*, 2008). L'apparition de la maladie sur un étage foliaire est liée à la coïncidence entre son émergence et l'existence de conditions climatiques favorables. C'est pourquoi dans cette étude, on a cherché à mettre au point un indicateur de classement variétal tenant compte des différences de date d'émergence d'étages foliaires entre variétés. Cet indicateur est calculé à partir d'un suivi de la perte de surface verte des feuilles malades. C'est en effet cette perte de surface verte qui est à l'origine de la nuisibilité de la septoriose (Robert *et al.* 2004, 2006 ; Gate *et al.* 2006 ; Bancal *et al.* 2007). On a ajusté aux suivis de surface verte des courbes de Gompertz suivant la méthodologie proposée par Gooding *et al.* (2000). Ces courbes nous ont permis de déterminer la date de démarrage de la perte de surface verte (10% de surface nécrosée) qui est très fortement liée au rendement (Gooding *et al.* 2000).

Pour chaque variété, la durée entre la date d'émergence de l'étage foliaire étudié et la date où la surface verte a diminué de 10% a été exprimée en degré-jours (base 0). Dans ce travail nous proposons d'utiliser l'estimation de cette durée comme indicateur de classement variétal. Pour cet objectif, nous avons évalué le lien entre cet indicateur et le rendement sur deux séries d'expérimentations. La première série est caractérisée par des suivis fin de maladies et implique six à neuf variétés. Comme un suivi fin de maladie est difficilement envisageable en routine pour des essais d'évaluation variétale, on a également procédé à l'exploitation d'essais « classiques » moins intensifs en mesure de maladie.

MATERIEL ET MÉTHODE

CONDUITE DES EXPERIMENTATIONS

L'expérimentation 1 a été conduite sur sept sites-années (Tableau I) et impliquait 6 ou 9 variétés (Tableau II) sur chaque site.

Tableau I : Caractéristiques des essais de l'expérimentation 1

| Site-année | Département | Année de récolte | Nombre de variétés | Date de semis | Nombre de notations maladie |
|------------|-------------|------------------|--------------------|---------------|-----------------------------|
| 2007-A | 18 | 2007 | 6 | 14/10/2006 | 12 |
| 2007-B | 22 | 2007 | 6 | 03/11/2006 | 8 |
| 2007-C | 27 | 2007 | 6 | 16/10/2006 | 8 |
| 2007-D | 91 | 2008 | 9 | 09/10/2006 | 8 |
| 2008-A | 18 | 2008 | 6 | 15/10/2007 | 7 |
| 2008-D | 91 | 2008 | 9 | 19/10/2007 | 6 |
| 2008-E | 51 | 2008 | 6 | 09/10/2007 | 5 |

Tableau II : Caractéristiques des variétés de l'expérimentation 1

| Variété | Résistance à la septoriose | Précocité épiaison |
|-----------|----------------------------|--------------------|
| Apache | Sensible | Précoce |
| Charger | Sensible | Tardif |
| Dinosaur | Très sensible | Tardif |
| Koreli | Peu sensible | Très tardif |
| Paledor | Peu sensible | Précoce |
| Rosario | Sensible | Très tardif |
| Royssac | Très sensible | Précoce |
| Sogood | Peu sensible | Très tardif |
| Toisonдор | Peu sensible | Tardif |

Les essais ont été conduits avec deux modalités de traitement fongicide (non-traité¹ et traité selon le programme localement appliqué par l'expérimentateur) et en trois répétitions. Le reste de la conduite s'est faite selon les standards locaux. Les stades « Epi à 1 cm » et « Epiaison » ont été relevés. Les dates d'émergence des feuilles ont été calculées avec le modèle décrit

par Gate (1995). La septoriose a été notée à plusieurs reprises (cf. tableau 1).

Les trois essais de l'expérimentation 2 ont toutes été conduits dans l'Eure (27) en 2004, 2005 et 2007 (essais codés 27-2004, 27-2005 et 27-2007 respectivement). Ils impliquaient respectivement 44, 40 et 45 variétés conduites en traité et non-traité¹ fongicides. La septoriose a été notée uniquement deux fois sur ces essais.

Tous les essais ont été conduits avec 3 répétitions sauf 2007-D et 2008-D (deux répétitions). La septoriose a systématiquement été notée par étage foliaire, en pourcentage de surface nécrotique.

AJUSTEMENT DES COURBES DE GOMPERTZ

Les analyses ont été conduites avec le logiciel statistique R.

Les suivis de maladie ont été utilisés pour ajuster, pour chaque variété et étage foliaire, des courbes de Gompertz, selon la méthodologie déployée par Gooding (2000). Le modèle de Gompertz a cependant été écrit différemment afin de faciliter l'interprétation des résultats. L'équation de Gompertz et ses paramètres sont de la forme suivante :

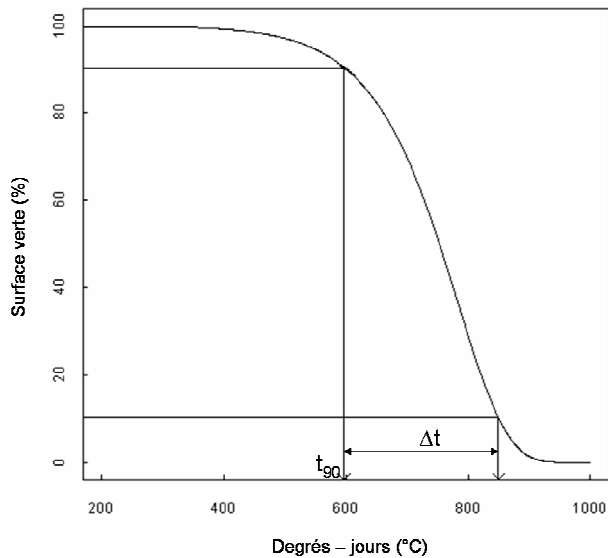
$$y(t) = 100 * e^{-\ln(10/9) * e^{\frac{b-a}{\Delta t}(t-t_{90})}}$$

avec y(t) le niveau de maladie au temps t, exprimé en degré-jours (base 0 °C), b = ln(ln(10/9)) et a = ln(ln(10)), Comme illustré par la figure 1, t₉₀ représente le paramètre de

¹ sauf maladies du pied

position de la courbe, exprimé comme le moment où 10% de la surface verte a été amputée par la maladie et Δt représente le paramètre de pente, exprimé comme le temps nécessaire pour passer de 90% à 10% de surface verte.

Figure 1 : illustration des paramètres de l'équation de Gompertz ajustée aux données de maladies



Pour l'expérimentation 1, cet ajustement a été fait numériquement avec la fonction nls() de R. Pour l'expérimentation 2, le fait de n'avoir que deux points empêche l'utilisation d'un ajustement statistique. On cherche à calculer deux paramètres et on dispose de deux notations y_1 et y_2 , réalisées aux temps t_1 et t_2 . On calcule donc les valeurs de t_{90} et Δt en résolvant le système de deux équations à deux inconnues suivant :

$$\begin{cases} y_1 = 100 * e^{-\ln(10/9) * e^{\frac{b-a}{\Delta t} (t_1 - t_{90})}} \\ y_2 = 100 * e^{-\ln(10/9) * e^{\frac{b-a}{\Delta t} (t_2 - t_{90})}} \end{cases}$$

Cela donne :

$$\Delta t = (a-b) * (t_2 - t_1) * \frac{1}{\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)}$$

$$t_{90} = \left(a * (t_2 - t_1) * \frac{1}{\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)} \right) + t_1 - \frac{\ln(-c_1)}{\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)} \text{ avec } c_1 = \ln\left(\frac{y_1}{100}\right), c_2 = \ln\left(\frac{y_2}{100}\right) \text{ et } 0 < y_i < 100.$$

RESULTATS

RENDEMENTS

On a observé sur tous les essais un effet significatif de l'interaction variété-fongicides (probabilités de $2.9 * 10^{-6}$, $5.7 * 10^{-3}$, $7.8 * 10^{-7}$, $1.8 * 10^{-3}$, $8.9 * 10^{-7}$, $2.4 * 10^{-3}$ pour les essais 2007-A, 2007-B, 2007-C, 2007-D, 2008-A et 2008-E respectivement), à l'exception de l'essai 2008-D (probabilité de 0.12) du fait d'un manque de précision sur la mesure du rendement des parcelles traitées de la variété Paledor. Les rendements ont été systématiquement plus élevés en conduite traitée (tableau III). On observe par ailleurs des nuisibilités (écarts traité – non-traité) très différentes entre variétés et généralement cohérentes avec les niveaux de résistance des variétés, exception faite de l'essai 2007-B, perturbé par une forte attaque de fusariose, et donc exclu des analyses ultérieures.

NOTATIONS MALADIES

Les courbes de Gompertz ont été ajustées pour chacun des deux étages foliaires supérieurs (F1 et F2) pour chaque parcelle (combinaison variété – traitement – bloc) de chaque essai. L'erreur quadratique moyenne de ces ajustements est de 2.36 en 2007 et 1.64 en 2008. Les valeurs de t_{90} des parcelles non-traitées ont été analysées par analyse de variance. Les valeurs ainsi calculées (tableau III) sont à la fois cohérentes avec les valeurs de rendement observées et avec les classements variétaux pressentis. Les mesures de t_{90} calculés sur F1 discriminent mieux les variétés que celles calculées sur F2. Cependant, même sur F2, on classe bien les variétés les plus résistantes, et les plus sensibles.

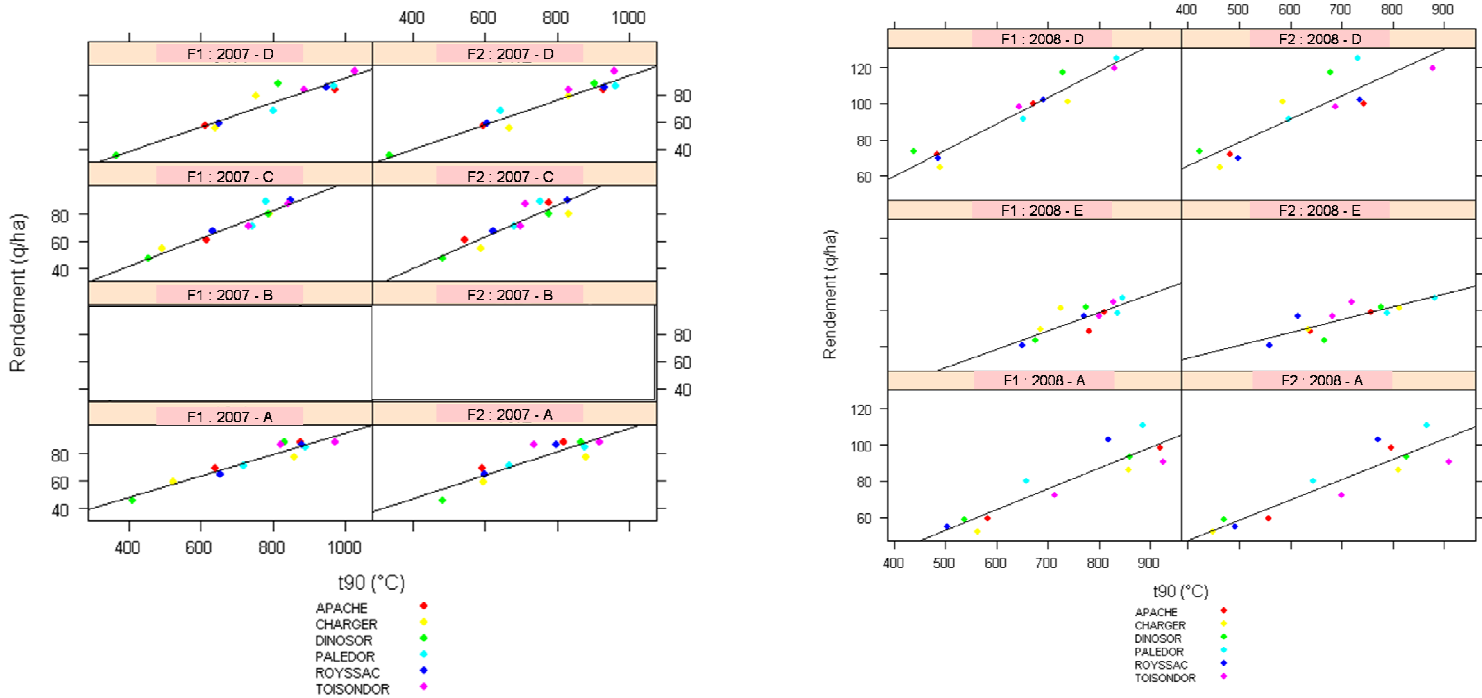
Tableau III : Résultats d'analyse de variance des essais de l'expérimentation 1 sur le rendement et sur les t_{90} des parcelles non-traitées : les modalités avec des lettres différentes sont significativement différentes à 5% (test de Tukey)

| Rendement des essais (q/ha) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|----|--------|--------|--------|-----|--------|----|
| Variété | | 2007-A | 2007-B | 2007-C | 2007-D | 2008-A | 2008-E | 2008-D | | | | | | | |
| Non-traité | APACHE | 68.97 | c | 55.97 | f | 61.2 | e | 57.6 | d | 59.23 | h | 68.13 | e | 71.9 | d |
| | CHARGER | 59.63 | d | 44.7 | g | 55.03 | f | 54.9 | d | 51.9 | i | 69.7 | e | 64.35 | d |
| | DINOSOR | 46.27 | e | 37.27 | h | 38.85 | g | 35.45 | e | 58.83 | h | 63.2 | f | 73.75 | d |
| | PALEDOR | 71 | c | 66.53 | e | 71.13 | cd | 67.85 | c | 79.87 | f | 78.2 | cd | 91.25 | c |
| | ROYSSAC | 64.83 | cd | 47.17 | g | 67.47 | d | 58.6 | cd | 54.53 | i | 60.63 | f | 69.85 | d |
| | TOISONDOR | 86.4 | a | 54.63 | f | 71.57 | c | 83.2 | b | 72.03 | g | 76.87 | d | 98.35 | c |
| Traité | APACHE | 88.57 | a | 85.13 | ab | 88.33 | a | 83.85 | b | 98.37 | c | 78.77 | cd | 100 | c |
| | CHARGER | 77.5 | b | 68.4 | e | 80.47 | b | 78.55 | b | 85.87 | e | 81.03 | bcd | 101.1 | c |
| | DINOSOR | 88.8 | a | 75.6 | d | 80.57 | b | 87.95 | ab | 93.53 | d | 81.83 | bc | 117.4 | ab |
| | PALEDOR | 84.9 | a | 90.37 | a | 89.3 | a | 86.15 | b | 110.57 | a | 87.03 | a | 125.35 | a |
| | ROYSSAC | 86.8 | a | 78.13 | cd | 90.5 | a | 85.25 | b | 102.7 | b | 76.9 | d | 102.3 | bc |
| | TOISONDOR | 88.2 | a | 83.6 | bc | 87.53 | a | 96.95 | a | 90.63 | d | 84.4 | ab | 119.25 | a |
| t_{90} des parcelles non-traitées des essais (°C) | | | | | | | | | | | | | | | |
| F1 | APACHE | 641.28 | c | | | 614.74 | ab c | 610.89 | b | 582.26 | b | 781.19 | ab | 484.24 | b |
| | CHARGER | 523.11 | d | | | 492 | bc | 638.61 | b | 562.85 | b c | 686.12 | ab | 490.39 | b |
| | DINOSOR | 410.85 | e | | | 453.74 | c | 366.09 | c | 538.06 | b c | 675.2 | b | 438.52 | b |
| | PALEDOR | 717.73 | b | | | 742.64 | a | 809.52 | a | 658.15 | a | 835.1 | a | 652.97 | a |
| | ROYSSAC | 651.83 | c | | | 633.27 | ab | 649.85 | b | 504.45 | c | 650.21 | b | 485.27 | b |
| | TOISONDOR | 820.09 | a | | | 733.21 | a | 886 | a | 712.35 | a | 799.64 | ab | 644.12 | a |
| F2 | APACHE | 591.9 | b | | | 545.94 | ab | 597.31 | b | 558.36 | b | 638.76 | bc | 481.36 | ab |
| | CHARGER | 596.71 | b | | | 587.86 | ab | 667.37 | ab | 449.46 | c | 634.27 | bc | 463.13 | ab |
| | DINOSOR | 481.61 | c | | | 484.16 | b | 336.21 | c | 469.82 | c | 666.94 | b | 422.54 | b |
| | PALEDOR | 669.24 | ab | | | 682.25 | a | 642.82 | b | 644.22 | a | 788.56 | a | 596.37 | ab |
| | ROYSSAC | 600.56 | b | | | 622.08 | ab | 606.68 | b | 492.13 | b c | 560.23 | c | 497.36 | ab |
| | TOISONDOR | 736.69 | a | | | 697.04 | a | 833.58 | a | 699.37 | a | 682.67 | b | 688.93 | a |

LIEN ENTRE t_{90} ET RENDEMENTS

Afin de valider la pertinence de l'indicateur choisi (le temps écoulé, en degré-jours base 0, entre l'émergence d'un étage foliaire et la perte de 10% de sa surface verte due à la septoriose), nous avons relié celui-ci au rendement observé sur les essais. La figure 2 représente ces relations pour les parcelles traitées et non-traitées, pour les six variétés communes à tous les essais (la qualité des relations reste la même en incluant les 3 variétés supplémentaires des essais 2007-D et 2008-D).

Figure 2 : Relations entre t_{90} et rendements pour les essais de l'expérimentation 1.



Toutes les régressions sont significatives à 5%, avec des coefficients de corrélation s'échelonnant de 0.61 à 0.94. On remarque que les relations sont plus chahutées pour les parcelles traitées, bien que celles-ci se situent dans le prolongement des parcelles non-traitées. Cela se traduit par des relations souvent non significatives lorsqu'on prend les parcelles traitées uniquement, alors que les relations restent fortement significatives lorsqu'on étudie uniquement les rendements non-traités. Cela correspond au fait que lorsque ce n'est plus la surface verte qui est le facteur limitant principal du rendement, grâce à un bon contrôle des maladies, d'autres facteurs limitants, qui peuvent être variétaux, s'expriment. L'indicateur choisi se relie donc très bien au rendement des variétés en conduite non-traitée, pour une large gamme de niveaux de résistance et quelque soit la précocité.

INTERPRETATION DE L'INDICATEUR T_{90}

L'indicateur t_{90} correspond au laps de temps entre l'émergence d'un étage foliaire et le décollage de la maladie sur l'étage foliaire en question. Cela correspond à visualiser les courbes d'évolution de la maladie en prenant pour chaque étage foliaire le temps zéro comme celui de l'émergence de l'étage foliaire en question (Figure 3).

La figure 3 illustre deux éléments clefs de notre démarche. Premièrement, l'indicateur choisi permet d'obtenir sur F1 et F2 un classement variétal pertinent et indépendant des précocités : malgré des précocités très différentes, les courbes d'évolution de la maladie des 3 variétés les plus résistantes se détachent nettement des autres. De plus, on observe que les courbes d'évolution de maladie ne se différencient qu'à partir de l'avant dernier étage foliaire.

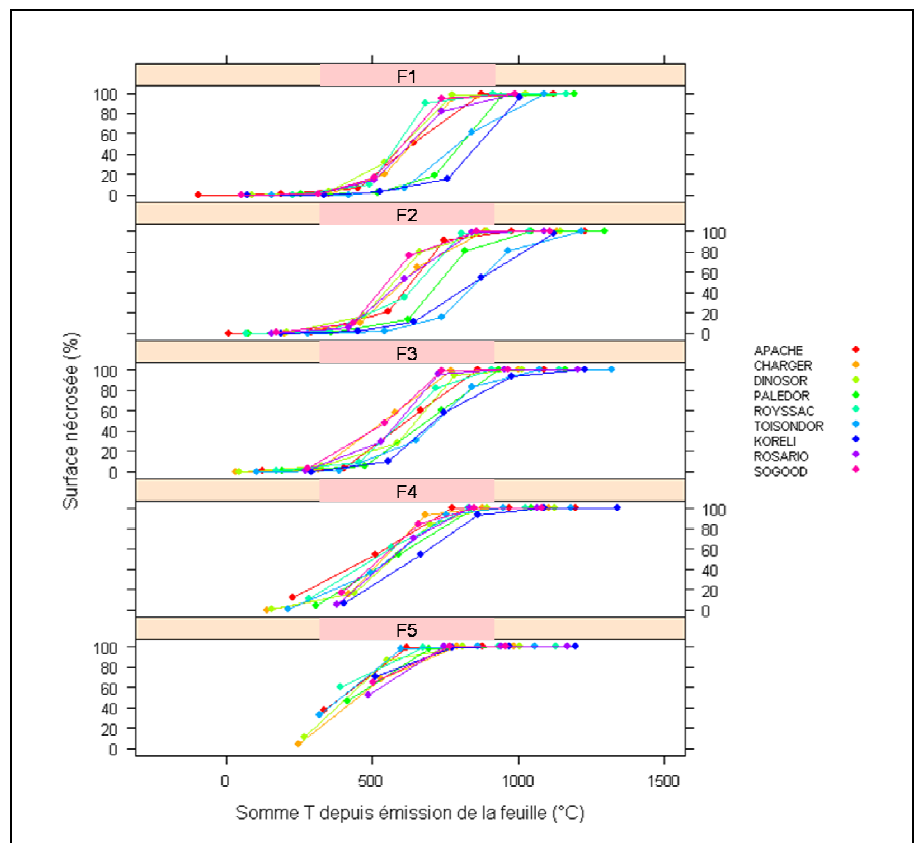


Figure 3 : Evolution des surfaces nécrosées (essai 2008-D, expérimentation 1) sur les 5 derniers étages foliaires (F1 = feuille drapeau), avec un axe des temps exprimé en degré-jours (°C base 0) depuis l'émergence de chaque étage foliaire.

MISE EN OEUVRE SUR DES DISPOSITIFS SIMPLIFIEES

Dans l'expérimentation 2, nous avons évalué la mise en oeuvre du calcul de l'indicateur t_{90} dans des dispositifs d'essais variétaux « classiques », ne faisant l'objet que de 2 notations de maladie et d'une observation de date d'épiaison. Comme avec les essais de l'expérimentation 1, on a évalué la qualité de l'indicateur au regard de sa relation avec le rendement des parcelles non-traitées. On a également évalué la qualité des relations entre chaque notation individuelle et le rendement. Les résultats des régressions et les éléments de contexte des essais sont récapitulés dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de l'expérimentation 2 (qualité des régressions de t_{90} et des valeurs des notations maladies avec le rendement non-traité et éléments explicatifs)

| Essai | t_{90} | | 1 ^{ère} notation | | 2 ^{ème} notation | | Nuisibilité (q/ha) | Evolution de la maladie | Ecart maximal de précocités (jours) |
|---------|----------|-------------|---------------------------|------------|---------------------------|-------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| | R^2 | p | R^2 | p | R^2 | p | | | |
| 27-2004 | -0.0099 | 0.45 | 0.07 | 0.04 | 0.059 | 0.06 | 11.1 | 6.52 | 13 |
| 27-2005 | 0.73 | $<10^{-11}$ | 0.41 | $<10^{-5}$ | 0.74 | $<10^{-12}$ | 29.5 | 58.54 | 11 |
| 27-2007 | 0.57 | $<10^{-8}$ | 0.22 | 0.00066 | 0.24 | 0.00035 | 24.1 | 67.34 | 21 |

Les essais de l'expérimentation 2 illustrent 3 situations différentes permettant de donner des recommandations quant à l'utilisation de l'indicateur.

L'essai 27-2004 correspond à un essai à faible pression de septoriose. De fait, quelque soit l'indicateur utilisé (t_{90} ou une des deux notations maladies), les relations sont faibles. De plus, on remarque une très faible évolution moyenne de la maladie entre les deux dates de notation : dans ces situations, l'évaluation du t_{90} est très peu précise. Dans les situations où la maladie évolue fortement entre les deux notations, on remarque que le t_{90} fournit de bonnes relations avec le rendement. L'utilisation de t_{90} fournit un résultat équivalent à une notation maladie en 2005. Par contre, en 2007, son utilisation donne un résultat bien meilleur qu'une notation maladie. On remarquera que ces deux années se différencient en terme d'écart de précocité à l'épiaison : l'utilisation de l'indicateur est d'autant plus intéressante que les écarts de précocité sont grands.

DISCUSSION

La corrélation négative entre précocité et niveau de septoriose généralement observée dans les essais est un problème majeur pour l'évaluation des résistances variétales vis-à-vis de cette maladie (Arama *et al.*, 1999 ; Arraiano, 2008). Nous avons développé une approche, basée sur la connaissance du rythme d'émergence des feuilles afin de tenter de corriger ce biais. Cette méthode se base sur le calcul d'un indicateur, t_{90} , qui correspond au temps, en degré-jours base 0 °C, qui s'écoule entre l'émergence d'un étage foliaire et le décollage de la maladie sur l'étage foliaire en question (10% de perte de surface verte).

Une première série d'essais montre que cet indicateur se relie très bien au rendement des parcelles non-traitées. Cette relation est meilleure sur F1 que sur F2. Cela correspond au fait que c'est le dernier étage foliaire qui contribue principalement au remplissage du grain et donc au rendement (Gooding *et al.* 2000, Robert *et al.* 2004, Bancal *et al.* 2007). Il est donc préférable de calculer l'indicateur sur F1, même si son calcul sur F2 permet également un classement pertinent. L'utilisation de l'indicateur sur des essais variétés « classiques » est plus délicat car il nécessite d'ajuster une courbe de Gompertz pour le calcul de l'indicateur à partir de seulement deux notations de maladie. Sur les essais disponibles, on montre que la pertinence de l'indicateur t_{90} dépend des essais. En particulier, il est nécessaire de noter une augmentation nette de maladie entre les deux notations.

Ces travaux mettent en lumière l'importance de la date d'émergence des feuilles sur le développement de la septoriose, souvent évoquée dans la littérature (Shaw, 1993 ; Lovell *et al.*, 2004) et récemment démontrée par modélisation (Robert *et al.*, 2008). L'observation de l'émergence des feuilles a déjà été utilisée pour améliorer l'application des produits fongicides (Paveley, 2000). Elle permet ici de décorréliser les effets précocité et résistance variétale. Pourtant, l'indicateur développé n'intègre pas le fait que les conditions climatiques rencontrées par les feuilles au moment de leur émergence peuvent être très différentes entre des variétés de précocités variées. Dans les essais dont il est ici question, il semble donc que les différences de conditions climatiques rencontrées ne soient qu'un effet d'ordre 2, le principal effet de la précocité étant donc un effet de décalage d'expression de la maladie. Les conditions nécessaires à l'infection pour la septoriose sont en effet considérées comme « lâches » (Shaw, 1991), ou peu contraignantes, ce qui expliquerait que, sous nos latitudes, les conditions rencontrées par les feuilles au cours de leur émergence ne soient pas si différentes en terme d'infections entre variétés.

Enfin, on observe que les différences variétales ne s'expriment que progressivement, aboutissant à des différences marquées sur F1 (feuille drapeau) et F2 mais qu'on ne voit pas (ou peu) sur les feuilles plus basses. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées. On pense à une expression différentielle de la résistance en fonction du stade de la plante (van Ginkel et Rajaram, 1999). Il est aussi possible que cette résistance se visualise mal à cause d'une durée de vie des feuilles plus courte. En effet, la septoriose étant une maladie à incubation lente, les différences ont moins le temps de s'extérioriser avant le début de la sénescence naturelle sur des feuilles basses dont la durée de vie est de 700°C par rapport à une F1 dont la durée de vie dépasse 900 °C.

CONCLUSION

L'émergence des feuilles du blé, élément clef du déroulement des épidémies de septoriose a permis, une fois prise en compte, de développer un indicateur de résistance du blé à la septoriose qui s'affranchit de la précocité variétale. Cet indicateur correspond au temps nécessaire, en degré-jours depuis l'émergence d'un étage foliaire, au décollage de la maladie sur l'étage en question. Les essais décrits ci-dessus ont permis de valider sa pertinence et de l'assortir de conditions d'utilisation. Il doit être calculé préférentiellement sur F1, éventuellement sur F2. Il est important pour le calculer de disposer de deux notations maladies entre lesquelles le niveau d'attaque par la septoriose a évolué fortement. Des travaux en cours permettront de préciser ces conditions d'utilisation, et d'expérimenter si un modèle de prévision de la maladie peut être utile pour positionner les deux observations.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Il a été soutenu par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. » La poursuite du travail est en cours avec l'appui du FSOV (Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale) dans le cadre du projet intitulé « Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *Mycosphaerella graminicola* ».

Les auteurs tiennent à remercier l'ensemble des équipes techniques des sites de Chalons, du Chaumoy, d'Écardenville, de La Minière et de Plélo qui ont permis d'obtenir les données. Julia Crombez et Virginie Delisle sont remerciées pour leurs analyses préliminaires des données. François Piraux et Florent Duyme sont remerciés pour leur appui statistique.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 2007. Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » in : Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »

http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf

Anonyme. 2009. Note commune : état des lieux et recommandations pour 2009. Perspectives Agricoles 354, 48-52.

Arama, P. F., Parlevliet, J. E., van Silfhout, C. H., 1999. Heading date and resistance to septoria tritici blotch in wheat not genetically associated. *Euphytica* 106, 63-68.

Arraiano, L. S., Brading, P. A., Dedryver, F., Brown, J. K. M., 2006. Resistance of wheat to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) and associations with plant ideotype and the 1BL-1RS translocation. *Plant Pathology* 55, 54-61.

Arraiano L. S, 2008. Genetics and breeding for durable resistance to cereal diseases, particularly septoria tritici blotch. 7th International *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Symposium. Ascona, Switzerland (August 18-22, 2008)

Bancal, M.O., Robert, C., Ney, B, 2007. Accounting for wheat crop growth and yield losses by accelerated green leaf layer losses due to late leaf rust and blotch epidemics. *Annals of Botany* 100, 777-789.

Danon, T., Sacks, J. M., Eyal, Z.. 1982, The Relationships Among Plant Stature, Maturity Class, and Susceptibility to Septoria Leaf Blotch of Wheat. *Phytopathology* 72, 1037-1042.

Gate, P. 1995. Ecophysiologie du blé. ITCF, Tec&Doc/Lavoisier (Eds.)

Gate, P., D. Gouache, C. Robert, M. O. Bancal, C. Lannou, B. Ney. 2006. Quel indicateur plante pour rendre compte de la nuisibilité de la septoriose ? In 8ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Gooding, M. J., Dimmock, J., France, J., Jones, S. A., 2000. Green leaf area decline of wheat flag leaves: the influence of fungicides and relationships with mean grain weight and grain yield. *Annals of Applied Biology* 136, 77-84.

Goodwin, S. B. 2007. Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australasian Plant Pathology* 36 (6):532-538

Jorgensen, L.N., Jahn, M., Clark, W., Antichi, D., Goral, T., Schepers, H., Lucas, P., Rolland, B., Gouache, D., Hornok, L., 2008. Endure Wheat Case Report

Jorgensen, L.N., Gouache, D. 2008. Limiter les maladies sans avoir recours aux fongicides ? *Perspectives Agricoles* 348, 52-56

Lovell, D. J., Parker, S. R., Hunter, T., Royle, D. J., Coker, R. R., 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* 46, 126-138.

Lovell, D. J., Hunter, T., Powers, S. J., Parker, S. R., van den Bosch, F.. 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53, 170-181.

Maufras J. Y., Maumene C., Couleaud G., Bousquet N, 2006. Comment résister à la résistance? *Perspectives Agricoles* 328, 30-36

Moreau, J. M., Maraite, H.. 1999. Integration of knowledge on wheat phenology and *Septoria tritici* epidemiology into a disease risk simulation model validated in Belgium. *Aspects of Applied Biology* 55, 1-6.

Paveley, N. D., Lockley, D., Vaughan, T. B., Thomas, J., Schmidt, K., 2000. Predicting effective fungicide doses through observation of leaf emergence. *Plant Pathology* 49, 748-766.

R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Robert, C., Bancal, M. O., Nicolas, P., Lannou, C., Ney, B., 2004. Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany* 55, 1079-1094.

Robert, C., Bancal, M.O., Lannou C., Ney B., 2006. Quantification of the effects of *Septoria tritici* blotch on wheat leaf gas exchange with respect to lesion age, leaf number, and leaf nitrogen status. *Journal of Experimental Botany* 57, 225–234.

Robert C, Fournier C, Andrieu B, Ney B. 2008. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant–pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology* 35, 997–1013.

Shaw, M. W., Royle, D. J., 1993. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 42, 882-899.

Simon, M. R., Worland, A. J., Struik, P. C., 2004. Influence of Plant Height and Heading Date on the Expression of the Resistance to *Septoria Tritici* Blotch in Near Isogenic Lines of Wheat. *Crop Science* 44, 2078-2085.

van Beuningen, L. T., M. M. Kohli. 1990. Deviation from the regression of infection on heading and height as a measure of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Plant Disease* 74:488-493.

van Ginkel, M., Rajaram, S., 1999. Breeding for Resistance to the *Septoria*/*Stagonospora* Blights of Wheat. In: van Ginkel, M., A. McNab, and J. Krupinsky, eds. 1999. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, D.F.: CIMMYT.

TOLÉRANCE DU BLÉ À LA SEPTORIOSE

¹M.-O. BANCAL (AgroParisTech ; UMR1091), ¹P. BANCAL (INRA EGC ; UMR1091),
¹R. BEN SLIMANE (thèse INRA EGC), ²P. GATE (Arvalis), ²D. GOUACHE (Arvalis)

(1) UMR 1091 INRA-AgroParisTech Environnement et Grandes Cultures
78850 Thiverval-Grignon, France

(2) ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL, Chemin de la Petite Minière
78280 Guyancourt, France

RÉSUMÉ

Au-delà de leurs caractéristiques propres, la nuisibilité de nombreux stress biotiques ou abiotiques (azote, sécheresse, maladies) repose largement sur une diminution accélérée et/ou anticipée de la surface verte des feuilles. Ces effets sur l'indice foliaire vert et son évolution au cours du temps (IFVI) induisent une modification du transfert des éléments carbonés et azotés depuis les parties végétatives vers les grains. Nous cherchons donc à caractériser :

- les paramètres physiologiques et structuraux impliqués dans la tolérance, c'est-à-dire la capacité à maintenir un niveau donné de production et/ou de qualité en présence de stress déclaré,
- l'utilisation de l'IFVI comme indicateur plante capable de caractériser et de qualifier la tolérance variétale en présence de un ou plusieurs types de stress.

La septoriose sera particulièrement étudiée parce que la tolérance revêt un intérêt important pour la durabilité des résistances variétales à cette maladie.

Nous présentons ici une première analyse de sensibilité permettant de hiérarchiser les effets principaux qui interviennent dans l'expression d'une tolérance générale aux stress passant par la variation d'IFVI.

IMPORTANCE DE LA NOTION DE TOLERANCE AUX STRESS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES, DANS LE CONTEXTE ACTUEL ET A VENIR DE LA PRODUCTION CEREALIERE

La pression réglementaire sur les intrants et tout particulièrement sur les pesticides (Ecophyto 2018) constitue un nouveau défi pour l'agriculture durable: comment assurer un niveau de production et de qualité en présence de stress biotiques plus fréquents? D'autre part, l'augmentation du coût des fertilisants azotés, directement lié au prix du pétrole laisse également présager une apparition plus fréquente de carences azotées, avec également des incidences sur le rendement et la qualité. En outre, le changement climatique participe directement à une évolution croissante des stress abiotiques (sécheresse, canicule). Cette évolution climatique caractérisée par plus d'aléas, laisse aussi entrevoir une variabilité spatiale plus forte et plus aléatoire du développement des maladies. De ce fait, il y aura une succession ou une coexistence plus importante de différents types de stress biotiques et/ou abiotiques au cours d'une même culture.

Face à un tel contexte, la caractérisation et la gestion d'une tolérance générique à plusieurs types de stress prend donc plus d'importance. Par tolérance, on entend la capacité à maintenir un niveau donné de production et/ou de qualité en présence de stress déclarés. C'est-à-dire que la tolérance s'oppose directement à la nuisibilité. La tolérance est un caractère plus durable que les résistances monogéniques car elle ne soumet pas les bioagresseurs à une pression de sélection unique. Elle est complémentaire de l'échappement qui vise à limiter l'exposition aux stress des organes sensibles, par un décalage de cycle biologique et/ou de position des organes. Tout comme l'échappement, la tolérance résulte de caractéristiques variétales (=résistance quantitative) en interaction avec les pratiques culturales.

Parmi les maladies du blé tendre d'hiver, la septoriose foliaire (*Septoria tritici* = *Mycosphaerella graminicola*; STB) est la plus fréquente et dommageable en Europe du Nord. La tolérance comme l'échappement à cette maladie revêtent un intérêt important pour la durabilité des résistances variétales, dans un contexte de perte d'efficacité de certaines molécules (strobilurines) et de limitation d'usage probable des triazoles, les plus efficaces actuellement sur le marché. Cette maladie, résultant d'une contamination hivernale et printanière des nouvelles feuilles lors des pluies, n'exprime des symptômes que longtemps après la contamination et ne se traduit donc par une baisse de croissance et de rendement que si les trois dernières feuilles sont atteintes. Les dates de déclenchement des traitements fongiques sont donc particulièrement cruciales et leur minimisation comme leur réussite partielle rattrapable par l'usage de variétés tolérantes.

UN OUTIL SIMPLE DE CARACTERISATION DE LA TOLERANCE AUX STRESS: L'INDICE FOLIAIRE VERT INTEGRE (IFVI)

Face à des attaques de maladies foliaires, à des carences azotées, à des stress hydriques, les effets principaux observés ainsi que les mécanismes majeurs les plus affectés à l'échelle de la plante sont le plus souvent les mêmes. De nombreuses références montrent que l'impact le plus nuisible résulte d'une réduction de la production de matière sèche nouvellement formée par une réduction du fonctionnement photosynthétique des feuilles, en particulier au cours du remplissage des grains. Ce fonctionnement est altéré d'abord par une expansion foliaire réduite et d'autre part par une anticipation de la sénescence naturelle.

Ces effets peuvent être quantifiés *via* un indicateur simple, exprimant l'évolution de l'indice foliaire vert au cours du temps: l'IFVI (Robert et al, 2004; Gate et al., 2006; Bancal et al, 2007). Concrètement, on estime l'indice foliaire vert d'une parcelle à plusieurs reprises entre un stade initial (épiaison ou floraison) et la maturité physiologique. On obtient ainsi une courbe exprimant l'évolution de l'indice foliaire vert depuis un maximum initial, jusqu'à sa disparition par sénescence (Fig 1a). L'intégration de cette courbe (la surface sous la courbe) est la valeur de l'indice foliaire vert intégré (IFVI). Sur un jeu de parcelles impliquant des doses d'azote ou de fongicides croissantes et variées, Gate et al. (2006) ont constaté que l'IFVI est très fortement corrélé au rendement final selon une relation ascendante, suivie d'un plateau (Fig 1b).

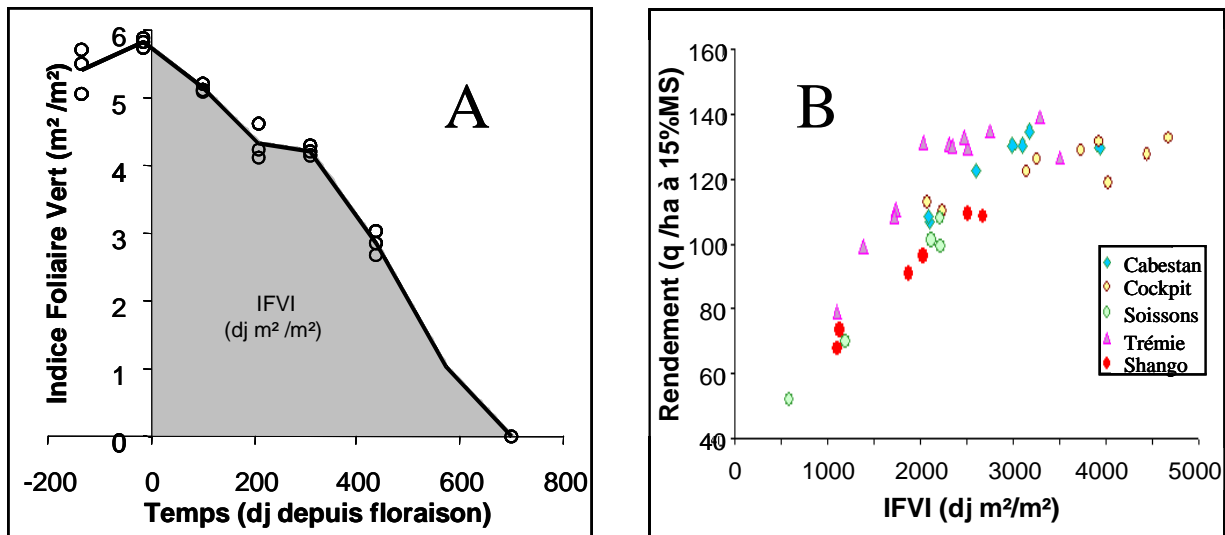


Figure 1: principe de calcul de l'IFVI, et relation avec le rendement

L'existence d'un plateau caractérise une zone où l'IFVI peut être réduit sans incidence sur le rendement, c'est-à-dire où la culture est tolérante aux stress. D'autre part, la loi commune observée entre IFVI et rendement présente une forte influence du génotype, ouvrant la voie à une caractérisation variétale de la tolérance aux stress.

EXPLICITATION DE LA RELATION ENTRE L'IFVI ET LE RENDEMENT : COMPRENDRE LES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE

La bibliographie (Cornish et al, 1990; Gaunt & Wright, 1992; Zuckerman et al, 1997 ; Parker et al, 2004) propose plusieurs voies potentielles de tolérance du rendement aux stress biotiques post-floraison, dont les deux premières sont directement liées à l'IFVI: (1) l'indice foliaire initial; (2) la durée de vie verte exprimant la durée de maintien en remplissage; (3) la relation entre indice foliaire et interception de la lumière *via* la structure du couvert; (4) la photosynthèse par unité de surface verte présente; (5) les réserves des tiges, en particulier dans le cas de maladies tardives ne jouant pas sur la constitution des stocks ante-floraison. On pourrait y ajouter à un autre niveau (6) le déterminisme de la force de puits de l'épi (nombre et poids des grains ; Bingham et al, 2009). Ces six voies peuvent être également proposées dans le cas des stress abiotiques.

IFVI ET TOLERANCE DE L'INTERCEPTION DU RAYONNEMENT : UNE ANALYSE DE SENSIBILITE

A tout instant au cours du remplissage, l'indice foliaire peut être relié à l'interception de la lumière (PAR) par la loi de Monteith (1977) : $\square_i = 1 - e^{-k \cdot IF}$, où \square_i est l'efficacité d'interception du PAR (entre 0 et 100%), IF est l'indice foliaire, et k un paramètre lié à la structure du couvert. Nous avons intégré cette relation entre floraison et maturité physiologique pour obtenir une relation entre IFVI et cumul de lumière absorbée par les surfaces vertes, directement relié à l'assimilation nette par photosynthèse. Nous présentons ici une analyse de sensibilité à partir de données simulées. Elle permet de hiérarchiser les effets principaux intervenant dans l'expression d'une tolérance de l'absorption du PAR passant par la variation d'IFVI.

a) Génération de séries de courbe d'indices foliaires verts

Nous avons paramétré une série de courbes sigmoïdes représentant l'évolution de l'indice foliaire vert à partir de valeurs initiales variant entre 1 et 6 (Fig 2a). Cette série de courbes simulées est compatible avec des données d'archives de couverts sains. Nous avons alors simulé l'impact d'une maladie sans résistance ni échappement (Fig 2b). Dans ce cas, la maladie progresse initialement à la même vitesse quelque soit l'indice foliaire initial ; donc en proportion beaucoup moins vite si l'indice foliaire initial est fort (Fig 2c).

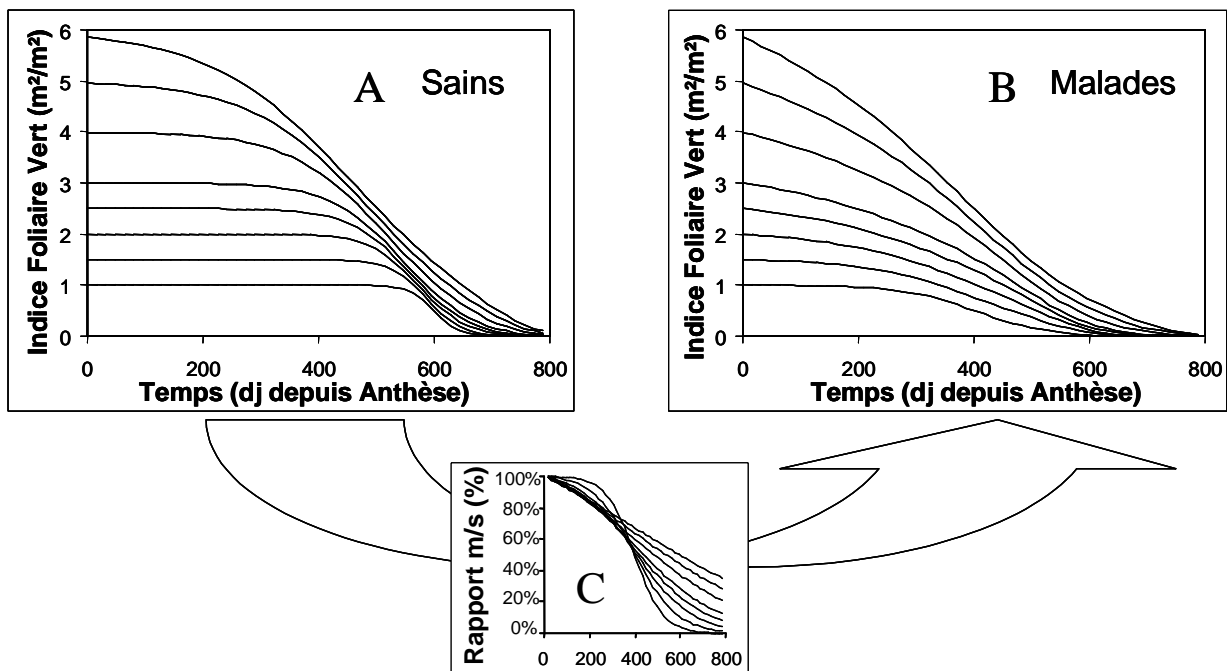
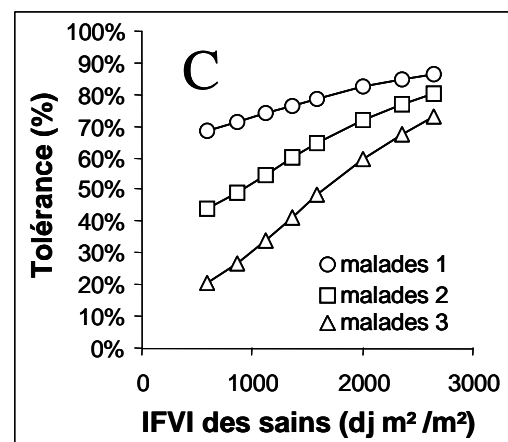
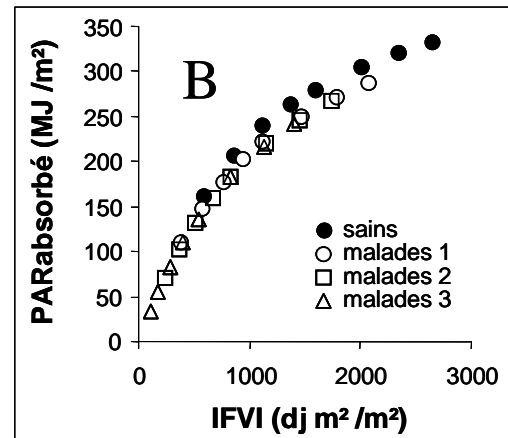
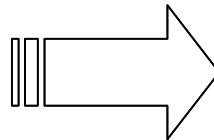
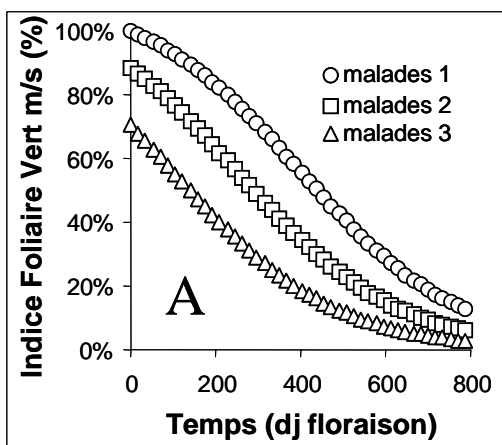


Figure 2: Evolution de l'Indice Foliaire Vert à partir d'une valeur initiale de 1 à 6 dans une série de couverts virtuels avec l'effet d'une maladie et de la sénescence qu'elle induit.

b) Relation entre l'IFVI et la tolérance de l'absorption à des épidémies plus ou moins précoces.

Les couverts simulés selon les principes énoncés en (a) ont été soumis à trois épidémies types (maladies 1, 2 et 3) différant par leur date de démarrage. Seuls les effets de la maladie sur la dégradation des surfaces vertes sont pris en compte dans cette simulation. En conséquence, plus la maladie est tardive (maladie 1), plus tard la surface verte est affectée. Dans ce premier cas, la surface verte n'est réduite de moitié par rapport au témoin que 400 dj post floraison, alors que dans le cas des maladies moyenne (maladie 2) ou précoce (maladie 3), ce point est atteint dès 250 dj ou 100 dj post-floraison (Fig 3a). Dans le bassin parisien, les épidémies tardives (maladie 1) sont les plus fréquentes.

Figure 3 : Effets de l'IFVI des peuplements sains sur la tolérance du couvert à des épidémies précoces (maladies 1), moyennes (maladies 2) ou tardives (maladies 3).



On constate (Fig. 3b) que la relation entre IFVI et cumul de PAR absorbé montre une tendance générale à la saturation. Ce phénomène découle directement de la non-linéarité de la loi de Monteith et ressemble à l'aspect de la relation entre IFVI et rendement (Fig. 1). Logiquement, les trois épidémies se traduisent par une diminution de l'IFVI d'autant plus forte que la maladie est précoce (Fig 3b), mais on constate également que ces baisses de l'IFVI provoquent une diminution du PAR absorbé suivant la même relation que celle observée pour les peuplements sains. La maladie ne modifie donc pas la relation IFVI x PAR absorbé, ce qui avait déjà été constaté à propos de la relation IFVI x Rendement.

On peut exprimer la tolérance à la maladie de l'absorption lumineuse par le rapport entre le PAR absorbé du couvert malade sur celui du couvert sain de même Indice Foliaire initial. Un rapport proche de 100% indique une tolérance élevée à la maladie simulée (Fig 3c). On constate dans tous les cas que les couverts à fort IFVI, qui sont ceux à fort indice foliaire, ont une tolérance plus élevée. Autrement dit, à niveau de maladie comparable, un indice foliaire important assure une meilleure tolérance. D'autre part la différence semble encore plus favorable dans le cas des épidémies précoces, les plus destructrices. Le gain de tolérance est de 50% dans le cas de l'épidémie précoce contre 30% et 10% respectivement pour les épidémies moyennes et tardives.

c) Géoclimat et tolérance aux maladies par un indice foliaire élevé.

Les simulations précédentes ont été réalisées en utilisant les données climatiques moyennes (PAR et température) à cette époque de l'année sur le site de Versailles. A l'aide du modèle, les effets du géoclimat et de l'IFVI sur la tolérance à une même épidémie tardive ont été analysés (Fig 4). Deux sites ont été comparés à celui de Versailles: Toulouse avec des fortes températures et Clermont-Ferrand avec des températures plus fraîches (Fig 4a). Les différences d'éclairements moyens des trois stations étant faibles, on a montré par ailleurs (non figuré) que cette variable a peu d'effet sur l'expression de la tolérance.

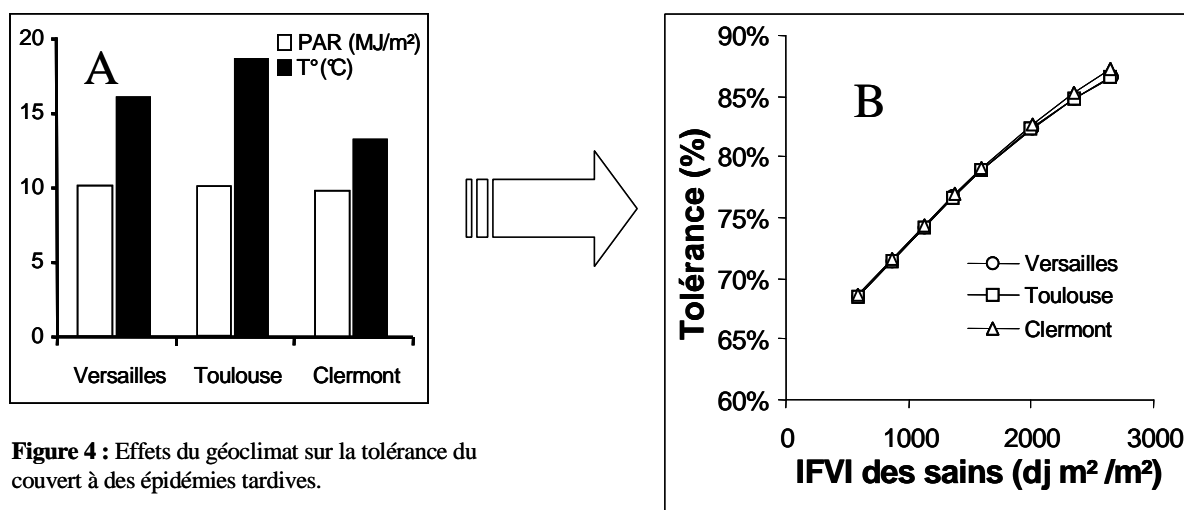


Figure 4 : Effets du géoclimat sur la tolérance du couvert à des épidémies tardives.

On constate que le géoclimat n'a pas d'incidence sur l'expression de la tolérance à l'épidémie simulée (Fig 4b). Il en va de même pour des épidémies moyennes ou précoces (données non figurées). Cela suggère que l'expression de la tolérance par un indice foliaire élevé ne dépend pas du site, ce qui pourrait être un atout pour une sélection variétale suivant ce critère.

d) Architecture des plantes et tolérance aux maladies par un indice foliaire élevé.

A indice foliaire égal l'architecture des plantes influe sur l'absorption lumineuse. Par exemple, la littérature souligne des variations extrêmes de port des feuilles, quantifiées par l'indicateur global qu'est le coefficient d'absorption k , allant de 0,3 (feuilles très dressées = couverts érectophylles) à 0,9 (feuilles très horizontales = couverts planophylles). Par défaut, la littérature recommande $k= 0.68$ pour le blé, mais reconnaît une variabilité sur ce caractère en fonction des variétés et des conduites agricoles. Nous avons donc testé l'effet du port des feuilles sur la tolérance aux maladies par un IFVI élevé. La figure 5 donne le résultat pour une maladie tardive, mais celui ci est conservé pour des maladies moyennes ou précoces. La formule de Monteith indique que les couverts planophylles (Fig 5a) aboutissent à une interception maximale de la lumière à indice foliaire modéré (2,5 à 3 m^2/m^2) alors que les couverts très érectophylles n'ont toujours pas atteint l'interception maximale pour un indice foliaire de 6 m^2/m^2 .

A indice foliaire, et donc à IFVI des sains identique, les couverts planophylles sont un peu plus tolérants (Fig 5b). Il n'y a pas d'interaction entre les effets du port et de l'indice foliaire sur la tolérance. Cependant, le gain de tolérance par le port reste faible malgré l'étendue de la gamme étudiée.

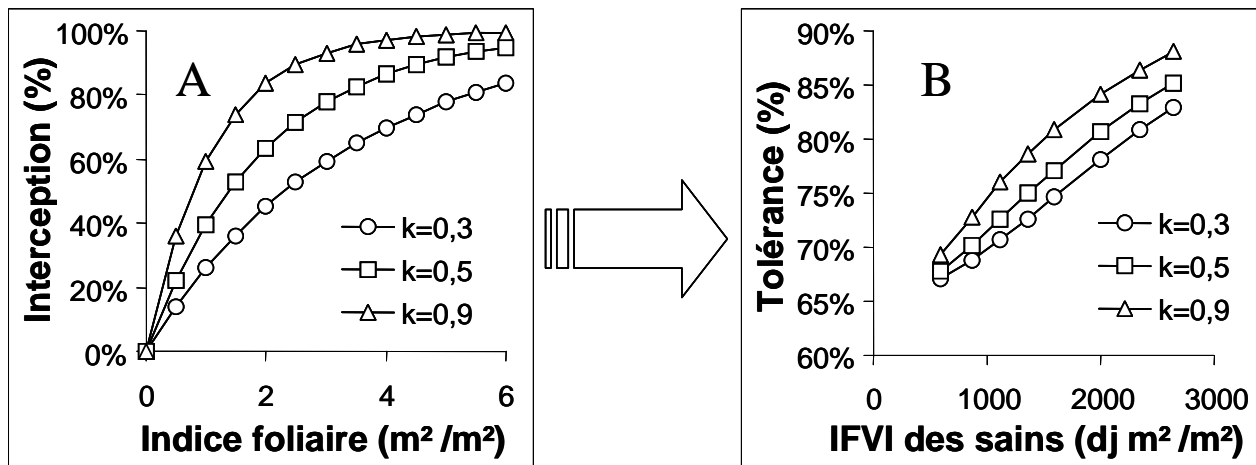


Figure 5 : Effets du port sur la tolérance de couverts d'Indices Foliaires initiaux variés à une maladie tardive

CONCLUSION

L'utilisation d'un modèle simple d'absorption du rayonnement montre que des niveaux élevés d'indice foliaire confèrent un IFVI élevé aux peuplements sains et une tolérance plus importante des couverts aux maladies foliaires. Ce modèle utilise le formalisme de Monteith sans individualiser les étages foliaires. Il est donc adapté aux maladies ayant une progression du bas vers le haut comme les épidémies lentes de septoriose (Royle, 1994), parce qu'elles ne perturbent pas trop la répartition des surfaces vertes par rapport à la sénescence naturelle. La construction d'un modèle d'interception stratifié devient par contre nécessaire dans le second cas de maladies s'installant en haut du couvert, comme les épidémies explosives de rouille et de septoriose (Royle, 1994).

Dans le premier cas, notre étude permet de hiérarchiser les effets : la tolérance est sensible à l'indice foliaire à la floraison et ce d'autant plus que les maladies sont précoces. Par contre la tolérance ne dépend pas du géoclimat moyen, et seulement légèrement du port des variétés. En conséquence, une meilleure valorisation des processus de tolérance passera par le choix de variétés et de conduites culturales favorisant entre autres un fort développement de l'indice foliaire vert. Par exemple, les variétés hybrides qui mettent en place un indice foliaire et un IFVI très élevés développent une forte tolérance (Fig. 1b). Néanmoins, un couvert végétatif important doit s'obtenir dans des limites d'intensification compatibles avec les nouvelles normes environnementales. Un couvert végétatif important peut également s'avérer favorable au développement des bioagresseurs, donc augmenter la pression de maladie, ce qui ruinerait le gain obtenu par tolérance. Cet effet en retour n'est pas du tout pris en compte dans le modèle ici présenté : pour une gestion durable, la construction d'un modèle rendant compte de l'effet du couvert sur les épidémies est indispensable.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Ils ont été soutenus par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. » et le projet C2008-02 du MAP (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) « Tolérance du blé tendre aux stress biotiques et abiotiques ». Les auteurs tiennent à remercier l'ensemble des équipes techniques et des étudiants ayant contribué aux travaux du projet depuis 2006.

BIBLIOGRAPHIE

- Bancal M-O, Robert C, Ney B (2007) Modeling wheat growth and yield losses from late epidemics of foliar diseases using loss of green leaf area per layer and pre-anthesis reserves. *Annals of Botany* 100, 777-789.
- Bingham IJ, Walters DR, Foulkes MJ, Paveley ND (2009). Crop traits and the tolerance of wheat and barley to foliar diseases. *Annals of Applied Biology* 154 (2), 159-173.
- Cornish PS, Baker GR, Murray GM. 1990. Physiological responses of wheat (*Triticum aestivum*) to infection with *Mycosphaerella graminicola* causing *Septoria tritici* blotch. *Australian Journal of Agricultural Research* 41: 317-327.
- Gaunt RE, Wright AC. 1992. Disease-yield relationship in barley. 2. Contribution of stored stem reserves to grain filling. *Plant Pathology* 41: 688-701.
- Gate P., Gouache D., Robert C., Bancal M.O., Lannou C., Ney B. (2006) Quel indicateur plante pour rendre compte de la nuisibilité de la septoriose sur blé tendre ? Actes de la CIMA.
- Monteith JL. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 281, 277-294.
- Parker, S.R., Welham, S., Paveley, N.D., Foulkes, J. and Scott, R.K., 2004. Tolerance of septoria leaf blotch in winter wheat. *Plant Pathology*, 53(1): 1-10.
- Robert C, Bancal M-O, Nicolas P, Lannou C, Ney B (2004) Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany* 55, 1-16.
- Royle DJ, 1994. Understanding and predicting epidemics: a commentary based on selected pathosystems. *Plant Pathology* 43, 777-789.
- Zuckerman E, Eshel A, Eyal Z. 1997. Physiological aspects related to tolerance of spring wheat cultivars to *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* 87, 60-65.

**EFFECT OF NITROGEN AND WATER MANAGEMENT ON SUNFLOWER PREMATURE
RIPENING CAUSED BY *PHOMA MACDONALDII***

C. SEASSAU¹, G. DECHAMP-GUILLAUME², E. MESTRIES³ and P. DEBAEKE⁴

⁽¹⁾ INRA, UMR AGIR, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
celia.seassau@toulouse.inra.fr

⁽²⁾ ENSAT, INPT, UMR AGIR, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
dechamp@ensat.fr

⁽³⁾ CETIOM, ENSAT, BP 32607, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
mestries@cetiom.fr

⁽⁴⁾ INRA, UMR AGIR, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France,
philippe.debaeke@toulouse.inra.fr

RÉSUMÉ

Le dessèchement précoce (PR) est l'une des maladies les plus importantes du tournesol en France depuis les années 90. Comprendre les facteurs impliqués dans le PR du tournesol est essentiel pour un contrôle efficace de la maladie. Une étude au champ a été conduite de 2006 à 2008, et l'effet de la fertilisation N (0, 75, 150 kg N ha⁻¹) et du régime hydrique (sec, irrigué) a été étudié sur deux cultivars après inoculation artificielle (AI) et infection naturelle (NI). Une forte fertilisation N induit significativement ($P < 0.05$) plus de PR qu'une non-fertilisation. Le déficit hydrique est également significativement impliqué ; l'AUDPC et le PR sont plus élevés lorsque la conduite en sec est associée à un fort apport en N. Ceci est observé pour les deux cultivars qui diffèrent par leur sensibilité face à la maladie. Cette étude démontre clairement le rôle de la conduite de culture et des conditions environnementales sur l'incidence et la gravité des attaques au collet à l'origine du PR.

Mots-clés : *Leptosphaeria lindquistii*, dessèchement précoce, *Helianthus annuus* L., conduite de culture, disease assessment

SUMMARY

Premature ripening (PR) is one of the most important diseases of sunflower in France since the 90s. Elucidation of critical environmental factors involved is crucial for better control of the disease. A field study was conducted in three contrasting cropping seasons (2006 to 2008) and investigated the effect of N fertilization (0, 75 and 150 kg N ha⁻¹) and water regime (rainfed, irrigated) on two cultivars with artificial inoculation (AI) and natural infection (NI). Data showed that high levels of N fertilization led to significantly ($P < 0.05$) more PR than non-fertilization. Water deficit conditions were significantly ($P < 0.05$) involved in disease severity, and AUDPC and PR were increased when dry conditions were associated with high N supply. This was true for two cultivars which differed in their susceptibility to the disease. This study demonstrated a clear role of crop management and environmental conditions on the incidence and severity of stem base attacks responsible for the PR syndrome.

Key words: *Leptosphaeria lindquistii*, premature ripening, *Helianthus annuus* L., crop management, disease assessment

INTRODUCTION

Phoma macdonaldii Boerema (teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) is one of the most widespread and detrimental diseases in sunflower production. In France, the incidence and severity of the disease increased dramatically in the early 90s and the entire sunflower cropping area is now affected by Phoma black stem (Penaud and Pérès, 1994). Sackston (1950) first described a wilt and stalk rot of unknown etiology as “premature ripening” (PR), and earlier evidence showed that stem base girdling canker caused by *P. macdonaldii* was its primary cause. Before PR, crops show loss of vigour from mid- to late summer, leaves become wilted and necrotic, the stalk turns dark brown to black, and this is followed by senescence and plant death a few weeks before physiological maturity (Donald et al., 1987). Environmental factors were suggested to play a key role in disease development and PR occurrence (Carson, 1991). Field studies showed that additional nitrogen increased the incidence of *P. macdonaldii* attacks at leaf nodes and stem base (Debaeke and Pérès, 2003). However, effects of crop management on PR have never been reported. In this context, there was need for detailed knowledge of agronomic factors involved in sunflower PR. This paper reports experimentation with two cultivars that differed in their susceptibility to PR, under contrasted water and N fertilization levels during three seasons, to assess the effects of water regime and N supply on premature ripening following artificial inoculation or natural infection with *P. macdonaldii*.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL DESIGN AND CROP MANAGEMENT SYSTEMS

Three field experiments (2006 to 2008) were carried out at INRA, Auzeville (Haute-Garonne, south-western France). From preliminary variety screenings, two cultivars were selected, differing in their susceptibility to PR (data not shown): cv. Heliasol RM, susceptible to PR, and cv. Melody, with a higher level of partial resistance.

The experiment was arranged as a 4-factor split-plot design with three replicates. The crop was sown in April 2006 and 2007, and in May 2008 due to rainy conditions in April (85 mm) (Table I). Plant density was 6.5 plants m⁻² after thinning. In 2006, two levels of N fertilization were applied (0 and 150 kg ha⁻¹), and three were made in 2007 and 2008 (0, 75 and 150 kg ha⁻¹). Quantity and timing of sprinkler irrigation were decided according to rainfall and soil water deficit. In 2006, a dry year, 220 mm were applied on irrigated plots and 50 mm on rainfed plots for seedling emergence and N incorporation. In 2007, 80 mm of irrigation was applied on the irrigated treatment while the rainfed treatment received no irrigation. In 2008, 120 mm were applied to irrigated plots and 20 mm was applied on rainfed plots for N incorporation. Over the three years of experimentation, individual factors were combined to create contrasting crop management systems. A range from 12 to 24 treatments was assessed by combining two water regime (rainfed vs irrigated), N fertilization (2 levels in 2006 and 3 in 2007, 2008), and infection (AI and NI) on both cv. Melody and cv. Heliasol RM in 2006 and 2007, and only on cv. Heliasol RM in 2008. In 2006, the treatment N150 - rainfed was not tested in AI for either cultivar.

PHOMA ISOLATES AND PLANT INOCULATION

One *P. macdonaldii* monopycniospore strain was used in these studies, selected for its severe aggressiveness. The strain was isolated from an infected sunflower residue showing severe black stem base lesions in a sunflower field located close to the trial site. Inoculum was plated on Petri dishes containing potato dextrose agar (Difco) (39 g l⁻¹, 150 mg of streptomycin, pH 6) and grown at 25 °C for 10 days in the dark. Inoculation on the AI plots was carried out at star bud stage on 25 uniform plants tagged. A 6 mm diameter disk of PDA with mycelium was placed at the stem base and left for five days. Drying of the disk was avoided by applying a moist cotton wool plug covered with aluminum foil around the stem base.

DISEASE ASSESSMENT

Disease symptoms were monitored weekly on the 25 tagged plants for all treatments on AI and NI plots. The disease was scored using a 0-4 scale: 0 = healthy plant, 1 = less than $\frac{3}{4}$ of the stem base circumference black, 2 = spots circling the stem base, 3 = all leaves wilted but the stem green, 4 = plant completely dry. PR plant was thus defined as one completely dry before physiological maturity with necroses circling the stem base. Disease assessment was continued up to 82 days post inoculation (DPI) in 2006 and 2007, and 81 DPI in 2008, one week before the onset of normal senescence.

Over the three years of experiment, 100 % of AI and NI tagged plants were infected by *P. macdonaldii*, equivalent to a disease score of ≥ 2 . Disease development was assessed by the area under disease progress curve (AUDPC) and the final percentage of PR plants. The percentage of PR plants was recorded weekly and used to calculate AUDPC for all experiments. The AUDPC was calculated according to the equation of Campbell and Madden (1990)

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i) \quad (1)$$

where n is the number of evaluations, y the percent of PR and t the DPI of each evaluation. The final percentage of PR plants was that at the last observation.

ASSESSMENT OF CROP NITROGEN AND WATER STATUS

The N nutrition status for each treatment was quantified using the Nitrogen Nutrition Index (NNI), calculated according to the equation of Lemaire and Gastal (1997) and Debaeke and Raffaillac (2006). NNI was calculated on 5 plants of cv. Heliasol RM for each treatment over the three years of experiment at flowering on AI or NI plots. A value of $NNI \geq 1$ indicated a crop with ample N supply (N non-limiting); $NNI = 1$ was optimal N nutrition and below 1, N deficiency.

The crop model SUNFLO developed by Casadebaig (2008) for dynamic simulation of response of sunflower cultivars to a range of soil, weather and management conditions was applied to the different water x nitrogen situations. The model accounted for plant phenology, leaf area index development and stomatal response to soil water deficit. The output variable used in this study was the ratio of actual to potential evapotranspiration ($ET_a : ET_0$) over the period from stem base inoculation to physiological maturity, which can be used as an index of plant water stress under healthy conditions. High values of ($ET_a : ET_0$) indicate an adequate water supply and water stress by ($ET_a : ET_0$) below 1.

STATISTICAL ANALYSES

The independent variables AUDPC and the final percent of PR plants were analysed with multifactor analysis of variance procedure of Statgraphics Plus 5.1 statistical software (Rockville, MA, USA). Prior to ANOVA, square-root transformations were carried out to AUDPC. Arcsine transformations were applied to PR percentage data. When significant differences were found at $P \leq 0.05$, means were compared using Fisher's protected least significant difference test (95 % LSD). For each year, PR was subjected to variance component analysis to estimate variability of infection, cultivar, water regime and N fertilization.

RESULTS

EFFECT OF CLIMATE AND CROP MANAGEMENT ON PLANT WATER AND PLANT NITROGEN STATUS

Climatic conditions in the three years differed greatly for temperature, relative humidity and rainfall (Table I). Mean temperature from April to September 2006 was the highest compared with 2007 and 2008. Temperatures throughout disease development were particularly high in 2006, with a mean of 25.2 °C in July, compared with 20.5 °C in 2007 and 21.3 °C in 2008. Rainfall during the cropping season was 300 mm in 2007 and 2008 but only 190 mm in 2006.

Table I: Average monthly temperature, relative humidity, and total monthly rainfall during the sunflower growing season at the experimental site of Auzeville.

(Moyennes mensuelles des températures, humidités relatives et précipitations relevées sur le site expérimental d'Auzeville pendant la culture du tournesol).

| Month | Temperature (°C) | | | Relative Humidity (%) | | | Rainfall (mm) | | |
|-----------------|------------------|------|------|-----------------------|------|------|---------------|-------|-------|
| | 2006 | 2007 | 2008 | 2006 | 2007 | 2008 | 2006 | 2007 | 2008 |
| April | 11.1 | 17.8 | 11.7 | 58 | 67 | 77 | 0.0 | 4.5 | 85.0 |
| May | 16.7 | 15.9 | 16.5 | 74 | 76 | 78 | 30.5 | 113.5 | 60.5 |
| June | 20.9 | 19.4 | 19.4 | 63 | 71 | 70 | 21.0 | 80.5 | 36.0 |
| July | 25.2 | 20.5 | 21.3 | 62 | 67 | 66 | 21.5 | 13.5 | 40.5 |
| August | 20.5 | 20.4 | 21.1 | 61 | 67 | 68 | 28.0 | 57.5 | 37.5 |
| September | 20.3 | 17.2 | 18.7 | 70 | 68 | 72 | 88.5 | 32.5 | 36.0 |
| April-September | 19.1 | 18.5 | 18.1 | 65 | 69 | 72 | 189.5 | 302.0 | 295.5 |

The simulated $ET_a : ET_0$ ratio for cv. Heliasol RM varied with irrigation and nitrogen management between years and climatic conditions (Table II). In irrigated plots, $ET_a : ET_0$ was above 0.81 for all levels of N and all years. In rainfed plots, this ratio was always below 0.73. Water stress was higher in fertilized plots, especially under rainfed management. Highly fertilized plots had Nitrogen Nutrition Indices (NNI) from 0.86 to 1.2 (Table II). whereas values for unfertilized plots were from 0.45 to 0.62, except in 2007 when NNI was 0.77 due to a high nitrogen content in the soil of rainfed plots. With N150, rainfed plots had lower NNI than irrigated ones.

Table II: Actual:potential evapotranspiration ratio ($ET_a : ET_0$) calculated by the SUNFLO model and Nitrogen Nutrition Index (NNI) values for cv. Heliasol RM under both water regimes (and rainfed) and three levels of N fertilization (N0, N75, N 150) throughout the disease development period in natural infection from 2006 to 2008

(Ratio de l'évaporation actuelle: potentielle ($ET_a : ET_0$) calculé par le modèle SUNFLO et l'Indice de Nutrition Azoté (NNI) pour cv. Heliasol RM pour les deux régimes hydriques (irrigué et sec) et les trois niveaux de fertilisation azotée (N0, N75, N 150) tout au long du développement de la maladie en infection naturelle de 2006 à 2008)

| Year | Irrigation | ET actual:ET potential ($ET_a:ET_0$) | | | Nitrogen Nutrition Index (NNI) | | |
|------|------------|--|------|------|--------------------------------|------|------|
| | | Fertilizer | | | Fertilizer | | |
| | | N0 | N75 | N150 | N0 | N75 | N150 |
| 2006 | Irrigated | 0.85 | - | 0.81 | 0.58 | - | 1.04 |
| | Rainfed | 0.56 | - | 0.51 | 0.62 | - | 0.86 |
| 2007 | Irrigated | 0.85 | 0.82 | 0.82 | 0.45 | 0.99 | 0.98 |
| | Rainfed | 0.73 | 0.70 | 0.70 | 0.77 | 1.10 | 0.95 |
| 2008 | Irrigated | 0.87 | 0.83 | 0.83 | 0.59 | 0.79 | 1.20 |
| | Rainfed | 0.72 | 0.68 | 0.68 | 0.57 | 0.69 | 0.95 |

EFFECT OF YEAR ON AUDPC AND PR

Disease severity was analyzed as AUDPC and final PR over the three years (Table III). The highest AUDPC values were observed in 2006 but did not differ significantly from those in 2007 and 2008. Significant differences ($P < 0.05$) in final percent of PR were observed between 2006 and 2007 for all crop management systems taken together. In 2007, PR was highest (47.5 %), followed by 2008 (41.9 %) and 2006 (39.7 %).

Table III: Mean values of AUDPC and final percentage prematurely ripened (PR) showing effects of cultivars (cv. Heliasol RM cv. Melody), N fertilization (N150, N75, N0) and water regimes (irrigated, rainfed) with artificial inoculation (AI) and natural infection (NI) from 2006 to 2008

(Moyenne des AUDPC et du pourcentage final de dessèchement précoce (PR) montrant les effets du cultivar (cv. Heliasol, cv. Melody), de la fertilisation N (N150, N75, N0) et du régime hydrique (irrigué, sec) après inoculation artificielle (AI) et infection naturelle (NI) de 2006 à 2008)

| Treatment | AUDPC ^a | | | | | | Final PR (%) ^b | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------|----------------|------|----|------|----|---------------------------|----|------|----|------|----|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|
| | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2006 | | 2007 | | 2008 | | | | | | | | | | | | | |
| | AI ^c | NI | AI | NI | AI | NI | AI ^c | NI | AI | NI | AI | NI | | | | | | | | | | | | |
| | 4.83 | A | 4.14 | A | 3.60 | A | 39.7 | B | 47.5 | A | 41.9 | AB | | | | | | | | | | | | |
| Inoculation method | 6.07 | A ^d | 3.60 | B | 4.83 | A | 3.45 | B | 3.83 | A | 3.37 | A | 48.0 | A | 31.4 | B | 52.0 | A | 43.0 | B | 45.8 | A | 38.0 | A |
| Cultivar | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Heliasol RM | 7.49 | a ^c | 4.47 | a | 6.78 | a | 4.48 | a | 3.83 | | 3.37 | | 60.9 | a | 40.4 | a | 67.5 | a | 52.6 | a | 45.8 | | 38.0 | |
| Melody | 4.64 | b | 2.73 | a | 2.87 | b | 2.42 | b | | | | | 35.1 | b | 22.4 | b | 36.6 | b | 33.3 | b | | | | |
| Water regime | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Irrigated | 3.27 | b | 1.70 | b | 4.02 | b | 2.48 | b | 3.51 | a | 2.42 | a | 23.7 | b | 14.5 | b | 43.5 | b | 29.4 | b | 46.6 | a | 34.7 | a |
| Rainfed | 8.86 | a | 5.50 | a | 5.63 | a | 4.42 | a | 4.16 | a | 4.32 | a | 72.3 | a | 48.3 | a | 60.5 | a | 56.6 | a | 44.9 | a | 41.4 | a |
| Fertilizer | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| High (N150) | 9.0 | a | 5.10 | a | 9.17 | a | 6.96 | a | 8.55 | a | 7.17 | a | 66.3 | a | 43.2 | a | 82.6 | a | 69.5 | a | 85.3 | a | 68.3 | a |
| Usual (N75) | | | | | 4.45 | b | 2.90 | b | 2.31 | b | 2.35 | b | | | | | 58.8 | b | 48.0 | b | 43.3 | b | 33.7 | b |
| None (N0) | 3.13 | b | 2.11 | b | 0.86 | c | 0.49 | c | 0.64 | b | 0.59 | b | 29.7 | b | 19.5 | b | 14.6 | c | 11.5 | c | 8.7 | c | 12.0 | c |

^aCalculated according to Campbell and Madden (1990)

^bFinal PR (%) taken 81 days from the start of epidemic

^cThe treatment N150 – rainfed was not tested for cv. Heliasol RM and cv. Melody

^dFor a given treatment, means followed by different capital letters in a row are significantly different from one another, whereas means followed by different small letters in a column are significantly different from one another based on L.S.D. _{0.05}.

EFFECT OF ARTIFICIAL INOCULATION AND NATURAL INFECTION ON AUDPC AND PR

AUDPC and final PR were higher after artificial inoculation than under natural infection (Table III). The differences were significant ($P < 0.05$) in 2006 and 2007 but not in 2008. The highest percent of PR was observed in 2007 after AI with 52 % of dead plants. In 2006, PR was the lowest with NI. Final PR in 2008 was comparable to the other years, but no significant difference was observed between AI and NI. Variance components analyses showed that the total variance in PR over the three years was not explained completely by the 2 types of infection.

EFFECTS OF INDIVIDUAL AGRONOMIC FACTORS ON AUDPC AND PR

Cultivar

Cultivar susceptibility was tested in 2006 and 2007. Significant differences ($P < 0.05$) were observed between cv. Heliasol RM and cv. Melody except in 2006, when AUDPC value in NI did not differ significantly from AI (Table III). Disease was more severe on cv. Heliasol RM than on cv. Melody with both AI and NI. Variance components analyses showed that cultivar explained 31 % and 27 % of the total variance in PR in 2006 and 2007, respectively.

Water regime

In 2006 and 2007, a significant ($P < 0.05$) effect of water regime on the disease development was observed (Table III). In 2008, no significant differences were observed between irrigated and rainfed plots. Plots under rainfed condition showed higher AUDPC and PR values than irrigated ones, the greatest disease severity being observed in rainfed condition in 2006 when climatic conditions were very dry and hot throughout disease development (Table I). From the variance component analyses, water regime in 2006 explained 29 % of the total variance in PR, but had no significant effect in 2007 and 2008, two years with high rainfall from July to September (104 mm and 111 mm respectively) (Table I).

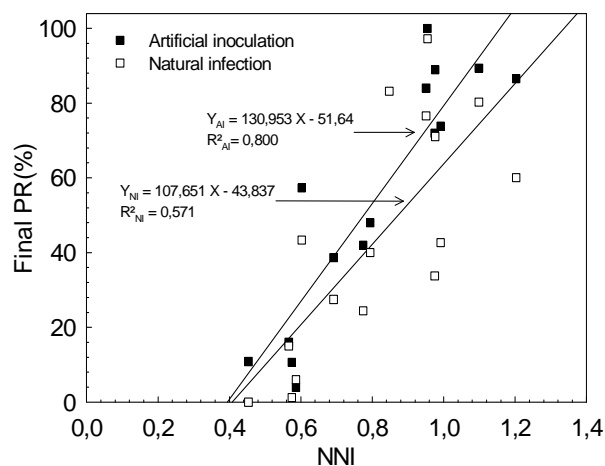
N fertilization

Variance component analyses demonstrated that N fertilization was the main factor increasing PR. N supply explained 26 %, 62 % and 81 % of PR in 2006, 2007 and 2008, respectively. ANOVA showed a significant ($P < 0.05$) effect of N fertilization on AUDPC and PR (Table III) except in 2008, where no significant differences were observed between N0 and N75 for AUDPC values. AUDPC and PR were highly increased with high N fertilization than unfertilized ones. In 2007 and 2008, AUDPC values were increased 11 to 14 times under the N150 treatment compared with N0. The final percent of PR was 82.6 % and 85.3 % for N150 plots with AI in 2007 and 2008 respectively.

The relationship between PR and NNI for cv. Heliasol RM from 2006 to 2008 is shown in Figure 1. Significant regressions were observed between NNI at flowering and PR in AI plots ($R^2_{AI} = 0.80$) and NI plots ($R^2_{NI} = 0.57$). Maximal PR values were observed, with N75 and N150 treatments, for NNI values ≥ 0.9 . Conversely, low PR was associated with NNI values below 0.6, when N deficiency was severe.

Figure 1: Relationship between the percentage of sunflowers affected by premature ripening (PR) and the Nitrogen Nutrition Index (NNI) for cv. Heliasol RM in artificial inoculation (AI) and natural infection (NI) from 2006 to 2008

(Relation entre le pourcentage de tournesol atteint de dessèchement précoce (PR) et l'Indice de Nutrition Azoté (NNI) pour cv. Heliasol RM après inoculation artificielle (AI) et infection naturelle de 2006 à 2008)

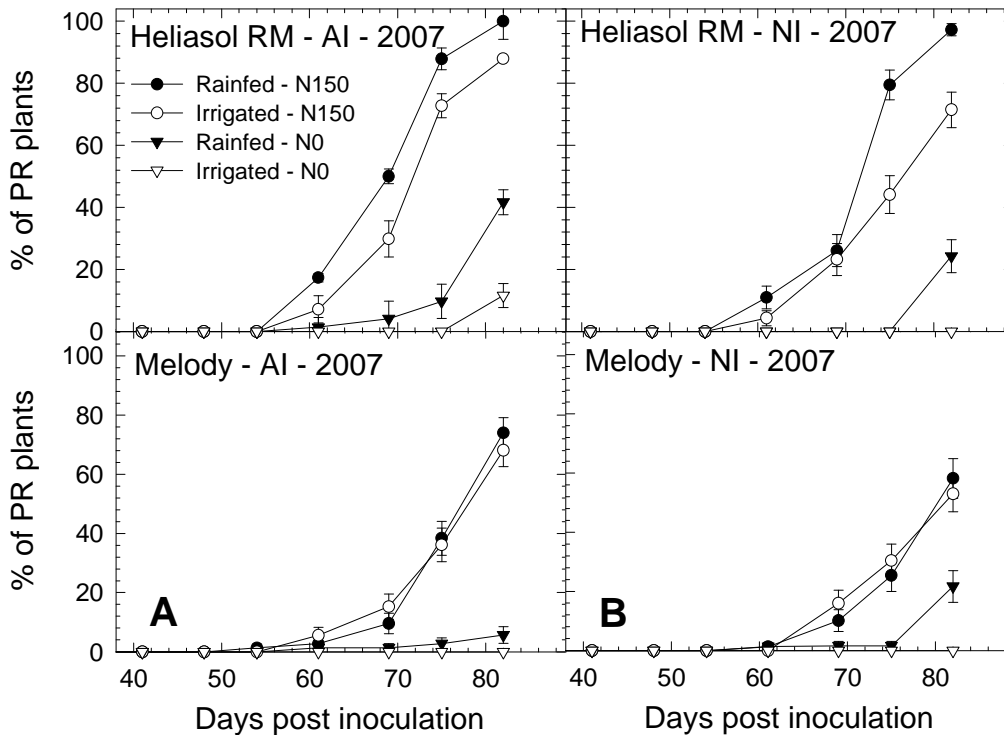


EFFECT OF COMBINED WATER AND NITROGEN FACTORS ON PR

Examples of annual disease progress curves of PR integrating the effects of N fertilization and water regime for both cultivars with AI and NI (Figure 2) show significant effects of crop management. N150 plots had the highest percent of PR. The first PR plants appeared in rainfed-N150 treatment, and the final rate was the highest in these plots for both cultivars and infection methods. Next highest levels were obtained in irrigated-N150, rainfed-N0 and irrigated-N0 crop management. In 2007, 100 % of PR plants were observed in irrigated-N0 plots and 0 % in rainfed-N150 ones with cv. Heliasol RM (Fig 2B).

Figure 2: Annual disease progress curves of premature ripening (PR) plants on both sunflower cultivars (cv. Heliasol RM and cv. Melody) for non-limiting (N150, irrigated) and stressed (N0, rainfed) nitrogen supply and water regime in artificial inoculation (A) and natural infection (B).

(Courbes de l'évolution annuelle du dessèchement précoce en 2007 des deux cultivars (cv. Heliasol RM and cv. Melody) pour un régime en N et en eau non limitant (N150, irrigué) et limitant (N0, sec) après inoculation artificielle (A) et infection naturelle (B))



A stepwise linear regression was calculated integrating NNI and $ETa : ET_0$ (Table II) and aimed at explaining PR values of cv. Heliasol after AI and NI (Eq. (4) and Eq. (5)).

$$PR (AI) = 33.8 + 103.2 NNI - 102.7 (ETa : ET_0) \quad R^2 = 0.904 \quad (2)$$

$$PR (NI) = 61.5 + 104.6 NNI - 138.4 (ETa : ET_0) \quad R^2 = 0.80 \quad (3)$$

PR increased significantly with increasing nitrogen availability (NNI) ($P < 0.05$) and decreased with increasing water availability ($ETa : ET_0$)

DISCUSSION

This research was conducted to determine how agronomic factors such as nitrogen fertilization and the water regime can influence occurrence and the severity of sunflower premature ripening. Our results with artificial inoculation and natural infection indicated that high levels of nitrogen fertilization and rainfed water conditions were the main factors increasing PR emergence for both susceptible and partially resistant cultivars.

AUDPC and PR were higher with AI than NI for all cultivar and crop management conditions. Diversity between *P. macdonaldii* strains for aggressiveness (Abou Al Fakil, 2006) could partially explain differences between NI and AI for percent PR. However, differences with AI between years were observed which suggests that climatic conditions

probably affected pathogen development and the resulting PR. Pathogen growth rate is largely dependent on temperature and relative humidity (RH), with optimum growth between 20 to 30 °C and RH above 80 % (Roustaei et al., 2000). High temperatures and low rainfall in 2006 may have hindered the first stages of progression of *P. macdonaldii* in the stem base (data not shown) and thus slightly reduced PR. Conversely, high rainfall and RH in 2007 and 2008 may have been favourable for pathogen growth and PR. Observations carried out on a hundred farms in south-western France showed the same year effect on PR. In 2007, 85 % of farms were affected by PR, compared with 71 % and 67 % in 2006 and 2008 respectively (data not shown).

This study emphasized the negative effect of N fertilization on sunflower PR. A high level (N150) increased significantly the level of crop susceptibility giving high AUDPC and PR values. Conversely, poor host nutrition in form of deficiency or unbalanced applications of N was less damaging for the crop in agreement with earlier reports on Phoma black stem (Gulya et al., 1997). The microclimate resulting from dense canopies, induced by high N fertilization, may have constituted a major climatic parameter in disease epidemiology and successful infection (Huber and Gillespie, 1992). An experiment carried out in 2008 aimed at investigating the role of microclimate on PR by testing three plant densities (4, 6 and 9 plants m⁻²). At all densities, 100% of the plants were infected by *P. macdonaldii* but the highest percent of PR plants was observed at the highest density (data not shown). Thus, microclimatic conditions within the canopy were probably not limiting for infection at the stem base in contrast to fungal infection of leaves such as with *Diaporthe helianthi* (Phomopsis stem canker). The severity of PR appears more likely to be determined by physiological and anatomical changes that could affect host susceptibility to the pathogen, such as alteration of cell wall constituents such as lignins, reduction of cell wall thickness and a decrease in phytotoxic phenolic compounds or their toxicity (Jensen and Munk, 1997). The susceptibility plants may thus vary without changing the facility with which they can be colonized by *P. macdonaldii*. Moreover, a high nitrogen supply could be trophic. This necrotrophic fungus which may have access to a wider range of N sources than biotrophic pathogens (Walter and Bingham, 2007).

Water stress occurring during the infection period induced significantly more PR than under irrigated conditions. This was observed in 2006 and 2007 where rainfed conditions were contrasted with irrigated management. High rainfall in 2008 resulted in an absence of significant differences between rainfed and irrigated treatments for both AUDPC and PR. This differs from an earlier report, based on field surveys, which indicated a lack of consistent relationships between water availability and PR (Pérès et al., 2000). A predisposition to disease is often observed in host plants during water shortage. Nardini and Salleo (2005) reported that water stress during active sunflower growth reduced plant size and that the diameter of the widest xylem vessels was narrowed by 20 % as an adaptation to the risk of occurrence of vascular embolisms (Mepsted et al., 1995). However, under water stress, vascular wilt pathogens are involved in xylem vessel blockage (Beckman, 1964) leading to the death of the plant. *P. macdonaldii* hyphae were observed in the xylem of 10 day-old seedlings (Abou Al Fadil et al. 2009) and of PR plants of cv. Heliasol RM (data not shown). The same strong vessel-plugging capacity observed for *Fusarium oxysporum* and *Verticillium* species (Put and Clercx, 1988) could be involved in sunflower PR. Rainfed condition may have reduced hydraulic conductance and PR occurred by vessel-clogging, and embolism of xylem elements. Thus, water stress may be an agronomic factor which increases rather than induces PR, contrary to nitrogen fertilization.

The study emphasized the individual effects of N fertilization and water regime on disease severity. However, integrating the two factors modified significantly AUDPC and PR expression in the field. A high nitrogen supply associated to post-anthesis water stress was most damaging for the crop, whereas no fertilization and full irrigation was less damaging especially for the partially resistant cultivar. Whatever the water regime, fertilized plots had more PR plants than unfertilized ones. Haefele et al. (2008) reported that high N fertilizer rates increased the drought risk in water-limited field situations as a result of greater biomass development and leaf area index, and the related high transpiration. This phenomenon,

called “haying-off” in cereals (Taylor, 1965), was expressed by the ratio of actual to potential evapotranspiration ($ET_a : ET_0$). An excess of nitrogen results more rapidly in soil water exhaustion and transpiration drop so it is necessary to manage the canopy for an effective control of sunflower PR. Avoiding excessive N fertilization by a soil N budget method can significantly minimize disease severity. The Nitrogen Nutrition Index (NNI) can be used as an indicator of plant N status and of the related risk of PR. The correlation between the final PR estimate and NNI at flowering was significant when plotting all the crop management treatments. However, for a reliable evaluation of this indicator, additional experiments should be performed including more cultivars in multi-local experiments. In addition, N supply should be adapted to cultivar susceptibility: the N optimum for a susceptible cultivar should be lower than for a partially resistant one. Since genotypes with partial resistance to *P. macdonaldii* have been described (Abou Al Fadil et al., 2009), the choice of the cultivar should be taken into account to limit PR in the future. In this study, the susceptibility to the disease was tested only on two cultivars, but significant differences were confirmed between them. Cv. Heliasol RM, more susceptible to PR, always showed higher AUDPC and PR than cv. Melody, whatever the growing conditions and biotic pressure. Such differences provided evidence of the key role of host susceptibility in PR and its cropping management.

CONCLUSION

This study attempted to identify the most crucial agronomic elements of the sunflower premature ripening disease induced by *P. macdonaldii* in south-western France. The combination of high nitrogen fertilization and rainfed conditions resulted in high disease pressure every year. Additionally, differences in susceptibility of sunflower cultivars could be exploited more instead of developing fungicide protection. Cropping of resistant varieties in combination with appropriate nutrition and other cultural practices could reduce inoculum pressure and PR. Promising cultivars should therefore be screened at high N supplies and under water-limited conditions, a procedure which could be used in resistance tests during breeding programmes. It is now important to develop flexible fertilizer management advice for farmers, adjusted to the highly variable and diverse rainfed environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CETIOM, Midi-Pyrénées government and PROMOSOL association. We are grateful to the technical staff of INRA (D. Raffailac, M. Labarrère, C. Quinquy, E. Bazerthe) for their assistance in experimental procedures. We would like also to thank M. Moreto, P. Joumas, G. Beure, C. Dujardin, N. Seguin, A. Sirvent, A. Pauvert and C. Jourda for their collaboration in disease scoring.

REFERENCES

- Abou Al Fadil T., 2006. Déterminisme de la tolérance du tournesol à *Phoma macdonaldii* au collet et sur racines : approches génétiques et histologiques. Ph.D Thesis. Toulouse National Polytechnic Institute, p. 184.
- Abou Al Fadil T., Jauneau A., Martinez Y., Rickauer M., Dechamp-Guillaume G., 2009 - Characterisation of sunflower root colonisation by *Phoma macdonaldii*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 124, 93-103.
- Beckman C.H., 1964 - Host responses to vascular infection. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 2, 231-252.
- Campbell C., Madden L.V., 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & sons. New York, 532 p.
- Carson M., 1991 - Relationship between *Phoma* black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. *Plant Dis.*, 75, 1150-1153.

- Casadebaig, P., 2008. Analyse et modélisation de l'interaction Génotype - Environnement - Conduite de culture : application au tournesol (*Helianthus annuus* L.), Ph.D Thesis, Toulouse University, p. 196.
- Debaeke P., Pérès A., 2003 - Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma back stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop Prot.*, 22, 741-752.
- Debaeke P., Raffaillac D., 2006. Normalized SPAD index and Nitrogen Nutrition Index (NNI): two indicators of plant N status for sunflower crop. Proceeding of the 9th ESA Congress, Varsovie, Pologne, 4-7 September 2006, pp. 83-84.
- Donald P.A., Venette J.R., Gulya T.J., 1987 - Relationship between *Phoma macdonaldii* and premature death of sunflower in North Dakota. *Plant Dis.*, 71, 466-468.
- Gulya T., Rashid K.Y., Masirevic S.M., 1997. Sunflower diseases: Phoma black stem. In: Schneiter, A. A., *Sunflower Technology and Production. Agronomy Monograph no. 35.* Edition ASA, CSSA, SSSA, USA, 319-322.
- Haefele S.M., Jabbar S.M.A., Siopongco J.D.L.C., Tirol-Padre A., Amarante S.T., Cruz P.C.S., Cosico W.C., 2008 - Nitrogen use efficiency in selected rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under different water regimes and nitrogen levels. *Field Crops Res.*, 107, 137-146.
- Huber L., Gillespie T.J., 1992 - Modelling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 30, 553-577.
- Jensen B., Munk L., 1997 - Nitrogen-induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* on seedlings of six spring barley cultivars. *Plant Pathol.*, 46, 191-202.
- Lemaire G., Gastal F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies. In: G. Lemaire, *Diagnostic of the nitrogen status in crops.* Edition Springer-Verlag, Berlin, 3-43.
- Mepsted R., Flood J., Cooper R.M., 1995 - Fusarium-Wilt of Oil Palm .2. Stunting as a mechanism to reduce water-stress. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 46, 373-387.
- Nardini A., Salleo S., 2005 - Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. *J. Exp. Bot.*, 56, 3093-3101.
- Penaud A., Pérès A., 1994 - Phoma du tournesol. *Oléoscope*, 15, p 37.
- Pérès A., Poisson B., Drolon G., 2000 - Le syndrome "pieds secs" du tournesol: étude des causes et approche de la nuisibilité. Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, ISA, Toulouse, France, 12-15 June 2000, pp. 17-21.
- Put H.M.C., Clerckx A.C.M., 1988 - The infiltration ability of microorganisms *Bacillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces* and *Pseudomonas* spp Into Xylem Vessels of *Gerbera* cv. "Fleur" and *Rosa* cv. "Sonia" cut flowers: a scanning electron microscope study. *J. App. Bacteriol.*, 64, 515-530.
- Roustaee A., Costes S., Dechamp-Guillaume G., Barrault G., 2000 - Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph: *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant. Pathol.*, 49, 227-234.
- Sackston W.E., 1950 - Sunflower diseases in Manitoba in 1949. *Can. Plant Dis. Surv.* 28, 31-35.
- Taylor A., 1965 - Wheat crop surveys in southern New South Wales. 2. Haying-off in commercial wheat crops. *Aust. J. Exp. Agric.*, 5, 491-494.
- Walters D.R., Bingham I.J., 2007 - Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Ann. appl. Biol.*, 151, 307-324.

**SELECTION DE LIGNEES D'ORGE RESISTANTES A L'AGENT CAUSAL DE LA STRIE
FOLIAIRE (*PYRENOPHORA GRAMINEA*)**

LAKEHAL A. (1, 2). AÏSSAT A. (1) .SAOUDIA L. (1)

- (1) Département d'Agronomie, faculté agro-vétérinaire. USD Blida, Blida 09000. Algérie
(2) Adresse actuelle : Ecole Nationale Supérieure Agronomique ex INA. 16200 Alger Algérie.
e-mail : abdellahlakehal@yahoo.fr

RESUME

La strie foliaire de l'orge est une maladie très répandue en Algérie. La présente étude se propose d'effectuer une sélection des meilleurs génotypes résistants à cette épidémie. A cet effet, les semences de quatre variétés inscrites au catalogue officiel (Algérie) et sept lignées F5 issues de la variété Saida (comme parent femelle) ont été inoculées par un isolat de *Drechslera graminea* (04-04-Br). Les résultats obtenus ont montré que la variété Saida s'est révélée la plus sensible, suivie des lignées H2, H6 et H7. Quant aux variétés Rihane, Jaidor et les lignées H5 et H8, elles ont enregistré un niveau de résistance intermédiaire, tandis que la variété Fouara et les lignées H3 et H4 sont apparues résistantes à cet isolat. La sélection effectuée a permis de retenir les meilleurs épis qui constitueront les têtes de sélection dans les futures générations.

Mots-clés : *Hordeum vulgare* L., *Pyrenophora graminea*, résistance génétique, sélection.

INTRODUCTION

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une espèce rustique qui peut être cultivée dans des sols plus ou moins pauvres. Elle est intéressante pour le pays compte tenu de sa tolérance à la sécheresse. La culture de l'orge qui occupe en Algérie une place très importante s'inscrit dans le cadre du système céréaliculture – élevage et dont l'objectif est une production élevée et régulière en grain et en paille. Malgré l'importance des superficies, les rendements de cette culture restent faibles et fluctuants. Ils varient entre 13.2 qx / Ha en 2003 et 15.2 qx / Ha en 2006 qui est le rendement le plus élevé durant cette dernière décennie.

L'introduction de nouvelles variétés n'a pas toujours donné des résultats satisfaisants permettant l'augmentation de la production. En effet les nouvelles variétés sont relativement très sensibles aux nombreux stress biotiques et abiotiques qui caractérisent les zones de culture de cette espèce. Des efforts sont ainsi faits dans le domaine de la création variétale, suivie par une sélection, pour tenter de cumuler les caractéristiques désirables dans un même fond génétique. Sachant que l'amélioration des rendements et la gestion durable des ressources phytogénétiques passent par la réhabilitation des variétés traditionnelles comme la variété Saïda, celles-ci doivent être introduites dans un schéma de création de nouveaux génotypes combinant à la fois les caractères agronomiques des cultivars locaux et ceux des variétés introduites.

Jusqu'à présent, l'attention a été portée beaucoup plus sur les pratiques culturales et les accidents climatiques, mettant en second ordre un facteur important et pourtant très peu étudié, qui est celui des maladies. D'après une étude réalisée par Sayoud et *al.*, (1999), qui a porté sur les maladies les plus importantes des céréales, la strie foliaire causée par *Pyrenophora graminea* Ito & Kuribayashi (anamorphe: *Drechslera graminea* Rabh. ex Schl.), est parmi les maladies les plus fréquentes en Algérie. Elle engendre des dégâts non négligeables. Compte tenu de l'importance des dégâts causés par ce pathogène, il mérite d'être pris en compte dans les programmes de sélection. Ainsi notre travail se propose d'effectuer une évaluation du niveau de résistance de 11 génotypes d'orge dont 7 lignées F5 et 4 variétés cataloguées à l'égard de *Pyrenophora graminea*, dans le but de sélectionner des génotypes résistants à cette maladie.

MATERIEL ET METHODES

Afin de tester la réaction de nos génotypes d'orge à l'égard de l'isolat de *Drechslera graminea* (04-04-Br), nous avons adopté la méthode sandwich préconisée par Huston et Oswald (1948) et utilisée par Pecchioni et *al.* (1996). Cette technique permet de détecter les mécanismes de résistance exprimés au stade de pénétration dans le coléorhize. Elle consiste en la stérilisation des graines d'orge dans une solution de NaOCl à 5% pendant 5 minutes, suivie d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile. Par la suite, 20 graines, bien séchées entre deux papiers buvard stériles, sont placées entre deux couches mycéliennes en croissance active. Les mêmes étapes ont été effectuées sur graines témoins, sauf que ces dernières ont été mises entre deux couches de PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) sans mycélium. Après incubation à l'obscurité et à 6 ± 1 C° dans une étuve, les jeunes plantules de 20 jours sont transplantées dans des pots de 35 cm de diamètre à raison de 15 plants par pot. Le dispositif expérimental adopté est un plan en randomisation totale avec trois répétitions. D'après Skou et *al.* (1994), l'estimation du niveau d'infection des plantes d'orge ne peut être exprimée que par un pourcentage. Le degré de résistance ou de sensibilité des génotypes est évalué comme le pourcentage des plantes malades au stade épiaison (Pecchioni et *al.*, 1996 ; Benbelkacem et *al.*, 2000 et Arabi et *al.*, 2004). Ainsi le nombre de plantes infectées est calculé puis exprimé en pourcentage, le degré de sensibilité ou de résistance des cultivars est exprimé selon l'échelle élaborée par Delogu et *al.*, (1989) , suivant les appréciations suivantes: très résistant (0-5%), résistant (6-11%), moyennement résistant (12-26%), sensible (27-78%), très sensible (79- 100%).

Les données obtenues ont été traitées par l'utilisation du logiciel XLSTAT, après une transformation angulaire des pourcentages, selon la formule suivante : $\text{Angl} = \arcsin(x\%)^{1/2}$.

RESULTATS ET DISCUSSION

La description de la maladie fait référence à des symptômes foliaires typiques (Zillinsky, 1983). Durant l'expérimentation, des symptômes visibles de la strie foliaire sont apparus sur les génotypes sensibles inoculés et ils étaient absents chez les témoins. Ainsi nous avons constaté que le comportement des 11 génotypes testés se répartit selon l'échelle de Delogu et al. (1989), en 4 groupes (figure 01).

- ◆ Génotypes résistants : représentés par les hybrides H3, H4 et la variété Fouara avec une incidence de 6.66%.
- ◆ Génotypes moyennement résistants : représentés par les hybrides H5, H8 et les variétés Jaidor et Rihane avec un taux d'infection de 13.33%, 20%, 17.77% et 20%, respectivement.
- ◆ Génotypes sensibles : représentés par les hybrides, H2, H7 et H6 avec une incidence de 33.33%, 40% et 46.66 %, respectivement.
- ◆ Génotypes très sensibles : représentés par la variété locale Saïda avec une incidence de 100%.

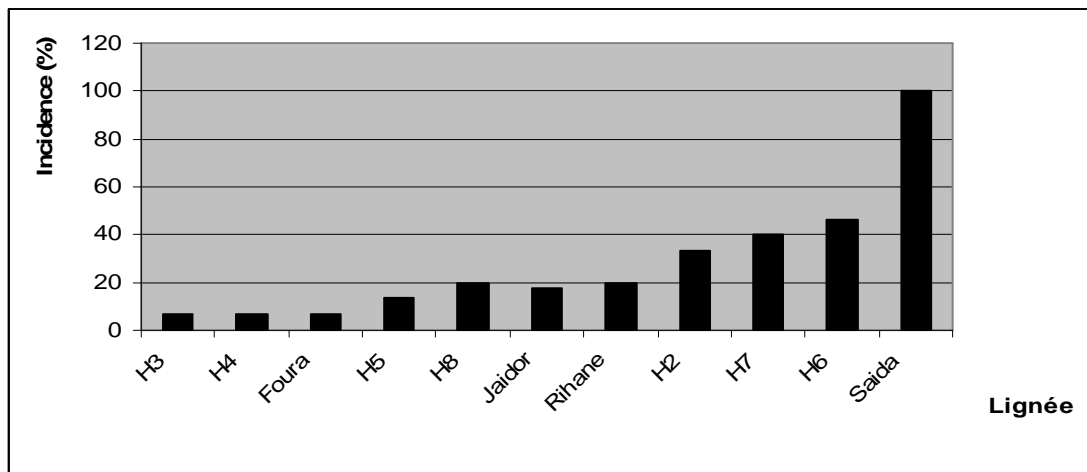


Figure 01 : Incidence moyenne de la maladie provoquée par *P.graminea* (exprimée en %) sur 11 génotypes d'orge.

L'analyse de la variance a révélé des différences très hautement significatives entre les génotypes d'orge sujet d'étude, ceci suggère l'existence d'une large variabilité dans l'interaction entre l'orge et *P. graminea*. Des résultats similaires ont été signalés par plusieurs auteurs (Tekauz, 1983; Boulif et Wilcoxson, 1988; Delogu et al., 1989).

Sur les 11 génotypes testés, la variété Saïda s'est montrée la plus sensible avec un taux d'infection de 100%. Ce dernier résultat s'est révélé concordant avec l'étude menée par Benbelkacem et al. (2000). Les lignées H2, H7 et H6 se sont avérées sensibles à l'isolat (04-04-Br), ceci suggère que ces hybrides ont hérité les gènes de sensibilité du parent femelle Saïda. Concernant l'hybride H6, issu du croisement entre les variétés Saïda et Rihane, qui présentent respectivement des taux d'infection de 100%(très sensible) et de 20% (moyennement résistant), celui ci a montré une incidence d'infection élevée de 46.66% (sensible), ceci suggère que ce génotype n'a hérité que faiblement des gènes de résistance que possède le parent mâle Rihane. Plusieurs auteurs ont souligné la présence d'une résistance partielle (polygénique) chez l'orge à l'égard de *pyrenophora graminea* (Smedegaard-Petersen et Jorgenen, 1982, Arru et al., 2002, Arabi, 2005), par conséquent, il semble difficile de ségréguer ce type de résistance par une hybridation suivie par une sélection généalogique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arabi M.I.E., 2005. Diallel analysis of barley for resistance to leaf stripe and impact of the disease on genetic variability for yield components. *Euphytica*, 145: 161–170.
- Arabi M.I.E., M. Jawhar, B. Al-Safadi, N. MirAli, 2004. Yield responses of barley to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) under experimental conditions in southern Syria. *Journal of Phytopathology*, 152: 519-523.
- Arru L., RE. Niks P. Lindhout G. Valè E. Francia et N. Pecchioni 2002. Genomic regions determining resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in barley. *Genome*, 45(3): 460-466.
- Benbelkacem, A., M. Boulif, A. Amri et S. Ceccarelli, 2000. Etude de la variabilité pathologique de 20 isolats Algérienne de *Pyrenophora graminea*. *Phyto. Mediterr.*, 39 :389-395.
- Boulif M. et R.D. Wilcoxso. 1988. Inheritance of resistance to *Pyrenophora graminea* in barley. *Plant Disease*, 72 : 233-238.
- Delogu G., A.Porta Puglia et G. Vannacci, 1989. Resistance of winter Barley varieties subjected to natural inoculums of *pyrenophora graminea*. *Journal of genetics and Breeding*: 46 179-186.
- Houston B.R., et J.W. Oswald, 1948. Methods of inoculation of barley with the stripe disease, *Helminthosporium gramineum* (abstract). *Phytopathology*, 38: 915.
- Pecchioni N., P. Faccioli, H. Toubia-Rahme, G. Valè, et V.Terzi, 1996. Quantitative resistance to barley leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) is dominated by one major locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 97-101.
- Sayoud R., B. Ezzahiri et Z. Bouznad ,1999. Les maladies des céréales et légumineuses alimentaires au magreb Ed. ITGC. Alger. p. 64.
- Skou, J.P., B.J. Nielsen,, et V. Haahr, 1994. Evaluation and importance of genetic resistance to leaf stripe in western European barleys. *Acta Agric. Scand.* 44: 9.
- Smedegaard-Petersen, V., and Jorgensen, J. 1982. Resistance to barley leaf stripe caused by *Pyrenophora graminea*. *Phytopat. Zeitschrift*, 105: 183–191.
- Tekauz A, 1983. Reaction of Canadian barley cultivars to *Pyrenophora graminea*, the incitant of leaf stripe. *Canadian journal of plant pathology*, 5:294-301.
- Zillinsky, 1983. Les maladies communes des céréales à pailles. Guide d'identification, CIMMYT., Mexico.pp: 141.

MISE EN PLACE D'UN TEST D'INOCULATION PAR LE MARSONIA CHEZ LE ROSIER
DE JARDIN

G. PONTREAU⁽¹⁾, M.-J. JAMMES⁽²⁾, J.-P. REYNOIRD⁽²⁾

- ⁽¹⁾ Agrocampus Ouest Centre d'Angers-INHP, 2 rue Le Nôtre, 49045 Angers – France –
mail : g.pontreau@hotmail.fr
- ⁽²⁾ Pépinières et Roseraies George Delbard - Centre de recherche Yves Mazière, rue
Jean Pellez, 03600 Commentry – France –
mail : mj.jammes@delbardinside.com; jp.reynoird@delbardinside.com

RESUME

La maladie des tâches noires peut avoir un impact économique important chez les rosiers de jardin. Elle est causée par l'agent pathogène hémibiotrophe, *Diplocarpon rosae* Wolf. La mise en place d'un test d'inoculation sur organe isolé (feuilles) permet au chercheur d'avoir un outil d'aide à la décision en fin de sélection, complémentaire du phénotypage. Des variations significatives de sensibilité ont été observées au cours de l'été 2009 chez les 3 hybrides testés, avec un inoculum ajusté à 2.10^5 conidies/ml. On retrouve des différences lorsque les tests ont été réalisés avec des inoculums de provenances diverses. Des essais de congélation de l'inoculum ont montré que les notes de sensibilité sont similaires au témoin pour des durées de congélation variant de 30 mn à 7 jours. Ce test permettrait, à l'avenir, de valider la notion de résistance des rosiers avant leur commercialisation.

Mots-clés : tâches noires – origines d'inoculum - *Diplocarpon rosae* - méthode d'inoculation - congélation des conidies

SUMMARY

Blackspot disease on garden rose trees could have an important economical impact. It is caused by the hemibiotrophic fungus *Diplocarpon rosae* Wolf. Inoculation test setting up on isolated parts of the plant (leaves) helps researchers at the end of the selection process, complementary with phenotyping. Significant differences of sensibility has been observed during summer 2009 on three hybrids tested, with inoculum concentrated at 2.10^5 conidies/ml. Differences were found when tests were applied with inoculums of various geographical origins. Inoculum freezing tests showed similar degrees of sensibility than genotype control for freezing period from 30 mn to 7 days. In the future, this test would validate degrees of rose tree resistance before marketing.

Keywords: rose blackspot – inoculum origin – *Diplocarpon rosae* – inoculation method – conidial freezing

PROGRESSION DE LA SEPTORIOSE DU BLE AU SEIN DE DIFFERENTS TYPES DE
CULTURES SOUS L'ACTION DE LA PLUIE

C. GIGOT^{1,2,3}, S. SAINT-JEAN^{2,1}, L. HUBER^{1,2}, M. LECONTE^{3,4}, L. GERARD^{3,4}
ET C. DE VALLAVIEILLE-POPE^{3,4}

¹INRA, UMR Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval-Grignon, France

²AgroParisTech, UMR Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval-Grignon,
France

³INRA, UMR BIOlogie et GEstion des Risques, 78850 Thiverval-Grignon, France

⁴AgroParisTech, UMR BIOlogie et GEstion des Risques, 78850 Thiverval-Grignon, France

RESUME

Dans le contexte agricole actuel visant à la réduction des intrants, nous nous sommes intéressés aux associations culturales et à leurs rôles dans le contrôle des épidémies causées par un agent pathogène à dispersion pluviale. La mise en place de plusieurs essais en plein champ, avec un suivi hebdomadaire des surfaces foliaires sénescentes naturelles et induites par la maladie, a permis d'appréhender les phénomènes régissant la progression de la septoriose du blé due à *Mycosphaerella graminicola*. Les différentes modalités considérées allaient de la culture mono-variétale de blé sensible — traitée ou non avec des fongicides — à l'association binaire de variétés de blé plus ou moins résistantes. L'association variétale offrait une maîtrise de la maladie similaire à celle observée pour la culture de blé traitée, en limitant notamment le flux de spores au sein du couvert végétal, ce qui pu être mis en évidence grâce à un dispositif de piégeage des spores spécialement conçu. Durant la période de post-floraison, la décroissance globale de la surface verte des trois dernières feuilles pour l'association variétale avait plus d'une semaine de retard par rapport à celle observée pour la culture mono-variétale de blé non traitée. La poursuite de ce travail permettrait à terme de concevoir des associations culturales opérationnelles pour la gestion des maladies.

Mots-clés : *Mycosphaerella graminicola*, septoriose du blé, dispersion par éclaboussement, associations culturales

INTRODUCTION

L'agriculture française se trouve actuellement confrontée à un contexte socio-économique où la tendance est à la diminution drastique du recours aux produits phytosanitaires. Au niveau politique, le plan d'action « Écophyto 2018 », mis en place suite au « Grenelle de l'Environnement », est symptomatique de cette situation puisqu'il vise à réduire l'utilisation de produits phytosanitaires d'ici moins de 10 ans. Par ailleurs d'un point de vue agronomique, les traitements chimiques, représentant la principale méthode de lutte contre de nombreux agents pathogènes des cultures, montrent certains signes de faiblesse. Par exemple, les deux familles de fongicides — strobilurines et triazoles — employées contre la septoriose du blé, principalement causée en France par le champignon pathogène *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröter, ne parviennent plus à maîtriser correctement cette maladie courante et particulièrement dommageable ; les traitements utilisés ont en effet contribué à l'apparition de souches résistantes (Leroux *et al.*, 2007; McCartney *et al.*, 2007).

Le défi est de taille, car il faut faire évoluer les systèmes conventionnels de culture vers des systèmes intégrés avec peu d'intrants, tout en essayant de maintenir le niveau tant quantitatif que qualitatif des productions végétales agricoles, et en gardant présent à l'esprit que les méthodes alternatives à la lutte chimique ont en général une efficacité partielle et variable. Le recours aux associations culturales — aussi bien inter-variétales qu'inter-spécifiques — figure parmi les initiatives tentant de répondre aux impératifs sus-cités. Il est souvent rapporté à ce propos que, outre la stabilisation des rendements, les associations culturales apportent une plus forte résistance aux bioagresseurs (Mundt *et al.*, 1995; Finckh *et al.*, 2000; de Vallavieille-Pope, 2004). Cependant ce fait n'a pas encore été démontré de manière univoque pour toutes les situations, et notamment dans le cas des agents pathogènes à dispersion pluviale (Fitt et McCartney, 1986; Madden, 1992; Huber *et al.*, 2006) tels que *M. graminicola* (Cowger et Mundt, 2002; Belhaj Fraj *et al.*, 2003; Mille *et al.*, 2006).

De précédents travaux menés sur la septoriose du blé au sein d'associations culturales (Saint-Jean *et al.*, 2008) ont mis en évidence un ralentissement dans la progression de la maladie. Toutefois, celui-ci ainsi que les processus sous-jacents impliqués demandent à être davantage explorés.

L'enjeu est de déterminer dans quelle mesure les associations de variétés ou d'espèces peuvent être efficaces pour réduire les épidémies de septoriose.

MATERIEL ET METHODES

Dispositif expérimental

Plusieurs modalités — allant de la culture mono-variétale à une association variétale binaire de blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum* L.) — ont été mises en place pour tester leur sensibilité respective à la septoriose du blé. Les deux variétés de blé *Sogood* et *Maxwell*, se classant respectivement parmi les plus sensibles et les plus résistantes à *M. graminicola* (Anonyme, 2009), ont été retenues. Trois modalités ont été testées¹ : (ST) culture mono-variétale traitée de blé *Sogood*, (S) culture mono-variétale non traitée de blé *Sogood*, (SM) association non traitée des variétés de blé *Sogood* et *Maxwell* [1 : 3].

La parcelle expérimentale (0,3 ha) était située sur le site de Grignon, dans les Yvelines (France). Elle a été divisée en cinq blocs, chacun d'entre eux contenant quatre essais (13 x 3,5 m). Entre ces derniers, l'espace (3 m minimum) a été comblé par du triticale, dont la fonction était d'isoler les essais aussi bien les uns des autres que des parcelles environnantes. Les différentes modalités étaient réparties aléatoirement au sein de

1 Les termes « traitée » et « non traitée » font référence aux traitements anti-fongiques, et les nombres entre crochets désignent les proportions de chaque variété dans l'association lors du semis.

la parcelle. Pour limiter la proximité entre les différents étages foliaires, ce qui aurait été favorable à une progression rapide de la septoriose, aucun régulateur de croissance n'a été appliqué. En contrepartie, sachant que le rendement n'était pas un objectif prioritaire pour notre expérimentation, il a été nécessaire de diminuer les apports azotés de manière à réduire les risques de verse.

Suivi de la progression de la maladie

Des notations hebdomadaires, menées sur une durée de trois mois (du 7 avril au 8 juillet 2009), ont permis de suivre la progression de la sévérité de la septoriose pour les différentes modalités étudiées. Cinq maîtres-brins par essai et par variété de blé ont été sélectionnés. À chaque notation, le pourcentage de surface sénescence totale a été évalué visuellement pour chaque feuille. En effet, comme la septoriose du blé accélère la sénescence naturelle (Robert *et al.*, 2004), les différences observables entre les différentes modalités ont pu être attribuées en grande partie au niveau d'infection des plantes. L'analyse des données sur l'ensemble de la période des notations s'est appuyée sur l'AUPC — ou aire sous la courbe de progression (*Area Under the Progress Curve*).

Par ailleurs, le recours à l'EFV — ou Équivalent Feuilles Vertes — a permis, en privilégiant la surface verte à la surface sénescence des feuilles, d'utiliser une approche pertinente au niveau agronomique — le remplissage des grains étant principalement dû à la surface foliaire verte, photosynthétiquement active (Gate, 1995). Seules les trois dernières feuilles, responsables de la plus grande partie de la photosynthèse lors de la phase de post-floraison (Robert *et al.*, 2004), ont été considérées dans notre analyse. Pour illustrer ce concept par un exemple, une valeur de 2,3 EFV, en ne tenant compte que de trois feuilles, signifie qu'il y a l'équivalent de 2,3 feuilles totalement vertes et 0,7 feuilles totalement sénescences.

Flux vertical des spores

L'étude de différents dispositifs permettant de piéger des particules biotiques — décrit dans la littérature (Fitt *et al.*, 1988; Paul *et al.*, 2004; Bannon et Cooke, 1998) et/ou testés préalablement au sein de l'UMR Environnement et Grandes Cultures (Saint-Jean *et al.*, 2008) — a permis de concevoir un nouveau protocole pour analyser la dispersion par éclaboussement des spores de *M. graminicola*, dans lequel le travail était partiellement automatisé. Le dispositif de piégeage utilisé, de type porte-lames, possédait un large toit, limitant autant que possible les interférences avec la pluie incidente. Les lames de verre, récupérées après chaque pluie que nous souhaitions analyser, étaient recouvertes d'une lamelle, après avoir préalablement déposé quelques gouttes de bleu de méthyle au lactophénol afin de colorer les spores et de stabiliser l'échantillon.

Pour chaque lame de verre, la zone délimitée par la lamelle a été entièrement photographiée au moyen d'un microscope optique avec platine automatisée, couplé à une caméra numérique. Une fois l'acquisition des photos réalisée, nous avons eu recours au logiciel d'analyse d'images ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). En prenant en compte plusieurs paramètres (Saint-Jean *et al.*, 2005) — taille, forme et couleur des différentes particules présentes dans l'échantillon —, les spores de *M. graminicola* ont pu être dénombrées automatiquement.

RESULTATS

Dans la présentation d'une partie des résultats, la modalité SM est subdivisée en deux « sous-modalités » : SM(S) et SM(M), correspondant respectivement aux composantes variétales *Sogood* et *Maxwell* de l'association culturale.

Suivi de la progression de la maladie

La sénescence foliaire totale par plante a évolué au cours du temps, passant de moins de 5 % pour la première notation (7 avril 2009 ; 788 °C.j²) à quasiment 100 % pour la quatorzième et dernière notation (8 juillet 2009 ; 2129 °C.j). Deux périodes, correspondant respectivement aux phases de pré-floraison et de post-floraison, ont été distinguées lors de l'analyse des données. C'est à partir de la huitième notation (26 mai 2009 ; 1411 °C.j) — délimitant les deux périodes sus-citées — que les feuilles terminales étaient présentes sur l'ensemble des tiges étudiées, indiquant par là même la fin de la croissance végétative du blé. Durant la phase de pré-floraison, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différentes modalités (ANOVA sur AUPC : $F = 1,79$; $p = 0,16$). La surface sénescente foliaire par tige a régulièrement progressé d'environ 4 - 5 % entre chaque notation. Au cours de la période de post-floraison, suite à la mise en évidence d'au moins une différence significative entre les modalités (ANOVA sur AUPC : $F = 36,75$; $p < 0,001$), un test HSD de Tukey a permis d'isoler trois groupes différents. En effet, bien que dans tous les cas, la sénescence par tige soit passée de 30 - 35 % à la huitième notation à 100 % à la dernière notation, l'évolution était différente en fonction des modalités. Si pour S, la progression — d'environ 12 % entre chaque notation — était régulière, pour le binôme ST - SM(M) par contre, elle est passée par un point d'inflexion bien marqué à la douzième notation (23 juin 2009 ; 1828 °C.j) — pour lequel les valeurs ont été respectivement de 48 % et 55 %. Quant à la sous-modalité SM(S), elle était dans une situation intermédiaire.

Concernant l'approche basée sur les EFV des trois dernières feuilles durant la période de post-floraison (Fig. 1), les trois mêmes groupes que ceux présentés précédemment ont pu être identifiés (ANOVA sur AUPC : $F = 73,33$; $p < 0,001$, suivie d'un test HSD de Tuckey). En examinant les valeurs pour la douzième notation (23 juin 2009 ; 1828 °C.j) — celle présentant le plus grand écart entre les EFV des différentes modalités —, il est possible de quantifier les différences entre ces groupes tout en tirant parti de l'intérêt de l'unité utilisée. À cette date-là, alors que S n'avait qu'un EFV, le binôme ST - SM(M) plafonnaient à 2,7 - 2,8 EFV — soit presque 2 EFV de plus que S. Quant à SM(S), elle gagnait plus d'un EFV par rapport à S — ce qui la rapprochait davantage du couple ST - SM(M) que de S. De plus, la décroissance des EFV de SM(S) était en retard d'au moins une semaine par rapport à celle observée pour S, ce délai étant beaucoup moins marqué entre SM(S) et le groupe ST - SM(M).

2 Il s'agit de la somme des températures quotidiennes moyennes depuis la date de semis (29 octobre 2009).

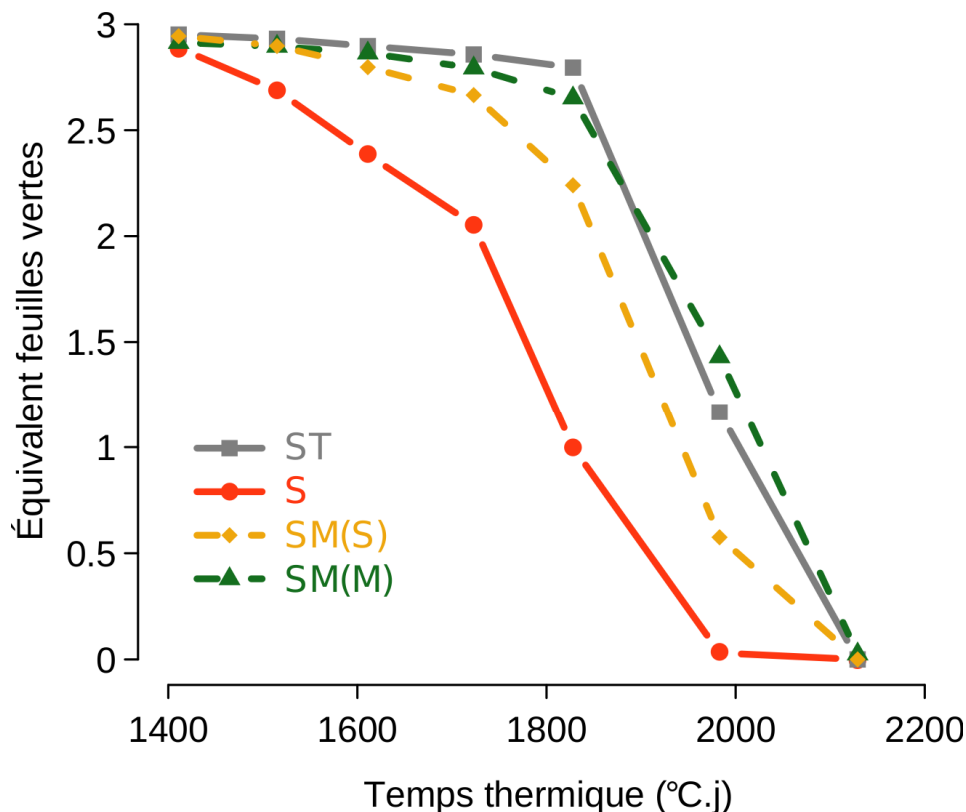


Fig. 1 – Évolution des EFV (Équivalent Feuilles Vertes) moyennes des trois dernières feuilles pour les différentes modalités. Les données relevées durant la période de post-floraison — de la huitième notation (26 mai 2009 ; 1411 °C.j) à la dernière notation (8 juillet 2009 ; 2129 °C.j) — ont été prises en compte. ST et S désignent respectivement les cultures mono-variétales traitée et non traitée aux fongicides de blé *Sogood*. SM(S) et SM(M), correspondent aux composantes variétales *Sogood* et *Maxwell* de l'association variétale.

Flux vertical des spores

Les huit échantillons analysés pour le moment ont été collectés, au sein d'essais des modalités SM et S, suite à un épisode pluvieux de 5 - 6 mm, intervenu à la fin de la nuit du 25 - 26 mai 2009. La faible quantité de prélèvements dont il est question, nous contraint à considérer les données comme étant de nature exploratoire.

Quelque soit la modalité, la concentration en spores le long d'un axe vertical ascendant était décroissante. En effet, de 20 à 80 cm au dessus du sol, la quantité de spores est progressivement passée de 4 - 5 à 1 - 2 spores par cm². Par ailleurs, à une exception près, le nombre de spores détectées pour SM a toujours été inférieur à celui trouvé pour S.

DISCUSSION

Le suivi de la progression de la sévérité de la septoriose en plein champ, grâce à des notations hebdomadaires de sénescence foliaire, a permis de mettre en évidence plusieurs éléments. La différenciation entre les modalités ne s'est réellement opérée dès lors que le blé a cessé son développement végétatif. Cette observation résulte du fait que, jusqu'à l'apparition des feuilles terminales, l'augmentation de la sénescence foliaire était en partie « compensée » par l'apparition régulière de nouvelles feuilles. Comme la septoriose accélère la sénescence naturelle (Robert *et al.*, 2004), l'application de traitements anti-fongiques pour

ST, et le recours à la variété *Maxwell* — plus résistante à la maladie que la variété *Sogood* — pour SM(M) expliquent pourquoi ces deux modalités « demeuraient vertes » plus longtemps, durant la phase de post-floraison. Ceci aurait permis a priori au grain de se remplir davantage grâce à une photosynthèse plus intense durant cette période. Par ailleurs, l'association des deux variétés de blé n'a certes pas permis à la composante variétale *Sogood* d'être l'équivalent de ST, mais cela a tout de même été suffisant pour la rendre significativement moins sensible que S.

Bien qu'étant de nature exploratoire, le protocole utilisé cette année pour l'étude de la dispersion des spores de *M. graminicola* a mis en évidence un flux de spores plus faible au sommet qu'au sein du couvert végétal. De plus, ce flux était plus limité dans le cas de l'association variétale (SM) que dans celui de la culture mono-variétale sans traitement fongicide (S), ce qui expliquerait — du moins en partie — le ralentissement de la progression de la septoriose du blé observée au sein de l'association.

CONCLUSION

Dans nos conditions expérimentales, la comparaison des cultures non traitées aux fongicides a permis de mettre en évidence un ralentissement de la sénescence foliaire au sein de l'association variétale par rapport à la culture mono-variétale de blé, durant la phase de post-floraison. Ceci s'est traduit par une surface photosynthétiquement active plus importante au cours d'une période clé du cycle du blé, correspondant au remplissage des grains. Ces observations peuvent s'expliquer, du moins partiellement, par le fait que le flux global de spores était plus faible au sein de l'association variétale. Les résultats obtenus dans cette étude préliminaire nous encouragent à poursuivre nos investigations afin d'optimiser les associations culturales dans le cadre du contrôle de la septoriose du blé.

REFERENCES

Anonyme (2009). Variétés de blé tendre : choisir ses variétés. Arvalis - Institut du végétal, arvalis infos édition.

Bannon, F. et Cooke, B. (1998). Studies on dispersal of *Septoria tritici* pycnidiospores in wheat-clover intercrops. *Plant Pathology*, 47:49–56.

Belhaj Fraj, M., Falentin-Guyomarc'h, H., Monod, H. et Vallavieille-Pope, C. (2003). The use of microsatellite markers to determine the relative proportions of grain produced by cultivars and the frequency of hybridization in bread wheat mixtures. *Plant breeding*, 122(5):385–391.

Cowger, C. et Mundt, C. (2002). Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of *Septoria tritici* blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*, 92(6):617–623.

de Vallavieille-Pope, C. (2004). Management of disease resistance diversity of cultivars of a species in single fields : controlling epidemics. *Comptes rendus-Biologies*, 327(7):611–620.

Finckh, M., Gacek, E., Goyeau, H., Lannou, C., Merz, U., Mundt, C., Munk, L., Nadziak, J., Newton, A., de Vallavieille-Pope, C. et Wolfe, M. (2000). Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance. *Agronomie*, 20(7):813–837.

Fitt, B. et McCartney, H. (1986). Spore dispersal in splash droplets. In: Ayres, P. et Boddy, L., éditeurs : *Water, Fungi and Plants*, pages 87–104. Cambridge University Press.

- Fitt, B., McCartney, H., Creighton, N., Lacey, M. et Walklate, P. (1988). Dispersal of *Rhynchosporium secalis* conidia from infected barley leaves or straw by simulated rain. *Annals of Applied Biology*.
- Gate, P. (1995). Ecophysiologie du blé. Technique & Documentation, Lavoisier
- Huber, L., Madden, L. et Fitt, B. (2006). Environmental biophysics applied to the dispersal of fungal spores by rain-splash. *In: Cooke, B., Jones, D. et Kaye, B., éditeurs : The epidemiology of plant diseases*. Springer.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M. et Walker, A. (2007). Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 63(7):688–698.
- Madden, L. (1992). Rainfall and the dispersal of fungal spores. *Advanced Plant Pathology*, 8:39–79.
- McCartney, C., Mercer, P., Cooke, L. et Fraaije, B. (2007). Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. *Crop Protection*, 26(8):1272–1280.
- Mille, B., Belhaj Fraj, M., Monod, H. et de Vallavieille-Pope, C. (2006). Assessing four-way mixtures of winter wheat cultivars from the performances of their two-way and individual components. *European Journal of Plant Pathology*, 114(2):163–173.
- Mundt, C., Brophy, L. et Schmitt, M. (1995). Disease severity and yield of pure-line wheat cultivars and mixtures in the presence of eyespot, yellow rust, and their combination. *Plant Pathology*, 44(1):173–182.
- Paul, P., El-Allaf, S., Lipps, P. et Madden, L. (2004). Rain Splash Dispersal of *Gibberella zeae* Within Wheat Canopies in Ohio. *Phytopathology*, 94:1342–1349.
- Robert, C., Bancal, M., Nicolas, P., Lannou, C. et Ney, B. (2004). Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany*, 55(399):1079–1094.
- Saint-Jean, S., Kerhornou, B., Derbali, F., Leconte, M., de Vallavieille-Pope, C. et Huber, L. (2008). Role of rain-splash in the progress of *Septoria* leaf blotch within a winter wheat variety mixture. *Aspects of Applied Biology*, 89:49–54.
- Saint-Jean, S., Testa, A., Kamoun, S. et Madden, L. (2005). Use of a green fluorescent protein marker for studying splash dispersal of sporangia of *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 112(4):391–394.

**AFPP-9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

**MESURE DE LA BIOMASSE FONGIQUE *IN PLANTA* D'*ALTERNARIA DAUCI* ET
DESCRIPTION DU CYCLE INFECTIEUX EN FONCTION DU NIVEAU DE RÉSISTANCE
DE LA CAROTTE**

C. BOEDO^(1,2,3), R. BERRUYER⁽²⁾, S. GEORGEAULT⁽⁴⁾, S. BERSIHAND⁽¹⁾,
M. CHEVALIER⁽²⁾, M. BRIARD⁽²⁾, P. SIMONEAU⁽¹⁾ et P. POUPARD⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR PaVé 77 (INRA/Agrocampus Ouest-INHP/Université d'Angers), UFR sciences,
2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers, France – cora.boedo@etud.univ-angers.fr

⁽²⁾ UMR GenHort 1259, Agrocampus Ouest-INHP, 2 rue le Nôtre, 49045 Angers, France ;
INRA, 42 rue Georges Morel, BP 57, 49071 Beaucouzé, France

⁽³⁾ Clause Vegetable Seeds, avenue bois l'abbé, 49070 Beaucouzé, France

⁽⁴⁾ Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques, UFR sciences médicales,
Université d'Angers, rue Haute de Reculée, 49045 Angers cedex 01, France

RÉSUMÉ

La création de variétés de carotte résistantes à *Alternaria dauci*, agent de la brûlure foliaire, est un enjeu économique majeur pour les sélectionneurs car il n'existe actuellement aucune variété commerciale possédant un niveau de résistance suffisamment élevé. La biomasse d'*A. dauci* a été quantifiée par PCR en temps réel chez trois variétés de carotte au cours d'une cinétique d'infection après inoculation avec une souche agressive ou très agressive. Quinze jours après inoculation, la biomasse fongique est significativement plus importante chez la variété sensible comparativement aux variétés partiellement résistantes. Les étapes majeures de l'infection ont été étudiées par différentes techniques microscopiques. La chronologie des étapes du cycle infectieux ainsi que les délais d'apparition des structures fongiques sont influencés non seulement par le niveau de résistance de la carotte à la brûlure foliaire mais aussi par le niveau d'agressivité de la souche d'*A. dauci*.

Mots-clés : *Alternaria dauci*, carotte, résistance, PCR en temps réel, processus infectieux

SUMMARY

The creation of carrot cultivars resistant to *Alternaria dauci*, the fungus responsible for the *Alternaria* leaf blight, is a major economic aim for carrot breeders. Breeders are still searching for cultivars showing higher levels of resistance to ALB. The biomass of *A. dauci* was quantified by real-time PCR in three carrot cultivars, challenged with an aggressive or a very aggressive strain during a kinetic of infection. Fifteen days after inoculation, the fungal biomass was significantly higher in the susceptible cultivar in comparison to the partially resistant ones. The main steps of infection processes were studied by several microscopic techniques. The chronology of the infectious process stages, as well as the delay of appearance of fungal structures are not only influenced by the level of cultivar resistance but also by the aggressiveness of *A. dauci* isolates.

Keywords: *Alternaria dauci*, carrot, resistance, real time PCR, infectious process

INTRODUCTION

Alternaria dauci est un champignon nécrotrophe responsable de la maladie des brûlures foliaires de la carotte. Les symptômes de brûlures foliaires sont des nécroses entourées ou non d'un halo chlorotique. Les nécroses s'élargissent jusqu'à devenir coalescentes. L'ensemble du feuillage peut être atteint, il prend alors un aspect brûlé. Le champignon attaque la carotte à tous les stades de son développement. La maladie de la brûlure foliaire est très préjudiciable en production de racines de carottes car les symptômes causés diminuent le potentiel photosynthétique des feuilles lesquelles s'affaiblissent et se rompent lors de l'arrachage mécanique qui s'effectue par préhension des fanes. Les racines restent donc en terre et lorsque l'attaque parasitaire est importante, l'ensemble de la récolte peut être perdue. Ce champignon possède en plus la particularité de se transmettre *via* les semences de carotte lorsque les hampes florales sont infectées. Sa dissémination peut donc se faire sur de longues distances du fait de l'internationalisation du commerce des semences. Les sources d'inoculum peuvent cependant avoir d'autres origines : carottes sauvages, adventices, repousses (Farrar *et al.*, 2004). La France est le premier producteur mondial de semences de carotte et le deuxième producteur au sein de l'Union Européenne pour la carotte de consommation. Dans un tel contexte économique, on comprend bien la nécessité de mettre au point de nouvelles variétés de carotte possédant des niveaux de résistance élevés et durables vis-à-vis d'*A. dauci*. Pour les établissements semenciers, l'enjeu est d'autant plus important qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune variété de carotte suffisamment résistante à *A. dauci*. Des QTL impliqués dans les mécanismes de la résistance de la plante à *A. dauci* ont été mis en évidence (Le Clerc *et al.*, 2009). La lutte contre *A. dauci* est génétique mais aussi chimique en dépit des effets néfastes que cela engendre sur l'environnement et la santé humaine. L'idéal, pour les sélectionneurs de la carotte, serait de pouvoir cumuler, au sein d'une même variété, un nombre important de QTL liés à la résistance. Parallèlement aux recherches menées sur les mécanismes impliqués dans la résistance de la plante envers le pathogène, il est nécessaire de bien connaître le cycle biologique du pathogène, qui jusqu'ici n'a pas fait l'objet d'investigations approfondies. La présente étude consiste à étudier en détail le cycle biologique d'*A. dauci* et de mettre en évidence les étapes clés du processus infectieux. Nous nous sommes attachés à mettre en évidence des différences de comportement du pathogène en fonction du niveau d'agressivité de la souche d'*A. dauci* ou du niveau de résistance de la plante hôte. Tout d'abord, la caractérisation des différentes étapes du cycle infectieux d'*A. dauci* a été effectuée au moyen de deux techniques de microscopie. La microscopie électronique à balayage permet d'étudier le développement du pathogène en surface des feuilles de la carotte tandis que la microscopie confocale nous a permis de suivre l'évolution du champignon à l'intérieur des parenchymes palissadiques et lacuneux. Ces observations consistent à identifier les types de structures fongiques (nourricières et/ou infectieuses) mises en place par le pathogène au cours des différentes étapes de son cycle infectieux (adhésion – pénétration – colonisation – reproduction). Parallèlement, la biomasse fongique d'*A. dauci* a été quantifiée *in planta* au cours du processus infectieux afin de suivre la progression de la colonisation. Dans ce but, un outil moléculaire basé sur la PCR en temps réel a été mis au point.

MATERIEL ET METHODE

MATERIEL BIOLOGIQUE

Matériel fongique

Deux souches d'*A. dauci* isolées en 2000 à partir de feuilles de carotte porte-graine par la Station Nationale d'Essais des Semences ont été utilisées. La souche P2 (souche de référence du laboratoire) est agressive et est originaire du département de la Gironde. La souche A2 est très agressive et provient du Maine-et-Loire.

A. dauci est cultivé en boîtes de Pétri (diamètre de 9 cm) sur milieu «jus de carotte» (20% de jus de carotte Jocker®, 20 g d'agar). Les boîtesensemencées sont placées pendant 20 jours à $24 \pm 2^\circ\text{C}$ à raison de 16 heures de lumière blanche par jour afin de favoriser la sporulation du champignon. Une membrane de cellophane est ajoutée en surface du milieu «jus de carotte» lorsque le mycélium est destiné à l'extraction d'ADN en vue des expériences de quantification par PCR en temps réel.

Matériel végétal

Les variétés de carotte utilisées sont Presto, Texto et Boléro. Il s'agit de trois variétés de type Nantaise sélectionnées par Vilmorin. La variété Presto est couramment utilisée dans les programmes de sélection variétale en temps que témoin très sensible à la brûlure foliaire. Les variétés Texto et Boléro sont partiellement résistantes à *A. dauci*. Les semences de ces trois variétés sont pelliculées avec un mélange à base de deux fongicides, l'iprodione (imidazole) et le thirame (dithiocarbamate).

Conditions de cultures des carottes en serre

Les semis de carotte sont réalisés en serre dans des caisses contenant un substrat composé de 2/3 de tourbe de sphaigne et 1/3 de sable de Loire. Dans chaque caisse, une cinquantaine de semences sont placées à 1,5 cm de profondeur et recouvertes de sable. Les paramètres de température, d'hygrométrie (85%) et de photopériode (16h/8h) sont contrôlés par informatique. Les températures diurne et nocturne sont respectivement de 20 et $19^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Après l'inoculation la température est maintenue à 24°C .

L'arrosage est effectué manuellement avec de l'eau du robinet. La fertilisation des plantes est réalisée avec un engrais N-P-K 3-2-6 (Sévitall). Des traitements anti-oïdium sont réalisés préventivement avec du nimrod (bupirimate : 2 mL/L).

PREPARATION DE L'INOCULUM

L'inoculum est constitué de conidies d'*A. dauci* mises en suspension à partir de cultures âgées d'environ 20 jours. Quatre mL d'eau stérile contenant 0,05% de Tween 20 sont déposés sur chaque boîte et la surface de la gélose est raclée avec un étaloir stérile. La suspension obtenue est filtrée au travers d'une double épaisseur de gaze. La concentration des spores est calibrée à l'aide d'une cellule de Thoma.

Pour l'étude de l'installation des souches d'*A. dauci* en surface et à l'intérieur des feuilles de carotte par microscopie, l'inoculum a été calibré à 10^5 conidies/mL. Pour l'étude des cinétiques d'infection par PCR en temps réel, une concentration de 10^4 conidies/mL a été utilisée.

REALISATION DE L'INOCULATION EN SERRE

Les plantes sont placées en serre sous un tunnel plastique et leur feuillage est saturé en eau par brumisation manuelle, juste avant l'inoculation. L'inoculation [10^4 ou 10^5 conidies/mL] est réalisée à l'aide d'un pulvérisateur manuel sur des plantes ayant atteint le stade 6-8 feuilles vraies. Pendant les deux jours suivant l'inoculation, le tunnel est maintenu fermé et la surface des plantes est humidifiée deux à trois fois par jour à l'aide d'un brumisateuse. Le tunnel est enlevé deux jours après l'inoculation.

PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS POUR LES ETUDES PAR MICROSCOPIE

Les étapes de prélèvement et de préparation des échantillons destinés à être observés par microscopie électronique à balayage sont décrites par Boedo *et al.*, 2008.

Pour les observations par microscopie confocale, des segments de feuilles ($\approx 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) sont prélevés 4, 15 et 21 jours après inoculation et sont placés dans du tampon FAA

(formaldéhyde : acide acétique : éthanol 60°, 5 : 5 : 90, v/v/v). Les échantillons sont inclus dans de l'agarose 6% et coupés à l'aide d'un vibratome Leica VT1000S (Leica, France). Les coupes transversales (50 µm d'épaisseur) sont récupérées dans l'eau. Les segments de feuilles sont colorés pendant 2 minutes en présence d'iodure de propidium (dilué 100 fois). Deux rinçages sont réalisés successivement avec du tampon PBS 1X. L'iodure de propidium colore les noyaux et les parois végétales. Les échantillons sont ensuite placés dans une solution de Solophényl 0,1% pendant 5 minutes, puis ils sont rincés successivement dans deux bains d'eau bi-distillée pendant 3 minutes. Le solophényl sert à colorer les parois fongiques. Les échantillons sont ensuite montés entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol 50%. Les échantillons sont observés avec une station confocale FV-1000 couplée à un microscope inversé IX-81 (Olympus, Tokyo, Japon), équipé d'un objectif Olympus UplanSapo x60, ouverture numérique 1,2.

PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS POUR LA QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE FONGIQUE PAR PCR EN TEMPS REEL

Les feuilles f_2 et f_3 de cinq plantes prises au hasard dans cinq caisses différentes sont collectées au bout de 5 heures après l'inoculation puis tous les 5 jours jusqu'au 25^{ème} jour après l'inoculation. On réalise cinq répétitions par traitement (variété/souche/date). Les échantillons sont immédiatement congelés à -80°C en attendant leur lyophilisation.

Le déroulement des étapes de préparation des échantillons d'ADN (lyophilisation, broyage du matériel végétal, extraction d'ADN, choix des amorces pour la PCR en temps réel, préparation des mélanges réactionnels et conditions d'amplification) est décrit par Boedo *et al.*, 2008.

ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

La première étape de l'analyse des résultats consiste à vérifier la spécificité des réactions d'amplification grâce à la visualisation des courbes de fusion. Trois répétitions sont réalisées pour chacun des échantillons. L'analyse d'une série de standards de concentrations connues d'ADN de champignon nous permet de tracer les droites étalon [$Ct = f(\log_{10} [ADN])$]. Un ratio d'infection I est calculé selon la méthode décrite par Berruyer *et al.* (2006) avec $I = [(N_{\text{nombre de copies du génome fongique}} / N_{\text{nombre de copies du génome végétal}}) \times 100]$. Le nombre de copies du génome du champignon est calculé à partir des valeurs de Ct et des courbes étalon en se basant sur une taille de 30 Mpb pour 4 génomes haploïdes d'*A. dauci* (Akamatsu *et al.*, 1999). Le nombre de copies du génome de la plante est estimé à 12500 par réaction de PCR ce qui correspond à une quantité d'ADN de 25 ng. Ce calcul tient compte de la nature diploïde de la carotte sachant que la taille du génome d'une carotte haploïde est de 980 Mpb (Bennet et Smith, 1976). Les résultats obtenus par PCR en temps réel sont analysés statistiquement avec le logiciel R-2.8.1.

RESULTATS

CARACTERISATION DES ETAPES DU CYCLE INFECTIEUX D'*A. DAUCI* EN SURFACE ET A L'INTERIEUR DES FEUILLES DES TROIS VARIETES DE CAROTTE

L'objectif consiste à identifier les étapes clés du processus infectieux en mettant en évidence : i) la succession des différentes étapes du cycle biologique ; ii) les délais d'apparition d'organes fongiques possédant différentes fonctions. La chronologie des différentes étapes du cycle infectieux d'*A. dauci* et les dates d'apparition des différentes structures fongiques en surface des trois variétés de carotte sont présentées dans le tableau I.

Tableau I : Récapitulatif des étapes clés du cycle infectieux d'*A. dauci* chez trois variétés de carotte - Summary of the main steps of *A. dauci* infectious cycle on three carrot cultivars

| Étapes de l'infection | Var. Presto | Var. Texto | Var. Boléro |
|---|------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Adhésion avec mucilage fibreux | J+1 ^a | J+1 | J+1 |
| Formation d' <i>appressoria-like</i> terminaux | J+1 | J+1 | J+1 |
| Formation d'hyphopodes en position latérale | J+1 | J+2 | J+2 |
| Pénétration directe <i>via</i> les jonctions inter-cellulaires | J+1 | J+1 | J+1 |
| Pénétration directe <i>via</i> les ostioles des stomates | J+1 (P2) J+10 (A2) | J+21 (P2) J+10 (A2) | X (P2) ^b J+10 (A2) |
| Pénétration <i>via</i> les ostioles des stomates avec formation d' <i>appressorium-like</i> | J+15 (P2) X (A2) | J+21 | X |
| Présences d'hyphes sous-cuticulaires | J+15 (P2) J+10 (A2) | J+10 (P2) J+15 (A2) | J+10 |
| Emergence de structures fongiques ^c à partir des stomates | J+10 | J+10 (P2) J+15 (A2) | J+21 |

a Nombre de jours après inoculation ; b Non observé ; c hyphes ou conidiophores

L'objectif prioritaire de ce travail est d'étudier l'influence exercée par le niveau de résistance de la plante vis-à-vis de la brûlure foliaire d'une part et l'influence de l'agressivité de la souche d'autre part, sur les étapes du cycle infectieux.

La première étape du processus infectieux est l'adhésion du pathogène en surface de sa plante-hôte. Dès le premier jour après l'inoculation, indépendamment de la variété de carotte étudiée et de la souche d'*A. dauci* utilisée, les hyphes adhèrent fortement à la cuticule en sécrétant un abondant mucilage qui s'étend autour des hyphes. Ce mucilage recouvre largement la surface des cellules de la plante. Le contact est très étroit entre les deux protagonistes. En moins de cinq heures après l'inoculation, les conidies d'*A. dauci* germent chez les trois variétés inoculées, quelle que soit la souche utilisée. En ce qui concerne la colonisation superficielle de la plante, les hyphes croissent le plus souvent en suivant les dépressions situées au niveau des jonctions inter-cellulaires des cellules épidermiques. Le thigmotactisme observé résulte de la variation du relief existant entre deux cellules épidermiques adjacentes.

Suite à l'adhésion et à la germination des conidies, une étape importante du processus infectieux est la pénétration du champignon dans les tissus de la plante hôte. Indépendamment de la souche inoculée et de la variété de carotte testée, *A. dauci* pénètre directement au travers des jonctions inter-cellulaires dès J+1 après inoculation. Dans nos conditions d'expérimentation, *A. dauci* réalise sa pénétration en formant parfois des structures infectieuses de type *appressoria-like* en position terminale (Howard 1997) ou hyphopodes en position latérale. Occasionnellement *A. dauci* pénètre *via* les stomates. Cette voie de pénétration est observée seulement à la face inférieure des feuilles, là où la densité des stomates est la plus importante. Chez les variétés Presto et Texto, cette pénétration peut parfois s'accompagner de la différenciation d'un *appressorium-like* au-dessus de l'ostiole. La pénétration par les stomates est généralement plus tardive que la pénétration par les jonctions inter-cellulaires. La souche A2 pénètre par les stomates des trois variétés à partir de J+10 après inoculation tandis que la souche P2 pénètre dès J+1 chez la variété sensible Presto et à partir de J+21 chez la variété Texto. Nous n'avons pas observé de pénétration de la souche P2 par les stomates de la variété Boléro. L'intense colonisation des tissus végétaux se traduit par la présence d'un réseau dense d'hyphes sous-cuticulaires chez les trois variétés de carotte. Les hyphes sous-cuticulaires de la souche P2 d'*A. dauci* s'observent dès J+10 après inoculation chez les deux variétés partiellement résistantes et à partir de J+15 chez la variété sensible Presto. Pour la souche A2, la chronologie est un peu différente puisque les hyphes sous-cuticulaires sont présentes dès J+10 chez les variétés Presto et Boléro, et J+15 chez la variété Texto. Les observations au microscope confocal de coupes transversales de feuilles de carotte infectées, nous ont permis de mettre en évidence un pore de pénétration d'1 µm de diamètre à la base d'un *appressorium-like*. Les hyphes d'*A. dauci* colonisent les parenchymes palissadiques et lacuneux. Nous avons pu établir que le champignon était présent de façon extra- et intra-cellulaire.

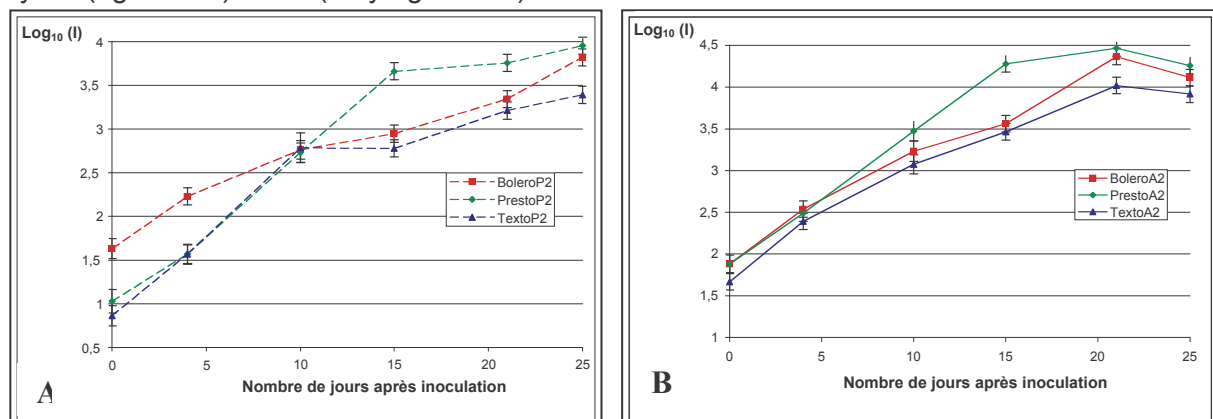
Le succès de l'infection se traduit par la sortie des hyphes des souches P2 ou A2, situées dans les tissus végétaux sous-jacents, par les ostioles des stomates des variétés Presto et Texto à J+10 ou J+15 après inoculation et à J+25 pour la variété Boléro. Le cycle infectieux des champignons phytopathogènes se termine généralement par l'étape de sporulation qui assure la survie et la dissémination du pathogène. Des sorties de structures fongiques sont observées *via* les ostioles. Parmi ces structures fongiques, certaines sont supposées être des conidiophores malgré l'absence de conidies néo-formées à leur extrémité. De telles structures sont observées à J+10 après inoculation chez la variété Presto inoculée avec les souches P2 ou A2 et à la même date chez la variété Texto inoculée avec la souche P2. Ces structures sont également observables à J+15 chez la variété Texto inoculée avec la souche A2 ou à J+21 chez la variété Boléro inoculée avec chacune des deux souches d'*A. dauci*.

QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE D'*A. DAUCI* DANS LES FEUILLES DE CAROTTE DE TROIS VARIETES POSSEDANT DIFFERENTS NIVEAUX DE RESISTANCE A LA BRULURE FOLIAIRE

L'objectif de cette expérimentation est de déterminer si la quantité de biomasse fongique *in planta* est influencée par le niveau de résistance de la plante et/ou par le niveau d'agressivité de la souche utilisée. La biomasse fongique des souches P2 ou A2 a été quantifiée par PCR en temps réel chez les trois variétés de carotte entre J0 (= 5 heures après inoculation) et J+25 après inoculation (Fig. 1) en utilisant la technologie SYBRGreen®.

Pour chacune des cinétiques d'infection, réalisée par PCR en temps réel avec l'une ou l'autre des souches d'*A. dauci*, la date J+15 est la plus discriminante. La variété sensible Presto est significativement plus colonisée par le champignon [$\text{Log}_{10} (I) = 3,65$ avec la souche P2 et $\text{Log}_{10} (I) = 4,27$ avec la souche A2] comparativement aux deux variétés partiellement résistantes Boléro [$\text{Log}_{10} (I) = 2,96$ avec la souche P2 et $\text{Log}_{10} (I) = 3,56$ avec la souche A2] et Texto [$\text{Log}_{10} (I) = 2,77$ avec la souche P2 et $\text{Log}_{10} (I) = 3,46$ avec la souche A2]. En fin d'expérimentation, entre J+21 et J+25, la biomasse de la souche P2 continue à augmenter. Les valeurs de $\text{Log}_{10} (I)$ passent de 3,75 à 3,95 chez la variété Presto, 3,34 à 3,81 chez la variété Boléro et de 3,21 à 3,39 chez la variété Texto. En ce qui concerne l'évolution de la biomasse de la souche A2, entre J+21 et J+25, on constate que les valeurs de $\text{Log}_{10} (I)$ diminuent entre ces deux dates d'observation. Les valeurs de $\text{Log}_{10} (I)$ passent de 4,46 à 4,25 chez la variété Presto, de 4,36 à 4,11 chez la variété Boléro et de 4,01 à 3,91 chez la variété Texto. En terme de biomasse fongique quantifiée chez les trois variétés de carotte, la souche A2 possède un niveau d'agressivité supérieur à celui de la souche P2 dans nos conditions d'expérimentations.

Figure 1 : Etude cinétique par PCR en temps réel de l'infection des variétés de carotte Presto (sensible), Texto et Boléro (partiellement résistantes) après contamination avec les souches P2 (A) ou A2 (B) d'*A. dauci* – Fungal quantification by real time PCR after inoculation of the carrot cultivars Presto (susceptible), Texto and Bolero (partially resistant) by P2 (agressive) or A2 (very aggressive) *A. dauci* strains



DISCUSSION

L'adhésion à la cuticule de la plante-hôte est une étape importante dans la pathogénèse. *A. dauci* sécrète un mucilage fibreux pouvant être constitué de polysaccharides, de glycoprotéines, de polymères d'hexosamine ou de xylane (Roustae et al., 2000) au niveau des hyphes et des *appressoria-like*. La sécrétion d'exsudats mucilagineux a été rapportée chez plusieurs champignons phytopathogènes nécrotrophes tels que *A. porri* (Aveling et al., 1994), et *A. eichhorniae* (Shabana et al., 1997). En plus de son rôle dans l'adhésion, le mucilage permet de protéger le champignon contre différents facteurs environnementaux (déshydratation, rayonnements ultra-violet) et assure la protection du site de pénétration (Gold et Mendgen, 1984).

D'après nos observations, *A. dauci* pénètre préférentiellement au travers des jonctions inter-cellulaires ce qui confirme les travaux de Dugdale et al. (2000). La pénétration se fait directement ou suite à la différenciation de structures particulières : les *appressoria-like* ou les hyphopodes. D'après nos connaissances, c'est la première fois que la présence de structures de type *appressorium-like* est rapportée chez *A. dauci*. Les *appressoria-like* produits par les tubes germinatifs des conidies d'*A. dauci* sont similaires aux *appressoria-like* décrits chez *A. porri* (Ellis) chez l'oignon (Aveling et al., 1994) ainsi que chez *A. brassicicola*, *A. brassicae* et *A. japonica* (McRoberts et Lennard, 1996) pathogènes des Brassicacées. Ces *appressoria-like* correspondent au renflement de l'extrémité hyaline de l'hyphe. Ces organes produits par les champignons du genre *Alternaria* ne jouent aucun rôle dans la pénétration mécanique des tissus végétaux (Tanabe et al., 1995) mais permettraient plutôt au champignon d'établir un contact étroit avec son hôte pour initier la phase de pénétration enzymatique. D'après nos observations dans le cas d'*A. dauci*, un pore d'1 µm de diamètre se forme à la base de l'*appressorium*. Occasionnellement *A. dauci* pénètre par les stomates en face inférieure des feuilles. *A. dauci* pénètre soit directement par les stomates ou en formant un *appressorium-like* au-dessus de l'ostiole. Le second type d'organe de pénétration que nous avons observé est l'hyphopode. Les hyphopodes sont de larges coussinets formés par des ramifications de mycélium, servant d'organe de fixation et de pénétration. Ils sont formés de part et d'autre de l'hyphe en croissance. Van Dyke et Trigiano (1987) parlent d'*appressoria* intercalaires dans le cas de l'étude d'*A. cassiae*. Après la germination des conidies, les hyphes d'*A. dauci* se développent en surface de la cuticule et aussi de façon sous-cuticulaire. Les hyphes qui se développent en surface de la cuticule adhèrent très fortement à la surface de l'hôte. Elles semblent «creuser» leur empreinte dans la cuticule grâce à l'action d'un arsenal enzymatique. Plusieurs *Alternaria* sp. sont connus pour produire des enzymes telles que les cutinases et pectinases (Rotem, 1994). Nous avons constaté que la colonisation des hyphes d'*A. dauci* en surface de la plante-hôte avait vraisemblablement un impact sur celle-ci puisque la cuticule se délite et ses ornements de surface disparaissent au fur et à mesure de l'avancée de l'hyphe. Les hyphes qui se développent en surface suivent généralement les dépressions formées par les jonctions pariétales des cellules végétales. Il s'agit d'un milieu riche en composés pectiques, en acides aminés ainsi qu'en sucres. La formation d'hyphes sous-cuticulaires par les champignons phytopathogènes n'est pas un phénomène couramment observé mais a néanmoins été rapportée chez quelques champignons tels qu'*A. brassicae* (Tewari, 1991) et *Venturia inaequalis* (Chevalier et al., 1991). Les hyphes sous-cuticulaires d'*A. dauci* se développent de façon aléatoire sous la cuticule et contournent toujours les stomates qu'ils rencontrent. La formation d'hyphes sous-cuticulaires semble liée à une courte période de latence dans le cycle biologique du pathogène avant une phase supplémentaire de colonisation des tissus de l'hôte (Roustae et al., 2000).

Les hyphes d'*A. dauci* pénètrent profondément dans les tissus végétaux puisqu'il est possible de les observer dans les parenchymes palissadiques et lacuneux. Le champignon est présent de façon intra- et extra-cellulaire au niveau des parenchymes mais nous ne possédons aucune information sur les mécanismes lui permettant de passer d'une cellule à l'autre (action de toxines et/ou d'enzymes, pression mécanique). Dans le cas du

pathosystème *A. dauci*/carotte (Dugdale *et al.*, 2000) la présence du champignon conduit à la fragmentation des parois cellulaires végétales, la désorganisation du cytoplasme et la perte de structure des thylakoïdes.

D'un point de vue microscopique, aucune différence majeure de comportement d'*A. dauci* n'a été observée chez les trois variétés de carotte hormis l'émergence de conidiophores à partir d'hyphes sous-cuticulaires qui n'a pas été observée chez la variété Boléro. *A contrario*, de tels conidiophores ont été observés chez la variété sensible Presto inoculée avec la souche P2 et chez la variété partiellement résistante Texto inoculée avec la souche P2 ou A2. Les conidiophores observés ne portent pas de conidie ce qui nous conduit à formuler trois hypothèses : i) la conidiogénèse n'a pas encore commencé, ii) la variété Texto ne permet pas ou limite la conidiogénèse. Les variétés Texto et Boléro ne sont pas issues des mêmes sources de résistance à la brûlure foliaire, cela pourrait expliquer les différences observées en terme d'émergence de conidiophores, iii) les conidies ont pu se détacher lors de la préparation des échantillons.

La PCR en temps réel a été utilisée afin de fournir une meilleure compréhension de l'incidence du niveau de résistance de différents génotypes de carotte et du niveau d'agressivité de deux souches d'*A. dauci* sur le déroulement du cycle infectieux du pathogène. Dans nos conditions d'expérimentation, la date J+15 après inoculation correspond à une date clé dans la caractérisation du cycle infectieux d'*A. dauci*. A cette date, la quantité de biomasse fongique *in planta* est significativement différente entre la variété sensible Presto et les variétés partiellement résistantes Texto et Boléro. La vitesse de colonisation des parenchymes par *A. dauci* étant moindre chez les variétés partiellement résistantes comparativement à la variété sensible, cela suppose que des mécanismes de défense de la plante ralentissent la progression du pathogène. On peut supposer que ces variétés synthétisent des composés de défense (phytoalexines, PR-protéines...) qui pourraient être absents chez la variété sensible, ou synthétisés plus lentement et/ou en quantité plus faible. Il pourrait aussi s'agir de composés de défense pré-formés de nature différente (phytoanticipines...) selon que la variété est sensible ou partiellement résistante à la brûlure foliaire. On peut supposer que les barrières physiques (cuticule, paroi) pourraient être légèrement différentes entre des variétés de niveau de résistance différent, en terme d'épaisseur et/ou de composition.

Une autre conclusion importante de notre étude est que les différences de quantité d'ADN fongique mesurées *in planta* dépendent d'une part du niveau de résistance du génotype à la brûlure foliaire et d'autre part du niveau d'agressivité de la souche d'*A. dauci*. En terme d'installation du champignon dans les tissus végétaux infectés, il semble clair que l'envahissement des tissus est d'autant plus important que le génotype est sensible et que la souche est agressive. Tout au long de l'étude cinétique de l'infection, la biomasse de la souche A2 (très agressive) *in planta* est supérieure à celle de la souche P2 (agressive). Sur la base de la quantification de la biomasse fongique *in planta*, la variété sensible Presto est presque toujours plus intensément colonisée que les variétés partiellement résistantes. Texto est en moyenne la variété la moins colonisée tandis que Boléro occupe une place intermédiaire. Le fait que la quantité de biomasse fongique *in planta* soit directement influencée par le niveau de résistance de la plante est vérifié pour d'autres pathosystèmes. Par exemple, la PCR en temps réel a été utilisée pour quantifier l'ADN de *Verticillium albo-atrum* dans des feuilles de variétés de luzerne présentant différents niveaux de résistance. Des différences significatives ont été observées entre les variétés ce qui suggère que la résistance de la luzerne à *V. albo-atrum* est caractérisée par l'expression de mécanismes de défense limitant la colonisation des génotypes résistants par le pathogène comparativement aux génotypes plus sensibles (Larsen *et al.*, 2007). Un autre exemple concerne l'étude de l'interaction piment/*Phytophthora capsici* par Silvar *et al.* (2005). Comme dans le cas du couple *A. dauci*/carotte, la vitesse de progression de *P. capsici* est plus rapide et la biomasse plus importante avec la souche agressive comparativement à la souche moins agressive au cours de la cinétique d'infection. De la même façon que dans le cas du pathosystème *A. dauci*/carotte, plus la souche est agressive, plus la biomasse fongique quantifiée *in planta* est importante.

On constate que de par sa sensibilité, sa spécificité et sa reproductibilité, la PCR en temps réel semble être une technique adaptée pour la mise en évidence de différences mineures du niveau de sensibilité/résistance entre différentes variétés. Des expérimentations complémentaires devront être réalisées, notamment en plein champ.

CONCLUSION

Pour la première fois, le cycle infectieux d'*A. dauci* a été étudié en détail. Des structures infectieuses particulières ont pu être mises en évidence. Ces données permettent de mieux comprendre le cycle de vie d'*A. dauci* dont l'incidence économique sur les cultures de carotte est importante. A plus long terme, des hypothèses pourront être proposées concernant les fonctions biologiques sous-jacentes à l'action de certains QTL de résistance mis en évidence chez la carotte. Notre étude pourrait aussi permettre d'adapter les méthodes de lutte en terme de date de déclenchement des traitements ou de mode d'action approprié (fongicide de contact ou systémique). Nous avons mis au point un outil moléculaire permettant de faire la distinction entre des variétés partiellement résistantes (Texto et Boléro) et une variété sensible (Presto) à la brûlure foliaire, en se basant sur l'intensité de colonisation de leurs tissus foliaires par *A. dauci* au cours d'une cinétique d'infection allant de J0 à J+25. La distinction sans ambiguïté entre variété sensible et variétés partiellement résistantes à J+15 rend hypothétiquement possible la distinction de génotypes possédant des niveaux de résistance intermédiaires. Cette technique de phénotypage appliquée à une date clé permettrait d'accélérer le processus d'identification et de sélection des sources potentielles de résistance. Le but principal est de pouvoir réaliser un classement fiable et objectif de variétés de carotte possédant des niveaux variables de résistance à la brûlure foliaire au cours des différentes étapes de la sélection des nouvelles variétés (choix des meilleurs géniteurs, phénotypage de leurs descendants).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient B. Hamon et M. Tellier pour leur assistance technique, ainsi que les établissements semenciers Clause Vegetable Seeds, Vilmorin et l'ANRT pour leur soutien financier dans le cadre d'une bourse CIFRE (C. Boëdo) ayant permis la réalisation de ces études. Ces travaux ont été financés dans le cadre d'un projet Fond de Compétitivité des Entreprises (Création Variétale Potagère, 2007-2010).

Les auteurs remercient Anne CANTEREAU (IPBC, UMR-CNRS 6187, Poitiers) pour les observations en microscopie confocale.

BIBLIOGRAPHIE

Akamatsu H., Taga M., Kodama M., Johnson R., Otani H., Kohmoto K., 1999 - Molecular karyotypes for *Alternaria* plants pathogens known to produce host-specific toxins. *Current Genetics*, 35, 647-656.

Aveling A.-S., Snyman H.-G., Rijkenberg F.-H.-J., 1994 - Morphology of infection of onion leaves by *Alternaria porri*. *Canadian Journal of Botany*, 72, 1164-1170.

Bennet M. D., Smith J. B., 1976 - Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 274, 227-274.

Berruyer R., Poussier S., Kankanala P., Mosquera G., Valent B., 2006 - Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on *in planta* growth of rice blast fungus. *Phytopathology*, 96, 346-355.

Boedo C., Le Clerc V., Briard M., Simoneau P., Chevalier M., Georgeault S., Poupard P., 2008 - Impact of carrot resistance on development of the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). *European Journal of Plant Pathology*, 121, 55-66.

- Chevalier M., Lespinasse Y., Renaudin S., 1991 - A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology*, 40, 249-256.
- Dugdale L. J., Mortimer A.-M., Isaack S., Collin H.-A., 2000 - Disease response of carrot and carrot somaclones to *Alternaria dauci*. *Plant Pathology*, 49, 57-67.
- Farrar J. J., Pryor B. M., Davis R. M., 2004 - *Alternaria* diseases of carrot. *Plant Disease*, 88, 776-784.
- Gold R.-N., Mendgen K., 1984 - Cytology of basidiospore germination, penetration, and early colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. *Canadian Journal of Botany*, 62, 1989-2002.
- Howard R.-J., 1997 - Breaching the outer barriers - cuticle and cell wall penetration. In: Carroll G., Tudzynski P. *The Mycota, Vol VI, Plant Relationships*. Springer-Verlag, Berlin, 43-60.
- Larsen R.-C., Vandemark G.-J., Hugues T.-J., Grau C.-R., 2007 - Development of a real-time Polymerase Chain Reaction assay for quantifying *Verticillium albo-atrum* DNA in resistant and susceptible alfalfa. *Phytopathology*, 97, 1519-1525.
- Le Clerc V., Pawelec A., Birolleau-Touchard C., Suel A., Briard M., 2009 - Genetic architecture of factors underlying partial resistance to *Alternaria* leaf blight in carrot. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 1251-1259.
- McRoberts N. et Lennard J.-H.-K., 1996 - Pathogen behaviour and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves of host and nonhost plants. *Plant Pathology*, 45, 742-752.
- Rotem J. 1994 - *The genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. APS Press. St Paul, Minnesota, 326 p.
- Roustae A., Dechamp-Guillaume G., Gelie B., Savy C., Dargent R., Barrault G., 2000 - Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. *Phytopathology*, 90, 915-920.
- Shabana Y.-M., Baka Z.- A.-M., Abdel-Fattah G.-M., 1997 - *Alternaria eichhorniae*, a biological control agent for waterhyacinth: mycoherbicidal formulation and physiological and ultrastructural host responses. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 99-111.
- Silvar C., Diaz J., Merino F., 2005 - Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology*, 95, 1423-1429.
- Tanabe K., Park P., Tsuge T., Kohmoto K., Nishimura S., 1995 - Characterization of the mutants of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype deficient in melanin production and their pathogenicity. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 61, 27-33.
- Tewari J.-P., 1991 - Structural and biochemical bases of the blackspot disease of crucifers. *Advanced Structural Biology*, 1, 325-349.
- Van Dyke C.-G., Trigiano R.-N., 1987 - Light and scanning electron microscopy of the interaction of the biocontrol fungus *Alternaria cassiae* with sicklepod (*Cassia obtusifolia*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9, 230-235.

**IDENTIFICATION ET ANALYSE DU POLYMORPHISME DE DEUX HOMOLOGUES
PUTATIFS DE *NPR1* DANS LA FAMILLE DES *VITACEAE***

K. BERGEAULT ⁽¹⁾, C. BERTSCH ⁽²⁾ ET B. WALTER ⁽³⁾

LABORATOIRE VIGNE, BIOTECHNOLOGIES & ENVIRONNEMENT, 33 RUE DE
HERRLISHEIM, 68000 COLMAR, FRANCE

⁽¹⁾ karine.bergeault@uha.fr, ⁽²⁾ christophe.bertsch@uha.fr, ⁽³⁾ bernard.walter@uha.fr

RESUME

La vigne est confrontée à un grand nombre d'agents pathogènes et de maladies conduisant à l'utilisation de produits chimiques en grande quantité. Un enjeu majeur pour la viticulture est donc de réduire l'utilisation de ces produits phytosanitaires. Des méthodes alternatives à la lutte chimique sont donc développées et impliquent la connaissance des mécanismes de défense. De nombreuses études ont mené à l'identification d'éléments de signalisation (Kunkel *et al.*, 2002). La protéine NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis Related 1) est un régulateur positif de la résistance systémique acquise (SAR) chez *Arabidopsis thaliana*. Des études montrent que NPR1 fait partie d'une famille multigénique comprenant au moins 6 membres chez *Arabidopsis thaliana* (AtNPR1 à AtNPR6) (Liu *et al.*, 2005). Nous avons mis en évidence deux homologues putatifs de NPR1 dans le génome de la vigne (VvNPR1.1 et VvNPR1.2). L'amplification et l'analyse des exons des gènes *NPR1* de quinze accessions de la famille des *Vitaceae* montrent que VvNPR1.1 et VvNPR1.2 sont fortement conservés. Ces gènes semblent être soumis à une sélection purificatrice.

Mots-clés : Vigne, Single nucleotide Polymorphism (SNP), phylogénie, mécanismes de défense des plantes

SUMMARY

IDENTIFICATION AND POLYMORPHISM ANALYSIS OF TWO PUTATIVE *NPR1* HOMOLOGS IN THE *VITACEAE* FAMILY

Grapevine is subjected to numerous pests and diseases resulting in the use of phytochemicals in large quantities. The will to decrease the use of phytochemicals leads to attempts to find alternative strategies, implying knowledge of defence mechanisms. Numerous studies have led to the identification of signalling pathways and regulatory elements (Kunkel *et al.*, 2002). Nonexpressor of Pathogenesis Related 1 (NPR1) is an important regulatory component of systemic acquired resistance (SAR) in *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis thaliana* genome contains six *NPR1*-related genes (called *AtNPR1* to *AtNPR6*) (Liu *et al.*, 2005). We identified two putative homologs of *NPR1* gene were found in grapevine genome (called VvNPR1.1 and VvNPR1.2). A PCR-based strategy with primers designed on exons was used to successfully amplify *NPR1* gene fragments in fifteen accessions belonging to the *Vitaceae* family. Sequence analyses show that VvNPR1.1 and VvNPR1.2 are highly conserved. These genes appear to be experiencing purifying selection.

Key words: Grapevine, Single nucleotide Polymorphism (SNP), phylogeny, plant defence mechanism.

**CONCEPTION ET EVALUATION D'UN PROCESSUS DE DECISION DE TRAITEMENTS
FONGICIDES CONTRE LE MILDIU ET L'OÏDIUM DE LA VIGNE**

L. DELIERE⁽¹⁾, P. CARTOLARO⁽¹⁾, B. LEGER.⁽¹⁾⁽²⁾, O. NAUD.⁽²⁾, A. UGAGLIA⁽³⁾

⁽¹⁾ INRA UMR Santé Végétale – ISVV – BP81 33883 Villenave d'Ornon – France
Laurent.Deliere@bordeaux.inra.fr

⁽²⁾ Cemagref UMR ITAP 361 rue JF Breton – BP 5095 – 34196 Montpellier cedex5 - France

⁽³⁾ ENITA Bordeaux UR Egerie - 1 cours du Général de Gaulle 33175 Gradignan - France

RÉSUMÉ

Dans l'objectif de réduire la quantité d'intrants nécessaire à la protection du vignoble contre le mildiou et l'oïdium, un processus de décision de traitements fongicide a été conçu et expérimenté au champ durant quatre ans. Cet article présente la démarche de conception de ce processus ainsi que ses grands principes de fonctionnement. Une analyse critique des performances au vignoble est réalisée sur un plan agronomique, environnemental et économique. L'application du processus entraîne une réduction moyenne de 35% du nombre de traitements, sans altération du potentiel de récolte sur 85% des parcelles expérimentées. Les cas d'échec rencontrés ont permis d'identifier des points faibles du processus et de réaliser les ajustements nécessaires.

Mots-clés : Outil d'aide à la décision, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, viticulture, stratégie de traitement

SUMMARY

DESIGN AND ASSESSMENT OF A DECISION WORKFLOW SYSTEM FOR THE TREATMENTS AGAINST GRAPEVINE POWDERY AND DOWNY MILDEWS

A decision workflow system for the treatments against grapevine powdery and downy mildews has been developed in the aim to reduce the quantity of inputs needed for the control of these two diseases. It has been tested in the field for four years. We present here how this system has been designed and its principles of functioning are described. Its agronomic, environmental and economic performances in the vineyard were assessed. Using this workflow system allowed to reduce by 35% in average the number of fungicide applications and the crop potential was not altered in 85% of the study plots. Understanding why this system was not successful in some cases allowed to identify the weak points in the process and then to improve it.

Key words: Decision support system, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, viticulture, Treatment strategy

INTRODUCTION

Parmi le cortège des bio-agresseurs de la vigne, le mildiou (*Plasmopara viticola*) et l'oïdium (*Erysiphe necator*) sont les deux agents pathogènes engendrant le plus grand nombre de traitements phytosanitaires, environ 70% en moyenne. Plusieurs éléments expliquent cet état de fait :

(i) Les épidémies présentent un caractère fortement polycyclique et sont susceptibles d'engendrer des dégâts quantitatifs et qualitatifs très importants. (ii) Le rendement est le plus souvent limité par la réglementation (AOC particulièrement). L'objectif de production est donc de préserver ce rendement contraint par des opérations culturales plutôt que de maximiser la récolte. (iii) Il en découle un objectif de protection maximaliste visant le plus souvent l'absence de tout symptôme sur la vigne. Dans ce contexte, les pratiques de protection phytosanitaire actuelles ont pour objectif de prévenir toute épidémie plutôt que de gérer un risque de perte de récolte qui soit économiquement acceptable.

Cette forte dépendance aux pesticides de la culture viticole s'est illustrée en 2006 par un Indice de Fréquence de Traitement (IFT) moyen français de 13,6 (Gary *et Al*, 2008). L'IFT correspond au nombre de traitements appliqués à pleine dose sur la totalité de la surface cultivée d'une parcelle au cours d'une campagne culturale. Il convient néanmoins de ne pas s'arrêter à des valeurs moyennes, car il existe une très forte variabilité des pratiques. La variabilité entre régions de production s'explique notamment et a priori par des différences climatiques, de terroir, d'encépagement. Cependant, on l'observe également au sein de zones géographiques climatiquement homogènes, et ceci malgré la mise à disposition d'outils permettant d'aider les viticulteurs à évaluer l'opportunité d'une intervention (modèles bioclimatiques de prévision des risques, données issues de réseaux d'observation,...). On peut donc faire l'hypothèse qu'il y a d'autres causes à cette variabilité dans une région viticole. Des facteurs comme l'aversion aux risques des producteurs et les contraintes d'organisation du travail influencent fortement les pratiques de protection et conduisent souvent à des traitements relativement systématiques pour ces deux bio-agresseurs. On peut aussi considérer, et c'est l'hypothèse que nous faisons, que cette variabilité des pratiques indique que des marges de manœuvre existent pour réduire le nombre de traitements. Le contexte sociétal et réglementaire actuel, notamment le plan Ecophyto 2018, nécessite de repenser les pratiques de protection vers une réduction significative du recours aux pesticides. Pour ces deux bio-agresseurs, une des possibilités consiste à construire des procédures de décisions explicites et robustes, basées sur des indicateurs ou outils existants mais adaptés à un contexte d'usage réduit des fongicides

Dans le cadre d'un projet financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR), nous avons élaboré une procédure ayant pour objectif de réduire de manière significative la charge d'intrants (par la réduction du nombre de passages) tout en apportant un bon niveau de garantie sur la maîtrise des risques. Cette procédure a ensuite été mise à l'épreuve au vignoble durant plusieurs années afin de valider ses performances aussi bien environnementales qu'agronomiques et économiques.

MATERIEL ET MÉTHODE

La démarche choisie pour l'élaboration de cette procédure est inspirée du prototypage de systèmes de culture (Vereijken, 1997) et construit en cinq étapes (Nolot and Debeake, 2003) :

1. La définition des objectifs assignés à la procédure et du cadre de contraintes dans lequel elle s'inscrit.
2. La conception d'un processus théorique. Le choix a été fait d'une conception par un groupe restreint d'experts en protection du vignoble.
3. La formalisation de ce processus théorique.
4. L'évaluation expérimentale au vignoble de ses performances.
5. La validation ou ajustement du processus théorique. L'évaluation expérimentale doit ainsi permettre d'améliorer la robustesse de la procédure par itérations successives, sur la base du concept théorique initial.

OBJECTIFS ET CADRE DE CONTRAINTES

L'objectif environnemental est une réduction significative de la quantité de traitements fongicides. Cette réduction est ici recherchée par la limitation du nombre de passages et non par une réduction de la dose appliquée à chaque traitement.

Nous avons formulé l'objectif agronomique comme le maintien des objectifs de production définis par le viticulteur. Ainsi, on tolère quelques symptômes de maladies sur le feuillage ou sur les grappes, du moment que ces éventuels symptômes n'impactent pas la quantité ni la qualité de la vendange récoltée par le viticulteur.

Pour rendre la procédure de décision la plus opérationnelle possible et économiquement viable, des contraintes liées à la mise en œuvre par les opérateurs ont été intégrées.

Dans la pratique usuelle, de nombreuses observations sont réalisées, et cela a un coût, mais l'objectif reste souvent limité à l'évaluation des résultats de la protection. Dans le cas du mildiou et de l'oïdium, très peu d'observations débouchent sur des décisions sauf pour la gestion des situations de crise. Notre stratégie est au contraire de réaliser un nombre restreint d'observations précises, positionnées à des stades clés du développement des maladies et dont les résultats sont intégrés à la procédure de décision.

Lorsqu'elles sont nécessaires, les applications contre le mildiou et l'oïdium doivent être couplées au maximum afin de réduire le nombre de passages. Ainsi, à chaque étape de la décision, une priorité est donnée à l'un des deux agents pathogènes et la protection contre l'autre est facultative selon le risque parcellaire évalué.

Aucune restriction n'est fixée *a priori* concernant le type de fongicide utilisé mises à part quelques recommandations de choix selon les stades.

CONCEPTION DU PROCESSUS THEORIQUE

Le processus théorique conçu a pour objectif d'adapter le nombre et le positionnement des traitements contre le mildiou et l'oïdium au développement des maladies observé à l'échelle parcellaire. Sa conception repose sur les connaissances acquises sur la biologie, l'épidémiologie et les méthodes de contrôle de ces deux bio-agresseurs ainsi que sur un certain nombre d'hypothèses qui représentent une simplification du système hôte/parasite/environnement. Il ne s'agit pas ici de prendre en compte l'ensemble des paramètres qui régissent ce système mais ceux jugés prépondérants pour la maîtrise du risque. Ainsi, à partir des objectifs et du cadre de contraintes définis, la démarche de conception a nécessité (i) la définition des stades clés de protection pour atteindre les objectifs, (ii) la définition d'un principe général, c'est-à-dire d'une stratégie de traitement *a priori* accompagnée des potentialités de réduction associées, (iii) la définition d'une règle de gestion commune des deux bio-agresseurs, (iv) l'identification et la sélection d'indicateurs pertinents ainsi que des propositions de seuillage pour la mise en œuvre expérimentale. Le processus théorique qui fournit ainsi une description détaillée de la séquence des décisions de traitement a été baptisé POD Mildium (Processus Opérationnel de Décision).

Le concept général du POD Mildium est basé sur une séquence de périodes de traitement avec des traitements dits obligatoires, c'est-à-dire réalisés quelles que soient les conditions, et de traitements optionnels, réalisés en fonction du développement réel ou prévu des épidémies. L'objectif n'est donc pas de limiter le nombre de traitements au strict nécessaire mais d'établir un compromis entre réduction globale de la quantité d'intrants appliqués et sécurité des performances. La saison végétative de la vigne est découpée en 4 périodes avec pour chacune d'elles un objectif de protection et des moyens assignés pour l'atteindre (cf. tableau 1). Le nombre de traitements « obligatoires » est restreint à 4 : 2 pour le mildiou et 2 pour l'oïdium. Ils ont pour objectif la maîtrise des épidémies « faibles », c'est-à-dire difficilement détectables par des observations mais qui peuvent néanmoins engendrer des dégâts significatifs sur la récolte. Par ailleurs, ils sont appliqués à des stades précis de la culture pour lesquels les conséquences d'une mauvaise estimation des risques seraient des plus dommageables pour la quantité ou la qualité de la récolte. Les traitements optionnels sont au nombre de 8 : 5 pour le mildiou et 3 pour l'oïdium. Ils sont appliqués en fonction de

l'état de différents indicateurs et ont pour objectif de maîtriser les épidémies sévères, c'est-à-dire à fort potentiel de destruction.

Les principaux indicateurs utilisés sont de 3 types. Le premier, commun aux deux bio-agresseurs, est basé sur l'observation à la parcelle des symptômes sur les feuilles ou les grappes. Trois observations sont ainsi réalisées au cours de la saison (cf. tableau 1). Le niveau de maladie affecté à la parcelle est une variable discrète à 2 ou 3 niveaux selon le bio-agresseur et la date d'observation : (-) présence nulle à modérée, (+) présence modérée à forte, et éventuellement (++) présence très forte. Les valeurs seuils de ces différents niveaux évoluent en fonction du stade de développement de la culture, ce qui permet d'actualiser la prise en compte du risque en fonction des conséquences de la maladie sur le développement de la vigne et les pertes de récolte potentielles. Pour le mildiou, deux indicateurs complémentaires sont pris en compte.

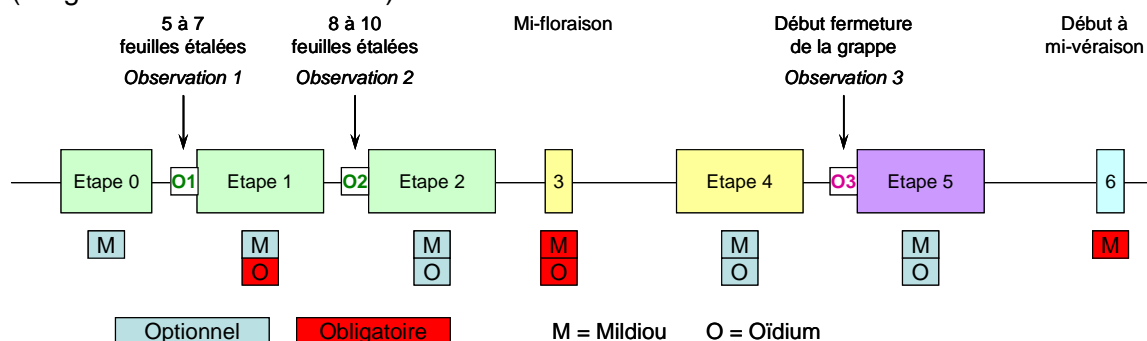
- Le niveau de risque local permet d'appréhender, sur une échelle géographique plus large que la parcelle, le risque de développement du mildiou. Il est évalué grâce à des réseaux d'observations et à des modèles climatiques de risque disponibles pour les viticulteurs. Ce risque est susceptible de prendre deux niveaux : (-) risque faible et (+) risque moyen à élevé.
- Les événements pluvieux annoncés.

Tableau I : Principes du Processus Opérationnel de Décision Mildium (Principles of the Decision Workflow System (DeWS) Mildium)

| Stades de la vigne | Objectifs de protection | Moyens | |
|---|---|-----------------------|---|
| | | Nombre d'observations | Décisions de traitements |
| Avant floraison (BBCH<60) | Limitation du stock d'inoculum sur le feuillage | 2 | Traitements optionnels + Positionnement d'un traitement obligatoire oïdium |
| Floraison – grains de pois (BBCH 60-75) | Limitation de l'infestation des grappes au stade de forte sensibilité | 0 | Traitement obligatoire floraison + Traitement optionnel selon observations précoces et indicateurs complémentaires |
| Fermeture Véraison (BBCH 77-81) | Limitation de la propagation des maladies sur feuilles et grappes | 1 | Traitement optionnel |
| Véraison (BBCH 81-85) | Maintien de l'état sanitaire du feuillage | 0 | Traitement obligatoire mildiou |

Le processus est décomposé en 7 étapes (cf. figure 1). L'entrée dans une étape peut être définie par différents événements : stade phénologique, observation d'état sanitaire ou délai depuis le traitement précédent. Lors de chaque étape, les différents indicateurs sont combinés afin de décider de l'opportunité d'application d'un traitement contre tout ou partie des bio-agresseurs concernés.

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes du POD Mildium (Stages of the DeWS Mildium)

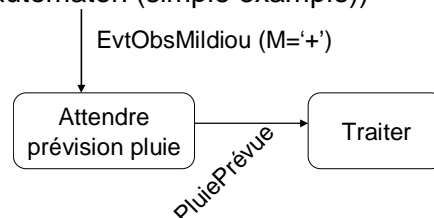


FORMALISATION

La modélisation, c'est-à-dire l'élaboration d'une expression mathématiquement rigoureuse, du POD a été une étape essentielle de gestion de connaissances pour cette recherche. Expérimenter dans de multiples lieux un processus de décision exige en effet précisément de rendre chaque étape de la décision intelligible sans ambiguïté par les expérimentateurs impliqués. Codifiée, chaque décision peut ainsi être enregistrée, comme on le fait pour toute donnée expérimentale.

Le POD est une méthode de contrôle de phénomènes qui évoluent dans le temps (croissance du végétal, évolution des maladies, climat). On peut représenter cet aspect temporel de la décision en référence à des événements passés ou prévus : pluies, changement de stade phénologique, dates d'observation, etc. Cette constatation nous a amené à choisir un formalisme à base d'automates à événements pour la modélisation. Chaque étape du raisonnement est représentée par un état du système décisionnel. Ces états sont séparés par des transitions (flèches dans l'exemple figure 2) liées aux événements pertinents pour la décision : réception des informations climatiques ou phénologiques, collecte des valeurs des indicateurs résultants des observations, échéance de fin de rémanence, etc.

Figure 2 : Transitions et états d'un automate (exemple simpliste)
(Transition and states of an automaton (simple example))



Pour que le modélisateur et les concepteurs du POD puissent travailler sur une représentation commune, nous avons opté pour les Statecharts, qui représentent les automates sous une forme graphique (Léger et Naud, 2009). Ainsi la procédure de décision a été recueillie par interviews en modifiant un schéma, avec calque et crayon. Après interview de chacun des concepteurs, chaque nouvelle version validée du schéma a ensuite été saisie informatiquement dans le langage des Statecharts, ce qui permettait d'en vérifier la cohérence mathématique, puis simulée. Le travail de modélisation permet également aux concepteurs de s'apercevoir d'éventuels cas imprévus pour lesquels il faut imaginer une solution en cohérence avec le reste de la procédure.

Le modèle a servi de référence pour l'établissement du cahier de protocole expérimental. Le cheminement de la décision et les conditions de déclenchement d'une étape (voir figure 1) sont ainsi très précisément stipulés. Grâce à cela, l'analyse critique des décisions préconisées par le POD dans les différentes situations expérimentales rencontrées fournit le matériau pour des adaptations et des évolutions du POD. Le protocole modélisé devient ainsi le support d'une véritable co-conception entre pathologistes, logiciens, et agronomes expérimentateurs.

EVALUATION EXPERIMENTALE

L'échelle choisie pour l'évaluation expérimentale est la parcelle viticole. Cette échelle présente l'avantage de mettre à l'épreuve le POD Mildium dans des conditions proches de la pratique (développement des épidémies, application des traitements) mais, compte tenu de la taille des parcelles, ne permet pas la mise en place d'un dispositif randomisé dans chaque site. Le POD Mildium a ainsi été appliqué sur des parcelles homogènes, en production, d'une superficie variant de 0,25 à 1 ha. L'évaluation a débuté en 2005. Durant 2 ans, les expérimentations ont été conduites uniquement sur deux domaines expérimentaux de l'INRA à Bordeaux (4 parcelles en 2005 et 2006) puis, à partir de 2007, le réseau a été progressivement élargi grâce à la participation d'organismes de développement, de

viticulteurs privés et de lycées agricoles (6 parcelles en 2007, 22 parcelles en 2008 dont 10 en Languedoc Roussillon et 12 en Aquitaine).

Le dispositif ne comporte pas de témoin non traité sur chaque parcelle, compte tenu de la taille des parcelles et de l'influence que ce témoin pourrait avoir sur les symptômes observés sur les zones traitées et sur les décisions en découlant. Les caractéristiques des pressions parasitaires annuelles ont donc été évaluées à l'aide d'un réseau d'acquisition de références biologiques, notamment celui développé par l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin).

Les trois observations de terrain nécessaires aux prises de décisions ont été réalisées sur une zone de 1000 ceps et un échantillonnage de 100 ceps par parcelle, soit 10%.

Les différents indicateurs (observations, prévisions météorologiques, niveau de risque régional mildiou) ont été collectés par les expérimentateurs qui ont déterminé les décisions de traitement résultant du fonctionnement du processus. Ces décisions ont ensuite été transmises aux viticulteurs qui ont eu la charge d'effectuer les traitements avec leurs équipements. Les viticulteurs ont procédé à la mise en œuvre de l'application en ajustant la date d'intervention en fonction des contraintes d'exploitation spécifiques (disponibilité humaine et matérielle, contraintes réglementaires).

Trois niveaux de performances sont évalués : agronomiques, environnementales et économiques. Les **performances agronomiques** sont évaluées à partir de critères quantitatifs (rendement), qualitatifs (maturité des raisins) et sanitaires (niveaux de maladies sur feuilles et grappes estimés sur 3% des ceps de la parcelle). L'objectif est d'évaluer l'écart entre les performances de la récolte et les objectifs de production et de déterminer si l'état sanitaire est responsable d'une éventuelle dégradation des performances. En effet, compte tenu de la taille des parcelles expérimentales, il est parfois difficile de comparer les performances de la récolte à celles d'une conduite classique chez le même viticulteur. Il est donc nécessaire de définir avec précision les objectifs de production assignés à chaque parcelle.

Concernant les **performances environnementales**, seuls les critères de pression fongicides ont été retenus – nombre de traitements et Indice de Fréquence de Traitement (IFT). Il est ici plus facile de comparer ces éléments aux pratiques du viticulteur pour chaque site expérimental. Néanmoins, après plusieurs années d'expérimentation, les pratiques de protection du viticulteur sont susceptibles d'être influencées par l'expérimentation elle-même. Il est donc nécessaire de confronter les nombres de traitements issus de l'application du POD Mildium aux pratiques de protection dans la zone de production obtenues par enquête.

Les **performances économiques** sont évaluées à partir de la comparaison des coûts de la conduite phytosanitaire classique du viticulteur à ceux induits par la mise en œuvre du POD Mildium. Pour cela, une méthode de calcul des coûts, inspirée de la méthode de comptabilité analytique ABC (Bouquin, 2003), a été mise au point pour calculer le coût des stratégies phytosanitaires : la méthode OBC (*Operation Based Costing*). Le coût tient compte uniquement des facteurs de production utilisés pour réaliser les opérations de protection phytosanitaire (traitements phytosanitaires, observations, etc) : intrants, matériel, main d'œuvre. Ce coût est un coût dit incomplet puisqu'on ne prend pas en compte les charges non directement liées aux opérations phytosanitaires. En effet, le reste de l'itinéraire technique est réalisé à l'identique sur toutes les parcelles. En se concentrant sur les facteurs de production, l'impact sur les coûts d'une modification de l'itinéraire technique sera donc aisément identifiable.

RESULTATS ET DISCUSSION

Des niveaux de pressions parasitaires très différents ont été rencontrés en Aquitaine et en Languedoc-Roussillon durant les quatre années d'expérimentation (cf. tableau 2).

Tableau II : Caractéristiques d'évolution du mildiou et de l'oïdium durant les années d'expérimentation

(Characteristics of Downy and Powdery mildew epidemics during the 4 years of experiments)

| Année | Vignoble | Pression parasitaire | | Remarque |
|-------|----------------------|----------------------|--------|--|
| | | Mildiou | oïdium | |
| 2005 | Bordelais | 0 | 0(+) | Quelques parcelles touchées ponctuellement par l'oïdium |
| 2006 | Bordelais | +(+) | + | Pression mildiou plus forte en fin de saison sur le feuillage. Quelques parcelles touchées ponctuellement par l'oïdium |
| 2007 | Bordelais | +++ | 0 | Très forte présence du mildiou sur feuilles et sur grappes, quasiment généralisée à toutes les parcelles |
| 2008 | Bordelais | +++ | 0 | Mildiou généralisé Gel de printemps sur certains secteurs et forte coulure sur certains cépages : impact important sur le rendement |
| | Languedoc-Roussillon | 0 à ++ | 0 à ++ | Grandes variabilité des situations mildiou. Forte présence de symptômes oïdium de type drapeaux sur cépage Carignan. |

Légende : pression parasitaire (0) nulle à très faible, (+) moyenne, (++) forte, (+++) exceptionnelle

Pour le mildiou, 3 à 6 traitements ont été appliqués selon les années et les situations. La distribution du nombre de traitements réalisés avec le POD Mildium se situe dans le dernier quartile de la distribution du nombre de traitements en conventionnel (cf. figure 3). En moyenne, l'économie est de 35% sur une période comprenant deux millésimes à forte pression mildiou.

Concernant l'oïdium, un maximum de 4 traitements a été appliqué avec une très grande majorité des situations ne recevant que 2 traitements. Le nombre de traitements est ainsi très inférieur à la pratique habituelle, avec une économie moyenne de 55% mais sur une période comprenant plusieurs années à faible pression. La tendance est identique lorsqu'on compare les IFT résultant de l'application du POD Mildium en 2008 et ceux des viticulteurs sur les mêmes sites (cf. figure 4). L'économie est de 10 à 40% pour le mildiou et de 30 à 70% pour l'oïdium.

Figure 3 : Distribution du nombre de traitements obtenu avec le POD Mildium (36 sites-années). Comparaison avec un échantillonnage de viticulteurs (conventionnel)

(Number of treatments with DeWS Mildium (36 sites-years) in comparison with conventional strategy)

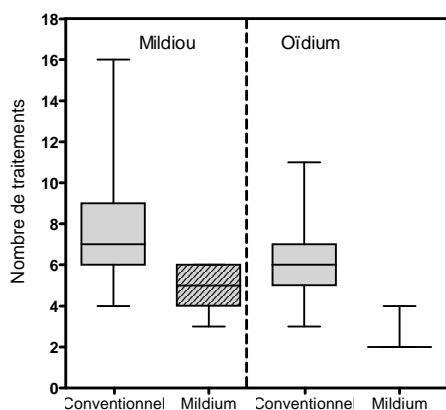
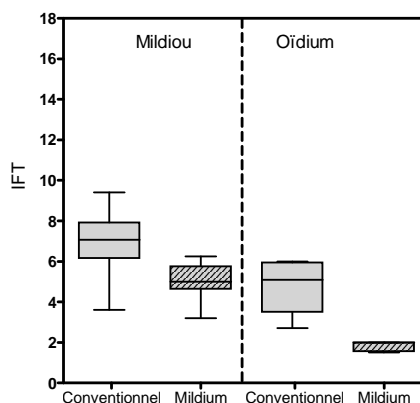


Figure 4 : Distribution des IFT obtenus avec le POD Mildium en 2008 (9 sites). Comparaison à la stratégie du viticulteur sur le même site expérimental (conventionnel)

(Frequency Treatment Index with DeWS Mildium in 2008 (9 sites) in comparison with conventional strategy)



Dans la majorité des situations, l'application du POD Mildium a engendré des niveaux d'attaque de mildiou relativement faibles (cf. figure 5). Néanmoins, en 2008 (année de pression mildiou exceptionnelle) plusieurs parcelles ont montré des niveaux de destruction significatifs. Sur la moitié de ces parcelles, les dégâts étaient supérieurs à ceux obtenus avec la stratégie classique du viticulteur. Sur le feuillage, des attaques de mildiou ont été observées ponctuellement dans les parcelles du bordelais, mais le plus souvent tardivement

à l'approche de la récolte. Concernant l'oïdium, un bon contrôle de la maladie sur grappes a été observé dans toutes les situations. Une invasion plus importante du feuillage en fin de saison a été notée sur certaines parcelles, principalement en 2006 et 2007.

Au-delà des niveaux de maladies, il est nécessaire d'évaluer les performances agronomiques du processus au regard du potentiel de récolte obtenu par rapport aux objectifs fixés par les viticulteurs. La figure 6 montre par exemple, pour chaque site/année, les niveaux de destruction des grappes par le mildiou et l'oïdium (sévérité) en fonction de l'écart de rendement par rapport à l'objectif initial fixé par le viticulteur. Les années 2005 à 2007 montrent ainsi des objectifs de rendement quasi-systématiquement atteints, avec des niveaux de maladies faibles à moyens. Mais en 2008, beaucoup de parcelles montrent un niveau de rendement inférieur à l'objectif de production avec des niveaux de destruction nuls à très forts.

Figure 5 : Distribution des niveaux de maladies obtenus sur feuilles et grappes après application du POD Mildium (Disease severity on leaves and bunches with DeWS Mildium)

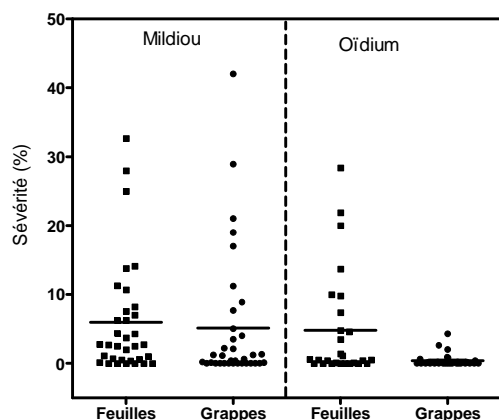
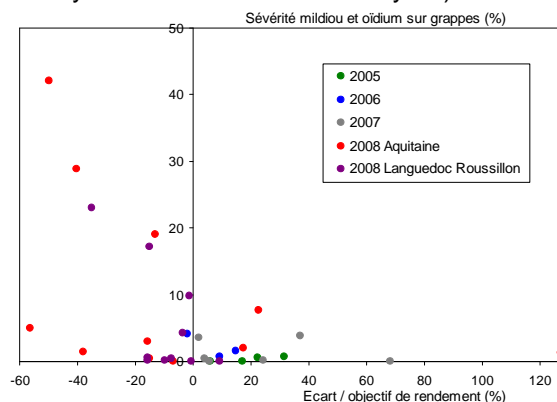


Figure 6 : Ecart par rapport à l'objectif de rendement en fonction du niveau d'attaque du mildiou et d'oïdium sur les grappes pour chaque site-année (Differences with the yield objective and disease severity on bunches for each site-year)



Ainsi, il est possible de répartir les performances agronomiques des parcelles en 4 classes :

- ① Les objectifs de récolte sont atteints quantitativement et qualitativement, avec des niveaux de maladie faibles.
- ② Les niveaux d'attaque sont élevés mais n'ont pas impacté de manière significative les objectifs de récolte. Néanmoins, certains types d'attaque sur grappes (oïdium, mildiou rot brun) peuvent entraîner une dépréciation qualitative des vins à partir d'un certain seuil.
- ③ Les niveaux d'attaque sont faibles mais les objectifs de récolte ne sont pas atteints. D'autres paramètres ont été prépondérants : gel, coulure, pourriture grise, climatologie défavorable à la maturité, etc. Les faibles dégâts se sont néanmoins ajoutés aux pertes déjà enregistrées.
- ④ Les niveaux d'attaques sont élevés et ont affecté de manière significative le potentiel de récolte conduisant ainsi au non respect des objectifs de production.

Pour des seuils de 5% de destruction de grappes pour le paramètre rendement - ce seuil correspond par ailleurs à un niveau de maladie qualitativement acceptable sur les grappes (Darriet *et Al*, 2002 ; Calonnet *et Al*, 2004) - et de 5% de feuillage attaqué et 12° pote ntial visés pour le paramètre maturité des raisins :

- 55% des parcelles ont montré un rendement supérieur ou égal à l'objectif et 85% des parcelles un degré potentiel supérieur à 12 % vol (cas ① et ②). Parmi ces parcelles, 28% ont montré un niveau d'attaque sur le feuillage supérieur à 5% (cas ②).

- 30% des parcelles ont montré des rendements inférieurs aux objectifs, malgré un niveau de destruction sur grappes inférieur à 5% (cas ③). Ces situations ont été principalement rencontrées en 2008 où les dégâts de mildiou n'ont contribué que très légèrement aux dommages mais ont néanmoins pu s'ajouter aux autres pertes de récolte (gel, coulure, ...).

- Enfin, pour 15% des parcelles, toutes en 2008, les dégâts causés sur grappes par le mildiou ont très fortement contribué aux pertes de récolte (cas ④).

Enfin, il était nécessaire d'analyser l'impact du processus sur les coûts de production des viticulteurs (2007-2008). Les coûts sont en effet un élément de gestion primordial pour cette activité dans la mesure où les rendements sont fixes (décret d'appellation). Les surcoûts potentiels associés aux démarches environnementales sont de plus souvent cités par les viticulteurs comme un des principaux freins à la mise en œuvre de processus innovants (Saint-Gès, 2006). Grâce à l'expérimentation, on observe ainsi dans un premier temps que l'application du POD Mildium permet d'envisager une réduction des coûts de production, en ce sens qu'elle permet d'économiser l'application de produits phytosanitaires et de main d'œuvre grâce à un nombre inférieur de passages. On observe, sur une année comme 2007 caractérisée par une forte présence de mildiou sur feuilles et sur grappes, une diminution des coûts des traitements sur les parcelles pilotées avec le POD Mildium. Concrètement, les réductions de traitements phytosanitaires réalisées grâce au POD se sont traduites par une réduction de coût moyenne de 49 €/ha en 2007 (EC 26) et de 137 €/ha (EC 46) en 2008. Toutefois la suppression de certains traitements dans l'itinéraire technique n'entraîne pas l'annulation de la totalité des charges des passages réalisés en moins puisque certaines d'entre elles ne sont pas liées aux nombres de traitements et devront être supportées quand même par l'exploitation (matériel). Il est enfin à noter que les résultats obtenus ont été très variables en fonction des pratiques de départ des viticulteurs (plus le nombre de traitements est élevé au départ dans l'exploitation plus l'économie potentielle peut être importante), des types de produits utilisés (cher ou pas), des doses utilisées dans la stratégie de protection classique de l'exploitation et des prix obtenus par les différentes exploitations pour un même produit.

Ces résultats sont à nuancer, dans la mesure où seule l'expérimentation du POD Mildium sur l'ensemble du vignoble de plusieurs exploitations pourra lever les interrogations qui persistent notamment sur la gestion et le coût des observations à l'échelle de l'exploitation.

CONCLUSION

Le travail réalisé a permis la mise au point d'une méthodologie de conception et d'évaluation d'un processus de décision qui peut être appliqué à d'autres cadres de contraintes ou à d'autres modèles biologiques. La formalisation rigoureuse d'un prototype de processus a permis l'élargissement de l'expérimentation au vignoble au-delà du cercle des concepteurs. Nous avons pu ainsi constituer un réseau d'expérimentation multi-partenaires qui a atteint en 2009 plus de 30 parcelles sur 9 départements viticoles.

D'un point de vue agronomique, les expérimentations conduites depuis 2005 montrent la pertinence de la démarche et des résultats satisfaisant au stade expérimental avec un nombre de traitements toujours inférieur aux pratiques habituelles. Les parcelles ayant montré un échec de protection en 2008 ont permis d'identifier certains points faibles du processus qui ont pu faire l'objet d'ajustements dès la campagne 2009. Par ailleurs, les résultats expérimentaux amènent à soulever plusieurs points : (i) L'application du POD Mildium entraîne fréquemment des symptômes de maladies sur feuilles et/ou sur grappes (invasion du feuillage par l'oïdium en fin de saison par exemple). Ainsi, malgré une production conforme aux objectifs, les résultats ne sont pas toujours jugés visuellement satisfaisants par les viticulteurs. Le développement de tels outils doit donc s'accompagner d'un changement des mentalités et d'une évolution des critères d'appréciation des résultats de protection par les praticiens. (ii) Dans le cas d'évènements impactant la quantité ou la qualité de la récolte (gel, coulure, maladie du bois,...), des dégâts même mineurs dus au mildiou ou à l'oïdium peuvent avoir un impact économique significatif. Il convient donc de définir avec précision les objectifs de production de chaque parcelle ou groupe de parcelles afin d'ajuster l'objectif de protection et de le réviser si nécessaire en cours de saison.

La validation du POD Mildium sera poursuivie à plus large échelle dans un maximum de situations agro-climatiques afin d'évaluer la variabilité de ses performances agronomiques et

économiques afin de pouvoir identifier les adaptations nécessaires aux contextes locaux (cépages, climats) ou aux objectifs spécifiques (type de vins, niveau de qualité,...). Ce travail sera réalisé à partir de 2009 dans le cadre d'un projet financé par le Ministère de l'Agriculture (projet SyDÉRÉT) regroupant les mêmes équipes de recherche et des organismes de développement. La question du passage à l'échelle de l'exploitation y sera également abordé, tant du point de vue de l'échantillonnage des observations que de l'organisation théorique et pratique du travail, en s'appuyant sur la modélisation et l'expérimentation.

A terme, le POD Mildium a pour objectif de constituer un outil de référence pouvant servir de base documentée pour la construction, par ajout d'expertise spécifique, de procédures de décision "bas intrants" en viticulture.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'Agence National pour la Recherche dans le cadre du programme « Agriculture et Développement Durable ». Les auteurs tiennent à remercier l'Unité expérimentale Viticole de l'INRA de Bordeaux, l'institut Français du Vin, les Chambres d'Agriculture de la Gironde, de l'Aude et des Pyrénées Orientales ainsi que l'ensemble des viticulteurs ayant accepté de participer à l'expérimentation.

BIBLIOGRAPHIE

Bouquin H., 2003 - *Comptabilité de gestion*, 2e édition, Ed. Economica. 319p.

Calonnec A., Cartolaro P., Poupot C., Dubourdieu D. and Darriet P., 2004 - Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathology*, 53, 434-45.

Darriet P., Pons M., Henry R., *et al.*, 2002 - Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); Incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3277-82.

Gary C., Meziere D., 2008 – *Vers des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires : analyse comparative et conception d'un réseau d'acquisition de références*, Tome III : Viticulture. 57p.

Léger B., Naud O., 2009 Experimenting statecharts for multiple experts knowledge elicitation in agriculture. *Expert Systems with Applications*, 36, 11296-11303.

Nolot J.M., Debeake P., 2003 – Principes et outils de conception, conduite et évaluation de systèmes de culture. *Cah. Agric*, 12, 387-400.

Saint Ges V., 2006 - *Innovations environnementales dans la viticulture*. Thèse ès Sciences économiques, Université de Bordeaux IV. 347p.

Vereijken P., 1997 - A methodical way of prototyping integrated and ecological arable farming systems (I/EAFS) in interaction with pilot farms. *European journal of agronomy*, 7, 235-250.

**MODÉLISATION DES INTERACTIONS ÉPIDÉMIE – COUVERT VÉGÉTAL : DE LA
RECHERCHE À LA MISE AU POINT D'OUTILS OPERATIONNELS POUR LA
PROTECTION INTÉGRÉE DES CULTURES**

D. GOUACHE ⁽¹⁾, B. ANDRIEU ⁽²⁾, M.-O. BANCAL ⁽²⁾, P. BANCAL ⁽²⁾, M. CHELLE ⁽²⁾,
C. FOURNIER ⁽³⁾, P. GATE ⁽¹⁾, C. ROBERT ⁽²⁾, B. NEY ⁽²⁾

⁽¹⁾ ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt,
France

⁽²⁾ UMR 1091 INRA-AgroParisTech Environnement et Grandes Cultures ; 78850 Thiverval-
Grignon, France

⁽³⁾ UMR 759 INRA-SupAgro Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress
Environnementaux ; Montpellier, France

RÉSUMÉ

La complexité des interactions entre les maladies et les couverts végétaux rend difficile la prise en compte de nombreux facteurs influençant celles-ci. Cette complexité limite l'élaboration d'outils fiables d'aide à la décision, la conception d'itinéraires techniques freinant les maladies, et l'évaluation variétale. Un projet collaboratif entre Arvalis et l'UMR EGC (INRA AgroParisTech), a permis d'élaborer des outils opérationnels, stables, fondés sur la compréhension des relations entre couvert et maladie, prenant la septoriose du blé comme "modèle" dans le cadre de l'Unité Mixte de Technologie Pivert. Ce projet repose sur un cadre conceptuel commun identifiant et hiérarchisant les différents points-clés des interactions entre épidémie et couvert. Les résultats, et la démarche, sont déclinés dans cette communication, et présentés en détail dans les posters auxquels il est fait référence.

Mots-clés : blé (*Triticum aestivum*), septoriose (*Mycosphaerella graminicola*), protection intégrée, peuplement végétal, architecture

SUMMARY

**MODELLING DISEASE – CROP CANOPY INTERACTIONS: FROM RESEARCH TO
OPERATIONNAL TOOLS FOR INTEGRATED PEST MANAGEMENT**

The complexity of the interactions between crops and diseases complicates the conception of robust decision support systems, crop management strategies and breeding for limiting disease impacts. A collaborative project between Arvalis and the UMR EGC (INRA AgroParisTech) has given rise to operational tools for the comprehension of the relations between crop canopies and epidemics, using *Septoria Tritici* Blotch of wheat as a "model". We hypothesize that canopy structure could be relevant to enhance new forms of pest management, included elaboration of resistant of ideotypes. This project is based on a common conceptual framework identifying the different key-points of interactions between disease and the canopy shared by both institutions. The results, and the process, are described hereafter and presented in detail in the posters that are referred to.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*), septoria (*Mycosphaerella graminicola*), integrated pest management, crop canopy, architecture

INTRODUCTION

La septoriose du blé tendre (*Triticum aestivum*), causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est la maladie la plus économiquement importante de cette culture en France par sa survenue généralisée sur le territoire et sa nuisibilité élevée, pouvant atteindre plus de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la septoriose s'appuie essentiellement sur la lutte chimique, avec la réalisation de 1 à 3 traitements, qui contribuent en moyenne à approximativement la moitié de l'investissement en fongicides sur blé (Maumené, communication personnelle). Cependant, cette lutte chimique est doublement remise en cause. Le développement de résistances aux matières actives par le pathogène a induit des baisses d'efficacité importantes (Maufras *et al.*, 2006 ; An., 2009). De plus, la pression sociétale s'est concrétisée par l'engagement pris lors du Grenelle de l'Environnement de réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques de 50% d'ici 2018 (An., 2007). La combinaison de ces deux éléments implique d'améliorer le raisonnement de l'utilisation de la lutte chimique qui doit être déployée en complément d'autres méthodes de lutte. La première méthode de lutte complémentaire est l'emploi de variétés résistantes qui permet de réduire l'investissement fongicide de l'ordre de 20 €/ha (Jorgensen *et al.* 2008). La seconde méthode passe par le raisonnement des pratiques agronomiques (conduite azotée des parcelles, choix des dates et densités de semis...) qui peuvent constituer un levier complémentaire de la lutte contre les maladies (Jorgensen et Gouache, 2008 ; Gouache *et al.* 2009).

Trois questions opérationnelles se posent. Comment permettre aux agriculteurs d'ajuster au mieux leur conduite "fongicide" aux conditions parasitaires locales ? Il s'agit là de prendre en compte à la fois les éléments climatiques et agronomiques majeurs influençant la maladie pour optimiser l'efficacité globale (en terme de retour économique) des interventions, permettant ainsi de réduire l'utilisation de produits chimiques. Comment sélectionner et préconiser des variétés résistantes à la septoriose ? En effet, la caractérisation variétale vis-à-vis de la septoriose est un exercice difficile (van Ginkel et Rajaram, 1999), marqué par de nombreuses corrélations avec les caractéristiques de la variété comme la précocité et la hauteur notamment. Enfin, comment quantifier et prévoir les effets de certaines pratiques agronomiques potentiellement bénéfiques en terme de réduction de pression de septoriose ? La plupart des pratiques ont des effets variables d'une année à l'autre. En 2005, à Vraignes, (80) par exemple, une réduction de la densité de semis a permis de freiner le développement épidémique, contrairement à 2006 où aucun effet n'a pu être constaté.

Les pertes de récolte dues aux épidémies sont donc le résultat d'interactions multiples entre plantes hôtes et leurs agents pathogènes. Le développement de la maladie dépend de nombreux facteurs. La plante est le "support", par sa morphologie au sein du couvert (nommée structure du couvert par la suite), et le "substrat", dont la qualité dépend de son état physiologique, des agents pathogènes. Réciproquement, le fonctionnement de la plante est affecté par l'agent pathogène. Cette perturbation va déterminer les pertes de récolte, mais aussi influencer sur la construction de la structure du couvert. Les fonctionnements de la plante et de son parasite sont donc intimement liés. Pour les champignons des plantes de grande culture, nous formulons l'hypothèse que la structure dynamique de la plante et du couvert est un levier pour amoindrir les effets de la maladie, limitant ainsi le recours à la lutte chimique et le contournement des résistances. C'est aussi l'une des raisons des apparentes contradictions d'une année à l'autre de l'efficacité d'une pratique ou d'une variété à limiter l'épidémie. L'identification des traits associés à la structure qui agissent sur le développement épidémique peut être un enjeu de sélection et d'innovation dans les systèmes de culture pour lutter contre la maladie.

Dans le cadre d'une structure collaborative entre recherche et développement (Unité Mixte Technologique Pivert associant Instituts techniques - Arvalis et CETIOM - l'INRA et AgroParisTech) nous avons développé, ensemble dès le début du processus de construction, un modèle de compréhension des interactions "blé x septoriose" et pensé son utilisation pour agir. Nous avons posé dès le départ un cadre conceptuel d'étude,

consensuel, qui permettait par un va et vient entre modèle et expérimentation non seulement d'approfondir les connaissances sur les relations entre hôte et parasite, mais aussi de proposer un modèle (ou des modèles) basé sur ces dernières. Des analyses de sensibilité permettraient ensuite de hiérarchiser les variables de structure ayant un rôle clé pour la construction d'un couvert idéal en jouant sur les caractéristiques variétales (idéotype) ou sur les pratiques culturales. Ces éléments devaient nous conduire à diagnostiquer et prévoir, mais aussi de proposer de nouvelles pratiques moins favorables à la maladie.

Dans la présente communication, après avoir démontré le rôle de la structure du couvert à partir de travaux existants et souligné leurs limites, nous développerons le cadre conceptuel qui a permis à la recherche de mieux appréhender l'impact de la maladie et de hiérarchiser les facteurs mis en cause, pour enfin décrire comment ce modèle et les connaissances sous-jacentes permettent et permettront des sorties opérationnelles en termes de construction variétale et de pratiques culturales. Nous ne développerons pas les résultats qui se trouvent décrits plus en détail dans des communications auxquelles nous ferons référence.

Enfin, même si nous ne discuterons ici que du pathosystème "blé x septoriose", nous pensons que la démarche peut être généralisée à d'autres pathosystèmes. Cette approche a été entreprise par exemple sur le pois protéagineux et l'antracnose, mais de façon moins complète, et aussi pour de nombreuses cultures, avec des modèles existants ou construits *de novo*. Deux originalités cependant de ce travail : la prise en compte des interactions dans un modèle heuristique et le travail conjoint entre acteurs de la recherche et du développement pour des sorties opérationnelles.

LA STRUCTURE DU COUVERT VEGETAL ET SON ROLE DANS LA TOLERANCE ET L'ECHAPPEMENT AUX MALADIES

L'influence de la structure du couvert sur la dynamique épidémique a été évoquée à de nombreuses reprises, et ce pour de nombreux pathosystèmes. Concernant la septoriose, l'utilisation de lignées quasi-isogéniques variant seulement pour leur hauteur et taux d'expansion de la tige (figure 1) montre leur différence de sensibilité à la maladie (figure 2) (Parker et al., 2002). Les plantes les plus courtes avec une vitesse d'élongation de la tige faible sont plus malades.

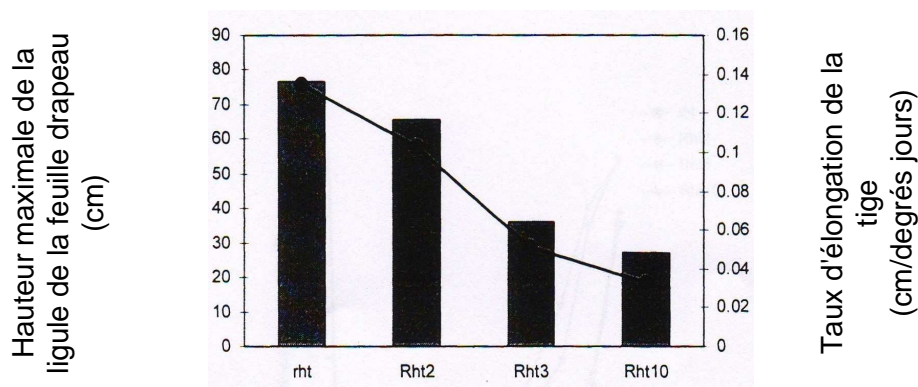


Figure 1 : Hauteur de la ligule de la feuille drapeau (histogramme) et taux d'expansion de la tige (ligne) pour des lignées quasi-isogéniques de cv. Mercia variant pour des gènes de nanisme (Long Ashton, 2000)

Height of the ligule of flag leaf (histogram) and expansion rate of the stem (line) for near-isogenic lines of cv. Mercia variant genes for dwarfing (Long Ashton, 2000)

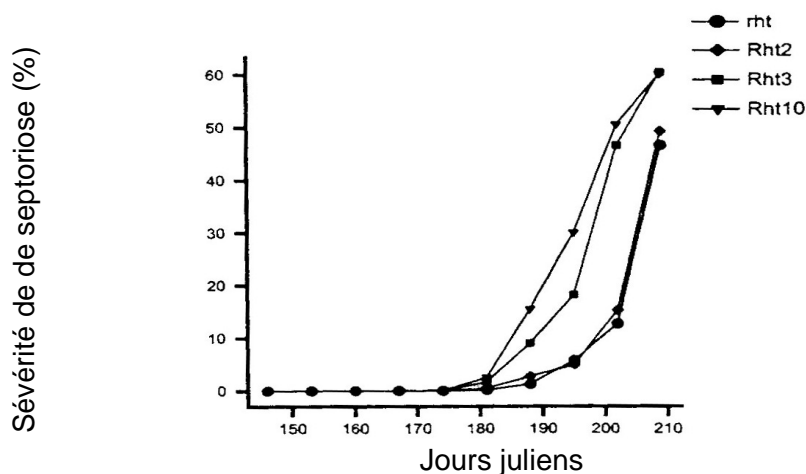


Figure 2 : Evolution de la sévérité d'attaque de septoriose pour des lignées quasi-isogéniques de cv. Mercia variant pour des gènes de nanisme (Long Ashton, 2000)

Evolution of the severity of septoria attack for nearly isogenic lines of cv. Mercia variant genes for dwarfing (Long Ashton, 2000)

Des résultats similaires prouvant les rôles conjoints de la géométrie du couvert et de la localisation de l'attaque ont été obtenus pour d'autres cultures et maladies, qu'elles soient aériennes ou souterraines. Pour ces dernières, une attaque proximale ou distale du piétin échaudage sur les racines de blé par exemple (selon la localisation de la maladie dans le sol) ne produit pas les mêmes effets sur la plante, en perturbant plus ou moins sa capacité d'absorber les éléments minéraux et l'eau du sol (Schoeny et al., 2003). La structure du couvert par son importance sur la maladie peut donc être un facteur de tolérance à la maladie, permettant d'en diminuer la nuisibilité.

Dans l'exemple de la figure 3 (Lovell *et al.*, 1997), la quantité de spore mesurée à plusieurs niveaux dans le couvert est très différente d'un cultivar à l'autre en raison de l'architecture du couvert.

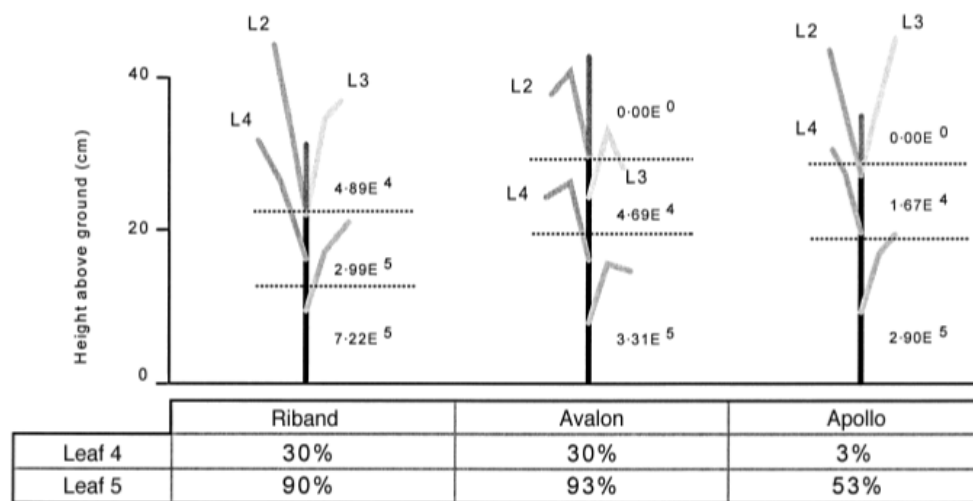


Figure 3 : quantité de spores dans trois sections horizontales du couvert et sévérité de maladie constatée sur les feuilles 4 et 5 de trois cultivars (D'après Lovell *et al.* (1997))

*Quantity of spores in three horizontal sections of the canopy and severity of disease observed on leaves 4 and 5 of three cultivars (According to Lovell *et al.* (1997))*

Comprendre l'effet d'une maladie, et par conséquent son impact, devient particulièrement mal-aisé en raison des nombreuses interactions au sein du système composé par la plante et l'agent pathogène se confrontant au sein du couvert dans un environnement fluctuant. Seul un modèle agrégeant des connaissances quantifiées peut nous permettre d'approcher le fonctionnement de l'ensemble.

MODELISER LES INTERACTIONS AU SEIN DU PATHOSYSTEME POUR COMPRENDRE ET HIERARCHISER LES VARIABLES EN JEU

Devant cette difficulté, nous nous sommes appliqués à :

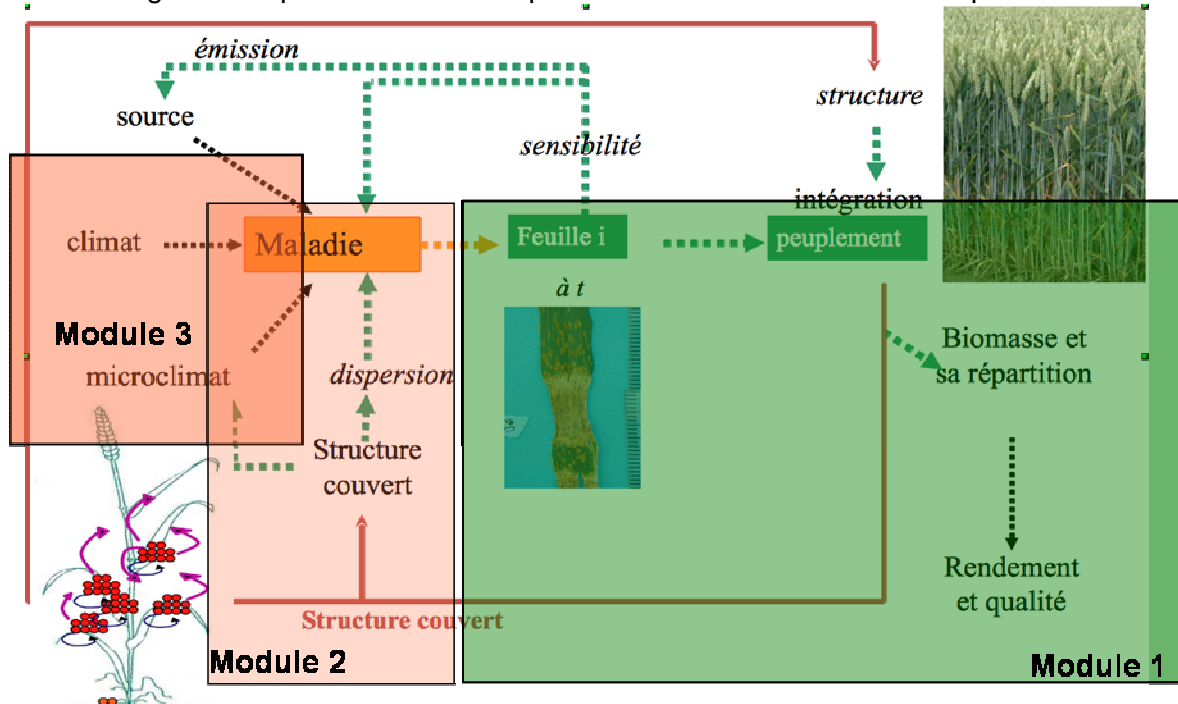
- i) proposer une vision du pathosystème par une représentation conceptuelle commune
- ii) quantifier les processus et les relations entre les variables de cette représentation
- iii) choisir un formalisme informatique qui permettrait d'élaborer un modèle

Le **modèle conceptuel** (figure 4) procède d'étapes intermédiaires (modules) qui nous ont permis de comprendre, de quantifier, d'associer et/ou de dé-corréler les processus, et de les modéliser. Trois parties, complémentaires, sont abordées :

- effet de la maladie sur la plante. La maladie, variable d'entrée, est spatialisée dans le couvert et la sortie de ce module sont les dommages (Module 1)
- effet de l'environnement sur l'agent pathogène (cycle infectieux et dispersion des spores), généré par l'état des feuilles, lieu de rencontre entre le pathogène et son hôte, et par l'architecture du couvert sur l'épidémie (Module 2).
- relations entre structure du couvert et environnement physique du pathogène (Module 3)

Le modèle repose sur la connaissance et la prévision de la mise en place de la structure du couvert et des propriétés physiologiques des feuilles qui le composent, abordées par ailleurs sur des couverts sains (voir dans cette conférence Robert, Andrieu *et al.* 2009, et Fournier *et al.* 2003).

Figure 4 : représentation conceptuelle des relations entre hôte et parasite



Dans le Module 1, la réponse de la plante est abordée à divers niveaux d'organisation (tissu, organe, plante et couvert). Une caractérisation adéquate des symptômes des principales maladies foliaires permet sa corrélation à la surface verte restante sur la feuille correspondante. Au delà de la septoriose, les fonctions de nuisibilité relatives au complexe parasitaire "rouille brune-septoriose" sont désormais paramétrées pour rendre compte de la baisse de photosynthèse à l'échelle foliaire et intégrées à celle du couvert par un modèle 1D (une dimension). Ce modèle calcule la réduction de photosynthèse de chaque étage foliaire à partir d'une relation entre la diminution de la photosynthèse et la sévérité de la maladie (ici très simplement pour ce complexe parasitaire, puisque la photosynthèse est proportionnelle à la surface restée verte, ce qui n'est pas le cas pour d'autres maladies). Il prédit, en sommant les photosynthèses locales, la réduction de croissance et de rendement d'un couvert de blé sous la contrainte du complexe.

Ce modèle a été testé avec succès pour des conditions très différentes de variétés et de sites expérimentaux (Figure 5) pour prédire la réduction de rendement (Gate et al. 2006) et ouvre la voie à des travaux sur la tolérance du couvert aux maladies (voir dans cette conférence Bancal et al.).

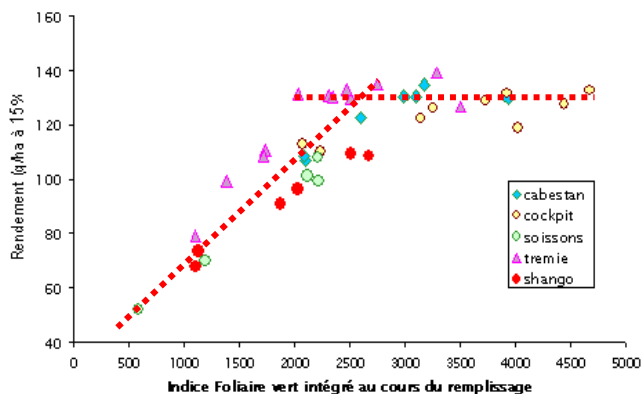


Figure 4 : relation entre indice foliaire vert intégré au cours du remplissage (intégrale de l'évolution de l'indice foliaire vert au cours du temps entre floraison et maturité) et rendement pour plusieurs variétés et plusieurs années (Gate et al., 2006)
Relation between green foliar index integrated during filling (Integral of evolution of the green foliar index during the time between flowering and maturity) and yield for several varieties and several years (Gate et al., 2006)

Notre objectif pour le module 2 est de comprendre comment l'environnement du pathogène créé par la structure des couverts (comprise comme sa géométrie et l'état physiologique des organes) influe sur le développement épidémique. L'environnement créé par le couvert influence le développement des pathogènes foliaires à deux niveaux. Sur la feuille, lieu de rencontre du pathogène et de la plante, l'état physiologique des tissus détermine le substrat (quantité et qualité de la ressource) exploitable par le pathogène. A l'échelle du couvert la dynamique de mise en place du couvert et son architecture influencent les épidémies en déterminant (i) le microclimat au sein du couvert (voir module 3), (ii) la quantité de sites infectables pour le pathogène et (iii) la dispersion de la maladie, à travers la distance entre les sources de spores et les tissus sains mais aussi la pénétration de la pluie et du vent.

L'effet de la géométrie du couvert et de sa dynamique de mise en place sur les épidémies a été pris en compte par le développement de Septo3D (Robert et al, 2008a ; *Robert, Andrieu et al. dans cette conférence*) par couplage du modèle ADEL-blé (Fournier et al., 2003), modèle architecturé de plante construit à l'UMR EGC et d'un modèle de septoriose basé sur le modèle de Rapilly et Jolivet (1976). Dans ce modèle dynamique, nous considérons trois effets de la structure du couvert sur les épidémies : la quantité de surface foliaire influence la réussite d'infection et la croissance des lésions, la densité de végétation influence la pénétration de la pluie ainsi que la redistribution des gouttelettes après splashing et les distances entre tissus infectés et sains fixent la distance du saut à faire pour atteindre les tissus sains. Septo3D a été ensuite utilisé pour identifier les traits de structure du couvert qui jouent sur la septoriose par analyse de sensibilité. Les simulations montrent que plus la plante se développe et grandit vite, plus elle échappe à la septoriose. La taille des feuilles a un effet plus complexe. Enfin, d'après les simulations la vitesse d'allongement de la tige et sa hauteur finale influencent les épidémies, confirmant l'hypothèse de Lovell et al. (1997). Le modèle est en cours de confrontation avec des données expérimentales (Robert et al., 2008b, Robert et al., 2009b). Ce travail de confrontation entre données de terrain et modèle, mené conjointement entre Arvalis et EGC, devrait permettre de mieux cerner les effets de la densité de semis sur la maladie.

Un modèle opérationnel a également été développé en parallèle (SeptoLis, *voir dans cette conférence Gouache et Couleaud*). Il reprend les traits majeurs d'architecture impactant la maladie, comme le rythme de développement du couvert. Ce modèle a permis de déployer des conseils opérationnels à la fois sur le plan tactique – positionnement du 1^{er} traitement anti-septoriose (*voir dans cette conférence Gouache et Couleaud*) – et stratégique – intérêt des semis tardifs en terme de réduction de pression phytosanitaire. L'identification du rythme d'émergence des feuilles comme un élément majeur influençant la maladie a également permis la mise au point d'une méthode de caractérisation variétale vis à vis de la septoriose améliorée, s'affranchissant du biais de précocité régulièrement observé au champ (*voir dans cette conférence Gouache et Robert*).

Enfin, dans le module 3, les processus impliqués dans les interactions plante-pathogène dépendent de variables phylloclimatiques, *i.e.* de variables microclimatiques - température, durée d'humectation, nombre et inertie des gouttes de pluie, rayonnement (quantité, qualité, UV) – réellement perçues par les acteurs biologiques (feuille, pathogène, lésion, etc...), elles mêmes dépendantes du climat et la structure du couvert. La dynamique spatio-temporelle de ces variables au sein d'une parcelle doit donc être caractérisée afin de quantifier leur influence sur les dynamiques épidémiques. Par ailleurs, l'étude de la résistance structurelle nécessite de caractériser les différences de dynamique engendrées par des structures de peuplements différents.

Deux problématiques sont posées ici par *Chelle et al.* (*voir dans cette conférence*) :

i) *la première concerne la variabilité microclimatique engendrée par la diversité de structure des couverts*, elle-même dépendante des cultivars et des conduites culturales. Une expérimentation préliminaire sur la variabilité inter-couvert (2 niveaux N x 3 géotypes) de la

température et de l'humidité d'air a d'ores et déjà montré des différences de température d'air entre traitement azotés, mais peu significatives entre les génotypes à port foliaire pourtant très contrasté.

ii) *la seconde a trait au choix des mesures microclimatiques pertinentes.* Les modèles de surveillance et de déclenchement utilisent généralement la température de l'air d'une station météo et l'on sait que les dynamiques épidémiques sont très sensibles à des variations faibles de températures dans certaines gammes, et pas dans d'autres. Cette non-linéarité des relations entre variables épidémiologiques et température, et entre température de l'air et la température au sein du couvert peut introduire un biais important dans les prévisions et donc les préconisations.

L'objectif ultime de ce module est la détermination des paramètres de structure d'un peuplement végétal (densité, profil de LAI, taille ou forme de feuille, agencement inter-plante,...), qui explique la variabilité spatiale des variables phylloclimatiques (rayonnement, température, humectation) et par conséquent conditionnent le développement épidémique.

Progressivement, les nouvelles variables de structure identifiées par les différents modules comme ayant un impact important sur les épidémies pourront être intégrées dans des modèles ou des règles de décision opérationnelles. On peut notamment imaginer l'utilisation de capteurs de la structure du couvert qui permettront de déterminer si ceux-ci présentent des chances d'échapper à la maladie, ouvrant la voie à une modulation intra-parcellaire des apports fongicides. En effet, lors d'un essai mené conjointement par Arvalis et la Chambre d'Agriculture d'Île de France en 2008, on a pu noter dans une même parcelle hétérogène, des zones où l'optimum d'investissement fongicide était nul, alors que dans d'autres il correspondait à un programme de traitement à pleine dose.

CONCLUSION : UNE COLLABORATION FRUCTUEUSE ENTRE RECHERCHE ET INSTITUT TECHNIQUE

La lutte contre la septoriose, maladie la plus nuisible du blé en France, nécessite par sa capacité à s'adapter aux matières actives fongicides la mise en place d'une véritable stratégie de lutte intégrée, combinant la lutte chimique avec le déploiement de pratiques culturales limitant le développement de la maladie, et de variétés déployant un arsenal complet de mécanismes – résistance, tolérance et échappement – réduisant son impact. La grande complexité des interactions entre maladie et couvert végétal rend cette tâche ardue. L'utilisation conjointe de la modélisation et de l'expérimentation (en conditions contrôlées et au champ) permet, tout au long des étapes allant de la compréhension fondamentale des mécanismes à sa déclinaison en conseils opérationnels, de cibler et hiérarchiser les points-clés de ces interactions en fonction des objectifs poursuivis. La complémentarité entre la recherche (en vert) et l'institut technique (en jaune) est ici évidente, les acquis de l'un alimentant l'autre à la fois en questions nouvelles et en résultats (Fig. 6). La condition de la réussite du projet repose sur une co-construction initiale avec la définition d'objectifs partagés, et sur des compétences communes à la fois en expérimentation et en modélisation.

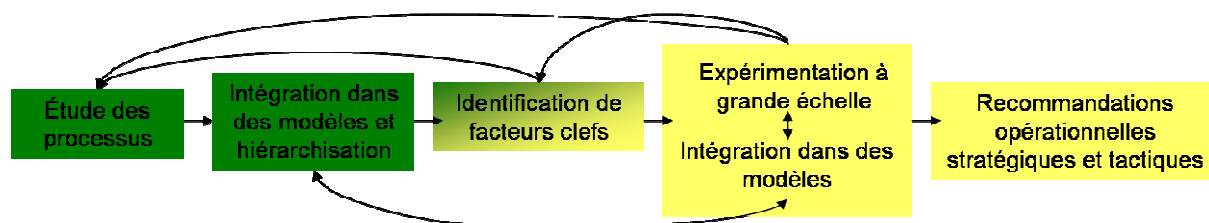


Figure 6 : représentation schématique des échanges entre recherche (vert) et institut technique (jaune) lors de la collaboration entre Arvalis et l'UMR EGC sur la septoriose du blé illustrés dans cette conférence. *Schematic representation of interaction between Research (green) and Technical*

Institute (yellow) in the collaboration between Arvalis and UMR EGC on septoria on wheat illustrated in this conference.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Ils ont été soutenus par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n° 6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. » et le projet C2008-02 du MAP (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche) « Tolérance du blé tendre aux stress biotiques et abiotiques ».

Les auteurs tiennent à remercier l'ensemble des équipes techniques et étudiants ayant contribué aux travaux du projet depuis 2006.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 2007. Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » *in* : Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »
http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf

Anonyme. 2009. Note commune : état des lieux et recommandations pour 2009. Perspectives Agricoles 354, 48-52.

Bancal, M.O., P. Bancal, R. Ben Slimane, P. Gate, D. Gouache. 2009. Tolérance du blé à la septoriose. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Chelle, M, S. Lui, B. Ney. 2009. Which air temperature drives epidemiological processes on fungal foliar wheat disease at leaf scale? In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Fournier C., B. Andrieu, S. Ljutovac, S. Saint-Jean, 2003. ADEL-wheat: a 3D architectural model of wheat development. In 'Plant growth modeling and applications'. (Eds B-G Hu, M Jaeger) pp. 54–66. (Tsinghua University Press: Beijing)

Gate P., D. Gouache, C. Robert, M.O. Bancal, C. Lannou, B. Ney, 2006. Quel indicateur plante pour rendre compte de la nuisibilité de la septoriose ? In 8ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Gouache, D., G. Couleaud. 2009. Le positionnement des traitements fongicides : enjeu pour la septoriose et intérêt du modèle « SeptoLIS ». In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Gouache D, P. Gate, C. Robert, C. Fournier, 2009. Date de semis, pression de septoriose et potentiel de rendement : de la compréhension à la préconisation opérationnelle. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Gouache D., C. Robert, 2009. Un nouvel indicateur de classement variétal vis-à-vis de la septoriose prenant en compte la précocité variétale. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Jorgensen L.N., M. Jahn, W. Clark, D. Antichi, T. Goral, H. Schepers, P. Lucas, B. Rolland, D. Gouache, L. Hornok, 2008. Endure Wheat Case Report

Jorgensen LN, D. Gouache, 2008. Limiter les maladies sans avoir recours aux fongicides ? Perspectives Agricoles 348, 52-56

Lovell D.J., S.R. Parker, T. Hunter, D.J. Royle, R.R. Coker, 1997 Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. Plant Pathology 46, 126–138. doi: 10.1046/j.1365-3059.1997.d01-206.x

Maufras J. Y., C. Maumene, G. Couleaud, N. Bousquet, 2006. Comment résister à la résistance? Perspectives Agricoles 328, 30-36

Parker, S. R., N. D. Paveley, M. J. Foulkes, and D. J. Lovell. 2002. Improving and exploiting self-defence against wheat diseases. In Brighton Crop Protection Conference.

Rapilly F., E. Jolivet, 1976. Construction d'un modèle (EPISEPT) permettant la simulation d'une épidémie de *Septoria nodorum* BERK. sur blé. Revue de Statistique Appliquée 3, 31–60.

Robert C, C. Fournier, B. Andrieu, B. Ney, 2008a. Coupling a 3D virtual wheat plant model with a *Septoria tritici* epidemic model: a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture. Functional Plant Biology, 35, 9-10, 997-1013.

Robert, C., C. Fournier, W. Lee, B. Andrieu, B. Ney, D. Gouache, P. Gate. 2008b. How does wheat canopy development influence *Septoria tritici* epidemics? In: Endure International Conference 2008. La Grande Motte (France)

Robert C., B. Andrieu, C. Fournier, D. Gouache, P. Gate, B. Ney. 2009a. Septo-3D, un modèle pour analyser les effets de la structure des couverts de blé sur les épidémies de septoriose. In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP

Robert C., C. Fournier, W. Lee, B. Andrieu, B. Ney, D. Gouache, P. Gate. 2009b. Does canopy architecture play a role in the effect of plant density and sowing date on epidemics of *Septoria tritici* in wheat crops? Society of Experimental Botany (SEB) Annual Main Meeting 2009 (Glasgow, UK)

Schoeny A., F. Devienne-Barret, M.H. Jeuffroy, P. Lucas, 2003. Effect of take-all root infections on nitrate uptake in winter wheat. Plant Pathology, 52, 1, 52-59.

van Ginkel M., S. Rajaram, 1999. Breeding for Resistance to the *Septoria*/*Stagonospora* Blights of Wheat. In: van Ginkel, M., A. McNab, and J. Krupinsky, eds. 1999. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, D.F.: CIMMYT.

**EVALUATION D'UN INDICATEUR DE RISQUE EN TANT QU'OUTIL D'AIDE A LA
DECISION D'UNE PROTECTION CONTRE LA SCLEROTINIOSE DU COLZA**

A. PENAUD⁽¹⁾, D. WAGNER⁽¹⁾, D. MAKOWSKI⁽²⁾, L. RUCK⁽¹⁾

⁽¹⁾ CETIOM, Campus de Grignon, Av. L. Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France
(penaud@cetiom.fr)

⁽²⁾ INRA UMR 211 AgroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon, France
(makowski@grignon.inra.fr)

RÉSUMÉ

La sclérotiniose est une des maladies les plus préjudiciables du colza avec des attaques nuisibles une année sur deux à trois par décennie. Pour appliquer la protection fongicide quand elle est nécessaire, le CETIOM a développé un test de diagnostic basé sur la fréquence de fleurs contaminées par *Sclerotinia sclerotiorum*. Le résultat de ce test est utilisé comme indicateur de risque, à grande échelle dans le cadre du projet CASDAR 6128. La performance de cet indicateur est évaluée par la méthode des courbes ROC qui a permis de déterminer un seuil de décision. C'est ainsi que le seuil de 30% de fleurs contaminées conduit à 90% de bonnes décisions, exception faite en année de très forte pression maladie comme 2007 où il aurait fallu abaisser ce seuil.

Mots-clés : colza, *Sclerotinia sclerotiorum*, indicateur de risque, seuil de décision

SUMMARY

**EVALUATION OF A RISK INDICATOR AS A DECISION MAKING TOOL FOR
CONTROLLING SCLEROTINIA STEM ROT IN OILSEED RAPE**

Sclerotinia stem rot is a major disease of oilseed rape in France. Severe yield losses usually occur two to three times per decade. For controlling the disease by spraying a fungicide only when it is needed CETIOM has improved and evaluated a diagnostic test based on a measured proportion of oilseed rape flowers infected by *Sclerotinia sclerotiorum*. The score of this test is used as a risk indicator. Receiver operating characteristic (ROC) curves are used to determine a decision threshold according to the sensitivity and specificity values. The threshold of 30% infected flowers generally leads to correct decisions except when disease pressure was too high as in 2007.

Key words: oilseed rape, *Sclerotinia sclerotiorum*, risk indicator, decision threshold

INTRODUCTION

La sclérotiniose causée par *Sclerotinia sclerotiorum* reste une des maladies majeures du colza, même si elle n'est véritablement nuisible et préjudiciable que deux à trois fois par décennie. Elle occasionne alors de sévères pertes de rendements qui, à partir d'un seuil de nuisibilité établi à 10% d'attaque, sont estimées au moins à 1 q/ha par tranche de 10% d'attaque (Simonin *et al*, comm. pers).

La protection contre cette maladie repose essentiellement sur l'application d'un traitement fongicide préventif en début floraison. C'est en effet à ce stade que le colza devient sensible aux contaminations aériennes par les ascospores de *S. sclerotiorum*. La contamination s'effectue par l'intermédiaire des pétales où les ascospores sont capables de germer et de développer un mycélium (Jamaux *et al*, 1994). En tombant sur une feuille, le pétale adhère d'autant mieux qu'il est infecté, par ce contact étroit il permet ainsi le passage du mycélium dans la feuille puis vers la tige.

Par le passé, la protection fongicide était appliquée de façon systématique avec des produits efficaces et peu coûteux à base de carbendazime. Mais avec d'une part l'apparition de souches de sclérotinia résistantes au carbendazime et leur généralisation sur le territoire (Moinard *et al*, 2009), et d'autre part la pression socio-environnementale pour une moindre utilisation des produits phytosanitaires, la gestion du risque sclérotinia est devenue un enjeu important non seulement pour préserver les solutions disponibles mais aussi pour répondre à la volonté française et européenne de réduire l'usage des pesticides.

Dans cette optique, le CETIOM a entrepris la mise au point d'un système d'aide à la décision de gestion du risque sclérotinia du colza à la parcelle, à destination des agriculteurs et des techniciens. L'outil retenu est basé sur l'usage d'un indicateur de risque correspondant au taux de fleurs contaminées par le sclérotinia au début de la floraison et déterminé à l'aide d'un kit de détection (Poisson *et al*, 2000). Cet indicateur biologique intégrateur de la climatologie et de la situation de la parcelle constitue un indicateur plus pertinent que les grilles de risque préalablement testées (Makowski *et al*, 2005, Maisonneuve *et al*, 1997). Après une phase de mise au point entre 2000 et 2004, comportant notamment une amélioration du test pétales canadien (Turkington & Morrall, 1991) avec remplacement du milieu gélosé initial par un milieu semi-sélectif et par la mise en culture non plus de pétales individualisés en conditions stériles mais de fleurs dans les conditions du champ (Taverne *et al.*, 2003), l'outil est entré dans une phase d'évaluation dans les conditions de la pratique des agriculteurs et des techniciens. Ses performances en tant qu'indicateur de risque ont été évaluées et font l'objet de cette présentation.

MATERIEL ET MÉTHODE

Un réseau national de parcelles expérimentales a été mis en place par le CETIOM en partenariat avec de nombreux organismes de développement dans les principales régions de production du colza depuis 2000.

Le dispositif annuel consiste, dans les mêmes parcelles agricoles, à réaliser un kit sclerotinia au stade F1 et à estimer un mois avant récolte le taux de plantes atteintes dans une bande laissée non traitée.

- Le kit de détection, réalisé au stade F1 permet d'estimer à la parcelle la proportion de fleurs infectées par *S. sclerotiorum*. La réalisation du kit consiste à prélever 40 fleurs au champ et à les déposer directement sur un milieu de culture semi-sélectif en boîtes de Pétri (Taverne *et al*, 2003). Après 4 jours d'incubation à l'obscurité et à 20-23°C, la présence de *S.sclerotiorum* est révélée grâce à la présence d'un indicateur de pH dans le milieu qui vire du bleu au jaune dès lors que *S.sclerotiorum* en se développant produit suffisamment d'acide oxalique pour acidifier le milieu (Steadman *et al*, 1994). Le pourcentage de fleurs infectées (PFI) est alors déterminé.

De 2000 à 2004, la lecture des kits est effectuée par le praticien et confirmée au laboratoire. Depuis 2005, la lecture directe du praticien est seule considérée. Depuis 2008, cette information est saisie en ligne par le praticien.

- Le taux de plantes atteintes sur tiges est déterminé dans une bande témoin non traitée par comptage de 20 x 10 plantes consécutives au stade G4-G5.

Le pourcentage de fleurs infectées à la parcelle est mis en relation avec le taux d'attaque réel dans la parcelle non traitée pour apprécier la pertinence de l'indicateur. Une première période de 2000 à 2004 a permis de constituer un référentiel de 264 parcelles et de tester des règles de décision. A partir de 2005, l'indicateur a été testé par les agriculteurs et les techniciens dans plus de 700 parcelles dans des contextes sites-années variés.

La méthode des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) est utilisée pour comparer les performances annuelles de l'indicateur de risque et proposer un seuil de décision I_s .

Le principe consiste à diviser l'ensemble des parcelles en 2 sous-groupes en fonction du taux d'attaque final (A) par rapport au seuil de nuisibilité de 10% de plantes attaquées au-dessus duquel un traitement devient nécessaire : parcelles fortement attaquées A+ et parcelles peu ou pas attaquées A-. Les mêmes parcelles sont ensuite classées selon la préconisation de traiter en fonction de l'indicateur I dont on fait varier les seuils dans une gamme allant du traitement systématique à l'impasse de traitement. Les calculs permettent de répartir les parcelles en 4 sous-groupes définis comme :

- VP (vrais positif) qui correspond au nombre de parcelles pour lesquelles la règle de décision conseille de traiter car l'indicateur de risque est supérieur au seuil de décision ($I > I_s$) dans le sous-groupe des parcelles fortement attaquées A+;
- VN (vrais négatif) qui correspond au nombre de parcelles pour lesquelles l'indicateur de risque est inférieur au seuil de décision ($I < I_s$) dans le sous-groupe des parcelles peu attaquées A- ;
- FxN (faux négatif) qui correspond au nombre de parcelles pour lesquelles la règle de décision conseille de ne pas traiter ($I < I_s$) alors que les parcelles vont être fortement attaquées A+ ;
- FP (faux positifs) qui correspond au nombre de parcelles pour lesquelles la règle de décision conseille de traiter ($I > I_s$) alors que les parcelles au final sont faiblement attaquées A-.

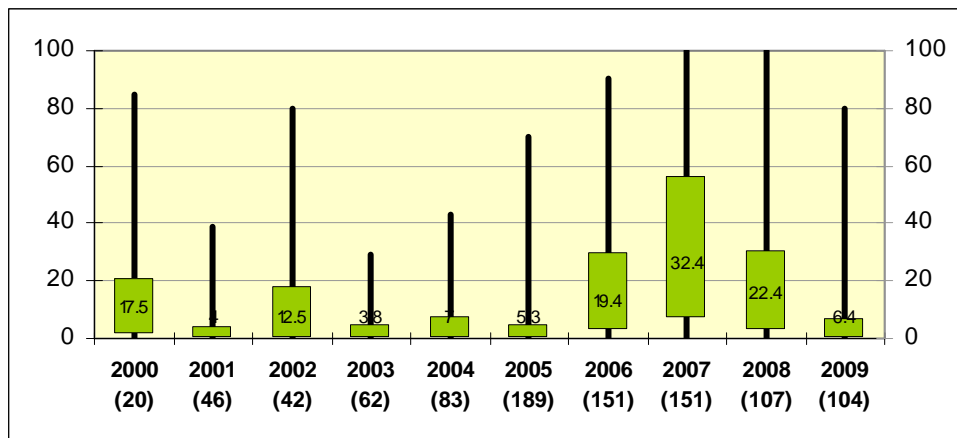
Les probabilités de chacune des catégories peuvent être estimées. La probabilité VP d'avoir une valeur du kit supérieur au seuil de décision ($I > I_s$) lorsque le seuil de nuisibilité est dépassé A+ ($VP/(VP+FxN)$) estime la « sensibilité ». De même, la probabilité VN de ne pas dépasser le seuil de décision I_s quand le seuil de nuisibilité n'est pas dépassé A- ($VN/(VN+FP)$) estime la « spécificité ». La courbe ROC est la représentation graphique de la sensibilité (VP) en fonction de 1 – spécificité (1-VN) pour tous les seuils de décision possibles. Plus cette courbe se rapproche du point (0,1) dans l'angle supérieur gauche, plus le test est satisfaisant. La précision de l'indicateur est estimé par l'aire sous la courbe (AUC).

RESULTATS

Au cours de la décennie d'expérimentation 2000 – 2009, des niveaux de pressions parasitaires très différents ont été rencontrés (Fig 1). On compte 5 années - 2001, 2003, 2004, 2005 et 2009 – soit une année sur 2 où les attaques sont faibles, avec un taux moyen d'attaque inférieur au seuil de nuisibilité de 10%. En moyenne à moins de 20%, l'attaque peut être considérée comme faible à modérée pour 3 années : 2000, 2002 et 2006. L'attaque la plus sévère est en 2007. En 2008, l'attaque est modérée mais la moyenne cache une variabilité régionale, avec des attaques faibles en toutes régions excepté en Champagne où localement les attaques sont aussi importantes qu'en 2007.

Figure 1 : Répartition des taux d'attaque de sclérotinia enregistrés au cours de la décennie 2000 – 2009. Entre () nombre de parcelles observées. Les boxplots indiquent les valeurs min, 1er quartile, moyenne, 3ème quartile et max.

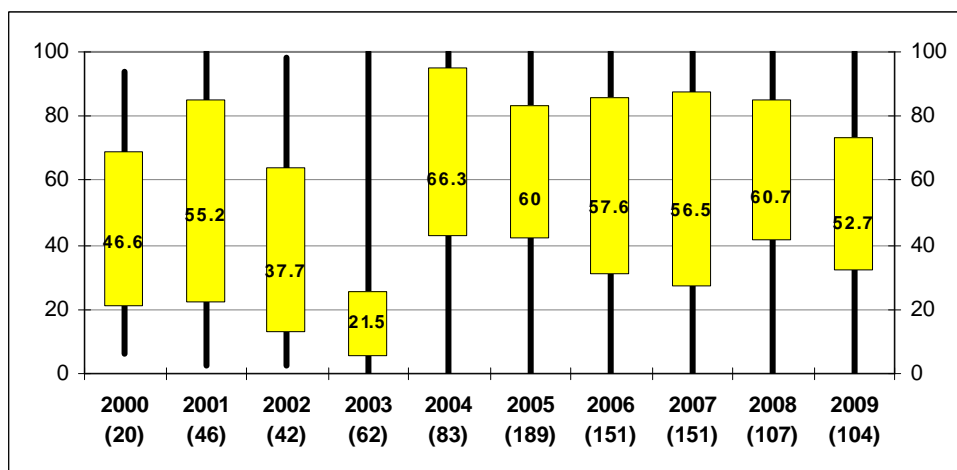
(Annual distribution of the disease incidence during the decade 2000-2009)



Pour la même période, l'indicateur sclerotinia donné par le pourcentage de fleurs contaminées détecté à l'aide du kit montre annuellement moins de variabilité que la pression parasitaire (Fig 2). La valeur de l'indicateur la plus faible est en 2003 avec un score moyen de 21% de fleurs infectées. Ces 6 dernières années l'indicateur détecte en moyenne plus de 50% de fleurs infectées. Cependant à niveau de risque comparable, la pression parasitaire finale s'est montrée 6 fois plus importante en 2007 qu'en 2005.

Figure 2 : Distribution des pourcentages de fleurs infectées estimés au stade F1 du colza à l'aide du kit de diagnostic durant la décennie 2000-2009. (Les chiffres entre parenthèses sur l'axe des abscisses correspondent au nombre de parcelles observées où un kit a été réalisé et le taux d'attaque estimé dans une bande non traitée).

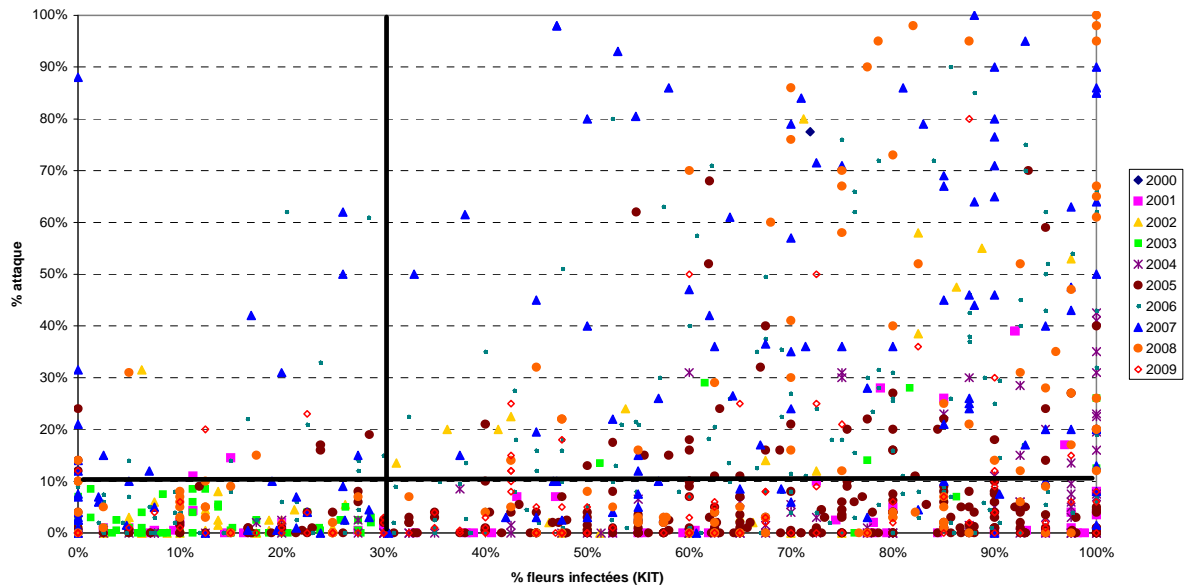
(Annual distribution of the percentage of infected flowers assessed at the beginning of flowering during the decade 2000-2009)



Le pourcentage de fleurs infectées déterminés au stade F1 du colza n'est pas fortement corrélé au taux d'attaque final ($r = 0.32$), ce qui signifie que le taux de fleurs infectées n'est pas un indicateur prédictif du taux d'attaque final de la culture (Fig 3).

Figure 3 : Relation entre le taux de fleurs infectées et le taux d'attaque final observés sur 934 parcelles entre 2000 et 2009.

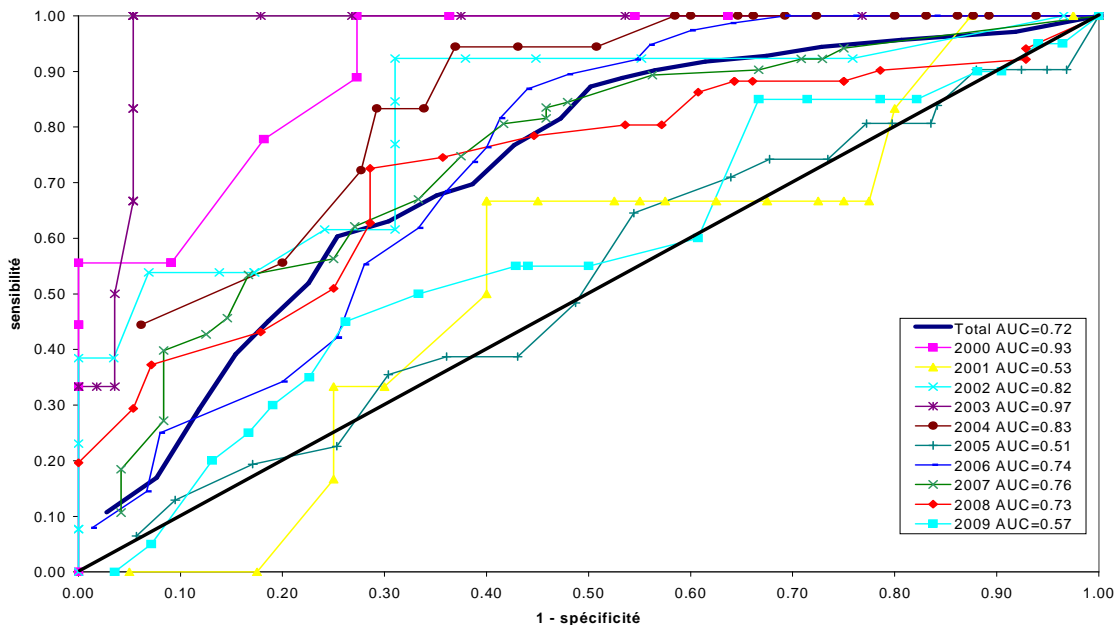
(Relationship between risk indicator and final disease incidence from 934 fields during the period 2000-2009).



En classant les parcelles en fonction du niveau d'attaque et de l'indicateur de risque, les calculs de sensibilité (probabilité d'avoir un kit supérieur au seuil de décision I_s lorsque le seuil de nuisibilité est dépassé ($VP/VP+FxN$)) et de spécificité (probabilité de ne pas dépasser le seuil de décision I_s quand le seuil de nuisibilité n'est pas dépassé ($VN/VN+FP$)) permettent de tracer les courbes ROC (Fig 4).

Figure 4 : Courbes ROC (sensibilité vs 1-spécificité) calculées au seuil de nuisibilité de 10% pour les dix années de 2000 à 2009.

(ROC curves for 10 years at disease incidence threshold of 10% diseased plants)



En 10 ans, 7 courbes sont au-dessus de la diagonale avec une AUC > 0.5, signifiant que l'indicateur est meilleur qu'une décision aléatoire. Pour 3 années (2001, 2005 et 2009), la performance de l'indicateur n'est pas meilleure qu'une décision aléatoire. Ces 3 années correspondent à un risque élevé qui n'est pas suivi de développement de l'épidémie ; cela se traduit par un grand nombre de faux positifs. La meilleure performance de l'indicateur est obtenue en 2003 où l'indicateur renseigne sur une quasi absence de risque et où la maladie au final est peu ou pas présente; c'est le cas où les vrais négatifs prédominent. Au final, toutes années confondues, l'AUC est de 0.72, conduisant à considérer le pourcentage de fleurs infectées comme un indicateur utile mais imparfait.

L'indicateur peut être pris en défaut concernant la fréquence de faux négatifs. En considérant un seuil de décision fixe, la fréquence de faux négatifs fluctue selon les années (Tab I). Au contraire, en fixant la fréquence de faux négatifs à ne pas dépasser, cela conduit à établir un seuil de décision qui, entre 2000 et 2009, a pu varier entre 10% et 75% au risque de 10% de faux négatifs et entre 0% et 60% au risque de 5%. Or, cette variation ne peut être connue a priori.

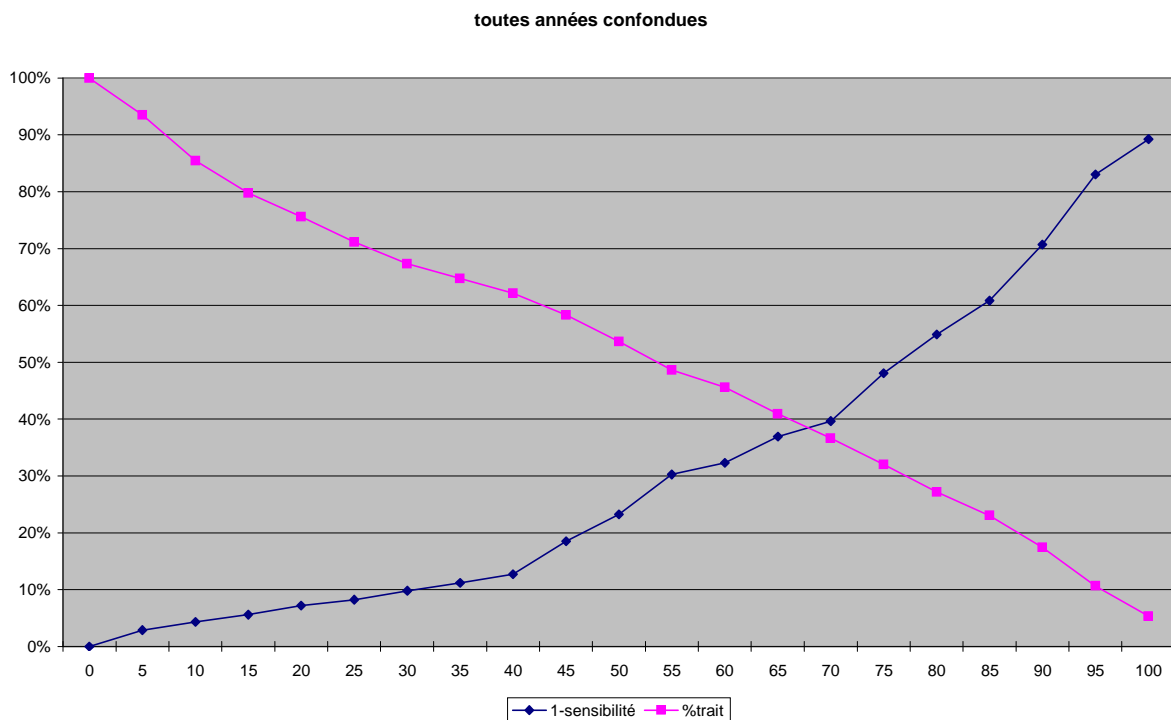
Tableau I : Variabilité du seuil décision en fonction de l'année et de la fréquence de faux négatifs acceptables.

(Variability of decision threshold according to the year and the frequency of acceptable false negative)

| Année | Fréquence FxN (Is = 30%) | Risque Faux Négatifs < 5% | | Risque Faux Négatifs < 10% | |
|---------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | Seuil de décision | Fréquence des traitements | Seuil de décision | Fréquence des traitements |
| 2000 | 0 | 40 | 60 | 40 | 60 |
| 2001 | 33 | 10 | 89 | 10 | 89 |
| 2002 | 8 | 5 | 98 | 30 | 50 |
| 2003 | 0 | 50 | 13 | 50 | 13 |
| 2004 | 0 | 60 | 67 | 75 | 49 |
| 2005 | 19 | 0 | 100 | 20 | 88 |
| 2006 | 5 | 25 | 75 | 35 | 73 |
| 2007 | 15 | 0 | 100 | 20 | 83 |
| 2008 | 12 | 5 | 93 | 15 | 84 |
| 2009 | 15 | 5 | 94 | 20 | 89 |
| 2000-09 | 11 | 15 | 80 | 30 | 67 |

Toutes années confondues, en considérant la probabilité d'avoir des faux négatifs dans les parcelles atteintes en fonction de toutes les valeurs de seuils de décision possibles (1-sensibilité), un seuil de décision global peut être déterminé en fonction du risque qu'on est prêt à accepter (Tab I, Fig 5). Pour ne pas dépasser une fréquence de 10% de faux négatifs, le seuil de décision s'établit à 30% de fleurs infectées et la fréquence des traitements aurait été de 67%, soit une économie d'un tiers des traitements. Si l'objectif est de 5% de faux négatifs, le seuil de décision pour l'indicateur est abaissé à 15% de fleurs infectées mais la fréquence de traitement augmente à près de 80%, soit une économie de traitements de seulement 20%. Enfin pour un risque « zéro » faux négatifs, le traitement est alors systématique.

Figure 5 : Seuils de décision en fonction de la fréquence de faux négatifs et fréquence des traitements, toutes années confondues.
(Decision thresholds and rate of sprays, all years)



DISCUSSION

Sur les réseaux d'expérimentation mis en place pour son évaluation, le pourcentage de fleurs infectées constitue un indicateur du risque sclerotinia à la parcelle pertinent comme l'avait montré au Canada avec le kit pétales l'équipe de Morrall (Turkington *et al*, 1991).

Si le pourcentage de fleurs infectées constitue un indicateur relativement fiable du risque potentiel de contamination du colza par *S. sclerotiorum*, il n'est cependant pas un indicateur prédictif du taux d'attaque final. En effet, parce que cet indicateur de risque est estimé au stade F1 du colza, il ne prend en compte ni les éventuelles contaminations tardives, ni le développement de la maladie qui dépend des conditions climatiques survenant en post floraison et qui peuvent limiter l'épidémie. Les années 2001, 2005 et 2009 en sont des exemples puisqu'au stade F1 du colza le risque est élevé et qu'à la récolte peu de parcelles sont atteintes.

Avec un recul de dix années, il apparaît que le pourcentage de fleurs infectées déterminé à l'aide du kit de détection sclerotinia est susceptible d'entraîner quelques erreurs de décision. Et, comme pour un agriculteur, il est toujours plus grave de ne pas traiter que de traiter à tort, il conviendrait de « sécuriser » la prise de décision. Différentes pistes peuvent être envisagées comme abaisser le seuil de décision de l'indicateur mais avec pour conséquence d'accroître la proportion de traitements, ce qui va à l'encontre du Grenelle de l'environnement. En absence de risque avéré au stade F1, le renouvellement du kit 8 à 10 jours plus tard (vers le stade G1) permet de re-évaluer le risque et d'être encore en mesure de protéger la culture si nécessaire. Une autre voie de sécurisation serait de développer un système d'assurance couplé à l'outil de détection ou bien encore d'attribuer une subvention à l'emploi de l'outil de sorte de compenser économiquement le manque à gagner par l'économie d'un traitement non réalisé mais nécessaire comparé à un traitement systématique (Marette *et al*, 2008).

Finalement, l'indicateur de risque basé sur le pourcentage de fleurs infectées estimé à l'aide du kit de diagnostic pourrait être remplacé par une analyse moléculaire quantitative sur un échantillon de 40 fleurs. Or, dans une première approche, un indicateur basé sur une intensité est peu corrélé avec un indicateur de risque basé sur une fréquence (Ruck *et al*, 2006). En conséquence la substitution risque d'être rendue difficile, un nouveau calage intensité/taux d'attaque au champ est nécessaire. Cependant, la PCR contrairement au kit permettrait une meilleure traçabilité pour un système assurantiel

Quel que soit l'indicateur retenu à l'avenir, il mériterait d'être complété par des modèles climatiques qui pourraient simuler le risque au-delà du stade F1 et ainsi permettre d'affiner la prise de décision.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement tous les techniciens des organismes professionnels qui ont permis la réalisation à grande échelle de kits de détection sclerotinia et le CASDAR pour son soutien financier de cette opération inscrite dans le projet 6128 « *Améliorer et développer les outils de raisonnement des traitements fongicides et insecticides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives utilisées contre les bioagresseurs* ».

BIBLIOGRAPHIE

- Hughes G., McRoberts N., Burnett F.J., 1999 – Decision-making and diagnosis in disease management. *Plant Pathol.* 48, 147-153.
- Jamaux I, Lamarque C. 1995 – Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathol.* 44, 22-30.
- Maisonneuve C., Penaud A., Auclert A., Arjauré G., Jung L., 1997 – *Sclerotinia sclerotiorum* Lib De Bary : mise au point d'un outil de décision pour le traitement du colza d'hiver. *ANPP 5^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes.*
- Makowski D., Taverne M., Bolomier J., Ducarne M., 2005 – Comparison of risk indicators for sclerotinia control in oilseed rape. *Crop Protection* 24, 527-531.
- Marette S., Messean A., Penaud A., Pinochet X. , Ruck L, 2008 – Economic gains and integrated pest management : an application to sclerotinia and the canola crop. *Bull. IOBC in press*
- Moinard J., Leroux P., Penaud A., Remuson F., Walker A.S., Micoud A., Huguet B., 2009 – Resistance de *Sclerotinia sclerotiorum* aux fongicides utilisés sur colza : bilan de la surveillance du territoire de 2000 à 2008. *AFPP 9^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours 8-9 décembre 2009.*
- Poisson B., Penaud A., 2000 – Détection du *Sclerotinia sclerotiorum* sur les pétales de colza. *AFPP – Sixième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes,*
- Ruck L., Penaud A., Wagner D., Jouanneau L., Chaudron F., Makowski D., Caceres F., Pic E., Bammé B., Honoré N., Bronsaer R., Simonin P., Merrien A. 2007. Evaluation of a decision making tools based on RT-PCR real time in sclerotinia stem rot control in oilseed rape. *12th International Rapeseed Congress, Wuhan, IV, 75-78.*
- Steadman J.R., Marcinkowska J., Rutledge S., 1994 – A semi selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 10, 159-165.
- Taverne M., Dupeuble F., Penaud A., 2003 – Evaluation of a diagnostic test for *Sclerotinia* on oilseed rape at flowering. *Proceedings 11th International Rapeseed Congress 4, 1115-1117.*
- Turkington T., Morrall R., Gugel R., 1991 – Use of petal infestation to forecast sclerotinia stem rot of canola : evaluation of early bloom sampling ; 1985-90. *Can. J. Plant Pathol.* 13, 50-59.

**LES OUTILS POUR GERER LE RISQUE DEOXYNIVALENOL SUR BLE TENDRE ET BLE
DUR**

E. GOURDAIN⁽¹⁾, F. PIRAUX⁽¹⁾, B. BARRIER-GUILLOT⁽¹⁾

(1) ARVALIS-Institut du végétal, Station expérimentale, 91700 Boigneville, France
e.gourdain@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

Afin de gérer le risque de contamination en déoxynivalénole (DON) sur blé, ARVALIS-Institut du végétal a mis à disposition des agriculteurs et des organismes stockeurs différents outils d'aide à la décision. Ces outils, déclinés sous la forme de grilles agronomiques d'évaluation du risque ou de modèles agro-climatiques, ont été développés et améliorés sur huit années d'enquêtes auprès des agriculteurs répartis sur la France entière. Ces enquêtes, couplées aux études expérimentales, nous ont permis d'identifier et de hiérarchiser les facteurs agronomiques en cause pour proposer une grille de diagnostic du risque. Enfin, l'ajout du climat a permis l'élaboration de modèles de prévision des teneurs en DON avant récolte. L'objectif de cet article sera de faire la synthèse de ce réseau d'étude en blé tendre et en blé dur, d'évaluer le comportement des outils mis en place ainsi que leurs limites notamment en terme de robustesse pour les années les plus à risque comme l'ont été 2007 et 2008.

Mots-clés : Déoxynivalénole, blés, agronomie, modélisation, fusariose, gestion du risque, outils d'aide à la décision

SUMMARY

DECISION MAKING TOOLS TO MANAGE DEOXYNIVALENOL CONTENT IN WHEAT AND DURUM WHEAT

To manage the risk of deoxynivalenol (DON) contamination in wheat, ARVALIS-Institut du végétal has proposed to farmers and grain producers and collectors different decision making tools. These tools, as agronomic assessment grids or agro-climatic predicting models, have been developed and improved on eight years of a French farm field survey. This survey, in addition to experimental trials, has led to identify and organised agronomic factors involved in DON contamination and proposed in agronomic assessment grids. Finally, agronomic factors and climate conditions have been linked in DON prevision models before harvesting time. The aim of this paper is to do the synthetis of the farm field survey in wheat and durum wheat, to validate the decision making tools and determine their limits in particular their robustness years as 2007 and 2008 where the DON contamination was high.

Key words: Deoxynivalenol, wheat, agronomy, modelling, *Fusarium* head blight, risk management, decision making tools

INTRODUCTION

Une des composantes essentielles de la qualité sanitaire des céréales repose sur la maîtrise du risque de contamination en mycotoxines des grains. En Europe, le déoxynivalénol (DON), fusariotoxine produite par certains *Fusarium* de la section *Discolor*, est au centre des préoccupations des filières céréales du fait de sa forte occurrence et des conséquences économiques qui en découlent. La problématique est d'autant plus importante qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune stratégie de maîtrise totalement efficace garantissant le respect des limites réglementaires. Cette préoccupation s'accroît actuellement avec l'augmentation des surfaces non labourées pour des raisons de gain de temps dans la préparation des sols et de préservation, mais aussi avec la diminution annoncée des protections phytosanitaires dans les systèmes de culture.

La fusariose de l'épi est une maladie du blé induite par un complexe d'espèces fusariennes présentes en fréquences variables sur les grains. *F. graminearum* est en France l'agent pathogène dominant à l'origine de cette maladie. Certaines années, elle peut occasionner des pertes importantes de rendement, mais surtout elle peut s'accompagner de l'accumulation de toxines dans les produits de récolte. Plusieurs études multifactorielles ont mis en évidence l'impact des pratiques culturales et des facteurs environnementaux dans le développement de la fusariose et la production de DON. Les facteurs qui ressortent systématiquement sont le climat autour de la floraison, le précédent cultural, le travail du sol ainsi que la sensibilité variétale (Obst and Bechtel, 2000 ; Schaafsma et al., 2001 ; Barrier-Guillot et al., 2004 ; Lemmens, 2007). De nombreux instituts de recherche ou structures privées ont développé des outils pour aider les agriculteurs à limiter l'apparition des mycotoxines et tout particulièrement du DON sur blés. Ces outils peuvent prendre la forme de grilles de décision (Gourdain, 2008) ou de modèles de prévision des teneurs en DON (Obst and Bechtel, 2000 ; Schaafsma et al., 2001 ; Barrier-Guillot et al., 2006 ; Edwards, 2007 ; Van der Fels-Klerx et al., 2008).

Grâce à un réseau d'agriculteurs développé sur la France entière depuis 2001, deux synthèses de l'impact des facteurs agronomiques sur les teneurs en DON ont été réalisées en blé tendre avec les données 2001 à 2004 (Barrier-Guillot et al., 2004) puis en ajoutant les données 2005 et 2006 (Barrier-Guillot et al., 2007). Ainsi, ARVALIS-Institut du végétal a proposé dès 2005, une première grille d'évaluation du risque en blé tendre accompagné d'un modèle de prévision des teneurs en DON.

Les conditions climatiques particulièrement pluvieuses pour les cultures de blés au cours des printemps 2007 et 2008, entraînant des cumuls de pluie parfois exceptionnels, ont conduit à des attaques importantes de fusarioses sur épis de blé. En dépit de progrès significatifs dans la maîtrise préventive du risque DON, des dépassements de limites réglementaires relativement importants ont été observés pour le DON. Selon les enquêtes conduites par FranceAgriMer et ARVALIS-Institut du végétal, ce sont entre 10 et 20% des surfaces emblavées ou des volumes collectés au niveau national en 2007 et 2008 qui ont des teneurs en DON supérieures aux limites réglementaires (1250 et 1750 µg/kg respectivement pour le blé tendre et le blé dur). Ainsi, en 2008, grille et modèle sur blé tendre ont évolué grâce aux enseignements apportés par les résultats des campagnes 2007 et 2008, et l'équivalent en blé dur a pu être proposé.

L'objectif de cet article est donc de faire la synthèse des résultats des 8 années d'enquêtes blé tendre et blé dur au niveau national et d'évaluer la robustesse des outils.

MATERIEL ET MÉTHODES

RESEAU D'ENQUÊTES AGRICULTEURS

L'objectif premier du réseau d'enquêtes était de confirmer et de hiérarchiser les facteurs de risque en cause dans la contamination en DON afin d'aboutir rapidement à la mise en place de grille de diagnostic agronomique et de modèles agro-climatiques. Ce réseau d'enquêtes initié en 2001 en blé tendre et blé dur auprès des agriculteurs de la France entière a été mis en place en collaboration avec des structures partenaires (organismes stockeurs (OS), Chambres

d'agricultures, etc.). Ces enquêtes consistent à prélever un échantillon de grains de blé lors de la récolte, et de l'accompagner d'un questionnaire à renseigner sur l'historique et les interventions culturales liés à cette parcelle échantillonnée. Le réseau a été suivi durant 8 années d'étude, 1956 échantillons de blé tendre et 713 de blé dur ont été suivis dans la majorité des grandes régions productrices de ces deux céréales (tableau I). On notera un nombre d'échantillons suivi plus faible en blé dur avec notamment deux années d'études en moins. Le choix des parcelles a, de plus, été orienté de telle sorte que la gamme de pratiques agronomiques et de conditions pédo-climatiques soit la plus large possible. Ce réseau ne se veut donc pas représentatif des pratiques agronomiques régionales. Les principales caractéristiques des 2669 échantillons suivis figurent dans les tableaux II et III.

Tableau I : Répartition du nombre d'échantillons par espèce sur les différentes années d'études.
Repartition of the number of samples by species on different years.

| Espèce | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | Total |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Blé dur | 85 | 115 | 131 | | | 111 | 154 | 117 | 713 |
| Blé tendre | 254 | 259 | 390 | 411 | 303 | 84 | 149 | 106 | 1956 |
| Total | 339 | 374 | 521 | 411 | 303 | 195 | 303 | 223 | 2669 |

Tableau II : Caractéristiques principales des 1956 échantillons de blé tendre suivis de 2001 à 2008
Main characteristics of the 1956 wheat samples followed between 2001 and 2008

| Région | % | Précédent cultural | % | Travail du sol | % | Sensibilité variétale | % |
|------------|-----|--------------------|-----|----------------|-----|-----------------------|-----|
| Ouest | 40% | Maïs grain | 29% | Labour | 63% | Forte | 48% |
| Centre | 31% | Colza | 18% | Non labour | 37% | Moyenne | 31% |
| Centre-Est | 14% | Maïs fourrage | 16% | | | Faible | 21% |
| Nord | 13% | Céréales à paille | 10% | | | | |
| Sud-Ouest | 2% | Betterave | 9% | | | | |
| | | Pois / féverole | 8% | | | | |
| | | Autres | 4% | | | | |
| | | Tournesol | 3% | | | | |
| | | Pomme de terre | 3% | | | | |

Tableau III : Caractéristiques principales des 713 échantillons de blé dur suivis de 2001 à 2008
Main characteristics of the 713 durum wheat samples followed between 2001 and 2008

| Région | % | Précédent cultural | % | Travail du sol | % | Sensibilité variétale | % |
|-----------|-----|---------------------|-----|----------------|-----|-----------------------|-----|
| Sud-Ouest | 47% | Maïs grain / sorgho | 37% | Labour | 50% | Forte | 35% |
| Ouest | 31% | Tournesol | 19% | Non labour | 50% | Assez Forte | 50% |
| Centre | 20% | Céréales à paille | 17% | | | Moyenne | 15% |
| Sud-Est | 2% | Colza | 9% | | | | |
| | | Pois / féverole | 7% | | | | |
| | | Autres | 5% | | | | |
| | | Maïs fourrage | 4% | | | | |
| | | Pomme de terre | 2% | | | | |
| | | Betterave | 1% | | | | |

ECHANTILLONNAGE ET TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Les échantillons sont prélevés lors de la moisson. Trois échantillons de 1 kg minimum chacun sont prélevés en début, milieu et fin de récolte de la parcelle pour palier à l'hétérogénéité des teneurs en DON au sein de la parcelle. Ces échantillons sont directement expédiés par l'agriculteur vers une station expérimentale d'ARVALIS-Institut du végétal accompagnés du questionnaire sur les pratiques. Ils sont ensuite regroupés pour former un échantillon unique, qui est nettoyé puis divisé pour ne récupérer que 1 à 1.5 kg de grains homogénéisés et propres. Cet échantillon final est broyé à 1 mm dans son intégralité et un sous échantillon de 250 à 500g est expédié au laboratoire d'analyse.

ANALYSES DU DON

Les analyses de trichothécènes ont été réalisées par méthode chromatographique. Les méthodes HPLC-UV ou GC-MS ont été utilisées jusqu'en 2005. Depuis 2006, les analyses par méthode LC-MSMS ont été préférées. Dans la suite de l'exposé, seule la mycotoxine DON sera étudiée.

CARACTERISTIQUES DE SENSIBILITE VARIETALE

Les variétés du fichier d'enquêtes ont été qualifiées pour leur sensibilité aux fusarioses/fusariotoxines à l'aide des notes attribuées par le GEVES et ARVALIS-Institut du végétal sur la base d'expérimentations spécifiques de pré et de post-inscription. Les notes de 1 à 9, des plus sensibles aux plus tolérantes, ont été ramenées à trois classes de sensibilité pour chacune des espèces blé tendre et blé dur.

DONNEES METEOROLOGIQUES-DATE DE FLORAISON DES BLES

Pour chaque parcelle suivie, les données météorologiques (pluie et température) autour de la floraison des blés sont récupérées au niveau de la station météorologique la plus proche (distance moyenne :11 km). Etant donné la difficulté sur le terrain à évaluer la date de floraison, celle-ci est estimée grâce à un modèle éco-physiologique de développement des stades (modèle interne, non publié).

ANALYSES STATISTIQUES

L'ensemble des données agronomiques, climatiques et teneurs en DON est compilé d'une année sur l'autre dans une base de données Excel. L'analyse statistique est réalisée via le logiciel SAS. Un modèle linéaire mixte a été utilisé pour analyser les données. La variable à expliquer (teneur en DON) a été transformée en $\ln(\text{DON})$ afin de normaliser la distribution des données. Les variables explicatives sont qualitatives (facteurs agronomiques, année, région) et quantitatives (variables météorologiques). Le facteur année a été considéré comme aléatoire, ainsi que toutes les interactions impliquant ce facteur. Dans un premier temps, seuls les facteurs agronomiques, ainsi que l'année et la région, ont été pris en compte. Cette première étude a permis de confirmer les facteurs de risque identifiés et de valider la grille de diagnostic agronomique décrivant la contamination du blé en fonction de la conduite de culture. Dans un deuxième temps, l'effet de variables climatiques a été pris en compte. La sélection des variables climatiques les plus significatives (sélection backward) a permis de construire un modèle agro-climatique prédictif de la teneur en DON.

RESULTATS

ETUDE DES FACTEURS AGRONOMIQUES

L'analyse des bases de données blé tendre et blé dur incluant les 8 années d'études a permis de confirmer la hiérarchie et le poids relatif des facteurs mis en évidence dans la première grille de diagnostic agronomique blé tendre (Barrier-Guillot et al., 2006) ainsi que confirmer les résultats issus de la bibliographie sur des données françaises.

Les facteurs de risque qui ressortent statistiquement comme les plus importants dans les contaminations en DON sont : l'année (conditions climatiques), le type de précédent cultural, le travail du sol, la sensibilité variétale à la fusariose et à l'accumulation de DON. Les effets d'autres facteurs agronomiques ont été testés mais sont apparus non significatifs, tels que l'irrigation, la dose d'azote, la densité ou encore le traitement anti-fusariose.

Si les facteurs de risque agronomique identifiés les plus importants sont identiques en blé tendre comme en blé dur, ces deux espèces sont traitées séparément par la suite pour faciliter la lecture.

Blé tendre

Un fort effet de l'année est observé sur nos données. Cet effet année est principalement attribué à un effet climatique. L'examen des effets années montre que 2003, 2007 et 2008 sont les plus touchées à l'opposé des années 2001, 2005 et 2006 (Figure 1).

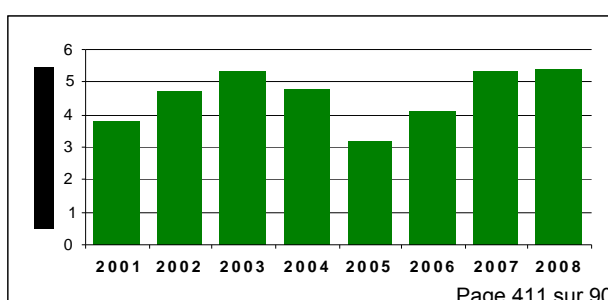


Figure 1 : Graphique illustrant l'effet année en blé tendre sur les moyennes ajustées en $\ln(\text{DON})$
Illustration of year effect on the adjusted means of $\ln(\text{DON})$

Nous rappellerons que par la suite cet effet année a été considéré comme aléatoire, il n'apparaît donc pas dans l'analyse qui suit.

L'analyse de la base de données « blé tendre » au moyen d'un modèle linéaire mixte conduit aux résultats repris dans le tableau IV.

| Effect | Num DF | F value | Pr > F | |
|-----------------------------------|--------|---------|---------|--|
| Précédent | 8 | 22.85 | <0.0001 | |
| Travail du sol | 1 | 16.57 | 0.0047 | |
| Précédent * travail du sol | 8 | 10.82 | <0.0001 | |
| Variétés | 2 | 29.23 | <0.0001 | |
| Précédent*variétés ⁽¹⁾ | 16 | 1.22 | 0.2957 | Tableau IV : Résultat de l'analyse de variance sur les facteurs agronomiques en blé tendre <i>Result of the variance analysis on the agronomic factors in wheat</i> |
| Travail du sol*variétés | 2 | 0.07 | 0.9343 | |
| Précédent*travail sol*variétés | 16 | 0.96 | 0.5180 | |
| Région | 4 | 0.98 | 0.4414 | |

⁽¹⁾ Derrière la terminologie « variétés » on entend, sensibilité des variétés aux fusarioses/fusariotoxines

L'analyse des données (test de Fisher à 5%) met en évidence des effets très hautement significatifs des facteurs simples précédent cultural, travail du sol et sensibilité variétale, avec également la présence d'une interaction significative entre précédent cultural et travail du sol. Par contre, les différences entre régions n'apparaissent pas significatives.

- Précédent cultural

La comparaison des différents précédents (test de Tukey) met en évidence deux grandes catégories : précédents maïs et les autres précédents (tableau V).

| Précédent | Lsmean | Tukey 5% | |
|-------------------|--------|----------|--|
| Pomme de terre | 4.192 | a | |
| Colza | 4.222 | a | |
| Protéagineux | 4.2759 | a | |
| Betterave | 4.3137 | a | |
| Tournesol | 4.3621 | a | |
| Céréales à paille | 4.4255 | a | Tableau V : Moyennes ajustées (Lsmean) de Ln(DON) et statistique de Tukey (5%) sur le facteur précédent <i>Ln(DON) adjusted means (Lsmean) and Tukey statistic (5%) on previous crop factor</i> |
| Autres | 4.5115 | a | |
| Maïs fourrage | 5.3933 | b | |
| Maïs grain | 5.5120 | b | |

Les parcelles en précédent maïs sont en moyenne 3,08 fois plus contaminées que les parcelles en précédents autres (la différence des logarithmes conduit au calcul du rapport des moyennes quand on revient à l'échelle d'origine par transformation inverse).

- Travail du sol

La comparaison des deux modalités de travail du sol (test de Tukey) met en évidence une différence significative entre labour et non labour (tableau VI).

| Travail du sol | Lsmean | Tukey 5% | |
|----------------|--------|----------|---|
| Labour | 4.316 | a | Tableau VI : Moyennes ajustées (Lsmean) de Ln(DON) et statistique de Tukey (5%) sur le facteur travail du sol <i>Ln(DON) adjusted means (Lsmean) and Tukey statistic (5%) on tillage practice factor</i> |
| Non labour | 4.841 | b | |

Le labour permet de réduire en moyenne de 1.69 fois la teneur en DON.

- Interaction précédent*travail du sol

Les résultats de l'interaction sont présentés dans la figure 2. Quel que soit le précédent, le non labour conduit à des taux de DON plus élevés, excepté pour deux précédents que sont les précédents pomme de terre et betterave. Quel que soit le travail du sol, le maïs ressort comme un précédent à risque.

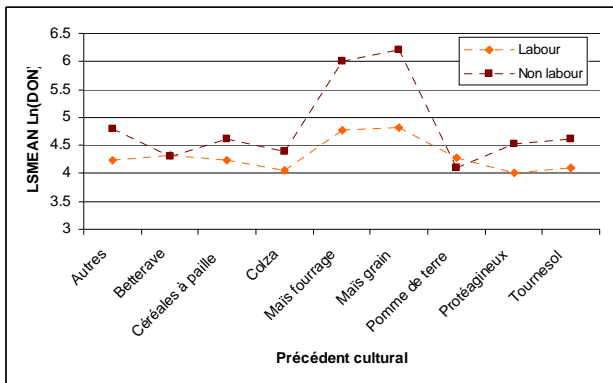


Figure 2 : Graphique illustrant l'interaction précédent / travail du sol en blé tendre sur les moyennes ajustées en Ln(DON)
Illustration of the interaction between previous crop and tillage practice on the adjusted means of Ln(DON)

- Sensibilité variétale

La comparaison des trois classes de sensibilité (test de Tukey) met en évidence une différence significative entre les trois modalités (tableau VII).

| Sensibilité | Lsmean | Tukey 5% |
|-------------|--------|----------|
| Faible | 4.032 | a |
| Moyenne | 4.636 | b |
| Forte | 5.067 | c |

Tableau VII :Moyennes ajustées (Lsmean) de Ln(DON) et statistique de Tukey (5%) sur le facteur sensibilité variétale
Ln(DON) adjusted means (Lsmean) and Tukey statistic (5%) on varietal susceptibility factor

Les parcelles avec des variétés moyennement sensibles sont en moyenne 1,83 fois plus contaminées que celles avec une variété peu sensible. Le choix d'une variété peu sensible permet de réduire en moyenne de 2,82 fois le niveau de DON comparativement aux variétés les plus sensibles.

- Importance relative des facteurs agronomiques et de l'année

Le facteur premier est l'année et explique près de 32% de la variabilité totale. Pour ce qui est des facteurs agronomiques, qui représente 24%, le précédent explique 8%, le travail du sol 6%, et l'interaction entre les deux 3%. En dernier lieu, la sensibilité variétale, mise en 3 classes, explique à elle seule 6% de la variabilité. L'ensemble de ces résultats est repris en figure 3. A noter, que la part non expliquée reste encore élevée (43%).

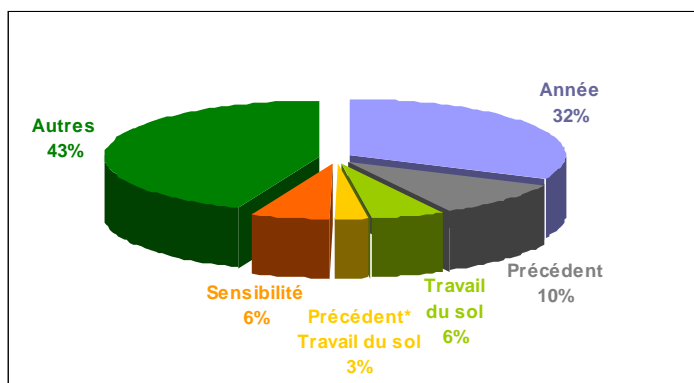


Figure 3 : Part d'explication de chaque facteur étudié sur la variabilité totale de la teneur en DON
Proportion of the each factor on the total variability of DON

CONSTRUCTION ET VALIDATION D'UNE GRILLE DE DIAGNOSTIC AGRONOMIQUE BLE TENDRE

L'analyse des données a été valorisée sous forme d'une grille de diagnostic (tableau VIII). Cette grille résulte de la combinaison des trois facteurs agronomiques étudiés précédemment, le précédent cultural mis en trois classes, le travail du sol et la variété. La combinaison de ces trois facteurs amène à un niveau de risque agronomique allant de 1, le plus faible, à 6, le plus fort.

| Précédent cultural et travail du sol | | Sensibilité variétale | Niveau de risque |
|---|------------|-----------------------|------------------|
| Céréales à paille, colza, pois, féverole, tournesol | Labour | Faible | 1 |
| | | Moyenne | 1 |
| | | Forte | 2b |
| | Non labour | Faible | 2a |
| | | Moyenne | 2a |
| | | Forte | 2b |
| Betterave, pomme de terre, soja, autres... | Labour | Faible | 2a |
| | | Moyenne | 2a |
| | | Forte | 2b |
| | Non labour | Faible | 2a |
| | | Moyenne | 2a |
| | | Forte | 3 |
| Maïs grain Sorgho (fourrages) | Labour | Faible | 2a |
| | | Moyenne | 2b (2a) |
| | | Forte | 3 |
| | Non labour | Faible | 4 (3) |
| | | Moyenne | 5 (4) |
| | | Forte | 6 (5) |

L'analyse de variance sur les niveaux de risque montre un effet significatif ($P < 0.001$) de la grille. La figure 4 et le tableau IX donne pour chaque niveau de risque, effectifs, teneur en DON moyenne, pourcentage de parcelles supérieures à 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et statistique de Tukey à 5%. Plus le risque augmente plus la teneur en DON est élevée avec des teneurs nettement plus fortes pour les risques 5 et 6 où près de 40 à 50 % des parcelles sont au dessus de la limite maximale réglementaire.

Tableau VIII : Grille agronomique d'évaluation du risque DON sur blé tendre
DON risk assessment grid on wheat

| Niveau de risque | Effectifs | Tukey 5% |
|------------------|-----------|----------|
| 1 | 238 | a |
| 2a | 488 | ab |
| 2b | 568 | bc |
| 3 | 349 | c |
| 4 | 80 | c |
| 5 | 106 | d |
| 6 | 66 | d |

Tableau IX : Effectifs et statistique de Tukey (5%) par niveau de risque
Numbers of samples and tukey statistic (5%) for each risk level

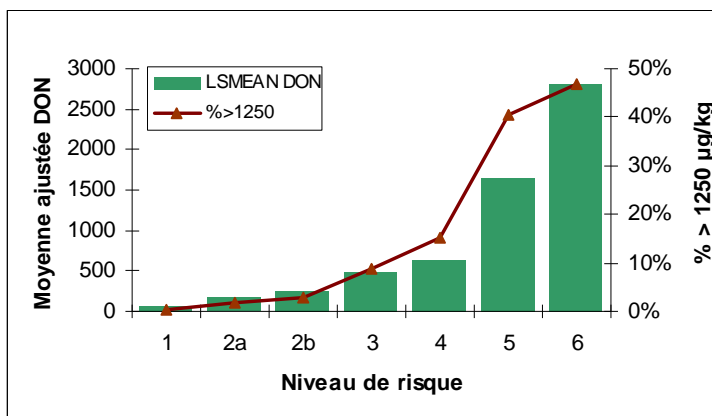


Figure 4 : Moyenne ajustée de DON du blé tendre et pourcentage de parcelles supérieures à 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par niveau de risque
DON adjusted mean on wheat and percentage of plots above 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for each risk level

La robustesse de classement de la grille a été vérifiée à l'aide d'une analyse des interactions entre les classes de risque et l'année. Bien que l'interaction soit significative, impliquant des écarts différents entre niveau de risque d'une année sur l'autre, la hiérarchie des classes de risque est respectée avec chaque année des teneurs en DON qui augmentent avec le niveau de risque (figure 5).

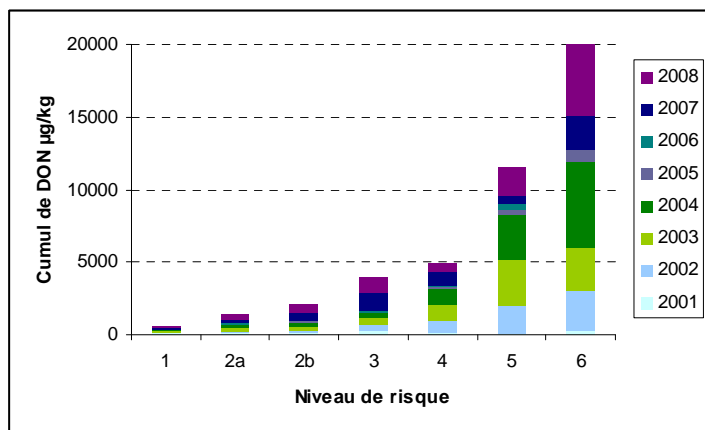


Figure 5 : Cumul des moyennes ajustées de DON du blé tendre par année et niveau de risque
Sum of DON adjusted mean on wheat per year and risk level

Blé dur

Comme pour le blé tendre un fort effet de l'année attribué à un effet climatique est également observé. L'examen des effets année montre que 2002, 2007 et 2008 sont les plus touchées (figure 6).

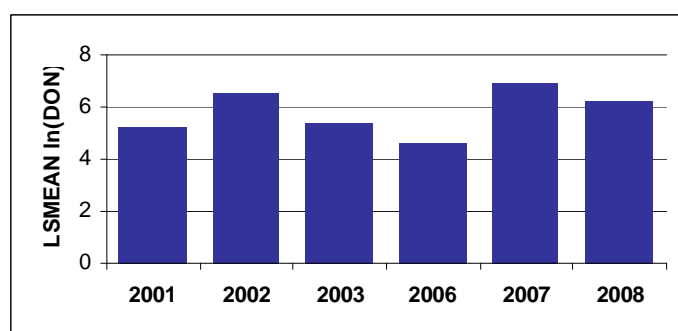


Figure 6 : Graphique illustrant l'effet année en blé dur sur les moyennes ajustées en Ln(DON)
Illustration of year effect on the adjusted means of Ln(DON) on durum wheat

Concernant les facteurs agronomique, en raison des effectifs d'enquêtes plus faibles en blé dur et étant donné les résultats observés sur blé tendre, le facteur précédent a été mis en deux classes (maïs-sorgho ou autres). L'analyse de la base de données « blé dur » au moyen d'un modèle linéaire mixte conduit aux résultats repris dans le tableau X.

| Effect | Num DF | F value | Pr > F |
|--------------------------------|--------|---------|--------|
| Précédent | 1 | 80.07 | 0.0003 |
| Travail du sol | 1 | 21.52 | 0.0056 |
| Précédent * travail du sol | 1 | 10.54 | 0.0228 |
| Variétés | 2 | 10.73 | 0.0155 |
| Précédent*variétés | 2 | 0.69 | 0.5424 |
| Travail du sol* variétés | 2 | 0.48 | 0.6436 |
| Précédent*travail sol*variétés | 2 | 1.41 | 0.3277 |
| Région | 2 | 0.86 | 0.4677 |

Tableau X : Résultat de l'analyse de variance sur les facteurs agronomiques en blé dur
Result of the variance analysis on the agronomic factors in durum wheat

⁽⁷⁾ Derrière la terminologie « variétés » on entend, sensibilité des variétés aux fusarioses/fusariotoxines

L'analyse des données (test de Fisher à 5%) met en évidence des effets très significatifs des facteurs simples précédent cultural, travail du sol et sensibilité variétale, avec également la présence d'une interaction significative entre précédent cultural et travail du sol. Par contre, les différences entre régions n'apparaissent pas significatives.

- Précédent cultural et travail du sol

La comparaison des deux classes de précédents (autres /maïs-sorgho) et du travail du sol (labour/non labour) par le test de Tukey met en évidence des différences significatives. Seuls les résultats de l'interaction sont présentés dans le tableau XI.

| Précédent | Autres | | Maïs-sorgho | |
|----------------|--------|------------|-------------|------------|
| Travail du sol | Labour | Non labour | Labour | Non labour |
| Lsmean Ln(DON) | 4.457 | 4.674 | 5.573 | 6.555 |
| Tukey 5% | a | a | b | c |

Tableau XI : Moyennes ajustées (Lsmean) de Ln(DON) et statistique de Tukey (5%) sur l'interaction précédent/travail du sol
Ln(DON) adjusted means (Lsmean) and Tukey statistic (5%) on interaction previous crop / tillage practice factor

Les parcelles en précédents maïs-sorgho non labour sont en moyenne 6,56 fois plus contaminées que celles en précédents autres ; en labour, elles le sont 3,05 fois plus. Enfin, en précédent maïs, le labour permet de réduire de 2,66 le niveau de DON.

- Sensibilité variétale

La comparaison des trois classes de sensibilité (test de Tukey) met en évidence une différence significative uniquement entre deux classes de variétés (tableau XII).

| Sensibilité | Lsmean | Tukey 5% |
|-------------|--------|----------|
| Moyenne | 5.222 | ab |
| Assez Forte | 5.078 | a |
| Forte | 5.644 | b |

Tableau XII : Moyennes ajustées (Lsmean) de Ln(DON) et statistique de Tukey (5%) sur la sensibilité variétale
Ln(DON) adjusted means (Lsmean) and Tukey statistic (5%) on varietal susceptibility

Les variétés de blé dur étant toutes assez sensibles à la fusariose des épis et aux fusariotoxines, il est difficile de mettre en évidence des différences significatives entre chaque classe.

- Importance relative des facteurs agronomiques et de l'année

Le facteur de premier rang est l'année et explique près de 38% de la variabilité totale. Pour ce qui est des facteurs agronomiques, qui explique 21%, le précédent cultural explique à lui seul 16%, contre 1% pour le travail du sol et 3% pour l'interaction. En dernier lieu, la sensibilité variétale, mise en 3 classes, explique seulement 1% de la variabilité. L'ensemble de ces résultats est repris la figure 7. A noter, que la part non expliquée reste encore élevée (43%).

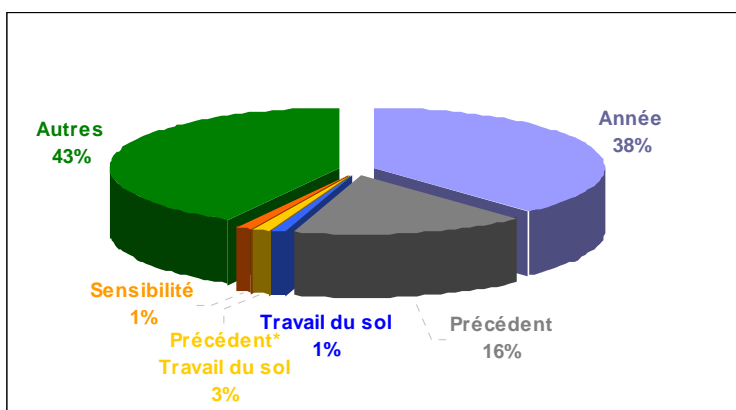


Figure 7 : Part d'explication de chaque facteur étudié sur la variabilité totale de la teneur en DON en blé dur
Proportion of each factor on the total variability of DON in durum wheat

CONSTRUCTION ET VALIDATION D'UNE GRILLE DE DIAGNOSTIC AGRONOMIQUE BLE DUR

A l'instar du blé tendre, une grille de diagnostic agronomique a été construite en blé dur intégrant les mêmes facteurs de risque. La combinaison de ces trois facteurs amène à un niveau de risque agronomique allant de a, le plus faible, à f, le plus fort (tableau XIII).

L'analyse de variance sur les niveaux de risque montre un effet significatif ($P < 0.001$) de la grille. La figure 8 et le tableau XIV donne pour chaque niveau de risque, effectifs, teneur en DON moyenne, pourcentage de parcelles supérieures à 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et statistique de Tukey à 5%. Malgré des différences pas toujours significatives, plus le risque augmente plus la teneur

en DON est élevée avec des teneurs nettement plus fortes pour les risques d, e et f avec pour le risque f près de 60 % des parcelles au dessus de la limite maximale réglementaire.

| Précédent cultural et travail du sol | | Sensibilité variétale | Niveau de risque |
|--------------------------------------|------------|-----------------------|------------------|
| Autres | Labour | Moyenne | a |
| | | Assez forte | a |
| | | Forte | b |
| | Non labour | Moyenne | b |
| | | Assez forte | b |
| | | Forte | c |
| Maïs grain Sorgho (fourrages) | Labour | Moyenne | c (b) |
| | | Assez forte | d (c) |
| | | Forte | d (c) |
| | Non labour | Moyenne | d (c) |
| | | Assez forte | e (d) |
| | | Forte | f (e) |

Tableau XIII : Grille agronomique d'évaluation du risque DON sur blé dur
DON risk assessment grid on durum wheat

| Niveau de risque | Effectifs | Tukey 5% |
|------------------|-----------|----------|
| a | 113 | a |
| b | 226 | ab |
| c | 177 | b |
| d | 98 | c |
| e | 41 | c |
| f | 23 | c |

Tableau XIV : Effectifs et statistique de Tukey (5%) par niveau de risque
Numbers of samples and tukey statistic (5%) for each risk level

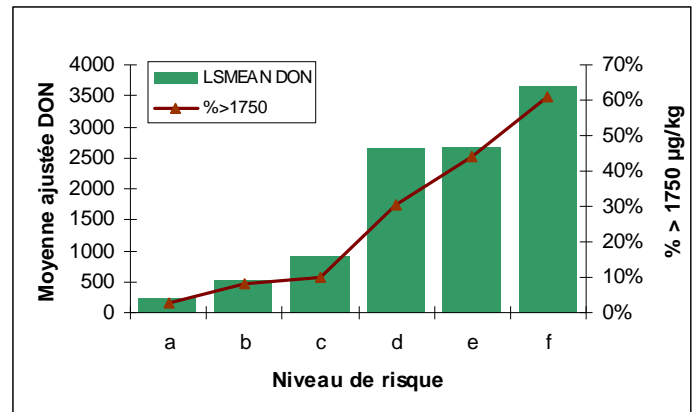


Figure 8 : Moyenne ajustée de DON du blé dur et pourcentage de parcelles supérieures à 1750µg/kg par niveau de risque
DON adjusted mean on durum wheat and percentage of plots above 1750µg/kg for each risk level

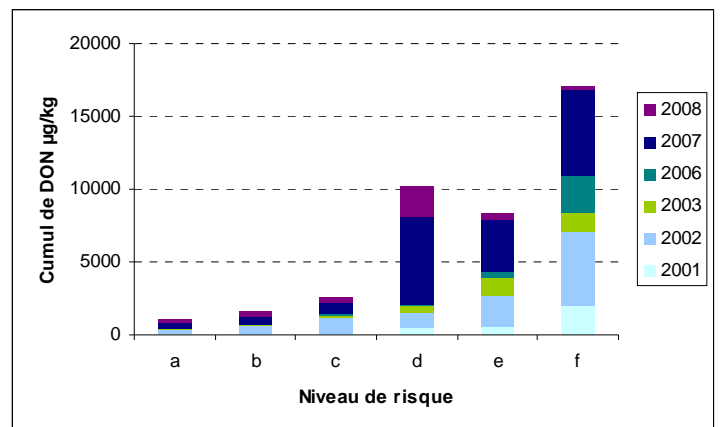


Figure 10 : Cumul des moyennes ajustées de DON du blé dur par année et niveau de risque
Sum of DON adjusted mean on durum wheat per year and risk level

Comme en blé tendre, il existe une interaction significative entre la grille et l'année. Cette interaction porte sur les écarts entre chaque risque d'une année sur l'autre (figure 10). Notons que les effectifs des classes d à f sont faibles.

CONSTRUCTION ET VALIDATION DES MODELES AGRO-CLIMATIQUES

Dans l'attente d'une méthode d'analyse des teneurs en DON instantanée à l'entrée des silos, la mise au point de modèles prédictifs des teneurs en DON avant récolte est un élément important dans la gestion du risque DON par les organismes de collecte et stockage. Ces modèles, déclinés en blé tendre et en blé dur, utilisent à la fois des données agronomiques et des données climatiques. Pour la construction de ces modèles, une régression linéaire avec sélection backward a permis de sélectionner les variables météorologiques significatives parmi un nombre important de variables décrites dans la bibliographie. Ces variables climatiques combinent de la pluie et/ou des températures (en somme ou en nombre de jours) sur différentes périodes allant de l'épiaison à plusieurs jours après floraison.

Les deux modèles, construits sur les données 2001 à 2007, ont été évalués par la méthode de cross-validation. Cette méthode consiste à prédire une année connue sans prendre en compte ses données. Ainsi, le modèle en blé tendre explique 15% de la variabilité du Ln(DON) contre 10% en blé dur. Un autre critère de performance étudié est sa capacité à classer les parcelles par rapport à la limite maximale réglementaire (tableaux XV et XVI).

Tableau XV : % de parcelles bien classées par rapport à la limite maximale réglementaire en blé tendre et en blé dur t par niveau de risque
% of farm field correctly rank compared with the legal limit in wheat and durum wheat per risk level

| Blé tendre | % Bien classées | Blé dur | % Bien classées |
|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| <i>Total</i> | 93% | <i>Total</i> | 84% |
| Risque 1 | 99% | Risque a | 97% |
| Risque 2a-2b | 98% | Risque b | 85% |
| Risque 3 | 87% | Risque c | 80% |
| Risque 4 | 79% | Risque d | 79% |
| Risque 5 | 74% | Risque e | 71% |
| Risque 6 | 74% | Risque f | 74% |

Tableau XVI : effectifs, % de parcelles bien classées par rapport à la limite maximale réglementaire par année en blé tendre et blé dur et % parcelles mesurées supérieure aux seuils
Number of samples, % of farm field correctly rank compared with the legal limit per year in wheat and durum wheat and % of farm field measured above the legal limit.

| | Effectifs | % Bien classées | %parcelles>seuils |
|------|-----------|-----------------|-------------------|
| 2001 | 324 | 98% | 2% |
| 2002 | 360 | 89% | 13% |
| 2003 | 504 | 93% | 9% |
| 2004 | 387 | 93% | 12% |
| 2005 | 259 | 97% | 1% |
| 2006 | 183 | 96% | 1% |
| 2007 | 286 | 79% | 21% |
| 2008 | 191 | 73% | 16% |

Ainsi, l'étude de ces résultats nous amène à conclure que les modèles sont utiles pour segmenter les parcelles par rapport à la limite maximale réglementaire. Le modèle blé tendre est un peu plus robuste que celui en blé dur, probablement lié aux effectifs d'enquêtes plus élevés pour le blé tendre. Néanmoins, des difficultés à classer les parcelles en risque agronomique supérieur à 4 ainsi que les années ayant connus des niveaux de contamination les plus forts (2003, 2007 et 2008) peuvent être observées.

DISCUSSION

Cette étude a mis en évidence une forte variation inter-annuelle des teneurs en DON à l'échelle de la France. Pour les deux espèces, blé tendre comme blé dur, les années 2007 et 2008 apparaissent nettement plus fortement contaminées que les années antérieures de l'étude. Ce constat s'explique notamment par le climat humide, depuis la floraison des blés jusqu'à parfois la récolte, propice aux contaminations par *Fusarium graminearum* et à la production de toxines, confirmé par l'intensité des symptômes de fusariose observées dans les champs.

L'étude des facteurs simples montre un effet marqué de l'année traduisant des effets climatiques, avec 32 et 38% de la variabilité totale de la teneur en DON expliquée par ce seul facteur.

Cette étude a également permis de confirmer l'effet des facteurs attendus tels que le précédent cultural, le travail du sol et l'interaction entre ces deux facteurs, ainsi que la sensibilité variétale, dont l'effet est plus marqué en blé tendre du fait de la variabilité génétique des sensibilités. Les précédents maïs se distinguent nettement des autres précédents et une interaction forte existe avec le travail du sol. A l'exception de la sensibilité variétale, les deux espèces blé tendre et blé dur se comportent de la même manière.

Néanmoins, une part importante de variabilité reste non expliquée, près de 40 % liés probablement aux aspects climatiques non pris en compte ainsi qu'à des facteurs agronomiques non intégrés. De plus, d'autres facteurs tels que la prévision des stades, les distances aux stations météorologiques avec la difficulté de capter les épisodes orageux, les pluies en post-floraison, les possibles contaminations tardives sont autant de facteurs qui peuvent expliquer cette part non expliquée.

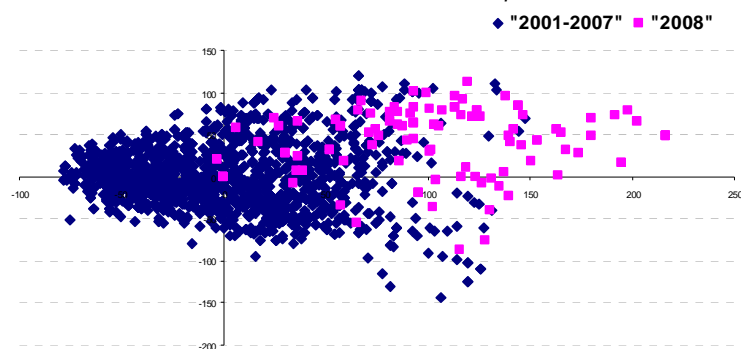
Concernant l'effet du traitement anti-fusariose, il a été possible d'observer un effet significatif certaines années comme 2007 en blé dur. Néanmoins, sur une analyse pluriannuelle, l'effet n'est pas significatif. Ce résultat peut s'expliquer d'une part par la difficulté à évaluer a posteriori le stade optimal de protection des blés et d'autre part, par l'évolution des matières actives, doses et règles de décision depuis 2001.

Les grilles agronomiques, proposées aux agriculteurs pour minimiser les risques de DON sont validées sur l'ensemble des jeux de données mais les différences entre les classes varient d'une année à l'autre. Néanmoins, elles ont été validées chaque année et pour chacune, même en 2008, la hiérarchie entre les classes de risque est respectée malgré le fait que les écarts ne soient pas toujours significatifs.

Les modèles montrent de bonnes performances au regard des pourcentages de parcelles bien classées, mais avec une variation annuelle forte. Les années les plus contaminées (2007 et 2008), les performances sont moins satisfaisantes, d'autant plus en 2008, année particulièrement atypique avec des pluies exceptionnellement fortes autour de la floraison. Afin de valider si l'année climatique se situe dans le domaine de validité de nos modèles, une analyse en composante principale est réalisée sur l'ensemble des variables climatiques qui ont permis de construire les modèles (année 2001 à 2007). Les points relatifs aux données climatiques de 2008 ont été positionnés en rose sur la figure 11 et montre un décalage par rapport au nuage de point (données 2001-2007), traduisant une année différente en terme climatique des années antérieures de l'étude

Figure 11 : positionnement des données climatiques par Analyse en Composante Principale (ACP) sur les parcelles de blé tendre entre 2001-2007 comparativement aux données 2008

Position of climatic data by PCA on wheat farm field between 2001 and 2007 compared with 2008 data



CONCLUSION

Cette étude a permis de conforter les premiers résultats sur la hiérarchie, la part relative et les interactions des facteurs climatiques et agronomiques sur la teneur en DON ainsi que de valider les outils d'aide à décision et de prévision en intégrant deux années atypiques 2007 et 2008. Que ce soit en blé tendre comme en blé dur, la gestion des résidus reste le levier le plus important pour limiter le risque. Des études réalisées en parcelles expérimentales ont montré qu'après un précédent maïs, le choix du non labour pouvait être palié par une gestion plus fine des résidus. Ainsi, avec l'augmentation du non labour, il s'agira de raisonner différemment la gestion des résidus à travers un broyage fin et une incorporation superficielle des résidus pour accélérer leur dégradation et limiter la réserve d'inoculum. Le choix de la variété reste également un critère important dans une optique de qualité sanitaire. Enfin, même si cet

aspect a été peu décrit, l'arrivée de nouvelles molécules fongicides comme le prothioconazole permet, de part sa meilleure efficacité et son spectre plus large sur les agents responsables de la fusariose, de limiter le risque considérablement. Enfin, cette étude a permis de montrer que même les années les plus atypiques, les outils d'aide à la décision développés par ARVALIS-Institut du végétal présentaient une bonne robustesse.

Cependant, ces outils, à disposition des opérateurs en amont des filières agricoles nécessitent d'être améliorés. La modélisation de la production des toxines en prenant en compte les aspects de développement de la maladie (sporulation, infection, toxinogénèse) est un nouvel axe de recherche. Le développement et l'utilisation de marqueurs moléculaires, en permettant des diagnostics plus précoces et rapides des flores sur les grains, devraient permettre de mieux comprendre la biologie du champignon pour ainsi lever des limites à l'acquisition de données et prendre en compte cet aspect dans la modélisation des teneurs en DON.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'ensemble des organismes collecteurs qui depuis plus de 8 ans pour certains contribuent à alimenter notre réseau en impliquant leurs adhérents dans la prise d'échantillons sans lesquels toute cette étude n'aurait été possible.

Nous remercions également l'équipe technique Arvalis-Institut du végétal de Villerable, qui a centralisé, nettoyé et préparé les échantillons de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

Barrier-Guillot, B., 2006. Dossier mycotoxines - Les actions de prévention : limiter le cumul des facteurs de risque au champ. *Perspectives agricoles n°324* :28-34.

Barrier-Guillot, B., Delambre, M., Morel, A., Maumené, C., Gouet, H., Grosjean, F., Leuillet, M. 2004. Occurrence of deoxynivalenol in wheat grown in France and identification of agronomic factors involved in content variations. *In : An overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Edited by A. Logrieco, A. Visconti, Pays-Bas 101-108.

Barrier-Guillot, B., Pons, B., Delambre, M., Gouet H., 2007. Effect on agronomic practices involved in level of DON in wheat : synthesis of three years survey. *In : Colloque scientifique, projet RARE : Fusariotoxines des céréales*, Arcachon, France 65-66.

Edwards, S. 2007. Investigation of Fusarium mycotoxins in UK wheat production. *In : HGCA Project report n°413*.

Gourdain, E. 2008. Mycotoxins – Quality. Field prevention first. *Selected Papers Arvalis- Institut du vegetal* 7 13-15.

Lemmens, M. 2007. Genetical, ecophysiological and biochemical interactions modulating the biogenesis of Fusarium mycotoxins. *In : Colloque scientifique, projet RARE : Fusariotoxines des céréales*, Arcachon, France 3-4.

Obst A., Lepschy J., Beck R., Bauer G. and Bechtel A., 2000. The risk of toxins by Fusarium graminearum in wheat — interactions between weather and agronomic factors. *Mycotoxin Research* 16 16-20

Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J.D., and Hooker, D.C. 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 23 279-285.

Van der Fels-klerx H.J., Booij C.J.H., 2008. Model for identification of emerging mycotoxin risks. *In : The World Mycotoxin Forum, The Fifth Conference*, Noordwijk, The Netherlands 23.

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**UN NOUVEL INDICATEUR ORIGINAL DE L'ETAT DES CULTURES
UTILISATION PRATIQUE AU CHAMP SUR CULTURE D'ORGE DE PRINTEMPS DANS
LES PAYS DE L'EST**

S. GATE ⁽¹⁾ et V. MARTINON⁽²⁾

⁽¹⁾ SYNGENTA AGRO S.A.S, 1 Avenue des Près, CS 10537, 78 286 Guyancourt cedex, France, sylvaine.gate@syngenta.com

⁽²⁾ FORCE-A, Centre Universitaire Paris-Sud, Bâtiment 503, 91893 Orsay cedex, France, vincent.martinon@force-a.fr

RÉSUMÉ

FORCE-A propose des solutions optiques de diagnostic et de gestion en temps réel pour l'agriculture durable. Ces capteurs optiques mettent en œuvre la fluorescence des végétaux pour quantifier les polyphénols et la chlorophylle des plantes, indicateurs de l'état nutritionnel, de qualité et de santé des cultures.

Syngenta Agro S.A.S, a mis en œuvre ces nouveaux indicateurs afin de mieux comprendre les gains de rendements observés sur orge de printemps, dans les pays de l'Est après protection des semences au thiaméthoxam (insecticide).

Des mesures sont réalisées avec le capteur Dualex® sur des feuilles d'orge prélevées dans des essais au champ un mois avant récolte. Les observations mettent en évidence un effet de la protection de semence (thiaméthoxam) sur le métabolisme secondaire de la plante. Les cultures traitées contiennent moins de polyphénols. En définitive, un gain de rendement en moyenne de 4 q/ha est observé sur l'ensemble des cultures traitées.

Mots-clés : capteurs optiques, polyphénols, orge de printemps, protection de semence, thiaméthoxam

SUMMARY

A NEW INNOVATIVE INDICATOR OF CROP STATUS – EXEMPLE OF IN-FIELD TRIAL ON BARLEY IN EASTERN-EUROPE

FORCE-A company develops optical solutions for crop health diagnostic and managing for sustainable agriculture. These sensors use plant fluorescence signals in order to monitor crops chlorophyll and polyphenolics contents, which are relative to the nutrition, the quality and the health status of the crops.

Syngenta Agro S.A.S has experimented these new crop status indicators in order to better understand and explain the yields gain observed on barley culture after seeds protection with thiametoxam (pesticide), in Eastern-Europe.

Dualex® sensor measurements have been achieved on barley leaves grown in field experiments one month before harvest. This study has shown an effect of thiametoxam seeds treatment on the secondary metabolism of plant. Polyphenolics content was lower in processed seeds crops and the effect of the pollen attack on leaves was also lower. For treated seeds, an average of yield gain of 4 q/ha was observed on all experiments.

Key words: optical sensors, polyphenolics, barley, seeds treatment, thiamethoxam

INTRODUCTION

FORCE-A propose des solutions inédites de diagnostic et de gestion en temps réel des cultures. Ces nouveaux outils mettent en œuvre des capteurs optiques basés sur la fluorescence des végétaux. L'utilisation de la fluorescence permet la mesure en temps réel et au champ d'une famille de molécules jusque là mesurée uniquement par des moyens lourds et coûteux au laboratoire : les polyphénols. Les solutions proposées par FORCE-A permettent une acquisition rapide, au champ d'un grand nombre d'informations. L'acquisition d'un grand nombre de mesures permet ainsi d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les polyphénols sont des molécules carbonées produites par le métabolisme secondaire de la plante. Ils sont le témoin d'un fonctionnement atypique de la plante : conditions de culture limitantes (nutrition) (Cartelat et *al.*, 2005), attaque de pathogènes ou de nuisibles (Poutaraud et *al.*, 2007), effets de traitements phyto-sanitaires (Ben Ghazlen et *al.*, sous presse).

Syngenta Agro S.A.S étudie les effets de traitement de semence sur les cultures et cherche à expliquer les observations réalisées. Des gains de rendements sur orge de printemps ont été observés au cours d'expérimentations réalisées en Europe de l'Est après traitement des semences au thiaméthoxam (insecticide). Nous avons cherché à comprendre ces gains de rendement et nous nous sommes intéressés au métabolisme secondaire de la plante. Afin d'obtenir rapidement des réponses, Nous avons utilisé en 2008 la pince à feuille qui mesure les flavonols de l'épiderme des feuilles ainsi qu'un chlorophylle-mètre.

MATERIEL ET MÉTHODE

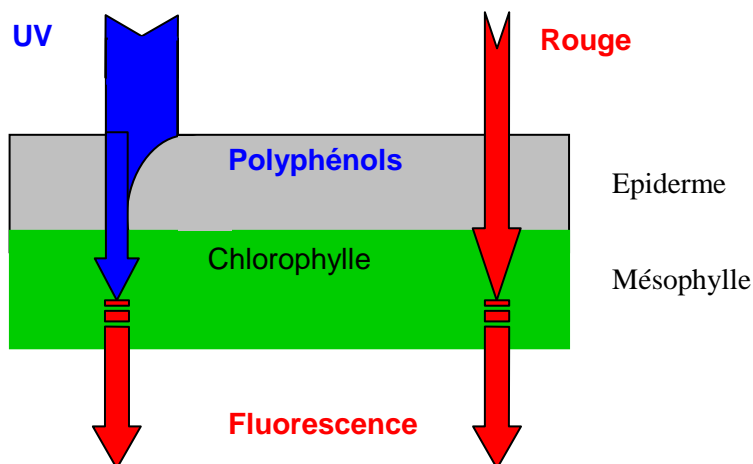
Description et principe de mesure de la pince à feuille Dualex®

Fruit de 15 ans de recherche en spectroscopie des feuilles par une équipe interdisciplinaire du CNRS, le Dualex® met en œuvre une technologie brevetée de mesure basée sur l'autofluorescence des feuilles (Cerovic et *al.*, 2002 ; Goulas et *al.*, 2004). La mesure de l'absorbance dans l'ultra-violet (UV) de l'épiderme des feuilles est non destructive, rapide et simple. Elle ne requiert aucune préparation préalable du végétal, et elle peut être réalisée dans toute condition d'éclairage ambiant.

La pince à feuille Dualex® Flav est un outil de diagnostic portable, ergonomique et communicant, opérant sur batterie rechargeable, qui fournit une mesure quantitative de l'absorbance de l'épiderme des feuilles des végétaux dans le domaine UV à la longueur d'onde de 375 nm. La valeur de l'absorbance UV est directement reliée à la concentration en polyphénols (ou phénylpropanoïdes) des feuilles (Cartelat et *al.*, 2005 ; Cerovic et *al.*, 2008). La valeur de l'absorbance peut être lue en temps réel sur l'afficheur LCD du boîtier électronique, et est également stockée en mémoire pour pouvoir être facilement transférée vers un ordinateur pour des traitements statistiques ultérieurs.

La mesure de l'absorbance de l'épiderme des feuilles dans le domaine UV est basée sur l'utilisation de la fluorescence de la chlorophylle (présente dans le mésophylle) excitée à deux longueurs d'onde (ultra-violette et rouge), et sur l'effet d'écran de l'épiderme qui absorbe une partie de la lumière UV d'excitation et qui ainsi réduit la quantité de lumière responsable de l'excitation de la fluorescence de la chlorophylle (voir la figure ci-dessous).

Figure 1 : Principe de fonctionnement du Dualex®
(Dualex® operating principle)



La transmittance de l'épiderme de la feuille est évaluée par le rapport d'excitation de fluorescence $F(UV)/F(R)$, où $F(UV)$ est l'intensité de fluorescence sous excitation UV, et $F(R)$ est la fluorescence sous excitation d'une longueur d'onde rouge de référence non absorbée par l'épiderme. Ainsi, la chlorophylle présente dans le mésophylle agit comme un photorécepteur qui fournit une réponse de fluorescence à la lumière d'excitation qui atteint le mésophylle.

Ainsi,

$$PHEN = \text{Absorbance} = \log(1/\text{Transmittance}) = \log(F(R)/F(UV))$$

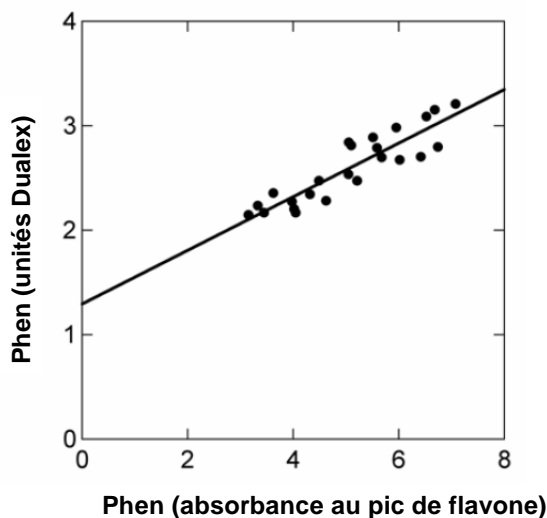


Figure 2 : Relation entre la concentration foliaire en polyphénols (Phen) mesurée par le Dualex® et celle mesurée par spectroscopie au pic d'absorption.
(Relationship between the leaf content of polyphenolics (Phen) measured with Dualex® leaf-clip and the absorbance measured at the maximum of the flavone peak)

$$Y = 1.29 + 0.26 X, r^2 = 0,81$$

Cette figure met en évidence que la pince à feuilles Dualex® mesure l'absorbance des polyphénols de l'épiderme des feuilles.

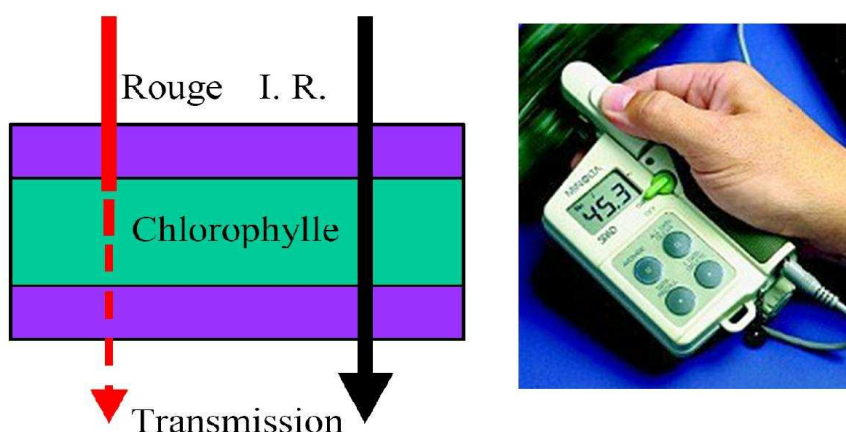


Figure 3 : Photographie du Dualex® Flav
(Dualex® Flav picture)

Description et principe de mesure du chlorophylle-mètre SPAD

La pince à feuille SPAD est un instrument de mesure portable qui fournit un indice corrélé à la teneur en chlorophylle de la feuille (Richardson et *al.*, 2002). Ce chlorophylle-mètre fonctionne sur le principe de la transmittance différentielle entre deux lumières : rouge (650 nm) et infrarouge (920 nm). La chlorophylle absorbe le rouge mais pas l'infrarouge. La différence d'intensité de lumière qui traverse la feuille permet ainsi la mesure du contenu en chlorophylle de la feuille.

Figure 4 : Photographie et principe de fonctionnement du chlorophylle-mètre SPAD (SPAD Chlorophyll-meter picture and operating principle)



Description des essais et des cultures

Afin de comprendre les gains de rendement observés sur orge de printemps dans les pays de l'Est après traitement des semences au thiaméthoxam (insecticide), nous nous sommes intéressés au métabolisme secondaire de la plante et nous avons utilisé en 2008 la pince à feuille Dualex® Flav ainsi qu'un chlorophylle-mètre SPAD fin juin 2008, soit environ un mois avant récolte, sur 2 essais basés en Autriche et République Tchèque.

Les semis d'orge ont été réalisés début avril.

Les essais ont été mis en place selon un dispositif de Fisher à 4 blocs randomisés, avec des témoins inclus. Les parcelles ont une surface minimale de 20m².

Les mesures ont été réalisées au champ sur 30 avant dernières feuilles (F2) de l'orge prises au hasard dans le milieu de la parcelle.

Trois modalités de traitements ont été comparées.

Tableau I : Liste de traitements dans les essais (Treatments list in trials)

| Référence | Traitement |
|-----------|--|
| 1 | témoin |
| 2 | Protection de semence fongicide |
| 3 | Protection de semence fongicide+thiaméthoxam (70g/100kg de semences) |

RESULTATS

Les résultats des polyphénols mesurés au niveau de l'épiderme des feuilles ainsi que ceux de la chlorophylle sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau II : Teneur en polyphénols (moyenne des 30 mesures)
(Polyphenolics content)

| Traitement | Polyphénols (unités DUALEX) | |
|---|--------------------------------|----------------|
| | Autriche NK | Tchéquie NK |
| Témoin | 0,93 a | 0,80 b |
| Protection de semence fongicide | 1,04 b | 0,77 b |
| Protection de semence fongicide+thiaméthoxam (70g/100kg de semences) | 0,88 a | 0,56 a |

NK : classement statistique selon le Test de NEWMAN-KEULS au seuil 5 %

Tableau III : Teneur en chlorophylle (moyenne des 30 mesures)
(Chlorophyll content)

| Traitement | Chlorophylle (unités SPAD) | |
|---|-------------------------------|----------|
| | Autriche | Tchéquie |
| Témoin | 36,1 | 32,1 |
| Protection de semence fongicide | 37,0 | 33,3 |
| Protection de semence fongicide+thiaméthoxam (70g/100kg de semences) | 37,6 | 35,8 |

Le chlorophylle-mètre utilisé n'était pas pourvu de mémoire, il n'a donc pas permis l'enregistrement des trente données. L'analyse statistique n'est pas possible.

Les différences de teneurs en chlorophylle et en polyphénols observées entre les deux sites pour un même traitement sont dues principalement aux différences de climat et de variétés. Génétiquement des variétés différentes sont programmées pour produire des teneurs en chlorophylle et en polyphénols différentes. De plus, la production des polyphénols est fortement influencée par le rayonnement lumineux propre au site.

Nous remarquons sur les 2 essais, une augmentation de la teneur en chlorophylle ainsi qu'une baisse en polyphénols, statistiquement différente entre les semences traitées uniquement fongicide et celles avec thiaméthoxam.

Cette augmentation s'est traduite par un gain de rendement de 4 quintaux en moyenne par rapport au traitement fongicide classique (cf. tableau ci-dessous). Par essai, nous constatons une très bonne relation entre la teneur en polyphénols et le rendement : le coefficient de corrélation est de 0.96 dans l'essai de l'Autriche et de 0.86 dans celui de la Tchéquie.

Tableau IV : Rendement (q/ha à 15% d'humidité)
(Yield in q/ha adjusted to 15 % moisture content)

| Traitement | Rendement (q/ha) | | | | |
|---|------------------|---|----------------|----|-----------|
| | Autriche NK | | Tchéquie NK | | Moyenne |
| Témoin | 56 | a | 49 | ab | 52 |
| Protection de semence fongicide | 54 | a | 48 | b | 51 |
| Protection de semence fongicide+thiaméthoxam (70g/100kg de semences) | 58 | a | 51 | a | 55 |

NK : classement statistique selon le Test de NEWMAN-KEULS au seuil 5 %

DISCUSSION-CONCLUSION

L'utilisation au champ de la pince à feuille Dualex® Flav (mesurant les polyphénols de l'épiderme des feuilles) a permis de montrer l'action du thiaméthoxam sur le métabolisme secondaire de la plante. Cette action est l'une des explications des gains de rendement observés sur orge de printemps ayant reçu une protection de semence à base de cette matière active dans les pays de l'Est.

Cette double indication de teneur en chlorophylle et en polyphénols est aujourd'hui mesurable avec un seul capteur développé par la société Force-A : le Dualex4.

BIBLIOGRAPHIE

Ben Ghazlen N., Moïse N., Latouche G., Martinon V., Mercier L., Besançon E., Cerovic Z.G., sous presse – Assessment of grapevine maturity using a new portable sensor : non-destructive quantification of anthocyanins. *Macrowine 2008* (sous presse).

Cartelat A., Cerovic Z.G., Goulas Y., Meyer S., Lelarge C., Prioul J-L., Barbottin A., Jeuffroy M-H., Gate P., Agati G. Moya I., 2005 - Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 91, 35-49.

Cerovic Z.G., Ounis A., Cartelat A., Latouche G., Goulas Y., Meyer S., Moya I., 2002 - The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment*, 25,1663-1676.

Cerovic Z. G., Moïse N., Agati G., Latouche G., Ben Ghazlen N., Meyer S. - 2008. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *J. Food Comp. Anal.*, 21, 8, 650-654.

Goulas Y., Cerovic Z.G., Cartelat A., Moya I., 2004 – Dualex : A new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics*, 43, 23, 4488-4496.

Poutaraud A., Latouche G., Martins S., Meyer S., Merdinoglu D., Cerovic Z.G., 2007 – Fast and local assessment of stilbene content in grapevine leaf by in vivo fluorometry. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4913-4920.

Richardson A., Duigan S., Berlyn G., 2002 – An evaluation of non-invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185-194

**OPTIMISATION DE LA STRATÉGIE FONGICIDE ANTI-BOTRYTIS APRÈS VÉRAISON ET
MODÉLISATION DE LA POURRITURE GRISE DE LA VIGNE**

M. FERMAUD⁽¹⁾, J. ROUDET⁽¹⁾, P. SAURIS⁽¹⁾, L. DRUELLE⁽¹⁾, L. DELIERE⁽¹⁾,
J.-M. ARMAND⁽¹⁾, G. BLANC⁽²⁾ et P. LAGOUARDE⁽²⁾

⁽¹⁾ UMR 1065 Santé Végétale INRA-ENITAB, ISVV Bordeaux-Aquitaine, 71 av. E. Bourloux,
F-33883 Villenave d'Ornon, France (fermaud@bordeaux.inra.fr)

⁽²⁾ Bayer CropScience France, 16 rue Jean-Marie Leclair, CP 310, 69337 Lyon Cedex 09,
France

RÉSUMÉ

Une stratégie fongicide optimisée contre la Pourriture grise de la Vigne a été expérimentée entre 2004 et 2008 sur le cépage Merlot noir sur deux sites du bordelais (Médoc et Entre-deux-Mers). A partir de la véraison, cette stratégie intègre le risque épidémique grâce à la modélisation statistique développée par l'INRA de Bordeaux en fonction de données climatiques standards et locales. Les résultats obtenus avec une substance active de référence (fenhexamid) permettent d'évaluer le bien-fondé de réaliser ou non l'application fongicide positionnée en pratique à la véraison, mais aussi de la pertinence de la décaler dans le temps après ce stade. Selon le site et l'année, ce décalage a varié entre 15 et 28 jours sans perte d'efficacité significative. En respectant le délai d'application avant récolte, l'intérêt de cette stratégie repose sur la souplesse d'utilisation des fongicides spécifiques et sur une meilleure adéquation entre l'analyse du risque épidémique et l'usage d'intrants phytosanitaires.

Mots-clés : épidémiologie, protection intégrée, *Botrytis cinerea*, évaluation du risque

SUMMARY

**OPTIMIZATION OF A CONTROL STRATEGY USING ANTI-BOTRYTIS FUNGICIDES
BASED ON EPIDEMIOLOGICAL MODELLING OF GREY MOULD IN THE VINEYARD**

A strategy using Anti-*Botrytis* fungicides was developed to control grey mould in the vineyard. Field trials were carried out from 2004 to 2008 on the cv. Merlot noir at two sites near Bordeaux (Médoc and Entre-deux-Mers). From the phenological stage "véraison » onwards, the epidemic risk was evaluated using a statistical modelling approach developed beforehand. According to climatic standard variables, the model indicated risk periods and, more importantly, non-risk phases during the season. The results, in terms of disease control using one fungicide (active ingredient: fenhexamid), allowed us to test whether a fungicide spray was required or not between veraison and harvest. Furthermore, when the spraying was necessary, postponing the application was demonstrated generally as relevant and a time-lag between 15 and 28 days (post-veraison) was effective according to the site and the year. The optimized strategy shows the prospect of limiting the fungicide use and relaxing the usual rules based on a precise phenological stage at which a spraying should be made.

Key words: epidemiology, integrated pest management, *Botrytis cinerea*, risk assessment

INTRODUCTION

La Pourriture grise, due au champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, est une maladie redoutable sur Vigne. En se déclarant sur les grappes en maturation, entre la véraison et la vendange, elle engendre des pertes quantitatives pouvant s'élever jusqu'à 40 - 50% de la récolte dans des situations très favorables à la maladie, notamment suite à de fortes pluies en fin de saison. Cependant, cette maladie est surtout préjudiciable du fait de ses conséquences néfastes sur la qualité organoleptique des vins. Elle s'accompagne i) d'une dégradation des principaux constituants qualitatifs des raisins et des vins (sucres, acides organiques, tanins et anthocyanes) ; ii) de difficultés technologiques (filtration) ; iii) de déviations aromatiques et iv) d'une baisse du potentiel de vieillissement des vins. Cette nuisibilité qualitative peut être induite par des attaques finales de Pourriture grise relativement faibles, d'environ 10% de baies de raisin atteintes. L'imprévisibilité et le caractère explosif des épidémies en fin de saison peuvent aussi contribuer à des vendanges réalisées plus tôt que prévues, avant maturité technologique, dépréciant d'autant leur qualité.

La protection vis-à-vis de la Pourriture grise de la vigne doit reposer d'abord et avant tout sur des méthodes prophylactiques éprouvées qui présentent un niveau d'efficacité significatif (p.ex. effeuillage, limitation de la vigueur du cep). L'usage de fongicides spécifiques constitue un moyen également très utilisé pour protéger les vignobles ainsi que les nombreuses autres cultures sensibles à cet agent pathogène. Ainsi, au niveau mondial et toutes cultures confondues, les traitements fongicides contre *B. cinerea* ont coûté environ 540 millions d'euros pour l'année 2001, soit 10 % du marché mondial des fongicides (rapport annuel UIPP, 2002). Très classiquement en France, les expérimentations au vignoble sont réalisées en positionnant les applications fongicides spécifiques sur la base de quatre stades phénologiques clefs qui constituent aussi le cadre de référence pour les préconisations en viticulture : stade « A » fin floraison ; « B » fermeture de la grappe ; « C » véraison et, enfin, « D » correspondant à 3 semaines avant vendanges ou au DAR du fongicide utilisé (délai d'application avant récolte), soit en pratique environ 15 à 21 j avant vendanges.

Cependant, force est de constater que les stratégies fondées sur les seuls stades phénologiques, aussi diversifiées soient elles, n'intègrent pas fondamentalement la dynamique épidémique de la maladie. Cette dernière pourrait être quantifiée, par exemple, grâce au suivi de la sporée aérienne. Pour notre part, nous avons privilégié une approche indirecte pour quantifier cette dynamique épidémique en se fondant sur le climat qui est un déterminant majeur gouvernant la progression des épidémies de Pourriture grise. C'est pourquoi, afin d'optimiser les stratégies de protection fongicide, nous avons développé depuis 2002 à l'UMR Santé Végétale de l'INRA de Bordeaux des indicateurs prévisionnels du risque épidémique (Fermaud *et al.*, 2002 ; 2003). Fondé sur l'analyse de données climatiques standards, le principe de l'élaboration et de l'utilisation potentielle de ces indicateurs a déjà fait l'objet de différentes publications (voir références bibliographiques).

Lors de cette étude au vignoble, deux objectifs ont été poursuivis en utilisant les Indicateurs Climatiques du Risque Tardif (ICRT) de Pourriture grise :

- **I) évaluer, selon les années, la nécessité ou non de réaliser le traitement à la véraison ou une application plus tardive.** Les conditions expérimentales correspondantes, en termes de profil de risque épidémique et d'effet parcellaire, sont décrites.
- **II) optimiser le positionnement dans le temps du traitement anti-Botrytis de la véraison (« C ») en intégrant effectivement l'évolution d'un risque épidémique avéré.** Ce positionnement décalé, tout en maintenant le haut niveau d'efficacité de cette application fongicide, vise à montrer l'existence d'une grande souplesse dans la gestion des applications anti-Botrytis tardives (post-véraison), d'autant plus qu'un traitement à la fin-floraison a été réalisé.

MATERIEL ET MÉTHODES

PARCELLES EXPERIMENTALES

Les deux parcelles expérimentales sont plantées avec le cépage Merlot noir et présentent des caractéristiques bien différentes.

- **Site de l'Entre-deux-Mers (« EdM »)**

L'essai a été mis en place à Moulon (Gironde) sur une parcelle plantée en 1993 avec le porte-greffe SO4 en sol limono-argilo calcaire. La densité de plantation est de 4464 pieds par ha : distance entre ceps sur le rang de 1.4 m X distance entre rangs de 1.6 m. La taille est du type « guyot simple ».

- **Site du Médoc (« Médoc »)**

La parcelle expérimentale, située dans le Médoc, a été plantée en 1976 sur le porte-greffe 3309 dans un sol sablo-graveleux. La densité de plantation est de 8696 pieds par ha : distance entre ceps sur le rang de 1 m X distance entre rangs de 1.15 m. La taille est en « guyot double » avec six bourgeons laissés en moyenne (trois par aste). Cette parcelle présente régulièrement un risque Botrytis plus important que le site EdM.

DISPOSITIF ET MODALITES EXPERIMENTALES

Les essais ont été réalisés selon la méthode CEB n°37. Le dispositif expérimental comporte 4 et 5 blocs, respectivement sur les sites EdM et Médoc, avec le témoin inclus dans le dispositif. Les modalités expérimentales permettent de comparer l'intérêt :

- de stratégies à une application :
 - « C standard » : application véraison (7 jours après début-véraison ou à la mi-véraison)
 - « C modèle » : application en post-véraison selon la préconisation liée aux indices ICRT (*cf infra*)
- et de stratégies à deux applications dont celle de la fin-floraison (« A ») :
 - « A » suivie d'une application « C standard »
 - « A » suivie d'une application « C modèle »

Pour pouvoir être comparées selon les années, toutes les applications à partir de la véraison, « C standard » comme « C modèle », ont été réalisées sur tous les sites avec un fongicide à base de fenhexamid (FNH), à 750 g /ha, reconnu pour ses performances anti-Botrytis à tous les stades de traitement (Kuck *et al.*, 1997 ; Suty *et al.*, 1997). Le choix de ce fongicide a été principalement guidé par le fait d'un DAR (délai d'utilisation avant récolte) particulièrement court de 15 jours. Pour les applications de fin-floraison, un autre anti-Botrytis homologué (« Ref A ») a été retenu

APPLICATION DES PRODUITS

Les traitements ont été appliqués, en dirigé sur la zone fructifère, par pulvérisation pneumatique : dans l'Entre-deux-Mers, sur la base de 150 l/ha et dans le Médoc, sur la base de 300 l/ha.

NOTATIONS DE POURRITURE GRISE

A chaque date, l'échantillonnage est de 100 grappes notées par parcelle élémentaire : respectivement, 400 et 500 grappes sur les sites EdM et Médoc. La progression épidémique est quantifiée par des notations visuelles hebdomadaires :

1. du **pourcentage (fréquence) de grappes attaquées**
2. de **l'intensité d'attaque moyenne par grappe**. Cette intensité observée de la maladie, qui correspond au pourcentage moyen de grains botrytisés par grappe, sera dénommée par la suite « **intensité globale de Pourriture grise** ».

MODELISATION DU RISQUE EPIDEMIQUE DE POURRITURE GRISE: INDICES ICRT

Les indicateurs du risque ICRT, ou Indices Climatiques du Risque Tardif, sont calculés au fur et à mesure de l'avancement de la saison à partir de données climatiques standards. Les données climatiques sources proviennent de postes agro-climatiques automatiques situés à proximité immédiate de chacun des sites expérimentaux. **Ces indicateurs reflètent l'évolution attendue des symptômes entre les stades de la véraison et de la maturité. Le potentiel de progression par semaine de la maladie est ainsi quantifié avec une capacité d'anticipation d'environ une dizaine de jours.** Deux indicateurs sont calculés plus spécifiquement :

1. ***l'indicateur de fréquence*** renseignant sur le potentiel d'évolution en termes de fréquence de grappes atteintes ;
2. ***l'indicateur de gravité*** renseignant sur le potentiel d'évolution en termes d'intensité d'attaque dans les grappes atteintes.

La Fig. 1 permet de visualiser l'évolution des deux indices, tels que simulés sur le site du Médoc en 2004. Sur cet exemple, la période de la fin août se caractérise par des pics importants indiquant un risque élevé d'apparition et d'intensification des symptômes sur les grappes. En revanche, le retour des indices à des valeurs nulles (voire possiblement très légèrement négatives) aux alentours du 11 septembre renseignent sur le fait qu'aucune évolution notable de la maladie n'est alors attendue.

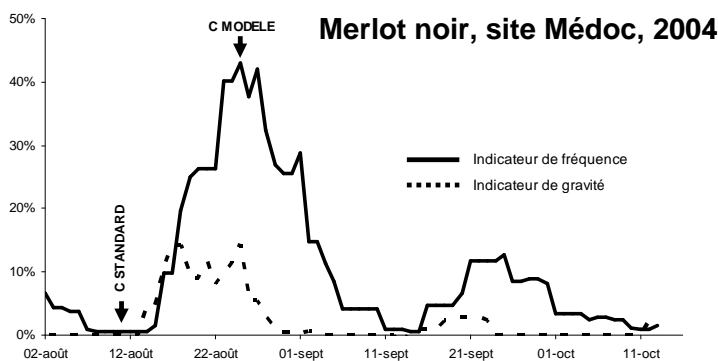


Fig. 1. Exemple d'évolution des 2 indicateurs du risque sur le site «Médoc» en 2004.
Example of evolution of both risk indices calculated at the «Médoc» site in 2004.

Le principe de ces essais a donc été de comparer, en termes d'efficacité de la protection, une application effectuée classiquement à la véraison (« C standard ») avec une application préconisée grâce à une règle de décision élaborée à partir de l'évolution des indices ICRT (« C modèle »).

RESULTATS

TROIS PROFILS EPIDEMIQUES TYPES

Trois profils épidémiques types ont pu être identifiés sur la base des notations régulières de Pourriture grise réalisées dans les parcelles témoins non traitées par des anti-Botrytis.

1. Profil d'attaque sévère : dynamique rapide et précoce

La Fig. 2 montre un profil d'évolution épidémique sévère avec une progression régulière de la Pourriture grise. A la récolte, le taux final de maladie atteint presque 50 %, soit pratiquement, une baie atteinte sur deux en moyenne.

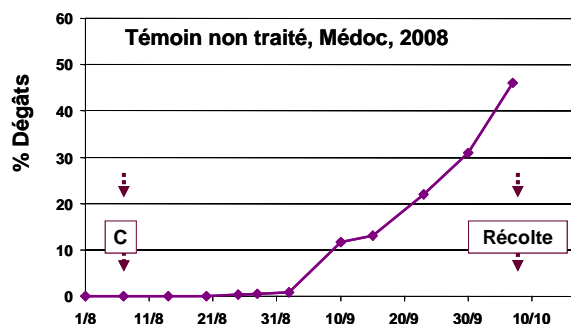


Fig. 2. Intensité globale de Pourriture grise caractéristique d'un «profil d'attaque sévère». Overall disease intensity observed in the vineyard typical of a «severe epidemic pattern».

2. Profil d'attaque limitée : dynamique tardive

Le cas d'une dynamique épidémique limitée a été observé dans les parcelles non traitées, notamment en 2005, suite à une saison assez sèche en général. Les conditions climatiques peuvent donc être la première cause d'un développement épidémique ralenti. Cependant, pour d'autres années, comme en 2006 par exemple (Fig. 3), une sensibilité parcellaire limitée en association avec une date de vendanges relativement précoce peuvent aussi amener à ce type de profil épidémique. Le taux final de maladie avoisine alors environ 10-15%, voire moins, en termes de taux moyen de baies atteintes à la vendange

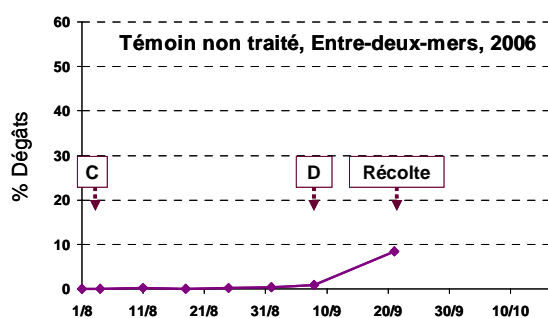


Fig. 3. Intensité globale de Pourriture grise caractéristique d'un «profil d'attaque limité». Overall disease intensity observed in the vineyard typical of a «mild epidemic pattern».

3. Profil d'attaque explosive de fin de saison : dynamique exponentielle

Il s'agit d'un cas extrême observé uniquement en 2006 sur le site du Médoc. Il peut néanmoins être considéré comme représentatif d'années très particulières caractérisées, en fin de saison, par un climat extrêmement pluvieux dans les toutes dernières semaines avant les vendanges. Ainsi, 106 mm de précipitations cumulées ont été enregistrées du 11 au 24 septembre, soit 11 jours pluvieux sur 2 semaines. Le taux final de maladie a alors été multiplié par un facteur 6 passant d'environ 10% à 60% de baies atteintes en moyenne. Il est important de remarquer ici le rôle essentiel joué par la date des vendanges dans la caractérisation du profil épidémique. Il apparaît clairement au vu de cet exemple qu'une date de vendange plus précoce, avancée au 20 septembre par exemple, nous aurait amené à

qualifier le profil épidémique comme limité et tardif. On peut s'en convaincre en comparant les deux profils des deux sites suivis en 2006 (Figs 3 et 4), profils tout à fait similaires jusqu'au 20 septembre.

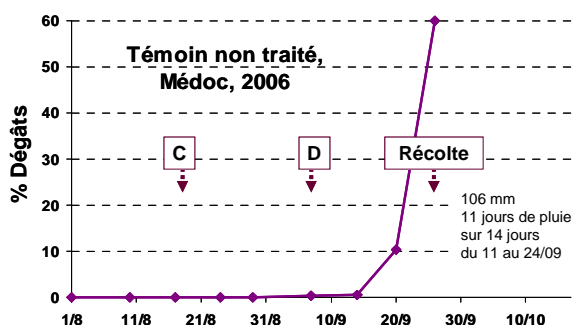


Fig. 4. Intensité globale de Pourriture grise caractéristique d'un «profil d'attaque explosive». Overall disease intensity observed in the vineyard typical of an «explosive epidemic pattern».

4. Récapitulatif des profils types observés selon le site et l'année

Le tableau 1 montre la variété des situations rencontrées au cours des cinq campagnes en termes de profils épidémiques. Les différences constatées entre les sites proviennent pour partie de la sensibilité intrinsèque des parcelles (facteurs agronomiques), mais aussi des conditions climatiques locales et des dates de vendanges qui, pour une même année, pouvaient varier notablement d'un site à l'autre.

Tab. 1. Profil épidémique et intensité globale de maladie à la récolte (témoins non traités). Epidemic pattern and overall disease intensity at harvest (control without any anti-Botrytis).

| SITE/ANNEE | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |
|------------------------|---------------|---------------|-----------------|---|---------------|
| Médoc | Sévère 35% | Limité 10% | Explosif 60% | Non exploité (intensité trop faible) | Sévère 46% |
| Entre-deux-Mers | non testé | Limité 5% | Limité 9% | Sévère 30% | Limité 12% |

EFFICACITES COMPAREES DES STRATEGIES FONGICIDES TESTEES

1. Le profil d'attaque limitée permet d'éviter le traitement de véraison et tout traitement ultérieur

Dans les situations à profil d'attaque limitée et tardive, telles que définies précédemment, les indices de risque ICRT nous ont amené à ne pas recommander ni réaliser le traitement à la véraison. Au vu des indices, le risque restant faible jusqu'au DAR, aucun traitement ultérieur en post-véraison n'a été non plus jugé nécessaire. C'est pourquoi, dans les quatre situations présentant ce profil épidémique, aucune application tardive sur grappes à la véraison ou au delà n'a été mise en œuvre.

Le tableau 2 montre les résultats comparés des stratégies anti-Botrytis à un traitement (« A » ou « C ») ou à deux traitements (« A & C »). **Dans ces situations à profil d'attaque limitée, et conformément à la non-recommandation par nos indices ICRT d'un traitement à partir de la véraison, on observe un niveau final de dégâts compris entre 5 à 12% en absence de tout traitement. Selon le seuil d'acceptabilité des dégâts par le viticulteur, une stratégie à un traitement maximum peut alors s'avérer pertinente.** En effet, une seule application permet de contrôler parfaitement la Pourriture grise à moins de 3% de baies atteintes, ce qui est en dessous du seuil de nuisibilité. Pour rester dans la logique des indices ICRT, et au vu de l'excellente protection apportée par la seule application de la fin floraison, cette seule

application pourrait constituer une stratégie optimale dans un souci de haut niveau d'exigence qualitative de la vendange vis-à-vis de la Pourriture grise.

Tab. 2. Intensités globales de maladie à la vendange pour des « profils d'attaque limitée ». Overall disease intensity at harvest in the case of a «mild epidemic pattern».

Suite à l'ANOVA et au test de Newman-Keuls, les différences significatives ($P = 5\%$) sont comparables au sein de chaque site x année, soit uniquement sur une même ligne.

| | TEMOIN NON TRAITE | C_STAND (FNH) | A (REF A) C_STAND (FNH) | A (FNH) | Indication Décision ICRT |
|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------------|-----------|--|
| Médoc (2005) | 10 a | 1 b | 0.7 b | 0.6 b | Traitement (post)véraison NON préconisé |
| Entre-deux-Mers (2005) | 5 a | 1 bc | 0.2 d | 0.3 d | |
| Entre-deux-Mers (2006) | 9 a | 3 b | 0.7 cd | 0.3 d | |
| Entre-deux-Mers (2008) | 12 a | 3 bcd | 1 d | Non testé | |

2. Les profils d'attaque sévère justifient une stratégie à deux applications

Ces situations épidémiques sont graves puisque les intensités finales de Pourriture grise observées dans les témoins non traités se situent entre 30% et 46% (Tab. 3). Trois situations à profil d'attaque sévère ont pu être analysées ; elles correspondent aux combinaisons « sites_années » : Entre-deux-Mers en 2007 et Médoc en 2004 et 2008. Dans toutes ces situations, les indices de risque ICRT nous ont amené à déclencher un traitement en post-véraison. En adéquation avec le risque modélisé, le traitement a alors été positionné de façon décalée avec un minimum 2 semaines après la mi-véraison (Tab. 3). Ce décalage a atteint au maximum 28 j après mi-véraison. Avec un niveau d'efficacité d'environ 50%, l'application « C-modèle » assure une protection similaire, non significativement différente, de celle de l'application « C standard » de la mi-véraison. Toutefois, en pratique, l'efficacité de cette application unique reste difficilement acceptable pour un viticulteur soucieux de qualité. Les stratégies testées à deux applications incluant une première application à la fin-floraison, permettent d'obtenir un bon contrôle de la maladie y compris en jouant sur la date d'application du traitement C à partir de la véraison. Que celui-ci ait été appliqué à la mi-véraison (« C standard ») ou de façon décalée selon les indices ICRT, l'efficacité n'est alors pas significativement différente lorsque l'on compare les résultats des stratégies à deux applications. En effet, un niveau d'efficacité très satisfaisant, d'environ 80-90%, est ainsi toujours obtenu dans ces conditions expérimentales. La Pourriture grise est alors maîtrisée correctement avec, le plus souvent, un taux de baies atteintes inférieur à 10%.

Tab. 3. Intensités globales de maladie à la vendange pour des « profils d'attaque sévère ». Overall disease intensity at harvest for a «severe epidemic pattern».

Suite à l'ANOVA et au test de Newman-Keuls, les différences significatives ($P = 5\%$) sont comparables au sein de chaque site x année, soit uniquement sur une même ligne.

| | Témoin Non Traité | C_stand (FNH) | C_modèle (FNH) | A (Ref A) C_stand (FNH) | A (Ref A) C_modèle (FNH) | Indication Décision ICRT |
|------------|----------------------|------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Médoc 2004 | 35% a | 22% b | 17% b | Non testé | 4% c | Traitement 14 j après mi-véraison |
| EdM 2007 | 30% a | 14% bc | 16% bc | 2% c | 7% bc | Traitement 28 j après mi-véraison |
| Médoc 2008 | 46% a | 21% b | 23% b | 8% c | 11% bc | Traitement 20 j après mi-véraison |

3. Le profil épidémique explosif : une situation particulière à gérer au cas par cas

Il s'agit d'une situation épidémique particulièrement grave avec une intensité finale de Pourriture grise dans les parcelles témoins non traités qui a atteint 60% de baies botrytisées à la vendange (Tab. 4). Dans cette étude, une telle situation reste exceptionnelle puisqu'elle n'a été rencontrée qu'une seule fois dans le Médoc en 2006 ; c'est donc un cas particulier qui mérite d'être analysé séparément. **En situation explosive de ce type, la stratégie à deux applications A – C_standard n'a présenté que 43% d'efficacité, ce qui n'est pas suffisant en pratique** (intensité finale de 34%).

Tab. 4. Intensités globales de maladie à la vendange pour un « profil d'attaque explosive ». Overall disease intensity at harvest for an « explosive epidemic pattern ».

| | Témoin Non Traité | C_stand (FNH) | D_stand (FNH) | A (Ref A) C_stand (FNH) | A (Ref A) D_stand (FNH) |
|------------|-------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Médoc 2006 | 60% a | 42% bc | 30% cd | 34% bcd | 23% d |

Pour ce qui est de la modélisation, elle n'a pas permis d'anticiper une telle évolution exceptionnelle. Cela s'explique par le fonctionnement même de la modélisation et le calcul des indices. Ces derniers, en effet, se fondent sur des données climatiques déjà enregistrées et non sur des données prévues (comme celles de Météo-France par exemple). C'est pourquoi, les indices ICRT n'ont pas amené à préconiser une application à la véraison ou en post-véraison. Il s'agit donc d'une situation critique à bien des égards, notamment du fait de :

- la difficulté d'anticipation du risque par le modèle dans cette situation exceptionnelle, suite à la prise en compte uniquement de données climatiques enregistrées au jour de la prise de décision ;
- la mise en défaut potentielle d'une stratégie à deux applications de type « A – C_standard », sinon très efficace dans le bordelais

Bien que non préconisée par notre modélisation, cet essai comportait une modalité expérimentale correspondant à une application tardive de type «D» (Tab. 4). Cette application a été réalisée 28 jours après la mi-véraison, soit 19 jours avant vendanges. Elle est compatible avec le DAR du fenhexamid qui est de 15 jours. Cette application a été testée seule ou dans une stratégie à deux applications faisant suite à un traitement « A » de fin floraison (Tab. 4). Il est intéressant de constater que le traitement seul a présenté une efficacité de 50% et que la stratégie à deux applications s'est traduite par une intensité globale de maladie de 23% de baies atteintes *in fine* (efficacité de 62%). Ces niveaux d'efficacité peuvent être considérés comme plutôt satisfaisants dans ce contexte particulier. Cela montre aussi et surtout qu'un décalage dans le temps de l'application de la véraison est une option technique qui peut être d'intérêt dans différents contextes et qui ne perd pas en efficacité même dans une situation épidémique explosive. Enfin, pour un contrôle optimal de la maladie face à ce type de situation exceptionnelle, il semble que d'avancer la date de vendanges constitue aussi une préconisation pertinente.

DISCUSSION

Ces essais pluriannuels montrent que la modélisation fondée sur les indices de risque ICRT constitue un outil d'aide à la décision qui prend en compte effectivement le risque épidémique de Pourriture grise au vignoble. En situation défavorable à la maladie, comme par exemple lors d'une année plutôt sèche, telle 2005, le profil d'attaque est de type « limitée ». Dans ce cas, les indices ICRT ont conduit à ne pas effectuer de traitement à la véraison (« C ») ni aucune autre application plus tardive. Dans ces conditions, nos résultats montrent qu'une stratégie à une seule application, réalisée en particulier à la fin floraison (« A »), permet de contrôler parfaitement la Pourriture grise avec une intensité finale de maladie acceptable à la vendange, car inférieure au seuil de nuisibilité. Cependant, si cette application n'était pas réalisée, le taux final de maladie serait celui du témoin non traité et le viticulteur devrait accepter une intensité de

Pourriture grise de l'ordre de 10% à la vendange. En plus des pertes quantitatives, un tel niveau d'attaque est susceptible d'induire des pertes qualitatives et une dépréciation notable de la qualité organoleptique des vins produits. En effet, différentes expérimentations menées par des organismes de recherche et/ou de développement viti-vinicoles ont pu montrer l'impact négatif d'un taux final d'environ 10% de baies atteintes par la Pourriture grise sur, d'une part, les qualités visuelles et olfactives des vins, notamment *via* la teneur en anthocyanes dans les moûts et les vins ; d'autre part, les qualités gustatives avec modification du profil aromatique des vins. La nuisance de la Pourriture grise est donc avérée dès un seuil relativement bas et qui peut être inférieur à 10% de baies touchées aux vendanges. C'est pourquoi, même dans des conditions de profil épidémique limité tel que défini dans cette étude, il est souhaitable d'avoir recours à des méthodes de protection efficaces vis-à-vis de la Pourriture grise. Une seule application fongicide à la floraison se montre alors d'une efficacité satisfaisante. D'autres méthodes sont aussi envisageables comme les mesures prophylactiques reconnues les plus efficaces, notamment, l'effeuillage, la baisse de vigueur (p. ex. *via* l'enherbement), la maîtrise des tordeuses et/ou le tri sélectif à la vendange.

La seconde partie de cette étude concerne des situations à risque épidémique sévère. Ces situations clairement caractérisées se traduisent par une intensité finale de pourriture grise dans les témoins non traités comprise entre 30 et 46 % de baies atteintes. Dans nos conditions expérimentales, une stratégie fongicide à deux applications spécifiques s'avère alors nécessaire. L'utilisation des indices ICRT permet de justifier la seconde intervention en post-véraison, en lieu et place de l'application « C standard », et d'en préciser le positionnement idéal dans le temps. Ce positionnement s'est avéré très décalé par rapport à la date d'application classique du « C standard », soit avec un délai de 14 à 28 jours après la mi-véraison. Malgré ce décalage, le DAR (délai d'utilisation avant récolte) du fongicide testé a toujours été scrupuleusement respecté. Réalisée seule, cette application décalée s'est avérée d'une efficacité d'environ 50%, donc tout à fait comparable à celle d'une application « C standard » à la véraison. Ce bon niveau d'efficacité est aussi attesté dans des stratégies à deux applications, dont la première est réalisée à la fin-floraison, qui ont montré des efficacités très satisfaisantes et supérieures à 75% dans ces conditions d'épidémies sévères.

En conclusion, on peut avancer que la stratégie développée grâce au modèle et aux indices de risque ICRT présente trois avantages.

* **Le premier intérêt est d'apporter l'assurance d'une stratégie raisonnée adaptée au risque, et ce même en cas de risque épidémique sévère.** Cette approche permet ainsi de se situer résolument dans une démarche visant à optimiser les intrants phytosanitaires au vignoble.

* Le deuxième intérêt réside dans la démonstration qu'un décalage dans le temps du traitement « C », qui est réalisé habituellement à la véraison, n'affecte pas son efficacité. Rappelons que ce décalage peut être important pouvant atteindre presque un mois. L'efficacité élevée du traitement n'est donc pas conditionnée par la réalisation de l'application à un stade précis, début ou mi-véraison en l'occurrence. En s'affranchissant d'un stade d'application précis tout en assurant une protection comparable à celle d'un programme classique, **le modèle apporte donc de la souplesse dans la gestion des applications que les viticulteurs sont nombreux à rechercher.**

* Le troisième avantage, et non des moindres, est aussi une conséquence du décalage possible de l'application en post-véraison. Sur la base, par exemple dans le bordelais, d'une durée d'environ 45 à 50 jours entre la mi-véraison et la récolte, les producteurs sont parfois amenés à renouveler l'application de la véraison, notamment en cas de conditions climatiques fortement dégradées durant la maturation des raisins. Une des craintes alors émises qui peut être à l'origine de cette seconde application tardive est de considérer que l'application de la véraison a été réalisée depuis trop longtemps et que son efficacité a donc du baisser en conséquence. Cette crainte peut ne plus avoir de raison d'être en cas d'application différée, telle que celle préconisée en utilisant les indices ICRT. On peut donc espérer, par ce biais, **éviter certaines applications surnuméraires en fin de saison dont l'efficacité peut être discutable**, notamment lorsque les traitements sont réalisés sur des parcelles exprimant déjà de façon significative des symptômes de Pourriture grise.

BIBLIOGRAPHIE

Fermaud M., Froidefond G., Liminana J.M. & Piéri P., 2002. Indicateurs prévisionnels du risque épidémique de Pourriture grise en fin de saison. *Annales du Colloque Mondiaiviti*, ITV Ed. ,19 rue G^l Foy, 75008, Paris. 94-98.

Fermaud M., Froidefond G., Liminana J.M., Piéri P., Mimiague F., 2003. Indices climatiques du risque de Pourriture grise de la Vigne en fin de saison. *In Œnologie 2003*, Lavoisier Tec & Doc Ed., 56-59.

Fermaud M., Piéri P. & Mimiague F., 2003. Precursory climatic indices of Botrytis rot development in mature grapes. *IOBC/WPRS « Integrated Control in Viticulture »*, C. Lozzia Ed., 26 (8) 63-67.

Fermaud M., Martinez F., Piéri P., Froidefond G., Sauris P. & Delière L., 2003. Pourriture grise de la Vigne : prévision du risque épidémique et protection fongicide. *Phytoma* n° 565, p. 36-40.

Kuck K.H., Krüger B.W., Rosslénbroich H.J., and Brandes W., 1997. KBR 2738 - nouveau fongicide de la famille des hydroxyanilides, actif sur *Botrytis cinerea* et *Monilia spp.* *ANPP - Cinquième Conférence internationale sur les maladies des Plantes*, Tours 3-5 Déc.

Suty A., Pontzen R., Stenzel K., 1997. KBR 2738: Mode d'action et sensibilité de *Botrytis cinerea*. *ANPP - Cinquième Conférence internationale sur les maladies des Plantes*, Tours 3-5 Déc.

**SIPPOM-WOSR, SIMULATOR FOR INTEGRATED PATHOGEN POPULATION
MANAGEMENT: UN OUTIL D'AIDE A LA CONCEPTION ET A L'EVALUATION DE
STRATEGIES DURABLES DE CONTROLE DU PHOMA SUR COLZA D'HIVER A
L'ECHELLE REGIONALE**

LÔ-PELZER E⁽¹⁾, BOILLOT M⁽²⁾, AUBERTOT JN⁽³⁾, BOUSSET L⁽⁴⁾, JEUFFROY MH⁽¹⁾, PINOCHET X⁽²⁾

⁽¹⁾ INRA-AGROPARISTECH, UMR211 AGRONOMIE, UMT PIVERT, 78850 THIVERVAL-GRIGNON,
FRANCE

⁽²⁾ CETIOM, UMT PIVERT, 78850 THIVERVAL-GRIGNON, FRANCE

⁽³⁾ INRA, UMR 1248 AGIR, 31320 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

⁽⁴⁾ INRA-AGROCAMPUS OUEST, UMR1099 BiO3P, 35653 LE RHEU, FRANCE

RÉSUMÉ

Le phoma est un agent pathogène majeur du colza. L'efficacité d'une nouvelle résistance spécifique est très élevée mais souvent peu durable. La combinaison de moyens de lutte dans le temps et dans l'espace peut aider au contrôle du phoma et au maintien dans le temps de l'efficacité des résistances spécifiques. Un modèle a été développé pour évaluer les performances de systèmes de cultures répartis dans l'espace. SIPPOM-WOSR comporte 5 sous-modèles. Parmi les sorties figure la structure génétique des populations du pathogène. L'évaluation de chaque sous-modèle révèle une bonne qualité prédictive. La comparaison entre les données observées et simulées sur la période de contournement de la résistance Rlm1 dans la région Centre est satisfaisante. D'autres simulations ont été conduites sur la période 2004-08. Les résultats montrent que le calcul de l'indice de sévérité doit être revu pour améliorer la qualité prédictive de SIPPOM.

Mots-clés : *Leptosphaeria maculans*; *Brassica napus*; contrôle cultural I; conduite intégrée des cultures; durabilité des résistances.

SUMMARY

**SIPPOM-WOSR, SIMULATOR FOR INTEGRATED PATHOGEN POPULATION
MANAGEMENT: A TOOL TO HELP DESIGN AND EVALUATE SUSTAINABLE
STRATEGIES TO CONTROL PHOMA STEM CANKER ON WOSR AT THE REGIONAL
SCALE**

Phoma stem canker, is a major disease of oilseed rape. New specific resistances are really efficient but may lack durability. Combining control methods at the multiple-years and regional scales could help contain phoma stem canker and preserve the efficiency of specific resistances. A model has been developed to evaluate the agronomic, economic and environmental performances of spatially distributed cropping systems: SIPPOM-WOSR consists of 5 sub-models. The output variables include the genetic structure of pathogen populations. The evaluation of each submodel revealed correct predictive quality. A comparison between simulated and observed data during the loss of efficacy period of the Rlm1 specific resistance gene in the Centre of France was satisfactory. Further simulations were carried out on the 2004-2008 period. Results showed that the disease index calculation should be adjusted to improve SIPPOM's predictive quality.

Key words: *Leptosphaeria maculans*; *Brassica napus*; Cultural control; Integrated Crop Management; Resistance Durability.

INTRODUCTION

Le Phoma est un agent pathogène du colza d'importance majeure à l'échelle mondiale. L'utilisation de génotypes résistants est le moyen de contrôle le plus efficace. Les variétés de colza ont deux types de résistance au phoma, spécifique ou quantitative. Néanmoins, les résistances spécifiques peuvent être plus facilement contournées. Pour améliorer la durabilité de l'efficacité des résistances spécifiques, la gestion intégrée de l'avirulence (Integrated Avirulence Management, Aubertot et al., 2006) consiste à limiter la pression de sélection exercée sur la population pathogène et à réduire sa taille. D'une part, il est nécessaire de raisonner le déploiement dans le temps et dans l'espace de la résistance. D'autre part, la réduction de la population pathogène peut être obtenue en combinant d'autres moyens de lutte contre la maladie. L'application d'un fongicide peut réduire les infections primaires. Les pratiques culturales telles que le choix de la densité de semis ou l'apport d'azote organique modifient les surfaces foliaires recevant les ascospores et peuvent augmenter le risque et l'intensité de l'infection. Après la récolte, un travail du sol peut réduire la quantité d'inoculum primaire par enfouissement des pailles évitant ainsi le développement des périthèces et l'émission des spores. Le contrôle de la maladie peut aussi être amélioré en limitant les échanges de spores entre parcelles en jouant sur la répartition spatiale des parcelles de colza dans le paysage. Compte tenu de l'ensemble des techniques et des échelles à prendre en compte pour optimiser le contrôle du Phoma, il n'est pas possible de tester des stratégies de contrôle par les moyens de l'expérimentation classique.

Notre objectif est de développer un modèle (SIPPOM-WOSR, a Simulator for Integrated Pathogen Population Management to manage phoma stem canker on Winter OilSeed Rape), pour évaluer des stratégies combinant les méthodes génétiques, culturales et chimiques de contrôle, à l'échelle d'une zone géographique plus large que la parcelle ou l'exploitation agricole, et sur une période de plusieurs années. Les stratégies testées cherchent à minimiser l'impact du Phoma et à préserver l'efficacité des résistances spécifiques, tout en assurant à l'agriculteur un profit économique et la satisfaction des règles environnementales en vigueur.

MATERIEL ET MÉTHODE

Conception de SIPPOM

Le modèle a été construit à partir de sous modèles existants qui ont été adaptés pour être introduits dans SIPPOM. C'est le cas de SimCanker pour simuler l'infection et les pertes de rendement qui en découlent, d'Anthracnose Tracer pour simuler la dispersion des ascospores (Diggle et al. 2002) ou d'Azodyn-colza pour décrire la croissance du colza (Jeuffroy et al. 2003). Des sous modèles ont été créés, sur la base de données expérimentales comme le sous modèle génétique (simulation de l'effet des résistances spécifiques et quantitatives sur l'infection et l'évolution de la population pathogène, de même que la recombinaison lors de la reproduction sexuée du champignon, et pour l'effet Allee), ainsi que le sous modèle prédisant le rendement accessible.

Analyse de sensibilité et évaluation de SIPPOM

Une analyse de sensibilité a été conduite pour étudier la sensibilité de chaque sous modèle à la variation des paramètres pour une large gamme de situations de production (climats*conduites). Les variations quantitatives des données de sortie ont été analysées, ainsi que la stabilité du classement des situations testées, pour des variations des paramètres.

Chaque sous modèle a été évalué indépendamment, en utilisant un jeu de données différent de celui utilisé pour la détermination des paramètres, ou par validation croisée. Les comparaisons entre observations et simulations ont été faites pour deux situations réelles. Le contournement de la résistance spécifique Rlm1 a été observé dans la région Centre (de 1994 à 2000; Rouxel et al. 2003), et a été simulé avec SIPPOM pour une petite région de 16 km². Les rotations et les pratiques habituelles (issues d'enquêtes chez les agriculteurs dans la zone et pour la période) ont été introduites dans SIPPOM pour comparer les évolutions des fréquences de pathotypes réelles et simulées. De même, les valeurs simulées et

observées des indices de gravité G2 et des rendements grains ont été comparées à l'échelle de la parcelle et pour la période 2004-2008. Les pratiques culturales, les indices de gravité G2 et les échantillons pour déterminer les virulences ont été collectés pour cette période sur la zone de travail de 16 km² où des nouvelles variétés portant le gène de résistance spécifique Rlm7 avaient été introduites.

Simulations

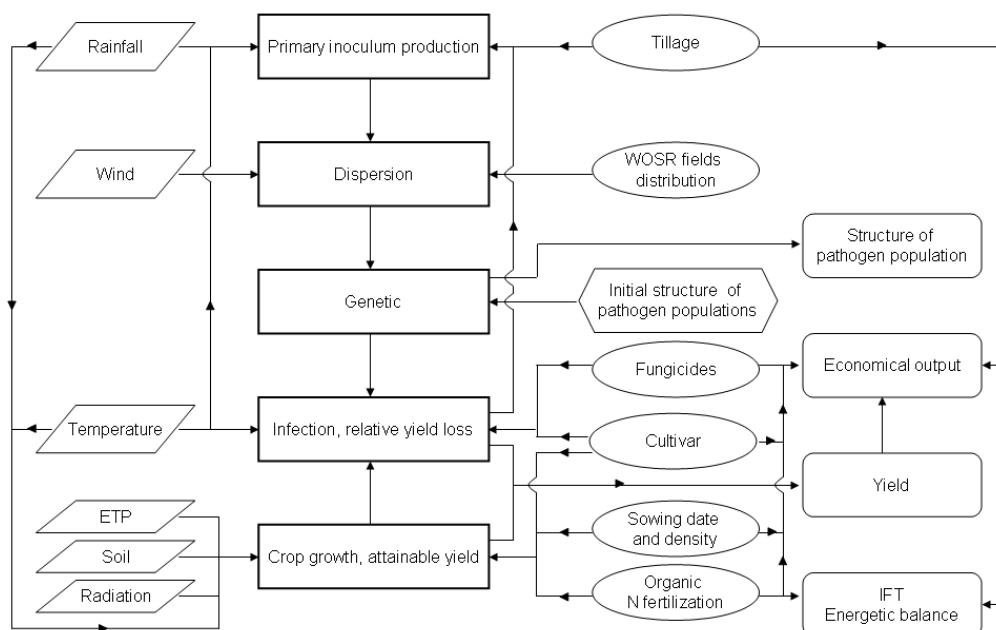
Des simulations ont été réalisées pour mettre en évidence les potentialités et les limites d'utilisation de SIPPOM. Le premier jeu de simulations a porté sur un paysage simplifié de 3 km * 3 km comportant 144 parcelles avec systématiquement une rotation Colza-Blé-Orge. Deux types de conduite ont été testés : l'une dite « intégrée » visant à limiter le développement de la maladie (labour, semis précoce et faible densité de semis), et l'autre dénommée « intensive », visant à maximiser le niveau de rendement tout en limitant le travail du sol (travail du sol simplifié, densité plus forte et une application fongicide contre le phoma à l'automne). Quatre variétés de colza d'hiver ont été utilisées dans les simulations : une avec résistance spécifique, une avec une résistance quantitative, une cumulant les deux types de résistance et la dernière sensible au pathogène. Huit stratégies combinant les deux types de conduite et les quatre variétés ont été testées.

RESULTATS

STRUCTURE DE SIPPOM

SIPPOM est composé de cinq sous-modèles (Figure 1) calculant i) la production d'inoculum primaire à la surface du sol après travail du sol, ii) la dispersion des ascospores dans le paysage (le modèle étant spatialement explicite), iii) la croissance du couvert et le rendement potentiel, iv) l'évolution de la structure génétique des populations pathogènes, et v) l'infection et pertes relatives de rendement.

Figure 1: Schéma de fonctionnement de SIPPOM-colza. Les carrés représentent les sous modèles. Flow chart of SIPPOM-WOSR. Sub-models are represented in squares.



Les variables d'entrée de sol et de climat sont au niveau des losanges (Figure n°1), celles relatives aux variables d'entrée techniques dans les ovales. Les variables de sorties sont

l'indice de sévérité G2 et les pertes de rendement associées, le rendement obtenu, la marge brute, le coût énergétique des pratiques culturales et l'indice de fréquence de traitements. Il détermine également la structure génétique des populations du pathogène en prenant en compte quatre forces évolutives : la migration, la sélection, la recombinaison. A droite figurent les variables de sorties (carrés arrondis). La structure génétique des populations pathogènes doit être initialisée. Elle est ensuite calculée chaque année, avant de devenir une variable de sortie en fin de simulation. La quantité d'inoculum dépend aussi de la sévérité des symptômes l'année précédente (Lô-Pelzer et al. 2008).

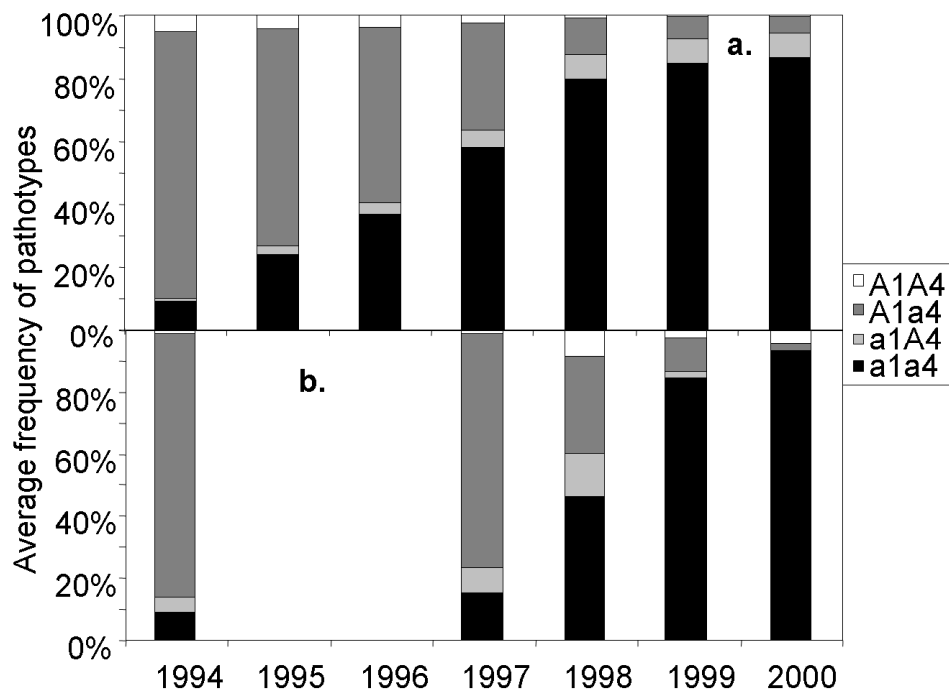
Analyse de sensibilité et évaluation de SIPPOM

L'analyse de sensibilité montre de fortes variations des variables de sortie quand les paramètres varient. Néanmoins, malgré ces variations, le classement des situations étudiées reste stable. Il est même en accord avec les attentes des experts consultés, ce qui signifie qu'il est fiable pour classer des stratégies de protection intégrée.

L'évaluation de chaque sous modèle montre une qualité prédictive correcte. La simulation de l'évolution des fréquences des pathotypes est en accord avec les valeurs observées (Figure 2), même si l'augmentation des pathotypes virulents est un peu plus rapide dans la simulation. Ces résultats soulignent l'intérêt qu'il y aurait à introduire un coût lié à la virulence dans SIPPOM. Dans les valeurs observées, les pathotypes avec le gène d'avirulence Avrlm4 persistent, ce qui semble être dû à une plus grande valeur adaptative (Huang et al., 2006), non prise en compte actuellement dans le modèle.

Figure 2. Evolution des fréquences de pathotypes associées avec les gènes de résistance spécifique Rlm1 et Rlm4, consécutivement à l'introduction du gène de résistance spécifique Rlm1. Comparaison entre simulé (a.) et observé (b.) fréquences. A: pathotype avec le gène d'avirulence concerné, a: pathotype sans le gène d'avirulence concerné.

Evolution of the frequencies of the pathotypes associated with the resistance genes Rlm1 and Rlm4, following the introduction of the specific resistant gene Rlm1. Comparison between simulated (a.) and observed (b.) frequencies. A: pathotype with the considered avirulence gene, a: pathotype without the considered avirulence gene.



La comparaison entre les valeurs de note G2 simulées et observées lors de la seconde série de simulation réelle (2004-2008) montre une mauvaise prédiction (RMSE = 3.1) avec une surestimation de la note G2 (Biais = 2.4).

L'évaluation de l'ensemble du modèle est difficile compte tenu des échelles de temps et d'espace couvertes ainsi que du nombre de variables d'entrée et de variables intermédiaires. Les comparaisons présentées ne sont pas des évaluations de la qualité prédictive du modèle *sensu stricto*. Elles permettent d'examiner le comportement général de SIPPOM pour des situations réalistes, et montrent que l'évolution de la population pathogène est correctement prédite. Cependant SIPPOM nécessite des améliorations, par exemple pour le calcul de la note G2.

Simulations

Les simulations sur paysages simplifiés montrent que SIPPOM est capable de représenter les effets des conduites culturales et des différents types de variétés, ainsi que leurs combinaisons et leurs répartitions dans l'espace sur la gravité de la maladie et sur les évolutions des profils de virulence des populations. Cela démontre que la mise en œuvre des principes de la production intégrée permet d'accroître la durabilité de résistances spécifiques en limitant la taille des populations du pathogène sur les parcelles de colza utilisant une variété à résistance spécifique. Cet aspect pourra être exploré plus complètement avec SIPPOM ultérieurement.

Figure 3. Simulation associant une conduite intégrée limitant la taille de la population du pathogène (avec labour), et des parcelles de colza avec une variété comportant une résistance spécifique:

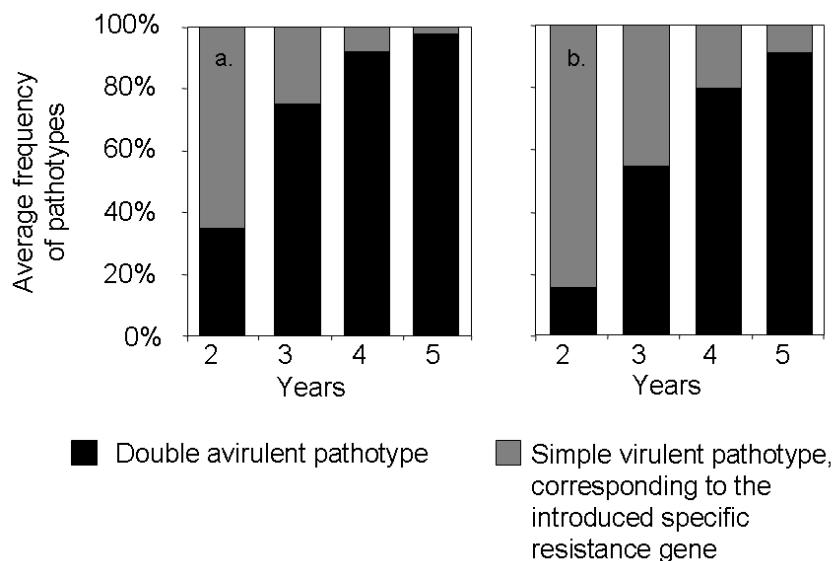
a. 50 % des parcelles de colza avec une variété comportant une résistance spécifique et 50% des parcelles avec une variété sensible en conduite intégrée.

b. 50 % des parcelles de colza avec une variété comportant une résistance spécifique en conduite intégrée et 50 % des parcelles de colza avec une variété sensible en conduite intensive. Proportion de colza dans un paysage de 9 km² avec une rotation colza-blé-orge.

Simulation of the association of an integrated crop management, limiting the pathogen population size (ploughing), to the WOSR fields with the specific resistant cultivar.

a. 50 % of WOSR fields with a specific resistant cultivar, 50 % of WOSR fields with a susceptible cultivar, integrated crop management, b. 50 % of WOSR fields with a specific resistant cultivar associated with the integrated crop management, 50 % of WOSR fields with a susceptible cultivar associated with the intensive crop management.

Proportion of winter oilseed rape fields in a 9 km² landscape with WOSR-Wheat-Barley rotation



Les simulations soulignent également les améliorations nécessaires à apporter au modèle pour la relation entre le nombre d'ascospores, le nombre de macules foliaires et la note G2 induite. Ceci nécessitera des expérimentations supplémentaires.

CONCLUSION

Malgré les améliorations à apporter au modèle pour améliorer la qualité des simulations, l'analyse de sensibilité a montré que SIPPOM pouvait être utilisé pour tester des stratégies de gestion intégrée du phoma. Les simulations permettent également d'obtenir des résultats que l'on ne peut pas acquérir autrement qu'avec ce type d'outil. Après avoir réalisé les améliorations nécessaires, des simulations, sur des paysages réalistes, seront conduites, de façon à étudier et à classer différentes stratégies de gestion permettant de réduire le risque de maladie et de limiter le risque de perte d'efficacité de nouvelles résistances spécifiques.

REMERCIEMENTS

La thèse d'E. Lô-Pelzer et le stage d'apprentissage de M. Boillot ont été financés par le CETIOM. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet CASDAR financé par le ministère de l'agriculture et de la pêche. Le développement du modèle SIPPOM a bénéficié d'un soutien financier du projet ANR-ADD CEDRE.

BIBLIOGRAPHIE

- Aubertot, J.N., Pinochet, X., Reau, R., Doré, T., 2004. SimCanker: a simulation model for containing phoma stem canker of oilseed rape through cultural practices. Proceedings of the 4th international crop science congress. Brisbane, Australia.
- Aubertot, J.N., West, J.S., Bousset-Vaslin, L., Salam, M.U., Barbetti, M.J. & Diggle, A.J. 2006. Improved Resistance Management for Durable Disease Control: A Case Study of Phoma Stem Canker of Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 91-106.
- Diggle, A.J., Salam, M.U., Thomas, G.J., Yang, H.A., O'Connell, M., Sweetingham, M.W., 2002. AnthracnoseTracer: a spatiotemporal model for simulating the spread of anthracnose in a lupin field. *Phytopathol.* 92, 1110-1121.
- Huang, Y.J., Li, Z.Q., Evans, N., Rouxel, T., Fitt, B.D.L., Balesdent, M.H., 2006. Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 77-89.
- Jeuffroy, M.H., Valantin-Morison, M., Saulas, L., Champolivier, L., 2003. Azodyn-Rape: a simple model for decision support in rapeseed nitrogen fertilisation. Proceeding of the 11th international rapeseed congress, Copenhagen Denmark.
- Lô-Pelzer, E., Aubertot, J.N., David, O., Jeuffroy, M.H. & Bousset, L. 2008. Relationship between the severity of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*/L *biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. *Plant. Pathol.* in press
- Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., Schmit, J., Balesdent, M.H. 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 871-881.

**9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT DISEASES
TOURS – FRANCE - 8 AND 9 DECEMBER 2009**

**GPM-CAST: AN EARLY WARNING COMPUTERIZED MODEL FOR GRAPES POWDERY
MILDEW IN EGYPT**

AFIFI, M.A. AND SAHAR, A.M. ZAYAN

Early Warning Unit, Plant Pathology Research Institute, Agricultural Research Center, Egypt

SUMMARY

Powdery mildew caused by *Uncinula necator* (Schw.) Burr., is considered one of the most damaging diseases that can result in complete loss of the crop and it poses a major threat to the Egyptian's grape production. The first Egyptian early warning computerized model named by the author GPM-CAST, is an integral linking system based on short-term observations over several grapes growing seasons. It analyzes real time, 24 hour microclimate data collected automatically by an advanced Agro-weather station (Adcon Telemetry A733). GPM-CAST was designed and validated under both computers Lab. and field conditions to forecast the grapes powdery mildew daily infection potential. Subsequently, it was evaluated as an advisory system to reduce fungicide cost compared with the fundamental applications during 2007 and 2008. The basic roles of system analysis for model validation and evaluation are discussed.

Keywords: Grape powdery mildew, *Uncinula necator*, GPM-CAST, system analysis, early warning computerized model and daily disease infection potential (DDIP).

RÉSUMÉ

**GPM-CAST : UN SIGNE AVANT-COUREUR LE MODELE INFORMATISE POUR LES
RAISINS LA MOISSURE POUDREUSE EN EGYPT**

L'oïdium causé par *Uncinula necator* (Schw.) Burr.; est considéré comme l'une des maladies les plus dommageables pouvant entraîner la perte complète de la récolte et constitue une menace importante pour la production égyptienne de raisins de table. Le premier modèle égyptien d'avertissement appelé par l'auteur GPM-CAST est un système intégrateur basé sur des observations réalisées au cours de plusieurs saisons de production. Il analyse en temps réel, les données climatiques journalières recueillies automatiquement par une station Agro-météorologique avancée (Telemetry A733). GPM-CAST a été conçu sur ordinateur pour prévoir le potentiel d'infection journalier de l'oïdium et validé dans les conditions de terrain. Par la suite, il a été évalué en 2007 et 2008 comme système de décision des traitements fongicides afin d'en réduire le nombre comparé à un calendrier d'applications. . L'analyse du système pour la validation du modèle et son évaluation sont discutés.

Mots-clés : Oïdium de la vigne, *Uncinula necator*, GPM-CAST, analyse de système, modèle de prévision et potentiel d'infection quotidien (DDIP).

INTRODUCTION

Grape (*Vitis Vinifera*) is considered the most popular fruits to the Egyptians after Citrus. Egypt has recently begun producing table grapes for export, chiefly along the Agricultural Desert Road linking Cairo and Alexandria. It has an exportation importance specially the early mature seedless varieties so grapes have an economically important for national income. The area of the vineyards has increased rapidly through the last few years and reached about 210,005 feddans (according to the statistics book of Ministry of Agriculture and Land Reclamation, 2008). Grape cultivation throughout the world and also in Egypt is affected by various disease problems. Powdery mildew caused by the fungus *Uncinula necator* (Schw.) Burr; which was renamed *Erysiphe necator* Schw. and sited into the section *Uncinula* of the genus (Miazzi *et al.*, 2003), is one of the most ubiquitously damaging disease of grapevines worldwide it is prevalent, where temperature is relatively high and moisture occurs as heavy dews rather than heavy rains, reducing yield, vine growth and vigor, and fruit quality.. In other meaning powdery mildew poses a major disease threat to grape growers (Seem & Gadoury, 1995; Gadoury *et al.*, 2001 and Rumbolz & Gubler, 2005). In Egypt *Uncinula necator* was found on different varieties of grapevines causing considerable losses in crop yield. The intensive management of high value crops such as grapes has relied increasingly in recent years on synthetic pesticide to sustain production. The negligent use of chemicals can cause diseases for humans, environmental disasters and pollution. The international concern about environmental and human health risks, due to pesticide overuse, raises the necessity of production of food free from chemical substances. There are many noteworthy efforts to improve sustainability and environmental stewardship among grape powdery mildew management. In the early 1990s, plant pathologists worldwide began to develop powdery mildew growth models that could provide growers with forecasts or early warning advisory system and help them foresee outbreaks in order to time more precisely their preventative powdery mildew treatments (Sall, 1980; Kast, 1994; Gadoury *et al.*, 1994; Seem & Gadoury, 1996; Gubler *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2002 and Austin *et al.*, 2006). If effective, these early warning systems would identify periods when conditions are favorable for disease development, and schedule fungicide applications when needed for perfect control of grape powdery mildew (Moyer *et al.*, 2007, 2008).The computerized early warning model simulates the development of grape powdery mildew on the basis of short-term observation of microclimatic factors. The inputs variables to the model are: temperature, RH, precipitation, wind speed, global radiation and leaf wetness for the primary disease infection potential (PDI) and the secondary daily disease infection potential (DDIP). The goal of this investigation was to evaluate and to facilitate validation of GPM-Cast, the first Egyptian computerized early warning model, to allow direct use of the model in an experimental vineyard over two successive grape-growing years in Egypt. To detect the optimal time for the first spray and lead the fungicides application for perfect disease control compared with standard fungicide schedule, for each year of testing. Finally, to establish an advisory system for grapes powdery mildew early warning model in Egypt.

MATERIALS AND METHODS

Weather monitoring:

Automated, portable and solar powered weather stations (Adcon Telemetry A733) (Fig.1) were used to monitor the microclimatological conditions in the crop. High technology, sensitive sensors transmitted the digital data up to 20 km in distance, on average every 15 minutes, via a personal computer using radio waves. In this way, data on temperature, relative humidity, wind speed, leaf wetness, precipitation and global radiation were collected from grapevine orchards canopy. The station is equipped with central base station (Fig.2) which served as a: data collection center (receiver) to receive and save the collected data up to 50 days and to run advantage software which allowed simple interpretation of the readings using a graph and detailed list of chosen items.

Grapes powdery mildew early warning model:

A computerized simulation model named by the author GPM-CAST,(Fig.3) was designed and tested several times under laboratory conditions before switching to the validation experimental phase conducted at Nobarria (Behera Governorate) throughout both 2007 and 2008 vineyard growing seasons. This allowed us to figure out how well such a model predicted disease incidence and facilitated revision and refinement of the model based on these findings. Frequently, disease control (timing of sprays) of grapes treated according to the model recommendations were compared to disease managed by traditional routine spray schedules.

The model system analysis

GPM-CAST model, presented as a flowchart (Fig.4) is a creation and designation of a computerized model, based on short-term observations (hourly weather data) analyzing the correlation between the input variables of microclimatological factors such as: temperature, relative humidity, leaf wetness, global radiation and wind speed. The model uses these factors to calculate the actual time of primary disease infection potential (PDIP) and secondary daily disease infection potential (SDIP) of grapes powdery mildew causal agent *Uncinula necator*. Then, the model outputs a daily announcement as a warning message (spray or don't spray) to guide the fungicides application for perfect disease control in the appropriate time. The model evaluation follows the basic rules of system analysis to identify events (A and B). The model is activated at pre-budding phase, and tries to detect the event A, which is defined as: Event A is triggered when the model detects at least X accumulated dynamic summation hours of RH between 50 – 90 % and temperature between Y and Z according to the data tabulated in (Table 1). Then the model looks for event B which is continues hours of RH>75%, and / or leaf wetness > 50 U. Moreover, using the model system analysis brings an extension to the model, that applies the same rules not only to identify the first critical phase of the season (correct time for primary infection), but also to issue warnings for Secondary disease infection potential (SDIP) throughout the whole growing season.

Table I - The basic rules of system analysis to identify events A.

(Les règles fondamentales d'analyse de système pour identifier les événements A.)

| Y = Temp from: | Z = Temp to: | X = 8 hours of RH | X = 10 hours of RH | X = 12 hours of RH |
|----------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 22 °C | 25 °C | Event A detected | | |
| 19 °C | 21 °C | | Event A detected | |
| 15 °C | 18 °C | | | Event A detected |

Model validation

Field experiments were conducted in large plots at Nobarria (Behera Governorate) throughout April, May and June of the 2007 and 2008 grape-growing seasons. A commercial vineyard, of King Ruby and Roumy Ahmer (planted in 1995) was used. Both cultivars are susceptible to powdery mildew. Spacing was 3 m between rows and 2.1 m between individual vines. The experimental units consisted of single vines, each separated by an untreated vine and arranged in a randomized complete block design. In both years, the following two treatments were tested: (i) a full-schedule fungicide program, in which plants were sprayed every 10 to 14 days; and (ii) spraying when the advisory system of early warning model GPM-CAST indicated that a spray application was needed and at least 14 days had elapsed since the previous fungicide application. Generally, Sumi-8 50% (35 cm / 100L water) in alternate with Topsin M 70% (80 g / 100 L water) are considered effective for controlling powdery mildew, and this was used with both the advisory - system treatment and the full-schedule program. Vineyards were carefully inspected at least once a week to point out the time of appearance of disease symptoms. The effect of each treatment was evaluated by the incidence and severity of powdery mildew. Severity was determined on a 0 to 5 scale, with 0 indicating healthy fruit and 1 to 5 indicating berry surfaces covered with powdery mildew as follows: 1 = 1 to 20%, 2 = 21 to 40%, 3 = 41 to 60%, 4 = 61 to 80% and 5 = 81 to 100. Disease incidence and severity was determined twice per season, according to Townsed & Heuberger (1943). Data were measured by automatic weather stations (Adcon Telemetry A733), installed within the vineyards.

RESULTS

It was obvious in this study that the application of a designed early warning computerized model named by the author GPM-CAST for grape powdery mildew which was adopted with the role of system analysis has been evaluated successfully for the first time in Egypt. Results presented in (Fig.5) and (Fig.6) showed that the GPM-CAST model has accurately determined the correct time for the first application (PDIP) in 25th and 28th of April 2007 and 2008 respectively. The model output daily announcement also successfully detected the secondary disease infection potential (DDIP) in 5th, 11th, 23rd and 8th, 14th, 26th of May 2007 and 2008 respectively. Meanwhile, the (DDIP) announce was in 1st and 14th, 21st June 2007 and 2008 respectively. Therefore, three sprays were applied in each season of evaluation according to the

recommendation of GPM-Cast warning system, instead of six sprays in 2007 and eight sprays in 2008 following a full-schedule fungicide program (routine application), with a reduction percentage of chemical applications by 50% and 62.5% in 2007 and 2008 respectively. Moreover both of the experimental treatments successfully control powdery mildew in 2007 and 2008 grape successive growing seasons.

Figure1- Automated in crop weather station (Adcon A733).
(Station météorologique automatique (Adcon A733) placée dans la culture)

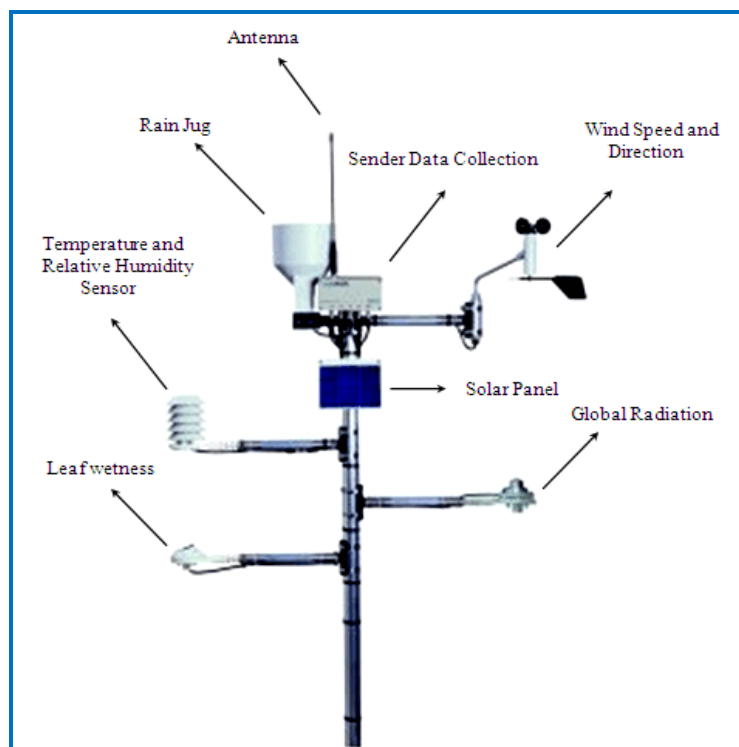


Figure 2 - the base station (Receiver, PC, and Advantage Software). Data is instantly plotted for easy examination of weather data. Time line indicates values where it intersects data lines.

Enregistrements des données (récepteur, ordinateur et Logiciel Advantage) : les données sont immédiatement affichées pour faciliter leur examen.

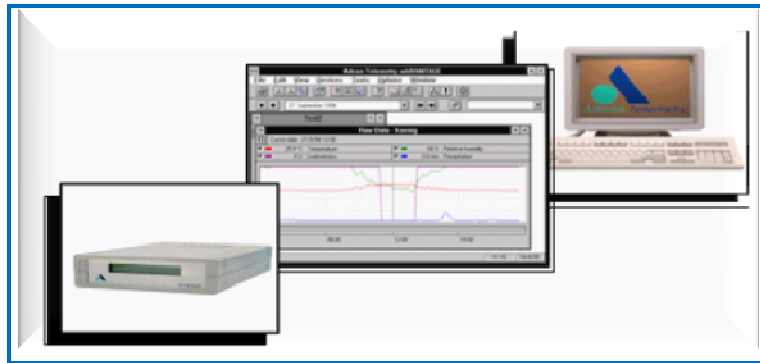


Figure 3 -GPM-Cast model`s interface for grapes powdery mildew in Egypt

(Interface du modèle GPM-CAST pour l'oïdium du raisin en Egypte.

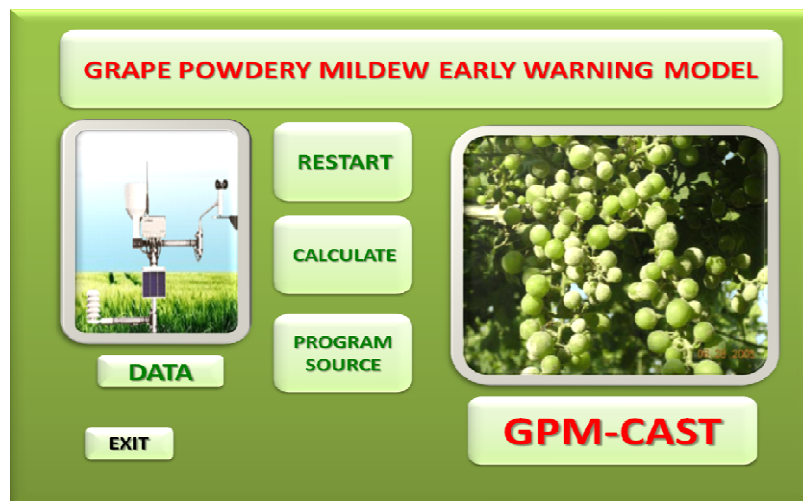


Figure 4 - Flowchart of GPM-Cast model's system analysis for grape powdery mildew in Egypt.

(Logigramme du système d'analyse du modèle GPM-CAST pour l'oïdium du raisin en Egypte).

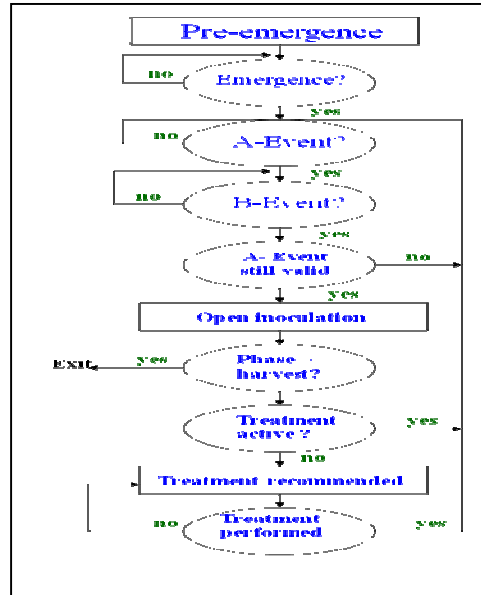
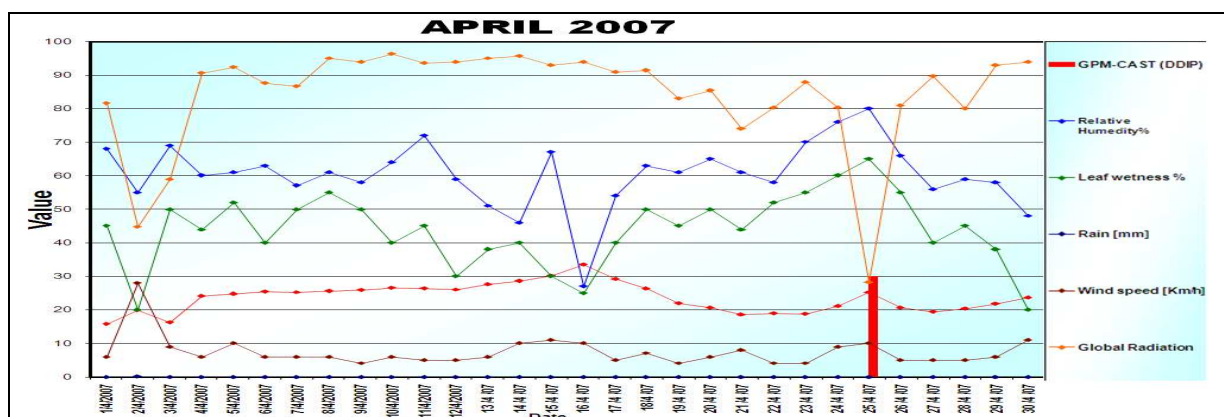


Figure 5 - The daily microclimatological factors (GPM-CAST model input variables) during April, May and June of 2007 grape-growing seasons indicate the early warning system spray recommendations.

(Facteurs microclimatologiques journaliers (variables d'entrée du modèle GPM-CAST) enregistrés durant la période de croissance du raisin, d'avril à juin 2007 et dates d'avertissement indiquées par le modèle)



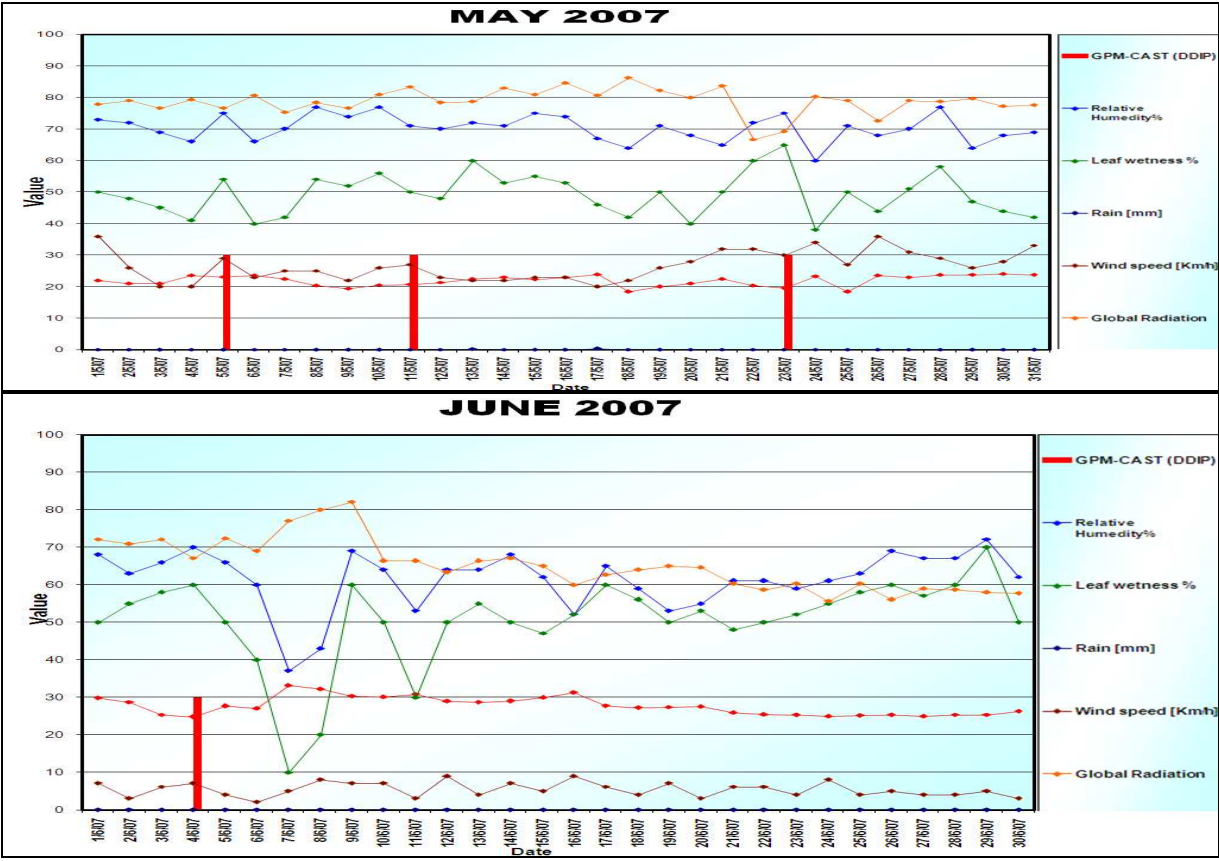
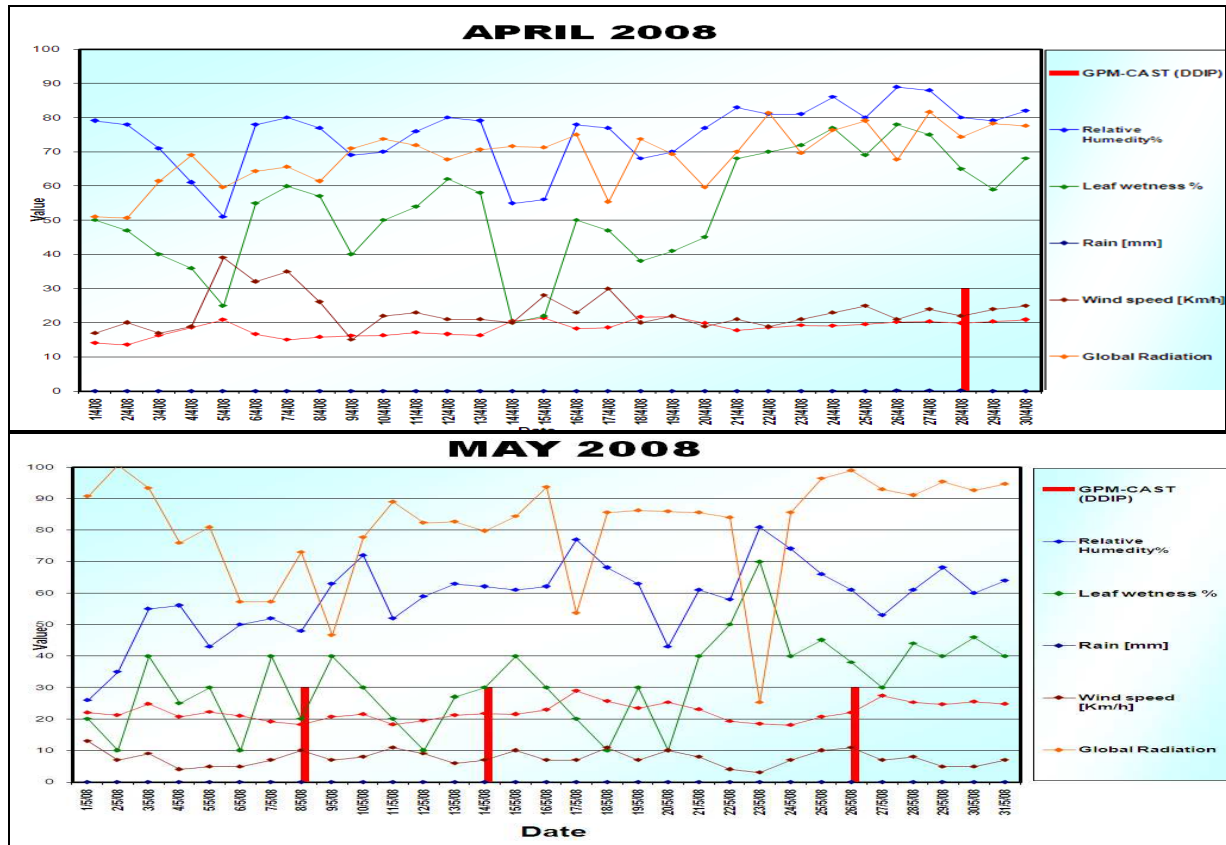
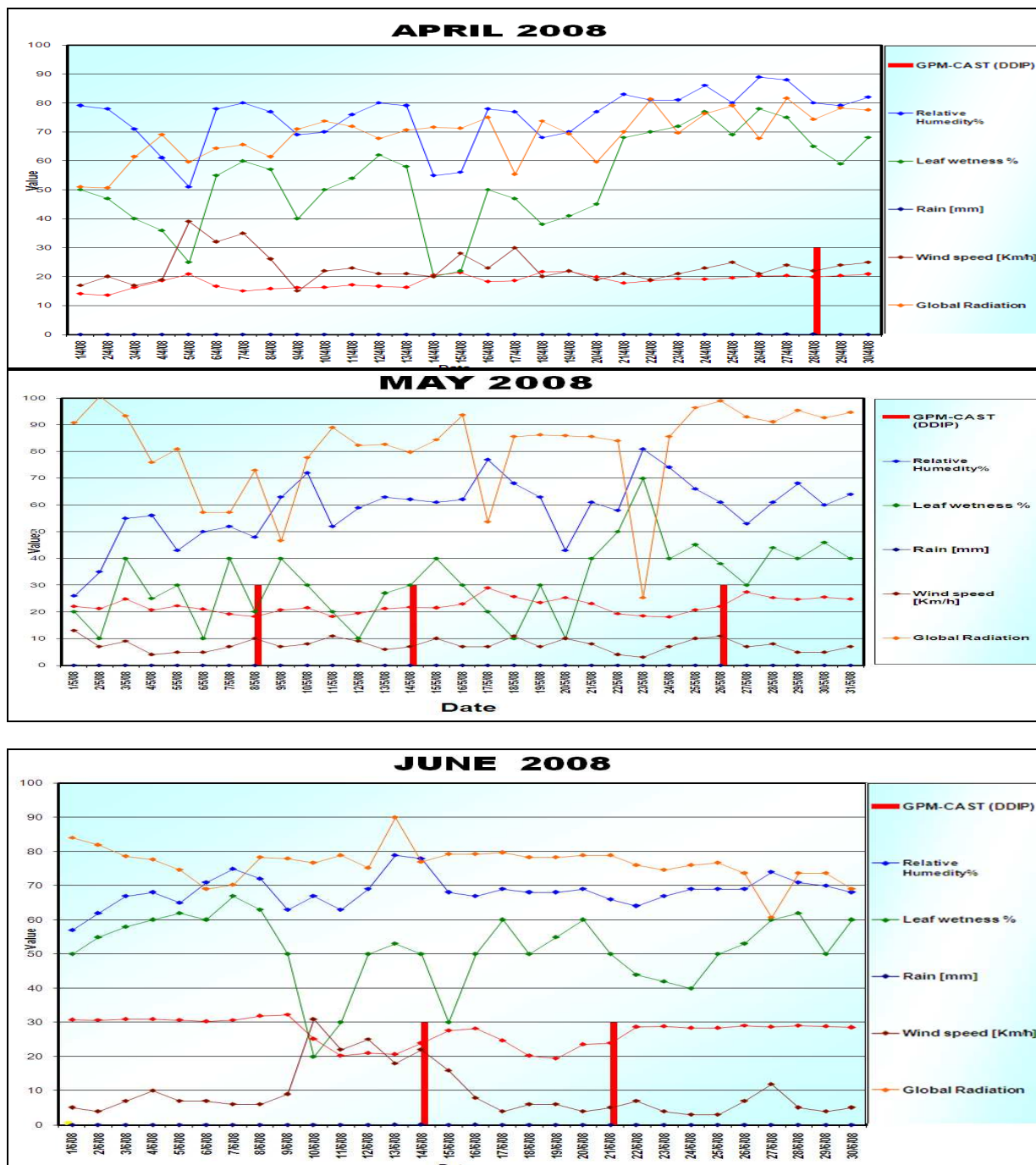


Figure 6 - The daily microclimatological factors (GPM-CAST model input variables) during April, May and June of 2008 grape-growing seasons indicate the early warning system spray recommendations.

(Facteurs microclimatologiques journaliers (variables d'entrée du modèle GPM-CAST) enregistrés durant la période de croissance du raisin, d'avril à juin 2008 et et dates d'avertissement indiquées par le modèle)





DISCUSSION

Powdery mildew caused by *Erysiphe necator* Schwein (sin. *Uncinula necator* (Schwein.) Burril) is the most important disease affecting grapevines (*Vitis vinifera* L.) in Egypt. Most of the knowledge used to manage powdery mildew in Egypt is derived from studies that depended mainly on the fungicide management scheme of routine time-table spraying. Increasing the

fungicide applications is very expensive; causes environmental pollution has harmful effects on consumers and negatively affects the growth of the treated plants. Accordingly, there is a clear need to re-evaluate the previous research knowledge to know when to start control of powdery mildew with the effective fungicides during the growing season, in order to reduce, as possible, the number of fungicides applications. An advisory system presented as early warning computerized simulation model named by the author GPM-CAST was validated and evaluated successfully for the first time during two successive grape growing seasons in Egypt to help the grape growers manage such disease with more precise use of fungicides. In this regard, many attempts have been made with success all over the world to forecast grape powdery mildew (Sall, 1980; Kast, 1994; Gadoury *et al.*, 1994; Chavan *et al.*, 1995; Seem & Gadoury, 1996; Gubler *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2002 and Austin *et al.*, 2006). The obtained results are in agreement with aforementioned researches and suggest that powdery mildew of grapes could be controlled effectively in Egypt with fewer fungicide applications using disease warning system compared with than a standard calendar-based schedule. System analysis play an important role in designing and creating the study subjected model and was discussed here in details. It is noteworthy to record that a significant reduction percentage in fungicide applications was achieved. The number of sprays was reduced by 50% and 62.5 % during 2007 and 2008 grape-growing seasons respectively.

REFERENCES

- Austin C.-N., Lakso A.-N., Seem R.-C., Riegel D.-G., Gadoury D.-M., Wilcox W.-F., 2006 - Influence of sun exposure on powdery mildew development. *Proc. 5th Int. Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew*. Pertot, I., Gessler C., Gadoury D.-M., Gubler D., Kassemeyer H.-H., Magarey P. (eds). Istituto Agrario di San Michele all' Adige. 196 pp.
- Carroll J.-E., Wilcox W.-F., Seem R.-C., Gadoury D.-M., Riegel D.-G. 2002 - Different microclimates and powdery mildew severities associated with distance from the water in a 'Concord' vineyard adjacent to Lake Erie. pp 60-61 in: *Proc. 4th Int. Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew*, Napa, California, 30 Sept. - 4 Oct., 2002. UC Davis Press. 88 pp.
- Chavan S.-B., Khandge S.-V., Varshneya M.-C.; Patil J.-D., 1995 - Influence of weather parameters on conidia formation in powdery mildew of grape. *Indian Phytopathology*, 48 (1): 40-44.
- Gadoury D.-M., Seem R.-C., Magarey P., Emmett R., Magarey R., 1994 - Development of a practical model for use in the management of grape powdery mildew. pp. 126-128 in: *Proceedings of the 2nd Int. Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew Modeling*, Freiburg, Germany, 29 Aug. - 1 Sept. 1994. 131 pp.
- Gadoury, D.M., Seem R.-C., Pearson R.-C., Wilcox W.-F., Dunst R.-M., 2001- Effects of powdery mildew on vine growth, yield and quality of Concord grapes. *Plant Disease* 85:137-140.
- Gubler W.-D., Rademacher M., Vasquez S.-J., Thomas C.-S., 1999 - Control of powdery mildew using the UC Davis powdery mildew risk index APS-net Feature. Published online. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Haleen F., Holz G., 2001- An overview of the biology, epidemiology and control of *Uncinula necator* (powdery mildew) on grapevine, with reference to South Africa. *South African Journal for Enology and Viticulture* 22:111-121.

Jarvis W.-R., Gubler W.D., Grove G.-G., 2002 - Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. Pages 169 -199. In: Bólanger, R. R., W.R. Bushnell, A.J. Dikana and L.W. Timothy (eds.). *The Powdery Mildews a Comprehensive Treatise*. St. Paul. Minnesota. USA.

Kast W.-K., 1994 -" A Step Risk Analysis (SRA) Used for Planning Sprays Against Powdery Mildew (OiDiag-System)." *Proceedings of the Second International Workshop on Grape wine Downy and Powdery Mildew Modeling*. Freiburg, Germany.

Miazzi M., Hajjeh H., Faretra F., 2003 - Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. *Journal of Plant Pathology*, 85, 2: 123-129.

Pearson R.-C., Gadoury D.-M., 1987- Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York. *Phytopathology* 77:1509-1514.

Pearson R.-C., Gartel W., 1985 - Occurrence of hyphae of *Uncinula necator* in buds of grapevine. *Plant Disease* 69:149-151.

Rumbolz J., Gubler W.-D., 2005. Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew *Erysiphe necator*. *Plant Pathology* 54:535-548.

Sall M.-A., 1980- Epidemiology of grape powdery mildew: a model. *Phytopathology* 70:338-342.

Seem R.-C., Gadoury D.-M., 1996 - Weather and prediction of disease risk in vineyards. *Proc. 25th N.Y. Wine Industry Workshop. N.Y. Agric. Exp. Stn. 144 pp.*

Schneider S., Gadoury D.-M., Kassemeyer H.-H., 1998 - The role of cleistothecia in the epidemiology of grape powdery mildew in Germany. p. 53 in *Proc. 3rd Int. Workshop on Powdery and Downy Mildew of Grapevine*. 22-28 March 1998. Loxton, SA, Australia. 62 pp.

**LE POSITIONNEMENT DES TRAITEMENTS FONGICIDES : ENJEU POUR LA
SEPTORIOSE ET INTERET DU MODELE « SEPTOLIS »**

D. GOUACHE ⁽¹⁾, G. COULEAUD ⁽²⁾

⁽¹⁾ ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt,
France

⁽²⁾ ARVALIS – INSTITUT DU VEGETAL, Station Expérimentale, 91720 Boigneville, France

Contact : d.gouache@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

Le positionnement des traitements fongicides est un paramètre clef de leur efficacité. Dans le cas de la septoriose, l'objectif de la lutte est de protéger la surface verte des deux dernières feuilles. Le positionnement du 1^{er} traitement est ainsi un compromis entre l'attente de l'émergence de ces 2 feuilles et le contrôle précoce de la maladie. Cela demande une approche couplée et dynamique de la maladie et de la plante, ce que permet « SeptoLIS ». Grâce à la description des contaminations reçues par les différents étages foliaires, il permet de prendre une décision de déclenchement du 1^{er} traitement. Des essais mis en place en 2008 et 2009 ont permis de quantifier l'enjeu d'un positionnement réussi, à la fois en terme de production mais aussi en terme d'optimisation de l'utilisation des produits fongicides. Ils ont également permis d'évaluer la qualité des prévisions issues de SeptoLIS.

Mots-clés : blé (*Triticum aestivum*), septoriose (*Mycosphaerella graminicola*), positionnement des traitements fongicides, modèle, outil d'aide à la décision

SUMMARY

**TIMING OF FUNGICIDE TREATMENTS AGAINST SEPTORIA : STAKES AND
POTENTIAL OF THE “SEPTOLIS” MODEL**

Timing of fungicide treatments is a key parameter of their efficiency. For Septoria tritici blotch, protection aims at keeping the top two leaves green as long as possible. Timing of the 1st treatment is thus a compromise between waiting for these leaves to be deployed and early control of the disease. This implies a dynamic approach coupling plant and disease development. “SeptoLIS” permits this through a description of infections received by successive leaf layers, which in turns allows for a recommendation of treatment date. A series of trials in 2008 and 2009 allowed for the importance of treatment timing to be quantified in terms of production and optimisation of product use. They also allowed for an evaluation of recommendations issued by “SeptoLIS”.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*), septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*), timing of fungicide treatments, model, decision support system

INTRODUCTION

En France, la septoriose, maladie fongique foliaire causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est la plus dommageable sur blé tendre (*Triticum aestivum*), pouvant engendrer des pertes de rendement de l'ordre de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la maladie dépend essentiellement de la lutte chimique. Cependant, cette lutte chimique est doublement remise en cause. Le développement de résistances aux matières actives par le pathogène a induit des baisses d'efficacité importantes (Maufras *et al.*, 2006 ; An., 2009). De plus, la pression sociétale s'est concrétisée par l'engagement pris lors du Grenelle de l'Environnement de réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques de 50% (An., 2007). Dans un tel contexte, il est important de rechercher un maximum de rentabilité pour un programme de protection donné, et d'exploiter toutes les opportunités de réduction éventuelle du nombre de traitements.

Le positionnement des traitements fongicides est une voie possible d'optimisation de l'efficacité d'un programme. Plusieurs études ont permis de préciser les fenêtres de traitement les mieux adaptées pour le contrôle de la septoriose. Ainsi, il a été montré de manière systématique que les traitements trop précoces, avant deux noeuds (stade Zadocks 32, Z32), sont sans intérêt (Cook, 1977; Cook *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1989). Cook (1977, 1999) met également en avant l'importance de la protection de la dernière feuille, qui peut contribuer à elle seule à 45% du remplissage du grain (Lupton, 1972 *in* Gooding *et al.*, 2000). La meilleure protection de la dernière feuille est obtenue dans ces références aux alentours du stade Z39, soit au déploiement complet de cet étage foliaire, en cohérence avec les résultats de Paveley *et al.* (2000), qui démontrent que la meilleure efficacité de traitement sur un étage foliaire donné s'obtient de manière très robuste avec un traitement réalisé au moment du déploiement complet de l'étage foliaire en question. (Thomas *et al.* 1989) soulignent également l'importance d'une bonne protection de la F2, et Cook *et al.* (1999) évoque l'intérêt des traitements avant Z39 pour maintenir un niveau de maladie faible. Cependant, le positionnement le plus efficace de ce traitement de réduction de pression semble plus variable, pouvant intervenir dès Z32, mais aussi à Z37 (Cook *et al.*, 1999). Ici, il apparaît important de tenir compte du niveau de développement de la maladie en début de montaison : en effet, si son développement est suffisamment faible, du fait notamment du climat hivernal, le transfert potentiel d'inoculum vers les dernières feuilles en sera réduit (Royle *et al.*, 1995), autorisant un délai pour la première intervention.

Une telle approche implique une prise en compte dynamique à la fois du développement de la maladie et du couvert végétal : les modèles couplant l'épidémiologie de la maladie au développement de la plante peuvent le permettre (Moreau et Maraite, 1999 ; Rouzet *et al.*, 2005 ; Burke et Dunne, 2008). Ainsi, Burke et Dunne (2008), en appliquant différents systèmes d'aide à la décision européens ont montré que ceux-ci pouvaient permettre des réductions de quantités de produit appliquées et/ou l'obtention d'une marge supérieure. En France, l'utilisation de modèles pour ajuster le positionnement des premiers traitements existe depuis de nombreuses années, et ce faisant, peut aussi permettre d'en réduire le nombre (Rouzet *et al.*, 2005). Ce papier présente des résultats d'essais faisant intervenir des positionnements de traitements différenciés, afin d'en saisir l'enjeu. Ces résultats montrent que l'utilisation d'un modèle couplé plante – pathogène permet d'obtenir les indicateurs nécessaires à un raisonnement du positionnement des traitements qui permet d'améliorer leur rentabilité et/ou d'en diminuer le nombre selon les situations.

MATERIEL ET MÉTHODE

LE RAISONNEMENT ET LE MODELE

Sur la base des résultats cités ci-dessus, on considère le traitement de la dernière feuille aux alentours du stade dernière feuille étalée comme la base d'un programme de protection contre les maladies foliaires. Celui-ci a pour vocation de protéger la dernière feuille, et, dans une moindre mesure, permet une protection de la F2. Le 1^{er} traitement, quant à lui, a pour vocation de limiter le développement de la maladie sur les feuilles F3 et F4, qui servent de

tremplin à la maladie pour atteindre ces deux dernières feuilles. Ainsi, le raisonnement du positionnement de ce traitement se fait sur la base des contaminations que reçoivent ces étages foliaires. Si aucun déclenchement n'est intervenu jusqu'à l'apparition de la dernière feuille, à partir de celle-ci on ne tolère que de faibles quantités de contaminations avant de déclencher.

Le modèle utilisé ici (« SeptoLIS® ») correspond à une adaptation du modèle couplé plante – pathogène décrit dans Audsley *et al.* (2005) et Milne *et al.* (2003). Le modèle de développement de la plante a été modifié pour intégrer le modèle de phyllotherme (rythme d'émergence des feuilles) de Gate (1995). Par ailleurs, un module de développement hivernal de l'inoculum a été développé. En effet, le modèle d'Audsley *et al.* (2005) démarre à partir de la F6, et c'est une observation en cours de montaison qui permet d'ajuster le niveau d'inoculum de début de montaison. Or, de nombreux auteurs ont mis en avant l'importance des conditions hivernales, et en particulier les températures basses, dans le développement du potentiel épidémique d'une parcelle (Coakley *et al.*, 1985; Gladders *et al.*, 2001; Pietravalle *et al.*, 2003; te Beest *et al.*, 2009). Une fonction polynomiale de la température et de la pluie journalière à partir du stade début tallage (Z21) a donc été développée et couplée au modèle d'Audsley *et al.* (2005).

CONDUITE DES EXPERIMENTATIONS

Les essais mis en oeuvre ont consisté à comparer 5 modalités avec des positionnements de T1 (1^{er} traitement) et de T2 (2^{ème} traitement) différentes (Table I). Chaque essai comportait également une modalité non-traitée. Les essais ont été conduits avec 3 répétitions. Pour certains essais, une courbe de réponse avec les mêmes produits a également été réalisée.

Table I : Positionnement théoriques et produits¹ utilisés dans les essais *Theoretical timing and products used in trials*

| Modalité | Stade des traitements | | | | |
|----------|--------------------------------|----------------------------------|---|---|---|
| | 2 noeuds (Z32) | Dernière feuille pointante (Z37) | Dernière feuille étalée (Z39) | Epiaison (Z55) | Début floraison (Z61) |
| 1 | Menara 0.4 l/ha + Bravo 1 l/ha | | Opus 0.6 l/ha + Pyros 0.6-0.7 ² l/ha ou Fandango S 1.2 l/ha ³ | | |
| 2 | Menara 0.4 l/ha + Bravo 1 l/ha | | | Opus 0.6 l/ha + Pyros 0.6-0.7 ² l/ha ou Fandango S 1.2 l/ha ³ | |
| 3 | | Menara 0.4 l/ha + Bravo 1 l/ha | | Opus 0.6 l/ha + Pyros 0.6-0.7 ² l/ha ou Fandango S 1.2 l/ha ³ | |
| 4 | | Menara 0.4 l/ha + Bravo 1 l/ha | | | Opus 0.6 l/ha + Pyros 0.6-0.7 ² l/ha ou Fandango S 1.2 l/ha ³ |
| 5 | | | Menara 0.4 l/ha + Bravo 1 l/ha | | Opus 0.6 l/ha + Pyros 0.6-0.7 ² l/ha ou Fandango S 1.2 l/ha ³ |

¹ MENARA (Syngenta Agro SAS) : cyproconazole 160 g/l + propiconazole 250 g/l ; BRAVO 500 (Syngenta Agro SAS) : chlorothalonil 500 g/l ; OPUS (BASF Agro) : epoxyconazole 125 g/l ; PYROS (BASF Agro) : prochloraze 450 g/l ; FANDANGO S (BayerCropScience) : prothioconazole 100 g/l + fluoxastrobine 50 g/l

² en 2009 : PYROS à 0.7 l/ha et en 2008 : PYROS à 0.6 l/ha

³ Essais avec FANDANGO S en T2 soulignés dans la table II

Table II : Localisation des essais. (^a Les essais figurés en gras sont ceux qui incluent une courbe de réponse. Les courbes de réponse réalisées sur les essais 18570, 22170 et 56500 diffèrent d'un produit par rapport aux modalités de positionnement décrites Table I).
Localisation of trials

| Année | Nombre d'essais | Localisation (code postal) ^a |
|-------|-----------------|---|
| 2008 | 11 | 14980 , 18570, 21110, 41240, 45300, 51400 , 51510 , 52000, 55160, 76750 , 80240 |
| 2009 | | 1600, 3290, 17700, 18570 , 21110, 22170 , 32270, 41240, 44370 , 44370p , 45300, 51510 , 55160, 56500 , 76750 , 81600, 80240 , 89700 |

Les essais ont fait l'objet de suivis de maladie dans les parcelles non-traitées. Les notations ont été faites par étage foliaire, en pourcentage de feuille malade, sur un échantillon de 20 tiges par parcelle. Les essais ont été récoltés à la machine et ramenés à 15% d'humidité.

ANALYSE ET TRAITEMENT DES DONNEES

Toutes les analyses ont été conduites avec le logiciel R. Chaque essai a été analysé individuellement. Les différentes modalités de positionnement ont été comparées entre elles par analyse de variance. Les différentes modalités ont également été regroupées entre elles de 2 manières : un regroupement correspondant au T1, les parcelles ayant eu le même positionnement du T1 se retrouvant regroupées), et un regroupement de même type pour le T2. Suite à ce regroupement, les différences entre T1 et entre T2 ont été testées par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Enfin, dans les essais où une courbe de réponse était également présente, une courbe de Monod y a été ajustée. La comparaison des modalités de positionnement à la courbe de réponse a ainsi pu être faite via la fonction nlme de R.

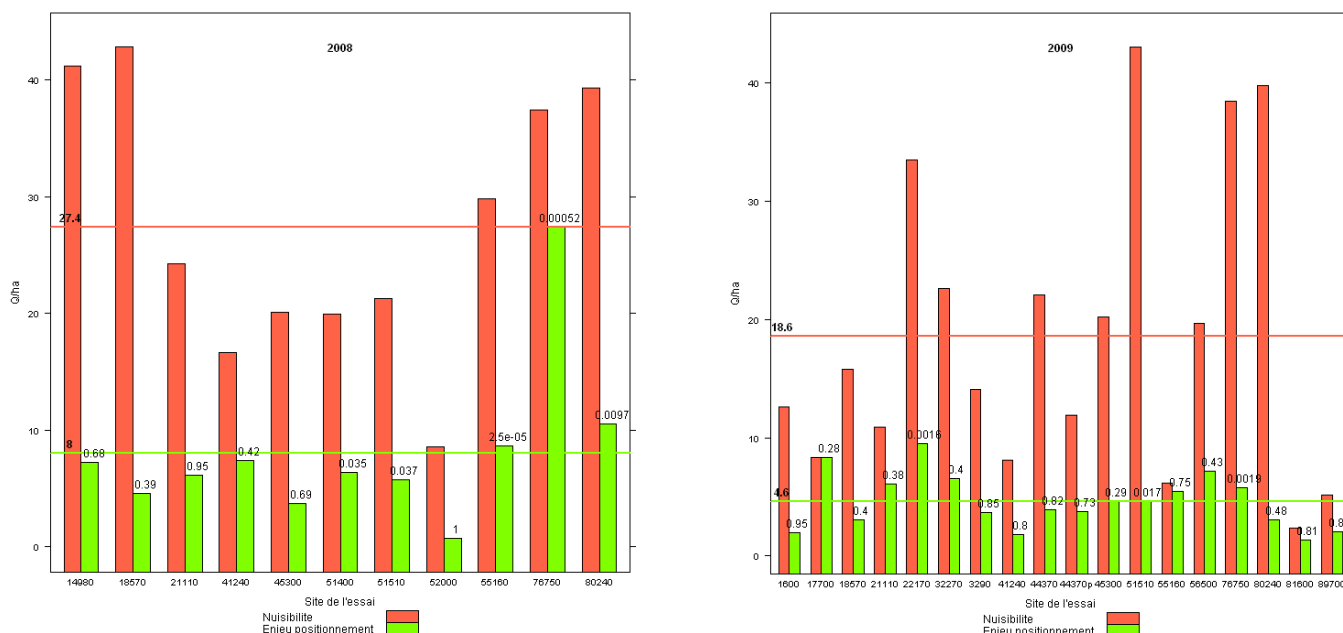
Pour comparer les préconisations de date de T1 du modèle avec ce qui a été obtenu dans les essais, on a premièrement évalué les stades réels des interventions des essais, qui n'ont pas toujours pu être réalisés au stade théorique souhaité, et de la date de déclenchement du modèle. On a affecté une valeur de 0.5 à 5 aux stades « avant Z31 », « après Z31 », « avant Z32 », « après Z32 », et ainsi de suite pour Z37, Z39 et Z55. Les comparaisons entre stades ont été faites par différence de ces valeurs. Pour les essais où le test de Kruskal-Wallis pour le T1 est significatif à 10%, on a comparé le stade du T1 de la meilleure (en terme de rendement) modalité avec celui du modèle. Pour les cas où le test n'est pas significatif, on a comparé au stade du T1 des deux meilleures modalités, et retenu l'écart le plus faible parmi les deux. Un essai (14980) n'a pas pu être évalué car l'écart de stades réels entre les deux premiers positionnements était trop grand (« après Z31 » et « avant Z39 »). On a également recherché la modalité de positionnement correspondant au stade de déclenchement de SeptoLIS. Dans le cas où celle-ci existait, le rendement de cette modalité a été comparé au rendement de la meilleure modalité.

RESULTATS

ENJEU DU POSITIONNEMENT

En 2008, année à forte nuisibilité, l'enjeu moyen du positionnement, calculé comme l'écart de rendement entre le meilleur positionnement et le moins bon, sur les 11 essais est de 8 q/ha. En écartant l'essai 76750 (qui le sera de toutes les analyses par la suite), dont la mise en oeuvre a été perturbée, ce chiffre descend à 6 q/ha. Pour 4 essais sur les 10, les différences sont statistiquement significatives au seuil de 5% (Fig. 1). En 2009, la nuisibilité moyenne est plus faible, et l'enjeu du positionnement également. En éliminant les essais 41240 et 81600 dont toutes les modalités n'ont pas pu être mises en oeuvre, on arrive à un enjeu du positionnement de 4.9 q/ha. Les différences sont statistiquement significatives au seuil de 5% pour 3 des essais, correspondant à 3 des 4 plus fortes nuisibilités du réseau.

Figure 1 : Nuisibilité des essais (en rouge) et écart de rendement (q/ha) entre meilleur et moins bon positionnement (en vert). Barres horizontales : moyennes annuelles. Les valeurs au dessus de chaque barre verte représentent le niveau de significativité de l'analyse de variance sur les modalités de positionnement. *Fungicide response (dt/ha) (in red) and difference between the best and worst fungicide timings (in green). Horizontal bar : annual mean. Values : level of significancy of differences between fungicide timings.*



L'approche par regroupement des modalités selon qu'elles ont eu le même T1 ou le même T2 suivie d'un test de Kruskal-Wallis permet de mettre en évidence les enjeux de chaque traitement respectif sur le réseau d'essais. On observe qu'en 2008, c'est surtout le positionnement du T2 qui était le plus impactant, 5 essais sortant comme significatifs au seuil de 5% pour le T2 alors que sur le T1 seuls 2 essais le sont, au seuil de 10%. A l'inverse, en 2009, le positionnement du T1 apparaît comme plus déterminant.

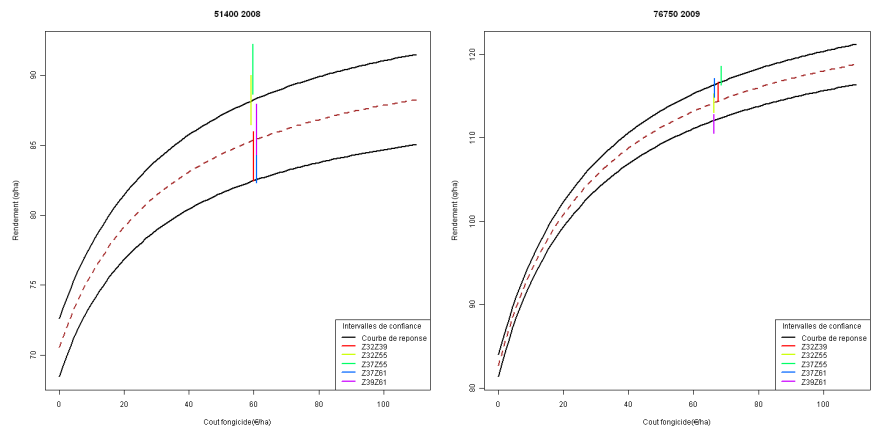
Table III : Degré de significativité (probabilité obtenue par test de Kruskal-Wallis) des différences entre positionnements sur le T1 ou sur le T2. *Level of significancy (Kruskal-Wallis test) of differences between fungicides timings of T1 and T2.*

| Année | Essai | T1 | T2 |
|-------|-------|------|------|
| 2008 | 14980 | 0.66 | 0.43 |
| | 18570 | 0.1 | 0.08 |
| | 21110 | 0.86 | 0.66 |
| | 41240 | 0.51 | 0.14 |
| | 45300 | 0.87 | 0.51 |
| | 51400 | 0.6 | 0.02 |
| | 51510 | 0.34 | 0.01 |
| | 52000 | 0.92 | 0.7 |
| | 55160 | 0.24 | 0.01 |
| | 76750 | - | - |
| | 80240 | 0.02 | 0.02 |

| Année | Essai | T1 | T2 |
|-------|--------|------------|------------|
| 2009 | 1600 | 0.84461281 | 0.85067192 |
| | 3290 | 0.90861544 | 0.68158567 |
| | 17700 | 0.08179236 | 0.69593431 |
| | 18570 | 0.27478865 | 0.24736238 |
| | 21110 | 0.69717816 | 0.1287349 |
| | 22170 | 0.00665425 | 0.00723253 |
| | 32270 | 0.45988183 | 0.16529889 |
| | 41240 | - | - |
| | 44370 | 0.34565516 | 0.5996976 |
| | 45300 | 0.40826723 | 0.15335497 |
| | 51510 | 0.02625673 | 0.15412274 |
| | 55160 | 0.63762815 | 0.71058503 |
| | 56500 | 0.21581508 | 0.93941306 |
| | 76750 | 0.00847174 | 0.42944595 |
| | 80240 | 0.28462832 | 0.72850829 |
| | 81600 | - | - |
| | 89700 | 0.83945702 | 0.31776964 |
| | 44370p | 0.63824008 | 0.51096058 |

La comparaison sur les essais disposant de courbes de réponse permet également de comparer les ordres de grandeur des effets du positionnement par rapport à ceux de la dose (Fig. 2). On observe ainsi sur 3 des 4 essais de 2008 qu'un positionnement de 2 traitements optimisé permet l'obtention d'un meilleur rendement à dose équivalente qu'une stratégie classique en 3 traitements. Cela est également le cas sur les essais 51510 et 76750 en 2009. Ces différences sont toutes significatives au seuil de 5%. A contrario, sur 2 des essais de 2008, les moins bons positionnements sont moins performants que la stratégie classique. Enfin, dans 3 cas en 2008, le meilleur positionnement est meilleur que la dose la plus élevée. Ces différences ne sont cependant pas significatives au seuil de 5%. Elle l'est au seuil de 7% pour l'essai 51400.

Figure 2 : Intervalles de confiance à 95% du rendement pour différents positionnements ou doses pour l'essai 51400 (2008) et 76750 (2009) *95% confidence intervals of yield for different fungicide timings or doses for trials 51400 (2008) et 76750 (2009)*



LIEN ENTRE LES RESULTATS DU MODELE ET LES POSITIONNEMENTS OPTIMAUX

En 2008, le modèle a déclenché des traitements allant du stade « Deux noeuds » (Z32) jusqu'à peu avant « Dernière feuille étalée » (Z39). En 2009, du fait de l'hiver froid suivi de contaminations intenses en fin de montaison, les déclenchements sont beaucoup plus regroupés, entre « Dernière feuille pointante » (Z37) et « Dernière feuille étalée » (Z39). Dans 11 cas sur 26, le déclenchement préconisé par le modèle se rapproche le plus du meilleur déclenchement obtenu sur les essais. Ainsi, l'écart de rendement entre la modalité la plus proche du déclenchement « SeptoLIS » et la modalité la meilleure est de 1.1 q/ha seulement. Cet écart est souvent faible, ne dépassant 3 q/ha que dans 4 cas. L'écart en terme de stade du modèle par rapport aux meilleures modalités ne dépasse un stade que dans deux situations.

DISCUSSION

L'impact positionnement des interventions fongicides visant à contrôler la septoriose a été étudié au travers de 29 essais mis en oeuvre en 2008 et 2009. Ces essais ont permis de quantifier l'enjeu de ce positionnement entre 5 et 6 q/ha en moyenne, pouvant même approcher 10 q/ha. Dans plusieurs cas, le choix d'un bon positionnement a permis d'améliorer, à investissement en fongicides équivalent, la rentabilité d'un programme. On a même identifié certaines situations où des traitements bien positionnés offrent une aussi bonne rentabilité qu'un programme standard à doses 2 fois plus élevées.

L'apport d'un modèle intégrant les facteurs de variation climatiques et phénologiques du positionnement idéal a été montré en s'appuyant sur le modèle SeptoLIS : celui-ci permet régulièrement de se rapprocher du positionnement idéal.

Le positionnement idéal du 1^{er} traitement peut varier fortement d'une année à l'autre ou d'un site à l'autre. En 2008, la coïncidence des épisodes pluvieux avec les stades de développement a donné lieu à des épidémies assez contrastées – précoces en se déplaçant vers le centre et l'ouest, nécessitant une 1^{ère} intervention à Z32 à tardives vers le nord et l'est. En 2009, l'hiver froid et sec généralisé a ralenti la progression de la maladie de telle sorte qu'il était possible de retarder les T1 jusqu'à Z37. Ensuite, il a souvent suffi d'un

épisode pluvieux intense (début ou mi mai en fonction des secteurs), coïncidant avec le déploiement de la dernière feuille, pour contaminer les étages supérieurs, d'où des déclenchements lors du déploiement de la dernière feuille.

On a également constaté que le positionnement idéal du T2 varie, et peut avoir un effet conséquent sur le rendement. Cela paraît être en contradiction avec l'hypothèse de Paveley *et al.* (2000) signalant que la meilleure efficacité sur un étage foliaire s'obtient en positionnant le traitement à l'émergence de l'étage en question, auquel cas les meilleurs T2 seraient systématiquement à Z39. Or, on a pu voir certains essais (en 2008, les 2 du 51 et ceux du 55 et 80) pour lesquels les modalités avec un T2 à Z55 sont supérieures aux autres. Une explication possible est que les conditions climatiques françaises sont moins systématiquement favorables au développement de la maladie, autorisant ainsi de ne pas protéger systématiquement la F1 à sa sortie. En effet, sur ces essais l'essentiel des pluies contaminantes a eu lieu à partir de l'épiaison. Notons également que Royle *et al.* (1995) avaient proposé en Angleterre de passer d'un schéma à trois traitements à un schéma à deux traitements en considérant qu'un T1 ciblant la F2 (donc un peu après Z37) suffirait pour protéger la F1 jusqu'à l'épiaison, qui serait le moment de renouvellement du traitement. Dans le cas de nos essais, la F1 n'a effectivement reçu que très peu de contaminations jusqu'à épiaison (mimant l'effet sur F1 du T1 proposé par Royle *et al.*). Dans ce cas, une intervention en T2 à l'épiaison permet de protéger la dernière feuille sur le restant de la durée du remplissage. En l'absence de connaissances actualisées – vu l'évolution des souches de septoriose vis à vis des fongicides (An., 2009) – sur l'efficacité préventive sur F1 d'un traitement n'ayant été intercepté que par une petite partie de la feuille, il semble donc intéressant de se pencher sur des règles de décision pour positionner le T2.

En termes méthodologiques, deux questions sont posées par ce type d'essai. Premièrement, les laps de temps entre les dates de traitement des différentes modalités sont importants. Cela peut rendre difficile leur interprétation par rapport au traitement proposé par un modèle. Idéalement, il faudrait mettre en oeuvre un beaucoup plus grand nombre de modalités avec des positionnements séquentiels beaucoup plus rapprochés. Cook *et al.* (1999) ont proposé un dispositif en gradient permettant de supprimer les répétitions classiquement utilisées, augmentant ainsi fortement le nombre de modalités matériellement implantables dans un essai. Ce type de dispositif serait à explorer pour optimiser les règles de décision de positionnement des traitements. Ensuite, la comparaison des modalités de positionnement avec celles d'une courbe de réponse a permis de montrer qu'un programme bien positionné apporte autant de gains de rendement qu'une augmentation des doses appliquées de 20%.

CONCLUSION

On a montré que le positionnement des traitements fongicides contre la septoriose était un levier d'action contribuant à répondre au double enjeu environnemental et de gestion des résistances de la protection fongicide. Le positionnement des traitements permet effectivement d'améliorer la rentabilité d'un programme à dose égale, et peut même permettre d'éviter certains traitements. Le déploiement de modèles de prévision comme SeptoLIS peut permettre d'ajuster au mieux ce positionnement. Le déploiement à grande échelle de ce type de modèle demande cependant à ce que d'autres considérations soient prises en compte, en particulier le cortège complet des maladies contre lesquelles la protection fongicide est dirigée.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Il a été soutenu par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. »

Les auteurs tiennent à remercier l'ensemble des équipes techniques qui ont permis d'obtenir les données. François Piraux et Florent Duyme sont remerciés pour leur appui statistique.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 2007. Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » in : Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »
http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf

Anonyme. 2009. Note commune : état des lieux et recommandations pour 2009. Perspectives Agricoles 354, 48-52.

Audsley, E., A. Milne, N. Paveley. 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. *Aspects of Applied Biology* 147 (2).

Burke, J. J., B. Dunne. 2008. Field testing of six decision support systems for scheduling fungicide applications to control *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat crops in Ireland. *The Journal of Agricultural Science* 146 (04):415-428.

Coakley, S. M., L. R. McDaniel, G. Shaner. 1985. Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology* 75 (11):1245-1251.

Cook, R. J. 1977. Effect of Timed Fungicide Sprays on Yield of Winter Wheat in Relation to *Septoria* Infection Periods. *Plant Pathology* 26 (1):30-34.

Cook, R. J., M. J. Hims, T. B. Vaughan. 1999. Effects of fungicide spray timing on winter wheat disease control. *Plant Pathology* 48 (1):33-50.

Gate, P. 1995. Ecophysiologie du blé. ITCF, Tec&Doc/Lavoisier (Eds.)

Gladders, P., N. D. Paveley, I. A. Barrie, N. V. Hardwick, M. J. Hims, S. Langton, M. C. Taylor. 2001. Agronomic and meteorological factors affecting the severity of leaf blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in commercial wheat crops in England *Aspects of Applied Biology* 138:301-311.

Gooding, M. J., J. Dimmock, J. France, S. A. Jones. 2000. Green leaf area decline of wheat flag leaves: the influence of fungicides and relationships with mean grain weight and grain yield. *Annals of Applied Biology* 136:77-84.

Jorgensen L.N., M. Jahn, W. Clark, D. Antichi, T. Goral, H. Schepers, P. Lucas, B. Rolland, D. Gouache, L. Hornok, 2008. Endure Wheat Case Report

Maufras J. Y., Maumene C., Couleaud G., Bousquet N. 2006. Comment résister à la résistance? *Perspectives Agricoles* 328, 30-36.

- Milne A., N. Paveley, E. Audsley, P. Livermore. 2003. A wheat canopy model for use in disease management decision support systems. *Annals of Applied Biology* 143: 265–274.
- Moreau, J. M., Maraite, H.. 1999. Integration of knowledge on wheat phenology and *Septoria tritici* epidemiology into a disease risk simulation model validated in Belgium. *Aspects of Applied Biology* 55, 1-6.
- Paveley, N. D., Lockley, D., Vaughan, T. B., Thomas, J., Schmidt, K., 2000. Predicting effective fungicide doses through observation of leaf emergence. *Plant Pathology* 49, 748-766.
- Pietravalle, S., M. W. Shaw, S. R. Parker, F. van den Bosch. 2003. Modeling of Relationships Between Weather and *Septoria tritici* Epidemics on Winter Wheat: A Critical Approach. *Phytopathology* 93 (10):1329-1339.
- R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rouzet, J, M Delos, G Le Hennaf. 2005. Modélisation et mise en oeuvre de modèles dans le cadre du conseil phytosanitaire. In: *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculteur et l'environnement*. Lavoisier.
- Royle, D. J., S. R. Parker, D. J. Lovell, and T. Hunter. 1995. Interpreting trends and risks for better control of *Septoria* in winter wheat. In *A Vital Role for Fungicides in Cereal Production*. Bios Scientific Publisher Ltd.
- te Beest, D. E., M. W. Shaw, S. Pietravalle, and F. van den Bosch. 2009. A predictive model for early-warning of *Septoria* leaf blotch on winter wheat. *European Journal of Plant Pathology* 124 (3):413-425.
- Thomas, M. R., R. J. Cook, J. E. King. 1989. Factors affecting development of *Septoria tritici* in winter wheat and its effect on yield. *Plant Pathology* 38 (2):246-257.

**WHICH AIR TEMPERATURE DRIVES EPIDEMIOLOGICAL PROCESSES
OF FUNGAL FOLIAR WHEAT DISEASES AT LEAF SCALE ?**

M. CHELLE¹, S. LIU², B. NEY³

¹ INRA, UMR1091, EGC, F-78850 Thiverval-Grignon, France – chelle@grignon.inra.fr

² AgroParisTech, UMR1091, EGC, F-78850 Thiverval-Grignon, France –
liushengcau@yahoo.fr

³ AgroParisTech, UMR1091, EGC, F-78850 Thiverval-Grignon, France –
ney@agroparistech.fr

RESUME

Les modèles Structure x Fonction de plante apparaissent comme de puissants outils d'intégration pour simuler les interactions couverts x maladies. Les épidémies sont pilotées par certains facteurs climatiques, notamment la température. Actuellement, celle-ci est mesurée par les stations météorologiques. Or, l'architecture des couverts modifie les variables climatiques en leur sein par rapport à leur valeur extérieure. La question traitée ici est: où doit être mesurée ou estimée la température pour rester pertinente dans la compréhension des interactions plante x maladie ? Une première étude a été conduite combinant mesures climatiques de la température de l'air au-dessus et au sein de couverts contrastés de blé (*Triticum aestivum* L.) et leur impact sur trois maladies: septoriose (*Septoria tritici*), rouille jaune (*Puccinia striiformis*) et oïdium (*Erysiphe graminis*).

Mots-clés : température, processus épidémique foliaire, architecture, blé, simulation

SUMMARY

Function-Structure Plant models (FSPM) seem attractive to better understand the complex interactions between plant growth, canopy morphogenesis, and epidemics. Epidemics are driven by climate factors and among them, temperature is known to play a major role. Thus, weather station measurement is commonly used to drive epidemics models. However, the relationship between climate and within-canopy microclimate is mainly affected by the canopy architecture. Thus, the general question addressed in this study is: where air temperature should be measured as input of FSPM for sick plants?

Keywords: temperature, foliar epidemic process, architecture, wheat, simulation

INTRODUCTION

Fungal diseases are a major concern for crop production. Up to now crop protection has mainly relied on fungicide sprays and host genetic resistance. However, their intensive use boosts the adaptation of fungal populations, causing the decrease of pathogen sensitivity to fungicides and the breakdown of host resistance. Therefore, novel crop management techniques have to be developed and thus new levers have to be identified. In that context, the three types of plant self-defense against diseases: resistance, escape, and tolerance (Parker *et al.*, 2002) have to be better understood. Except for the genetic resistance, these mechanisms depend on both the canopy morphogenesis and on the biomass production and allocation within plants. Regarding the ability to characterize and model these mechanisms and their interactions, the function-structure plant modeling (FSPM) seems well suited (Robert *et al.*, 2008).

Moreover, temperature is a key variable that drives epidemiological processes, such as infection, dormancy, lesion growth, sporulation (Chungu *et al.*, 2001; Henze *et al.*, 2007; Lovell *et al.*, 2004; Magboul *et al.*, 1992). Epidemiological models usually relied on weather station measurements, *e.g.*, air temperature and humidity, rainfall, etc. However, Hallaire *et al.* (1969) have stated that such climate indicators, are not well suited to better understand the plant-microclimate-pathogens interactions and the effect of the canopy structure on them. Indeed, the relationship between the climate measured by a weather station and the within-canopy microclimate depends strongly on the canopy structure and on the sensor position.

Therefore, using the FSPM approach to well understand the canopy self-defense mechanisms raises the question: which climate variables should be measured as inputs of sick plant models? More precisely, do weather station measurements of air temperature enable a satisfying simulation of the effect of canopy architecture on epidemics models?

To answer this question, a first study has been carried out, in which air temperature has been measured at different locations above and within various wheat canopies and a sensitivity analysis to these temperatures of epidemiological models of three fungal wheat leaf diseases has been performed at leaf scale.

MATERIALS AND METHODS

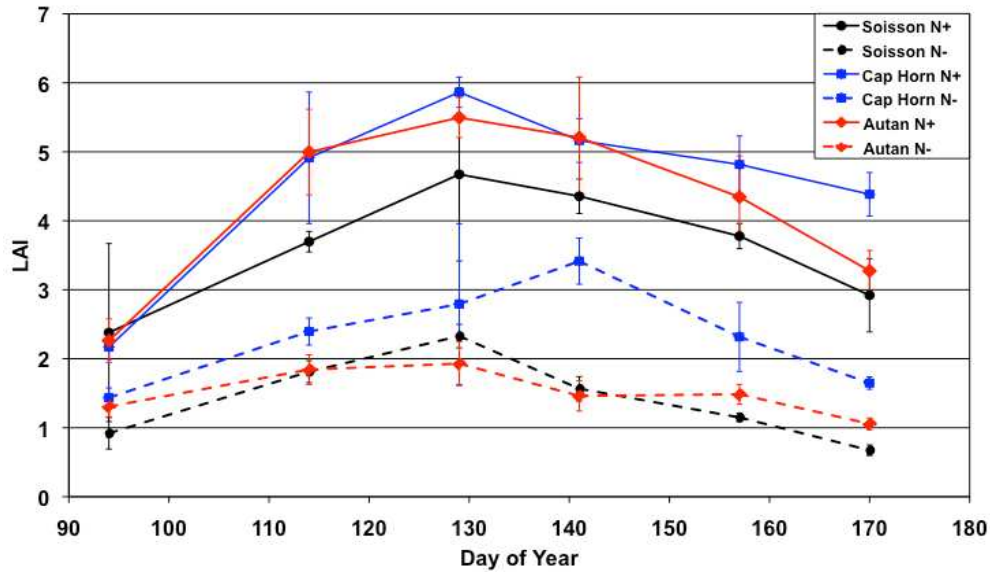
Microclimatic dataset

A weather station (Enerco, CIMEL, France) measured hourly air temperature and rainfall in Thiverval-Grignon, France (48°51'N, 1°58'E) during ten years (1996-2006).

Moreover, an experiment was carried out in Thiverval-Grignon, France in 2006. Wheat (*Triticum aestivum* L.) was sown in a deep silt loam soil with a density of 250 pl m⁻². Rain conditions coupled with the deep soil prevented plant water stress. Three contrasted cultivars (Cap Horn, Autan, Soisson) were sown; they essentially differ from their leaf angle distribution and tillering. Two nitrogen regimes were used: optimal (three applications: Zadoks growth stage (GS) 25, 30, 55) and low (two applications: GS25, GS30). Figure 1 presents the temporal evolution of the leaf area index (LAI) for the six treatments. Classically, nitrogen influenced greatly LAI (differences greater than 2 between low and optimal regimes). Differences between cultivars were smaller. Within the canopy, air temperature was measured using very thin thermocouples (wire diameter of 60.10-6 m). Measurements were made at three heights (0.1, 0.2, 0.35 m). For a given height, five thermocouples were attached at regular intervals to a 1-m long thin nylon thread placed parallel to the rows.

Figure 1: Temporal evolution of the leaf area index during the 2006.

(Dynamique de l'indice foliaire durant l'expérimentation de 2006)



Disease models at leaf scale

To simulate epidemics several processes at organ scale have to be integrated to plant and canopy scale (Audsley *et al.*, 2005; Magboul *et al.*, 1992; O'Callaghan *et al.*, 1994; Papastamati and Bosch, 2007; Robert *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 1997; Xu, 2003). Most of them depend on temperature, *e.g.*, infection (Magarey *et al.*, 2005), dormancy (Lovell *et al.*, 2004), growth lesion, sporulation (Lalancette *et al.*, 2003; McGregor and Manners, 1985; Rossi *et al.*, 2002), etc.

In this first study, we have focused on two processes at leaf scale: the infection and dormancy process of three wheat foliar diseases, *Septoria tritici* (leaf blotch), *Puccinia striiformis* (yellow rust), and *Erysiphe graminis* (powdery mildew), as described in the synthesis model of Audsley *et al.* (2005). As different mathematical functions have been proposed to model the responses to temperature, we have chosen the generic model of infection of Magarey *et al.* (2005) as an alternative to (Audsley *et al.*, 2005).

The sensitivity of these infection models to temperature was estimated by calculating the rate of visible lesion P_i . P_i is the proportion of incoming spores becoming visible lesions on a given leaf at a given day i . It is calculated by combining the rate of infection calculated each day from the starting day 0 to day i and the related latent period. It assumed no spore limitation for infection, that is spores arrived continuously every day. This will be refined in future by coupling it with a model of spore dispersal. Thus,

$$P_i = L_i / S_i \quad (1)$$

where L_i is the number of visible lesion at day i and S_i is the number of spores arrived between day 0 and day i , day 0 being chosen in this study as DOY 123.

$$L_i = \sum_{j=0}^i \text{infect}(R_j, T_j) \cdot \text{latent}(TT_{ji}) \quad (2)$$

where *infect()* is the infection function described in (Audsley *et al.*, 2005; Magarey *et al.*, 2005), *latent()* is the latency function described in (Audsley *et al.*, 2005; Lovell *et al.*, 2004), R_j and T_j are the daily rainfall and average temperature, and TT_{ij} is the thermal time between day j and day i .

These equations have been efficiently implemented using matrix calculation with the Scilab software (<http://www.scilab.org/>).

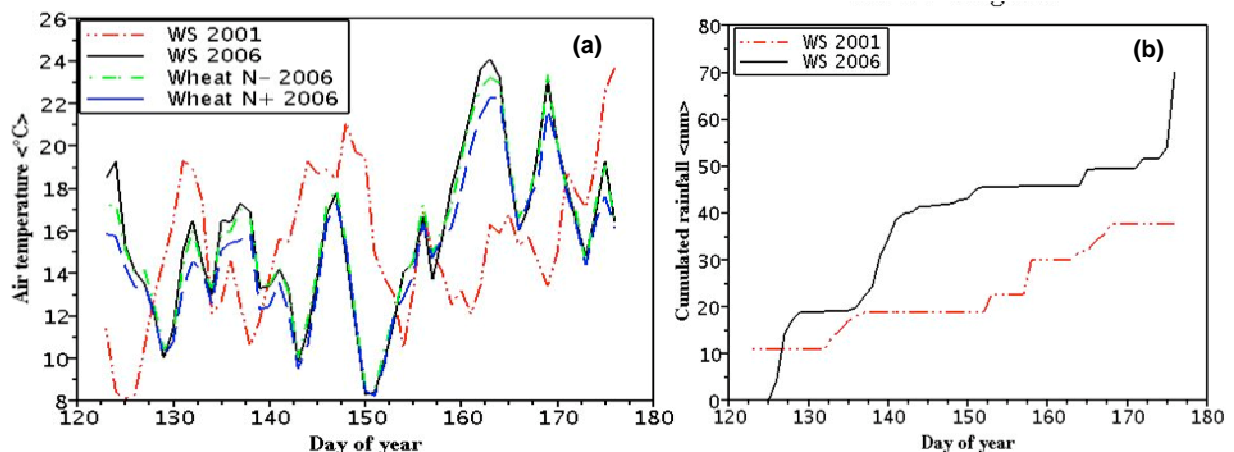
RESULTS AND DISCUSSION

Air temperature

Both temperature and rainfall from weather station had very contrasted patterns in the 10-year dataset measured at Grignon. For this study, we chose year 2001 and 2006, which represented very distinct years (Fig. 2). Within-canopy temperature differs lowly between the 6 treatments. Differences between nitrogen treatments (RMSD=1.2°C) were greater than cultivar treatments (RMSD=0.5°C), despite the visual differences between them. This is mainly explained by the differences in terms of LAI (Fig. 1) that were greater between nitrogen treatments than the cultivar ones. For simulation, we chose temperature measured in the N- and N+ x cultivar Autan treatments.

Figure 2: Temporal evolution of (a) air temperature and (b) rainfall in year 2001 and 2006; temperature being measured in weather station (WS) and within two wheat canopies (under low (N-) and optimal nitrogen (N+) regime).

(Évolution temporelle (a) de la température d'air et (b) des précipitations au cours de l'année 2001 et 2006, la température étant mesurée par la station météorologique (WS) et au sein de deux couverts de blé ayant eu un apport faible (N-) et optimal d'azote (N+))



Sensitivity to temperature of epidemiological processes at leaf scale

We compared the sensitivity of epidemiological model presented in the previous section to temperature using measurement from weather station (WS2001 and WS2006) and from thermocouples located within two wheat canopies (cv. Autan x N- and N+ regimes). Fig 3ab and 4 presents the temporal evolution of P_i in the case of powdery mildew, yellow rust, and leaf blotch, respectively. Powdery mildew was little sensitive to temperature and rainfall differences (Fig. 3a). Yellow rust had distinct behaviors between WS2001, 2006N+, and WS2006, but not quite between WS2006 and N-2006 (Fig. 3b). The year effect confirmed well-known observations in epidemiology. However, the significant differences between N+ and N- treatments, which can be explained by an amplification of the small differences in temperature by the non-linear infection model, raises the question of which air temperature measured to drive yellow rust epidemics? The sensitivity of leaf blotch to temperature depended on the used infection model. Using equations from Audsley *et al.* (2005), only effect of year appeared (Fig. 4a). This can be explained by the fact that the infection model is only driven by rainfall, temperature driving only dormancy.

On the contrary, the infection of Magarey *et al.* (2005), which depends on temperature, showed the same trend as the yellow rust model (Fig. 4b). This raises the question of the choice of elementary functions, such as infection, when building an epidemiological model.

Figure 3: Temporal evolution of the rate of visible lesions of powdery mildew (a) and yellow rust (b) calculated using temperature measured by weather station (WS) and within two wheat canopies (under low (N-) and optimal nitrogen (N+) regime).

(Évolution temporelle de la probabilité de visibilité des lésions d'oïdium (a) et de rouille jaune (b) calculée à partir de la température d'air mesurée par la station météorologique (WS) et au sein de deux couverts de blé ayant eu un apport faible (N-) et optimal d'azote (N+))

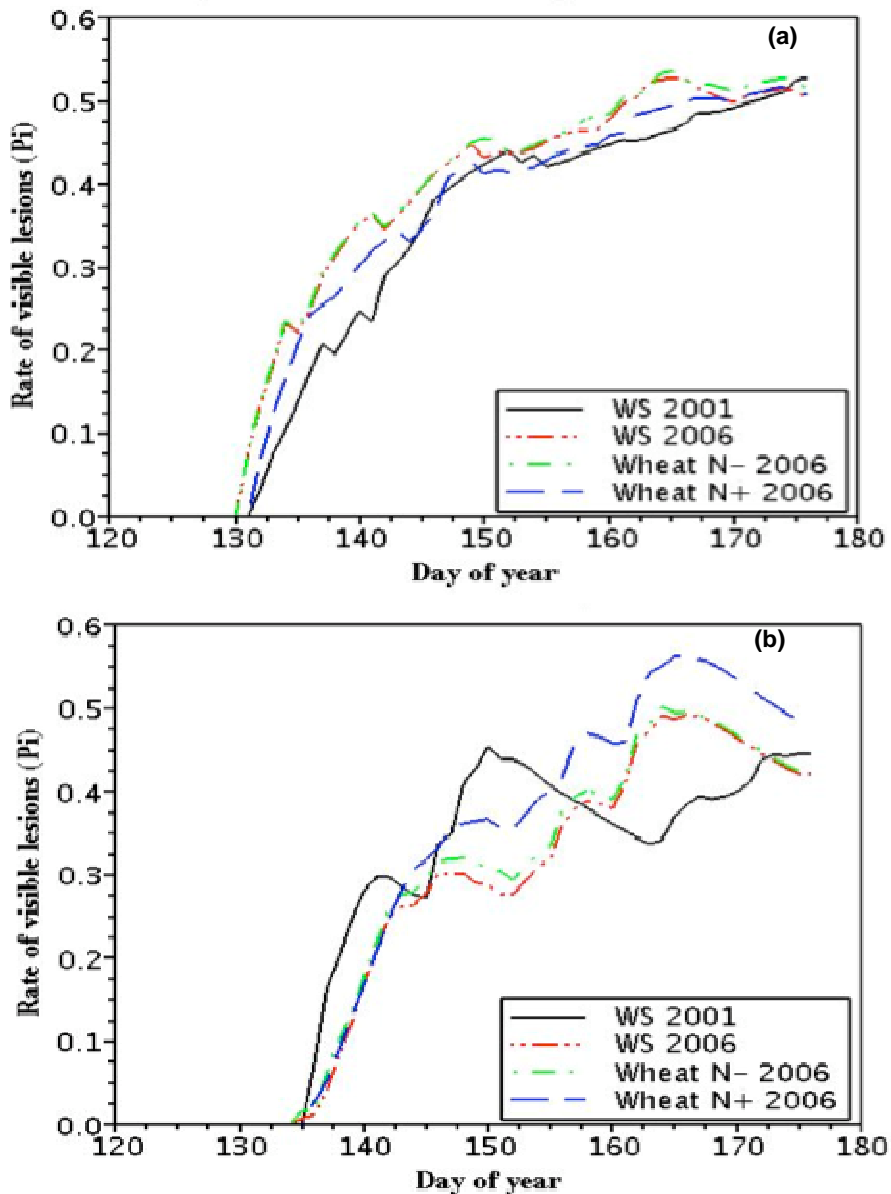
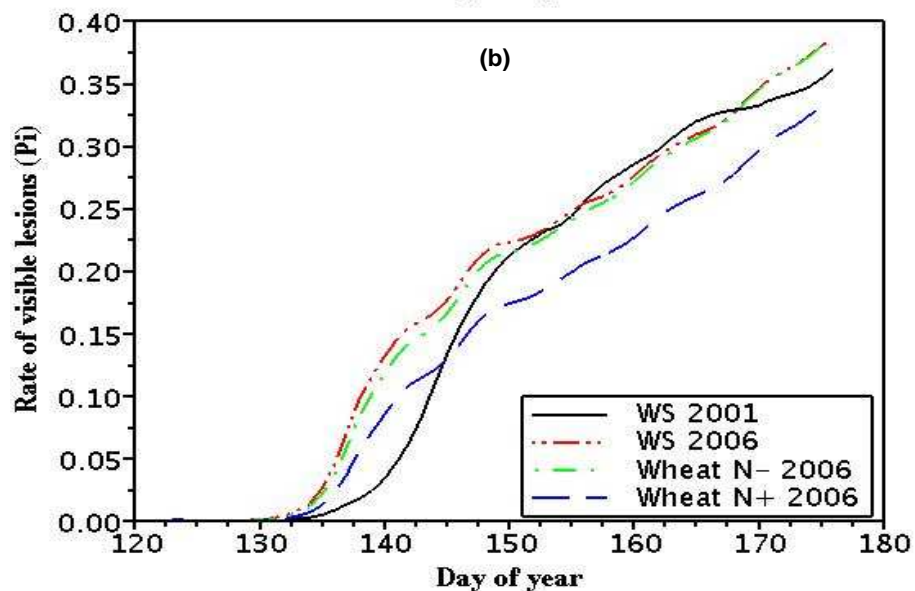
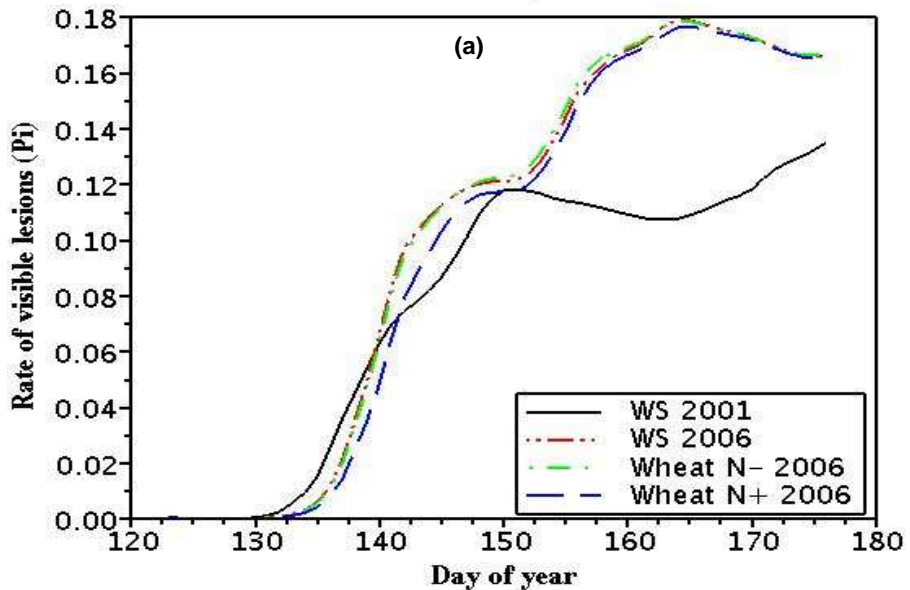


Figure 4: Temporal evolution of the rate of visible lesions of leaf blotch calculated by (a) Audsley et al. (2005) and (b) Magarey et al. (2005) calculated using temperature measured by weather station (WS) and within two wheat canopies (under low (N-) and optimal nitrogen (N+) regime).

(Évolution temporelle de la probabilité de visibilité de la septoriose calculée par (a) Audsley et al. (2005) and (b) Magarey et al. (2005) à partir de la température d'air mesurée par la station météorologique (WS) et au sein au sein de deux couverts de blé ayant eu un apport faible (N-) et optimal d'azote (N+))



CONCLUDING REMARKS

The first results obtained on a limited microclimatic dataset and number of models have raised the question of the relevance of the air temperature measured in weather station to drive epidemics processes at leaf scale, especially in the frame of the FSPM approach, which emphasizes the role of canopy architecture. Due to the non-linearity of epidemiological models, first, simulations are required to better understand the complex effects of microclimate on epidemics. Second, even small differences in air temperature generated differences in epidemics. Thus, it raises the question of the relevance of air temperature compared to leaf temperature, which is the actual temperature driving plant-pathogen inter-actions, as already shown (Jimenez, 1996). Moreover, the response to temperature are often established in controlled conditions (constant temperature regime), but they are integrated in models to simulate the field case (fluctuating temperature regime), which can generate bias, as shown by Rossi *et al.* (2002) for four fungi causing head blight of wheat.

Short-term perspectives are the continuation of this study by enlarging it to other conditions and processes. This could be easy in porting these models on the OpenAlea platform (Pradal *et al.*, 2008). This would facilitate the coupling between the epidemiological leaf models and FSPMs, *e.g.*, (Robert *et al.*, 2008).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Alain Fortineau and Olivier Maury for their technical assistance. This study was funded by the French ministry of agriculture (CASDAR).

REFERENCES

- Audsley, E., Milne, A. and Paveley, N., 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. . *Annals of Applied Biology*, 147(2): 161-172.
- Chungu, C., Gilbert, J. and Townley-Smith, F., 2001. Septoria tritici blotch development as affected by temperature, duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. *Plant Disease*, 85(4): 430-435.
- Hallaire, M., Rapilly, F. and Pauvert, P., 1969. Effets de l'irrigation sous ses différents modes sur la biologie, l'étiologie et l'épidémiologie des maladies des plantes. *Annales de phytopathologie*, 1: 9-29.
- Henze, M., Beyer, M., Klink, H. and Verreet, J.A., 2007. Characterizing meteorological scenarios favorable for Septoria tritici infections in wheat and estimation of latent periods. *Plant Disease*, 91(11): 1445-1449.
- Jimenez, O., 1996. Relationship between air temperature and the temperature of the youngest leaf in plantain (*Musa AAB*). An analysis applied to black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*). *CORBANA*, 21(46): 115-127.
- Lalancette, N., Foster, K.A. and Robison, D.M., 2003. Quantitative models for describing temperature and moisture effects on sporulation of *Phomopsis amygdali* on peach. *Phytopathology*, 93(9): 1165-1172.

- Lovell, D.J., Hunter, T., Powers, S.J., Parker, S.R. and Bosch, F.v.d., 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant pathology*, 53(2): 170-181.
- Magarey, R.D., Sutton, T.B. and Thayer, C.L., 2005. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 95(1): 92-100.
- Magboul, A.M., Geng, S., Gilchrist, D.G. and Jackson, L.F., 1992. Environmental influence on the infection of wheat *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*, 82(12): 1407-1413.
- McGregor, A.J. and Manners, J.G., 1985. The effect of temperature and light-intensity on growth and sporulation of *Puccinia striiformis* on wheat. *Plant Pathology*, 34(2): 263-271.
- O'Callaghan, J.R., Dahab, M.H., Hossain, A.H.M.S. and Wyseure, G.C.L., 1994. Simulation of Septoria tritici-winter wheat interactions. *Computers and Electronics in Agriculture*, 11(4): 309-321.
- Papastamati, K. and Bosch, F.v.d., 2007. The sensitivity of the epidemic growth rate to weather variables, with an application to yellow rust on wheat. *Phytopathology*, 97(2): 202-210.
- Parker, S.R., Paveley, N.D., Foulkes, M.J., Lovell, D.J., Welham, S.J. and Worland, A.J., 2002. Improving and exploiting self-defence against wheat diseases., The BCPC Conference: Pests and diseases. British Crop Protection Council; Farnham; UK, Brighton, UK,, pp. 919-924.
- Pradal, C., Dufour-Kowalski, S., Boudon, F., Fournier, C. and Godin, C., 2008. OpenAlea: a visual programming and component-based software platform for plant modelling. *Functional Plant Biology*, 35(9/10): 751-760.
- Robert, C., Bancal, M.O., Nicolas, P., Lannou, C. and Ney, B., 2004. Analysis and modelling of effects of leaf rust and Septoria tritici blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany*, 55(399): 1079-1094.
- Robert, C., Fournier, C., Andrieu, B. and Ney, B., 2008. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a Septoria tritici epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture *Functional Plant Biology*, 35(9/10): 997-1013.
- Rossi, V., Patteri, E., Ravanetti, A. and Giosuè, S., 2002. Effect of constant and fluctuating temperature regimes on sporulation of four fungi causing head blight of wheat. *Journal of plant pathology*, 84(2): 95-105.
- Rossi, V., Racca, P., Giosue, S., Pancaldi, D. and Alberti, I., 1997. A simulation model for the development of brown rust epidemics in winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 103(5): 453-465.
- Xu, X., 2003. Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7): 683-689

**SEPTO3D: UN MODELE POUR ANALYSER LES EFFETS DE LA STRUCTURE DES
COUVERTS DE BLE SUR LES EPIDEMIES DE SEPTORIOSE**

C. ROBERT⁽¹⁾, B. ANDRIEU⁽¹⁾, C. FOURNIER⁽²⁾, D. GOUACHE⁽³⁾, P. GATE, B⁽³⁾. B. NEY⁽¹⁾

⁽¹⁾ INRA, UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon, France
AgroParisTech, UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon, France

⁽²⁾ INRA, UMR 759 LEPSE, F-34060 Montpellier, France
SupAgro, UMR 759 LEPSE, F-34060 Montpellier, France

⁽³⁾ Arvalis – Institut du Végétal, F-78280 Guyancourt, France

RÉSUMÉ

Les techniques culturales, en modifiant le développement des couverts végétaux influencent le développement des pathogènes qui s'y développent. Pour comprendre ces effets nous avons développé un modèle couplant un modèle de simulation du développement du couvert de blé (3D) et un modèle épidémique de septoriose. Cette maladie est causée par le champignon *Mycosphaerella graminicola* qui est dispersé lors des pluies par des éclaboussures. Le modèle simule le développement des lésions depuis les feuilles du bas du couvert vers celles du haut au fur et à mesure que le couvert se développe. Nous avons utilisé le modèle pour comparer l'effet de différents traits architecturaux sur les épidémies. Nous discutons le potentiel d'application de ce type d'approche.

Mots-clés : échappement, architecture, maladie foliaire, maladies fongiques, modélisation

SUMMARY

Crop management techniques can modulate the development of crop plants and thus impact the conditions of live of plant pathogens. In order to understand these effects, we have developed a model that links the simulation in 3D of a wheat canopy with a model of septoriose epidemics. Septoriose is caused by the fungus *Mycosphaerella graminicola*, which propagates during rain events, as it is transported by splashing. The model simulates the propagation of the disease from the lower leaves to the new leaves that emerge higher in the canopy as the plants develop. We used the model to assess the effect of various architectural traits on the epidemics. Finally, we discuss the potential of the approach for understanding and increasing escape mechanisms

Key words: escape, architecture, septoriose, foliar disease, fungal disease, modelling

INTRODUCTION

Les objectifs retenus lors du Grenelle de l'Environnement en 2007 sont de réduire de moitié l'utilisation des pesticides d'ici 10 ans. Il est désormais crucial d'associer la lutte chimique à l'utilisation des variétés résistantes ou tolérantes et à la régulation des bio-agresseurs par des techniques culturales. Ando et al. (2007) proposent d'utiliser l'architecture des peuplements comme source d'échappement des cultures aux maladies. Pour cela il est nécessaire d'identifier et de quantifier l'effet de certaines caractéristiques du couvert sur les épidémies.

Sur notre pathosystème, des études révèlent des effets de la structure des couverts de blé sur la septoriose. Dans les années 70, Eyal (1971) note que l'introduction des variétés de blé naines coïncide avec une explosion des problèmes liés à la septoriose. Bahat et al. (1980) l'expliquent par un effet échelle : plus les feuilles successives sont proches, plus la propagation du parasite vers le haut est facilitée. Shaw et Royle (1993) observent des niveaux de septoriose plus élevés pour des semis de blé plus précoces. Ils supposent que le plus fort tallage hivernal, la plus faible vitesse d'extension de la tige et la plus longue durée de vie des feuilles pourraient expliquer l'augmentation de la maladie. Mais leurs travaux ne permettent pas de décorréler ces effets. Plus récemment, Lovell et al. (1997 and 2004) démontrent que l'infection des nouvelles feuilles dépend de leur localisation par rapport aux feuilles plus âgées déjà infectées. Ainsi les effets de la structure des couverts sont complexes et difficiles à décorréler dans les expérimentations au champ.

Une approche de modélisation paraît judicieuse afin de comprendre ce système complexe. Nous avons développé un modèle qui simule de manière dynamique le développement du couvert et le développement épidémique. Des analyses de sensibilité permettent d'identifier et de hiérarchiser les traits de structure du couvert qui réduisent les épidémies.

PRESENTATION DE LA SEPTORIOSE ET DES CHOIX DE MODELISATION

DEROULEMENT DES EPIDEMIES DE SEPTORIOSE.

Les agents pathogènes des septorioses du blé (*Septoria tritici* et *Septoria nodorum*) sont des champignons ascomycètes. Actuellement *S. tritici* domine et c'est la forme considérée dans ce travail. Son agent pathogène, *M. graminicola* alterne les formes sexuées et asexuées au cours du développement de la maladie. La maladie apparaît en automne avec la forme sexuée : les ascospores, provenant des débris de culture sont la source essentielle de l'inoculum primaire. Ensuite, c'est la forme asexuée, les pycnidiospores, qui assure l'infection de la plante pendant la saison de culture.

Déroulement du cycle infectieux. Il inclue les étapes depuis l'adhésion des spores sur la feuille jusqu'à la sporulation du champignon. *M. graminicola* est héli-biotrophe : la première partie de son cycle est biotrophe mais la sporulation s'effectue sur des tissus morts.

Après la pénétration du champignon dans la feuille, le champignon progresse d'abord lentement au sein de la feuille avec une faible destruction des cellules. C'est la période biotrophe d'incubation, durant laquelle la feuille ne présente aucun symptôme visible. La fin de cette période est caractérisée par une amplification de la croissance mycélienne qui s'accompagne de la destruction des parois des cellules végétales. Les symptômes chlorotiques apparaissent sur les feuilles. Puis les hyphes reproducteurs se développent activement, les chloroses deviennent nécroses et la phase nécrotrophe débute. Elle s'accompagne de la formation des pycnides et de la sporulation.

Dispersion par éclaboussures. La maladie se propage verticalement au cours de la saison de culture, des feuilles infectées situées à la base des plantes vers les nouvelles feuilles qui apparaissent plus haut dans le couvert.

Le transport des spores a lieu lors des pluies, par les éclaboussures. Les pycnides produisent des pycnidiospores dans des gelées sporifères appelées les cirrhes. Les spores sont libérées lors des pluies. Elles sont en partie intégrées et dispersées dans les

éclaboussures provoquées par la pluie et en partie perdues par lavage des feuilles. L'intensité des pluies joue sur le nombre et la distribution des gouttelettes (Rapilly et Jolivet, 1976 ; Pietravalle et al. 2001 ; Saint-Jean et al. 2004) et donc sur l'efficacité de la pluie pour la propagation de la maladie.

Interaction avec l'architecture. Royle et al. (1986) ont montré que la dispersion par éclaboussure est un facteur limitant de la progression de la maladie, du fait de la longue période de latence du champignon. Cette longue période de latence a deux conséquences: (1) pour obtenir des sévérités élevées de maladie, il faut que les feuilles soient infectées tôt, sinon *M. Graminicola* n'a pas le temps de finir son cycle infectieux avant la mort naturelle des feuilles et (2) comme le laps de temps entre la sortie des feuilles successives est plus court que la période de latence, il est possible que les feuilles du haut du couvert arrivent hors de portée d'éclaboussures avant que les lésions de la base du couvert ne sporulent. Ces deux phénomènes forment la base des interactions entre architecture du couvert et développement de la septoriose.

PARTI PRIS POUR LA MODELISATION DES EPIDEMIES.

Concernant la modélisation du cycle infectieux, nous simulons les différentes étapes : germination, incubation, latence, production de spores et vidage des lésions. Il existe une assez bonne connaissance du développement et de la croissance des lésions de septoriose et des facteurs climatiques qui les influencent. Pour notre modèle, nous avons pris en compte les effets principaux du climat sur les différentes parties du cycle : l'humidité et l'éclairement déterminent la germination, la température module les durées d'incubation et de latence et enfin l'intensité des pluies détermine le vidage des lésions sporulantes. Nous ne considérons pas dans un premier temps l'effet du niveau de résistance ou de l'état physiologique des organes sur le cycle infectieux. Le seul effet pris en compte est celui de la sénescence des feuilles qui recouvre les lésions incubantes et donc stoppe le développement du cycle.

Concernant la dispersion des spores, nous modélisons la propagation de la maladie depuis les feuilles du bas vers les feuilles du haut du couvert, à partir de conditions initiales qui miment une intensité d'infection sur les 3 premières feuilles du couvert. Nous considérons la dispersion des pycnidiospores par éclaboussement lors des pluies via la simulation du transport des gouttelettes infectieuses qui contiennent les spores. L'intensité et la durée des pluies déterminent le nombre de gouttelettes infectieuses qui peuvent participer à la dispersion. On ne modélise pas le nombre total de spores : on considère qu'une gouttelette infectieuse produit une nouvelle lésion si elle atteint des tissus verts et que les conditions climatiques sont bonnes..

PRESENTATION DE L'ARCHITECTURE DU BLE ET DES CHOIX DE MODELISATION

MISE EN PLACE DE L'ARCHITECTURE.

Une plante de blé pleinement développée est constituée d'un ensemble d'axes (ou talles) qui comportent chacun une partie végétative, la tige feuillée, une partie reproductrice, l'épi et un système racinaire. Le premier axe formé est appelé brin maître ; les autres axes sont des ramifications issues du brin maître. La figure 1 présente un axe qui a atteint sa taille finale. La tige feuillée est formée d'un empilement de modules, les phytomères. Chaque phytomère est potentiellement constitué, du bas vers le haut, d'un nœud portant un bourgeon axillaire et des racines nodales, d'un entre-nœud, d'une gaine foliaire et d'un limbe foliaire. Les phytomères inférieurs n'ont pas d'entre-nœuds allongés et les nœuds exposés à la lumière ne portent pas de racines.

Principales phases du cycle de développement. Le blé d'hiver est semé en automne. Suite à la levée et typiquement jusque au mois de mars, la jeune plante forme des feuilles, et des

talles issues de la tige primaire. La tige ne s'allonge pas et les feuilles sont insérées à la base de la plante. A l'issue de cette phase, l'ensemble des feuilles a été initié, mais les plus jeunes ne sont pas visibles. La phase suivante est la montaison, au cours de laquelle se produit l'élongation de la tige, sous l'effet de régulateurs de croissance émis par l'épi en formation. Durant cette phase, chaque nouvelle feuille qui apparaît va, après avoir fini son extension, s'élever au dessus de la feuille précédente du fait de l'élongation de l'entre-nœud. Cette élévation va influencer sur la contamination de la septoriose de feuille à feuille. Après que les entre-nœuds végétatifs soient tous allongés, l'extension du pédoncule de l'épi, conduit à l'émergence de celui-ci (épiaison) puis à la floraison. Après floraison, la plante a atteint sa taille adulte et la structure du peuplement n'évolue plus que par la mort successive des feuilles. Au cours de cette phase, les ressources stockées dans les parties végétatives et celles nouvellement acquises sont affectées au remplissage des grains.

Figure 1. Drawing of a wheat culm around flowering (a); the basal leaves, associated with phytomers having short internodes are dead, thus only four phytomers, having long internodes, are clearly seen. Détail of a phytomer (b), after Moore and Moser, 1995

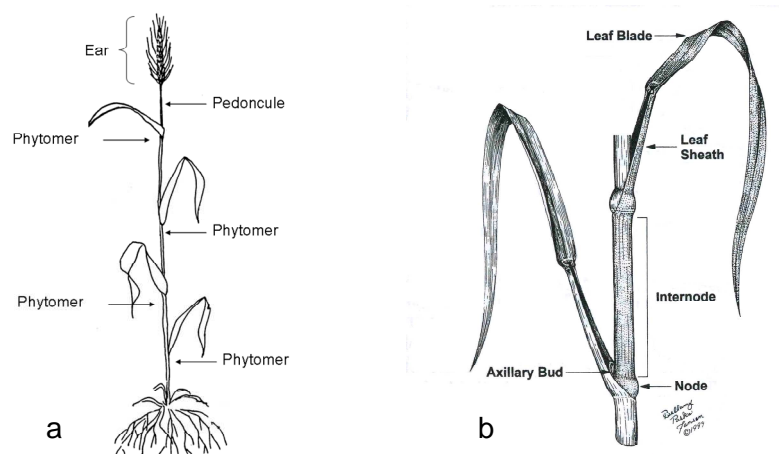
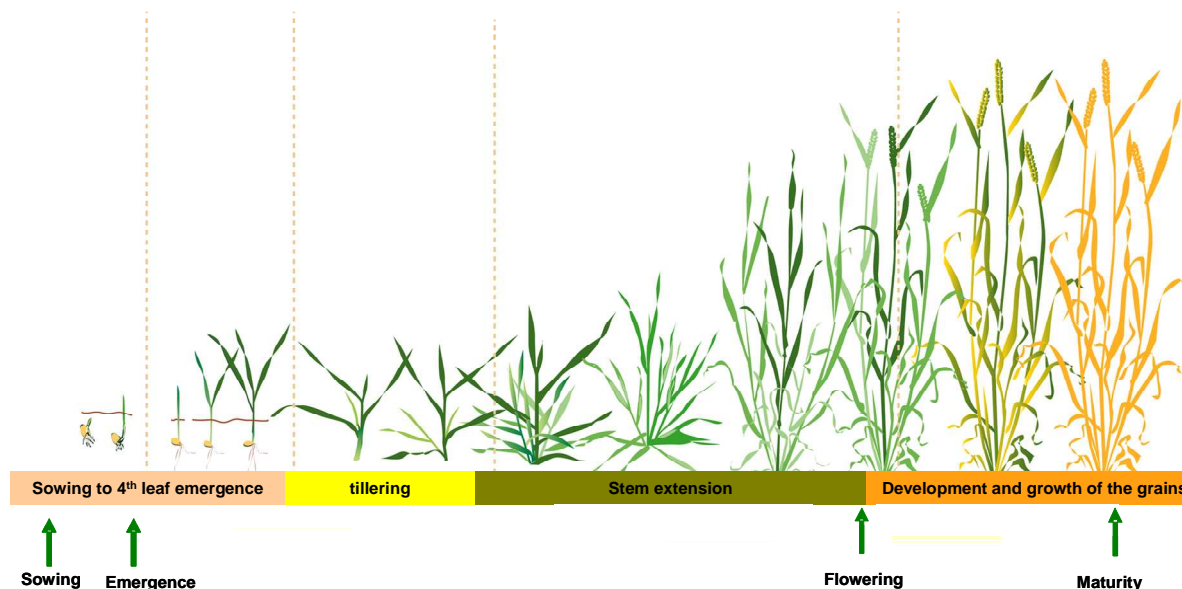


Figure 2. Main stages in the development of a wheat plant (adapted from Slafer and Rawson, 1994).



Quels sont les degrés de libertés ? L'organisation décrite précédemment est générique, et partagée avec de nombreuses autres céréales. Il existe toutefois une variabilité génotypique qui interagit avec la variabilité climatique et les ressources disponibles pour déterminer une plasticité de l'architecture au sein du cadre précédemment décrit. Cette plasticité peut moduler fortement le développement des épidémies.

- un aspect essentiel est la régulation de la dynamique dans le temps : la date de semi détermine le point de départ du cycle ; la température et la photopériode régulent la vitesse de formation des organes, et finalement la durée séparant l'émergence de deux feuilles successives. Elles déterminent également les transitions développementales majeures (formation de l'épi lorsque les besoins de photopériode et vernalisation sont satisfaits). Ces régulations sont un élément majeur de la « course » entre la plante et le pathogène. En outre, déterminant les vitesses et les moments de transitions, ces régulations déterminent le nombre de phytomères constituant la plante adulte.

- un second aspect important est la régulation du nombre d'axes et des dimensions des organes. Le nombre de talles formées par plante est fortement variable en fonction de la densité de semi et des conditions de nutrition minérale. Les différences de densité de semis sont compensées par le tallage, et ont peu d'incidence sur le nombre de brins par m² à floraison, mais elles conduisent à des différences dans l'évolution du nombre d'axes au cours du temps. La nutrition hydrique et minérale module le nombre de talles formées, ainsi que les dimensions des feuilles et des entre-nœuds. La hauteur des tiges est manipulée également par l'utilisation de raccourcisseurs. Cet ensemble de degrés de libertés module la dynamique au cours du temps de l'indice foliaire et de la hauteur du couvert, et donc la quantité de tissus disponible pour le développement des maladies, ainsi que les distances entre organes.

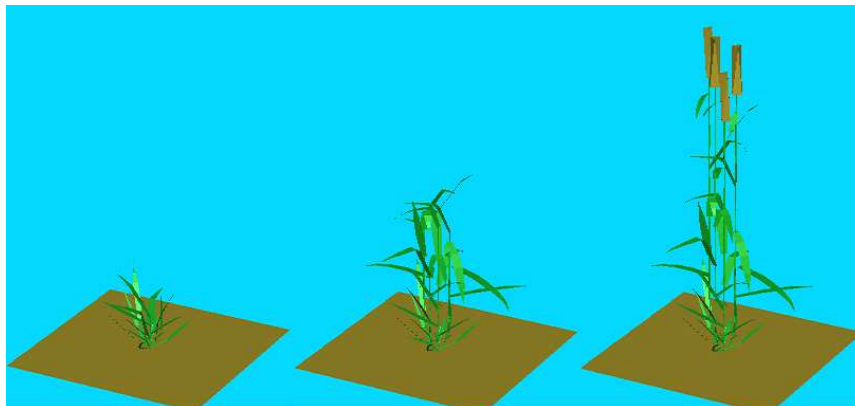
- Finalement les conditions de nutrition hydriques et minérales vont déterminer aussi la teneur des tissus en éléments nutritifs (carbohydrates et azote) ainsi que les durées de vie des feuilles, et donc les ressources disponibles pour les pathogènes, comme pour le remplissage des grains

PARTI PRIS POUR LA MODELISATION DE LA PLANTE.

Il existe donc une bonne connaissance du schéma de développement de la plante, des degrés de libertés dans la construction de l'architecture, des facteurs environnementaux qui influent ces degrés de libertés et des ordres de grandeurs des réponses à ces facteurs (voir Mc Master 2005 pour une synthèse récente). Les connaissances sur le développement des maladies

permettent d'émettre des hypothèses sur les degrés de libertés les plus déterminants pour le développement épidémique. Par contre (i) les connaissances ne sont pas suffisantes pour proposer des modèles mécanistes simulant de façon détaillée les réponses des différentes composantes de l'architecture aux variations environnementales et (ii) les hypothèses sur les degrés de libertés les plus importants pour le développement épidémique restent à tester. La stratégie de modélisation pour la plante a été de réaliser un modèle utilisant conjointement des connaissances et des mesures expérimentales de façon à simuler en 3D de façon réaliste une large gamme possible de peuplements. Le modèle ADEL-blé (Fournier et al. 2003) utilise le formalisme des L-systèmes (voir Prusinkiewicz 2004 pour une synthèse) pour décrire de façon détaillée la dynamique 3D de l'architecture, par un ensemble de modules simulant explicitement l'organisation botanique en axes et phytomères décrites précédemment. Le modèle formalise les connaissances disponibles sur les coordinations temporelles invariantes dans la construction de la plante et s'appuie sur des paramétrisations empiriques de grandeurs telles que le nombre, la dimension et la forme des organes adultes puisque les connaissances sont insuffisantes pour une simulation mécaniste. Dans l'état actuel du modèle, on ne considère pas les teneurs des tissus en carbone et azote (voir Fournier et al 2007 pour une description de l'état de l'art de ces approches).

Figure 3 : Simulation of a wheat plant at different growth stages using ADEL-wheat model. Parameters for organs size and shape are from Soissons cultivar.

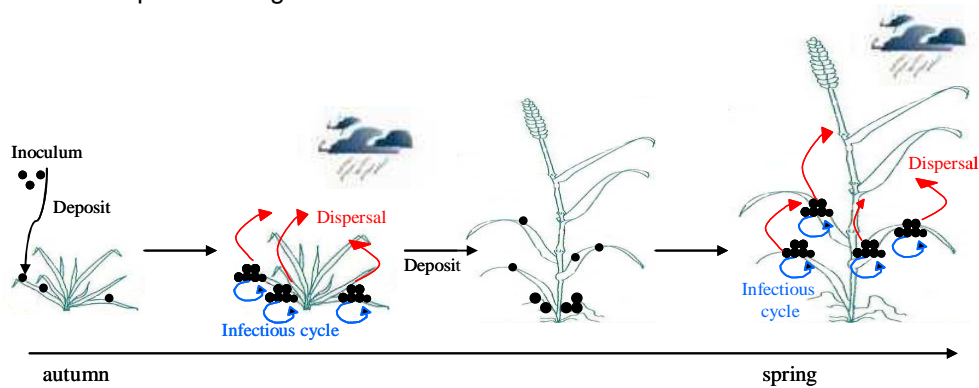


DESCRIPTION DU MODELE SEPTO3D

FONCTIONNEMENT DU MODELE.

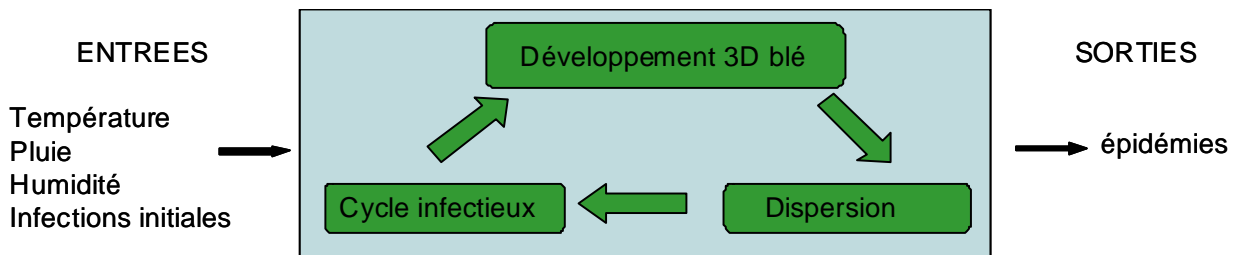
Le modèle Septo3D (Robert et al. 2008) résulte d'un couplage entre le modèle ADEL-blé, et un modèle de dynamique d'épidémie de septoriose inspiré des travaux de Rapilly et Jolivet (1976). Initialisé à partir d'un niveau d'infection défini pour les trois premières feuilles de la plante (infection forcée), le modèle simule le développement de l'épidémie, à partir des feuilles basales infectées vers les feuilles saines du haut du couvert (figure 4).

Figure 4: Development of a polycyclic epidemic resulting from the succession of infection cycles and spores dispersal (from Robert et al., 2008). Epidemics progress from the lower infected leaves to the upper leaves of the plants during rain events.



Le modèle rend compte de trois effets de la structure du couvert sur les épidémies : la quantité de surface foliaire influence la croissance des lésions, la densité de végétation influence la pénétration de la pluie ainsi que la redistribution des gouttelettes après splashing et les distances entre tissus infectés et sains fixent la distance à parcourir pour une nouvelle infection. Le modèle procède itérativement (un pas de temps = 1 jour), en faisant intervenir à chaque pas de temps, 3 modules calculant respectivement: la dispersion des spores, le développement du cycle infectieux sur les feuilles, et le développement des plantes (figure 5).

Figure 5 : Model's structure.

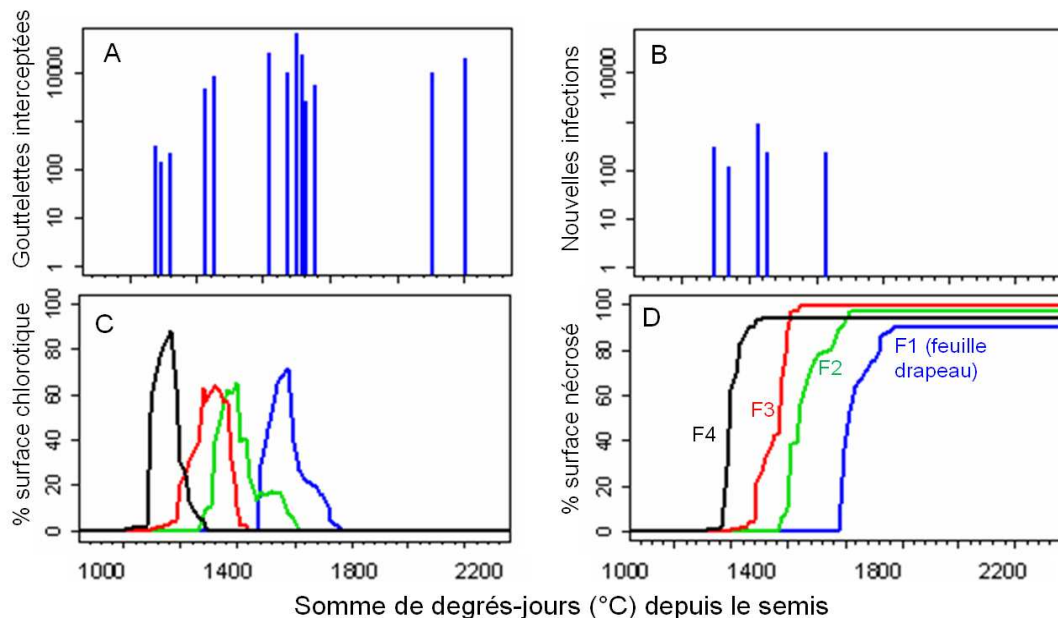


DESCRIPTION DES 3 MODULES

Module Plante. Le module de développement des plantes simule au cours du temps l'apparition des différentes tiges, la croissance des feuilles et des entre-nœuds et la sénescence des feuilles (Hillier *et al*, 2007). Le modèle effectue les calculs sur une plante moyenne, i.e. un brin maître et ses différentes talles. Le couvert est obtenu en dupliquant cette plante moyenne.

Module Cycle infectieux. Ce module simule les étapes depuis le dépôt des spores sur la feuille jusqu'au vidage des lésions sporulantes par les pluies. Les durées des phases d'incubation et de latence dépendent de conditions de température et d'humidité. Après trois pluies reçues par les lésions sporulantes, on considère la lésion vidée de spores. La figure 6 montre un exemple de simulation. Après un évènement pluvieux, le module simule le nombre total de gouttelettes reçu par les feuilles (A). Parmi celles-ci, seules celles tombées sur des tissus sains pourront germer, en outre certaines seront lavées par la pluie. Sous condition d'humidité favorable, les spores germent et provoquent des nouvelles infections (B). Ces infections croissent dans la feuille jusqu'à l'apparition des chloroses (C) qui grandissent puis se transforment en nécroses sporulantes (D).

Figure 6 : Example of simulations plotted over thermal time counted from plant emergence for climate 1998-1998 and initial infection of 20%. A and B show the number of infectious droplets received by flag leaf (F1) and number of induced consequent infections. C and D show proportion of chlorotic and necrotic area in leaves 8 (black line), 9 (red line), 10 (green line) and 11 (blue line). From Robert et al. 2008.



Module Dispersion. Pour modéliser la dispersion des spores lors des pluies, Septo3D estime l'interception de la pluie par les différents étages foliaires et la proportion de pluie qui tombe sur de la surface sporulante et créera donc des gouttelettes contenant des spores.

Le nombre de gouttelettes créées par une pluie est estimé à partir de l'intensité de celle-ci. Puis on simule la redistribution de ces gouttelettes dans le couvert. Leur répartition décroît exponentiellement avec la distance à la source (Pietravalle et al, 2001). Le résultat donne la répartition des gouttelettes infectieuses sur les feuilles.

RESULTATS : SIMULATION DES EFFETS DE TRAITS D'ARCHITECTURE SUR LES EPIDEMIES

Nous avons utilisé notre modèle développé pour réaliser une analyse de sensibilité de l'effet de différents traits architecturaux sur les épidémies. L'objectif est de quantifier et de comprendre comment certains traits du couvert végétal influencent le développement des épidémies. Nous présentons ici les résultats de simulation obtenus pour trois paramètres d'architecture.

PARAMETRES DE L'ANALYSE DE SENSIBILITE

Les trois paramètres d'architecture étudiés sont :

- Le phyllochrone : c'est la durée entre l'apparition de 2 feuilles successives. Changer sa valeur dans le modèle, permet de modifier la vitesse de développement de la plante : plus il est grand, plus la plante pousse lentement. Le phyllochrone a des effets multiples : il modifie le positionnement du cycle par rapport au climat, il modifie les vitesses de croissance des feuilles et des tiges, et modifie aussi la durée de vie des feuilles.
- La longueur finale des entre-nœuds. La longueur des entre-nœuds détermine les distances entre feuilles successives et, plus globalement, la hauteur du couvert. D'après Bahat et al. (1980), des entre-nœuds plus grands diminueraient la réussite de la dispersion d'une feuille vers une autre plus haute, et donc la maladie progresserait moins vite.
- La surface des feuilles. Elle détermine l'espace et le substrat disponible pour la croissance des lésions. Mais elle influence également l'interception des pluies et une surface foliaire élevée peut diminuer la formation de gouttelettes infectieuses au bas du couvert.

L'architecture de référence est un blé, cv. Soissons, cultivé à Grignon à une densité 250 plante/m², avec fertilisation azotée optimale. Les trois paramètres présentés ci-dessus ont été variés de + ou – 30% dans les simulations réalisées par rapport aux valeurs de référence. Les résultats de simulations sont présentés dans la figure 7.

L'analyse a été réalisée sur 2 années climatiques contrastées. La saison 1998-99 a été très favorable alors que 2002-2003 a été sèche et donc très défavorable à la septoriose. Les niveaux d'infection initiaux utilisés sont de 5% sur les trois premières feuilles du couvert. Les trois paramètres présentés ci-dessus ont été variés de + ou – 30% dans les simulations présentées dans la figure 7.

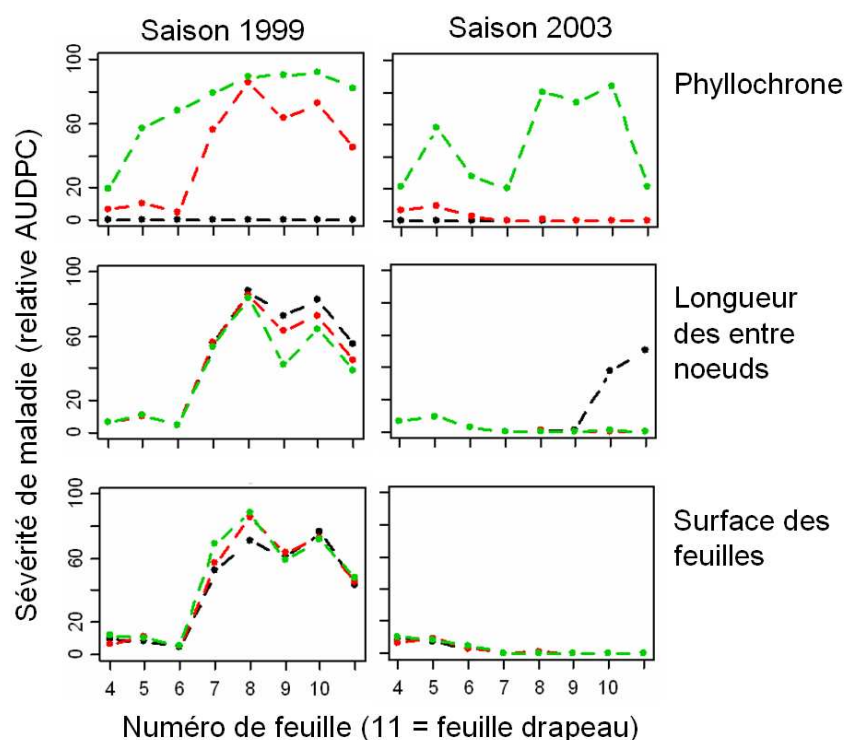
RESULTATS DE L'ANALYSE DE SENSIBILITE

Phyllochrone. Dans les simulations, changer la valeur du phyllochrone a un effet très fort sur le développement de la maladie pour toutes les feuilles et les 2 climats étudiés. Avec une valeur de phyllochrone réduite, les épidémies sont drastiquement diminuées dans le climat favorable.

Longueur des entre nœuds. Dans les simulations, l'effet de la longueur des entre nœuds n'est visible que sur les dernières feuilles du couvert, ce qui est logique car les premières feuilles sont organisées en rosette. L'effet simulé est assez faible.

Surface des feuilles. Changer la surface des feuilles n'influe pas le développement épidémique dans le cas du climat très défavorable. L'effet est un peu plus marqué dans le climat favorable. Il s'exprime sur les feuilles du milieu du couvert.

Figure 7: Vertical axis: leaf diseased severity expressed in normalised AUDPC (Area Under Disease Progress Curve). Horizontal axis: leaf position (4-11). Each column represents one climate (1999 and 2003). Each row represents simulation obtained when using 3 values of one canopy trait: phyllochron (row 1), internodes length (row 2) and leaf size (row 3). Colours indicate the change in the canopy trait: red: reference value, green: increased value (130%) and black: decreased value (70%).



DISCUSSION

Le travail réalisé jusqu'à présent montre, par l'exemple, la capacité du modèle à intégrer à l'échelle du couvert les processus épidémiques, décrits à un niveau suffisamment fin pour analyser comment chaque trait architectural contribue à les moduler et donc constitue éventuellement une cible pour l'amélioration génétique. En réponse aux variations environnementales et aux pratiques culturales, les changements dans les différents traits sont corrélés. Un des axes de travail en cours est de définir les protocoles expérimentaux optimisés de façon à pouvoir acquérir au moindre coût les informations nécessaires pour simuler de façon réaliste la structure de peuplement réalisée au cours d'une expérimentation. Ainsi le modèle pourra être un outil essentiel pour améliorer notre capacité d'analyse des expérimentations.

Des travaux en cours ont pour objectif de confronter le modèle Septo3D à des données expérimentales. En collaboration avec ARVALIS nous testons le modèle dans des conditions de date et de densité de semis variées. Nous allons également tester Septo3D pour des variations d'architecture liées à la variété de blé dans la collaboration avec l'institut ADAS (UK). Par l'introduction des gènes de la famille *rht* (gènes de nanisme) ils ont en effet obtenu des lignées de blé qui varient considérablement pour la longueur des entre-nœuds, la longueur et la posture des feuilles.

Dans une optique plus large, nous avons pour ambition d'identifier des stratégies de traitement fongicide associées à des architectures échappantes. Pour une application plus réaliste, nous allons également élargir le pathosystème considéré en considérant le complexe parasitaire foliaire dans son ensemble.

CONCLUSION

Le travail réalisé a permis de proposer un nouveau cadre de modélisation des interactions plantes pathogènes, la nouveauté est de s'appuyer sur un « grain » de description plus fin que les approches usuelles. Nous avons montré la possibilité de ce changement d'échelle et commencé à démontrer son utilité pour la compréhension des processus d'échappement. A court terme, des compléments de validation sont nécessaires ; ils sont en cours, ainsi que les développements méthodologiques destinés à faciliter la simulation d'une gamme d'architectures.

Il est peu probable que des architectures optimisées soient suffisantes à elle seules pour garantir un faible risque épidémique, mais l'utilisation de couverts échappants est cependant une piste pour diminuer l'utilisation des pesticides. Les projets d'utilisation du modèle visent également à analyser l'apport potentiel de combiner plusieurs méthodes de lutte : A partir de description simple de l'effet d'un traitement fongicide sur le champignon, nous comptons analyser dans quelle mesure l'échappement partiel peut permettre de réduire les doses ou les nombres de traitements.

A moyen terme, il s'agira aussi de compléter les processus pris en compte, par exemple : est-ce que la teneur en carbone et azote des feuilles joue un rôle important dans le développement de la septoriose ? Il s'agira également d'intégrer plus de connaissances, par exemple : intégrer des lois de réponse de l'architecture au climat, plutôt que d'estimer les paramètres à partir d'expériences augmenterait la capacité à simuler des scénarios *de novo*. Le modèle devra être également élargi à d'autres pathogènes, puisque dans la pratique plusieurs maladies interagissent généralement. Dans cette optique, nous comptons aborder dans un premier temps le complexe rouille-septoriose.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Il a été soutenu par le projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et

Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. ». Les auteurs remercient l'ensemble des équipes techniques qui ont permis d'obtenir les données.

BIBLIOGRAPHIE

- Ando K., Grumet R., Terpstra K., Kelly J., 2007 - Manipulation of plant architecture to enhance crop disease control. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2, 26.
- Bahat A., Gelernter I., Brown M.B., Eyal Z., 1980 - Factors affecting the vertical progression of Septoria Leaf Blotch in Short-Statured Wheats. *Phytopathology* 70, 3, 179-184.
- Eyal Z., 1971 - The kinetics of pycnidiospore liberation in *Septoria tritici*. *Canadian Journal of Botany*, 49, 1095-1099.
- Fournier C., Andrieu B., Ljutovac S., Saint-Jean S., 2003 - ADEL-wheat: a 3D architectural model of wheat development. In: B.-G. Hu and M. Jaeger *Plant Growth Modeling and Applications*, Tsinghua University Press and Springer, Beijing, China, 54-66.
- Fournier C., Andrieu B., Buck-Sorlin G.H., Evers J.B., et al., 2007 - Functional-structural modelling of Gramineae. In Vos J., Marcelis L.F.M., deVisser P.H.B., Struik P.C., Evers J.B. *Functional-Structural Plant Modelling in Crop Production*, Springer, Wageningen, The Netherlands, 175-86.
- Hillier J., Watt J., Bertheloot J., Lewis P., Fournier C., Andrieu B., 2007 - Modelling the time course of senescence in winter wheat at the individual leaf and whole plant level. Proceedings of the 5th International Workshop on Functional Structural Plant Models November 4-9, 2007 Napier, New Zealand.
- Lovell D.J., Parker S.R., Hunter T., Royle D.J., Coker R.R., 1997 - Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology*, 46, 1, 126-138.
- Lovell D.J., Parker S.R., Hunter T., Welham S.J., Nichols A.R., 2004 - Position of inoculum in the canopy affects the risk of *Septoria tritici* blotch epidemics in winter wheat. *Plant Pathology*, 53, 1, 11-21.
- McMaster GS., 2005 - Phytomers, phyllochrons, phenology and temperate cereal development. *Journal of Agricultural Science* 143, 137-50.
- Pietravalle S., Van den Bosch F., Welham S.J., Parker S.R., Lovell D.J., 2001 - Modelling of rain splash trajectories and prediction of rain splash height. *Agricultural and Forest Meteorology*, 109, 171-185.
- Prusinkiewicz P., 2004 - Modeling plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 79-83.
- Rapilly F., Jolivet E. 1976 - Construction d'un modèle (episept) permettant la simulation d'une épidémie de *Septoria nodorum* BERK. sur blé. *Revue de Statistique Appliquée*, 3, 31-60.
- Robert C., Fournier C., Andrieu B., Ney B. 2008 - Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology*, 35, 10, 997-1013.
- Roylen D. J., Shaw M.W. and Cook R.J., 1986 - Patterns of development of *Septoria nodorum* and *S. tritici* in some winter wheat crops in Western Europe, 1981- 83. *Plant Pathology*, 35, 4, 466-476.
- Shaw M.W. and Royle D.J., 1993 - Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in the UK. *Plant Pathology*, 42, 882-899.
- Saint-Jean S., Chelle M., Huber L., 2004 - Modeling water transfer by rain splash in a 3D canopy structure by means of Monte Carlo integration. *Agricultural and Forest Meteorology*, 121, 3-4, 183-196.
- Slafer G. A., Rawson H.M., 1994 - Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21, 393-426.

**FACTEURS DE RENDEMENT DU BLÉ TENDRE : MODÉLISATION PAR LES
TECHNIQUES DE L'INTELLIGENCE ARTIFICIELLE**

BOUHARATI S. ^(1,2), HARZALLAH D. ⁽¹⁾, BENMAHAMMED K. ⁽²⁾

Laboratoire de microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences,
UFAS 19000, Algérie.

Laboratoire des systèmes intelligents, Département d'électronique, Faculté des Sciences de
l'ingénieur, UFAS 19000, Algérie.

e.mail : sbouharati@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Comme le rendement en blé tendre d'une parcelle dépend principalement de la nature du sol, il est également résultat du traitement par fongicides. Cependant, et la nature du sol et la répartition des fongicides en doses, se caractérisent par leur incertitude et leur imprécision. L'hétérogénéité du sol est souvent constatée ainsi que la répartition des maladies à l'intérieur même d'une parcelle tel que l'oïdium et la septoriose (*S. tritici*). Dans cette étude, nous avons développé une approche utilisant les techniques de l'intelligence artificielle notamment la théorie de la logique floue dans l'analyse des données. Le rendement par zones enregistré d'une parcelle est considéré comme variable de sortie, tandis que la nature du sol ainsi que les zones traitées en fonction de leur dosage représentent les variables d'entrée du système. Le modèle établi permet de prédire le rendement d'une parcelle en fonction de sa nature du sol et de la dose de la fongicide administrée.

Mots-clés : Blé tendre, sol, fongicides, systèmes experts, systèmes intelligents, inférence à logique floue.

SUMMARY

As the wheat yield of a plot depends on the nature of the soil, it is also a result of treatment with fungicides. However, soil type and distribution of fungicide doses, are characterized by uncertainty and imprecision. The heterogeneity of soil is often found as well as the distribution of diseases within a plot such as powdery mildew and septoria (*S. tritici*). In this study, we developed an approach using the techniques of artificial intelligence in particular, the theory of fuzzy logic in the data analysis. The level of performance in registered parcel is considered as output variable, while the soil and the treated areas according to their strength are the input variables of the system. The model can predict the performance of a parcel according to its soil type and dose of the fungicide administered.

INTRODUCTION

Les rendements en blé tendre dans une région ne peuvent pas être expliqués que par l'aridité du climat. Au plan agronomique, d'autres facteurs limitant liés au sol, au végétal ou à la manière dont les cultures sont conduites peuvent contribuer à la baisse des rendements. Ainsi, limiter la contrainte en céréaliculture pluviale uniquement au climat, revient à connaître le sol (sa nature, ses fertilités, ses propriétés, son comportement), le végétal (ses potentialités, ses exigences) et à adopter un mode adéquat de conduite des cultures (itinéraires techniques et fumures) (Lahmar, 1991). Nous constatons que les facteurs liés à la nature du sol, texture de surface et discontinuité, sensibilité à l'eau, composition chimiques. Cela ne peut être considéré que par une gestion intégrée de l'hétérogénéité inter et intra-parcellaire. La généralisation de la caractérisation des sols ne peut être envisagée que par une simplification de l'acquisition de la donnée sol. L'utilisation de données satellitaires est d'une grande utilité dans la cartographie du sol.

Comme la résistance des variétés aux maladies influence la dose de fongicides nécessaire à l'expression du potentiel de rendement du blé tendre. Les caractéristiques du climat de l'année, qui déterminent si la pression des maladies sera plus ou moins forte, constituent le second facteur à prendre en compte dans l'adoption d'un programme fongicide prévisionnel (Bjerre, 1999). Aussi, la détection des premiers signes de dérives de sensibilité des parasites, une bonne connaissance de la réalité de la résistance au champ et des spécialités efficaces en situation de résistance, la promotion de pratiques phytosanitaires intégrant des pratiques culturales, le choix variétal et le recours limité et raisonné aux différentes familles de produits doivent permettre de réduire les risques de développement des résistances et leur impact économique.

Nous constatons que tous ces paramètres se caractérisent par leur incertitude et leur imprécision. Elaborer une gestion intégrée de ces variables s'avère très difficile si ce n'est impossible.

Dans cette étude, nous proposons un nouveau système intelligent pour l'analyse de ces données. La méthode proposée est basée sur un système utilisant les techniques de l'intelligence artificielle. Les variables d'entrée du système à logique floue proposé représentent la nature du sol et la dose en fongicides. La variable de sortie, représente le taux de production du blé tendre.

NOTIONS FONDAMENTALES

Nous avons jugé utile de donner un aperçu global sur certaines notions fondamentales de la logique floue. Ces notions permettent de justifier et de démontrer certains principes de base. On ne retiendra que les éléments indispensables à la compréhension du principe de détection par la logique floue. Ces éléments sont les variables floues et les règles d'inférences.

L'utilisation d'un modèle à logique floue, démontre sa capacité de résolution des problèmes dont les données se trouvent dans un environnement incertain. Une base de données est construite à partir des analyses expertes suivant les méthodes classiques. Les résultats sont obtenus sur la base des mesures des variations des paramètres géochimiques et pédologiques de chaque parcelle ainsi que la dose de fongicide administrée et cela en fonction du rendement enregistré.

Il est nécessaire de convertir ces grandeurs en variables floues. Pour ce faire on définit les deux notions:

- Les fonctions d'appartenances qui permettent de définir le degré de vérité de la variable floue en fonction de la grandeur d'entrée
- Les intervalles flous qui déterminent le nombre de variables floues

Ces paramètres sont traduits en fonctions d'appartenance. Il s'agit là d'établir une relation entre le degré de vérité de la variable floue et la grandeur d'entrée correspondante. Des intervalles flous sont définis en nombre de variables floues associées à une grandeur d'entrée. Dans le cas de notre détection, trois intervalles s'avèrent suffisants. De façon générale ils sont caractérisés à l'aide de symboles.

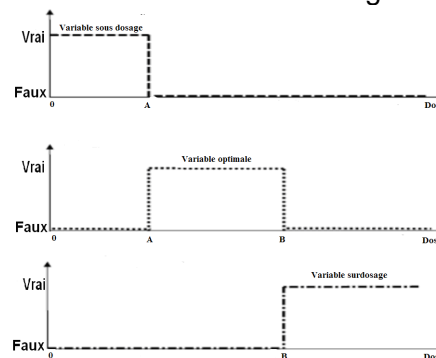
Le traitement des données s'opère suivant des règles permettant de relier les variables floues d'entrée aux variables floues de sortie à l'aide d'opérateur. Ces règles d'inférences font appel à l'opérateur « et », qui s'applique aux variables floues. La variable floues de sortie doit être convertie en une grandeur de mesure afin d'être appliquée au système d'analyse comme étape de défuzzification. Il s'agit de convertir cette information en une grandeur physique de lecture.

MODÉLISATION PAR LOGIQUE FLOUE

Dans le cadre de la logique classique, une proposition est soit vraie, soit fausse, soit inconnue ou indéterminée par rapport à une théorie, Mais le raisonnement humain s'appuie fréquemment sur des connaissances et des données inexactes, incertaines ou bien imprécises. D'ailleurs, le progrès continu dans tous les domaines de notre vie est accompagné par une complexité croissante, des applications de plus en plus complexes et des systèmes de plus en plus sophistiqués nous obligent à chercher des théories capables de traiter ces complexités. Cet environnement a précipité le besoin de traiter de propositions plus générales et de recueillir des données toujours plus loin d'être précises et définitives à cent pour cent. Dans notre thème d'étude, les sources d'information – état géochimiques, pédologique et doses en fongicides - ne sont pas totalement fiables (et donc introduisent de l'incertitude) et par leur nature, sont génératrices d'imprécision. L'application de la théorie de la logique floue devient alors un besoin.

Contrairement aux variables binaires qui sont définies par les deux états «vrai» ou «faux», les variables floues présentent toute une gradation entre la valeur «vrai» et la valeur «faux». Si l'on désire classer la dose du fongicide nécessaire à une surface, en définissant (0 à A) comme un niveau de sous dosage, et (de A à B) dose optimale, et (au delà de B) un niveau de sur dosage. La logique binaire donne la représentation de la -figure 1- pour les trois variables «sous dosage», «optimale» et «surdosage»

Figure 1 : Représentation des variables suivant la logique binaire
Representation of variables using the binary logic



Cette fonction peut être défini par :

$$\text{singleton}(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } x = x_0 \\ 0 & \text{si } x \neq x_0 \end{cases}$$

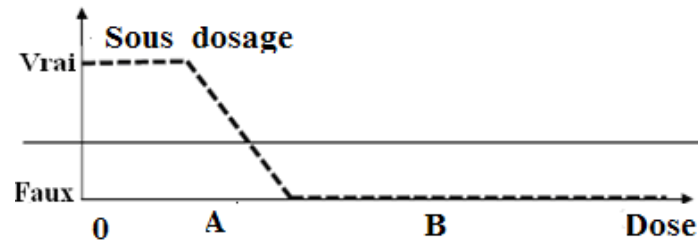
Deux remarques s'imposent au sujet de cette représentation :

D'une part, on préfère représenter l'état de la variable à l'aide de son degré de vérité en associant la valeur 1 (degré de vérité de 100%) à la valeur «vrai» et le degré de vérité nul à la valeur «faux». D'autre part, on constate que cette façon de faire est très éloignée de ce que fait l'être humain lorsqu'il résout ce genre de problème. En effet, l'homme ne fait pas naturellement une distinction franche entre «faible dose» et «dose optimale» par exemple. Il utilise des expressions du genre «plutôt faible» pour qualifier une dose légèrement inférieure à un degré optimal et «plutôt forte» pour un degré légèrement supérieure à cette valeur.

En conclusion, la logique binaire présente l'avantage de la simplicité mais est assez éloignée de la logique utilisée naturellement par l'être humain.

Si l'on représente le même problème à l'aide de la logique floue, les variables ne sont plus binaires mais présentent une infinité de valeurs possible entre le « optimale » et le « surdosage » (figure 2).

Figure 2 : Représentation des variables suivant la logique floue
Representation of variables using the fuzzy logic



On constate que cette représentation est beaucoup plus proche de la façon dont l'être humain raisonne puisqu'elle permet de faire intervenir des notions telles que «plutôt sous dosé», «assez optimale»... Cet avantage se fait, évidemment, au détriment de la simplicité de la représentation.

INFÉRENCE FLOUE

L'approche floue est un sous domaine des systèmes intelligents utilisés largement dans la solution de différents problèmes d'applications médicales, biologiques et environnementaux. La logique floue utilise des informations sous forme de variables linguistique à partir de l'expertise humaine. Cette propriété lui confère son aptitude à résoudre différents problèmes liés à l'environnement où les données se caractérisent par leur complexité. L'approche floue concerne les cas où les variables linguistiques incertaines jouent le rôle du contrôle du mécanisme du système (Demir et Korkmaz, 2008). Le système à inférence floue est un outil puissant dans la simulation du comportement des phénomènes non linéaire. Dans cette étude, nous élaborons un algorithme à règles communes associé à un vecteur d'observation.

$a = (a(1), a(2), \dots, a(n))$

avec (a) test, nous attribuons par la suite une forme générale du K^{ime} règle dans le système.

($k = 1, 2, \dots, K$):

SI $a(1)$ **est** A_{1k} **ET**...**ET** $a(n)$ **est** $A_{n,k}$ **ALORS** b **est** B_k

Où A_{ik} , sont des états flous (les fonctions d'appartenance sont désignées par $(\mu_{A_{i,k}})$ qui correspondent à la nature particulière de l'observation. (Pour des raisons de simplification, nous choisissons des fonctions triangulaires). k B sont des états flous discrets. La particularité des décisions algorithmiques utilisées dans l'analyse des facteurs de production du blé tendre c'est qu'elles ont la possibilité d'inférer des procédures à partir des règles enregistrées sur terrain.

Dans une déduction formelle, le syllogisme :

Q_1 A's **sont** B's **ET** Q_2 (A&B)'s **sont** C's **ALORS** Q_1Q_2 A's **sont** (B&C)'s.

Exemple : Sous dose de fongicide (Précision) donne faible rendement. Sol rocheux, produit faible rendement. Sol rocheux et faible dose en fongicide ; la probabilité d'avoir un faible rendement est élevée au carré. (Inan et al., 2007).

RÈGLES D'INFÉRENCE

Une implication floue entre deux propositions élémentaires est une relation R entre les deux ensembles U_1 et U_2 , quantifiant le degré de vérité de la proposition :

si (x est A) *alors* (y est B)

Où, A et B sont des sous-ensembles de U_1 et U_2 respectivement. En logique floue, il existe plusieurs manières pour générer les implications floues, les plus souvent utilisées sont celles de Mamdani et Larsen.

Les règles d'inférence sont l'ensemble des différentes règles reliant les variables floues d'entrée d'un système aux variables floues de sortie de ce système. Elles doivent être définies par le l'expert à partir des résultats enregistrés sur terrains. Ces règles se présentent sous la forme :

Si condition 1 et/ou condition 2 (et) alors action sur les sorties

COMBINAISON DES RÈGLES

L'ensemble des règles se présente sous la forme d'une énumération du type :

Si condition 1 et condition 2 (et) alors action sur les sorties

Si condition 3 et condition 4 (et) alors action sur les sorties

Si condition 5 et condition 6 (et) alors action sur les sorties

...

Ces règles permettent de relier les variables floues d'entrée aux variables floues de sortie à l'aide de différents opérateurs. Dans notre système d'étude, on peut citer l'exemple :

Lorsque l'on désire mesurer le taux de rendement d'une parcelle en fonction de la dose des fongicides, un des problèmes qui se présente est de savoir si ce taux est le résultat de la dose ou à d'autres facteurs qui interviennent notamment la nature du sol. Exemple

- Si la dose est faible alors le rendement est faible
- Si la dose est forte, alors le rendement est faible
- Si la dose est optimal, alors le rendement est élevé
- etc...

RAISONNEMENT PAR INFÉRENCE COMPOSÉE

Contrairement au raisonnement monotone, le raisonnement par inférence permet de raisonner à l'aide de plusieurs règles composées, et des variables linguistiques expliquent les états des systèmes, nous pouvons raisonner et évaluer les résultats. En effet toutes les règles floues sont évaluées en parallèle. Pour effectuer ce type de raisonnement, on utilise «la méthode du Min-Max» (Cox et Freeman, 1990).

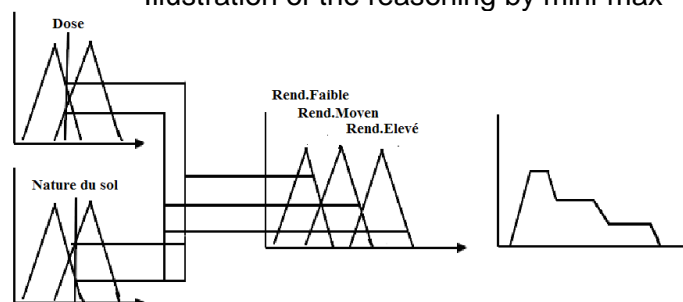
LA MÉTHODE D'INFÉRENCE MINI-MAX

La méthode Min-Max se décompose en deux étapes: pour chaque règle appliquée, le minimum de degré d'appartenance est retenu dans le résultat. Par contre, si plusieurs règles donnent un même résultat, le maximum de ces résultats est retenu. (Cox, 1994). Ces opérations sont expliquées par :

$m_{\text{résultat}} = \text{Min}(m_{x1}, m_{x2})$

$m_{\text{résultat finale}} = \text{Max}(m_{\text{résultat1}}, m_{\text{résultat2}}, \dots, m_{\text{résultat n}})$ (Figure 3).

Figure 3 : Illustration des raisonnements par mini-max
Illustration of the reasoning by mini-max



L'opérateur choisi dans notre cas d'étude est l'opérateur [et] réalisé par le calcul du minimum et représente l'intersection :

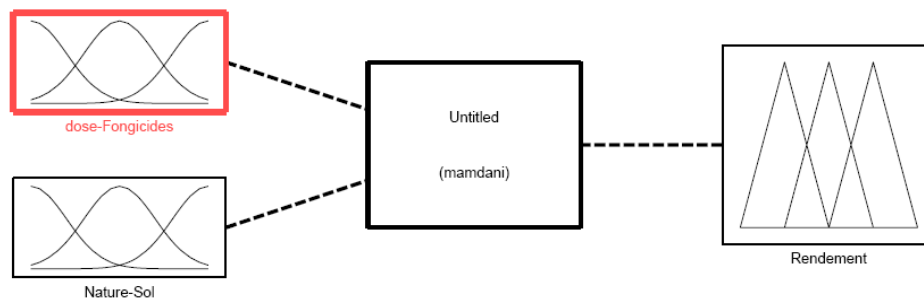
$$A \cap B = \{x / x \in A \wedge x \in B\}$$

Représenté par la fonction :

$$\mu_{A \cap B}(x) = \mu_A(x) \wedge \mu_B(x) = \min(\mu_A(x), \mu_B(x))$$

La structure du schéma bloc de notre système d'analyse (Fig. 4) se compose de deux entrées floues, Deux parties principales constituent la base des données qui renferme les données spécifiques des fonctions d'appartenance des variables d'entrée et de sortie. Quant à la base des règles elle renferme les règles qui permettent de définir la relation entre les prémisses et la conséquence en fonction des variables floues résultants de la fuzzification.

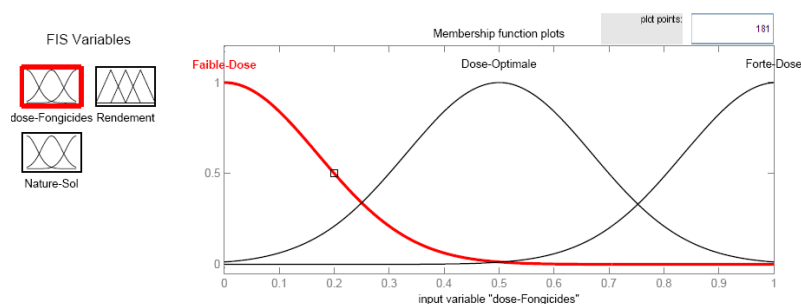
Figure 4 : Structure du système flou avec deux entrées et une sortie
Structure of fuzzy system with two inputs and one output



FUZZIFICATION DE LA VARIABLE 'DOSE DE FONGICIDES

On choisit trois intervalles flous et des fonctions d'appartenance de type gaussienne en définissant la dose « Faible dose » comme correspondant à une valeur inférieure à 0,5g/ha; « Dose optimale » comme étant une dose comprise entre 0,25 g/ha et 0,75 g/ha et « Forte dose » comme étant une dose supérieure à 0,75 g/ha (figure 5). Sachant que la température optimale pour la fermentation du lactose des coliformes totaux de 37° et 44°C à 44.5°C pour les coliformes fécaux.

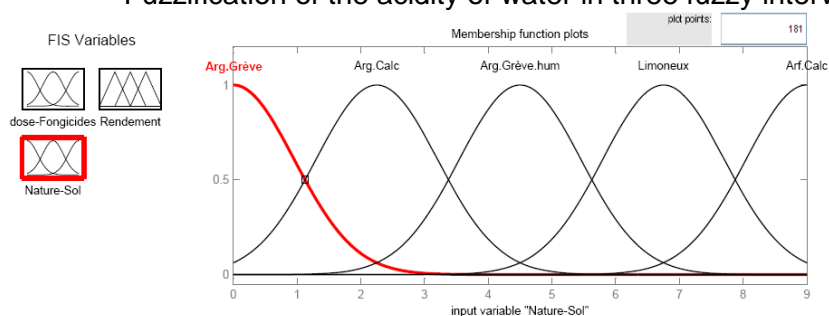
Figure 5 : Fuzzification de la dose en fongicides en trois intervalles flous
Fuzzification of the dose of fungicides in three fuzzy intervals



Fuzzification de la nature du sol

On choisit cinq intervalles flous et des fonctions d'appartenance de type gaussienne en définissant la nature du sol « Argileux sur grève » comme correspondant à une valeur inférieure à 1 ; « Argileux calcique » comme étant une valeur comprise entre 1 et 3,5 et « Argileux sur grève humide » comme étant une valeur comprise entre 3,5 et 5,5 et une nature en limoneux correspondant à une valeur comprise entre 5,5 et 7,5 (figure 6).

Figure 6 : Fuzzification de l'acidité de l'eau en trois intervalles flous
Fuzzification of the acidity of water in three fuzzy intervals

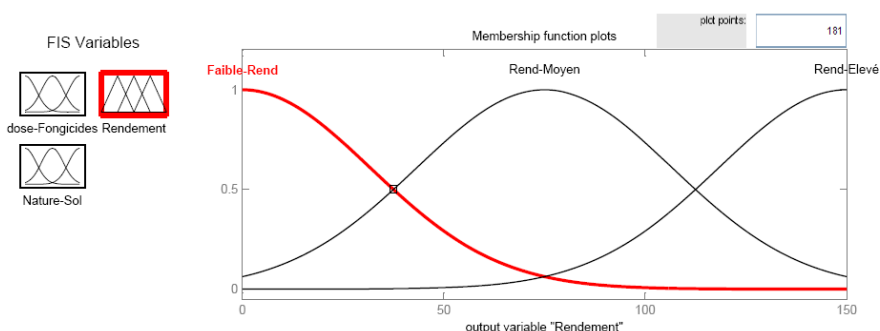


FUZZIFICATION DU TAUX DE RENDEMENT EN BLE TENDRE

Comme variable de sortie du système, le taux de production en blé tendre mesuré par parcelle suivant sa nature et suivant son traitement par fongicides ou non est réparti sur trois intervalles flous.

D'après les valeurs mesurées, on choisit trois intervalles flous et des fonctions d'appartenance de type gaussienne en définissant le taux de productions « faible rendement » comme correspondant à un taux inférieur à 40 q/ha; « Rendement moyen » comme étant un taux compris entre 40 et 110 q/ha et un taux élevé correspondant à une production supérieure à 110 q/ha (figure 7).

Figure 7 : Fuzzification du taux de rendement en blé tendre
Fuzzification of yield in wheat



RÈGLES D'INFÉRENCE

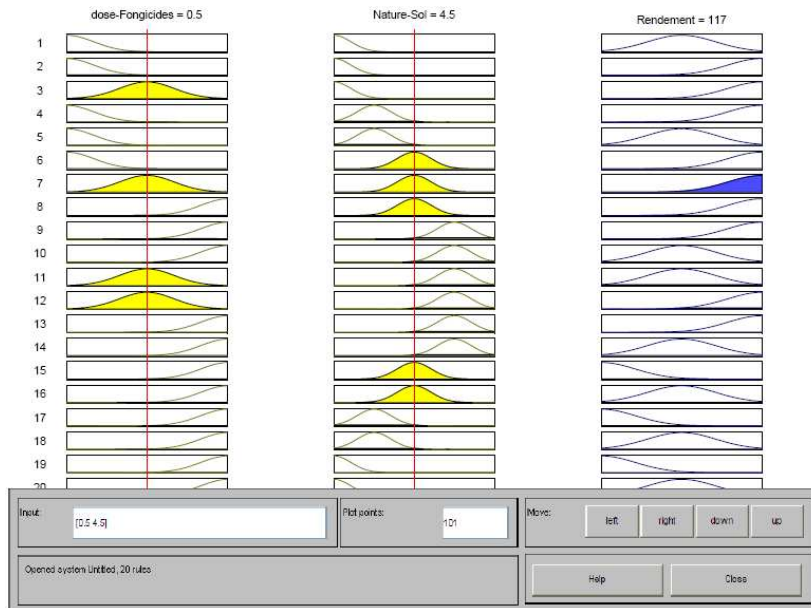
La manipulation de règles symboliques et logiques a rendu possible l'un des grands succès de l'intelligence artificielle. Leur but est, à travers la manipulation d'un grand nombre de règles, de porter un jugement sur un problème relevant d'un domaine précis. Dans notre cas, les taux de production enregistrés et les valeurs des doses en fongicides administrées ainsi que la nature du sol correspondant ont permis de définir les règles de fonctionnement de notre système. La combinaison de plusieurs de ces règles représentant tout les cas de figures possibles avec l'état de chaque paramètre et le résultat enregistré.

EXEMPLE D'APPLICATION

Hypothèse : la dose en fongicide administrée est de 0,5 g/ha et la valeur de la nature du sol est de 4,5 ce qui correspond au sol argileux sur grève humide, le taux de production prévu est de 117 q/ha. (Figure 8).

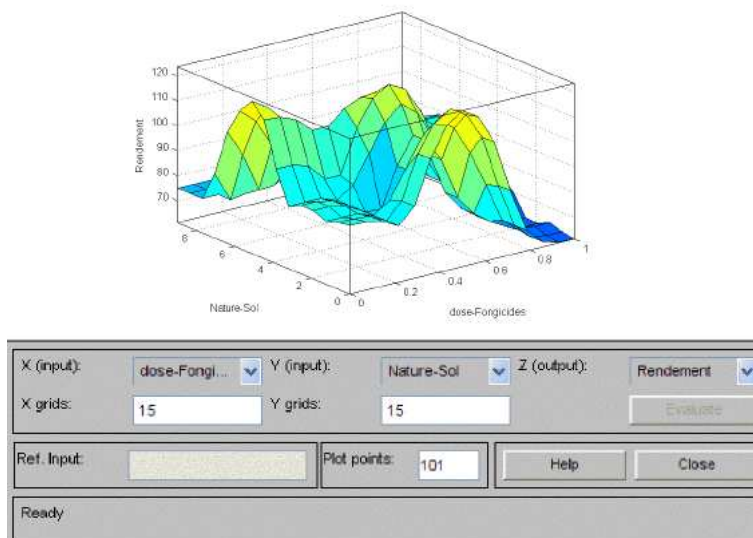
Ces valeurs sont portées à titre d'exemple (Maumene *et al*, 2003) le système proposé accepte toutes les combinaisons possibles.

Figure 8 : Exemple d'application
Sample Application



La figure 9, présente la variation du rendement en blé tendre en fonction des doses en fongicides ainsi que la nature du sol correspondant (Valeurs attribuée à chaque type).

Figure 9 : Variations du rendement
Yield variations



DISCUSSION

En pratique les techniciens de terrain et les agriculteurs raisonnent leur investissement fongicide en intégrant le potentiel de rendement de la parcelle et établissent implicitement un lien entre le potentiel de rendement et les risques maladies. L'investissement fongicide est plus limité si le potentiel de la parcelle est lui-même limité. Inversement les forts potentiels sont davantage protégés. Le système proposé permet de prévoir la dose nécessaire à chaque parcelle suivant sa nature du sol.

CONCLUSION

Le système établi permet d'analyser les facteurs qui interviennent dans l'amélioration du rendement du blé tendre. Comme les augmentations de rendement dues à l'utilisation de fongicides peuvent être fortement variables au sein d'une même parcelle et fluctuer du simple au double. L'adaptation intra parcellaire de la dose fongicide à cette variabilité dépend de la nature du sol, des données géochimiques, pédologiques, de ses données climatiques...etc.

Si le programme proposé permet de prévoir le taux de production en blé tendre en fonction de la nature du sol et de la dose du traitement en fongicide, cela reste extensible et admet l'introduction d'autres variables qui ne sont pris en considération dans cette étude. Une étude plus large englobant tous les paramètres susceptibles d'influencer la production, sont à introduire et cela pour plus de précision. La conjugaison de ces facteurs avec leur complexité, s'adaptent parfaitement à ce modèle de traitement des données.

RÉFÉRENCES :

Bjerre K. D., 1999. Disease maps and site specific fungicide application in winter wheat. In: *Proceedings of the second European Conference on Precision Agriculture*, Odense, Denmark. 495-504.

Cox D.C., Freeman L.C.G., 1990. «Managing the Development of a New Mine Project». *MinE*. Vol., pp. 277-283.

Cox E., 1994. *The Fuzzy Systems Handbook, A Practitioner's Guide to Building, Using, and Maintaining Fuzzy Systems*, Boston, AP Professional.

Demir F., Korkmaz K.A., 2008. Prediction of lower and upper bounds of elastic modulus of high strength concrete. *Constr Build Mater*, 22 (7):1385–93.

Inan G., Goktepe A.B., Ramyar K., Sezer A., 2007. Prediction of sulfate expansion of PC mortar using adaptive neuro-fuzzy methodology. *Build Environ*; 42 (7):1264–9.

Lahmar R., 1991. Intensification céréalière dans les Hautes Plaines Sétifiennes : Quelques résultats. CIHEAM - *Options Méditerranéennes*. Vol. 2, n°1

Maumene C., *et al*, 2003. Estimation et cartographie de la variabilité intra parcellaire des augmentations de rendement dues à l'utilisation des fongicides contre les maladies du blé. *AFPP-Septième conférence internationale sur les maladies des plantes*, Tours, France.

**HELMINTHOSPORIOSE FUSIFORME DU MAÏS : PROPOSITIONS DE SEUILS
D'INTERVENTION SUR VARIÉTÉ SENSIBLE**

C. JENN ⁽¹⁾, A. WEISSEBERGER ⁽²⁾, E. GAERING ⁽¹⁾, J. CASPAR ⁽³⁾, F. WERSINGER ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Coopérative Agricole de Céréales, 10 rue Lavoisier, BP 91207, 68012 Colmar Cédex

⁽²⁾ Chambre d'Agriculture du Bas-Rhin, Espace Européen de l'Entreprise, 2 rue de Rome, BP 30022 Schiltigheim, 67013 STRASBOURG CEDEX

⁽³⁾ DRAAF/SRAL Alsace, Station d'expérimentation, route de Saverne, 67370 Wiwersheim

RÉSUMÉ

Présente probablement depuis au moins une vingtaine d'années en Alsace sans poser de problèmes particuliers, l'helminthosporiose fusiforme du maïs (*Exserohilum turcicum*) s'est développée depuis la fin des années 90 pour provoquer des pertes de rendement parfois importantes. Parallèlement, à la prise en compte de la tolérance variétale dans la gestion de cette maladie, des essais ont été mis en place pour optimiser le positionnement des fongicides sur les variétés sensibles. De plus l'autorisation de spécialités à base d'azoxystrobine sur maïs grain nous a conduit à mener les mêmes études sur ce type de molécule. Les résultats et les conclusions de ces essais sont présentés, ainsi que les perspectives et difficultés de mise en oeuvre de ces seuils.

Mots-clés : Helminthosporiose fusiforme, seuil de nuisibilité, fongicides, azoxystrobine, sensibilité variétale

SUMMARY

Though present probably in Alsace for at least twenty years without posing any particular problems, northern corn leaf blight (*Exserohilum turcicum*) has, since the late 1990s, developed to point of causing significant yield losses. During this period, with the recognition of the importance of varietal resistance in the management of this disease, tests have been conducted to optimize the placement of fungicide on sensitive varieties. At the same time, the registration of azoxystrobine-based products has led us to conduct the same trials on this type of molecule. The results and conclusions of these tests are presented, as well as the perspectives and difficulties of establishing these threshold.

Key words: northern corn leaf blight, threshold, fungicides, azoxystrobine, varietal tolerance

INTRODUCTION

Observée la première fois en 1994 en Alsace, en bordure de parcelle, l'helminthosporiose fusiforme du maïs (*Exserohilum turcicum*) est probablement présente depuis de nombreuses années dans la région. C'est en 1999 que des symptômes plus importants sont observés dans des parcelles de la Hardt (secteur de monoculture irriguée en bordure rhénane). La sensibilisation a permis une modification du panel variétal au profit de variétés plus tolérantes. Néanmoins, la maladie reste régulièrement présente dans la région et tout particulièrement dans la bordure rhénane haut-rhinoise. Les essais mis en place depuis 10 ans en Alsace confirment une nuisibilité très variable (de 0 à 50 %) suivant la sensibilité de l'hybride et la cinétique de l'attaque par rapport au stade phénologique de la plante. Ceci est confirmé par de nombreux auteurs depuis 1985 en France (Gay et al 1985, Naibo B.2002). Le positionnement des fongicides en fonction de l'évolution de la maladie a également un effet important sur les gains potentiels de rendement. Le seuil d'intervention avec des fongicides à base de triazoles reste variable suivant les auteurs : de 1 à 2 taches par plante sur les feuilles du milieu de la plante (Gay et Al, 1985) à une tache en moyenne sur les feuilles supérieures à l'épi. (Naibo et al, 2000). Les premiers essais menés en Alsace avec des fongicides à base de triazole, lors de l'extension de la maladie, semblaient indiquer que ces seuils étaient trop élevés dans la situation régionale. Ensuite l'autorisation de mise sur le marché d'une spécialité à base d'azoxystrobine, à mode d'action différent, nous a amené à étudier le positionnement idéal des strobilurines sur l'helminthosporiose du maïs. Les résultats de ces expérimentations et des propositions de seuils d'intervention sont proposés dans les lignes qui suivent.

MATERIEL ET MÉTHODE

Deux séries d'expérimentations sont mises en place entre 2003 et 2007.

- en 2003 et 2004, des essais étudiant le positionnement optimal d'une spécialité à base de triazole : Punch CS (fluzilazole + carbendazime) à 0,8 l/ha
- de 2005 à 2007, des essais étudiant le positionnement optimal d'une spécialité à base de strobilurine : Amistar (azoxystrobine) à 1 l/ha

Les essais sont menés dans la Hardt, région de monoculture de maïs irriguée, sur des variétés sensibles à l'helminthosporiose fusiforme (Eurostar de 2003 à 2006 et DK 272 en 2007). Le dispositif expérimental est du type bloc de Fisher à 4 répétitions. Chaque parcelle élémentaire est composée de 4 rangs de maïs de 12,5 m de long.

| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
|-------------|---------|-----------|------------|------------|------------|----------------------|------------|---------|---------|---------|--------|
| 2003 | 24 juin | 8 juillet | 15 juillet | 22 juillet | 29 juillet | 5 août | 12 août | | | | |
| 2004 | 29 juin | 6 juillet | 13 juillet | 20 juillet | 27 juillet | 3 août | 10 août | 18 août | 25 août | 31 août | 7 sept |
| 2005 | 20 juin | 5 juillet | 11 juillet | 19 juillet | 26 juillet | 1 ^{er} août | 8 août | 16 août | 23 août | | |
| 2006 | 23 juin | 3 juillet | 11 juillet | 18 juillet | 24 juillet | 31 juillet | 7 août | * | 22 août | | |
| 2007 | 19 juin | 25 juin | 3 juillet | 9 juillet | 18 juillet | 23 juillet | 31 juillet | 6 août | 13 août | | |

Tableau I : Date des traitements dans les différents essais

(*) traitement non réalisé en raison d'une météo trop défavorable

Chaque semaine, une modalité différente est traitée avec la spécialité étudiée à la dose d'homologation. En fonction de l'année et de la longueur du cycle végétatif, le nombre de modalités étudiées varie de 7 à 11. Ces modalités sont comparées à un témoin non traité, inclus et randomisé dans le dispositif expérimental (Tableau I).

L'évolution de la maladie est suivie toutes les semaines dans les parcelles non traitées sur 10 pieds consécutifs par parcelle élémentaire. Ces plantes sont les mêmes tout au long de l'essai. La surface nécrosée par la maladie est évaluée sur chaque feuille. On calcule ensuite l'intensité moyenne de maladie sur les feuilles en dessous et au dessus de l'épi, ainsi que la fréquence de pieds touchés (pieds avec au moins une tache, quelle que soit la feuille). Lorsque le développement de la maladie est suffisant dans le témoin, on évalue globalement les surfaces nécrosées sur les feuilles en dessous et au-dessus de l'épi, sur l'ensemble des parcelles de l'essai. A l'automne, l'essai est récolté, et le rendement de chaque parcelle est calculé.

RESULTATS

Exemple de l'essai 2006

L'année 2006 est choisie comme l'année moyenne des années L'évolution de l'helminthosporiose dans le témoin est décrite dans le graphique ci-dessous (Figure 1).

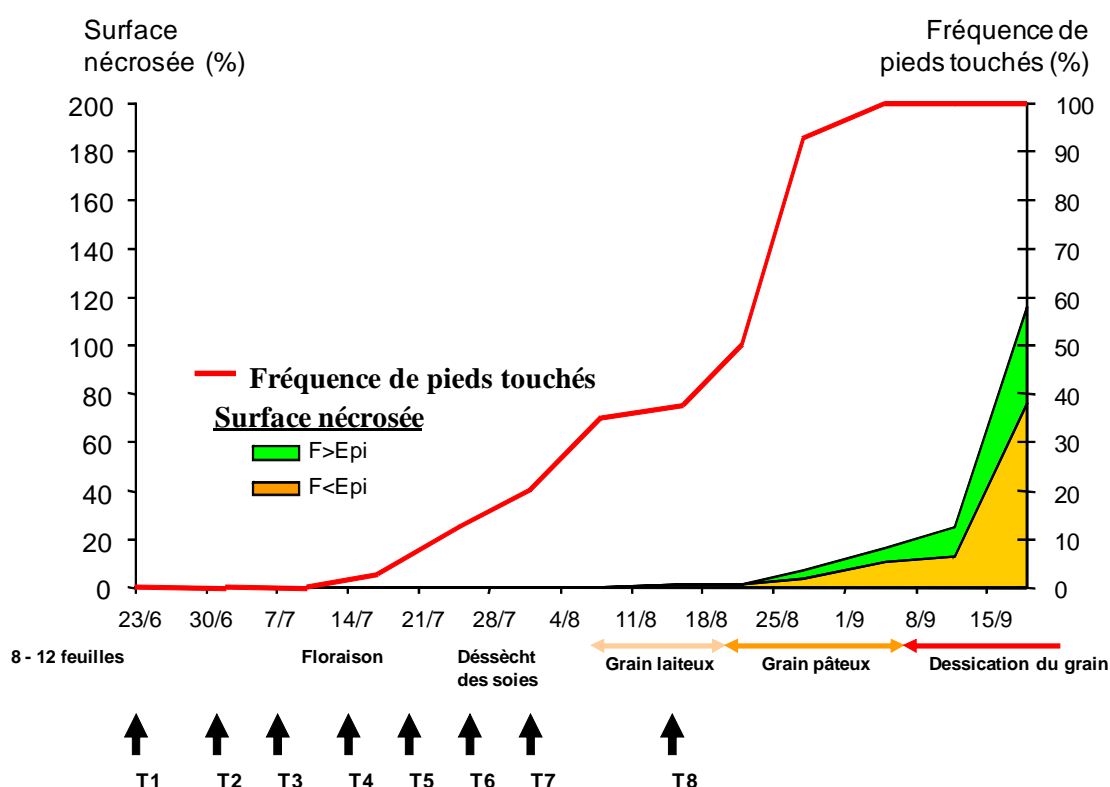


Figure 1 : Evolution de l'helminthosporiose dans le témoin et positionnement des traitements

La maladie apparaît à la mi juillet. La fréquence de pieds touchés progresse ensuite régulièrement pendant un mois, puis plus rapidement à partir de la mi-août. Classiquement, les nécroses foliaires « significatives » apparaissent beaucoup plus tardivement : il faut attendre la fin-août pour atteindre une intensité de 5 %.

Il faut donc attendre le 19 septembre pour évaluer la surface nécrosée par l'helminthosporiose, et calculer l'efficacité des différentes modalités. Cette notation met en évidence des efficacités maximales pour les traitements positionnés durant la seconde quinzaine de juillet (Figure 2).

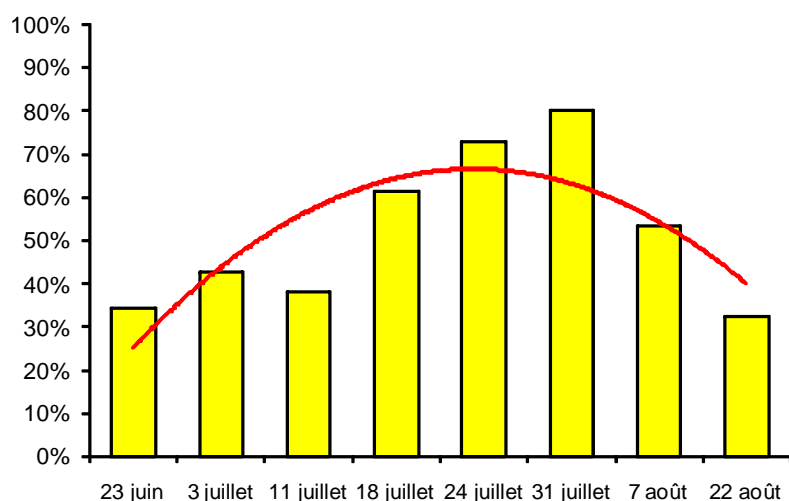


Figure 2 : Efficacité au 19 septembre des différentes dates de traitement

Les rendements des différentes modalités sont conformes aux efficacités notées et varient de 93,2 q/ha dans le témoin à 100,8 q/ha pour la modalité traitée le 31 juillet.

L'analyse présentée ci-dessus est faite pour les deux séries d'essais : avec triazoles (2003 et 2004) et strobilurine (2005 à 2007).

Les fongicides à base de triazoles

Les années 2003 et 2004 ont été marquées par des attaques moyennes et tardives de la maladie. Les toutes premières taches apparaissent début à mi-juillet, mais il faut attendre 4 à 6 semaines pour voir la maladie progresser rapidement et contaminer l'ensemble des pieds de maïs.

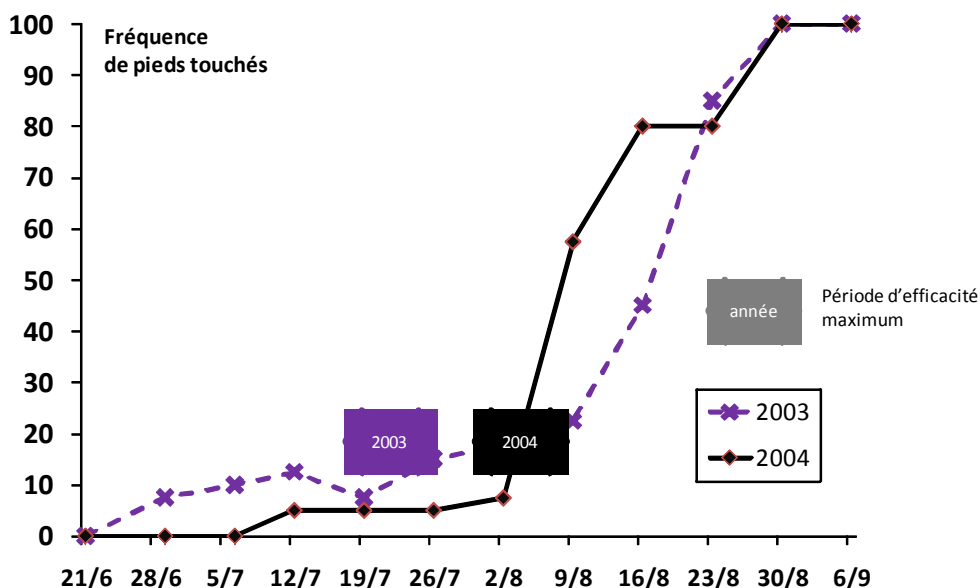


Figure 3 : Evolution de la maladie et période optimale de traitement des triazoles

La période de traitement qui conduit à la meilleure efficacité se situe durant la deuxième quinzaine de juillet en 2003 et début-août en 2004. Dans ces deux situations, le niveau d'attaque avoisine les 15 à 20 % de pieds touchés.

Les fongicides à base de strobilurines

A l'instar de 2003 et 2004, la maladie est également apparue tardivement. A l'inverse 2006 et plus encore 2007 ont été des années particulièrement favorables au développement précoce de la maladie. Les premières taches sont observées fin juin, et la période « d'explosion » de la maladie intervient rapidement (début août en 2006 et mi-juillet en 2007).

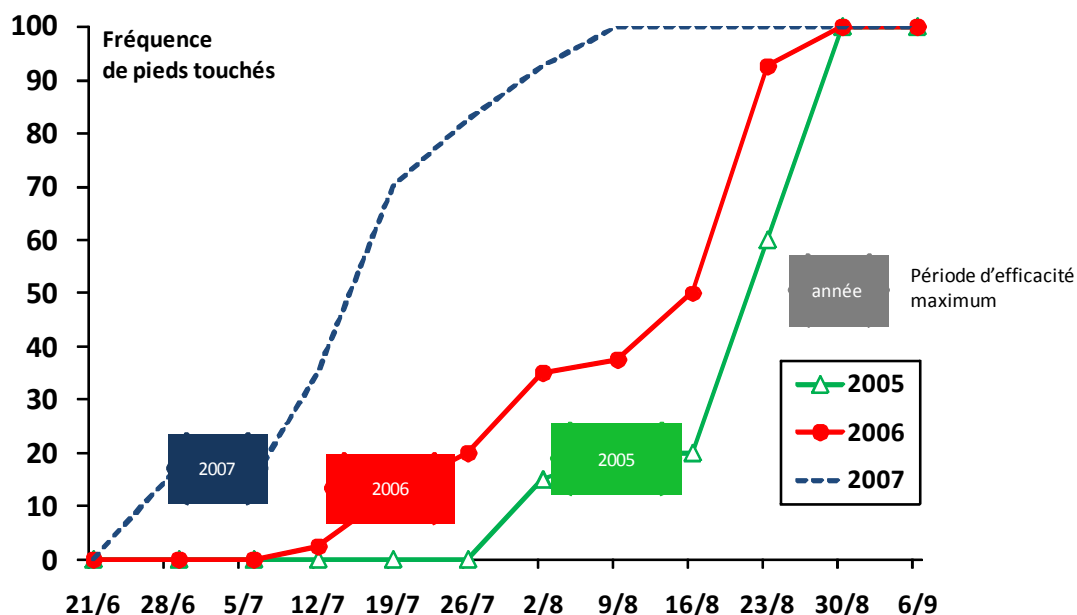


Figure 4 : Evolution de la maladie et période optimale de traitement des strobilurines

L'analyse de ces 3 années d'essai conduit à la même conclusion que celle faite en 2003 et 2004 sur les fongicides à base de triazole : ce sont les applications faites lorsque la maladie touche 15 à 20% des pieds qui aboutissent à la meilleure efficacité des fongicides utilisés.

Effet sur le rendement

Enfin, la mise en regard des dates de traitements permettant le meilleur gain de rendement dans chaque essai (Tableau II), conforte l'analyse faite à partir des observations en végétation.

| Année | Fongicide | Date | Gain de rendement | Fréquence de pieds touchés | Surface moyenne nécrosée |
|-------|--------------|---------|-------------------|----------------------------|--------------------------|
| 2003 | Triazole | 22-juil | 12,5 | 15% | 0,10% |
| 2004 | Triazole | 03-août | 9,0 | 8% | 0,10% |
| 2005 | Strobilurine | 26-juil | 6,8 | 20% | 0,10% |
| 2006 | Strobilurine | 02-août | 6,7 | 23% | 0,15% |
| 2007 | Strobilurine | 25-juin | 19,6 | 18% | 0,10% |

Tableau II : Dates de traitement permettant le meilleur gain de rendement et importance de la maladie à cette date

DISCUSSION

Les résultats de ces 5 années d'expérimentation, mettent en évidence un seuil optimal d'intervention particulièrement bas : de 15 à 20 % de pieds touchés. A ce stade de l'épidémiologie de l'helminthosporiose fusiforme du maïs, la surface foliaire moyenne nécrosée est très faible (Tableau II). Ces résultats vont à l'encontre des règles proposées il y a 10-15 ans par d'autres auteurs, sans forcément les remettre en cause. En effet, ces derniers ont été élaborés dans le Sud Ouest de la France, alors que les données ci-dessus ont été obtenus en Alsace. Il conviendrait donc de vérifier que les souches des deux régions sont identiques, et à ce jour cette condition n'a pu être démontrée (Lechapt- comm.pers.). Par ailleurs, et de façon un peu surprenante, on ne note pas de différences dans les périodes idéales de déclenchement des traitements entre des spécialités à base de triazoles et des fongicides à base de strobilurines, réputés pour être positionnés de façon plus préventive.

CONCLUSION

Les résultats de ces 5 années d'expérimentation en Alsace, mettent en évidence l'intérêt d'une intervention fongicide précoce sur l'helminthosporiose fusiforme du maïs (en variété sensible), pour assurer une efficacité maximum. Dans tous les cas, il faut intervenir au plus près de la phase « explosive » de la maladie, quand la fréquence de pieds touchés peut passer de 15-20% à près de 100 % en quelques jours. Cette dynamique de la maladie est caractéristique des hybrides sensibles à la maladie (Naïbo, 2002). En pratique, une intervention à un seuil aussi faible pose le problème de la difficulté d'observation nécessaire au raisonnement, mais surtout à la prévision de cette « explosion » de la maladie dans une parcelle. Il est clair que la mise en place d'un outil d'aide à la décision permettant de prévoir cette période de l'épidémiologie de la maladie faciliterait sensiblement le raisonnement des éventuelles interventions fongicides.

BIBLIOGRAPHIE

Gay J.P., Tour M., Foueillassar X., 1985. Lutte chimique contre les maladies du maïs. Premières journées d'études sur les maladies des plantes – Versailles – 26-27 février.

Naïbo B., 2002. – Helminthosporiose chez le maïs: intérêt de la tolérance variétale. *Perspectives Agricoles*, 280, 92-97.

Naïbo B., Porte-Laborde A., Renoux J.P., 2000. – L'helminthosporiose du maïs: intérêt des méthodes préventives culturales et génétiques. *Phytoma*, 523, 22-24.

**MODELE DE PREVISION DES RISQUES DU MILDIOU DE L'ARTICHAUT
(*BREMIA LACTUCAE*)**

MEZENCEV N⁽¹⁾, C. MONOT⁽²⁾ et COLLET J.M.⁽³⁾

⁽¹⁾ Chambre d'Agriculture du Finistère, Kergompez 29250 Saint Pol-de-Léon, France,

nicolas.mezencev@finistere.chambagri.fr

⁽²⁾ Bretagne Biotechnologie Végétale, 29250 Saint Pol de Léon, France, monot@bbv.fr

⁽³⁾ Comité d'Action Technique et Economique CTIFL/CATE, Vézendoquet, 29250 Saint Pol-de-Léon, France, jean-michel.collet@cate.fr

RÉSUMÉ

La mise au point d'un modèle de prévision des risques d'apparition du mildiou de l'artichaut (*Bremia lactucae*) a été initiée à partir d'un modèle biologique proche de celui de Guntz et Divoux sur la pomme de terre. Le modèle utilise des données météorologiques simples (Humidité relative de l'air, températures horaires et précipitations) et inclut des données utilisateurs (Traitements, irrigation, stade de la culture et variété). La première année de calage du modèle (2008) montre une bonne visualisation de l'épidémie réelle. Des tests en laboratoires affinent nos connaissances du cycle (influence de la température, de l'hygrométrie) et, associés aux observations de terrain, permettront de quantifier plus précisément les paramètres du modèle.

Mots-clés : Mildiou de l'artichaut, Modélisation, Télématicque, *Bremia lactucae*,

SUMMARY

REPORT OF OUR KNOWLEDGE ON DOWNY MILDEW OF ARTICHOKE

Development of a model of prediction of risks of appearance of downy mildew on artichoke (*Bremia lactucae*) based on a biological model close to Guntz and Divoux's one on potatoes. The model uses simple meteorological data (relative humidity of air, hourly temperatures and rainfalls) and includes user's data (treatments, irrigation, stage of the crop and variety). The first year of the model's fittings showed a good visualization of the real epidemic. Laboratory tests refine our knowledge about the life cycle and, associated to field observations, will allow quantifying more precisely the models parameters.

Keywords: Downy mildew, *Bremia lactucae*, Modelisation, Telematics

INTRODUCTION

Artichoke in Brittany is each year victim of downy mildew caused by an oomycete supposed to be *Bremia lactucae*. This disease attacks the upper side of leaves and the bracts. Precocious attacks on leaves leads to significant yield losses. Bud attacks affect the visual quality of the bracts and so their marketable value. The disease is only significantly present in Brittany. One of the difficulties found with this disease is the positioning of treatments: the plant cycle is very long, the disease is present all the time, and the products to treat are preventive. The modelling of the disease and the availability of a tool to help make decisions will allow a better plant protection according to the risks.

MATERIALS AND METHODS

Development of a calculation model of sporulating risks of downy mildew and its incubation according to climatic data. The model chosen was based on G \ddot{u} ntz and Divoux's tables, established for potato mildew, this one takes up at first, in the absence of precise biological knowledge on artichoke mildew, the estimation of sporulating risks of mildew tables contingent on the temperature for a length of relative humidity at least equal to 90%.

PROGRAMMING OF THE MODEL AND HOSTING OF THE PROGRAMME AND THE CLIMATIC DATA BASE

A data base MYSQL, made available on a server, is constituted in real time and provides data necessary for the functioning of the program. It contains:

• "Plausible" biological parameters: It consists in the threshold hygrometry for the beginning of spore germination (**% TH**), the hygrometry duration, higher that threshold (**H% > T**), necessary for a given contamination level (classed from 0 to 4).

- Hypotheses have been put forward on the variety sensitivity ("Castel" more sensitive than "Violet de Provence" and than "Camus de Bretagne") and the growth phase (the "rising" phase is more sensitive than the "vegetative" phase. These hypotheses are based on many years of observation.

- Because of the polycyclic character of the disease, we consider that it is necessary for 3 continuous cycles of mildew to take place to cause the disease. The model then lets out an alert at 2 cycles and $\frac{3}{4}$, leaving time for the farmer to treat his plot. The achievement of a cycle needs 7 Incubation Units (**UI**). The add ups of UI depends on the temperature. The survival of spores in dry air ($H\% < 80\%$) is simulated and allows to valid or not continuity of two successive cycles of g/incubation.

- Hourly climatic data (temperature, pluviometry and relative humidity) come from a meteorological station consulted by GSM telephone.

- Each user's own data is entered by the farmer him self via a web interface: the farmer enters the date of plantation or of the last cutting back, used as a start point for the simulation. He also enters the variety and the phase of his crop, thus defining the degrees of sensitivity of the crops to the disease. He indicates his treatment and irrigation historic (dose and time of the last watering).

- The computer programme developed in PHP language, interactively consults the data base, and calculates the risk of contamination and the progress of incubation. The farmer can then intervene 2 different ways: curative (that stops the incubation cycle), or preventive (that blocks the sporulating but allows the disease cycle to finish). When a series of treatments are done, the programs takes account of the effectiveness length of successive treatments and determines at all time the "principle" treatment, that influences on the diseases' life cycle. Let's point out that, when it is known, the sum up of rainfalls and irrigation allows to estimate the washing off of contact products and can then invalidate a treatment.

This programme is efficiently working since spring 2008

VALIDATION OF THE MODEL

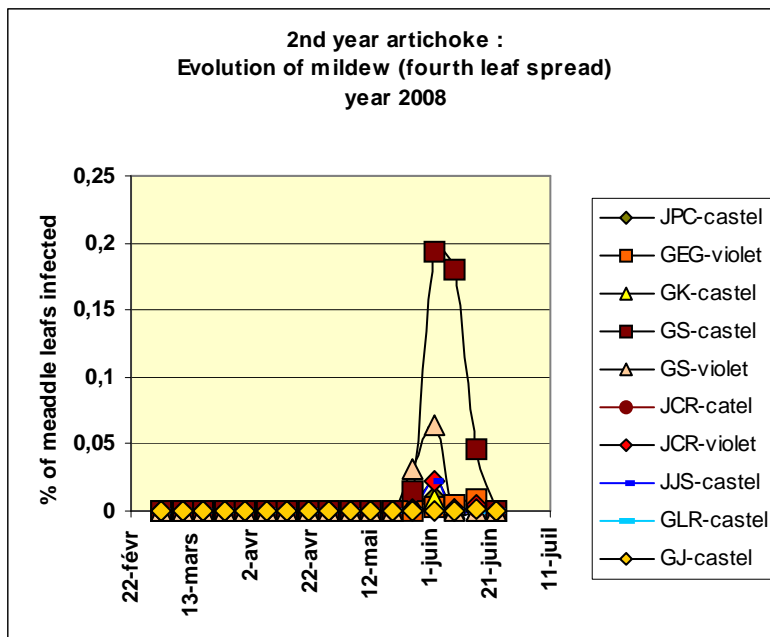
The validation of the model consisted in following in parallel a network of parcels (10 parcels at 2nd year phase and 9 parcels of offspring phase) on a restricted area around the meteorological station. We then observed the concordance between the theoretical curb of contamination and incubation of mildew and the epidemic observations in the fields. The parcels are observed weekly and are rated with a pseudo-quantitative notation in tiers of the upper side of leaves and the sixth leaf unfolded (0: 0%; 1: 1%; 2: 5%; 3: 10%; 4: 25%; 5: 50%; 6: 75%; 7: 90%; 8-9-10: 100%). The ranking is done on 12 plants per parcel.

RESULTS

ON OLD ARTICHOKE

The follow up shows that there is a mildew activity starting from the end of May. It only reached a critical threshold on one plot and on the 'Castel' variety.(figure 1)

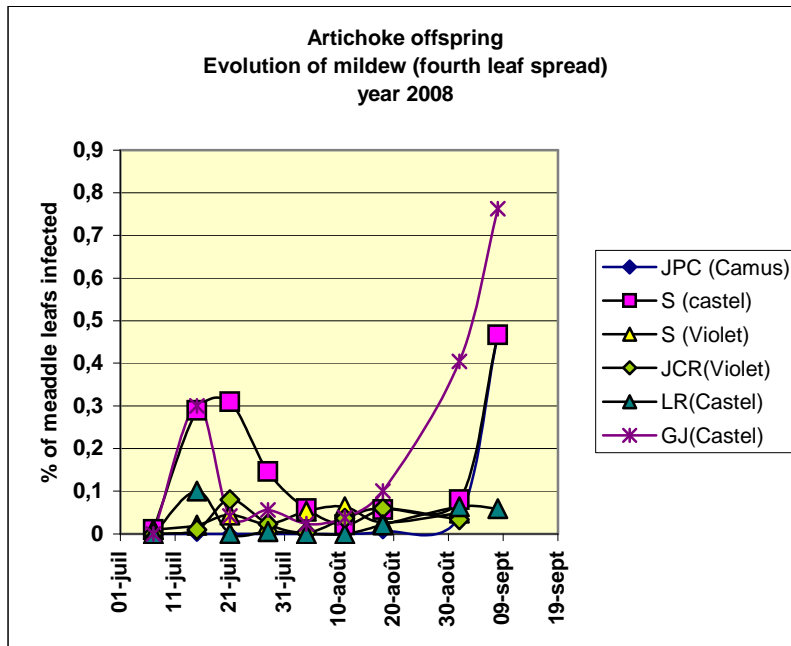
Figure 1 : Activity of the downy mildew on summer and autumn (second year of the artichoke)



ON OFFSPRINGS

The curve shows an evolution of mildew on the 18th of August, and then a worsening beginning of September (Cf. figure 2). We also register a few spots around the 10th of July on 2 plots

Figure 2 : activity of the downy mildew on spring.(first year of the artichoke)



The simulation done with the informatics model show à good concordance with the field observations in view of a few adjustments in relation to the original set up :

- The hygrometry threshold is taken down to 85% (instead of 90%), the contamination scale was changed for a reduction of hygrometry durations higher than the threshold necessary for the germination and the penetration of the spores (Cf. **Table I** Abaques of Güntz-Divoux adapted for artichoke downy mildew), the minimum temperature of incubation is brought down from 7° to 12° witch eliminates the simulated winter peaks.(Cf. **Table II**: Deduction of UI according to the average daily temperatures)

Table I : Abaqués of Güntz-Divoux adapted for artichoke downy mildew.

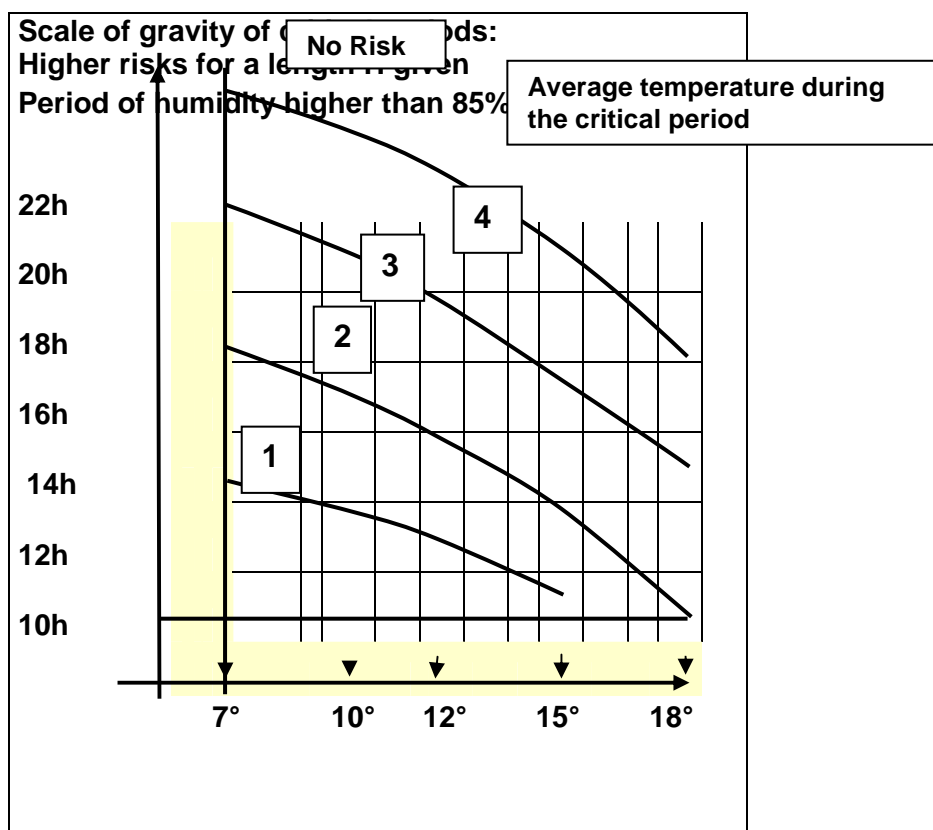


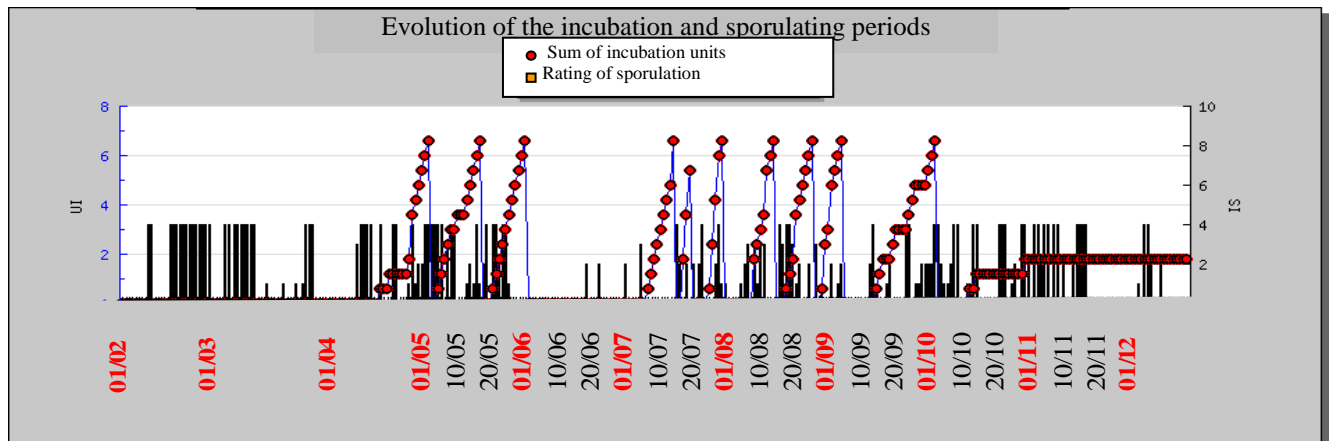
Table II : Incubation units according to the temperature.

| Incubation units according to the temperature | |
|---|------------------|
| daily average temperature | Incubation units |
| 8° | 0 iu |
| 12° | 0,6 iu |
| 16,6° | 1,8 iu |
| 20,1° | 1,6 iu |

7 IU are necessary for 1 incubation

- The life span of spores in dry air is not changed because of its little influence on the model in 2008.
- Figure 3 from the 'Milart' program interface shows the gravity of sporulating; we consider that, on the Castel variety, the gravity is high for a significant incubation (**IS**) of 2, where as for Camus or Little violet variety, a SI of 4 is necessary. (It is the gravity threshold that commands or not the beginning of a IS). This setting still needs to be confirmed more precisely. The IS threshold seems to be a good "adjustment variable" for the model, and allows to explain the different variety sensitivity.

Figure 3 : Simulated evolution of the incubation and sporulating periods of the *bremia* on artichoke during CY2008.



In the same way, we play on this parameter to explain the different phenologic sensitivities. The proximity of the reproduction phases increases the sensitivity of the plant to the parasite. The use of a synthetic variable here also allows adjustment. The curve redraws the sum of UI's and allows to locate the epidemic risk. 3 consecutive incubations were observed in spring and translates well the apparition of the disease on 2 year old artichokes. The incubation length takes from 11 to 15 days per cycle. The cycles in July do not lead to an epidemic phenomenon, probably because of the bad survival of spores. Let's also notice that at this period, the incubation phase is very reduced (3-4 days) but the air also dries quickly and compromises the survival of spores. In August we get back favourable conditions for the establishment of several consecutive cycles with liveable and abundant inocula, leading to the explosion of the disease observed at the end of August.

DISCUSSION

The modelling of mildew of artichoke, although carried out in a imperfect way (since a big part is adapted from the GUNTZ and DIVOUX model on potatoes), show results that are quickly exploitable in the prediction of risks.

It is a biological model that lays on field experimentation and laboratory experimentation.

A few other aspects need to be tested in the following years such as:

- Verify that it is pertinent to maintain 3 complete parasite cycles before sending out an alert: the approved phytosanitary products only have a preventive action (Fosetyl-AI, Mancozebe) and are relatively moderated. The elicitor products (Potassium phosphites), that could complete the chemical protection are only good enough if the plant has time to mobilize its defences.
- The percentage of survival of spores in dry air compared to time must be specified so that the contamination counter does not go back to zero untimely: there are not many references on the importance of primary or residual inocula in the generation of a new cycle are to our knowledge. It is planed to work on this factor that is essential for the functioning of the model.
- The varietal and phenological sensitivities must be quantified to approach a real establishment of a model. The organisations that deal with varietal selection on artichoke can provide essential observations so as to calibrate the sensitivity of cultivars. The genetic determinism of the sensitivity to mildew is not known: cultivars more sensitive than "Camus de Bretagne" (on leaf) exists in collections, but no cultivar is more resistant (except in the reserve of related species like the Cardoon). The sensitivity of capitulum seems to be uncorrelated to leaf resistance.

- The application elaborated for an internet use must be accessible for the farmer who enters his plot data and receives in return an advice for treatment.

For a satisfying use of the system, it must be based on a network of reliable meteorological data (the nearest possible to the plot and kept up to date in real time): the distance of validity of simulations compared to the stations must be verified. The coverings with meteorological stations that allow the exploitation of the model are small in the mildew activity area. The number of models developing on the crops and the cost of the exploitation should decrease. In the same way, the research on the interpolation of data on the territory can improve the effectiveness of the meshing.

LITERATURE CITED

- Collet J.M., 2008. Le mildiou de l'artichaut, une maladie à problèmes. *Infos-CTIFL*, 240, 43-45.
- Duvauchelle S., 1992. Le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*), aperçu des connaissances. *SRPV Loos-en-Gohelle* : 69 p.
- Janvier C., Orvoën H., Ganseman C., Icard C., Clara S., 2008. Le mildiou de la laitue, état des lieux et perspectives. *Infos-CTIFL*, 242, 34-38.
- Kushalappa A. C., 2001. BREMCAST : Development of a system to forecast risk levels of downy mildew on lettuce (*Bremia lactucae*). *International Journal of Pest Management*, 2001, 47(1) 1-5.
- Lepoivre P., 2003. Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. *De Boeck Université* , 432 pages
- Rapilly F. 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale : mycoses aériennes, *Institut National de la Recherche Agronomique*, Quae, 318 pages.
- Su, H., van Bruggen, A. H. C., Subbarao, K. V., and Scherm, H. 2004. Sporulation of *Bremia lactucae* affected by temperature, relative humidity, and wind in controlled conditions. *Phytopathology*, 94:396-401.

Interface is available to the following address:

<http://www.mezencev.ironie.org/artmil/accgene.php>

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the farmers of St. Pol de Léon who lent there plots and for there support. To S. Perennec, adviser at the Chambre d'agriculture du Finistère for her participation to phytosanitary assays. To M. Polman, student at the ESA, for the carrying out of laboratory assays, phytosanitary assays and the observations on the network.

AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009

ÉTUDE D'UN MODÈLE CLIMATIQUE DE PRÉVISION DE LA NUISIBILITÉ DE LA ROUILLE
BRUNE SUR BLÉ DUR EN FRANCE

S. THEPOT ^(1,2), D. GOUACHE ⁽²⁾

⁽¹⁾ École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Avenue de l'agrobiopole, 31326
Castanet tolosan, France, stephanie.thepot@etu.ensat.fr

⁽²⁾ Arvalis – institut du végétal, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, France,
d.gouache@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

Le climat a une grande influence sur le développement de la rouille brune. En utilisant vingt années de données d'écartés traités – non-traités (nuisibilité) moyens sur blé dur, on a exploré les relations entre la maladie et le climat. Une procédure de type « Window Pane » a permis d'identifier des variables climatiques fortement reliées à la nuisibilité : trois variables température et trois variables pluie sur trois périodes différentes – avant semis, hiver et printemps. Ces variables permettent par régression linéaire multiple de prédire quantitativement la nuisibilité de la maladie. Elles permettent également une prédiction qualitative intéressante, qui pourrait être utile dans le cadre de décisions de traitement. Enfin, on montre que l'élaboration d'un unique modèle pour toutes les régions aboutit à des prédictions plus robustes que plusieurs modèles régionaux.

Mots-clés : blé dur, *Puccinia triticina*, modèle, prévision, nuisibilité

SUMMARY

Climate has a strong influence on brown rust development. Using twenty years of mean fungicide response data on durum wheat, relationships between weather and disease were explored. A "Window Pane" procedure allowed for identification of weather variables strongly related to disease : three temperature variables and three rain variables for three different time periods – before sowing, winter and spring. These variables allow for quantitative prediction of expected yield loss by multiple linear regression. They can also be used for qualitative prediction, which could be of interest in treatment decision making. Finally, we show that the use of one model for all regions provides more robust predictions than numerous regional models.

Key words: durum wheat, *Puccinia triticina*, model, forecasting, yield loss

INTRODUCTION

La rouille brune du blé (*Puccinia triticina*) fait partie des maladies les plus nuisibles en France, de part sa fréquence élevée, dans le Sud de la France en particulier, et les pertes très élevées qu'elle peut engendrer. En effet, ce champignon a un développement de type explosif, qui peut amener des pertes de rendement catastrophiques atteignant parfois 40% pour les blés tendres (*Triticum aestivum* var. *aestivum*) et 75% pour les blés durs (*Triticum turgidum* var. *durum*) (Caron et al., 1994). Elle est surtout présente dans le Sud de la France mais il arrive qu'elle se développe dans le Nord lors de certaines années chaudes (Maufras et Maumené, 2007).

Les solutions pour contrôler la rouille brune sont la sélection variétale et surtout la lutte phytosanitaire. Le programme de traitement est souvent composé de trois traitements dans le Sud de la France, un au stade montaison en cas de rouille brune précoce, un au stade dernière feuille pour protéger les feuilles et un au stade fin épiaison pour protéger l'épi (Cochet J.C., 2004). Dans le Nord, les traitements sont réalisés uniquement en cas d'observation de pustules sur l'un des trois étages foliaires les plus hauts (Cochet B. et al., 2006). Ajuster les programmes de lutte chimique en fonction du développement de la maladie est une voie qui contribue à une utilisation à la fois plus efficace et plus parcimonieuse des fongicides (Gouache et Couleaud, 2009), en cohérence avec les objectifs du Grenelle de l'Environnement (An., 2007). Cependant, elle demande de pouvoir prévoir ce développement.

La recherche de corrélations entre données climatiques et développement des maladies s'est développée depuis de nombreuses années (Coakley et al., 1984, 1985) et a permis la mise au point de modèles de prédiction basée sur des régressions linéaires, notamment pour la rouille brune (Eversmeyer et Kramer, 1998 ; Moschini et Perez, 1999). Elle a aussi fait l'objet de développements méthodologiques intéressants, avec en particulier le développement d'une technique de recherche automatisée baptisée « Window Pane » (Coakley et al., 1988). Cette méthodologie a été reprise récemment, lui fournissant un cadre d'interprétation statistique et biologique visant à éviter les écueils de corrélations hasardeuses (Pietravalle et al., 2003 ; te Beest et al., 2008).

Dans ce travail, on a mis en oeuvre ces méthodologies de recherche de variables explicatives des niveaux de nuisibilité interannuelle causée par la rouille brune sur blé dur et on a évalué le potentiel de ces variables dans le cadre de schémas de prévision, suite à une série de travaux préliminaires réalisés par Braun (2008).

MATERIEL ET MÉTHODE

DONNEES

Les données utilisées dans ce travail sont issues d'essais de comparaison de variétés de blé dur conduits tous les ans dans les différentes stations régionales d'ARVALIS – Institut du Végétal (Tableau I). Chaque essai est conduit avec et sans traitement fongicide. Ces données ont permis de calculer pour chaque essai la perte de rendement moyenne (en pourcentage du rendement traité). On considère que cette perte de rendement est due uniquement à la rouille brune. On a veillé, par le choix des essais, à ne pas inclure des essais où d'autres maladies seraient la cause prépondérante de pertes de rendement. La variable à expliquer est ainsi la nuisibilité de la rouille brune en pourcentage de perte de rendement. Les données sont réparties sur vingt ans entre 1988 et 2008 et sur quatre zones géographiques : Ouest (site du Magneraud – 17), Centre (site d'Ouzouer – 41), Sud Est (site de Nîmes – 30) et Sud Ouest (site de Montgaillard – 31). Les données météorologiques ont été obtenues via des stations positionnées à proximité des sites d'essai.

Tableau I : Sites-années des essais utilisés.
(Year-sites in the data base).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Ouest | | | | | | | | | | | x | x | | x | x | x | x | x | x | | |
| Centre | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | | x | | x | x | |
| Sud Est | | | | | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Sud Ouest | | | | | | | | | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | |

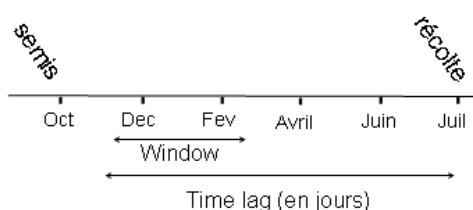
CALCULS DES VARIABLES CLIMATIQUES

L'algorithme « Window Pane » modifié tel que le décrit Pietravalle et al. (2003) a été codé avec le logiciel R (R Development Core Team, 2008). Le principe est d'étudier de manière itérative la corrélation entre la variable à expliquer et une variable climatique sur des périodes différentes et de durées différentes. Partant d'une date d'origine, on retranche des « lags » pour obtenir la date de début de calcul de la variable météorologique. Pour chaque « lag », on calcule la variable sur des fenêtres (« window ») de longueurs différentes. Les périodes balayées ont été choisies pour couvrir l'été précédant l'implantation de la culture et l'automne, hiver et printemps de la culture.

Pour la période avant semis, le « lag » variait entre 20 et 90 jours avec un pas de 5 jours. Son origine a été choisie au 30/09. Pour la période après le semis, il a été élargi jusqu'à 240 jours à partir de 01/07, date proche de la récolte. Pour chaque « lag », des « windows » de 20 à 60 jours ont été étudiées avec un pas de 5 jours (Figure 1). Le minimum de 20 jours a été choisi afin d'éviter d'être influencé par des événements climatiques trop ponctuels.

Figure 1 : Exemple de calcul de Window pane : « Window » de novembre à mars dans un « lag » de huit mois avant la récolte.

(Example of a Window pane calculation : Window from November to March in a time lag of eight months preceding the harvesting).



Les variables climatiques utilisées sont la température (en °C), les précipitations (en mm), le rayonnement (en calorie) et la pluie moins l'évapotranspiration (P-ETP en mm) quotidiennes. Chaque variable a été déclinée sous différentes « formes » :

- somme de la variable avec un seuil ou un plafond,
- nombre de jours où la variable est au dessus ou en dessous d'un seuil,
- nombre de séquences de 3 ou 7 jours consécutifs où la variable est au dessus ou en dessous d'un seuil,
- moyenne de la variable avec un seuil ou un plafond.

SELECTION DE VARIABLES

Pour chaque variable climatique, le coefficient de corrélation de Spearman (fonction cor.test de R) entre cette variable et la nuisibilité a été calculé, ainsi que la p-value de cette corrélation. Un premier tri des variables a été fait sur la base de la valeur absolue de cette corrélation (supérieure à 30%) ainsi que son degré de significativité (inférieur à 5%). La sélection d'un nombre plus restreint de variables s'est ensuite faite en tenant compte des recommandations formulées par Pietravalle et al. (2003) :

- le nombre de « lags » sur lesquels la corrélation ressort,
- le nombre de « windows » sur lesquels la corrélation ressort,
- la cohérence de cette corrélation avec des éléments connus de la biologie du parasite,
- l'existence de variables similaires qui ressortent comme corrélées.

On a également préféré des fenêtres longues afin d'éviter de donner trop de poids à des séquences climatiques trop particulières.

AJUSTEMENT DE MODELES

Plusieurs types de modèles ont été ajustés aux données ainsi établies. Des modèles de prévision quantitative de la nuisibilité ont été construits par régression linéaire multiple (fonction lm de R) : un modèle général et des modèles spécifiques à chaque région. Ils ont été évalués par leur erreur quadratique moyenne (ou RMSE : « Root Mean Square Error ») et leur erreur quadratique moyenne de prédiction (ou RMSEP : « Root Mean Square Error of Prediction ») calculée par validation croisée : on a ôté successivement les données de chaque année, ajusté le modèle au nouveau jeu de données ainsi obtenu, et prédit les valeurs de nuisibilité de l'année en question. Pour le modèle global, la RMSE a été décomposée afin de mieux interpréter l'erreur du modèle (Kobayashi et Salam, 2000). La MSE qui est égale à l'erreur quadratique moyenne au carré est la somme de trois coefficients : un coefficient correspondant au biais général des prédictions (SB), un autre à la différence de variabilité entre les valeurs prédites et les valeurs observées (SDSD), et le dernier à la capacité de prédire le reste des fluctuations des valeurs observées (LCS).

$$MSE = SB + SDSD + LCS \quad \text{avec : } SB = (\bar{x} - \bar{y})^2$$

$$LCS = 2SD_s SD_m (1 - r) \quad SDSD = (SD_s - SD_m)^2$$

On a aussi cherché à explorer le potentiel des variables sélectionnées pour prendre une décision de traitement binaire. Le jeu de données a été divisé en deux catégories : nuisibilité faible, inférieure à 10%, et nuisibilité forte, supérieure à 10%. Un modèle de régression logistique a ensuite été ajusté aux données (fonction glm de R). La qualité de prédiction de ce modèle a été évaluée par analyse ROC (Hughes et al., 1999) avec le package ROCR de R (Sing et al., 2007).

RESULTATS

VARIABLES SELECTIONNEES

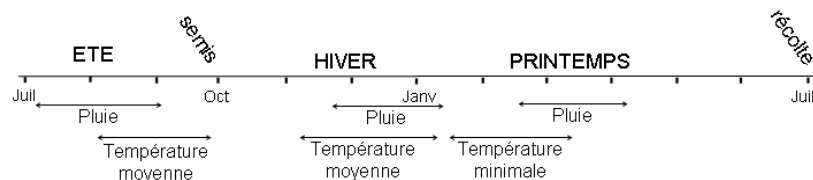
La procédure « Window Pane » a permis d'identifier 66 variables sur la période précédant la culture et 7563 pour la période de culture. Pour la réalisation des modèles, six variables ont finalement été retenues (Tableau II et Figure 2), une liée à la température et une liée à la pluie

pour chacune des trois périodes que sont l'été précédent l'implantation de la culture, l'hiver et le printemps de la période de culture.

Tableau II : Variables climatiques sélectionnées pour le modèle.
(Selected weather variables for the model).

| Variable | Notation | Description | Window Length | Time Lag | Corrélation | P-value |
|-------------|----------|--|---------------|----------|-------------|---------|
| ETE | | | | | | |
| sPluie | P.ete | Accumulation des précipitations | 86 | 61 | 0.32 | 0.018 |
| c3TMoysup25 | T.ete | Nombre de séquences de 3 jours consécutifs où la température moyenne est supérieure à 25°C | 60 | 55 | -0.3 | 0.032 |
| HIVER | | | | | | |
| c3TMoyinf10 | T.hiv | Nombre de séquences de 3 jours consécutifs où la température moyenne est inférieure à 10°C | 235 | 60 | -0.49 | <0.001 |
| c3Pluiesup1 | P.hiv | Nombre de séquences de 3 jours consécutifs où l'accumulation de pluie est supérieure à 1mm | 215 | 50 | -0.27 | 0.049 |
| PRINTEMPS | | | | | | |
| nTMinsup10 | T.print | Nombre de jours où la température est supérieure à 10°C | 170 | 60 | 0.48 | <0.001 |
| c3Pluieinf5 | P.print | Nombre de séquences de 3 jours consécutifs où l'accumulation de pluie est inférieure à 5mm | 130 | 50 | -0.27 | 0.048 |

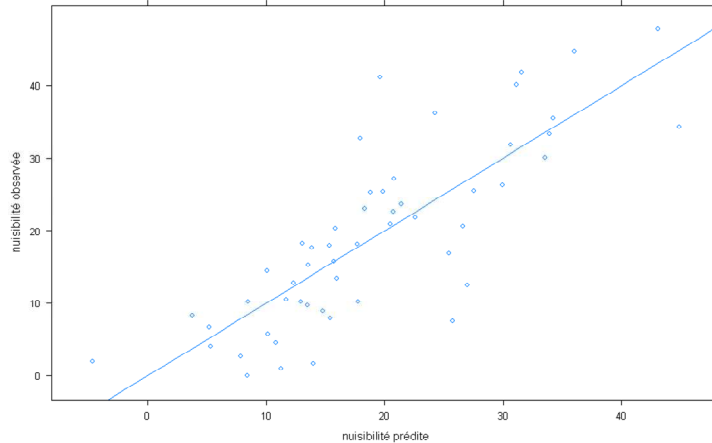
Figure 2 : Représentation chronologique des variables sélectionnées.
(Chosen weather variables for the model represented on a time line).



PREVISION QUANTITATIVE

Le modèle établi avec toute la base de données est significatif à $5 \cdot 10^{-9}$ et présente un coefficient de détermination (R^2) de 0.65 (Figure 3). La droite de régression de la nuisibilité observée en fonction de la nuisibilité prédite a un coefficient directeur de 1 et une ordonnée à l'origine avec des intervalles de confiance à 95% respectifs de [0.8 ; 1.2] et de [-4.43 ; 4.43]. L'erreur quadratique moyenne du modèle (RMSE) est égale à 7.26. Avec la décomposition de la MSE (cf. Tableau III), on s'aperçoit que LCS est le coefficient prépondérant. Il participe à la hauteur de 90%, ensuite la SDSD à 10% et SB est nul. On en conclut qu'il n'y a pas de biais dans le modèle ($SB=0$), la déviation standard des valeurs prédites est relativement proche de celle des valeurs observées ($SDSD=5.596$) mais qu'il reste des fluctuations observées dont le modèle ne rend pas compte ($LCS=47.123$).

Figure 3 : Nuisibilités observées en fonction des nuisibilités prédites par régression linéaire. (Relationship between observed and predicted - by linear regression - fungicide response).



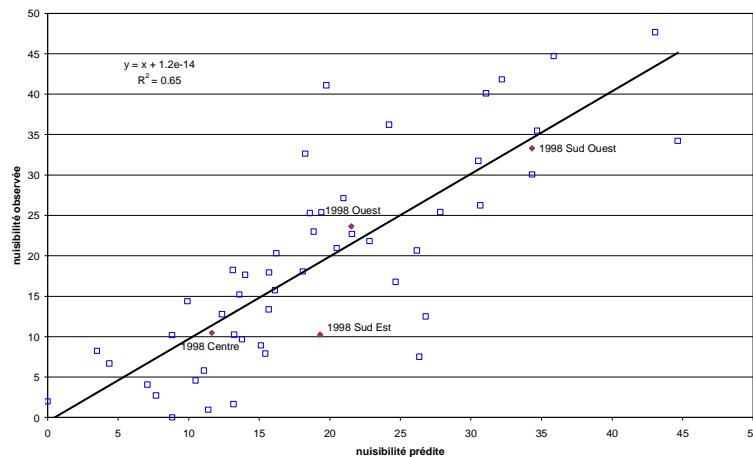
Ce modèle a été évalué en validation croisée et comparé à un modèle qui aurait été ajusté région par région. On remarque que le modèle régionalisé permet un meilleur ajustement, mais que sa qualité prédictive est nettement plus faible (Tableau III).

Tableau III : Erreurs quadratiques moyennes (RMSE) et erreurs quadratiques moyennes de prédiction (RMSEP) des modèles globaux et régionalisés. (Root mean square error and root mean square error of prediction for the overall and regionalized models).

| | RMSE | RMSEP |
|--------------------|------|-------|
| Modèle global | 7.26 | 8.97 |
| Modèle régionalisé | 5.56 | 19.97 |

On observe également en validation croisée (Figure 4) une absence de biais, la droite de régression a une pente égale à 1 avec un intervalle de confiance à 95% de [0.78 ; 1.22] (fonction confint de R) et une ordonnée à l'origine de $1.2 \cdot 10^{-14}$ avec un intervalle de confiance à 95% [-4.7 ; 4.7].

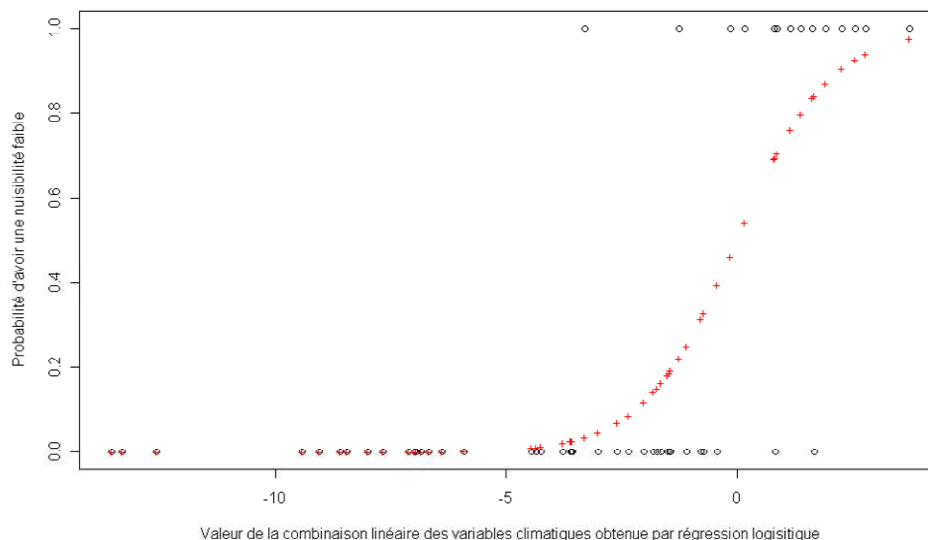
Figure 4 : Exemple de validation croisée pour l'année 1998. (Example of a crossed validation for 1998).



PREVISION QUALITATIVE

Le modèle ajusté par régression logistique permet d'obtenir une combinaison linéaire des variables qui se relie à la probabilité d'avoir une nuisibilité inférieure à 10% (Figure 5). On peut également utiliser cette combinaison linéaire comme un indicateur d'appartenance à la classe de nuisibilité. Par exemple, en fixant un seuil à 10%, on voit que l'on classe bien tous les essais sauf 5. La méthodologie des courbes ROC permet de quantifier la qualité d'un indicateur pour une classification binaire telle que celle-ci. Le critère classiquement utilisé est celui de l'aire sous la courbe ROC : plus celui-ci est proche de 1, plus la prédiction est bonne. Dans notre cas, sa valeur est de 0.94.

Figure 5 : Nuisibilité observée en fonction de la nuisibilité prédite par la régression logistique (points noirs = positionnements des essais individuels, points rouges = probabilités modélisées)
(Observed damage in function of predicted damage by logistic regression (black points = individual trial positions, red points= modelled probabilities)).



DISCUSSION

Les variables climatiques retenues dans ce modèle sont en cohérence avec les facteurs identifiés comme importants dans le développement de la rouille brune dans des publications antérieures. L'influence de l'humidité et des conditions de température a effectivement été mise en avant par de nombreux auteurs (Caron et al., 1994 ; Eversmeyer et al., 1988, 1994 ; Harris et Clifford, 1981). Les paramètres de température sélectionnés sont la température supérieure à 10°C ou inférieure à 25°C. Or cet intervalle contient la température optimale de fonctionnement de la maladie (proche de 15°C) (Eversmeyer et al., 1988). Dans ce travail, en l'absence de données spécifiques d'humidité relative, on a observé que les variables liées à la pluie ressortaient fortement. Le rayonnement est ressorti ponctuellement mais pas de manière majeure, malgré son influence sur l'infection (de Vallavieille et al., 2002 ; Eversmeyer et al., 1988). L'importance de l'été et de l'hiver a été mise en avant par Eversmeyer et Kramer (1994) et Caron et al. (1994). Ces auteurs mettent en avant que les conditions climatiques estivales

jouent sur la survie de l'inoculum biotrophe sur des repousses de blé ou d'éventuels hôtes secondaires. Quant à la phase hivernale, son importance résiderait essentiellement dans les conditions de température qui limitent la réalisation d'un grand nombre de cycles infectieux. La prise en compte de la température hivernale dans les modèles mécanistes apparaît donc primordiale.

D'un point de vue méthodologique, l'utilisation d'une procédure comme « Window Pane » peut conduire à l'identification de corrélations hasardeuses. Cependant, l'encadrement avec des critères quantitatifs et qualitatifs, basés sur de la connaissance biologique, comme recommandé par Pietravalle et al. (2003) et te Beest et al. (2008) ont abouti à un modèle robuste. Il est intéressant de souligner que la robustesse du modèle est bien plus forte en conservant un modèle unique pour toutes les régions : une plus forte variabilité géographique permet ici de mieux prédire une variabilité interannuelle.

Sur le plan de l'usage, on a également pu montrer que les variables sélectionnées permettent une prise de décision binaire efficace. Le seuil de 10% de nuisibilité a ici été choisi arbitrairement, il serait intéressant d'établir à partir de quelle nuisibilité un traitement est rentabilisé, auquel cas le modèle pourrait peut être permettre de prendre cette décision. Cela demanderait cependant de n'inclure que des variables déterminées tôt en saison, comme cela a été fait dans te Beest et al (2009) avec la septoriose. Dans notre cas, les variables climatiques ont été pris tôt en saison avant mi-avril, mais pour les régions les plus précoces, il faudrait voir si le modèle sans les variables printemps serait toujours aussi robuste.

CONCLUSION

L'utilisation d'une procédure de sélection des variables climatiques corrélées à la nuisibilité de la rouille brune sur blé dur a permis la mise au point de deux modèles de prévision : un modèle qualitatif qui peut servir d'outil d'aide à la décision de traitement et un modèle quantitatif qui prévoit la nuisibilité. Les deux modèles pourront donner des tendances régionales en France d'une année sur l'autre. Leur caractère global leur donne une meilleure robustesse et une bonne prédiction.

Pour utiliser le modèle quantitatif, il faudrait déterminer le seuil de nuisibilité à partir duquel un traitement serait conseillé. Ce seuil pourrait être fixé à l'aide d'une analyse économique.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un stage de niveau stage de fin d'étude. Il a bénéficié du soutien du projet Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural) n°6128 « Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives. » dans le cadre de l'UMT (Unité Mixte Technologique) Pivert. Les auteurs remercient les collaborateurs d'Arvalis pour leur aide, et en particulier Philippe Braun et les personnes ayant permis d'obtenir les données.

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 2007 - Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » in : *Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »*. Disponible sur http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf Consulté le 3 août 2009.

Braun, P., 2008 - Récolte française 2007 : production, qualité, faits marquants. 10ème journée nationale de la filière blé dur (Labège - 17/01/2008)

Caron D., Barrault G., Albertini L., 1994 - Epidémiologie de la rouille brune du blé (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) dans le Sud-Ouest de la France. *Revue de cytologie et de biologie végétales, Le Botaniste*, 18, 3-4, 121-165.

Coakley S.M., McDaniel L.R., Shaner G., 1985 - Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology*, 75, 11, 1245-1251.

Coakley S.M., Line R.F., McDaniel L.R., 1988 - Predicting stripe rust severity on winter wheat using an improved method for analysing meteorological and rust data. *Phytopathology*, 78, 543-550.

Coakley S.M., Boyd W.S., Line R.F., 1984 - Development of regional models that use meteorological variables for predicting strip rust disease on winter wheat. *Journal of Climate and applied meteorology*, 23, 1234-1240.

Cochet B., Flodrops Y., Rouillon C., Bonnefoy M., Delsuc B., 2006 - Traitements et interventions de printemps des céréales, Ile de France, Centre, Limousin. *Choisir céréales*, 2, 54-58.

Cochet J.C., Laconde J.P., 2004 - Traitements et interventions de printemps des céréales, Région Aquitaine, Midi-Pyrénées, Aude. *Choisir céréales*, 2, 52-57.

de Vallavielle-Pope C., Huber L., Leconte M., Bethenod O., 2002 - Preinoculation effects of light quantity on infection efficiency of *Puccinia striiformis* and *P. triticina* on wheat seedlings. *Phytopathology*, 92, 1308-1314.

Eversmeyer M.G., Kramer C.L., Hassan Z.M., 1988 - Environmental influence on the establishment of *Puccinia recondita* infection structures. *Plant Disease*, 72, 409-412.

Eversmeyer M.G., Kramer C.L., 1994 - Survival of *Puccinia recondita* and *P. graminis* uredinospores as affected by exposure to weather conditions at one meter. *Phytopathology*, 84, 332-335.

Eversmeyer M.G., Kramer C.L., 1998 - Models of early spring survival of wheat leaf rust in the Central Great Plains. *Plant Disease*, 82, 987-991.

Gouache, D., Couleaud G., 2009 - Le positionnement des traitements fongicides : enjeu pour la septoriose et intérêt du modèle « SeptoLIS ». In 9ème Conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours (France): AFPP.

Harris, R.G., Clifford B.C., 1981 - Controlled environment studies of the epidemic potential of *Puccinia triticina* f.sp. *tritici* on wheat in Britain. *Transactions of the british mycological society*, 77, 2, 351-358.

Hugues G., McRoberts N., Burnett F.J., 1999 - Decision-making and diagnosis in disease management. *Plant Pathology*, 48, 2, 147-153.

Kobayashi K., Salam M.U., 2000 – Comparing simulated and measured values using mean squared deviation and its components. *Agron. J.*, 92, 345-352.

Maufras J.Y., Maumené C., 2007 - Dossier fongicides: Rouille brune : les leçons d'une mise à l'épreuve. *Perspectives Agricoles*, 340, 22-26.

Moschini R.C., Perez B.A., 1999 - Predicting leaf rust severity using planting date, genetic resistance, and weather variables. *Plant Disease*, 83, 381-384.

Pietravalle S., Shaw M.W., Parker S.R., Van Den Bosch F., 2003 - Modeling of relationships between weather and *Septoria tritici* epidemics on winter wheat: A critical approach. *Phytopathology*, 93, 10, 1329-1339.

R Development Core Team, 2008 - R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Sing T., Sander O., Beerenwinkel N., Lengauer T., 2007 - ROCR: Visualizing the performance of scoring classifiers. R package version 1.0-2. <http://rocr.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>

te Beest D.E., Paveley N.D., Shaw M.W., van den Bosch F., 2008 - Disease-weather relationships for Powdery Mildew and Yellow Rust on winter wheat. *Phytopathology*, 98, 5, 609-617.

te Beest D.E., Shaw M.W., Pietravalle S., van den Bosch F., 2009 - A predictive model for early-warning of *Septoria* leaf blotch on winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 3, 413-425.

**AFPP- 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS-8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LE CAVITY SPOT DE LA CAROTTE :
Utilisation de l'agent de lutte biologique *Trichoderma atroviride* I-1237**

C. CORDIER ⁽¹⁾, C. LUNEAU ⁽²⁾ et J. DUBOIS ⁽²⁾

⁽¹⁾ AGRAUXINE SA, siège social ZA Troyalac'h, 2 Rue Louis Lumière,
29170 SAINT EVARZEC, France

⁽²⁾ SILEBAN, BP 1, 50760 BARFLEUR, France

RESUME

La lutte contre la maladie de la tache, autrement appelée Cavity Spot, due à l'agent pathogène *Pythium* sp. reste une priorité dans les différents bassins de production de carottes. Actuellement, un produit phytosanitaire, Santhal, est utilisé pour lutter contre cette maladie. Parmi les méthodes de lutte envisagées, la lutte biologique faisant appel à l'utilisation de micro-organismes antagonistes est une alternative possible. Les champignons du genre *Trichoderma* sp. sont très étudiés depuis de nombreuses années en tant qu'agents de lutte biologique pour lutter contre les maladies d'origine tellurique. Dans le cadre d'expérimentations conduites au SILEBAN en 2007 et 2008, une souche antagoniste de *T. atroviride* (I-1237) développée par AGRAUXINE a été étudiée pour son efficacité contre le Cavity Spot.

Les essais en conditions semi contrôlées, sous serre, ont été réalisés dans des pots de 12 litres contenant un sol naturellement infesté par *Pythium* sp. L'agent antagoniste a été apporté au sol à trois doses différentes. Les essais en conditions de plein champ ont consistés à introduire artificiellement l'inoculum pathogène de *Pythium* sp. puis à apporter l'agent antagoniste. Dans chaque essai, le Santhal a été utilisé comme référence chimique.

Dans tous les essais, la maladie s'est fortement exprimée chez les plantes témoins avec 70% de plantes atteintes en fin de culture. Il a pu ainsi être montré une réduction significative de la maladie en termes de fréquence et d'intensité d'attaque des carottes par *Pythium* sp après traitement du sol avec la souche fongique antagoniste I-1237. La protection apportée par la souche I-1237 est toujours significativement supérieure à celle obtenue avec la référence chimique. Pour exemple, au champ, 98,1% des carottes sont saines dans la modalité inoculée avec I-1237 contre 39,5% seulement avec le traitement phytosanitaire.

Ces premiers résultats sont encourageants et sont à reproduire dans les futures expérimentations.

9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT DISEASES
TOURS – FRANCE - 8 AND 9 DECEMBER 2009

CONTROLLING CUCUMBER DOWNY MILDEW USING SOME EGYPTIAN MEDICINAL
PLANT EXTRACTS UNDER FIELD CONDITIONS

AFIFI, M.A. AND SAHAR, A.M. ZAYAN

Plant Pathology Research Institute, Agricultural Research Center, Giza, Egypt

SUMMARY

Downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* is a serious disease of cucumber crop grown in Egypt, causing significant loss of fruit quality and yield. Sun – dried samples of six Egyptian medicinal plant species, i.e. Eucalyptus leaves (*Eucalyptus globulus*), Lemon grass leaves (*Cymbopogon citratus*), Peppermint leaves (*Mentha piperita*), Rosmary (*Rosmarinus officinalis*), Marjoram leaves (*Majorana hortensis*) and Sweet basil leaves (*Ocimum bacilicum*), were used. Aqueous extracts of these plants with three concentrations (5.0, 10.0 and 15%) per each were evaluated against *P. cubensis* under field conditions in comparison with Ridomil MZ fungicide during 2007 and 2008 cucumber successive seasons. Results indicated that all medicinal plant extracts reduced the disease severity of downy mildew compared with control (sprayed only with water); the highest reduction of disease severity % was obtained with Rosmary, Lemon grass, Sweet basil and Eucalyptus respectively. On the other hand, increasing of cucumber yield produced by plants treated with aqueous medicinal extracts was recorded. These results reported that medicinal plant extracts can be used as an effective, safe treatment for the control of cucumber downy mildew disease in Egypt.

Keywords: cucumber, downy mildew, *P. cubensis*, medicinal plant extract

RÉSUMÉ

Le mildiou du concombre, causé par *Pseudoperonospora cubensis* est une maladie importante en Egypte, entraînant des pertes significatives de récolte et de qualité de fruit. Des échantillons de feuilles de six plantes médicinales égyptiennes séchées au soleil : eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), citronnelle (*Cymbopogon citratus*), menthe poivrée (*Mentha piperita*), romarin (*Rosmarinus officinalis*), marjolaine (*Majorana hortensis*) et basilic (*Ocimum bacilicum*), ont été utilisés. Les efficacités contre *P. cubensis* de trois concentrations d'extraits aqueux de chacune de ces plantes (5.0, 10.0 et 15 %) ont été évalués au champ en 2007 et 2008, en comparaison avec du Ridomil MZ. Les résultats ont indiqué que tous les extraits de plantes permettaient une réduction de l'intensité de la maladie par rapport au témoin (traité uniquement avec de l'eau); les efficacités les plus élevées ont été obtenues avec le romarin, la citronnelle, le basilic et l'eucalyptus. D'autre part, une augmentation de rendement (par rapport au témoin) a été enregistrée pour les plantes traitées avec ces extraits aqueux. Ces résultats montrent que les extraits de plantes médicinales peuvent être utilisés comme traitement efficace pour le contrôle du mildiou du concombre en Egypte.

Mots-clés : la moisissure au concombre, pelucheuse, *P. cubensis*, l'extrait médicinal d'équipement.

INTRODUCTION

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is considered one of the most economic vegetables crop as an agriculture activity and commodity in Egypt, for both local consumption and for exportation purposes, such a potential crop is known to suffer from many diseases among them foliar diseases. Downy mildew caused by the oomycete *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt.) Rostow. is one of the most destructive foliar diseases of cucumber distributed widely throughout the world under open fields and protected agriculture (Palti and Cohen, 1980). Such disease can reduce yield, fruit quality, and harvesting time. It does so by leaf infections which impair necessary food production in the plant. In Egypt, losses caused by downy mildew on cucumber may reach to 30 – 80% from fruit yield when the percentage of infection reaches to 50 – 100% during cool, moist weather (El-Nagar *et al.*, 1991 and El-Shoraky, 1992). Disease control can be achieved by using resistant cultivars and / or chemicals and may lose it is efficacy if new pathotypes or fungicide-tolerant forms of the fungus appear, beside, the high cost of such chemicals forbids their use by ordinary farmers. Furthermore, in view of chemical products undesired secondary effects may pose ecological problems and the fact that cucumber requires continuous prolonged harvesting. These facts shift the disease control strategy towards finding the suitable alternatives as substitutes for synthetic fungicides. This, in turn, necessitates the search for alternatives in plant and plant products, many of which have been reported to be antimicrobials against plant pathogenic fungi and effective in the control of several plant diseases (Shetty *et al.*, 1984; Grayer & Harbome, 1994; Lawson & Denedy, 1998; Bowers & Locke, 2000; Enikuomehin & Peters, 2002 and Okigbo & Emoghene, 2003). Plant extracts might be a substantial alternative of chemical fungicides in controlling plant diseases. Extracts of medicinal plants from Egypt inhibited mycelial growth and germination of spores of different phytopathogenic fungi (EL-Badrawy & Hanan, 1998; Abd-EL- Kareem *et al.*, 2002 and Abd-EL- Khair & Omima, 2006). The present study was conducted to spot the effect of aqueous leaf extracts of six Egyptian medicinal plants as eco-environmental friendly and cheap alternatives on controlling cucumber downy mildew compared to recommended fungicide under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum Preparation: For greenhouse tests, *P. cubensis* was maintained on cucumber plants in pots (25 cm in diameter) and incubated at 20°C, 18 hr. light and 90% relative humidity (RH). To inoculate cucumber plants, the procedure described by (Okuno *et al.*, 1991) was used. Infected leaves of cucumber plants were collected from commercial fields in Nobaryia (Behera Governorate) that had not been sprayed with fungicides. Leaves were collected in the morning, placed in plastic bags and stored in a cooler with ice. In the laboratory, sporangial spores were harvested from heavy-infected leaves using a brush and water containing 0.01% tween 80 (poly oxyethylene) as sufficient. The sporangial spores suspension was filtered through fine nylon mesh to remove large hyphal aggregates, and then washed twice with sterilized water, using Whatman No. 3 filter paper to retain the sporangia. The sporangia concentration was adjusted to 10^5 spores per ml with a hemacytometer and lightly atomized onto cucumber leaves.

Preparation of Aqueous Extracts of Egyptian Medicinal Plant: Fresh leaves of six Egyptian medicinal plants were obtained and utilized for the experiments as water extraction according to the method described by (Achim & Schlosser, 1992 and EL-Badrawy & Hanan, 1998). 100 grams of each sun-dried Egyptian medicinal plant leaves were separately added to 1000 ml distilled water (1:10 w/v) and then, extracted under cold conditions for 24h. The concentrations of (5.0, 10.0 and 15%), as a crude aqueous extract, were screened for their effectiveness against downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) on cucumber plants *in vitro* and *in vivo*.

Leaf disk technique: Cucumber plants of susceptible cultivars, Beit Alpha were used to prepare leaf disks. The tenth leaf below the apex was surface sterilized with 0.1% sodium hypo-chlorit and rinsed three times in sterile water. Fifteen leaf disks (15 mm in diameter) were sprayed with aqueous extracts of Egyptian medicinal plants and sterilized water only served as a control. After 24hr. 2ml of spores suspension was sprayed over the disks. The disks were put inside petri dishes (90 mm in diameter) containing wettable filter paper with six replicates for each treatment. The disks then incubated at 20°C in dark ness. After 24hr spores germination were determined under a light microscope.

Greenhouse experiments: Under greenhouse conditions, cucumber Beit Alpha a high susceptible cultivar was sown in 25 cm diameter pots filled with sterilized sandy-clay soil (1:1) at a rate of five seeds /pot. Incubated at 20°C light and 90% relative humidity (RH). Plants were inoculated with *P. cubensis* (10^5 sporangia / ml) after 25 days from planting. Seedlings were divided into two treatments; the first pre-inoculation treatment, in which aqueous extracts of Egyptian medicinal plants and sterilized water only served as a control were sprayed four days before inoculation. The second treatment, cucumber plants were sprayed with the same aforementioned treatments four days after inoculation. Inoculum suspension was sprayed onto adaxial (upper) or abaxial (lower) leaf surfaces of cucumber plants using a glass atomizer at about 10ml/plant. Inoculated plants were placed at previous mentioned conditions for 10 days before assaying the disease severity. Five replicated were used for each treatment. Disease severity was measured according to (Reuveni, 1983) using color index and infected area. The color index was calculated as follows; 0, no symptoms; 1, greenish; 2, yellowish; 3, yellow; 4, brown. The infected area index was as follow; 1= indicates that symptoms on 25% or less; 2= 26-50%; 3= 51-75%, 4= 76-100% of leaf area. Multiplication of the color and infected area indexes for each leaf yields a value of disease severity. Spores of *P. cubensis* were collected from infected lesions 10 days after inoculation. Leaves were taken at the early morning and then immersed in a jar containing 10 ml of distilled water. Spores were released from lesion using a brush, and were counted by using hemacytometer slide. Means of six replicates, each containing 10 leaves were calculated.

Field experiments: This investigation was performed throughout 2007 and 2008 cucumber successive Nilli-seasons at Nobaryia locality (Behera Governorate) commercial fields. The experiments were arranged in a randomized complete block design technique. Plot area was 1/200 of feddan (21 m²) and was separated at each end by 1.5 m alleys. Three rows 7 meter in length and 1 meter in width were included in each replicate. Beit Alpha cucumber seeds were sown in one-side rows at 50 cm apart. The fertilizers were added 25, 40 and 55 days after sowing. Other cultural practices were done as usual under natural infection. Aqueous extracts of Six Egyptian medicinal plants were used against downy mildew. Four replicates were used for each treatment and non-treated plots (sprayed with only water) served as controls. A concentration of (15%) aqueous leaves extracts of Egyptian medicinal plants was used in field experiments since it gave the highest reduction of downy mildew disease severity and spores germination and numbers of infected cucumber leaves in *vitro* and under greenhouse conditions. Spraying was started at the first stage of downy mildew symptoms and repeated five times every two weeks. Ridomil MZ (WP), the recommended fungicide against the studied disease, was used at the rate of 2.5 g/l water in order to compare its effect to those of the plant extracts. Disease severity of downy mildew according to (Reuveni, 1983) and yield were estimated and recorded at the end of experiments (15 days after the last spray). Efficacy of different treatments in controlling cucumber downy mildew was recorded using a randomized sample of one hundred leaves from each plot according to the method described by (Horsfall and Barrat, 1945).

Statistical Analysis: Data were statistically analyzed in lab. for Design & Stat. Analysis Res., Field Crop Res., Inst., Agric. Res. Center, Giza, Egypt. According to the procedures outlined by

(Gomez & Gomes, 1984) and the treatment means were compared by least significant differences (L.S.D).

RESULTS

Data in Table I indicated that all concentrations of the tested aqueous extracts of Egyptian medicinal plants significantly affect *P. cubensis* spore germination comparing to the control. Meanwhile, the percentage values of spore germination reduction were proportional to concentration from 5.0% to 15%, the best results of all tested plant extracts obtained at 15%. Furthermore, results showed that spore germination was highly reduced by aqueous extract of Rosmary followed by Lemon grass, Sweet basil, Eucalyptus, Peppermint and Marjoram respectively. They recorded values of spore germination reduction (%) of 98, 96, 93, 90, 83 and 78 at concentration of 15% respectively.

Results in Table II show that all tested aqueous extracts of Egyptian medicinal plants applications at different concentrations (5, 10 and 15%) under greenhouse conditions were critical on reducing the downy mildew disease severity (%). Reduction in disease severity was highly increased on cucumber leaves sprayed either pre or post inoculation treatments at concentration of 15% compared with untreated plants. Among the tested extracts, remarkable results were achieved on Rosmary when used pre or post inoculation followed by Sweet basil, Lemon grass, Eucalyptus, Peppermint and Marjoram respectively. They scored values of disease severity reduction (%) of 92.6, 89.9, 87.1, 83.4, 65.1 and 64.2 for pre- inoculation respectively and 87.9, 84.4, 81.8, 81, 64.6 and 56.8 respectively for post- inoculation experiments. Means, clearly Indicated that application of aqueous extracts of Egyptian medicinal plants as pre-inoculation was effective to reduced the downy mildew disease severity (%) than applied as post inoculation.

Data in Table III illustrate that in cucumber plants sprayed with tested aqueous extracts of Egyptian medicinal plants 4 days before or after inoculation, a significant reduction in *P. cubensis* sporulation was found in infected lesion, compared with control (sprayed with only detailed water). Still, Rosmary at concentration of 15%, strongly suppressed sporulation of *P. cubensis* on infected lesions by 96.2 and 95.8 % compared with the other treatments in pre and post inoculation followed by Sweet basil, Lemon grass, Eucalyptus, Peppermint and Marjoram respectively. Whereas, the percentage of spore counts in cucumber infected leaves were reduced by 96.2, 94.9, 94.5, 93.6, 67.9 and 59.8 in pre-inoculation, and by 95.8, 93.9, 92.7, 92.4, 68.8 and 62.1 in post inoculation experiments respectively. However, results confirmed that post-inoculation trail was less effective on *P. cubensis* spores production on infected cucumber leaves.

Field experiments results as shown in Table (4) generally reported that downy mildew development on highly susceptible cucumber cultivar Biet Alpha, grown under open field conditions of Nilli seasons in 2007 and 2008 was significantly affected by spraying an aqueous leaves extracts of six Egyptian medicinal plants at concentration of 15% and the recommended fungicide Ridomil MZ at a dose of 2.5 g/l water. Downy mildew percentage of disease severity was ranged from 5.7 to 22.4, 5.8 to 21.3 compared with control from 84.6 and 88.1 in 2007 and 2008 respectively. Clearly, Rosmary was considered to be the best aqueous extract for controlling cucumber downy mildew disease severity which proved almost disease control efficacy in both seasons by 93.2 and 93.4% respectively. Meanwhile, Ridomil MZ came in second rank after Rosmary, but before lemon grass, sweet basil and Eucalyptus as a good result of efficacy percentage in controlling downy mildew by 92.5, 87.7, 86.0, 79.7 and 93.0, 85.3, 82.7, 79.9 in 2007 and 2008 respectively. The lowest results in control efficacy (%) were obtained with Peppermint and Marjoram by 75.7, 73.5 and 77.1, 75.8 in 2007 and 2008 respectively. Furthermore data presented in Table (4) showed that the produced cucumber

yields (kg/plant) was increased for all treatments of Egyptian medicinal plants aqueous extracts as well as Ridomil increased in both experimental seasons comparing with control treatments (sprayed with only water). It is noteworthy that increasing in yield was proportionally positive with the reducing percentage of downy mildew disease severity.

DISCUSSION

Downy mildew is a devastating disease in cucumber plants especially when low temperature and high humidity seasons are present in Egypt. The causal agent, *P. cubensis* has development resistance to fungicides (Klinkenberg *et al.*, 1998). Beside the considerable concern about the intensive use of fungicides and it is a side effect on environment. Therefore, there is an urgent need to find an alternative mean to control plant diseases. The results obtained in this work showed that aqueous leaf extracts of six Egyptian medicinal plants in a comparative screening with recommended fungicide Ridomil MZ as a foliar spray serve as an alternative mean to protect cucumber plants against *P. cubensis* and the best control is achieved by sprays carried out soon after and before infection as well as reduce environmental pollution. The disease was effectively controlled by all the tested leaves extracts of Egyptian medicinal plants.

The preliminary experiments of this study showed that *in vitro* and under greenhouse conditions the tested extracts were effective in suppressing the spore germination, development and disease severity when applied pre and post inoculation at different tested concentrations from 5.0 to 15% . Increasing concentration at 15% resulted in a progressive reduction in the percentage of spore numbers and germination of *P. cubensis* as well as disease severity (%). In this respect, (Fiori *et al.*, 2000) found that a crude extract of *C. citrates* and *Eucalyptus citriodora* leaves were efficient at inhibiting spore germination of the fungus *Didymella bryoniae*. And with those of (EL-Badrawy & Hanan, 1998; Abd-EL- Kareem *et al.*, 2002 and Abd-EL- Khair & Omima, 2006), they reported that Extracts of medicinal plants from Egypt inhibited mycelial growth and germination of spores of different phytopathogenic fungi. Clearly, Rosmary at 15% sprayed either pre or post inoculation had an excellent effect on reduction downy mildew disease severity and pathogen development compared with control treatment. Results obtained under open field conditions during cucumber Nilli seasons in 2007 and 2008 confirmed the effectiveness of the medicinal plant extract in controlling cucumber downy mildew, presented as a reduction of disease severity and increase in cucumber yields for all tested extracts and recommended fungicide Ridomil. The increase in cucumber yields by using medicinal plant extracts may be the direct result to the decrease in foliar-plant damages, which usually occurred by downy mildew. Our results have an agreement with several investigations carried out all over the world to declare for the positive roll of medicinal plant extracts in control of plant diseases and have antimicrobials against plant pathogenic fungi (Shetty *et al.*, 1984; Grayer & Harbome, 1994; Lawson & Dennedy, 1998; Bowers & Locke, 2000; Enikuomihin & Peters, 2002 and Okigbo & Emoghene, 2003). Moreover, our studies revealed a close correlation between extract concentration and disease reduction. This connection may be helpful for establishing extract concentrations for conditions of practical application. The results of this study suggested it may be possible to replace conventional chemical fungicides with leaf extracts of Egyptian medicinal plants, it is safe for human, environment and thus provided both economical and ecological efficacy.

REFERENCES

- Horsfall, J.G; Barratt, R.W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology* **35**: 655.
- Klinkenberg, H. J.; Stierl, J. R. and WDehne, H. 1998. Investigation on fungicide resistance in Oomycetes. Proceedings, 50th International Symposium on Crop Protection, Mededelingn Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent.,63: 1005-1015.
- Fiori, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.J.B; Vida, C.A.;Scapim, M.E.S Cruz and Pascholati,S.F. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology* **148** (7-8): 483-487.
- Achimu, P. and Scholsser, A. 1992. Effect of neem seed extracts (*Azadirachta indica* A. Juss) against downy mildew (*Plasmopara viticola*) of grape vine. *Med. Fac. Land bouww. Univ. Gent*, **57**(2): 423-431.
- Reuveni, R., 1983. Resistance of *cucumis melo* to *Pseudoperonospora cubensis*. *Ann. Bio.*, **102**: 533-537.
- Okuno, T., M. Nakayama, N. Okajima and I. Furusawa, 1991. Systemic resistance to downy mildew and appearance of acid soluble proteins in cucumber leaves treated with biotic and a biotic inducers. *Annals of the Phthopathol. Soci. Japan*, **57**:203-211.
- Shetty, S. A.; Prakash, H. S. and Shetty, H. H. 1984. Efficacy of certain plant extracts against seed-borne prevalence of *Trichoconiella padwickii* in paddy (*Oryza sativa*). *Canadian J Bot* **67**(7), 1956-1958.
- Grayer, R. J. and Harbome, J. B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **37**, 19-42.
- Lawson, M. and Deneddy, R. 1998. Evaluation of garlic oil and other chemicals for control of downey mildew (*Peronospora parasitica*) in organic production of brassicas. *Ann Appl Biol* **132**(suppl), 14-15.
- Bowers, J. H. and Locke, J. C. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium wilt* in the greenhouse. *Plant Dis* **84**, 300-305.
- El-Shoraky, S., 1992. Studies on some cucumber diseases in Egypt. M. Sc. Thesis, Fac. of Agric. Tanta Univ., 79pp.
- El-Nagar, M. A.; Maklad, F. M.; Ali, M. H. and Fadi, F. A., 1991. Downy mildew disease of cucumber in plastic houses and its control. *Egypt. J. Appl. Sci*, 6pp.
- Enikuomihin, O.A. and Peters, O.T. 2002. Evaluation of crude extracts from some Nigerian plants for the control of field diseases of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Trop. Oilseeds J.*, **7**: 84-93.

Okigbo, R.N. and Emoghene, A.O. 2003. Effect of leaf extract of three plant species on *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, the causal organism of Black Sigatoka disease of Banana (*Musa acuminata*). Niger. J. Pl. Prot., 20: 101-110.

Palti, J., and Cohen, Y. 1980. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*). The fungus and its hosts, distribution, epidemiology, and control. Phytoparasitica 8: 109-147.

Abd-EL- Kareem F., Abd-Alla M.-A., EL- Mohamady R.-S., 2002 - Induced resistance in potato plants for controlling early blight disease under field conditions. Egypt. J. Appl. Sci.,17: 51-66.

Abd-EL- Khair, H, and Omima, M. Hafez, 2006. Effect of aqueous extracts of some medicinal plants in controlling the green mould disease and improvement of stored "Washington" navel orange quality. J. Applied Sciences Research, 2: 664-674.

EL-Badrawy, F. and H. Hanan, 1998. The Antimicrobial Activity of some Medicinal Plants. M.Sc. Thesis, Depart. Agric. Microbial, Fac. Agric., Ain Shams Univ., pp 24-26.

Table I: Assessment of germination of *P. cubensis* on cucumber leaf disks (15mm) sprayed with different concentrations (5, 10 and 15%) of Egyptian medicinal plants aqueous extracts, 24h pre- inoculation and incubation at 20°C.

Evaluation de la germination de *P.cubensis* sur les disques de feuilles de concombre (15 mm) pulverizes avec différentes concentrations (5,10 et 15%) d'extraits aqueux de plantes médicinales égyptiennes, 24 heures avant inoculation et incubation à 20°C

| Treatments | Spores germination (%) | | | | | | |
|-------------|------------------------|----|------|----|------|----|------|
| | 5.0% | | 10% | | 15% | | Mean |
| | G% | R% | G% | R% | G% | R% | |
| Peppermint | 19.6 | 76 | 14.4 | 82 | 14.1 | 83 | 16.0 |
| Lemon grass | 5.9 | 93 | 3.8 | 95 | 3.5 | 96 | 4.4 |
| Eucalyptus | 10.3 | 87 | 7.9 | 90 | 8.1 | 90 | 8.7 |
| Sweet basil | 6.2 | 92 | 5.6 | 93 | 5.8 | 93 | 5.8 |
| Rosmary | 1.9 | 97 | 1.6 | 98 | 1.5 | 98 | 1.6 |
| Marjoram | 23.1 | 72 | 17.5 | 79 | 17.8 | 78 | 19.4 |
| Control | 82.4 | | | | | | |

G%= spore germination R%= redaction of spore germination

T= Treatment and C= Concentration

L.S.D at 5% T= 0.882 C= 0.577 TC= 1.528

Table II: Efficacy of different concentrations (5, 10 and 15%) of Egyptian medicinal plants aqueous extracts on disease severity of downy mildew disease when applied pre or post inoculation of *P. cubensis* under greenhouse conditions.

Effet de différentes concentrations (5,10 et 15%) d'extraits aqueux de plantes médicinales égyptiennes sur le niveau d'attaque de mildiou lorsque l'application a lieu en pre ou post inoculation par *P.cubensis* en conditions sous serres.

| Treatments | Disease severity (%) | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------------|------|-----|------|-----|------|------------------|------|------|-----|------|-----|------|-------|
| | Pre-inoculation | | | | | | Post-inoculation | | | | | | | |
| | 5% | | 10% | | 15% | | Mean | 5% | | 10% | | 15% | | Mean |
| | D.S | R% | D.S | R% | D.S | R% | | D.S | R% | D.S | R% | D.S | R% | |
| Peppermint | 4.3 | 60.5 | 4.1 | 62.3 | 3.8 | 65.1 | 4.0 | 5.5 | 52.5 | 4.6 | 60.3 | 4.1 | 64.6 | 4.7 |
| Lemon grass | 2.2 | 79.8 | 2.0 | 81.6 | 1.4 | 87.1 | 1.8 | 3.4 | 70.6 | 2.5 | 78.4 | 2.1 | 81.8 | 2.6 |
| Eucalyptus | 2.7 | 75.2 | 2.2 | 79.8 | 1.8 | 83.4 | 2.2 | 3.3 | 71.5 | 2.9 | 75.0 | 2.2 | 81.0 | 2.8 |
| Sweet basil | 2.1 | 80.7 | 1.6 | 85.3 | 1.1 | 89.9 | 1.6 | 2.9 | 75.0 | 2.0 | 82.7 | 1.8 | 84.4 | 2.2 |
| Rosmary | 1.5 | 86.2 | 1.2 | 88.9 | 0.8 | 92.6 | 1.1 | 1.9 | 83.6 | 1.7 | 85.3 | 1.4 | 87.9 | 1.6 |
| Marjoram | 4.5 | 58.7 | 4.2 | 61.4 | 3.9 | 64.2 | 4.2 | 5.9 | 49.1 | 5.4 | 53.4 | 5.0 | 56.8 | 5.4 |
| Control | 10.9 | | | | | | ----- | 11.6 | | | | | | ----- |

D.S=disease severity R%=reduction of disease severity

P= Application time pre and post-inoculation T= Treatment C= Concentration

L.S.D at5% P=0.183 T= 0.343 PT= ns C= 0.225 PC= ns TC=ns

PTC= ns

Table III: Efficacy of different concentrations (5, 10 and 15%) of Egyptian medicinal plants aqueous extracts on *P. cubensis* spores counts / c m² when applied pre or post inoculation of *P. cubensis* under greenhouse conditions.

Effet de différentes concentrations (5,10 et 15%) d'extraits aqueux de plantes médicinales égyptiennes sur le nombre de spores de *P.cubensis* lorsque l'application a lieu en pre ou post inoculation par *P.cubensis* en conditions sous serres

| Treatments | <i>P. cubensis</i> spores counts / c m ² of infected lesions | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|------|--------|------|--------|------|-------|------------------|------|--------|------|--------|------|--------|
| | Pre-inoculation | | | | | | | Post-inoculation | | | | | | |
| | 5% | | 10% | | 15% | | Mean | 5% | | 10% | | 15% | | Mean |
| | S. No. | R% | S. No. | R% | S. No. | R% | | S. No. | R% | S. No. | R% | S. No. | R% | Mean |
| Peppermint | 864.0 | 60.3 | 773.9 | 64.4 | 698.2 | 67.9 | 778.7 | 923.7 | 66.7 | 881.0 | 68.3 | 865.9 | 68.8 | 890.2 |
| Lemon grass | 155.0 | 92.8 | 137.7 | 93.6 | 119.4 | 94.5 | 137.3 | 244.1 | 91.2 | 215.0 | 92.2 | 200.8 | 92.7 | 219.9 |
| Eucalyptus | 188.2 | 91.3 | 152.0 | 93.0 | 138.0 | 93.6 | 159.4 | 264.0 | 90.5 | 226.6 | 91.8 | 211.2 | 92.4 | 233.9 |
| Sweet basil | 143.0 | 93.4 | 116.0 | 94.6 | 109.4 | 94.9 | 122.8 | 226.0 | 91.8 | 202.0 | 92.7 | 168.3 | 93.9 | 198.7 |
| Rosmary | 101.0 | 95.3 | 92.0 | 95.7 | 80.6 | 96.2 | 91.2 | 154.2 | 94.4 | 124.3 | 95.5 | 115.0 | 95.8 | 131.1 |
| Marjoram | 917.3 | 57.8 | 898.0 | 58.7 | 875.2 | 59.8 | 896.8 | 1327.0 | 52.2 | 1101.5 | 60.3 | 1053.8 | 62.1 | 1160.7 |
| Control | 2177.6 | | | | | | ----- | 2781.5 | | | | | | ----- |

S.No=number of spores R%=reduction of spores number

P= Application time pre and post-inoculation

T= Treatment

C= Concentration

L.S.D at5%

P=1.204

T= 2.253

PT= 3.186

C= 1.475

PC= 2.086

TC=3.902

PTC= 5.519

Table IV: Effect of Egyptian medicinal plants aqueous extracts and recommended fungicide (Ridomil MZ) on disease severity (%) of cucumber downy mildew and yield (kg/plant) under field conditions in successive Nilli-seasons at Nobaryia locality (Behera Governorate).

Effet d' extraits aqueux de plantes medicinales egyptiennes et d'un fongicide recommandé (Ridomil MZ) sur le développement du mildiou du concombre et sur le rendement (kg/plante) en condition de plein champs durant les saisons Nilly dans la localité de Nobaryia (Behera Governorate)

| Treatment | 2007 | | | | 2008 | | | |
|-------------|----------------------|--------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------|-----------------|-----------------------|
| | Disease severity (%) | Efficacy (%) | Yield Kg / plant | Increase* or decrease | Disease severity (%) | Efficacy (%) | Yield Kg /plant | Increase* or decrease |
| Peppermint | 20.5 | 75.7 | 1.62 | 70.52 (+) | 20.1 | 77.1 | 1.52 | 73.71 (+) |
| Lemon grass | 10.4 | 87.7 | 2.00 | 110.52(+) | 12.9 | 85.3 | 2.15 | 145.71(+) |
| Eucalyptus | 17.1 | 79.7 | 1.70 | 78.94 (+) | 17.7 | 79.9 | 1.52 | 73.71 (+) |
| Sweet basil | 11.8 | 86.0 | 1.85 | 94.73 (+) | 15.2 | 82.7 | 1.65 | 88.57 (+) |
| Rosmary | 5.7 | 93.2 | 2.55 | 168.42(+) | 5.8 | 93.4 | 2.81 | 221.14(+) |
| Marjoram | 22.4 | 73.5 | 1.50 | 57.89 (+) | 21.3 | 75.8 | 1.46 | 66.85 (+) |
| Ridomil MZ | 6.3 | 92.5 | 2.30 | 142.10(+) | 6.1 | 93.0 | 2.72 | 210.85(+) |
| Control | 84.6 | ----- | 0.950 | ----- | 88.1 | ----- | 0.875 | ----- |
| L.S.D at 5% | 1.159 | | | | 1.139 | | | |

**AFPP- 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS-8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**EFFICACITE DE STIMULATEURS DE DEFENSES DES PLANTES (BTH ET
PHOSPHONATES) SUR L'OÏDIUM ET LE MILDIOU DE LA VIGNE : IMPACT DE LA
DIVERSITE DES PATHOGENES**

M.-C. DUFOUR, L. DRUELLE, P. SAURIS, G. TARIS, M.-F. CORIO-COSTET

INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave
d'Ornon, France

RESUME

Les phosphonates, sont connus pour posséder un pouvoir antifongique, mais également pour stimuler les défenses des plantes. Dans cette étude l'efficacité de deux phosphonates ; le fosétyl-Al et un fertilisant foliaire (PK2) a été évaluée sur différents génotypes et phénotypes de mildiou de la vigne (sensibles ou résistants aux fongicides - *Plasmopara viticola*) et d'oïdium (*Erysiphe necator*- groupe génétique A ou B). Leur efficacité a été comparée à celle de l'acibenzolar-S-méthyle, un analogue de l'acide salicylique décrit comme stimulateur des défenses. En parallèle, nous avons également quantifié par RT-Q-PCR l'expression de 16 gènes d'intérêt impliqués dans les défenses des plantes. Il existe des efficacités variables de la stimulation des défenses de la vigne en fonction du groupe d'agents pathogènes considérés. L'expression des gènes de défenses varie selon la molécule stimulatrice mais également selon la variabilité inter et intra espèces des pathogènes. En complément, une étude d'efficacité sur le terrain a été réalisée en 2009 qui compare les efficacités de traitements du fosétyl-Al, de l'acibenzolar-S-méthyle et du mancozèbe vis-à-vis du mildiou après une inoculation artificielle de mildiou

Mots-clés : défense des plantes, méthodes alternatives, expression de gènes, efficacité terrain, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola*

SUMMARY

IMPACT OF GRAPEVINE DOWNY AND POWDERY MILDEW DIVERSITY ON THE EFFICACY OF PHOSPHONATE DERIVATIVES (FOSÉTYL-AL, PK2) DESCRIBED LIKE STIMULATOR OF PLANT DEFENCES.

Phosphonates are well known to possess powerful antifungal activity, and the fungicide fosetyl-Al is known to exert both a direct effect on the pathogen and an indirect effect via stimulation of host defences. In this study, the efficacy of two phosphonate derivatives fosetyl-Al and a foliar fertilizer (PK2) was tested on different genotypes and phenotypes of grape downy (*Plasmopara viticola*) and powdery (*Erysiphe necator*) mildews. We quantified the level of gene expression of proteins involved in potential plant defence pathways by RT-Q-PCR and compared the gene expression induced after treatments with Benzothiadiazole (BTH), which mimics salicylic acid in natural systemic acquired resistance. Phosphonate derivatives are efficient against powdery mildew depending on genetic group (A or B) and that group B strains are four -fold more sensitive to fosetyl-Al than group A strains. Field trials undergone in 2009, show significant differences in fosetyl, BTH, dithane efficiencies compared to the control against downy mildew after artificial contamination. We conclude on the role of diversity of the two pathogens on the efficacy of these chemical compounds and also on the effective stimulation of grapevine plant defences.

Keywords: acquired systemic resistance, plant immunity, phosphonates, bezothiadiazole, gene expression, powdery mildew, downy mildew

INTRODUCTION

La vigne est soumise à la pression de nombreux bioagresseurs dont des parasites obligatoires tels que l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). À elle seule, avec moins de 3% de SAU, la vigne consomme 20 % des pesticides commercialisés en France chaque année, dont 80 % sont des fongicides. La maîtrise des épidémies nécessite ainsi de nombreux traitements chimiques ayant des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé. L'utilisation de stimulateurs de défenses, aux côtés de la résistance variétale et de la lutte biologique, peut représenter une méthode de lutte alternative d'intérêt.

Parce qu'ils agissent sur la plante et non directement sur le pathogène, les éliciteurs induisent une résistance de la plante hôte multifactorielle qui sera plus difficile à contourner par le pathogène, que l'effet d'un fongicide mono-site. Les voies de signalisation intracellulaires activées chez les plantes suite à la réaction de défense convergent notamment vers la production de formes actives de l'oxygène, de métabolites secondaires, d'hormones (acide salicylique (SA), acide jasmonique, éthylène ou acide abscissique) la mise en place d'un renforcement des parois cellulaires et l'induction de gènes de défense dont les produits directs ou indirects peuvent contribuer à l'arrêt du développement du pathogène. Parmi toutes les réactions mises en place par la plante pour limiter le développement des agents pathogènes, la synthèse de nouvelles protéines, appelées protéine de pathogénèse (PR) localement accumulées au site de l'infection (Van Loon *et al.*, 2006), sont décrites comme étant un bon marqueur de la résistance induite dans plusieurs espèces de plantes. De manière générale, la résistance systémique acquise (SAR) est le résultat de l'effet combiné de plusieurs PR protéines plutôt que l'effet spécifique d'une seule (Durrant et Dong, 2004).

L'acibenzolar-S-méthyle, un dérivé benzothiadiazole (BTH), est un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, décrit comme stimulateur de la résistance systémique acquise chez les mono et dicotylédones. Il est efficace envers un large spectre de pathogènes allant des virus, bactéries aux parasites fongiques mais également contre les insectes, nématodes et phytoplasmes (Sticher *et al.*, 1997). Il active le signal de transduction de la SAR en agissant sur des étapes qui se situent en amont ou au niveau de l'accumulation de SA (Ryals *et al.*, 1996).

Le fosétyl-aluminium (FOS) est un fongicide actif contre les oomycètes, mais ce phosphonate jouerait également un rôle de stimulant des défenses naturelles chez la tomate infectée par *Phytophthora capsici* (Bompeix *et al.*, 1981) et chez la vigne lors d'une attaque par *Plasmopara viticola* (Raynal *et al.*, 1980).

Le PK2, un fertilisant foliaire, appartient aussi à la famille des phosphonates et semble présenter une action de stimulateur des défenses naturelles de la vigne. En effet, des plants traités avec ce produit suggèrent l'existence de stimulation des défenses suite à la présence précoce d'éthylène (indication de stress), d'une accumulation précoce de lignine et de phytoalexines autour du site d'infection (Soyez, 2001). Il semble que tous les phosphonates (HPO_3^-) possèdent ce potentiel de stimulation des défenses, et qu'ils soient immédiatement disponibles pour la mise en alerte des systèmes de défense de la plante.

Le but de cette étude était de préciser le rôle d'élicitation de produits générant des ions phosphonates et d'évaluer, *in vitro* et *in natura*, l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne contre les deux principaux agents pathogènes que sont l'oïdium et le mildiou. Il s'agit d'appréhender l'efficacité de tels traitements face à la diversité des populations d'oïdium et de mildiou. Ainsi, différentes souches d'oïdium de la vigne appartenant soit au groupe génétique A ou B, et différentes souches de mildiou sensibles ou résistantes aux fongicides ont-elles été confrontées à l'efficacité de pré-traitements des plantes avec les différentes molécules précitées. Les efficacités ont été évaluées à différents niveaux : biologique (tests d'efficacité sur la croissance mycélienne des pathogènes) et au niveau moléculaire (niveau d'expression de gènes). Des essais au vignoble, sur des parcelles expérimentales élémentaires prétraitées avec les différents produits éliciteurs, ont été réalisés, afin d'estimer l'efficacité et le potentiel de ces produits en conditions naturelles. L'objectif final est de mieux comprendre comment ces éliciteurs fonctionnent, et d'évaluer

l'intérêt de développer des stratégies alternatives d'induction des mécanismes de défense au cours du développement de la vigne.

MATERIEL ET METHODE

Collection d'isolats et production d'inoculum

Plasmopara viticola

Une collection de souches mono-sporange a été repiquée sur des feuilles de vigne en survie et conservée à – 20°C comme décrit par Chen *et al.*, 2006. Six souches présentant des sensibilités différentes à plusieurs fongicides ont été utilisées (2 sensibles et 4 résistantes) (Tableau I).

Erysiphe necator

Les souches d'oïdium sont repiquées sur des feuilles maintenues en survie ou conservées sur des vitro-plants de vigne à 15 °C, après un isolement monoconidien comme décrit par Délye *et al.*, 1997. Dix souches appartenant au groupe génétique A et 9 au groupe B ont été utilisées au cours des expériences (Tableau I).

Tableau I : Caractéristiques des souches française de *P. viticola* et *E. necator* utilisées dans cette étude.

(Table I Characteristics of *P. viticola* and of *E. necator* isolates)

| | Souches | Année de prélèvement | FAM ₁ | IPRO ² | MEF ₃ | Tests d'efficacité | Expression de gènes |
|----------------------------|---------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Plasmopara viticola</i> | PIC 59 | 2003 | R | S | R | X | |
| | CAS 01 | 2005 | R | R | S | X | X |
| | PAU 32 | 2003 | R | S | R | X | |
| | EAU 08 | 2005 | R | R | S | X | |
| | FLE 01 | 2004 | S | S | S | X | |
| | COU 15 | 2003 | S | S | S | X | X |
| | | | Groupe génétique | | | | |
| <i>Erysiphe necator</i> | PVR 43 | 2003 | | A | | X | |
| | GF 10 | 2003 | | B | | X | |
| | LAT 12 | 2003 | | B | | X | |
| | CC 49 | 1999 | | B | | X | |
| | CHL 02 | 2004 | | B | | X | |
| | BR 33 | 2002 | | A | | X | |
| | PAL 01 | 2003 | | B | | X | |
| | LLU 70 | 2006 | | A | | X | |
| | LLU 41 | 2006 | | A | | X | X |
| | LLU 55 | 2006 | | A | | X | |
| | PV 15 | 2006 | | A | | X | |
| | PV 33 | 2006 | | A | | X | |
| | PVR 38 | 2005 | | A | | X | |
| | ORA 4 | 2003 | | A | | X | |
| | 2B 15 | 2000 | | B | | X | |
| | PV 28 | 2006 | | B | | X | |
| | PV 46 | 2006 | | B | | X | |
| | PV 74 | 2006 | | B | | X | X |
| ORA 3 | 2003 | | A | | X | | |

FAM : famoxadone ; IPRO : Iprovalicarbe, MEF : mefenoxam.

Produits utilisés

Les solutions des différents produits sont préparées extemporanément pour les tests *in vitro*. Pour l'oïdium, les applications sont effectuées en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire.

Acibenzolar S-méthyle ou BTH

Nom UIPAC: S-méthyl (1, 2, 3) benzothiadiazole 7 – carbothioate.

Nom commercial: Bion®, C₈H₆N₂OS₂, PM = 210. Le BTH est appliqué à 6 concentrations de matière active: 0,47 ; 1,18 ; 2,36 ; 3,54 ; 4,72 et 7,08 mM sur des disques de feuilles.

Fosétyl d'aluminium ou FOS

Nom UIPAC: Ethyl hydrogene phosphonate aluminium.

Nom commercial: Aliette®, C₆H₁₈-(PO₃)₃-Al, PM = 354. Le FOS est appliqué à 6 concentrations : 0,28 ; 0,70 ; 1,40 ; 2,11 ; 2,81 et 4,21 mM.

Un fertilisant ou PK₂

Nom usuel : phosphonate de potassium, K₂HPO₃, PM = 157.

Le PK₂ est appliqué à 6 concentrations : 0,63 ; 1,59 ; 3,18 ; 4,78 ; 6,37 et 9,55 mM.

Détermination de la sensibilité aux traitements

Les tests d'évaluation de l'efficacité des stimulateurs des défenses de la vigne sont réalisés sur des disques de feuilles comme décrit dans Délye *et al.*, 1997 et Chen *et al.*, 2006 . Huit disques de feuilles sont pulvérisés avec les différentes concentrations d'éliciteurs, séchés, puis inoculés soit avec une suspension de sporanges (5000 spores/ml) soit avec une dispersion de conidies (600-800 par cm²). Quatre expériences indépendantes ont été réalisées avec les différentes souches d'oïdium et trois avec les souches de mildiou. L'efficacité du traitement est déterminée par une évaluation visuelle du pourcentage de croissance des pathogènes sur les disques après 12 jours de croissance pour l'oïdium et après 7 jours pour le mildiou à 22°C. Les CI₅₀, concentrations inhibant 50% de la croissance du pathogène sont déterminées comme décrit dans Sombardier *et al.*, 2009.

Evaluation de l'efficacité au vignoble

Les tests sont réalisés sur une parcelle expérimentale, constituée de répétition de 4 blocs constitués de trois ceps de Cabernet Sauvignon non traités ou traités hebdomadairement avec 2 g/L de matière active de BTH, 2,5 g/L de Fosétyl-aluminium et 2,1g/L de mancozèbe (fongicide de référence).

Les traitements ont débuté le 5 mai 2009 au stade phénologique 13-14 de l'échelle BBCH (3-4 feuilles étalées) et ont cessé le 21 juillet au stade 79 de l'échelle BBCH (fruits et baies ont atteint leur taille finale), soit 12 traitements. Une inoculation artificielle a été réalisée le 27 mai, (stade 55, BBCH) 24 h après le quatrième traitement, à raison de 6 feuilles par cep pulvérisé avec une solution à 44 000 sporanges /ml. Quatre prélèvements sont effectués (24h après les traitements) au cours de la période de test, à raison de 12 feuilles par modalité pour tester au laboratoire l'efficacité des produits au niveau biologique, biochimique et moléculaire. L'évaluation de la maladie au vignoble a débuté le 4 juin, après 5 traitements et une semaine après l'inoculation artificielle. Le niveau d'attaque de 100 feuilles par bloc est ainsi évalué hebdomadairement et le niveau d'attaque de 50 grappes par bloc a été évalué deux fois au cours de l'expérience : le 25 juin, et le 23 juillet soit 4 semaines et 9 semaines après l'inoculation artificielle.

Extraction d' ADN et amplification par RT-QPCR

Pour l'étude de l'expression des gènes, *in vitro*, les concentrations suivantes ont été utilisées pour pré traiter les feuilles, 24 h avant l'inoculation de pathogènes: 1,90 mM de BTH, 1,13 mM de FOS et 3,18 mM de PK₂. Les tests sont effectués sur 6 feuilles entières par modalité. Quatre expériences indépendantes sont réalisées, 2 pour le mildiou et 2 pour l'oïdium.

L'extraction des ARNs est réalisée selon le protocole décrit par Reid *et al.*, (2006). Le mélange agité est incubé une heure à 65°C. Après ajout d'un volume du mélange chloroforme: alcool isoamylique (24:2 ; v/v), et centrifugation, la phase aqueuse est ré-extraite dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol. Après précipitation (- 80°C, 30 min) et centrifugation, le culot d'acides nucléiques est dissout dans 1 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,5), puis ajouté à 3 vol de LiCl à 8 M. Après une nuit à 4°C, les ARNs précipitent par centrifugation à 20000 g (30 minutes à 4°C), et les quantités d'ARNs sont mesurées à 260 nm et 280 nm par spectrométrie (Genequant pro, Amersham Bioscience, France).

Deux µg d'ARNs sont traités à la DNase puis rétro-transcrits en utilisant 1,2 µM d'oligo d(T)₁₅ et la reverse transcriptase M-MLV de Promega selon les recommandations du fabricant. Les cDNAs obtenus sont ensuite stockés à -20 °C. Les réactions de qPCR sont réalisées en double comme décrit par Dufour et Corio-Costet, 2009. Pour chaque gène et pour chaque modalité, une valeur de Cq moyen (cycle quantification) est obtenue, représentant la valeur du nombre de cycle de qPCR à partir duquel le seuil de fluorescence devient significativement différent du bruit de fond. L'expression relative (ER) des gènes est ensuite calculée en appliquant la formule suivante (Germer *et al.*, 2000): $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (modalité étudiée) - ΔCt (modalité témoin).

Tableau II : Gènes utilisés pour dessiner les amorces pour l'étude de l'expression des gènes de défense de la vigne.

(Table II: Genes used to design primers to gene expression study in *Vitis vinifera*)

| Gènes | N° accession GeneBank |
|---|-----------------------|
| Chaîne gamma du facteur d'élongation 1 (EF1) | AF176496 |
| Phénylalanine ammonia lyase (PAL) | X75967 |
| Stilbène synthase (STS) | X76892 |
| PR protéines de classe 1 (PR1) | AJ536326 |
| PR protéines de classe 10 (PR10) | AJ291705 |
| Chalcone isomérase (CHI) | X75963 |
| Chalcone synthase (CHS) | X75969 |
| Chitinase de classe III (CHIT3) | Z68123 |
| Chitinase de classe IV (CHIT4) | WU97521 |
| Protéine inhibant les polygalacturonases (PGIP) | AF305093 |
| β1,3 glucanase (GLU) | AF239617 |
| Inhibiteur de sérine protéase (PIN) | AY156047 |
| Lipoxygénase (LOX) | AY159556 |
| Leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) | X75966 |
| Glutathione S- transférase (GST) | AY156048 |
| Anthocyanidine réductase (BAN) | VI000166 |
| Acide 1-aminocyclopropane, 1-carboxylique synthase (ACC) | AF424611 |

Analyses des données

Pour évaluer l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne et l'expression des gènes selon la diversité des pathogènes, les données ont été soumises soit à une analyse de covariance par modèle général linéaire (données d'efficacité), soit à une analyse de variance (données d'expression) en utilisant un programme d'analyse statistique Systat 11 (Systat Software, Inc). Les différences significatives des valeurs moyennes sont déterminées au seuil de 0,05 et les comparaisons deux à deux sont effectuées par le test de Tukey.

RESULTATS

Evaluation biologique de l'efficacité des différents stimulateurs

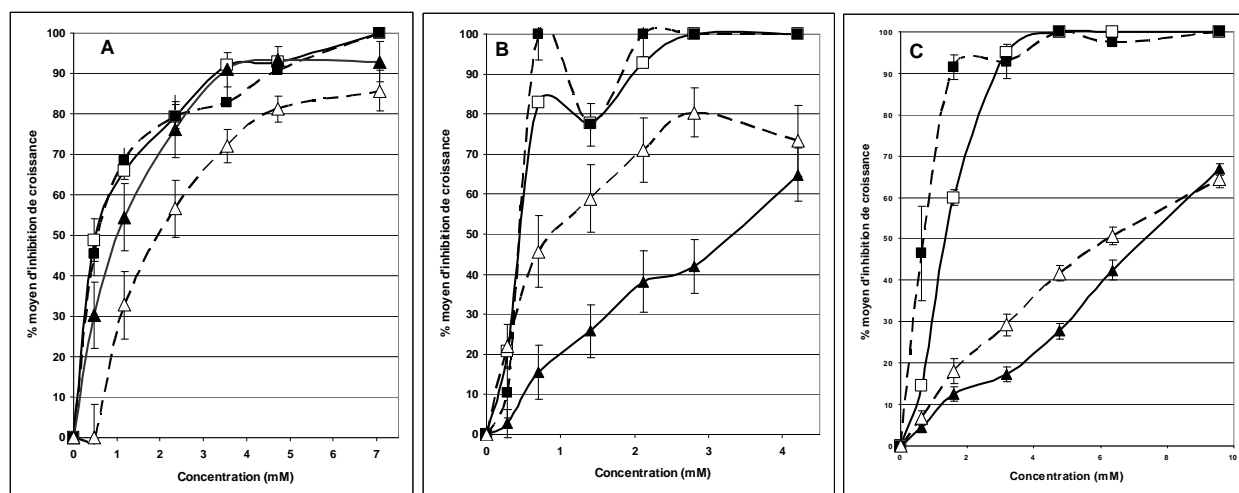
L'efficacité des différents stimulateurs a été évaluée sur 19 souches d'oidium de la vigne (10 appartenant au groupe A et 9 au groupe B) ainsi que sur 2 souches de mildiou sensibles aux fongicides et 4 souches présentant de la résistance aux fongicides (Tableau I).

Effet du benzothiadiazole (BTH)

Le BTH a une bonne efficacité contre le mildiou et l'oïdium et permet d'atteindre 85 à 100% d'inhibition (figure 1, A). Les valeurs de CI_{50} déterminées sont de 0,47 mM pour les deux groupes de souches de mildiou et de 1,05 mM et 2 mM pour les souches de groupe A et B d'oïdium. Cependant aucune différence significative n'existe entre les différents groupes. L'efficacité du BTH s'avère assez homogène quel que soit le groupe de pathogène considéré.

Figure 1 : Inhibition de croissance des différents groupes de souches de *P. viticola* : (-■-) sensibles aux fongicides (n = 2); (-□-) résistantes aux fongicides (n=4) ; et d' *E. necator* : (-▲-) souches de groupe A (n= 10), (--Δ-) souches de groupe B (n= 9) en fonction des différentes molécules testées : (A) : BTH ; (B) FOS ; (C) PK2.

(Figure 1: Growth inhibition of the different groups of *P. viticola* [(-■-) fungicide sensitive (n = 2); (-□-) fungicide resistant (n=4)] and of *E. necator* isolates [(-▲-) genetic group A (n= 10), (--Δ-) genetic group B(n= 9)] depending on various concentrations of different compounds; (A) : BTH ; (B) FOS ; (C) PK2)



Effet du fosétyl d'aluminium (FOS)

Le fosétyl d'aluminium (FOS) (figure 1, B) induit des efficacités variables de 65 à 100% selon le pathogène considéré, avec une meilleure efficacité vis-à-vis du mildiou que vis-à-vis de l'oïdium. Les valeurs de CI_{50} calculées pour les souches sensibles (0,48 mM) et résistantes (0,52 mM) ne sont pas significativement différentes. A l'inverse, pour les souches d'oïdium appartenant soit au groupe génétique A (3,30 mM) soit au groupe génétique B (0,98 mM), il existe une différence significative ($P= 0,0001$). Aucune différence significative n'existe entre les deux groupes de souches de mildiou et le groupe de souche B d'oïdium. Seules les souches appartenant au groupe A sont moins sensibles à l'effet du fosétyl que l'ensemble des autres souches de pathogènes testés.

Effet du fertilisant PK2

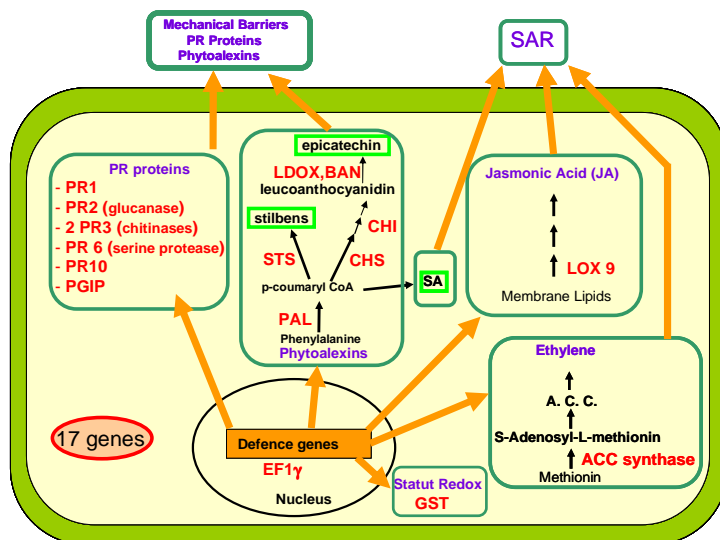
L'efficacité obtenue suite aux applications de différentes concentrations de PK2 (figure 1, C), conduit à un maximum d'efficacité vis-à-vis des deux groupes de souches de mildiou (100%) et à une efficacité plus faible vis-à-vis de l'oïdium (65%). Les valeurs de CI_{50} obtenues pour les souches sensibles et résistantes de mildiou sont de 0,64 et 1,27 mM ne sont pas significativement différentes. Cependant le fertilisant est significativement plus efficace vis-à-vis du mildiou que vis-à-vis de l'oïdium ($P = 0,0001$). Concernant l'oïdium, les CI_{50} obtenues pour les souches du groupe A (7,44 mM) et les souches du groupe B (6,36 mM) ne sont pas significativement différentes.

Expression de gène

Le gène codant pour le facteur d'élongation gamma (EF1 γ) a été choisi comme gène de référence. Les 16 gènes étudiés (tableau II, figure 2)) sont exprimés par rapport à EF1. L'expression des gènes a été suivie à 0, 24, 48 et 72 H sur l'ensemble des modalités.

Figure 2: Schéma résumant les voies de biosynthèse étudiées et les gènes dont l'expression a été suivi (en rouge).

(Figure 2 : Scheme summarize the major biosynthesis pathways studied by gene expression. In red: studied gene)



Différentes modalités ont été analysées: les pathogènes (mildiou vs oïdium), les produits (PK2, FOS, BTH), les produits en présence du pathogène en tant que variables indépendantes. L'analyse globale des gènes surexprimés pour les différentes modalités, issue de 4 répétitions dupliquées donnent les résultats consignés dans le tableau III.

Nous ne détectons pas de différence significative entre le contrôle et les modalités traitées avec les différents produits en absence de pathogène. Une répression significative de l'expression de la majorité des gènes est observée après inoculation avec les différents pathogènes seuls ($P < 0.05$). Des différences également significatives ont été trouvées en présence de feuilles pré-traitées avec les différents éliciteurs, en présence des agents pathogènes (Tableau III).

Tableau III : Bilan des gènes significativement surexprimés en fonction des différents traitements et des pathogènes présents

(Table III: Balance of significant over-expressed genes depending on different treatments and different pathogens)

| Pathogènes | Phosphonates | BTH |
|----------------------------------|---|---|
| Mildiou sensible aux fongicides | - CHI- CHS - PR protéines (PR10, CHIT4, PGIP, PIN) - Hormones (ACC) | -PR protéines (PR1, CHIT3, GLU) |
| Mildiou résistant aux fongicides | - CHI-CHS - PR protéines (PR1, PR10, CHIT4, GLU, PIN) - GST | - PR protéines (PR1, CHIT3, GLU) - GST |
| Groupe A d'oïdium | - STS, CHI, LDOX, BAN - PR protéines (PR10, PGIP, PIN) - Hormones (LOX) | -STS |
| Groupe B d'oïdium | - LDOX, BAN - PR Protéines (PR10, PGIP) | - BAN - PR protéines (CHIT4) - GST |

Des différences existent selon le produit utilisé et le pathogène présent. En effet en présence de BTH, les voies de biosynthèses des stilbènes et anthocyanes (STS, BAN) sont privilégiées en présence d'oïdium, alors qu'en présence de mildiou ce sont surtout les PR protéines qui sont sur exprimés (PR1, GLU, CHIT3). À noter également que les gènes surexprimés varient également selon l'appartenance de l'oïdium au groupe génétique A ou B. Pour ce dernier on note une sur expression significative d'une PR protéine (CHIT4) et de la glutathione S- transférase (GST) impliqués dans les mécanismes d'oxydo-réduction.

Concernant les phosphonates, ils induisent essentiellement l'expression de gènes codant pour la biosynthèse des anthocyanes (CHI, CHS, BAN, LDOX) et pour des PR protéines (PR10, PGIP) quel que soit le pathogène, et de chitinase et de glucanase en présence de mildiou. A noter la surexpression de la stilbène synthase (STS) qui est exclusivement retrouvée en présence du groupe A d'oïdium.

Efficacité comparée du BTH, fosétyl et du mancozèbe sur le mildiou de la vigne *in natura*

Les plots témoins révèlent que l'épidémie prend son essor dès le 18 juin et une phase particulièrement explosive se déroule à partir du 9 juillet qui conduit à la date du 20 août à plus de 90% de sévérité sur feuilles. Sur grappes, plus de 90% de sévérité sont atteints en juillet. Aucune grappe ne subsiste à la date du 1^{er} septembre (figure 3).

Effet du mancozèbe

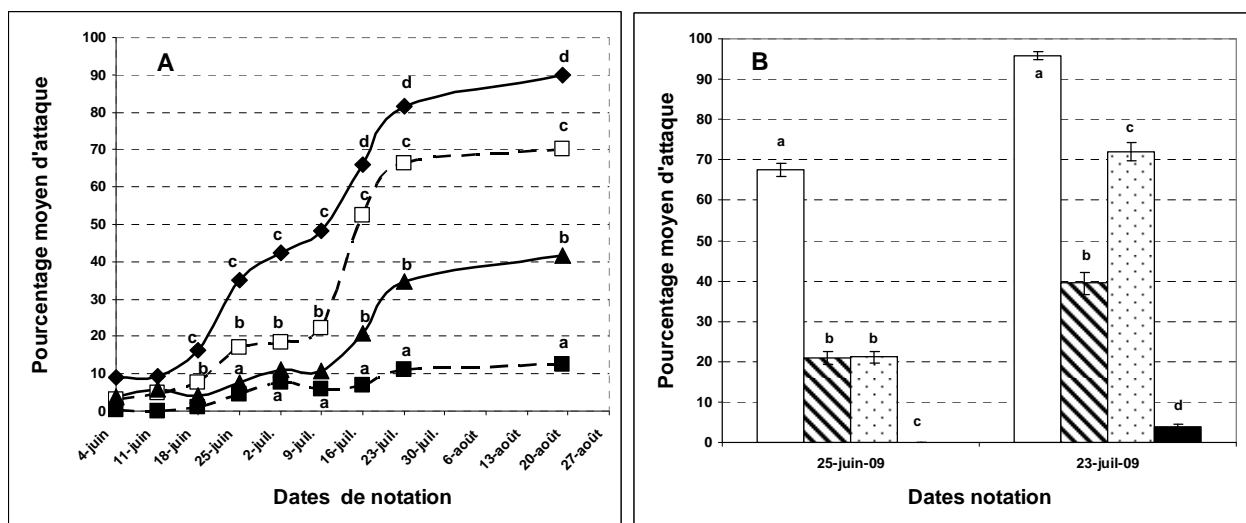
Ce fongicide appliqué en tant que référence fongicide, dans les conditions d'expérimentations (inoculation artificielle de mildiou, traitement hebdomadaire) montre une bonne efficacité tout au long de l'expérience, tant sur feuilles que sur grappes (figure 3A, B).

Effet du fosétyl d'aluminium

Le fosétyl d'aluminium présente également une bonne efficacité jusqu'au 16 juillet et permet de n'obtenir que 40% d'attaque sur feuilles à la date du 20 août, par rapport au témoin atteint plus de 90%. Sur grappes, au mois de juin 20% des grappes sont attaquées et en juillet, le pourcentage moyen d'attaque atteint 70%. Au 1^{er} septembre quelques grappes subsistent mais très attaquées.

Figure 3 : Evolution de la sévérité d'attaque (%) sur feuilles (A) [(♦) Témoin, (□) BTH ; (■) Dithane; (▲) FOS] et du pourcentage moyen d'attaque sur grappes (B) [(□) control ; (≡) BTH, (▨) FOS ; (■) mancozèbe] de *P. viticola* après inoculation artificielle le 27 mai . (♦) Témoin, (□) BTH ; (■) Dithane; (▲) FOS.

(Figure 3: Severity evolution on leaves [(♦) control, (□) BTH ; (■) mancozeb; (▲) FOS] and on grape berries after an artificial inoculation with *P. viticola*)



Effet du BTH

Concernant le BTH, il procure également une bonne protection jusqu'au 9 juillet, mais rapidement les feuilles sont très attaquées et la sévérité atteint 70%. Sur grappe, au mois de juin la sévérité sur grappe atteint seulement 20% comme pour le fosétyl, par contre en juillet, une meilleure protection est conférée par le BTH que par le fosétyl puisqu'on atteint 40% de sévérité sur grappe contre 70% avec le fosétyl. À noter toutefois que les grappes traitées avec le BTH possèdent encore de belles grappes intactes à la date du 1^{er} septembre, mais non vérées.

DISCUSSION

Pour la première fois nous comparons directement l'efficacité de molécules « élicitrices » sur les deux parasites obligatoires, principaux agents pathogènes de la vigne. Les produits testés présentent généralement une meilleure efficacité anti-mildiou qu'anti-oidium. Au cours de tests *in vitro* avec le BTH, une efficacité similaire est cependant obtenue vis-à-vis du mildiou et de l'oidium. Si l'efficacité du BTH est bien connue vis-à-vis de l'oidium de la vigne (Campbell et Latorre, 2004), celle observée envers un oomycète est rarement décrite. En terme d'efficacité, il semble que les souches d'oidium de groupe A soient moins sensibles aux phosphonates que les souches de groupe B. Une telle différence d'efficacité au sein d'une même espèce n'avait jamais été décrite à ce jour. Ce fait est peut être à relier aux exigences écologiques des souches de groupe A qui hiverneraient en France exclusivement sous forme de mycelium dormant, dans la plante.

La vigne est capable de moduler les niveaux d'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de défenses, en réponse à l'application des stimulateurs, mais leurs expressions varient selon la molécule. Ainsi, le BTH stimule essentiellement l'expression de gènes PR tels que PR1, des chitinases (CHIT3, CHIT4) et de glucanase (GLU), pour les mildious, et des gènes de la biosynthèse des stilbènes et des anthocyanes pour les groupes d'oidiums. Ceci est en accord avec les gènes surexprimés chez *Arabidopsis Thaliana*. et la biosynthèse de stilbènes et anthocyanes chez la vigne (Dao *et al.*, 2009, Iriti *et al.*, 2004). Les phosphonates, quant à eux, semblent stimuler la vigne différemment du BTH avec cependant une stimulation générale de PR protéines (PR10, PGIP et parfois CHIT4) et de nombreux gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes (CHI, CHS, LDOX, BAN). A noter que lors de l'élicitation de la plante, inoculée avec l'oidium de groupe A, par les phosphonates, on retrouve une stimulation spécifique de la stilbène synthase comme avec le BTH.

CONCLUSION

Cette étude montre que les réponses de la plante après différents traitements « éliciteur » conduisent à une efficacité et à une modulation de l'expression des gènes de la vigne dépendante de la molécule utilisée mais également du pathogène présent. Ainsi, existe-t-il une spécificité de réponses liées à la variabilité inter-espèce mais également intra-espèce. Le mildiou de la vigne et les souches d'oidium du groupe B favorisent la surexpression de gènes impliqués dans les voies de biosynthèses des anthocyanes et des PR protéines. Il est intéressant de noter que l'oidium du groupe A favorise plutôt l'expression des gènes de la synthèse de stilbènes. Nous analysons actuellement les polyphénols produits dans les feuilles issues des différentes modalités afin de corréliser ou non l'expression de gènes à une sur production de molécules de défenses.

L'expérimentation terrain réalisée nous a permis de comparer réellement l'efficacité des produits sur le mildiou de la vigne et les analyses biochimiques et moléculaires des feuilles prélevées à différents temps nous renseigneront sur l'état de défense réelle de la plante avant la présence du pathogène.

Les approches déployées complémentaires permettent de mieux comprendre comment agissent ces stimulateurs et quelle efficacité potentielle l'on peut en attendre dans des conditions difficiles (inoculation artificielle). Les données obtenues doivent également permettre de positionner au mieux ces produits dans le cadre de programme de traitement et la mise en place de méthodes alternatives de lutte contre ces agents pathogènes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient S. Gambier pour la production de plants de vigne et les sociétés Syngenta, Proval et Bayer pour les dons de produits. Un grand merci au CIVB pour son soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

- Bompeix G., Fettouche F., Saindrenan P., 1981 - Mode of action of phosethyl Al. *Phytopathologie-Phytopharmacie* 30, 257-272.
- Cambell P.A., Latorre B.A., 2004 – Suppression of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) by acibenzolar-S-methyl. *Vitis* 43, 209-210.
- Chen WJ., Delmotte F., Richard-Cervera S., Douence L., Greif C., Corio-Costet MF., 2007 - At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied Environ. Microbiol.* 73: 5162-6172.
- Dao TTH., Puig R.C., Kim HK., Erkelens C., Lefeber AWM., Linthorst HJM., Choi YH., Verpoorte R., 2009 – Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 146-152.
- Delye C., Laigret F., Corio-Costet M-F, 1997 - New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. *Pesticide Science* 51(3): 309-314.
- Dufour M.-C., Corio-Costet M.-F., 2009 - Impact of grapevine downy and powdery mildew diversity on efficacy of phosphonate derivatives (fosetyl-AL and fertilizer PK2) and salicylic acid (BTH) described as stimulators of plant defences. IOBC working group, “Induced resistance in plants against insects and diseases”, in press.
- Durrant, W. E., Dong X., 2004 - Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.
- Germer S., Holland M.J., Higuchi R., 2000 - High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Research* 10 (2), 258-266.
- Iriti M., Rossoni M., Borgo M., Faoro F., 2004 – Benzothiadiazole enhances Resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4406-4413.
- Raynal G., Ravise A., Bompeix G. 1980 - Action of aluminium tris-O-ethylphosphonate on pathogenicity of *Plasmopara viticola* and on stimulation of defence reactions of grapevine. *Annales de Phytopathologie* 12, 163-175.
- Reid K. E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T., 2006 - An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development - art. no. 27. *BMC Plant Biology* 6, 27-27.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D., 1996 - Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Sombardier A., Dufour M.-C., Blancard D., Corio-Costet M.-F., 2009b - Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides : distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag. Sci.* 65, sous presse.
- Soyez J.L., 2001 - New phosphonates and potassium polyvalents for use in viticulture (1993-2001). *Progres Agricole et Viticole* 118, 487-490.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J.P., 1997 - Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35, 325-370.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J, 2006 - Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135-162.

LUTTE CONTRE LA ROUILLE BLANCHE DU CHRYSANTHEME

J. GUERRAND¹, M. ALJABAL¹, A. LEBIHAN¹, O. STAPEL², S. HALLIER¹

¹Bretagne Biotechnologie Végétale (BBV), Penn-ar-prat, F-29250 Saint-Pol de Léon

² STEPP Bretagne, 52 Rue de St Ilan, 22360 Langueux, France.

Correspondance : guerrand@bbv.fr

RÉSUMÉ

La rouille blanche du chrysanthème, causée par *Puccinia horiana*, est un parasite fongique obligatoire.

Depuis 2006, sur une dérogation du SRPV-Bretagne, BBV mène en partenariat avec Astredhor un programme de recherche appliquée dans le but d'identifier des produits phytosanitaires alternatifs contre ce pathogène. Les expérimentations réalisées en milieu confiné et en conditions contrôlées ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de différents produits alternatifs aux produits phytosanitaires conventionnels et notamment des stimulateurs de défenses naturelles des plantes (SDN ou éliciteurs) ainsi que des produits issus de préparations naturelles, pour prévenir l'infestation du chrysanthème par la rouille blanche.

Depuis fin 2008, les expérimentations sont réalisées au sein du nouveau laboratoire NS3 de BBV.

Mots-clés : Chrysanthème, rouille blanche, culture ornementale, test de pathogénie, éliciteur.

SUMMARY

The chrysanthemum white rust, caused by *Puccinia horiana*, is an obligate fungus parasite.

Since 2006, thanks to dispensation let to the SRPV-Bretagne, BBV leads an applied research programme in partnership with Astredhor, that aims at identifying alternative phytosanitary products to prevent the disease. Experiments performed in confined space and in controlled conditions helped to rise the interest of using different alternative products such as natural plant defence elicitors and natural concoction-based products, in order to prevent from the infestation of chrysanthemum by the white rust.

Since the end of 2008, experiments are performed in the new 3rd level of quarantine security laboratory of BBV.

Key-words: Chrysanthemum, white rust, ornamental crop, pathogeny test, elicitor.

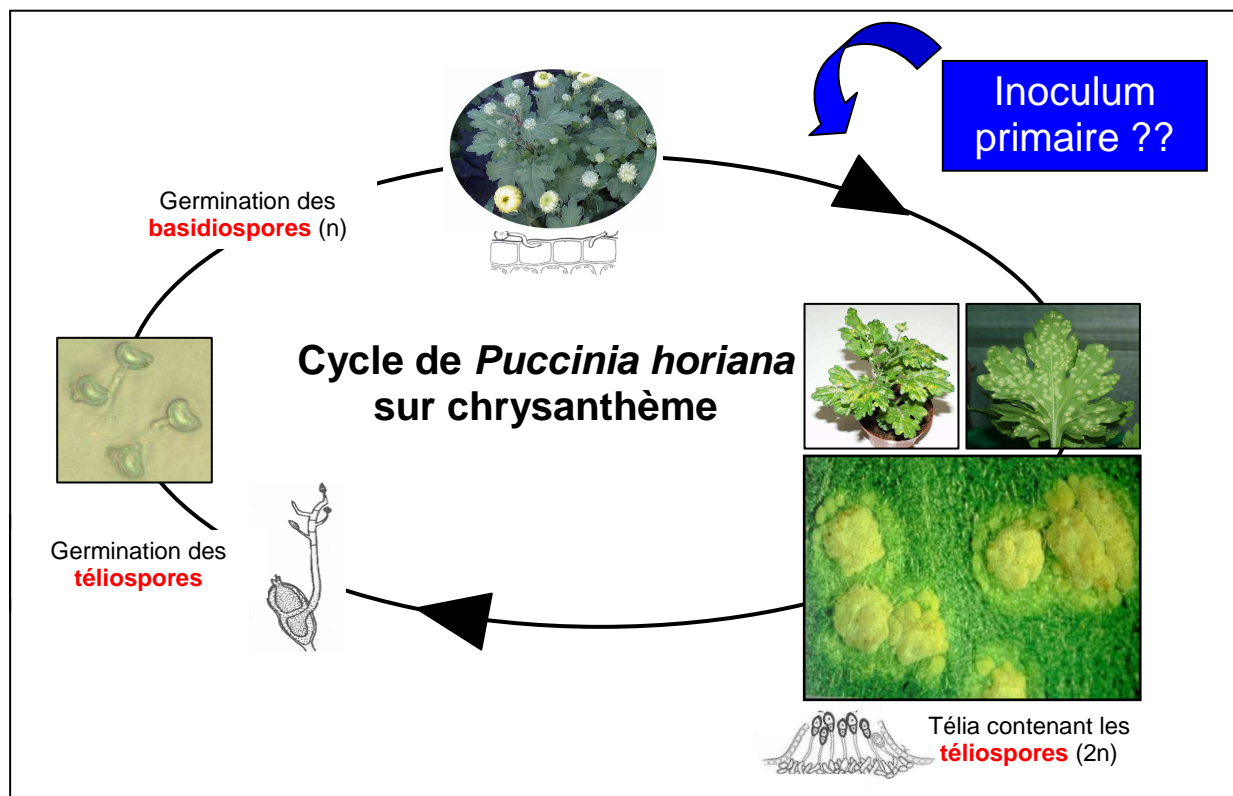
INTRODUCTION

La rouille blanche du chrysanthème est un organisme de quarantaine inscrit sur la liste A2 de l'OEPP (Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes). C'est un champignon filamenteux microcyclique de l'embranchement des Basidiomycètes, *Puccinia horiana*. Cette rouille est dite autoïque, c'est-à-dire qu'elle réalise tout son cycle sur un seul hôte (cf. figure 1). *P. horiana* produit des téliospores bicellulaires et des basidiospores unicellulaires. Les basidiospores, émises en conditions thermo-hygrométriques favorables, propagent la maladie de proche en proche mais également sur de longues distances (Wojdyla, 2004). La période d'incubation est généralement de 7 à 10 jours. Une fois établie, il est très difficile d'éradiquer cette maladie. Par ailleurs, l'intensification de la production de chrysanthèmes, avec de fortes densités de plantes dans des serres humides, offre un environnement idéal pour ce pathogène.

L'application de fongicides est un moyen relativement efficace mais coûteux (Water, 1981). Malgré cela, les plantes ornementales n'étant pas consommées comme le sont les légumes, ces cultures reçoivent potentiellement une grande quantité de produits phytosanitaires. Aujourd'hui, la stratégie d'utilisation des produits « alternatifs » de protection des plantes sur les cultures d'ornement peut répondre à la fois au risque de contournement de résistance et à la volonté de réduction des produits phytosanitaires conventionnels.

Figure 1 : Cycle biologique de *Puccinia horiana*.

Biological cycle of *Puccinia horiana*.



MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

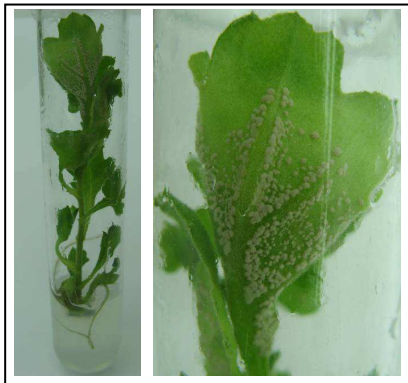
Les plants de chrysanthèmes, variété Mélodie (sensible à la rouille blanche), sont multipliés *in vitro* sur milieu spécifique, puis sont acclimatés en serre.

Multipliation et conservation de la rouille blanche

La rouille blanche est multipliée sur plante toutes les trois semaines, en conditions contrôlées. Les différentes souches cultivées à BBV sont issues de symptômes prélevés localement (Bretagne) en serre de production de chrysanthème. Depuis l'initiation du travail en 2006, quatre isolats, en cours d'identification moléculaires par l'ILVO (*Institute for Agricultural and Fisheries Research*), ont été collectés ; ceux-ci sont désormais maintenus en soucier *sur vitroplants* en se basant sur les techniques décrites par Ohishi *et al.* (2000), Takatsu *et al.* (2000) et de Vences-Contreras *et al.* (2008) qui ont ensuite été adaptées à notre environnement expérimental (cf. figure 2). Les isolats sont également conservés à long terme dans l'azote liquide comme décrit par Dahmen *et al.* (1983).

Figure 2 : Plantules *in vitro* de chrysanthème, portant des fructifications de rouille blanche.

In vitro plantlets of chrysanthemum, carrying fructifications of white rust.



Méthode d'inoculation de la rouille blanche

Les basidiospores du *Puccinia horiana* ne peuvent pas être mises en suspension, celles-ci étant produites au fur et à mesure par germination à partir des fructifications blanches ; il n'est donc pas possible de fabriquer un stock. La méthodologie retenue consiste donc à fixer une feuille sporulante au-dessus de 4 plants disposés auparavant dans des mini-serres fermées. Cette technique permet une contamination relativement homogène. Le dispositif est maintenu pendant 24 heures pour permettre aux basidiospores, émises dans l'air, de se disperser lentement sur le feuillage. Puis les feuilles portant l'inoculum sont éliminées et les plantes incubent pendant encore 15 jours jusqu'à la sporulation de la nouvelle génération du pathogène.

Méthode de notation de l'infection par la rouille blanche

Les symptômes causés par la rouille blanche sont évalués quantitativement en dénombrant les taches sporulantes sur le feuillage, 15 à 20 jours après l'inoculation. Pour cela 3 feuilles suffisamment développées au moment de l'inoculation servent d'unité statistique pour chaque plante le jour de la notation.

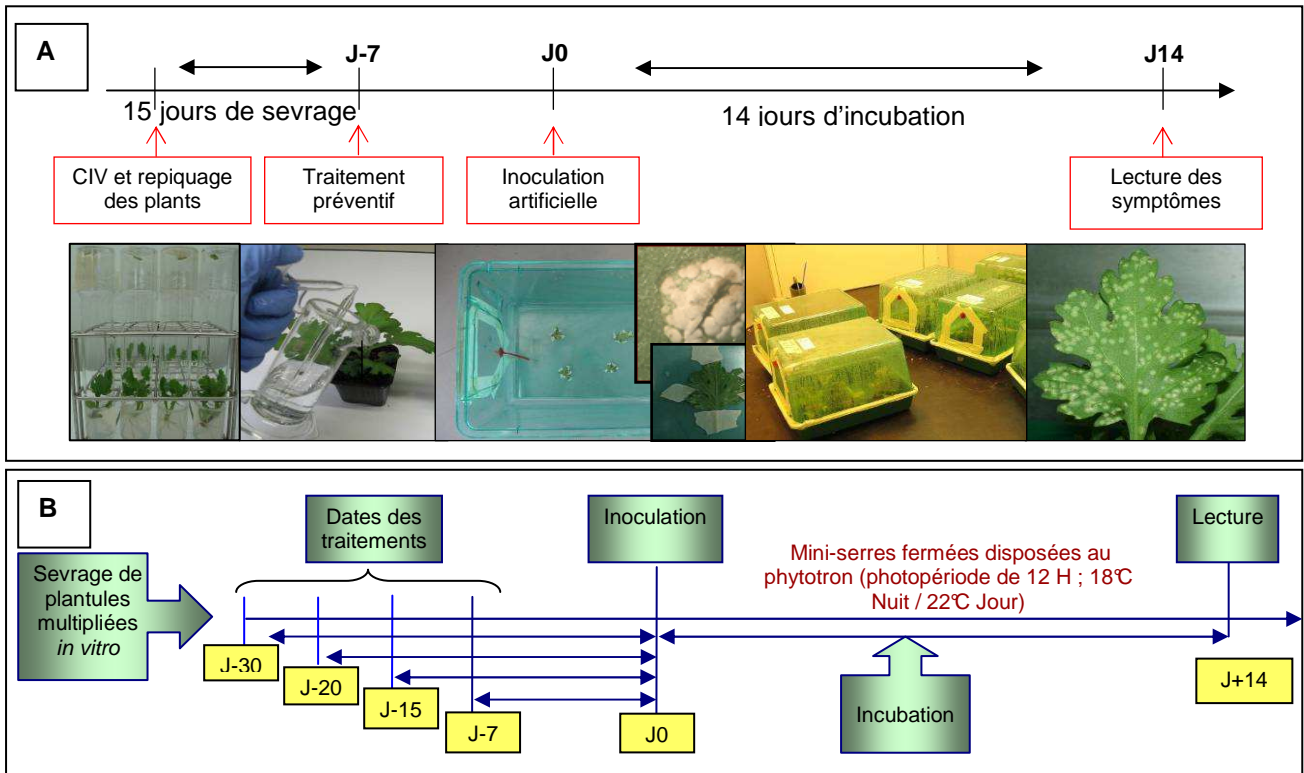
Méthode d'évaluation des produits testés

Les évaluations ont été réalisées pour deux types d'itinéraires expérimentaux (Cf. figure 3) :

Programme A : traitement préventif 7 jours avant inoculation

Programme B : traitements décalés dans le temps par rapport à la date d'inoculation

Figure 3 : Illustration des calendriers expérimentaux utilisés ; A : programme à un traitement préventif. B : programme à traitements préventifs décalés.
 Illustration of the experimental calendar used; A: protocol with one unique preventative treatment. B : protocol with 4 preventative treatments.



Dispositif expérimental

Les expérimentations consistent en 8 répétitions de 1 plante par modalité, organisées en 8 blocs randomisés.

Caractéristiques des produits utilisés lors des évaluations

Le tableau I ci-dessous résume l'ensemble des produits testés sur le couple rouille blanche/chrysanthème, dans nos conditions d'expérimentation.

Tableau I : Caractéristiques des différents produits utilisés dans les essais.
Specifications of the product used in the trials

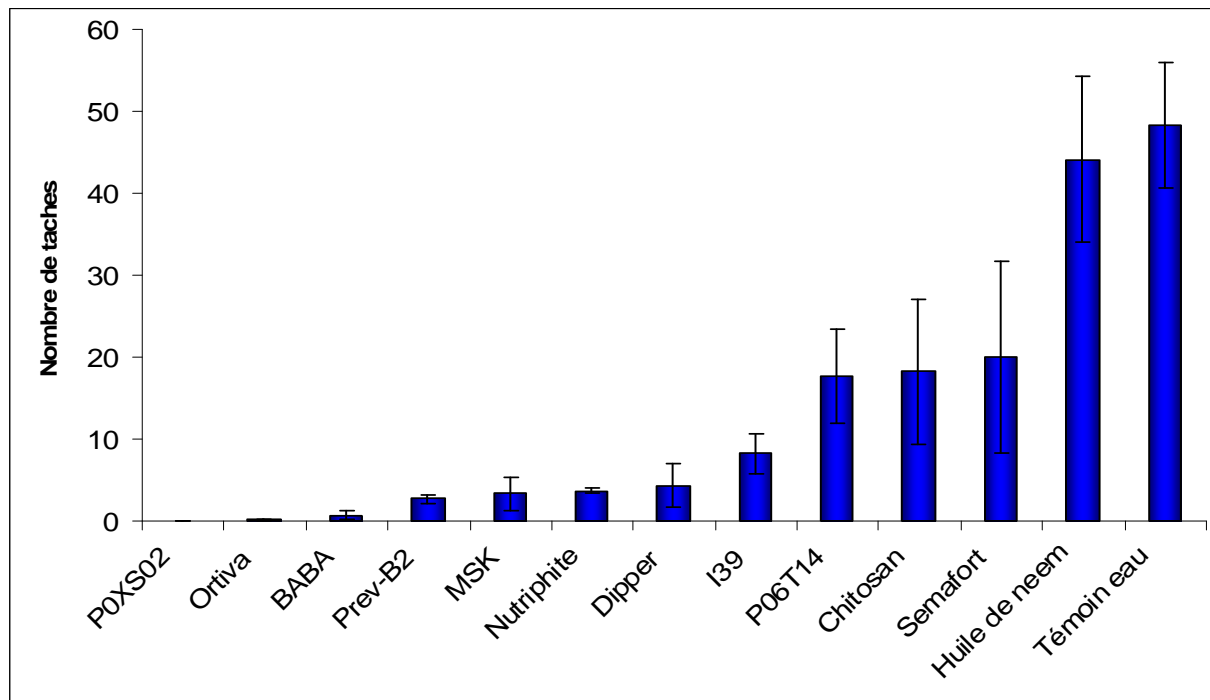
| PRODUITS / CODES | MATIERES ACTIVES | PRINCIPES D'ACTION CONNUS OU SUPPOSES | TYPE D'HOMOLOGATION | CONCENTRATION D'UTILISATION |
|------------------|---|--|--------------------------------|-----------------------------|
| Ortiva® | Azoxystrobine | Anti-fongique | 91-414-CE | 0.33% |
| BABA | Acide β -aminobutyrique | Activation des gènes de défense | Non homologué en France | 0.41% |
| P0XS02 | Acibenzolar-S-methyl | Activation des gènes de défense | 91-414-CE Sur autres usages | 0.01% |
| Dipper® | NPK + Extrait de citrus | Desséchant + ? | Engrais CE | 0.3% |
| I39 | Extrait d'arbre | Stimulation de la croissance + antifongique | Stade R&D | 3% |
| MSK | Mono-silicate de potassium (20% SiO ₂) | Epaississement de la paroi cellulaire + ? | Engrais CE | 2.5% |
| Prev-B2® | NPK + Extrait d'orange | Desséchant + ? | Engrais CE | 1% |
| Nutriphite® | NPK + phosphite | Stimulation de la croissance + ? | Engrais CE | 1% |
| T14 | NP (PO ₃ ³⁻) K | Stimulation de la croissance, activation des gènes de défense | Engrais CE | 0.6% |
| Chitosan | Extrait de carapace de crustacés | Activation des gènes de défense, antifongique, renforcement du système racinaire | Engrais CE | 2% |
| Sémafort® | Acides aminés + algues + NP (PO ₃ ³⁻) K + oligosaccharides | Induction de protéines PR | Engrais CE | 0.6% |
| Huile de neem | Azadirachtine | Régulateur de croissance des champignons | Non homologué en France | 0.5% |

Méthodologie du test fongicide

Ce test consiste à mettre en présence les spores fongiques pathogènes, responsables de la propagation de la maladie, avec le produit en test. Pour cela, le produit est déposé sur gélose, à la concentration « X » appliquée sur plante (1 ml de solution de produit à tester étalé sur la boîte de pétri) ; la concentration 10X de chaque produit est également testée pour écarter le diagnostic d'un effet direct potentiel. Les spores sont ensuite apportées par sédimentation en fixant une feuille contaminée au-dessus de la gélose imbibée du produit. Après 24h, les boîtes de pétri sont ouvertes et le pourcentage de basidiospores présentant un tube germinatif est dénombré au microscope. Ce dénombrement apporte des informations complémentaires sur le mode d'action du produit testé.

RESULTATS

Figure 3 : Criblage phytosanitaire de produits alternatifs de protection contre la rouille blanche du chrysanthème
Phytosanitary screening of alternative products to protect against the chrysanthemum white rust



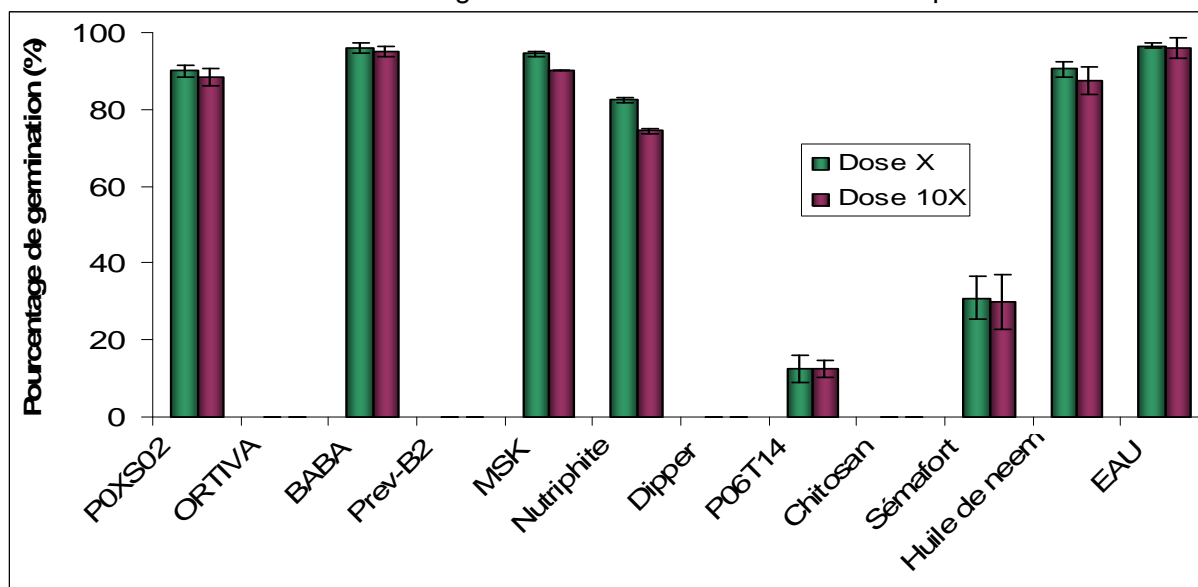
Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

La figure 3 présente les résultats obtenus, au cours des différents criblages, en utilisant le programme A (traitement préventif à J-7) Nos résultats, qui reflètent les niveaux de protection obtenus, montrent trois tranches de symptômes :

- 0 à 8 taches par feuille en moyenne : le POXS02, le Prev-B2[®], le MSK, le Nutriphite[®], le Dipper[®] et le I39, comparables aux références positives Ortiva[®] et BABA.
- 17 à 20 taches en moyenne : le P06T14, le Chitosan et le Sémafort[®].
- 45 taches et plus en moyenne : l'huile de neem, comparable au résultat obtenu pour le témoin négatif « eau ».

Afin de mieux comprendre le mode d'action des produits, un test d'effet direct a ensuite été réalisé (figure 4) :

Figure 4 : Evaluation de l'effet fongicide des différents produits criblés
 Evaluation of the fungicide effect of the various screened products



Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

Ce test d'effet direct a été mis en place pour nous aider à caractériser le mode d'action des différents produits testés. Nos résultats mettent en évidence trois types de produits :

- Ortiva®, Prev-B2®, Dipper®, Chitosan® : inhibition de la germination des basidiospores
- P06T14 et Sémafort® : inhibition partielle
- P0XS02, BABA, MSK, Nutriphite®, Huile de neem : peu ou pas de germination

Tableau II : Résumé des résultats expérimentaux.
 Summary of experimental scoring.

| Notations | Témoins | | | Produits testés | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------|------|-----|-----------------|----------|------|-------------|---------|------|--------|----------|-----------|---------------|
| | Ortiva® | BABA | Eau | P0XS02 | Prev-B2® | MSK | Nutriphite® | Dipper® | I39 | P06T14 | Chitosan | Sémafort® | Huile de neem |
| Efficacité de protection | ++++ | ++++ | - | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | +++ | + |
| Effet direct (fongicide) | ++++ | + | + | + | ++++ | + | + | ++++ | | ++++ | ++++ | +++ | + |
| Mode d'action supposé | F | SDN | | SDN | F | SDN | SDN | F | ? | F | F | F/? | |

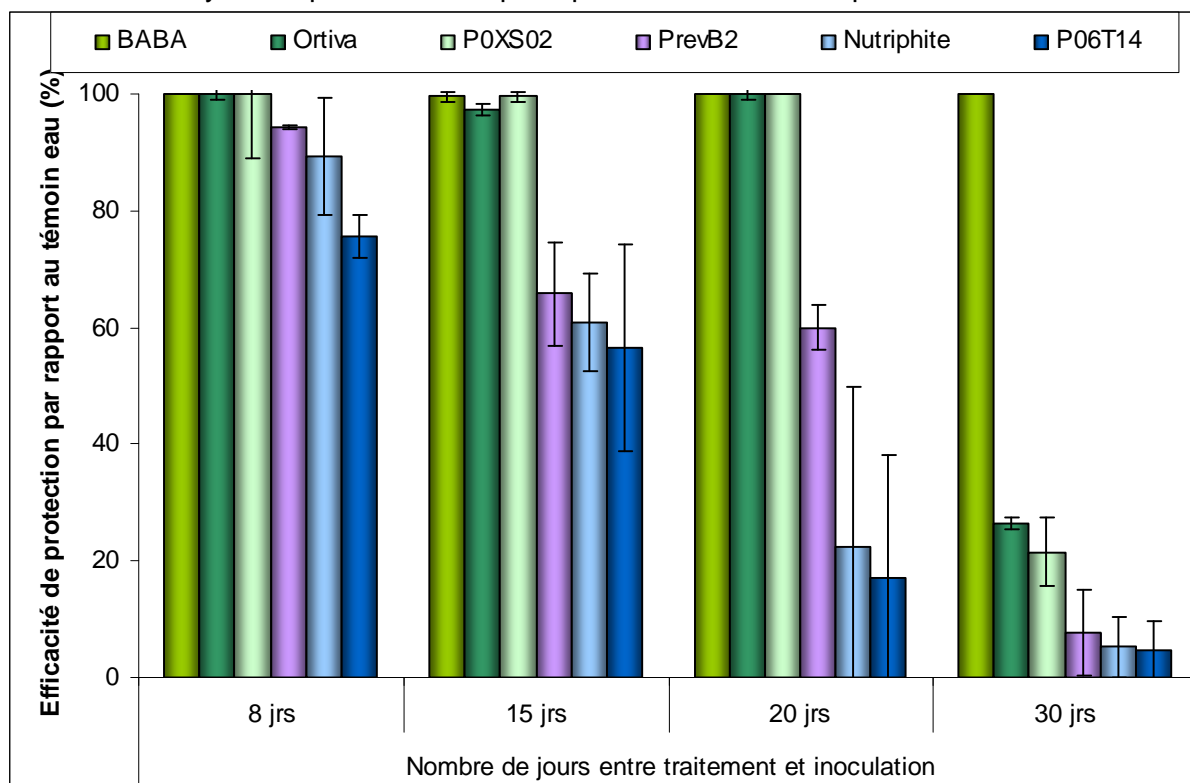
++++ : 81 à 100% / +++ : 51 à 80% / ++ : 21 à 50% / + : 1 à 20% / - : pas d'efficacité / F : Fongicide / SDN : Stimulateur des Défenses Naturelles

Le témoin positif Ortiva® montre une bonne efficacité de protection et un fort effet direct, correspondant bien à un mode d'action de type fongicide. le Prev-B2®, le Dipper®, le P06T14, le Chitosan et partiellement le sémafort présentent ce même mode d'action.

Le témoin positif BABA présente également une forte efficacité de protection mais un effet direct presque nul. Ce produit est notre témoin SDN de référence dont l'efficacité trouve son origine dans la stimulation des mécanismes de défense de la plante. Le POXS02, le MSK et le Nutriphite® semblent présenter ce même mode d'action dans nos conditions expérimentales.

Il était par ailleurs intéressant d'évaluer la persistance d'action de ces produits. Nous avons donc décidé d'évaluer ces efficacités au travers d'un test permettant de mettre en évidence leur persistance sur une période allant jusqu'à 30 jours avant l'infestation par la rouille blanche. La méthodologie est résumée dans la figure 3 (Programme B). L'évaluation a été réalisée pour 4 produits testés précédemment : le POXS02, le Prev-B2®, le Nutriphite® et le T14. Les résultats sont présentés dans la figure 5.

Figure 5 : Etude de la rémanence de produits alternatifs de protection des plantes.
Study of the persistence of plant protection alternative products.



Dans nos conditions expérimentales, les produits efficaces pour une application 7 jours avant infestation montrent une forte variabilité de persistance d'action dans le temps.

Ainsi, lorsque le témoin positif BABA conserve son efficacité jusqu'à 30 jours avant infestation, d'autres produits tel que le phosphite P06T14 perd plus rapidement sa capacité à protéger le chrysanthème contre la rouille blanche. Le produit Nutriphite® suit approximativement la même cinétique.

Le Prev-B2®, à action fongicide, maintient une efficacité significative jusqu'à 20 jours avant infestation.

Enfin le produit POXSO2 et le témoin positif Ortiva® montrent une efficacité équivalente tout au long de l'essai avec un effondrement de l'efficacité lorsque le traitement est réalisé 30 jours avant infestation.

CONCLUSION

Le criblage de produits alternatifs de protection des plantes montre l'intérêt de cette stratégie phytosanitaire : certains produits se comportent comme les fongicides classiques tandis que d'autres permettent, a priori, de stimuler les mécanismes de défense des plantes. Globalement, les produits évalués en conditions contrôlées permettent de retrouver des niveaux d'efficacité de protection équivalents aux références phytosanitaires. Le dernier test montre que l'étude de la persistance d'action des produits est une étape importante de l'évaluation pour permettre, *in fine*, de définir le meilleur positionnement de ces produits.

Depuis fin 2008, BBV possède un laboratoire NS3 pour prévenir tout risque de dissémination de la maladie. Cet outil de travail nous permet de conserver, de multiplier et de réaliser des criblages sur la rouille blanche afin de faire avancer les connaissances dans ce domaine.

Ces résultats doivent toutefois être validés sur le terrain en conditions de production.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le Cerafel (Morlaix), le Conseil régional de Bretagne, et l'Astredhor. Nous remercions tout particulièrement la Stepp-Bretagne pour sa grande mobilisation au cours de ce programme, en particulier pour nous permettre de valider sur le terrain les résultats obtenus en conditions contrôlées.

BIBLIOGRAPHIE

Alaei H., Baeyen S., Maes M., Höfte M., Heungens K., 2008, *in press* - Molecular detection of *Puccinia horiana* in Chrysanthemum X morifolium through conventional and real-time PCR. *Journal of Microbiology Methods* Doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.001.

Dahmen H., Staub Th., et Schwinn F., 1983 - Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology*, 73, 241-246.

OEPP/EPPO, 1982 - Data sheets on quarantine organisms No. 80, *Puccinia horiana*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 12, 1.

OEPP/EPPO, 1990 - Exigences spécifiques de quarantaine. *Document technique de l'OEPP* n° 1008.

Ohishi K., Okumura Y., Morioka K., 2000 - Incubation of *Puccinia horiana* P.H. using Chrysanthemum plants cultured *in vitro*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 69, 6, 767-769.

Takatsu Y., Ohishi K., Tomita. Y., 2000 - Use of chrysanthemum plantlets grown *in vitro* to test cultivar susceptibility to white rust, *Puccinia horiana* P. Hennings. *Plant breeding*, 119, 528-530.

Vences-Contreras C., Vázquez-García L.-M., 2008 - Inoculación *in vitro* de la roya blanca (*Puccinia horiana* Hennings) en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Agronomía mesoamericana*, 19, 1, 81-85.

Water J.-K., 1981 - Chrysanthemum white rust. *OEPP/EPPO Bulletin*, 11, 239-242.

Wojdyla A., 2004 - Development of *Puccinia horiana* on chrysanthemum leaves in relation to chemical compounds and time of their application. *Journal of Plant Protection Research*, 44, 91-102.

**AFPP-9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

INTERET DES PRODUITS ALTERNATIFS FACE AUX MALADIES DES PLANTES

S. HALLIER, C. MONOT, M-C. CARRARA, K. CRADDOCK ET J. GUERRAND ⁽¹⁾

(1) Bretagne Biotechnologie Végétale (BBV), Pen-ar-prat, F-29250 St-Pol-de-Léon, France

Contact : hallier@bbv.fr

RESUME

BBV travaille depuis plus de 10 ans à l'étude en conditions contrôlées de produits de protection des plantes susceptibles d'apporter une alternative intéressante aux produits phytosanitaires conventionnels. Nombre de ces produits, et en particulier certains stimulateurs de défense, ont été évalués sur plus d'une dizaine de couples plante/pathogène. Les études réalisées à BBV englobent également la compréhension du mode d'action du produit, et notamment sa capacité à induire des mécanismes de défense de la plante, son potentiel effet biocide, sa persistance d'action et sa possible systémie (ou systémie d'une résistance induite). Cette communication présente notre avis sur les limites et les avantages des produits alternatifs, et en particulier des stimulateurs de défense des plantes.

Mots-clés : maladies des plantes, tests en conditions contrôlées, produits alternatifs, éliciteurs, mode d'action.

SUMMARY

INTEREST OF ALTERNATIVE PHYTOSANITARY PRODUCTS TOWARDS PLANT DISEASES

BBV has been working for more than 10 years on studying under controlled conditions phytosanitary products potentially able to bring an interesting alternative to conventional plant protection. Those products, especially elicitors of plant defence, have been evaluated on more than 10 different plant diseases. Studies done at BBV include also the understanding of the action mode of the product, such as its ability to stimulate plant defence, its potential biocide effect, its persistence of action, and its possible systemic protection (or systemic induced resistance). This paper presents our point of view on the limits and advantages of the alternatives products, more specifically regarding elicitors of plant defence.

Key words: plant disease, tests under controlled conditions, alternative products, elicitors, action mode.

Introduction

Le respect de l'environnement et de la santé humaine est au cœur des préoccupations de notre société. Ce phénomène se concrétise par de nombreuses actions gouvernementales comme les décrets de 2006 sur les pesticides, la directive cadre européenne sur l'eau et le Grenelle de l'Environnement. Le monde des produits phytosanitaires fait ainsi face aujourd'hui à une réalité nouvelle dans laquelle seules les rares molécules actives à très faible toxicité seront autorisées, retirant ainsi du marché la plupart des produits phytosanitaires. Cette situation soulève le problème de la protection de nombreuses cultures pour lesquelles il n'existera quasiment plus de produits phytosanitaires efficaces, ce qui pourrait conduire à terme à la disparition de certaines cultures.

Dans ce contexte, de nombreux produits sont ainsi présentés aux producteurs en tant que « produits alternatifs » sans que des évaluations sérieuses n'aient été réalisées sur les maladies ou les ravageurs des cultures concernées.

Face à cette situation, BBV participe depuis de nombreuses années à l'étude de produits alternatifs, en évaluant notamment leur efficacité sur de nombreuses maladies des plantes et en aidant les firmes à mieux comprendre le mode d'action de leur produit pour en optimiser l'utilisation [Pajot et al, 2001 ; Ziadi et al, 2001 ; Silué et al, 2002 ; Pajot et al, 2005 ; Guerrand et al, 2007].

Matériel et méthode

Matériel végétal

Variétés

Les variétés choisies pour les essais d'évaluation de produits de protection sont des variétés couramment utilisées par les producteurs. Elles présentent une sensibilité à la maladie facilement observable.

Conditions de culture

Dans le cadre d'essais maladie réalisés en chambre de culture, les plantes sont semées et élevées en serre jusqu'au moment de l'inoculation. Dans le cas d'essais réalisés en serre, les plantes sont conservées en chambre de culture avant inoculation.

Inoculation

Il s'agit d'inoculations artificielles, généralement par pulvérisation d'une suspension de spores sur les feuilles de la plante. Elle est généralement réalisée sur de jeunes plantes, à l'exception de l'oïdium du fraisier qui est effectué sur plantes matures.

Traitement

Il s'agit généralement de traitements préventifs 5 à 7 jours avant inoculation. Le traitement est le plus souvent réalisé à la limite du ruissellement. Sur certains pathosystèmes comme l'oïdium du fraisier, il s'agit d'itinéraire de plusieurs traitements, suivant une cadence de traitement similaire à celle utilisée en production. Des pré-tests sont généralement réalisés pour ajuster les doses à tester selon l'espèce végétale et le stade de la plante choisie.

Tableau I : Caractéristiques des produits évalués

Table I : Features of evaluated products

| Produit | Matière active (ou extrait) | Dose d'utilisation | Homologation |
|------------------------------|--|--------------------|--------------|
| Rhodax [®] | Mancozèbe + Phoséthyl-aluminium | 6 mL/L | 91-414CE |
| Dithane M45 [®] | Mancozèbe | 2 g/L | 91-414CE |
| Rovral Aqua Flo [®] | Iprodione | 1.7 g/L | 91-414CE |
| Topaze [®] | Penconazole | 1.25 mL/L | 91-414CE |
| Stifénia [®] | Extrait de Fenugrec | 30 g/L | 91-414CE |
| Chitosan | Extrait de carapace de crustacé | 20 mL/L | |
| TTF5 | Extrait d'algue + acides aminés + phosphite | 7.5 mL/L | Engrais CE |
| ASM | Acibenzolar-S-methyl | 0.1 g/L | 91-414CE |
| BABA | Acide β -aminobutyrique | 1 g/L | |
| PK2 [®] | Phosphite | 0.3 mL/L | Engrais CE |
| Extrait 1 | Extrait d'algue | 12.5 mL/L | |
| Extrait 2 | Extrait d'algue | 1 g/L | |
| Extrait 3 | Extrait d'algue | 1 g/L | Engrais CE |
| Optiplant [®] | Isothérapie (extrait alcoolique du pathogène concerné) | 7.5 mL/L | Engrais CE |
| Huile de neem | Azadirachtine | 20 mL/L | |

Tableau II : Résumé des paramètres expérimentaux

Table II : Summary of experimental features

| Couple hôte-pathogène | Variété hôte | Stade de traitement(T) | Stade d'inoculation | Date d'inoculation (en jours après traitement) | Date de notation(s) (en jours après inoculation) | Conditions de culture | |
|--|---------------------|--|---------------------|--|--|----------------------------------|---|
| | | | | | | Elevage | Essai |
| Chou-fleur / mildiou (<i>Peronospora parasitica</i>) | <i>Billabong</i> | cotylédon | | 7 | 7 | Serre 20°C minimum | Phytotron 16°C nuit, 18°C jour Hygrométrie : 80 à 100% |
| Artichaut / mildiou (<i>Bremia lactucae</i>) | <i>Vert du Laon</i> | cotylédon | | 7 | 10 | Serre 20°C minimum | |
| Laitue / mildiou (<i>Bremia lactucae</i>) | <i>Campion as</i> | cotylédon | | 7 | 7 | Serre 20°C minimum | |
| Tomate / mildiou (<i>Phytophthora infestans</i>) | <i>Durinta</i> | 2 feuilles | | 7 | 7 | Serre 20°C minimum | |
| Fraisier / oïdium (<i>Podosphaera aphanis</i>) | <i>Elsanta</i> | Programme à 4 traitements : Stade 4 à 6 feuilles pour le T1 jusqu'au stade fraisier mature pour le dernier T | 6 à 8 feuilles | 5 | 7, puis 3 autres notations tous les 10 jours | Phytotron (18°C nuit, 22°C jour) | Serre 20°C minimum Hygrométrie : 50 à 80% |

Notation

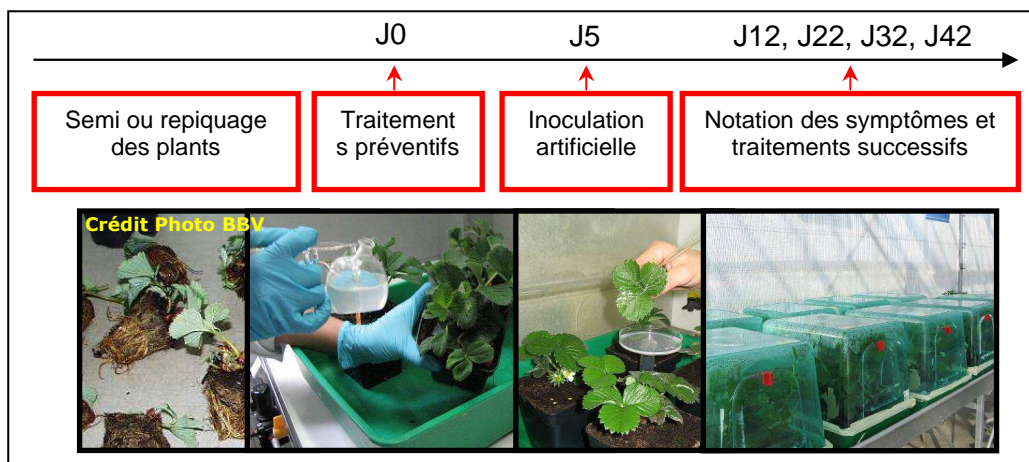
A chaque couples hôte-pathogène travaillés correspond une échelle de notation semi quantitative exprimée en indice de maladie. Ces indices de maladie sont proportionnels à la surface foliaire infectée. L'indice de maladie obtenu pour le témoin traité à l'eau permet de calculer « l'efficacité de protection » des produits à évaluer.

En règle générale, dans chaque essai, l'indice de maladie relevé pour le témoin traité à l'eau se situe toujours dans le haut de l'échelle de notation. Néanmoins il peut arriver qu'un produit évalué favorise l'installation de la maladie et présente un indice de maladie supérieur au témoin traité à l'eau d'où une efficacité de protection négative.

Dispositif expérimental

Les essais sont organisés en 4 blocs randomisés. Le nombre de plantes par répétition dépend du pathosystème choisi. Il peut aller de 2 à 4 plantes par répétition. Plusieurs témoins sont intégrés à l'essai : témoin traité à l'eau, témoin fongicide conventionnel et témoin produit alternatif. Ces deux derniers sont différents selon le pathosystème choisi.

Figure 1 : Exemple de processus d'évaluation de produits de protection sur oïdium du fraisier.
Example of the process used at BBV for the evaluation of phytosanitary product on powdery mildew of strawberry plants.



Test d'effet direct

Les tests d'effet direct (ou test biocide) sont réalisés selon 3 méthodes différentes. La méthode la plus classique consiste à déposer sur boîtes de Pétri des pastilles imbibées de produit en bordure de boîte. Le pathogène est ensuite placé au centre de la boîte. Il est également possible, en cas de problème de diffusion du produit, de faire pousser le champignon ou la bactérie en boîte de Pétri après étalement du produit sur toute la surface de la boîte. Une autre méthode consiste à mettre en contact le produit avec le pathogène en milieu liquide, dans un Erlen. Un échantillon du mélange, après un temps de contact de quelques heures, est ensuite étalé en boîte de Pétri sur milieu de culture. Ces procédures n'ont cependant pas pu être appliquées à certains pathogènes obligatoires du type oïdium.

Analyses biochimiques de la stimulation des défenses de la plante

Trois marqueurs biochimiques sont actuellement utilisés à BBV pour mettre en évidence une stimulation des défenses de la plante : l'activité glucanase, l'activité peroxydase et la quantité de polyphénols.

Résultats

Efficacité face à différentes maladies des plantes

Ci-dessous quelques exemples d'efficacité observée pour différents stimulateurs de défense sur différentes maladies des plantes maraîchères :

Figure 2 : Efficacité en conditions contrôlées de différents produits de protection sur mildiou du chou-fleur.
Efficiency under controlled conditions of different products on downy mildew of cauliflower.

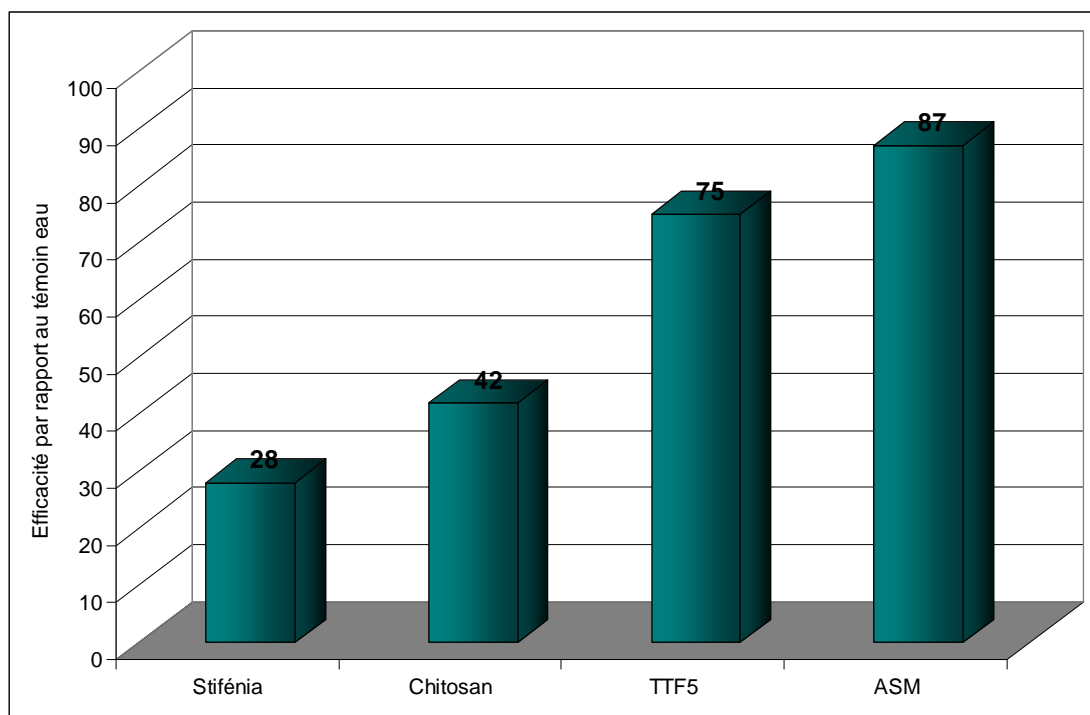


Figure 3 : Efficacité en conditions contrôlées de différents produits de protection sur mildiou de l'artichaut.
Efficiency under controlled conditions of different products on downy mildew of artichoke.

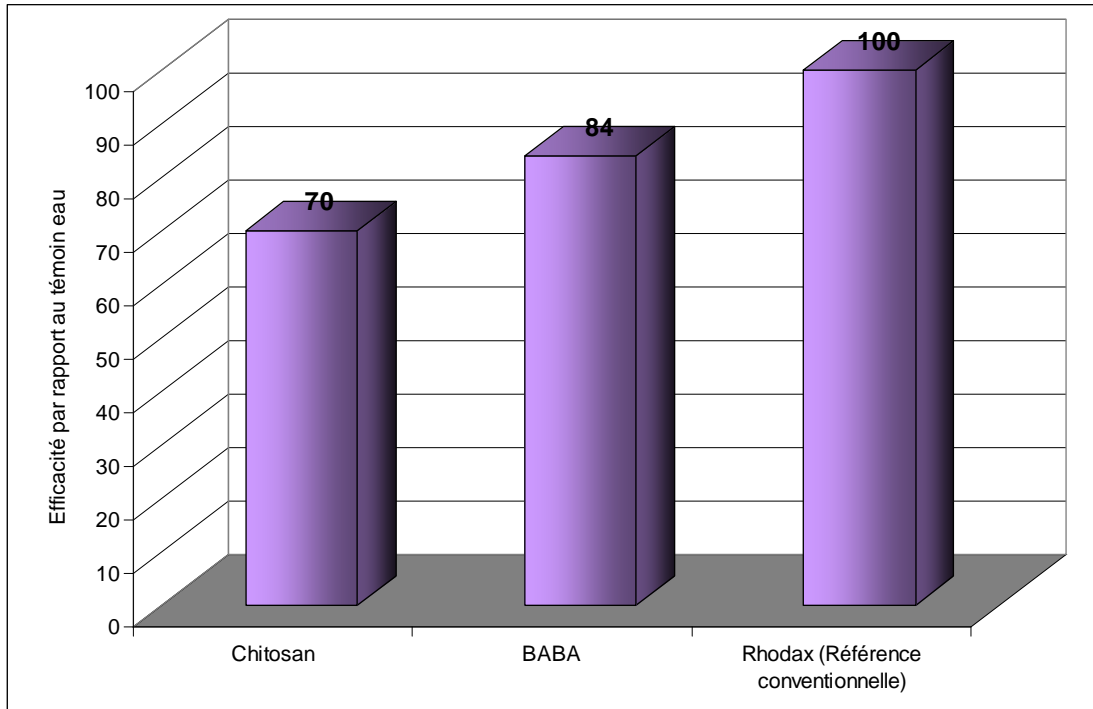


Figure 4 Efficacité en conditions contrôlées de différents produits de protection sur mildiou de la laitue.
Efficiency under controlled conditions of different products on downy mildew of lettuce.

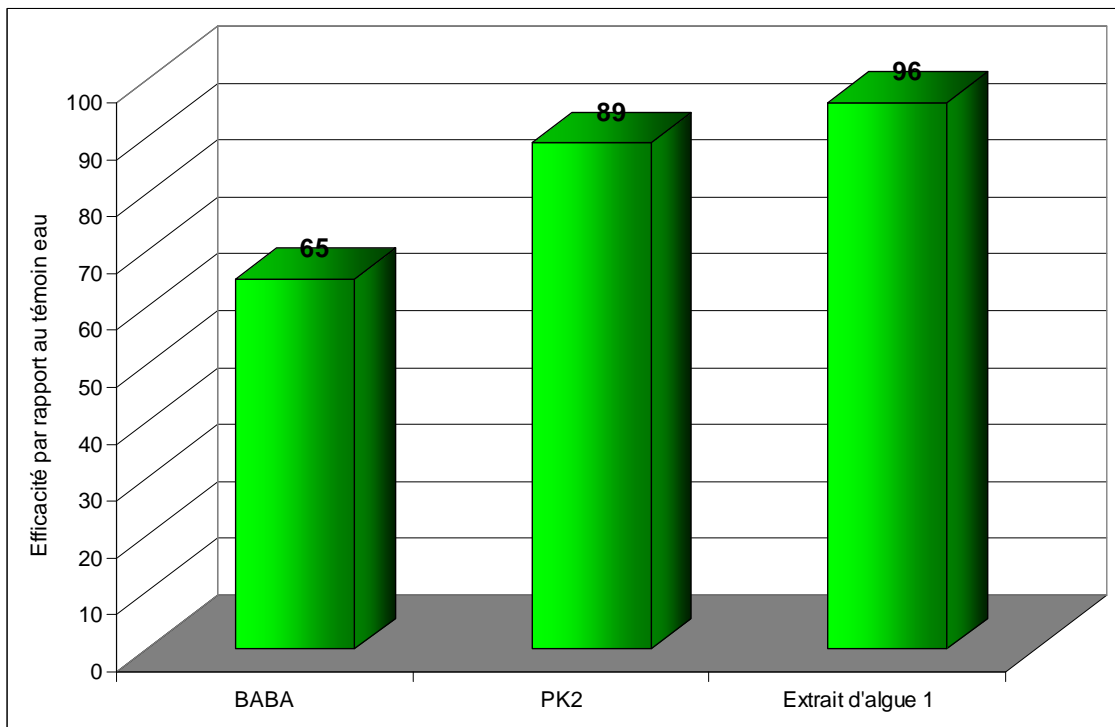


Figure 5 : Efficacité en conditions contrôlées de différents produits de protection sur mildiou de la tomate.
Efficiency under controlled conditions of different products on downy mildew of tomato.

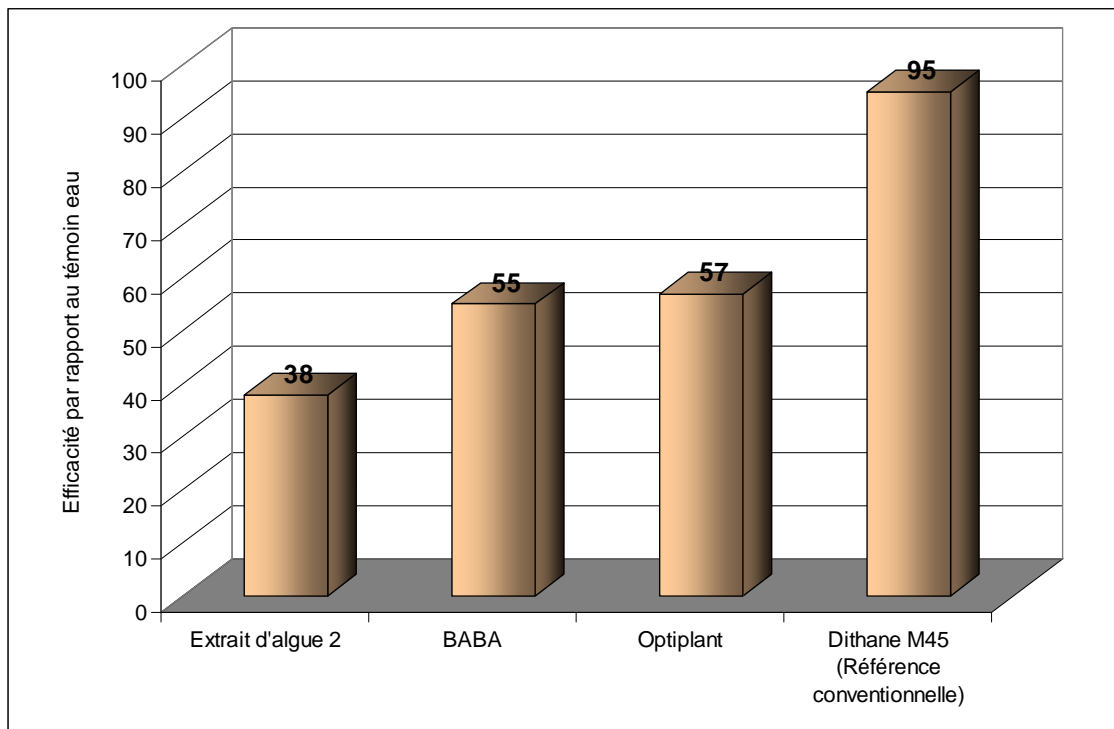


Figure 6 : Efficacité en conditions contrôlées de différents produits de protection sur botrytis de la tomate.
Efficiency under controlled conditions of different products on botrytis of tomato.

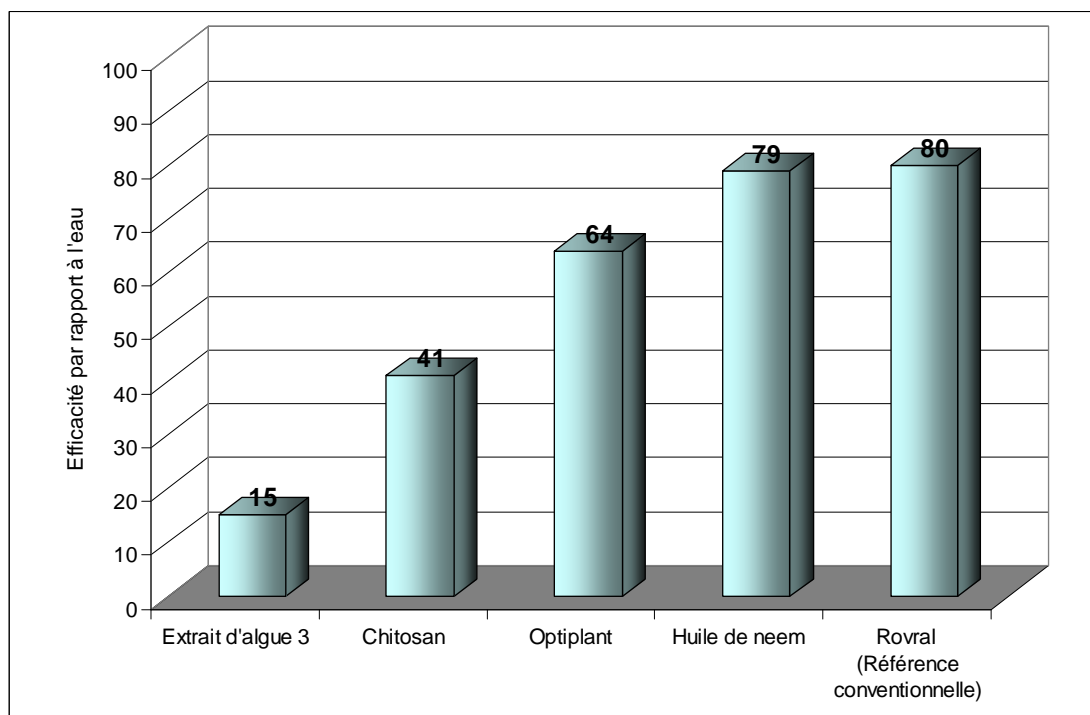
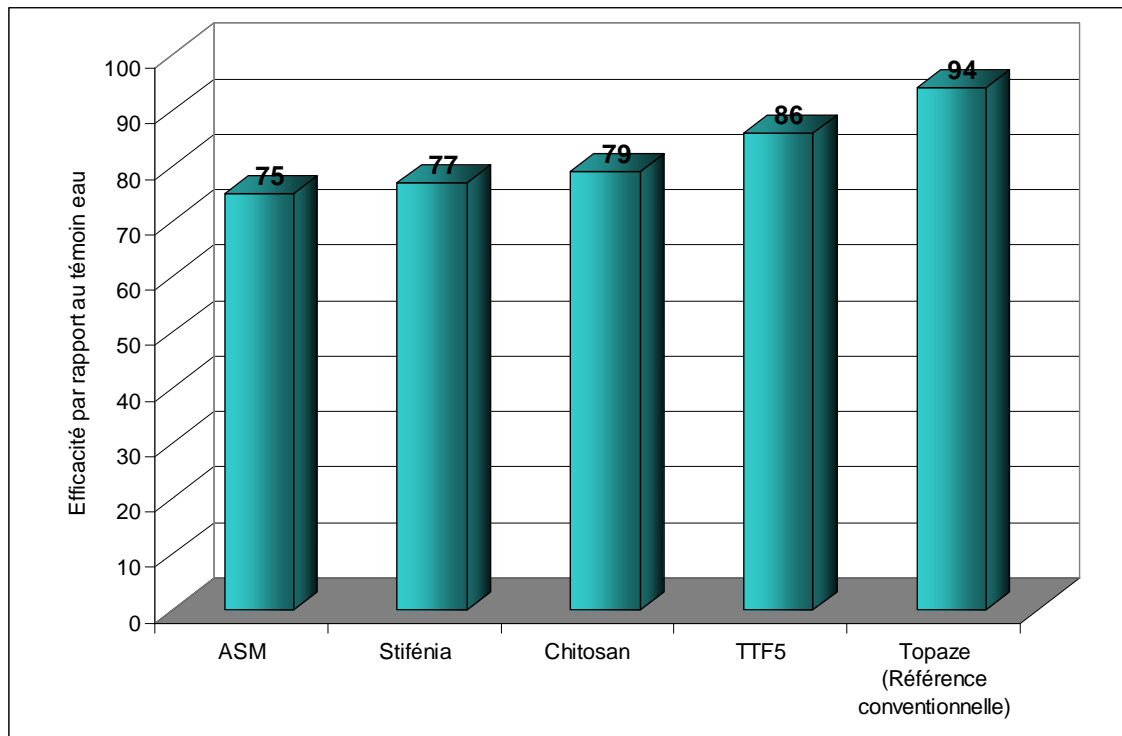


Figure 7 : Efficacité en conditions contrôlées de différents produits de protection sur oïdium du fraisier.
 Efficiency under controlled conditions of different products on powdery mildew of strawberry.



L'efficacité observée est très variable d'un produit « alternatif » à l'autre. Par ailleurs, certains produits sont plus efficaces sur certaines maladies que sur d'autres. Il n'est donc pas possible de généraliser ni sur l'efficacité de ce type de produit en général, ni sur leur spectre d'action. On peut constater qu'il est beaucoup plus difficile de mettre en évidence des produits efficaces sur botrytis de la tomate que sur oïdium du fraisier. De façon générale, il semble que peu de produits puissent apporter leur aide face à des pathogènes nécrotrophes. L'efficacité n'est, face à ces derniers, au mieux que partielle.

Mode d'action

Différentes études du mode d'action ont été réalisées à BBV. Ces études étant généralement confidentielles, nous ne pouvons donner qu'une observation générale sur les résultats obtenus.

Certains produits à base d'extrait végétaux, comme le Neem, ont des effets biocides très nets. D'autres n'ont par contre aucun effet direct observé malgré une très bonne efficacité sur plante. Les résultats biochimiques montrent alors souvent une stimulation des défenses de la plante suite au traitement.

Dans certains cas, nous avons pu observer une potentialisation de la stimulation des défenses. Ceci signifie que la plante traitée n'induit ses mécanismes de défense qu'en présence du champignon, et plus fortement qu'une plante non traitée.

Certaines études de la persistance d'action des produits ont par ailleurs pu montrer là aussi une très grande hétérogénéité entre produits. Le stimulateur de défense Baba a ainsi montré sur rouille blanche du chrysanthème une persistance d'action supérieure à la référence conventionnelle, contrairement à la plupart des produits testés (Guerrand *et al*, 2009).

Nous n'avons encore que peu de recul sur la systémie de l'effet des produits. L'ASM a montré une systémie ascendante dans une de nos expériences réalisées sur chrysanthème.

Discussion

De façon générale, les résultats obtenus à BBV, en conditions contrôlées, permettent d'affirmer que de nombreux produits dits « alternatifs » présentent un niveau d'efficacité très prometteur qui peut parfois atteindre, voire dépasser, le niveau d'efficacité de la référence conventionnelle. Dans la majorité des cas cependant, l'efficacité n'est plus que partielle sur le terrain et un travail de fond doit être entrepris pour mieux comprendre ces produits afin d'en optimiser l'utilisation, et notamment leur formulation. Des études combinant en alternance produits conventionnels et produits « alternatifs » ont déjà montré de très bons résultats. Il s'agit d'une option intéressante qui peut permettre de réduire dans le futur proche la quantité de produits conventionnels utilisés.

Dans le cas des éliciteurs, se pose de plus le problème de la réceptivité de la plante au produit, qui peut dépendre de nombreux paramètres tels que le stade de la plante, sa génétique (différence de réceptivité entre variétés), son état nutritif, son état de stress (lié à des facteurs biotiques ou abiotiques), les traitements avec d'autres produits, réalisés préalablement ou en parallèle du traitement avec l'éliciteur. L'évaluation de l'efficacité des éliciteurs est donc assez délicate et implique plus de répétitions dans le temps et dans l'espace, l'étude sur différentes variétés et à différents stades de la plante. L'impact de stress extérieurs peut également interférer avec les résultats, en particulier lorsqu'il s'agit d'essais au champ.

Dans l'esprit de chacun, l'intérêt des produits « alternatifs » repose notamment dans leur respect de l'environnement et de la santé humaine. Il est cependant important de faire une distinction entre produits « alternatifs » et produits naturels. Certains produits naturels présentent en effet une toxicité égale ou supérieure à certains produits conventionnels de synthèse. Il est vrai par contre que les chances que ces produits soient hautement toxiques est généralement plus faible, ce qui en fait de bons candidats comme potentiels « produits alternatifs ». Leur niveau de toxicité reste cependant à être vérifié avant toute commercialisation. Des molécules dont l'effet est strictement indirect, comme un grand nombre d'éliciteurs, sont ainsi de bons candidats. Leur absence de toxicité directe sur les microorganismes étudiés laisse supposer un faible niveau de toxicité ou d'écotoxicité (ce qui reste cependant à être validé par la suite).

Les éliciteurs ont par ailleurs l'avantage d'être nettement moins sujet à un contournement de résistance. Il est en effet très difficile pour un pathogène de devoir s'adapter à plusieurs mécanismes de défense mis en place simultanément.

Conclusion

En conclusion, de nombreux « produits alternatifs » présentent des efficacités intéressantes au laboratoire mais nécessitent souvent d'être optimisés pour pouvoir être utilisés sur le terrain. Ils requièrent, et c'est d'autant plus vrai pour les stimulateurs de défense, d'être globalement mieux étudiés au niveau de leur mode d'action afin de faire face aux freins auxquels ils sont confrontés.

Il s'agit donc de produits apportant un espoir pour le futur mais qui doivent être utilisés avec précaution en attendant une optimisation du produit et de son utilisation.

Remerciements

Je remercie toute l'équipe de pathologie végétale de BBV qui a réalisé les différentes études mentionnées.

Merci également à l'équipe de la station expérimentale du Caté de nous faire partager ses connaissances et son expérience, nous permettant ainsi d'adapter nos essais d'évaluation de produits de protection pour se rapprocher au mieux des exigences du terrain.

Nous remercions également pour leur aide financière :

le Cerafel Bretagne, le Pays de Morlaix (Fonds européens : Feoga), la Communauté de Communes du Pays Léonard (CCPL), le Conseil général du Finistère, le Conseil régional de Bretagne, l'Astredhor, Viniflor, le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

Merci enfin aux entreprises phytosanitaires qui nous ont fait confiance en nous permettant de participer à l'étude de leurs produits.

Bibliographie

Pajot E., Le Corre D. and Silué D., 2001 - Phytogard® and DL-β amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *European Journal of Plant Pathology*, N° 107, p 861-869.

Ziadi S., Barbedette S., Godard J.F., Monot C., Le Corre D. and Silué D., 2001 - Production of pathogenesis-related (PR) proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* Var. *botrytis*) downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology*, N° 50, p 579-586.

Silué D., Pajot E. and Cohen Y., 2002 - Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL-β amino-n-butanoic acid (BABA). *Plant Pathology*, N° 51, p 97-102.

Pajot E., Silué D., 2005 – Evidence that DL-3-amino-n-butyric acid (BABA) and acibenzolar-S-methyl (ASM) induce resistance in broccoli against head rot. *Pest Management Science*, Vol. 61, p 1110-1114.

Guerrand J., Drevon A., Colombel A-S, Stapel O., Pajot E., 2007 - Des avancées prometteuses dans la protection intégrée vis-à-vis des rouilles du chrysanthème. *4èmes Rencontres du Végétal*, Institut National d'Horticulture, Angers, France, 16-17 janvier.

**ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HUILES ESSENTIELLES D'*Ammoides verticillata*
ET DE *Thymus numidicus* (PLANTES AROMATIQUES ALGERIENNES)**

H. LAOUER¹, F. SAHLI², M. EL KOLLI¹, M. LAMAMRA¹, M. M. ZERROUG³
ET D. HARZELLAH³

¹Laboratoire de valorisation des ressources biologiques, Faculté des sciences, Université de Sétif, Algérie.

²Laboratoire de valorisation des ressources biologiques, Faculté des sciences médicales, Université de Sétif, Algérie.

³Laboratoire de microbiologie appliquée, Faculté des sciences, Université de Sétif, Algérie.

RESUME

Les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* et de *Thymus numidicus* (plantes aromatiques algériennes), obtenues par hydrodistillation au moyen de Clevenger sont analysées par chromatographie phase gaz couplée au spectrophotomètre de masse et évaluées *in vitro* pour leur activité antibactérienne vis-à-vis les souches phytopathogènes suivantes : *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 330 ; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1460 ; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1781 ; *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1099 ; *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1776.

Mots-clés : activité antibactérienne, huile essentielle, *Ammoides verticillata*, *Thymus numidicus*.

SUMMARY

The essential oils of *Ammoides verticillata* and of *Thymus numidicus* (Algerian aromatic plants), obtained by hydrodistillation by Clevenger apparatus type are analyzed by GC and by GC/SM and evaluated *in vitro* for their antibacterial activity against the following bacterial strains: *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 330; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1460; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1781; *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1099; *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1776.

Key words: antibacterial activity, essential oil, *Ammoides verticillata*, *Thymus numidicus*

INTRODUCTION

Les maladies bactériennes constituent un sérieux problème pour les différentes cultures. Parmi les bactéries incriminées : *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 330 ; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1460 ; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1781 ; *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1099 ; *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1776. Ces bactéries sont dangereuses pour certaines cultures.

Les pertes économiques causés par les bactéries phytopathogènes, et l'apparition de souches résistantes aux pesticides ont nécessité la recherche des produits plus sûrs et efficaces. Le control biologique par les extraits végétaux est apparu suite à plusieurs travaux de recherche très prometteurs. D'ailleurs et à titre d'exemple, Balestra *et al*, (2008), ont étudié *in vitro* et *in vivo*, l'activité antibactérienne des extraits naturels obtenus d'*Allium sativum* et de *Ficus carica* à l'encontre de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *viridiflava* et *P. syringae* pv. *tomato*. Güllüce *et al*, (2004) ont également étudié l'effet des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique de *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis sur 14 bactéries, trois champignons et une moisissure.

Les composés réputés actifs des huiles essentielles sont majoritairement les terpènes, souvent liés à leur propriétés lipophiles (Tepe *et al*, 2005 ; Pina-Vaz *et al*, 2004 ; Slaménova *et al*, 2004) et les phénols, réputés pour posséder une activité bactéricide très prononcée (Lambert *et al*, 2001 in Burt et Reinders, 2003), ainsi que les aldéhydes, notamment le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, ont une activité forte sur les bactéries (Dorman et Deans, 2000; Holley et Patel, 2005). Dans ce contexte nous sommes intéressés à l'évaluation biologique de deux huiles essentielles de plantes algériennes et dont l'analyse chimique a été réalisée au préalable (Laouer *et al*, 2003a et b ; Laouer *et al*, 2004 ; Laouer *et al*, 2009) au sein du département de chimie à Camerino (Italie) et au sein du LCMBA, CNRS UMR 6001 Université de Nice Sophia Antipolis dans le cadre d'une collaboration.

Partie expérimentale

MATERIEL ET METHODE.

Matériel végétal

Les deux plantes (*Ammoides pusilla* et *Thymus numidicus*) sont recueillies dans différentes régions de l'Est algérien, en Mai 2008, à différentes altitudes. Elles sont débarrassées des impuretés puis séchées à l'ombre à une température ambiante.

Souches microbiennes et milieu de culture

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée sur 5 pathovars de *Pseudomonas syringae*: *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 330 ; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1460 ; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1781 ; *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1099 ; *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1776. Ces souches proviennent du souchier de laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Sétif. La culture des bactéries a nécessité l'utilisation du milieu de culture Mueller Hinton agar

Méthodes expérimentales

Extraction et analyse des huiles essentielles

Le matériel végétal est coupé en parties très fines et soumises à l'hydrodistillation en se servant du dispositif d'extraction type Clevenger. La séparation et l'identification des constituants des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse (GC) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) à colonne apolaire au département des sciences chimiques à l'université de Camerino (Italie) et à l'université Sophia antipolis (Nice). En plus de multiples références bibliographiques, plusieurs bases de données sont utilisées pour l'identification des constituants Nist 98, Wiley 275 etc....

Etude de l'activité antibactérienne *in vitro* des huiles essentielles

L'étude qualitative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est réalisée par la technique du contact direct (méthode de diffusion d'agar). 5 µL de chaque dilution (1/2 v/v, 1/5v/v et 1/10 v/v) de l'huile essentielle dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont déposés à la surface de la gélose (9 cm. 20 ml de gélose). Les boîtes de Pétriensemencées par une suspension bactérienne (d'environ 10⁶ CFU/ml) sont ensuite incubées à l'étuve à 28°C pendant 48h. Après ce délai, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'activité antibactérienne des deux huiles est représentée dans le tableau 1. Toutefois, il est à noter que l'huile d'*Ammoides pusilla* était plus active sur les bactéries testées, malgré la richesse des deux huiles en thymol (le principal phénol actif vis-à-vis de plusieurs bactéries). La dilution ½ (v/v) de l'huile d'*A. pusilla* a inhibé totalement le développement de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1099 et de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1776. Enfin, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1460 a été inhibée par un diamètre de 45 mm. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 330 et *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1781 ont présenté la même sensibilité à cette dilution par un diamètre très nettement inférieur comparable à l'effet de la dilution ½ de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* à l'encontre de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1776 et *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 1460. La composition chimique des deux huiles sont publiés précédemment (Laouer *et al*, 2003a ; Laouer *et al*, 2009). Les constituants majoritaires des deux huiles essentielles sont présentés dans le tableau 2.

Tableau I. Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et du *Thymus numidicus* exprimée par le diamètre de l'halo d'inhibition en millimètre

Table I. Antibacterial activities of the essential oils of *Ammoides pusilla* and *Thymus numidicus* (expressed by the diameter of inhibition zone in millimeter)

| Dilutions/souches | <i>Ammoides pusilla</i> | | | <i>Thymus numidicus</i> | | |
|--|-------------------------|-----|------|-------------------------|-----|------|
| | 1/2 | 1/5 | 1/10 | 1/2 | 1/5 | 1/10 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> 330 | 24 | 17 | 15 | 12 | 12 | 10 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> 1460 | 45 | 37 | 35 | 25 | 16 | 15 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> 1781 | 25 | 20 | 23 | 18 | 14 | 13 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 109 | (-) | 30 | 32 | 16 | 10 | 09 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 1776 | (-) | 37 | 30 | 27 | 25 | 25 |

5 µl de chaque dilution (réalisée dans DMSO est exprimé en v/v= (volume/volume)

Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en millimètre

Diamètre de disque : 6 mm ; (-) : pas de développement.

Tableau II. Les principaux constituants des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et du *Thymus numidicus*

Table II. Principal constituent of essential oils of *Ammoides pusilla* and *Thymus numidicus*

| <i>Ammoides pusilla</i> | | <i>Thymus numidicus</i> | |
|-------------------------|------|-------------------------|-----|
| Constituant | % | Constituant | % |
| Gamma terpinène | 32.9 | alpha pinène | 5.3 |
| Para-cymène | 13.5 | para-cymène | 5.8 |
| Méthyl thymol | 7.5 | gama -tepinène | 8.5 |
| thymol | 44.5 | thymol | 59 |

Lacobellis *et al.* (2005) ont signalé, que malgré, un faible effet de deux huiles sur les bactéries *Pseudomonas*, le potentiel antibactérien que peut constituer les huiles de fruits de *Cuminum cyminum* L. et du *Carum carvi* L. vis-à-vis les bactéries phytopathogènes. İşcan *et al.*, (2002) ont démontré que les huiles essentielles de *Mentha piperita* L. ont fortement inhibé les microorganismes phytopathogènes. Enfin, Basim *et al.*, (2000) ont mis en évidence l'effet de l'huile essentielle de *Thymbra spicata* L. var. *spicata* à l'encontre de plusieurs bactéries phytopathogènes par contact ainsi que par la technique de la vapeur. Balestra *et al.*, (2008) ont montré par des tests *in vitro* et *in vivo*, que les extraits aqueux d'*Allium sativum* et des figues (*Ficus carica*) réduisent la survie et les dommages (l'incidence de maladie et la sévérité de maladie) causés par les bactéries phytopathogènes des fruits du kiwi (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas viridiflava*) et de tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).

BIBLIOGRAPHIE

Balestra G.M., Rossetti A., Quattrucci A, 1982 - Biological control of kiwifruit and tomato bacterial pathogens. 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20, 2008. Archived at <http://orgprints.org/view/projects/conference.html>

Basim H., Yegen O., Zeller W., 2000 - Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107, 3, 279-284.

Burt SA., Reinders R., 2003 - Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36, 162–167.

Dorman H.J.D, Deans H.J.D., 2000 - Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 2, 308–316.

Güllüce M., Sökmen M., Şahin F., Sökmen A., Adigüzel A., Özer H., 2004 - Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84, 7, 735-741.

Holley R.A., Patel D., 2005 - Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22, 4, 273–292.

Iacobellis N. S., Cantore P. L., Capasso F., Senatore F., 2005 - Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1, 57–61.

İşcan G., Kırılmer N., Kürkcüoğlu M., Can Başer K. H., Demirc F., 2002 - Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 14, 3943–3946.

Laouer H, Boulaacheb N., Akkal S., Meierhenrich Uwe J., Baldovini N., 2009 - Composition and *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of two populations of *Thymus numidicus* Poiret. *J. Essent. Oil Res.*, july/august (2009).

Laouer H., Zerroug M. M., Chaker A. N., Bouzerzour H., 2004 - Study of the effect of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist, Essential oil Against *Pseudomonas*. *Comm. Appl. Biol. Sci.* Ghent University, 69, 4, 619-624.

Laouer H., Zerroug M. M., Sahli F., Chaker A., Valentine G., Ferretti G., Grande M. and Anaya J. - Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. Essential Oil. *J. Essent. Oil Res.*, 15, 135-138.

Laouer H., Zerroug M. M., Chaker A. N., Khenchouche A., Sahli F., Bouabdellah B., Ababsa A., Valentini G., Biondi R., Grande M., 2003b - Etude comparative de l'activité antimicrobienne et de la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne et des fruits d'*Ammoides pusilla* (Brot.) Bresist. *Revue des Sciences et Technologie C*, 20, 11-18.

Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L, Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de-Oliveira J., 204 - Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J. Acad. Dermatol. Venereol*, 18, 73–78.

Slamenova D., Masterova I., Labaj J., Horvathova E., Kubala P., Jakubikova J., Wsolova L., 2004 - Cytotoxic and DNA-Damaging Effects of Diterpenoid Quinones from the Roots of *Salvia officinalis*L. On Colonic and Hepatic Human Cells Cultured *in vitro*. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 94, 282–290.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., 2005 - Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333–340.

POTENTIEL OF *OLEA EUROPAEA* LEAVES AND CAKE AND *SALVIA OFFICINALIS*
FOR CONTROLLING SOFT ROT POTATO TUBERS

R. ZAIDI-YAHIAOUI, F. ZAIDI, S. OUANAS, S. MEZIANI ET S. BECHAR

Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie 06000 Bejaia, Algérie
Laboratoire de Microbiologie Appliquée. e-mail: rachida_zaidi@yahoo.fr

SUMMARY

The acetone and methanol extracts of *Salvia officinalis*. and *Olea europaea* L. leaves and olive cake are evaluated in order to control the soft rot caused by *Pectobacterium atrosepticum* on potatoes. A colorimetric determination of the extracts tested, has revealed the presence of total polyphenols, tannins and flavonoids. All the extracts tested in vitro showed an inhibitory effect against the strain tested. A better inhibition was observed in the presence of the acetone extract of *Olea europaea* L. leaves. The same extracts tested on half potato tubers inoculated with *P. atrosepticum* showed a significant reduction in the development of soft rot with a more pronounced inhibition (inhibition about 65% of the disease) obtained with the acetone extracts of *O. europaea* L. and methanolic extract of olive cake at a concentration of 100µg/µl.

Keywords: *Pectobacterium*, plant extracts, protection, Potato and Phenolics.

RESUME

Les extraits acétonique et méthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. et d'*Olea europaea sativa* et d'un co-produit (grignon d'olive) sont évalués dans le but de contrôler la pourriture molle causée par *Pectobacterium atrosepticum*, sur pomme de terre. Un dosage colorimétrique des extraits testés, a mis en évidence la présence de polyphénols totaux, tannins et flavonoïdes. L'ensemble des extraits testés in vitro a montré un effet inhibiteur vis-à-vis de la souche testée. Une meilleure inhibition est observée en présence de l'extrait acétonique des feuilles d'*Olea europaea*. Les mêmes extraits testés sur demi-tubercules de pomme de terre inoculés par *P. atrosepticum* ont montré une baisse importante du développement de la pourriture molle avec une inhibition plus prononcée (inhibition près de 65% de la maladie) obtenue avec les extraits acétonique d'*O. europaea* L et méthanolique du grignon d'olive à une concentration de 100µg/µl.

Mots clés : *Pectobacterium*, extraits de plantes, protection pomme de terre et polyphénols.

INTRODUCTION

Soft rot disease caused by *Pectobacterium* species is one of the most important diseases on a wide range of plant species including many crops of economical importance. Soft rot of potato tubers may be a severe problem in industry of potatoes production due to the general disorganisation of plant tissue following by degradation of pectin (Pérombelon and Kelman, 1980; Stead, 1999).

Despite the economic importance of soft rot, an efficient chemical method or other wise, has not been developed to control the world-wide disease. Several strategies of controlling tuber diseases have been introduced over the years but serious losses still occur. To solve this problem, many scientists have focused on alternative solutions such as biological control but few of their works have focused on the use of natural products from plants to control the phytopathogenic diseases.

The increasing interest in the possible application of the secondary metabolites to pest management has directed investigations towards search for new sources of biologically active natural products. Considering the recent need for biologically active natural products, with low persistence in environment and biodegradability, which may also avoid the development of resistance in pest, higher plants are routinely screened for antimicrobial activity against *Pectobacterium* sp. in our laboratory.

The use of plant extracts has long been identified as a traditional means to control plant diseases (Cowan, 1999). However, the actual use of these products in plant disease control has only recently become an important field of study (Obagwu, 2003). The natural products of plant extracts such as phenolic compounds (Tripathi and Dubek, 2004) have been used successfully to control postharvest diseases of some agricultural crops.

Phenolic compounds including oleuropein, tyrosol, hydrotyrosol, caffeic acid, gallic acid, syringic acid, coumaric acid and luteolin isolated from olive leaves, and salvianolic acid, rosmarinic acid and sageriniquic acid (Lu et Foo., 2001); flavonoïdes such as Luteoline-7-glucoside and Apegin glycosylated from *S. officinalis* leaves, have been shown to inhibit or delay the rate of growth of a range of microorganisms (Aziz *et al.*, 1998; Bisignano *et al.* 1999; Korukluoglu *et al.* 2004; Melosevic, and Solujic, 2006; Korukluoglu *et al.* 2007 and Raghavendra *et al.*, 2008).

The main aim of this investigation is to develop herbal remedies for plant diseases management and to evaluate the potential control of soft rot on potato tubers of crude extracts from olive cake and leaves and *Salvia officinalis*.

MATERIELS AND METHODS

Bacteria strains and culture media

Pectobacterium strain *Pca* (CFBP 1526 -NCPBP 549, Graham), used in this study was obtained from the Stock Culture Collections of Phytopathogenic Bacteria (CFBP, INRA Angers, France). It was maintained for extended periods as deep-frozen cultures (- 80 °C) in Luria-Bertani (LB) medium (10 g.l⁻¹ tryptone, 5 g.l⁻¹ yeast extract and 10 g.l⁻¹ NaCl; pH 7.3 supplemented with 30% glycerol (Sambrook *et al.*, 1989). Before inoculation, a bacterial suspension of each strain was prepared in sterile distilled water (SDW) from cultures on King's B medium, and incubated at 26°C for 24h. The bacterial inoculum was prepared from overnight stock culture in nutrient broth corresponding to 4.10⁸ cfu.ml⁻¹.

Polyphenol extraction

The *Olea europaea* and olive leaves and cake were collected from Béjaia in January. The whole samples were dried in shade and crushed to fine powder.

20g of dried powder of each olive cake and leaves were submitted to extractions which were carried out twice for 24h with 400 mL of the following solvents: A, Acetone: water (7:3) and B, Methanol: water (8:2). Then extracts were evaporated to dryness by evaporation on a water bath to avoid hydrolysis and polymerisation reactions. The aqueous extract was delipitated using the method described by Djeridane *et al.*, (2006).

Phenolics analysis

The total phenolic contents of the samples were determined with the Folin Ciocalteu reagent according to the methods given by Singleton *et al.* (1999). The flavonoid fraction was determined by mixing 1ml of the aqueous extract with 1 ml of methanolic solution containing 2% of aqueous Aluminium Chloride (AlCl₃, 6 H₂O). The mixture was left for 10 min and the absorbance was measured at 430nm. The flavonoid content was expressed as the equivalent of quercetine per gram of vegetal powder (mg QE/g) (Bahorum *et al.*, 1996)

The tannin content was determined by basing on Hagerman and Butler (1978) methods and expressed as the equivalent of tannic acid per gram of vegetal powder (mg GAE/g). All the analysis was carried out in three replicates.

Antimicrobial activity assay of plant extract on Petri disch

The paper disc diffusion methods were used to test antimicrobial activity. One hundred microlitres of the liquid diluted culture of *P. atrosepticum* were spread on 15 ml of sterile Mueller-Hinton agar (MHA). The sterile filter-dics (6mm diameter) impregnated with the different doses of prepared extracts were then placed on the plates and incubated at 20°C. and inhibition zones were evaluated after 48 h by measuring the widths (as mm) of the clear zone surrounding the well and the effect was calculated as mean of the duplicate experiments for each triplicate strain test.

Antimicrobial essay on potato tubers

The half tuber was treated according to the methods given by Ibrahim *et al.*, (1978) and Val *et al.*, (2006). Tubers of cultivar (Desiree) chosen for its popularity in Algeria and have been regarded as susceptible to soft rot. They were washed, surface-sterilised by immersing the tubers in 10% ethanol for 5 min, rinsed in SDW and air-dried overnight before cutting. Each tuber was cut from the rose end to the heel end in two roughly equal parts with a sterile knife. A hole (10 mm diameter x 10 mm depth) was drilled with a cork borer in the centre of each half-tuber, which was then placed on tissue paper soaked with sterile water in plastic containers and allowed to dry for one hr before inoculation. Each half-tuber was treated by depositing 100 µl of one of the previously prepared phenolic extracts in the hole. For the control half-tubers, SDW and phenolic extract were used. After 48h the treated potato tubers were then inoculated with 100 µl of bacterial suspensions 10⁸ CFU/ml. The plastic boxes containing the inoculated tubers were covered with a plastic sheet sealed with a rubber band to maintain a saturating relative humidity. The tubers were assessed after five days for the development of diseases symptoms, before all rotted tissue was removed with a spatula and weighted. In each test, 5 half-tubers were inoculated with each inoculum concentration with and without phenolic extract of each strain.

Statistical analysis

The pathogenic ability of *Pectobacterium carotovorum* on each cultivar was assessed as the means of the weight of rotted tissue. Effects of plants extracts, doses and solvent of extraction on pathogenicity), and interactions between those parameters were analysed by ANOVA STATISTICA 5.5 Fr with two factors.

RESULTS

Phenolics compound content

Folin type assay may overestimate the total phenolic contents due to reaction with interfering compounds like sugars and ascorbic acids. The results presented in table1 revealed the presence of total phenolic, flavonoids and tannins in the crude extract of all the plants.. Acetone extracts gave the highest concentrations of total polyphenols in *S. officinalis* leaves and olive cake compared to methanol extract. Furthermore, the highest levels in total polyphenols were obtained from methanol olive leaves extract. The extraction with aqueous acetone gave the highest concentrations of the tannins in olive cake compared to aqueous methanol, while for *S. officinalis*, the highest yields are obtained by methanolic extract (3.61

± 0.16 meq TA / g of MS against 2.71 ± 0.11 meq TA / g of MS for the acetone extract). Regardless of the solvent ($P > 0.05$), the tannin content is higher in *O. europaea* leaves followed by *S. officinalis* and the olive cake. Nonetheless, there is no significant difference ($P > 0.05$) between the content of flavonoids in methanolic and acetone extracts for *S.*

| | | <i>O. europaea</i> L. Leaves' Chemlal variety | | Olive cake Chemlal variety | | <i>Salvia officinalis</i> leaves | |
|--|--|---|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | | AE | ME | AE | ME | AE | ME |
| Expressed as (mg GAE or QE/g of MS) | Total soluble phenolic compounds | 35,07 \pm 0,14 | 43,59 \pm 0,24 | 14.62 \pm 0.01 | 11.57 \pm 0.04 | 42,59 \pm 0,2 | 29,84 \pm 0,1 |
| | Tannins | 3,95. \pm 0,01 | 3,84 \pm 0,14 | 1.99 \pm 0.01 | 1.02 \pm 0.01 | 2,71 \pm 0,11 | 3,61 \pm 0,16 |
| | Flavonoïds | 1,33 \pm 0,01 | 1,24 \pm 0,007 | 0.036 \pm 0.01 | 0.136 \pm 0.01 | 1,38 \pm 0,01 | 1,37 \pm 0,02 |

officinalis leaves. Contrary to these observations, acetone and methanol extracts of *O. europaea* leaves and cake were significantly different between them. The acetone extracts of *S. officinalis* and *O. europaea* leaves have similar flavonoid concentrations (1.38 ± 0.01 and 1.33 ± 0.01 mg EQ / g, of MS respectively). The content of flavonoids in methanolic extracts of *S. officinalis* leaves are the highest (1.37 ± 0.02 meq Q/g of MS) compared to of *O. europaea* leaves and cake which contained ($1,24 \pm 0.007$ and $0,136 \pm 0,01$ respectively).

Table I: Content of phenolic compound of *Olea europaea* cake and leaves and *Salvia officinalis* extracts. (Contenu en composés phénoliques des feuilles et du grignon d'*Olea europaea* et de *Salvia officinalis*).

AE: Acétonic Extract; **ME:** Methanolic Extract.

Evaluation of antimicrobial effect of plant extract on Petri dish.

All the crude extracts Acétonic Extract (AE) and Methanolic Extract (ME) of *S. officinalis* leaves and products of *O. europaea* (cake and leaves) expressed antibacterial activity towards *P. atrosepticum* strain. This activity differs from one sample to another, depending on the concentration of plant material used and the extraction solvent.

Indeed, whatever the nature of the plants used, the acetone extracts had a better inhibitory effect on *P. atrosepticum* compared to the methanolic extracts. Thus, inhibition of growth of *P. atrosepticum* is highly significant ($P < 0.01$) with increasing the concentration of extract. The highest inhibitory effect was obtained with the acetone extract of *O. europaea* leaves at a concentration of 200 mg / ml, with inhibition zone of 15.67 ± 0.58 mm diameters, followed by the methanolic extract of *S. officinalis* and the acetone extract of olive cake. The lowest effect is obtained with the acetone extract of *S. officinalis* leaves.

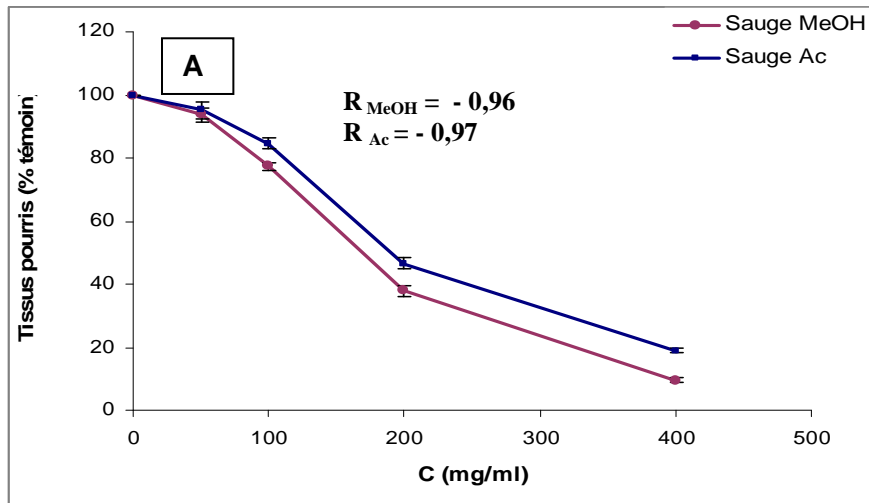
Suppression of soft rot development on potato tubers

The visual aspect of soft rot symptoms caused by *P. atrosepticum* appeared as a dark brown slimy necrosis surrounded by a black ring.

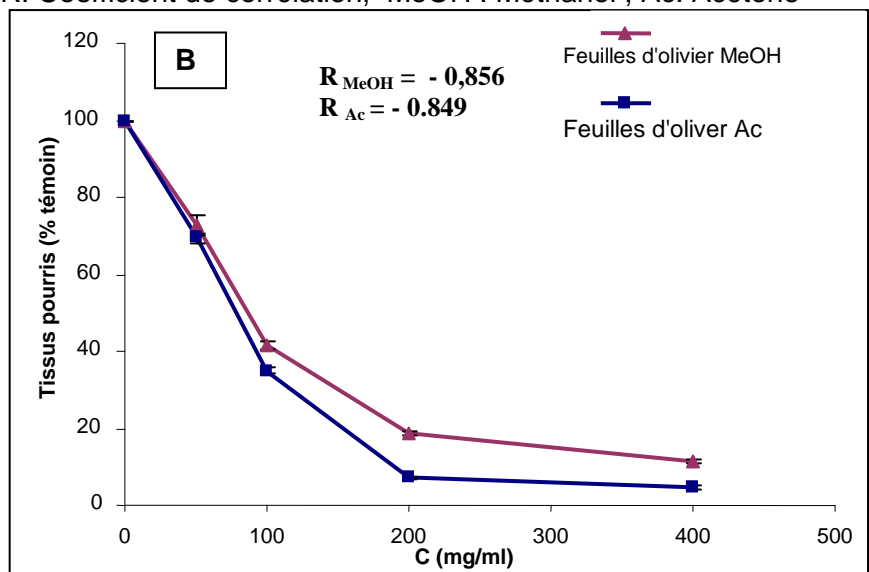
Figure 1 show that both Acétonic Extract (AE) and Methanolic Extract (ME) of *O. europaea* L. and *S. officinallis* express antibacterial activity on *P. atrosepticum*. The results of the half-tuber inoculation treated by various extracts showed a remarkable reduction in the amount of

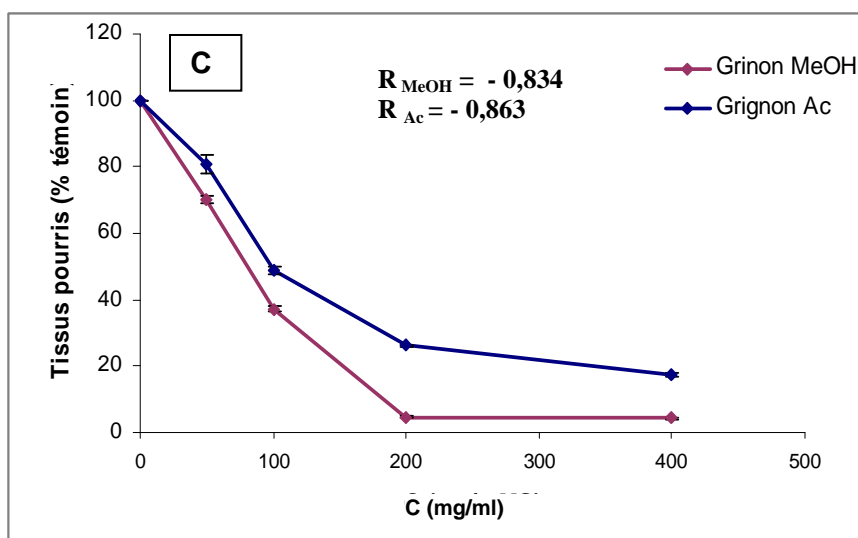
rotted tissue in the presence of the acetone extracts of *O. europaea* L. compared to their equivalents methanolic. The various results obtained showed a net effect of the dose extract on the inhibition of the development of the soft rot with the two solvents and substrates used ($P < 0.001$). The statistical analysis of the results shows that only the methanolic extracts of *O. europaea* L. present significant differences between them ($P < 0.001$)

Figure 1. Effect of *Salvia. officinalis* (A), and *Olea europaea* (B) leaves and olive residue extract (C) on soft rot development on potato tuber. (Effet des feuilles de *Salvia. officinalis* (A), et d'*Olea europaea* et du grignon d'olive sur la pourriture molle des tubercules de pomme de terre).



R: Coefficient de corrélation, MeOH : Méthanol ; Ac: Acétone





A significant reduction in the amount of rotted tissue was observed on tubers in the presence of the various extracts. The quantity of rot collected on the potato tubers after five day of incubation, is inversely proportional to the concentration of extracts ($P < 0.001$) and varies from an extract to another. The reduction of soft rot is significantly higher in the presence of AE extracts of *O. europaea* leaves and ME of olive cake compared to *S. officinalis* extracts which corroborates the observations of *in vitro* tests.

We also note that the treatment of potato tubers with a concentration of 400 mg / ml of either methanolic or acetonic extract decreases significantly ($P < 0.05$) the amount of rotted tissue. The quantity of rotted tissue harvested after five days of inoculation were inversely correlated to the concentration of such extracts shown in figures1. They acted positively on the inhibition of development of soft rot by acting mainly on the growth of *P. atrosepticum* as demonstrated in *in-vitro* tests

DISCUSSION

The goal of this work is to study the behavior of *P. atrosepticum* against potato tubers, in the presence of olive leaves and cake from *O. europaea*. The latter are obtained by solid-liquid extraction using aqueous organic solvents recommended by many researchers as better extractors of the phenolic compounds than pure organic solvents (Chavan *et al.*, 2001; Luthria and Mukhopadhyay, 2006).

The olive leaves are considered as a major source of production of polyphenols compared with other parts of the olive tree (Ryan *et al.*, 2002).

The concentration of *O. europaea* leaves AE is similar to that obtained by Pereira *et al.* (2007) (36.05 GAE mg / g DM). For the total polyphenol concentration of *S. officinalis* leaves ME (29.84 ± 0.1 GAE mg / g DM), it is slightly higher than the data of Miliauskas *et al.* (2004) (23.6 ± 0.9 GAE mg / g DM). Also, the same observations are noted with the *O. europaea* leaves ME (43.30 ± 0.24 GAE mg / g DM) which is higher than those obtained by Martin-Garcia *et al.* (2006) and Ferreira *et al.* (2007). The values obtained with the olive cake ME are very similar to those reported by Martin-Garcia *et al.* (2003) (11.57 ± 0.13 mg GAE / g DM). The differences found between the results obtained and the data of different authors cited above are quite justified. Indeed, the extraction conditions in terms of temperature and the number of stages of extraction (Escribano-Baillon and Santos-BuEIGa., 2003; Scalbert, 1991) and the status and origin of the sample terms of geographical origin, season and cultivar collection can not be excluded (Ranalli *et al.*, 2006).

According to Rawel *et al.* (2005), methods of storage and light exposure of plants can affect the level of tannins. Indeed, phenolic compounds are susceptible to oxidation, especially

gallic acid, which tends to form polymers giving condensed tannins (Manach *et al.*, 2004) which could explain these differences in concentrations. The low tannin content in the samples tested could be explained by the fact that they are harvested in winter (young foliage). The levels of flavonoids in *S. officinalis* leaves AE (3.1 mg quercetin / g MS) are three times lower than those reported by Miliauskas *et al.* (2004).

We note that despite the low total polyphenol concentration, olive cake ME and *O. europaea* leaves AE were very effective on the inhibition of growth of the bacteria compared to *S. officinalis* leaves. The antimicrobial effects of plants extracts is related to their phenolic compounds content as reported by many researchers. These observations could be explained by the nature and properties of each constituent phenolic compounds extracted and possibly a synergistic effect between the phenolic compounds in an extract. Indeed, the majority of phenolic compounds identified in the products of *O. europaea* are reported for their antimicrobial potential. According Bisignano *et al.* (1999), hydroxytyrosol and oleuropein, the majority of two compounds *O. europaea* (leaves and cake), have shown very interesting antibacterial properties over a wide range of microorganisms including enterobacteria which supports our hypothesis. Furthermore, High concentrations in tyrosol, phenolic compound in *O. europaea* leaves AE with antibacterial properties have been reported by several authors (Ryan *et al.*, 2002; Martin *et al.* 2003; Perreira *et al.*, 2007). *S. officinalis* is known to contain a considerable amount of phenolic acids (acid salvianolic acid, rosemary, sagerinique acid) whose antioxidant activity has been studied by several authors (Lu and Foo., 2001). The plant also contains flavonoids (mainly luteolin-7-glucoside, Apegin) glycosylated form. Turkmen *et al.* (2006) and Taguri *et al.* (2006) reported that the antibacterial activity of flavonoids decreases considerably as being glycosylated, which could explain the low antibacterial activity of extracts of *S. officinalis*.

The decrease of rot caused by *P. atrosepticum* with *O. europaea* L leaves and cake extracts. and *S. officinalis* proves that these plants could contain substances responsible of the inhibitory effect like phenolic compounds or the induction of the molecules of defence in potato tubers. Inhibition of the disease obtained by the tested extracts is due to the antibacterial effect of phenolic compounds. They acted positively on the inhibition of development of soft rot by acting mainly on the growth of *P. atrosepticum* as demonstrated in *in vitro* tests.

According to Okuda *et al.* (2005), phenolic compounds in general and in particular tannins, are responsible of precipitation of proteins and can thus precipitate the membrane proteins by binding to the outer envelope of the microorganism. This binding results in a disruption of the cytoplasmic membrane and inactivation of cellular proteins. However, this remains a function of the chemical nature of phenolic compounds and the bacterial species that is more difficult in the case of gram negative bacteria like *P. atrosepticum*. Thus, polyphenols with chelating properties of metals can bind to active sites of metabolic enzymes to reduce the metabolism of bacteria and its growth (Chandarana *et al.*, 2005). Indeed, Pectate lyase, known to be responsible for the onset of decay, is Ca²⁺ dependent and the reduction of these ions inhibits the activity of this enzyme thus reducing the quantities of the macerated tissue. This could partly explain the effect of extracts on the reduction of the weight of rotted tissue.

The influence of phenolic compounds can be explained by the interaction with protease and pectate lyase produced by *P. atrosepticum*. Indeed, various polyphenols are known to be enzyme inhibitors and are able to settle down on some proteins or enzymes and change their stability (Meddleton *et al.*, 2000). For example, tannins are known to have important binding with various enzymes and generate a complex protein-polyphenols which precipitate and become non-functionall Lowjkovska and Halubovska (1992) showed that the inactivation of membrane enzyme by the phenolic compounds would involve a modification of the cellular permeability followed by a lysis of the bacterial cell.

Phenolic compounds could contribute too to the stimulation of defence mechanisms in plants against *P. atrosepticum*. Our hypothesis is supported by the observations of Del Rio *et al.* (2003) where an increase in inhibition of *Phytophthora* sp and increased rates of antibiotics

was noted after treatment of leaves by the olive polyphenols. Also, the study of Baysal and Zeller (2004), showed that a preventive treatment of apples by the extract of *Hedera* sp, 48 hours before inoculation with *Erwinia amylovora*, was sufficient to allow the receptors located at the plasma membrane of the host to recognize the elicitors produced by the extracts. This leads to activation of genes in host defence to inhibit the proliferation of the micro-organism producing polyphénoloxydases and peroxidases, which play an important role in the resistance of the plant pathogen.

The interest of this work carried out on the micro-organisms, has as a practical repercussion, the implementation of production of healthy plants by means of the research of the methods of fight by using natural products. The results are very encouraging and suggesting that these two plants contains compounds having important antimicrobial properties and should be investigated to better understand their effect. Further investigations need to be carried out to know which of the phenolics compounds previously reported are responsible for the antimicrobial activity.

CONCLUSION

Our data express that Plant extract have great potential as antimicrobial compounds against *P. atrosepticum* in vitro and on half potato tubers and suggest the possible exploitation of these plants in management of plant pathogenic bacteria since compounds of biological origin are known to possess minimal residual effects. Thus, they can be used in the treatment of infection diseases caused by resistant microbes in an early state. Therefore, such plants should be investigated to better understand their properties, safely and efficiently. More work is needed to confirm this data. In addition phytotoxicity and the environmental effects of the extract on epiphytic micro-organisms need to be tested.

Acknowledgement: This work is part of the project N° F00620080005 which is supported by MESRS. We thank B. Jouan, D. Anrivos, F. Val (INRA LeRheu /Rennes and B. Cerdic (LCBE Centre of Phytopharmacy /UPVD) for their collaboration.

REFERENCES

- Aziz N., Farag S.-E., Mousa L.-A. Abo-Zaid M.-A., 1998 -Effets antibactériens et antifongiques comparatifs de certains composants phénoliques. *Microbios*, 93, 43-54.
- Baharun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. -C., Pinkas M., 1996 -Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Research*, 46, 1086 –1108
- Baysal O., Zeller W., 2004 -Extract of *Hedera* induces resistance on apple roots to M 26 similar to acibenzolar-s-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and molecular Plant Pathology*, 65, 305-315.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio, R.; Crisafi G., Uccella N. et Saija A., 1999 -On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal Pharm Pharmacology*, 51, 971–974.
- Chandarana H., Baluja S., Chanda S., 2005 -Comparison of antibacterial activities of selected species of Zingiberaceae and some synthetic compounds. *Turkey Journal of Biology*, 29, 83-97.
- Cowan M.-M. 1999 - Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12, 4, 564-582.
- Chavan U.-D., Shahidia F., Naczkb M., 2001 -Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food. Chemistry.,Analytical. Nutritional and Clinical. Methods. Section*, 75, 509–512

Del Rio J. -A., Baidez A. -G., Botia J. -M., Ortuno A., 2003 -Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, 83, 75–78.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., 2006 -Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.

Escribano-Bailón M. -T. et Santos-Buegla C., 2001. Polyphenol extraction from foods. In: "Method in polyphenol analysis". Ed. Royal Society of Chemistry, 1-16.

Ferreira I. -C. -F. -R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P. -B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. -A. 2007 -Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecule*, 12, 1153-1162.

Hagerman A. -E., Butler L. -G., 1978 -Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 26, 809-812.

Ibrahim M., Jouan B., Samson R., Poutier F., Saily M., 1978. Prospect of a pathogenicity test concerning *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on half tubers. In: Proceeding. 4th International Plant Conference plant pathogenic Bacteria, Angers, 591-602.

Korukluoglu M., Ahan M., Yigit Y., Tumay A., Ozer O., Guger S., 2004. In vitro Antimicrobial Activity of Olive Leaf (*Olea europea* L.) Extracts and their chemical characterisation, in: 4th Aegean Analytical Chemistry Days Aydin, Turkey, 569-571.

Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit., 2007 –Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of food safety*, 28, 76-87.

Lojkowska E., Holubovska M., 1992- The role of polyphenol oxidase and peroxydase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Journal of Phytopathology*, 136, 319-328.

Luthria D. -L., Mukhopadhyay S., 2006 -Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 41-47.

Hagerman A. -E., Butler L. -G., 1978 -Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 26, 809-812.

Lu Y., Foo L. -Y., 2001 -Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197–202.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004 -Polyphénols: food sources and bioavailability. *American journal of Clinical and Nutrition*, 79, 727-747.

Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez-Ruiz D.R. et Molina-Alcaide E., 2003 –Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107, 61-74.

Martin Garcia I., Yanez Ruiz D., Moumen A., Molina Alcaide E., 2006 -Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Ruminant Research*, 6, 53–61.

Miliauskas G., Venskutonisa P. -R., van Beek T.A., 2004 -Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231–237.

Meddleton E., Kandaswami C., Theoharides T.-C., 2000 -The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Review*, 52, 673-751.

Melosevic T., Solujic S., 2006 -Antimicrobial activity of the *Hypocum perforatum* L. plant. *Bulletin of Chemical. Technology. Macedonia*, 25, 127-130.

Obagu J., 2003 -Developing biopesticides for controlling of citrus fruit pathogens of importance in global trade. Phd THESIS University of Pretoria, Pretoria, South Africa

Okuda T., 2005 -Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Photochemistry*, 66, 2012-2031.

Pereira A. -P., Ferreira I.C-F-R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P. -B., Seabra R., Estevinho L., Bento A. et Pereira J. -A., 2007 - Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12, 1153-1162.

Perombelon M. -C. -M., Kelman A., 1980 -Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 361–87.

Raghavendra M.-P., Satish S., Raveesha K.-A., 2008 - In vitro antibacterial potential of alkaloids of *Samanea Samon* (Jacq.) Merr. Against *Xanthomonas* and Human Pathogenic Bacteria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4, 100-105.

Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D., Di Fonzo V., 2006 –Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem*, 54, 434-440.

Rawel H. -M., Meidtner K., Kroll J., 2005 -Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 4228-4235.

Ryan D., Antolovich M., Herlt T., Prenzler, P. -D., Lavee S., Robards K., 2002 –Identification of phenolics compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammouth. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 6716-6724.

Scalbert A., 1991 -Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875–3883.

Singleton V. -L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. -M., 1999 -Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods. Enzymology*, 29, 152-178.

Sambrook J., Fritsch E. -F., Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning In: A Laboratory Manual*, 2nd ed. P. 18. 15. Cold Spring, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory. p34.

Stead D., 1999 -Bacterial diseases of potato: relevance *in vitro* potato seed production. *Potato Research*, 42, 505-509.

Taguri T., Tanaka T., Kouno I., 2006 -Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological & Pharmaceutical. Bulletin*, 29, 11, 2226-2235.

Tripathi B., Dubey N. -K., 2004 – Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest of Biology and technology*, 32, 235, 245

Turkmen N., Sari F., Velioglu Y. -S., 2006 -Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 99, 4, 835 841.

Val F., Barzic, M. -R., Desender, S., Hamelin, G., Andrivon, D., 2006 -Stockage des pommes de terre: Un lipopolysaccharide bactérien, anti-bactérien ? (Bacterial diseases of potatoes: What about bacterial lipopolysaccharide for biological control?). *Phytoma, la défense des végétaux*, 596, 33-36.

**AFPP-9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

**ETAT SANITAIRE POST-RECOLTE DE LA MANGUE COMMERCIALISEE DANS LA
VILLE DE DSCHANG ET EFFICACITE *IN VITRO* DES HUILES ESSENTIELLES CONTRE
COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES PENZ., AGENT CAUSAL DE
L'ANTHRACNOSE**

J.-F. DJEUGAP^{1*}, J.-R. KUIATE² et D.-A. FONTEM¹

¹ Laboratoire de Phytopathologie, Département de Protection des Végétaux, Faculté d'Agronomie et des Sciences Agricoles (B.P. 222 Dschang), Université de Dschang, Cameroun.

² Laboratoire de Biochimie, Département de Biochimie, Faculté des Sciences (B.P. 67 Dschang), Université de Dschang, Cameroun.

* Auteur correspondant, E-mail : jdjeugapfovo@yahoo.fr

RESUME

L'étude de la pathologie post-récolte des mangues commercialisées dans la ville de Dschang (Cameroun) montre que durant leur conservation les mangues sont infectées par quatre champignons phytopathogènes qui sont : *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis guepinii* et *Rhizopus nigricans*. Les huiles essentielles des graines sèches de *Piper guineense* (P) et de *Monodora myristica* (M) ont donné des rendements respectifs de 2,18 et 3,58 %. L'efficacité *in vitro* de ces huiles essentielles ainsi que celle de leurs mélanges (volume /volume) sur la croissance radiale de *Colletotrichum gloeosporioides* (agent de l'antracnose) a montré que les essences les plus efficaces sont les mélanges d'huiles P/M (90 /10), P/M (75 /25), P/M (50 /50) et P/M (25 /75) avec des pourcentages d'inhibition (%I) respectifs de 92, 89, 86 et 80%. L'huile de *M. myristica* a été la moins efficace (%I = 30%). L'huile de *P. guineense* (%I = 57%) et le mélange P/M (10 /90) (%I = 70%) ont présenté une efficacité moyenne. Les mélanges d'huiles P/M (90 /10), P/M (75 /25), P/M (50 /50) et P/M (25 /75) et l'huile de *P. guineense* ont présenté des effets fongistatiques vis-à-vis de *C. gloeosporioides* à la concentration de 20 µl/ml. Compte tenu de l'efficacité de ces mélanges d'huiles sur la croissance du pathogène, ils devraient ultérieurement être testés sur mangues afin de s'assurer de leur aptitude à préserver leur qualité sanitaire et organoleptique.

Mots-clés : Pathologies de post-récolte, mangue, huiles essentielles, activité antifongique, *C. gloeosporioides*

SUMMARY

Mangoes sold in Dschang town (Cameroon) are infected by four pathogenic fungi which are: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis guepinii* and *Rhizopus nigricans*. Essential oils from dry seeds of *Piper guineense* (P) and *Monodora myristica* (M) gave yields of 3.58 % and 2.18 % respectively. The effectiveness of these oils and their mixtures in the *in vitro* radial growth of *C. gloeosporioides* (causal agent of anthracnose) showed that the mixture P/M (90/10), P/M (75/25), P/M (50/50) and P/M (25/75) were more effective with respective percentage inhibition (%I) of 92, 89, 86 and 80 %. *M. myristica* oil (%I=30%) was least effective. *P. guineense* oil (%I= 57 %) and the mixture P/M (10/90) (%I=70 %) showed average effectiveness. The mixture P/M (90/10), P/M (75/25), P/M (50/50) and P/M (25/75) and the *P. guineense* oil showed fungistatic effects against *C. gloeosporioides* at the concentration of 20 µl/ml. Base on the effectiveness of these mixtures on the growth of the pathogen, these oils could be later tested for a phytosanitary protection of mangoes in order to preserve its physical and organoleptic quality.

Keywords: Post harvest diseases, mango, essential oil, antifungal activity, *C. gloeosporioides*

INTRODUCTION

La mangue fraîche, comme fruit dessert, occupe une place de choix dans les repas des Hommes de part le monde en raison de ses qualités diététiques et énergétiques établies (Rice et *al.*, 1990). De nos jours, au regard de la pression démographique galopante, il est certain que sa production et son commerce continueront à se développer dans l'avenir (AFFI, 2000). Cependant, la production et la commercialisation de ce fruit se heurtent à une maladie fongique, l'antracnose causée par *C. gloeosporioides*. Cette pathologie se caractérise par la présence sur les fruits malades des taches noires pouvant s'agrandir par coalescence en temps humide et devenir légèrement déprimées ; elles sont le plus souvent groupées près du pédoncule. Elle cause d'importants dégâts sur les feuilles, les fleurs et sur les fruits ; lorsque les conditions climatiques lui sont favorables, le pathogène peut détruire toute la floraison et compromettre la fructification. Les attaques survenues avant la maturité des fruits, peuvent provoquer l'apparition des crevasses noires sur le péricarpe. Les pertes de rendements atteignent 90 et 100 % selon les variétés et l'état phénologique des arbres ; elles peuvent atteindre 100 % lorsqu'en champs, sur les variétés sensibles, la récolte ne s'opère pas suivant les règles de l'art. Les dégâts causés au cours de la conservation peuvent atteindre 90% sur les lots non contrôlés (Laroussilhe, 1980). Diverses méthodes de lutte contre l'antracnose existent ; la méthode la plus utilisée est la lutte chimique qui recommande préférentiellement des fongicides de synthèse à base de cuivre. Plus récemment, le captafol, le manèbe et le bénomyl ont été recommandés pour leurs effets fongistatiques vis-à-vis de la maladie sur fruits entreposés aux concentrations respectives de 0,04 ; 1 et 20µg/ml (Daykin et *al.*, 1984) Toutefois, bien que relativement efficace, l'utilisation de ces produits chimiques pose très souvent le problème de résidus de pesticides sur les récoltes et sont responsables d'une toxicité à long terme sur les organes de la plante et sur les consommateurs (Fournier, 1988). Dans le cadre de ce travail dont le but est de lutter contre l'antracnose de la mangue, il a été envisagé d'utiliser des substances naturelles des plantes telles que les huiles essentielles pour évaluer leur efficacité *in vitro* contre *C. gloeosporioides*. Le caractère inoffensif de ces substances naturelles ayant été établi (Valnet, 1980).

MATERIELS ET METHODES

Préparation du milieu de culture

La culture des cryptogames ainsi que le test de la bioefficacité des huiles ont été faits sur le milieu de culture PDA. Pour sa préparation, 200 g de pomme de terre ont été pelées, lavées, découpées en tranches et mises à ébullition dans 1 L d'eau distillée pendant 1 h. Cette préparation a été ensuite filtrée, puis 20 g d'Agar et 15 g de Dextrose y ont été ajoutés. Après homogénéisation, le volume a été complété à 1 L (Smith & Agnes, 1983). Le milieu ainsi préparé a été supplémenté de deux gélules de chloramphénicol (2 x 250 mg) puis réparti dans des flacons de 30 ml à raison de 20 ml de milieu par flacon préalablement à leur stérilisation à l'autoclave (marque Georjin) à 121°C pendant 15 min (Smith & Agnes, 1983).

Isolement et identification des microorganismes

Les fruits atteints d'antracnose (Figure 1) ont été désinfectés superficiellement à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 90° sous la hotte microbiologique près de la flamme du Bec Bensen. Les fragments de tissus ont été ensuite prélevés à l'aide d'un scalpel au niveau des jeunes lésions et déposés aseptiquement sur le milieu PDA coulé dans des boîtes de Pétri.



Figure1 : Symptômes d'antracnose sur mangues a : stade juvénile, b : stade avancé
Figure 1: Anthracosis symptoms on mangoes a : young stage, b : advanced stage

L'incubation des boîtes ainsiensemencées a été faite à la température du laboratoire (20-22°C) pendant 10 jours. Le mycélium développé à la périphérie des fragments de tissus a été prélevé et repiqué aseptiquement de manière individuelle dans de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu PDA frais. Après plusieurs repiquages successifs, les cultures pures de champignon ont été obtenues puis conservées sur milieu PDA. L'identification des cryptogames a été réalisée à l'aide d'un microscope de marque Olympus BH-2 en s'appuyant sur les techniques usuelles d'identification (Alexopoulos & Mims, 1979 ; Barnett & Hunter 1972).

Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites à partir des graines sèches de *P. guineense* (Figure 2) et de *M. myristica* (Figure 3) par la technique d'hydro distillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Ciulei, 1980).



Figure 2 : Graines sèches de *P. guineense*

Figure 2 : Dried grains of P. guineense



Figure 3 : Graines sèches de *M.*

Figure 3 : Dried grains of M. myristica

A cet effet, pour chaque espèce, 2 Kg de graines ont été déulpés, broyées, pesées et introduites dans la cocotte. Ensuite, 6 litres d'eau propre y ont été ajoutées et l'ensemble porté à l'ébullition au moyen d'une plaque chauffante pendant 8 heures. Au cours du chauffage, la vapeur monte et se condense au niveau du réfrigérant puis, les gouttelettes qui se forment tombent dans le décanteur où il se différencie deux phases : l'une, inférieure, est aqueuse et l'autre, supérieure, est organique (huile recherchée). L'huile recueillie a été séchée sous une colonne de sulfate de sodium anhydre.

Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles contre *C. gloeosporioides*

Le choix porté sur *C. gloeosporioides* repose sur le fait qu'il représente le principal parasite responsable de l'antracnose. C'est l'agent causal de la maladie. Le milieu stérilisé a été coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre préalablement stérilisées au four Pasteur (marque Thénod) pendant 120 min à 140°C. L'évaluation de l'activité antifongique des huiles a porté sur deux aspects à savoir :

- **Inhibition de la croissance radiale de *C. gloeosporioides***

La méthode utilisée a été celle de dispersion en milieu solide. L'huile a été dispersée dans le milieu grâce au tween 20 qui joue le rôle de tensioactif. L'effet du tween a été préalablement testé afin de s'assurer de son innocuité vis-à-vis du pathogène. Des dilutions d'huiles ont été préparées à partir d'une solution mère de concentration 400µl/ml de milieu. Les concentrations testées ont été de 0, 2.5, 5, 10 et 20µl/ml. Pour chaque concentration, trois répétitions ont été effectuées. Les différents mélanges d'huiles (v/v) ont été préparés à partir de différents volumes prélevés dans la solution mère de *P. guineense* et de *M. myristica*. Après solidification du milieu, un explant de mycélium a été prélevé au front de croissance d'une culture pure âgée de 10 j à l'aide d'un emporte pièce de 5 mm de diamètre, puis déposé aseptiquement au milieu de chacune des boîtes de Pétri supplémentées ou non en huile essentielle. Ces boîtes ont été incubées à la température ambiante pendant le temps nécessaire pour que le champignon colonise toute la boîte. Le témoin a étéensemencé sur un milieu dépourvu d'huile. La croissance mycélienne (C) a été évaluée en mesurant tous les

jours et à la même heure deux diamètres orthogonaux (d_1 et d_2) tracés au revers des boîtes de Pétri. $C = \frac{1}{2}(d_1 + d_2) - d_0$ où C est la croissance mycélienne journalière, d_1 et d_2 les diamètres de croissance mycélienne, d_0 le diamètre de l'emporte pièce (Singh et al., 1993). L'expérience a été reprise trois fois. Les pourcentages d'inhibition (%) ont été calculés afin de comparer la croissance obtenue sur milieu supplémenté en huile avec le témoin. $\%I = 100 \times D_t / (D_t - D_x)$ avec D_t , le diamètre de croissance du témoin et, D_x , le diamètre de croissance de la colonie fongique sur milieu supplémenté en huile essentielle (Singh et al., 1993).

- **Toxicité des huiles essentielles**

L'évaluation de la toxicité a consisté à voir si l'inhibition de la croissance mycélienne observée s'accompagne d'un effet fongicide ou fongistatique de l'huile. A cet effet, les explants de mycélium dont l'inhibition de la croissance a été totale sur milieu PDA supplémenté en huile essentielle ont été repris et déposés aseptiquement sur le milieu PDA frais. Ainsi, l'activité de l'huile est dite fongistatique s'il y a reprise de la croissance fongique et fongicide dans le cas contraire (Pandey et al., 1982; Kishore et al., 1993).

Analyse des données

Les pourcentages d'inhibition moyenne pour chaque huile et mélange d'huile et pour chaque concentration ont été comparés à l'aide du test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité de 5%.

RESULTATS

Isolement des microorganismes

Sur la base des caractéristiques des fructifications sur milieu PDA, divers champignons phytopathogènes attaques les mangues après récolte parmi eux quatre espèces ont été identifiées dont :

Colletotrichum gloeosporioides (Mélanoconiales) : les cultures pures âgées de 12 jours révèlent un mycélium blanchâtre, à conidiophores simples, droits et cloisonnés. Les conidies incolores, solitaires et unicellulaires sont allongées et possèdent à leurs extrémités deux gouttelettes (renflements transparents) (Figure 4).



Figure 4 : Conidies et conidiophores de *C. gloeosporioides* (X400)

Figure 4 : Conidia and conidiophores of *C. gloeosporioides* (X400)

Pestalotiopsis guepinii (Mélanoconiales) : sur des cultures pures âgées de 12 jours, le mycélium est blanc et aurolé de place en place par un miellat noirâtre (acervules). Les conidiophores sont simples et courts. Les conidies fusiformes sont tricellulaires, de couleur jaune-doré ; leur extrémité supérieure est prolongée par trois filaments simples ou appendices tandis que le côté opposé, plus effilé est incolore et se termine par un seul filament (Figure 5).



Figure 5 : Conidies de *P. guepinii* (X400)

Figure 5 : Conidia of *P. guepinii* (X400)

Botryodiplodia theobromae (Sphaeropsidales) : sur milieu PDA, la croissance est relativement lente. Les cultures pures de 16 jours montrent un mycélium brun foncé et compact adhérent sur le milieu de culture. Les conidies sont bicellulaires, ovoïdes et de couleur marron (Figure 6).



Figure 6 : Conidies de *B. theobromae* (X400)

Figure 6 : Conidia of *B. theobromae* (X400)

Rhizopus nigricans (Mucorales) : sur des cultures âgées de 12 jours, le mycélium siphonné et soyeux est de couleur brunâtre, très envahissant et porte à maturité des sporocystes de couleur noire. Les spores produites sont très nombreuses et de petites taille (Figure 7).



Figure 7 : Sporangies et sporangiophores de *R. nigricans* (X400)

Figure 7 : Sporangia and sporangiophores of *R. nigricans* (X400)

Au terme de l'isolement des cryptogames, *C. gloeosporioides* a été le parasite le plus fréquemment isolé suivi de *R. nigricans* (Tableau 1).

Tableau 1 : Fréquence d'isolement des microorganismes

Table 1 : Isolation frequency of microorganisms

| Microorganismes | <i>C. gloeosporioides</i> | <i>P. guepinii</i> | <i>B. theobromae</i> | <i>R. nigricans</i> |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| Fréquence d'isolement | 0,60 | 0,09 | 0,12 | 0,19 |

Extraction des huiles essentielles

L'hydrodistillation des graines sèches de *M. myristica* et de *P. guineense* montre que la couleur, l'odeur de l'huile et le rendement de l'extraction varient en fonction de l'espèce végétale ; *M. myristica* a offert le rendement le plus élevé (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques physiques des huiles essentielles de *M. myristica* et de *P. guineense*

Table 2 : Physical characteristics of essential oils of *M. myristica* and *P. guineense*

| Espèce épicee | Couleur | Parfum | Rendement (%) |
|---------------------|-------------|-----------------------|---------------|
| <i>P. guineense</i> | Brunâtre | Piquant et aromatique | 2,18 |
| <i>M. myristica</i> | Jaune clair | Légèrement parfumé | 3,58 |

Effet des huiles et mélanges d'huiles sur la croissance radiale de *C. gloeosporioides*

Les huiles testées ainsi que leurs mélanges ont exercés des effets dépressifs variables sur la croissance radiale du pathogène. Pour chaque huile et mélange d'huile, l'effet est d'autant plus marqué que la concentration est élevée. Toutefois, les huiles essentielles pures ont moins réduit le diamètre des colonies fongiques comparativement aux mélanges (Tableau 3).

Tableau 3 : Diamètre moyen des cultures de *C. gloeosporioides*, 12 jours après inoculation

Table 3 : Mean diameter of *C. gloeosporioides* cultures, 12 days after inoculation

| Huile essentielle | Diamètre moyen (mm) pour | | |
|---------------------|--------------------------|----------|----------|
| | 0 µl/ml | 10 µl/ml | 20 µl/ml |
| <i>P. guineense</i> | 88± 1,90 | 51± 2,11 | 0 |
| <i>M. myristica</i> | 88± 1,90 | 26± 4,02 | 20± 3,23 |
| P/M (90/10) | 88± 1,90 | 82± 2,20 | 0 |
| P/M (75/25) | 88± 1,90 | 79± 3,66 | 0 |
| P/M (50/50) | 88± 1,90 | 77± 1,85 | 0 |
| P/M (25/75) | 88± 1,90 | 72± 1,04 | 0 |
| P/M (10/90) | 88± 1,90 | 63± 3,12 | 12± 2,13 |

Par ailleurs, l'huile de *M. myristica* a été la moins efficace dans l'inhibition de la croissance radiale de *C. gloeosporioides* ; les différences d'activité antifongique entre cette huile et les mélanges d'huiles sont hautement significatives ($p < 0,0001$). Les huiles les plus efficaces dans l'inhibition de la croissance du pathogène ont été les mélanges P/M (25 /75), P/M (50 /50), P/M (75 /25) et P/M (90 /10). Toutefois, il faut noter que l'huile pure de *M. myristica*, bien que très peu active (%I = 29,5), lorsqu'elle est mélangée à celle de *P. guineense* augmente l'efficacité de cette dernière; plus sa proportion est faible dans le mélange, plus ce mélange est efficace (Tableau 4).

Tableau 4 : Influence des huiles essentielles et de leurs mélanges sur la croissance radiale de *C. gloeosporioides*

Table 4 : Influence of essential oils and their mixture on the radial growth of *C. gloeosporioides*

| Traitement | Huile essentielle | % I (à 10 µl/ml) |
|------------|---------------------|------------------------------|
| 1 | P/M (90 :10) | 91,55 ± 09,62 a ^z |
| 2 | P/M (75 :25) | 89,33 ± 10,20 a |
| 3 | P/M (50 :50) | 85,81 ± 12,50 a |
| 4 | P/M (25 :75) | 80,07 ± 14,63 a |
| 5 | P/M (10 :90) | 70,14 ± 16,12 b |
| 6 | <i>P. guineense</i> | 57,26 ± 15,20 b |
| 7 | <i>M. myristica</i> | 29,52 ± 28,39 c |

^z : Les moyennes affectés de la même lettre n'ont pas d'activité antifongique statistiquement différentes au seuil de probabilité $p < 0,05$. Les données de la dernière colonne représentent les valeurs moyennes des pourcentages d'inhibition par rapport au témoin ± l'erreur standard sur la moyenne de 3 mesures.

Toxicité fongique des huiles

En dehors de l'huile de *M. myristica* et du mélange P/M (10 /90) qui ont favorisé la croissance du pathogène à la concentration de 20 µl/ml, toutes les autres huiles ont inhibé totalement la croissance du champignon à cette concentration. Par ailleurs, lorsque les explants à croissance mycélienne nulle ont été prélevés et repiqués sur le milieu PDA dépourvu d'huile, tous ont repris leur croissance. L'observation microscopique de cette végétation fongique a révélé qu'il s'agissait des filaments mycéliens de *C. gloeosporioides*.

De ce fait, l'huile de *P. guineense* et les mélanges P/M (25 /75), P/M (50 /50), P/M (75 /25) et P/M (90 /10) ont des effets fongistatiques vis-à-vis de ce pathogène à la concentration de 20µl/ml.

DISCUSSION & CONCLUSION

Les résultats sur la pathologie post- récolte des mangues se rapprochent de ceux de Laroussilhe (1980) obtenu en Inde. Toutefois, de petites nuances existent, notamment sur *P. guepinii* et *R. nigricans* qui n'avaient pas été cités. Les points de convergence reposent sur *C. gloeosporioides* (agent de l'antracnose) et sur *B. theobromae* (agent de la pourriture péri pédonculaire). Cette similitude dans la pathologie des mangues serait liée aux conditions climatiques favorables aux attaques fongiques et presque identiques qui prévalent dans ces pays (Floride, Inde et Cameroun) appartenant tous à la zone intertropicale (Rice et al., 1990). Les huiles essentielles utilisées, ayant toutes la caractéristique d'être comestibles (Valnet, 1980) ont présenté des rendements d'extraction très élevé par rapport à ceux de nombreuses autres plantes telles que : *Laggera gracilis* (feuilles : 0,2 %) (Mishra & Dubey, 1992) et *Erigeron floribundus* (feuilles : 0,9 %) (Amfo, 2000). Cette tendance laisse penser à une possibilité de leur exploitation, notamment en agroalimentaire, en parfumerie et en phytopharmacie. L'inhibition de la croissance radiale de *C. gloeosporioides* par les huiles essentielles pures et leurs mélanges a varié selon le type d'huile et en fonction des concentrations testées. En effet, à concentration égale, on note des différences d'activité hautement significative ($p < 0,0001$) entre *M. myristica* et *P. guineense* par exemple, tandis qu'elles sont nulles ($p=1$) entre les mélanges P/M (90 /10) et P/M (75 /25). Ces différences d'activité des huiles vis-à-vis de *C. gloeosporioides* pourrait être attribuées à leurs différences dans la composition chimique. En effet, il est établi que certains constituants des huiles essentielles peuvent influencer positivement sur l'activité globale de celles-ci ; c'est le cas par exemple du limonène, isolé des feuilles de *Citrus limon* qui s'est révélé très actif sur *C. gloeosporioides* isolé des avocats atteints d'antracnose (Atoundem, 1999). Aussi, convient-il de signaler que les effets antifongiques des huiles essentielles sont très souvent liés à des actions simultanées de leurs constituants (Valnet, 1980). Le fait que tous les mélanges se sont révélés plus actifs que les huiles essentielles pures nous laisse penser à l'existence d'une complémentarité d'action qui existerait entre les différents constituants présents dans ces mélanges. L'activité des mélanges P/M (90 /10, %I= 91,55) et P/M (75 /25, %I= 89,33) a été plus élevée contre *C. gloeosporioides* comparativement à celle de l'essence de *Cinnamomum camphora* qui inhibe la croissance du même pathogène à 70 % à la concentration de 4µg/ml (Mishra & Dubey, 1992). Cette étude montre qu'après récolte, la mangue commercialisée à Dschang est un fruit sensible à quatre principaux champignons phytopathogènes qui sont : *C. gloeosporioides*, *P. guepinii*, *B. theobromae* et *R. nigricans*. L'huile pure de *P. guineense* et les mélanges d'huile P/M (25 /75), P/M (50 /50), P/M (75 /25) et P/M (90 /10) devraient davantage être étudiés en vue de leur exploitation pour la lutte contre l'antracnose.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les responsables des laboratoires de Phytopathologie et de Biochimie de l'Université de Dschang pour leur soutien matériel dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

African Fruit Fly Initiative (AFFI), 2000. *Fruits de qualité pour l'Afrique. Réseau africain de la mouche des fruits*, 5 p.

Alexopoulos C. J. & Mims C. W., 1979. *Introductory Mycology*, 3rd Ed. John Wiley & Sons, New York, 240p.

- Amfo T. A., 2000. Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles et des fleurs de *Erigeron floribundus* L. et de *Laggera pterodonta* Sch. Bip. (Asteraceae). Mémoire de Maîtrise de Biochimie. Université de Dschang, 32 p.
- Atoundem K. B., 1999. Contribution à l'évaluation de l'activité antifongique de quelques huiles essentielles des plantes du genre Citrus (Rutaceae). Mémoire de Maîtrise de Biochimie. Université de Dschang, 34p.
- Barnett H. L. et Hunter B. B., 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd edition. Burgess Publishing Company. Pp 180-200.
- Ciulei I., 1980. *Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. Practical manual on the industrial utilization of medicinal and aromatic plants*. Arta Grafica, Bucharest, Romania, 420 p.
- Daykin M. E. et Milholland R. D., 1984. Ripe rot of muscadine grape caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and its control. *Phytopathology* (74): 710-714.
- Laroussilhe F., 1980. *Le Manguier. Techniques agricoles et productions tropicales*. G. P. Maisonneuve & Larose, Paris 5^e, 305 p.
- Fournier J., 1988. *Chimie des pesticides*. Agence de coopération culturelle et technique, Paris. Pp 25-39.
- Kishore N. Mishra A.K. et Cham Souria J.P.N., 1993. Fungitoxicity of *Thevetia peruviana* (Yellow oleander) and *Pulmeria alba* (White frangipani) Riv. Ital. *Sostanza Grasse* 67: 635-637.
- Pandey D.K. Chandra H. and Tripathi N.N., 1982. Volatile fungitoxicity activity in higher plants special reference to that of *Callistemon lanceolatus* D. C. *Phytopathology* 105: 175-182.
- Mishra A. K. et Dubey N K., 1992. Evaluation of some essential oils from their toxicity against fungi causing deterioration of stored food communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4): 1101-1105.
- Rice R. P. Rice L. W. et Tindall H. D., 1990. *Fruit and vegetable production in warm climates*. The Mc Millian Press LTD. London and Basingstone. pp 80-91.
- Singh G. Padhvay R.K., Narayaman G.S., Padmkumari K.P. and Rao G.P., 1993. Chemical and fungitoxic investigation on the essential oil of Citrus Pers. Z. *Deutsche Zeits half fur Pflangenfrankenenen und flanzenschultz* 100: 69-74.
- Smith D. & Agnes H. S., 1983. *The preservation and maintenance of living fungi*. Commonwealth Mycological Institute. pp 34-39.
- Valnet J., 1980. *Aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes*. 9^e édition, Maloine. pp 31-115

**ANTIMICROBIAL AND ANTIOXYDANT ACTIVITIES OF ARTEMISIA HERBA ALBA
ASSO. EXTRACTS**

R. BELHATTAB & L.AMOR

Department of Biology, faculty of Sciences, University F.A., Setif 19000, Algeria
rbelhat@yahoo.fr

SUMMARY

Extracts from aerial parts of *Artemisia herba-alba* Asso (Asteraceae) were obtained by maceration in distilled water and by exhaustive extraction with acetone in Soxhlet apparatus. The extracts were tested against Gram- and Gram+ bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 as well as against moulds such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium sp.* and *Fusarium sp.* Among the bacteria tested *S.aureus* was the most sensitive to aqueous and organic extracts with minimal inhibitory concentrations (MICs) of 200 mg/ml and 111mg/ml respectively. However, for the moulds, the lowest MIC 83 mg/ml was observed with organic extract against *Fusarium sp.* The antioxidant activity evaluated with the test using the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical showed an IC₅₀ of the aqueous and organic extracts 236,6 µg/ml and 331 µg/ml respectively and that of the positive control butylated hydroxyanisole (BHA) 81,5 µg/ml.

Key words: *Artemisia herba-alba*, antimicrobial activity, antioxidant activity, aqueous extract, organic extract.

RÉSUMÉ

Les extraits des parties aériennes de *Artemisia herba-alba* Asso (Asteraceae) sont obtenus par macération dans l'eau distillée et extraction exhaustive au Soxhlet par l'acétone. Les extraits sont testés sur des bactéries Gram- et Gram+, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et aussi sur des moisissures telles que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium sp.* et *Fusarium sp.* Parmi les bactéries testées, *S.aureus* était la souche la plus sensible aux extraits aqueux et organique avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 200 mg/ml et 11mg/ml respectivement. Cependant, pour les moisissures, la plus faible CMI 83 mg/ml a été observée sur *Fusarium sp* avec l'extrait organique. L'activité antioxydante évaluée par le test utilisant le radical stable 1,1 diphenyl-2-dipicrylhydrazyl (DPPH) a montré des CI₅₀ de 236,6 µg/ml et 331 µg/ml des extraits aqueux et organique respectivement alors que celle du control positive Hydroxyanisole butylé (BHA) était de 81,51 µg/ml.

Mots-clés : *Artemisia herba-alba*, activité antimicrobienne, activité antioxydante, extrait aqueux, extrait organique.

INTRODUCTION

The genus *Artemisia*, widespread over the world, belongs to the *Asteraceae* family (Salido *et al*, 2003). According to Quezel and Santa (1963), 11 spontaneous *Artemisia* species are present in the Algerian flora. *Artemisia herba-alba* Asso commonly known as the desert wormwood (Arabic name chih) is dwarf shrub growing wild in the arid and semiarid regions and in dry mountains (Neffati *et al*, 2008). The plant is perennial, strongly aromatic herb, greenish-silver with many basal, erect and leafy stems covered by woolly hairs (Dob *et al*, 2006; Hudaib and Aburjai, 2006).

Numerous studies in the literature have reported the traditional uses of *Artemisia* species in folk medicine. It is mainly used as antidiarrheic and antispasmodic and other common uses such as digestive troubles and gastric ulcer by the local population (BabaAissa, 1999 ; Neffati *et al*, 2008).

To overcome the side effects of antimicrobial chemicals and the resistance developed by microorganisms and in order to avoid oxidative damage caused by reactive oxygen/nitrogen species, there has been increasing interest to natural sources of antimicrobial and antioxidant of plant origin (Kim *et al*, 2003). Antimicrobial and antioxidant properties of numerous plants have been established to be due, at least partially, to their essential oils (Saleh *et al*, 2006; Kim *et al*, 2003). Investigations on the non volatile fractions of *A.herba-alba* revealed the presence of several secondary metabolites mainly sesquiterpene lactones and flavonoids in the aerial parts of the plant (Saleh and Jäger, 2005 ; Tan *et al*, 1999).

This work has been carried out on the aerial parts of *A.herba-alba* collected in Setif region of Algeria. Antimicrobial and antioxidant activities are reported for the aqueous and organic extracts from this plant.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts (leaves, flowers, stems) of *A.herba-alba* were collected in Setif region of Algeria in summer 2008. The plant material was air dried and stored at room temperature in the dark until use. The plant was authenticated and voucher specimen has been deposited in the herbarium of the Department of Biology, F.A University of Setif (Algeria).

Extraction

Powdered plant material was subjected to exhaustive extraction with acetone using a Soxhlet apparatus. The extract obtained was evaporated to dryness in a rotary evaporator (Büchi) to yield 7,5% (w/w). Aliquots were dissolved in the appropriate solvent for subsequently use (Belhattab *et al*, 2004). The aqueous extract was prepared according to Tadeq *et al*, (2005). Briefly, 50g of the ground plant material were macerated in 250 ml distilled water by shaking over night. The procedure was repeated three times and the filtrates were concentrated under reduced pressure to afford 15% yield (w/w).

Antimicrobial activity

Antibacterial activity: To assess the antimicrobial activity, three bacterial strains (Gram- and Gram+) were used. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Stock cultures were grown on Mueller-Hinton agar medium at 37°C for 18-24 h before the test. The inoculum used for all the assays reached the microbial density 10^6 - 10^8 CFU/ml dimethyl sulfoxid (DMSO). Filter paper disks (Whatman 6mm in diameter) impregnated with 10 µl of each dilution of the plant extract were deposited onto agar plates. After 24 hours incubation at 37°C the diameter of the clear zone around the disks was measured.

Antifungal activity: For this test, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium sp.* et *Fusarium sp.* isolated from cereals and maintained in the Microbiology laboratory, Setif University, were used. A seven days mould cultures on potato dextrose agar (PDA) were used for the test. The spores were harvested from the colonies and suspended in 0,1% tween 80 solutions. The concentrations were adjusted to 10^5 - 10^7 spores/ml using a Malassez cell. 100 µl of each solution were seeded on Petri dishes containing PDA medium,

then 6 mm diameter disks (Whatman) wetted with gradual concentrations of extracts (dissolved in DMSO) were deposited on the medium. After 72 hours incubation at 28°C the halo diameter round the disk was measured.

Gentamycine and carvacrol were used as positive controls, whereas DMSO and distilled water as negative controls.

Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) was performed using gradual dilutions of the extracts. The MIC corresponds to the highest concentration for which no effect was observed.

Antioxidant activity

The estimation of antiradical activity was conducted using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl DPPH test. Briefly, 4mg DPPH (Sigma) were dissolved in 50 ml methanol (to obtain a final concentration 4mM), and 1ml aliquot was added to 1ml of extract in methanol. The samples and positive control, BHA, were diluted with methanol to prepare final concentrations in a range of 50 to 400µg/ml (Kim *et al*, 2003; Yildirim *et al*, 2004). After incubation for 30 min in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 515 nm, and the percentage of radical scavenging activity was calculated according to the equation: $[1 - (A \text{ sample}/A \text{ control})] \times 100$, where A sample is the absorbance of the test compounds and A control is the absorbance of the control reaction (containing all of the reagents except the test compounds). Series of dilutions of aqueous and organic extracts give the following curves equations : $y= 2,1491x-0,8485$; $R^2= 0,9934$ and $y=1,1539x+11,805$; $R^2= 0,9971$ respectively. BHA was used as positive control.

Each assay was repeated three times and the average result and standard deviations calculated.

RESULTS

Antimicrobial activity

A series of gradual dilutions of aqueous and organic extracts prepared in DMSO were used to assess the antimicrobial activities. The diameter of the clear zone round the disk was dose dependant (Table I). The minimal inhibitory concentrations (MICs) were then determined (Table II). According to the results obtained, *S.aureus* (Gram+) is more sensitive (MICs 200mg/ml and 111mg/ml) than *E.coli* (Gram-) (MICs 285 mg/ml and 142 mg/ml) to aqueous and organic extracts respectively, however *P.aeruginosa* was resistant to both extracts.

Gentamycine, a positive control exhibited the same effect on *E.coli* and *S. aureus*. Therefore, *P.aeruginosa* remains more resistant (Table II).

When tested against fungi aqueous extract developed the same effects against *A.niger*, *A.flavus* and *Penicillium sp.* with a MIC estimated at 200mg/ml. However, *P.italicum* and *Fusarium sp.* were more sensitive with 285 mg/ml as MICs values. The organic extract was more effective against *Fusarium sp.* (MIC 83mg/ml) and *A.niger* (MIC 142 mg/ml). The remaining tested fungi were less sensitive (MICs 200mg/ml). Carvacrol, as a positive control, exhibited the lowest MICs (Table II).

Table I: Growth inhibition zones of microorganisms in millimeters \pm standard deviation of *A. herba-alba* extracts.
 Zone d'inhibition de la croissance des microorganismes en millimètre \pm déviation standard des extraits de *A. herba-alba*.

| microorganisms | Clear zone diameter (mm) | |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | Aqueous extract (1mg/ml) | Organic extract (0,5mg/ml) |
| <i>E.coli</i> | 8,66 \pm 0,50 | 10,3 \pm 0,57 |
| <i>P.aeruginosa</i> | Ne | Ne |
| <i>S.aureus</i> | 8,66 \pm 0,50 | 9,33 \pm 0,44 |
| <i>A.niger</i> | 15,00 \pm 0,33 | 10,66 \pm 0,66 |
| <i>A.flavus</i> | 12,50 \pm 0,50 | 11,66 \pm 0,33 |
| <i>P.italicum</i> | 10,00 \pm 0,66 | 8,33 \pm 0,66 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 10,33 \pm 0,33 | 11,00 \pm 0,00 |
| <i>Fusarium sp.</i> | 10,66 \pm 0,66 | 14,66 \pm 4,66 |

results are mean values of three replications \pm SD.

Ne= non effect

Table II: Antimicrobial activities of both *A.herba-alba* aqueous and organic dry extracts expressed as MICs (mg/ml) and positive controls, gentamycine and carvacrol (μ g/ml)
 Activités antimicrobiennes des extraits secs aqueux et organique de *A.herba-alba* exprimées en CMI (mg/ml) et de la gentamycine et du carvacrol, témoins positifs, (μ g/ml).

| | Aqueous extract | Organic extract | gentamycine | Carvacrol |
|------------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------|
| <i>E.coli</i> | 285 | 142 | 6,3 | Nd |
| <i>P. aeruginosa</i> | Ne | Ne | 12,5 | Nd |
| <i>S.aureus</i> | 200 | 111 | 6,3 | Nd |
| <i>A.niger</i> | 200 | 142 | Nd | 6,50 |
| <i>A.flavus</i> | 200 | 200 | Nd | 3,25 |
| <i>P.italicum</i> | 285 | 200 | Nd | 1,39 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 200 | 200 | Nd | 2,44 |
| <i>Fusarium sp.</i> | 285 | 83 | nd | 1,39 |

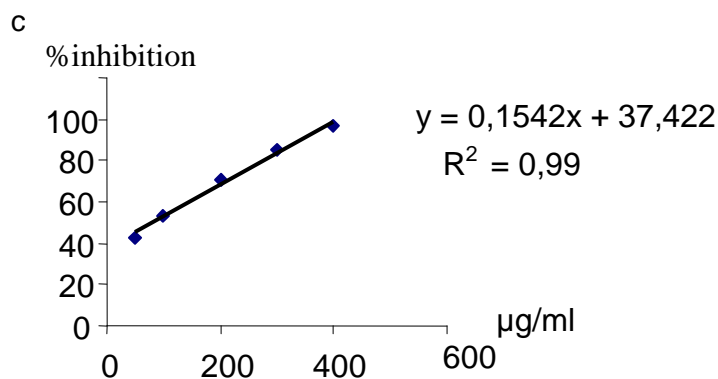
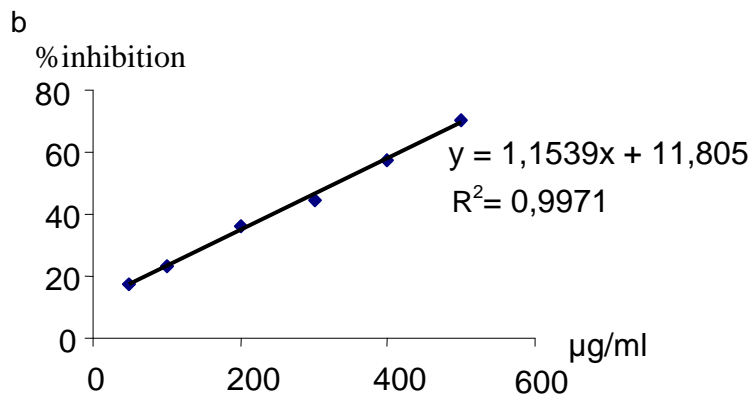
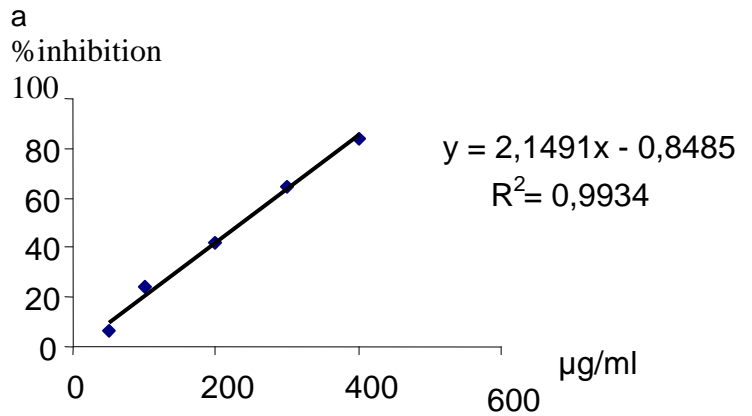
Ne= non effect

Nd= not determined

Scavenging activity to DPPH radical

The antiradical activities profiles show that both extracts have antiradical activities dose dependant (Figure 1).

Figure 1: Antiradical effects of *A.herba-alba* (a) aqueous extract, (b) organic extract and (c) positive control BHA expressed as percent inhibition
Effets antiradicalaires des extraits (a) aqueux, (b) organique de *A.herba-alba* et du (c) témoin positif BHA exprimés en pourcentage d'inhibition.



When compared, IC_{50} of aqueous and organic extracts were 236,6 µg/ml and 331 µg/ml respectively, whereas that of positive control, BHA, was 81,56 µg/ml (Tab. III).

Table III: Antiradical effect of *A.herba-alba* aqueous and organic extracts and positive control BHA on DPPH expressed as percent inhibition.
Effet antiradicalaire des extraits aqueux et organique de *A.herba-alba* et du témoin positif BHA sur le DPPH exprimés en pourcentage d'inhibition.

| extracts | Concentration (µg/ml) | | | | | |
|----------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| | 50 | 100 | 200 | 3000 | 400 | IC ₅₀ |
| Aqueous | 6,69 | 24,23 | 41,9 | 64,55 | 84,04 | 236,6 |
| Organic | 17,66 | 23,02 | 36,41 | 44,82 | 57,49 | 331 |
| BHA | 42,63 | 53,6 | 70,9 | 84,9 | 97 | 81,56 |

DISCUSSION

A susceptibility screening test using the disk diffusion method was employed to evaluate the *A.herba-alba* extracts against eight microorganismes of clinical and agricultural importance. These extracts have exhibited inhibition growth effect against gram- and gram+ bacteria except *P.aeruginosa*. It is noteworthy that these extracts are inhibitory to all the filamentous fungi tested and in particular the aflatoxinogenic strain *A.flavus*. The plant pathogen *Fusarium sp.* was more susceptible to organic extract than the spoilage organism *A.niger* (Table I).

Previous works reported that organic extracts from *Artemisia* species and their main constituent pinitol show antifungal properties when tested against pathogenic fungi namely *A.flavus* and *A.niger* (Tan et al, 1999).

The scavenging effect has been determined using the DPPH test, a stable free radical. A violet solution is obtained when DPPH is prepared in methanol. In this study, spectrophotometric scanning of the solution gave a maximum absorption at 515 nm. Reduction of this free radical gives rise to a yellowish solution. This reduction was concentration dependant (Figure 1). Works dealt with *Artemisia* essential oils exhibited weak antioxidant abilities to reduce DPPH radical (Lopes-Lutz et al, 2008).

The present data indicated that the two plant extracts had antioxidant activities. This activity, may partly, due to the presence of phenolic compounds such as flavonoids. Effectively, numerous studies have shown a correlation between the antioxidant activity and the total phenolic content when DPPH test is used (Beta et al, 2005). Acetone was chosen as a less polar solvent, often used to extract active phenolic constituents from plants (Dapkevicius et al, 1998; Exarchou et al, 2002; Belhattab et al, 2004). Thin layer chromatography verified the presence of phenolic compounds as quercetin (data not shown).

CONCLUSION

Extracts of *Artemisia herba-alba* may have value as biological control agent. On the other hand, the use of natural antioxidant from plant sources is receiving considerable attention, and the genus *Artemisia* may provide a number of potential compounds. However, this is the first record for *A.herba-alba* extracts as antimicrobial and antioxidants.

REFERENCES

- 1- BabaAissa F., 1991- Les plantes médicinales d'Algérie. Coédition Bouchéné et Addiwan, Alger, Algérie.
- 2- Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Boskou D., Exarchou V., 2004- Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *J.Food Agr. Environ.*, 2, 1, 69-73.
- 3- Beta T., Name S., Dexter J.E., Sapirstein H.D., 2005- Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chem.*, 82, 390-393.
- 4- Dapkevicius A, Venskutonis R., VanBeek T .A., Linssen J.P.H., 1998- Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J.Sci.,Food Agric.*, 77, 140-146.

- 5- Dob T., Benabdelkader T., 2006- Chemical composition of the essential oils of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *J.Essent.Oil Res.*, 18, 685-690.
- 6- Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanasis L.P., Troganis A., Boskou D., 2002- Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek origano, greek sage and summer savory. *J.Agr.Food Chem.*, 50, 5294-5299.
- 7- Hudaib M.M., Aburjai T.A., 2006- Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *J.Essent.Oil Res.*, 18, 301-304.
- 8- Kim K.S., Lee S., Lee Y.S., Jung S.H., Park Y., Shin K.H., Kim B-K., 2003- Antioxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *J.Ethnopharmacol.*, 85, 69-72.
- 9- Lopez-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., kolodziejczyk P. P., 2008- Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69, 1732-1738.
- 10- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P., 2005- Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.*, 89, 411-420.
- 11- Neffati A., Skandrani I., BenSghaier M., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K., Neffati M., Chraief I., Hammani M., Chekir-Ghedira L., 2008- Chemical composition, mutagenic and antimutagenic activities of essential oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *J.Essent.Oil Res.*, 20, 471-477.
- 12- Quezel P., Santa S., 1963- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris.
- 13- Saleh M.A., Belal M.H., El-Baroty G., 2006- Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae). *J.Environ.Sci.Health. Part B*, 41, 237-244.
- 14- Salah S.M., Jäger A .K., 2005- Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with in vitro GABA_A –benzodiazepine receptor activity. *J.Ethnopharmacol.*, 99, 145-146.
- 15- Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos J., Noguera M., Sanchez A., Cano E., 2003- Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem.Syst. Ecol.*, 32, 3, 265-277.
- 16- Tadag H., Mohammed A., Asres K., Gebre-Mariam T., 2005. Antimicrobial activities of some selected traditional ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J.Ethnopharmacol.*, 100, 168-175.
- 17- Tan R.X., Lu H., Wolfender J.L., Yu T.T., Zheng W.F., Yang L., Gafner S., Hostettmann K., 1999. Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Medica*, 65, 64-67.
- 18- Yildirim A., Cakir A., Mavi A., yalcin M., Fauler G., Taskesenligil Y., 2004- The variation of antioxidant activities and chemical composition of essential oils of *Teucrium orientale* L. var. *orientale* during harvesting stages. *Flav.Fragr. J.*, 19, 367-372.

**RECHERCHE DE BACTERIOCINES CHEZ DES *PSEUDOMONAS* RÉSISTANTES AUX
ANTIBIOTIQUES, ISOLEES DE LA RHIZOSPHERE DE LA POMME DE TERRE**

S. MEZAACHE, A. GUECHI

Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences,
Université de Sétif, Algérie
Email:mezaic2002@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Après isolement et identification de *Pseudomonas* de la rhizosphère de la pomme de terre par les méthodes classiques, l'étude de leur résistance a montrée qu'elles étaient multi résistantes à quelques antibiotiques (ATB) et métaux lourds (étudiés). Leur traitement à la ciprofloxacine a pratiquement éliminé cette résistance. Par ailleurs, des essais d'antagonisme par production de bactériocines avec des souches isolées du même site, ainsi qu'avec d'autres souches comme *E.coli* après induction par les rayons UV, a été fructueuse. D'autre part des souches caractérisées par leurs activités antifongiques vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes sont aussi douées d'une activité bactéricide.

Mots-clés : Bactéries, bactériocines, Pseudomonas, rhizosphère

SUMMARY

Bacteria isolated by classic methods from the rhizosphere of potato, were identified as *Pseudomonas*, and they were resistant to antibiotics and heavy metals. The treatment of these bacteria with ciprofloxacine suppresses the resistance to antibiotics and metals. Antagonism by production of bacteriocines tested against bacteria from the genus *Pseudomonas* and others such as *E.coli* after induction by UV was fructuous. Some isolates had also antifungal and bactericide activity.

Key words: Bacteria, bacteriocines, Pseudomonas, rhizosphere

INTRODUCTION

L'antagonisme entre les microorganismes est médié par les antibiotiques, enzymes lytiques, enterotoxines et bactériocines, ces dernières représentent la classe de facteurs bactériens défensive la plus abondante.

Les bactériocines sont définies comme composés protéiques produites par certaines souches (isolats) pour tuer d'autres souches étroitement liées (Riley et Wertz, 2002).

La production de bactériocines par les bactéries à Gram⁺ a été largement étudiée chez *Pseudomonas aeruginosa* et les entéro-bactéries, on retrouve fréquemment des isolats possédant ces bactériocines parmi les *Pseudomonas* spp. fluorescentes associées aux plantes. Et il a d'ailleurs été proposé que de telles souches pouvaient avoir un avantage compétitif dans la rhizosphère (Parret et De Mot, 2000; Parret et De Mot, 2002). La plus part des études menées ont été effectuées in vitro, et l'impact des bactériocines dans la survie des *Pseudomonas* spp. in situ reste largement inexplorée.

Dans notre étude, nous avons testé cette activité antagonique in vitro chez les bactéries fluorescentes de la rhizosphère parmi lesquels on retrouve des souches stimulant la croissance des plantes et produisant des antibiotiques.

MATERIEL ET METHODES

ISOLEMENT ET CULTURE

Les isolats utilisés ont été prélevés de la rhizosphère de la pomme de terre, sont mis en culture sur milieu King B (King, 1954), caractérisés pour leur résistances aux ATB appartenant à 6 classes chimiques différentes, et à certains métaux lourds. *Pseudomonas fluorescens* CHAO et *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 ont été offertes par Pr. Haas (Lausanne, Suisse). *E. coli* MC 4100, *Pseudomonas diminutus* and *Paracoccus paratrophus* proviennent de la collection du Dr. Jane Nicklin, School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London.

Les bactéries sont cultivées sur Luria Bertani (LB), Tryptone Soja Broth (TSB, Panreac Spain) à 28°C (Loper, 1988).

ANTAGONISME IN VITRO

Les souches de *Pseudomonas* spp. sont analysées pour la production de bactériocines décrite par Govan (1978) in Validov *et al.* (2005).

Chaque souche testée pour la production de bactériocines est étalée en une bande d'une largeur de 2 cm sur TSA (Tryptone Soja Agar). Après 18h à 28°C, les cellules sont irradiées à 254 nm pendant 1 min à une distance de 15cm, et reincubées à 28°C pendant 3h 30min. La couche de bactéries est alors raclée avec un coton tige saturée en chloroforme, les boîtes sont alors exposées aux vapeurs de ce dernier pour tuer les bactéries restantes. Des aliquotes de 15 µl d'une culture fraîche dans du TSB (souches indicatrices/sensibles) sont étalées perpendiculairement à la bande test.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les tests d'inhibition in vitro ont révélé que l'activité antagonique est distribuée « retrouvée » chez les souches produisant des substances de nature ATB tel que *Ps. fluorescens* CHAO, *Ps. aureofaciens* 30-84 et chez d'autres bactéries fluorescentes (isolats stimulant la croissance des plantes, data not shown, tableau 1).

Tableau 1. Antagonisme in Vitro entre les Pseudomonas fluorescents par production de bactériocines.

In vitro antagonism between fluorescent Pseudomonas by production of bacteriocines.

| Souches sensibles | Souches productrices | | | | | | |
|-------------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Ps. CHAO | Ps1 | Ps2 | Ps5 | Ps7 | Ps8 | Ps10 |
| 1 | + | - | - | - | - | - | - |
| 2 | + | - | - | - | + | - | + |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | + | + | - | - | + | - | + |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | + | - | - | + | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | + | + | + | + | - | - | - |
| E coli | ND | - | + | - | - | - | - |
| Ps. diminutus | ND | - | - | - | - | - | - |
| Micrococcus paratrophus | ND | - | - | - | - | - | - |
| Ps. 30-84 | + | - | - | - | - | - | - |

Ps: Pseudomonas

1,2....etc: numero des souches donné aux Pseudomonas isolées

PsCHAO et Ps30-84: *Pseudomonas fluorescens* CHAO et *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 respectivement. E.coli: *Escherichia coli*

ND:non déterminé ,+:activité bactericide,-:absence d'activité bactéricide

Validov *et al* (2005) ont par ailleurs rapporté, que les inhibitions dues a une activité antagonique in vitro étaient largement distribuées chez les Pseudomonas fluorescents produisant le phloroglucinol, et que parmi les 47 souches testées, seulement 11 pouvaient antagoniser avec une autre souche.

L'activité antagonique est distribuée parmi les différentes espèces du genre Pseudomonas isolées, on retrouve: *Ps. aureofaciens*(Ps2), *Ps. Fluorescens*(Ps5et7) et *Ps. Putida*(Ps10) qui interagissent entre elles (antagonisme mutuel entre les souches productrices). Pour la plus part des géotypes l'activité antagonique est positivement corrélé avec la capacité de tuer (Validov *et al.*, 2005).

A l'intérieur d'une même espèce des dizaines voir des centaines de bactériocines différentes sont produites (James *et al*, 1991; Riley et Gordon, 1992). Selon Klaenhammer (1988), 99% des bactéries produiraient au moins une bactériocine et la seule raison pour laquelle on ne les auraient pas mises en évidence, est que peu de chercheurs s'y sont intéressés. Les bactériocines ont une certaine fonction dans les communautés microbiennes, cette constatation vient du fait que la détection de la production de bactériocines est retrouvée chez toutes les lignées phénotypiques étudiées.

Cette compilation est le résultat d'une sélection positive et forte. Une théorie s'est développée et expliquant le rôle potentiel des bactériocines dans le maintien de la diversité microbienne dans une population et au niveau communautaire (Chao et Devin, 1981; Frank, 1994; Gordon et Riley, 1999; Kerr *et al*, 2002).

Les bactériocines des Pseudomonas ont été les plus caractérisées chez *Ps aeruginosa* où elles sont habituellement nommées pyocines (Michel – Briand et Baysse, 2002).

Les Ps fluorescents colonisant les racines, produisant des ATB sont les agents de biocontrôle les plus étudiés, et c'est ce qui en fait des PGPR (McSpadden Gardener *et al*, 2000).

La plus part des souches que nous avons tester antagonisent avec d'autres *Pseudomonas* fluorescents in vitro après induction par les rayons UV, et spécialement entre les souches productrices. Cette activité ne peut être due à la production d'ATB puisque la plus part des souches ont été précédemment évalué pour la production de substances antimicrobiennes en culture duelle avec des bactéries et des champignons, et une seule souche s'avère productrice d'ATB ayant une activité antifongique mais non antimicrobienne (souche 2 data not shown).

Aussi nous avons considéré que l'antagonisme comme trait phénotypique unique et qui pouvait être du à l'activité de plusieurs bactéries agissant en chœur (Parret et De mot, 2002). En fait des analyses génétiques (séquençage) de *Ps. fluorescens* ont indiqué que celle-ci avait le potentiel de produire plusieurs bactériocines (Parret et De mot, 2002).

Les bactériocines sont considérées comme des facteurs compétitifs entre les espèces (intra-espèces) qui peuvent aider des souches productrices à envahir de nouvelles niches écologiques et/ou de déloger des souches déjà installées (Riley et Gordon, 1999, Riley et Wertz, 2002). Cependant, outre les études in vitro, le rôle des bactériocines in vivo n'est pas encore élucidé (reste obscure)

Toute fois la production de bactériocines n'est cependant pas le facteur déterminant majeur dans la colonisation des racines (Validov *et al*, 2005). Mais nos résultats suggèrent qu'elles pourraient contribuer dans la compétition entre des *Pseudomonas* étroitement liées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chao L., Levin B.R., 1981 - Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *PNAS*, 78, 6324– 6328.
- Frank S., 1994 - Spatial polymorphism of bacteriocins and other allelopathic traits. *Evol. Ecol.*, 8, 369–386.
- Gordon M., Riley M.A., 1999 - A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny. *Microbiology*, 145, 655–661.
- Govan J.R.W., 1978 - Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Method Microbiol.*, 10, 61–91.
- James R., Lazdunski C., Pattus F., 1991 - Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. In: NATO ASI series, Springer-Verlag, New York, 519.
- Kerr B., Riley M.A., Feldman M., Bohannan B., 2002 - Local dispersal and interaction promote coexistence in a real life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418, 171–174.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E., 1954 - Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301-307.
- Klaenhammer T.R., 1988 - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337–349.
- Loper J.E., 1988 - Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology*, 78, 166–172.
- Michel – Briand et Baysse, 2002
- Parret A. H. A., De Mot R., 2000 - Novel bacteriocins with predicted tRNAse and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.*, 35, 472–473.
- Parret A. H. A., De Mot R., 2002 - Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends in Microbiology*, 10, 3, 107-112.
- Riley, M.A., Gordon, D.M. 1999 - The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.*, 7, 129 – 133.
- Riley M. A., Goldstone, C. M., Wertz. J. E., 2003 - A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J. Evol. Biol.*, 16, 690–697.
- Riley M. A., Wertz J. E., 2002 - Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 117–137.
- Riley M.A., 1998 - Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 32, 255–278.
- Riley M.A., Gordon D.M., 1992 - A survey of col plasmids in natural strains of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of col-plasmid lineages. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1345– 1352.

- McSpadden Gardener B.B., Schroeder K.L., Kaloger S.E., Raaijmakers J.M., Thomashow, L.S., Weller, D.M. 2000 - Genotypic and phenotypic diversity of pHID-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1939–1946.
- Validov S., Mavrodi O., De La Fuente L.; Boronin A.; Weller D.; Thomashow L., Mavrodi D., 2005 - Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett.*, 15, 242, 249-256.

DEVELOPPEMENT D'UN PRODUIT PHYTOSANITAIRE CONTRE *PECTOBACTERIUM atrosepticum*, BACTERIE MACERGÈNE DE LA POMME DE TERRE : DE LA RECHERCHE DE MOLECULES ACTIVES A L'APPLICATION *IN SITU*

A. CIROU ⁽¹⁻²⁾ et D. FAURE ⁽²⁾

(1) Comité Nord Plants de pommes de terre, 76110 Bretteville-du-Grand-Caux, France, amelie.cirou@isv.cnrs-gif.fr

(2) Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR2355, Avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France, denis.faure@isv.cnrs-gif.fr

RÉSUMÉ

Les bactéries macergènes du genre *Pectobacterium* sont responsables de dégâts importants lors de la culture et la conservation des tubercules de pomme de terre. Aujourd'hui, aucun traitement ne permet de lutter efficacement contre cette maladie. La virulence de *Pectobacterium* est régulée par *quorum-sensing* (QS), un système de communication entre bactéries reposant sur la production et la perception de molécules signal, les N-acyl homoserines lactones (NAHL). La stratégie de lutte contre *Pectobacterium* proposée consiste à stimuler *in situ* les populations bactériennes qui dégradent les signaux NAHL. Des molécules naturelles, biodégradables et capables de favoriser la croissance de bactéries dégradant les NAHL ont été identifiées et appelées biostimulants. Leur efficacité a été testée sur différents systèmes de production de plants de pommes de terre.

Mots-clés : lutte biologique, *Pectobacterium*, *quorum-sensing*, biostimulant, pomme de terre.

SUMMARY

Pectinolytic bacteria belonging to the genus *Pectobacterium* are responsible for important damages during the culture and storage of potato tubers. There is currently no treatment for controlling this plant disease. In *Pectobacterium*, virulence is regulated by a quorum-sensing communication pathway that relies upon the production and perception of, N-acyl homoserine lactones (NAHL) signal molecules. The proposed biocontrol strategy is based on the *in situ* stimulation of the bacteria community that naturally degrades NAHL. We identified two molecules, structurally related to NAHL, which show such activity. We called them biostimulants. The effectiveness of these molecules was assayed in different potato plant production systems.

Key words: biological control, *Pectobacterium*, quorum-sensing, biostimulant, potato.

INTRODUCTION

Les cultures de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et les tubercules en conservation sont soumis à l'attaque de nombreux pathogènes bactériens. Parmi ceux-ci on retrouve des bactéries des genres *Clavibacter*, *Ralstonia*, *Streptomyces* et *Pectobacterium*.

La perte de rendement due aux agents pathogènes s'établit autour de 4% en France et autour de 6% aux Pays-Bas. Dix à 15 % des pertes françaises sont dues à des phytopathogènes bactériens marcergènes (dont *Pectobacterium*), alors que cette bactérie est responsable de plus de 75% des pertes aux Pays-Bas (rapport de la FNPPPT, Paris, 2006) et probablement d'autant en Allemagne. En Europe, le montant des pertes dues à cet agent pathogène est estimé à 5% environ de la production totale de pomme de terre (incluant les productions de tubercules de plants, de consommation et de transformation). Ces pertes représentaient en 2006 un manque à gagner de l'ordre de 20 millions d'euros en France, et d'un peu plus de 200 millions d'euros en Europe. Au-delà de ces chiffres globaux, la détection des symptômes liés à *Pectobacterium* au-dessus des valeurs de tolérance (définies par les instances nationales et européennes) aboutit au déclassement de la production de l'ensemble de la parcelle ou du lot de tubercules incriminés, donc à une perte sèche pour l'agriculteur.

La lutte contre *Pectobacterium* implique jusqu'à présent l'utilisation de bactéricides non spécifiques. Les traitements cupriques autorisés, ou organo-mercuriels, interdits, sont peu efficaces sur *Pectobacterium* (Ordax et al., 2006) et affectent fortement l'environnement (Priou et Jouan, 1996). L'utilisation massive du cuivre peut en outre conduire à la sélection de déterminants de résistance au cuivre, souvent plasmidiques donc transférables à la microflore bactérienne, et parfois associés à des résistances aux antibiotiques (Silver, 1996), affaiblissant l'intérêt du recours à ces traitements pour des pathologies végétales sensibles au cuivre. Les traitements cupriques (sulfate de cuivre par exemple, seul traitement autorisé en agriculture biologique) peuvent représenter 20 à 100 kg (de cuivre métal) par an et par hectare. De plus, les symptômes causés par *Pectobacterium*, jambe noire et pourriture molle, favorisent les infections secondaires par des champignons opportunistes et pathogènes, encourageant ainsi l'apport d'autres biocides de type fongicides.

Chez *Pectobacterium*, l'expression des facteurs de virulences (enzymes de macération de la paroi pectocellulosique, et effecteurs de la mort cellulaire) dépend de la synthèse et de l'accumulation d'un signal bactérien de la classe des N-acyl homosérine lactones (NAHL) (Barnard et Salmond, 2007). Cette voie de régulation est appelée *quorum-sensing* (QS), car elle associe un nombre minimum de bactéries (*quorum*) à l'expression génique (Keller et Surette, 2006). Chez ces bactéries, l'expression des facteurs de virulence est conditionnée par le signal NAHL. En conséquence, tout procédé visant à limiter la production, l'accumulation ou la perception du signal NAHL conduira à l'affaiblissement de la virulence de *Pectobacterium*. Concrètement, il existe deux façons d'inactiver la régulation QS. La première vise à détruire les signaux NAHL, le plus souvent au moyen d'activités enzymatiques, telles que lactonases et amidohydrolases (Dong et Zhang, 2005; Uroz et al., 2003). La seconde implique l'utilisation de molécules dites QSI (*quorum-sensing inhibitors*), qui vont empêcher la reconnaissance du signal par leur récepteur moléculaire (Rasmussen et Givskov, 2006).

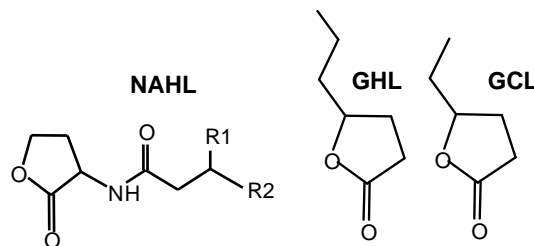
Le procédé novateur de bio-stimulation que nous proposons consiste en l'application de molécules biodégradables, les biostimulants, sur les cultures de plants de pomme de terre (Cirou et al., 2007 ; Faure et al., 2008). Les biostimulateurs favorisent dans la rhizosphère la croissance de bactéries indigènes naturellement capables de dégrader les NAHL. Il s'agit des populations cibles de ce traitement. Parmi celles-ci, domine l'espèce non-pathogène et ubiquiste *Rhodococcus erythropolis* chez laquelle trois voies de dégradation des signaux NAHL ont été identifiées (Uroz et al., 2005; Uroz et al., 2008).

MATERIEL ET MÉTHODE

MOLECULES UTILISEES

Les molécules utilisées dans cette étude ont été fournies par Sigma-Aldrich. Ces molécules possèdent un noyau butyrolactone et une chaîne carbonée de longueur variable (Cirou et al., 2007). Elles ont été choisies pour leur similitude structurale avec les NAHL (figure 1). L'effet de la gamma-caprolactone GCL et la gamma-heptalactone GHL a été particulièrement étudié. Les NAHL utilisées sont l'hexanoylhomosérine lactone (C6-HSL) et la 3-oxo-octanoylhomosérine lactone (OC8-HSL).

Figure 1. Molécules utilisées dans cette étude (Compounds used in this study) : Structure générique des NAHL (exemple R1=H et R2= (CH₂)₃-CH₃ pour la C6-HSL), de la GHL et de la GCL.



NUMERATION ET ISOLEMENT BACTERIENS

La numération des communautés bactériennes totales cultivables issues des cultures hydroponiques des plants de pomme de terre s'effectue par étalement de suspension-dilution dans du MgSO₄ (10mM) sur milieu riche TSA (AES). Pour chaque condition (bac ou table de culture) et chaque temps d'analyse, trois échantillons sont prélevés et étalés sur milieu TSA. Pour chacun de ces échantillons, trente colonies bactériennes développées sur TSA sont individuellement testées pour la production et la dégradation des signaux NAHL. La souche *Rhodococcus erythropolis* R138 isolée de cultures hydroponiques de plants de pomme de terre est rendue résistante à la Rifampicine (Rif). Elle est cultivée sur un milieu minimum AB avec la GCL comme seule source de carbone et supplémenté avec de la Rif à 100µg/mL.

CULTURES VEGETALES

Tous les plants de pomme de terre de la variété Allians sont issus de culture *in vitro* et fournis par le Comité Nord Plants de Pomme de terre (CNPPT). Les plants sont cultivés en bac (40x60x8 cm) contenant 13L de solution nutritive, ou en table de 6m de long alimentée par un réservoir de 200L de la même solution nutritive. La solution nutritive Hydrobloom (Cellmax, Royaume-Uni) contient les éléments majoritaires suivants : N (0.8g/L), P (0.56g/L) et K (1.48g/L). La solution nutritive concentrée est diluée 250 fois avec de l'eau non stérile du réseau public. Une centaine de plants est placée dans chaque bac ; trois cents sur chaque table de culture. Les bacs et les tables de culture sont disposés dans une serre de la station expérimentale du CNPPT à Bretteville-du-Grand-caux (76) sous lumière naturelle, avec des températures de 10-15°C la nuit et 20-30°C le jour en fonction des saisons (de mars à novembre).

MESURE DES ACTIVITES DE PRODUCTION ET DE DEGRADATION DES SIGNAUX NAHL

Les bio-indicateurs permettant la détection des signaux NAHLs, *Chromobacterium violaceum* CV026 et *Agrobacterium tumefaciens* NTLR4, sont utilisés comme décrit précédemment (D'Angelo-Picard et al., 2005). Le bio-indicateur *A. tumefaciens* NTLR4 permet d'identifier un large spectre de NAHL dont l'OC8HSL.

Le bio-indicateur *C. violaceum* CV026 est utilisé dans le test de dégradation de la C6-HSL, permettant d'identifier les isolats dégradant les NAHL. Lors de ce test, les cultures bactériennes sont mises en contact pendant 24h avec 25µM de C6-HSL, puis la concentration résiduelle de C6-HSL est évaluée avec *C. violaceum* CV026. Les cultures présentant un niveau indétectable (<1µM) de C6-HSL sont considérées comme capables de dégrader les signaux de type NAHL. L'aptitude de dégradation ou de production des NAHL de chacun de ces isolats est vérifiée une seconde fois.

DIVERSITE BACTERIENNE

Les isolats sont identifiés par séquençage partiel (500 nt environ) de la région 5' du gène *rrs* (ARN16S) amplifiée avec les amorces pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG). Les séquençages sont effectués par Genomics (Meylan, France). Les analyses de la diversité bactérienne totale par DGGE sont effectuées sur des amplifiats de gène *rrs* (position 341 à 534 chez *Escherichia coli*). Deux échantillons du système racinaire (10g) sont analysés par bac de culture. Les analyses DGGE sont réalisées par *Microbial Insights* (Rockford, USA) comme décrit précédemment (D'Angelo-Picard et al., 2004). Chaque bande des profils obtenus sont codés 0 (absence) ou 1 (présence) afin d'alimenter une matrice utilisée pour calculer des indices de similarité avec le logiciel DistAFLP (<http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/microb>). L'identification des séquences du gène *rrs* se fait par interrogation de la banque du *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>) selon la classification taxonomique donnée par le *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>).

RESULTATS

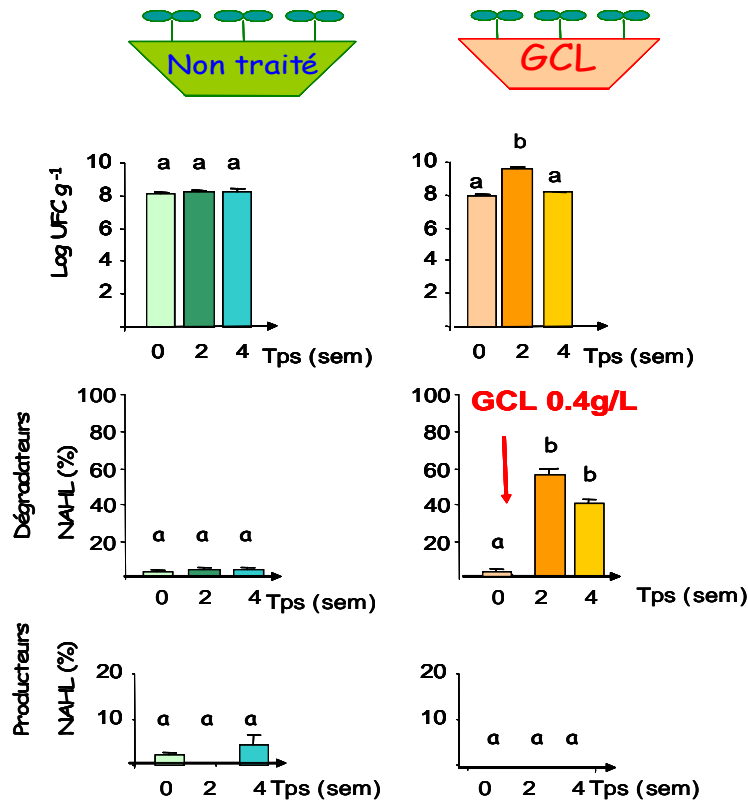
IDENTIFICATION DE LA GCL ET DE LA GHL

A l'issue du crible effectué sur vingt cinq molécules ayant une structure proche de celle des NAHL, seules deux molécules, la GCL (CAS#695-06-7) et la GHL (CAS#105-21-5) ont été retenue. Ces molécules ont la capacité de stimuler la croissance de bactéries rhizosphériques naturellement capables de dégrader les signaux du QS. Les consortia bactériens stimulés avec l'un ou l'autre de ces biostimulants dégradent rapidement les NAHL (C6-HSL et OC8-HSL) apportées de façon exogène. Ces mêmes consortia bactériens co-inoculés avec *Pectobacterium* dans des tubercules de pomme de terre montrent une forte activité de protection. Suite à ces tests en laboratoire, des essais de biostimulation en condition réelle sur les installations hydroponiques du CNPPT ont été réalisés.

EFFET IN SITU DES BIOSTIMULANTS GHL ET GHL

Les premières campagnes *in situ* (2005, 2006 et 2007) ont été effectuées sur des bacs de culture contenant de la solution nutritive. L'application de GCL induit une augmentation de la population totale de bactéries d'un facteur 10 environ (soit 10⁸ UFC/g de racine) deux semaines après traitement (figure 2). Dans ces mêmes conditions, une forte stimulation des populations bactériennes capables de dégrader les NAHL est observée. Après stimulation ces populations cibles représentent jusqu'à 60% des populations totales. Dans la condition témoin sans traitement, la proportion de dégradateurs de NAHL est d'environ 5%. Cette proportion est stable au cours du temps. En ce qui concerne les populations de producteurs de NAHL, aucune variation significative n'est observée au cours du temps. Des essais similaires ont été réalisés avec la GHL avec l'obtention des mêmes résultats. Ces résultats ont été validés sur plusieurs campagnes successives.

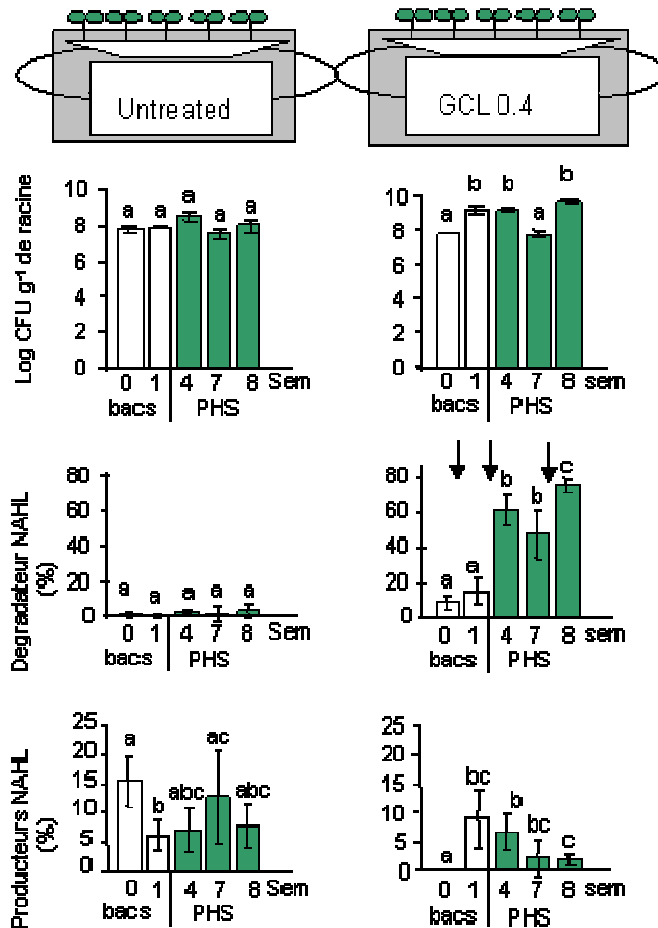
Figure 2 : Impact de la GCL sur les populations cultivables (Impact of GCL on culturable populations). La GCL est appliquée à une concentration de 0.4 g/L au temps J0. Des prélèvements sont effectués avant le traitement puis 2 et 4 semaines après. Les valeurs sont comparées au cours du temps (test T de Student ; 0.05).



Suite à ces résultats encourageants, de nouveaux essais ont été effectués lors de la campagne 2007 dans un système hydroponique à grande échelle permettant la production de tubercules. Ce système est appelé PHS pour *Plant Hydroponic System*. Il permet une circulation continue de solution nutritive du réservoir (200L) aux cultures (Figure 3).

Lors du processus standard de production, les plants sont cultivés en bac, puis transférés en PHS. La solution hydroponique du bac est transvasée dans le réservoir. Suite au premier traitement GCL (t=0), l'impact sur les populations de dégradateurs de NAHL mesuré une semaine après n'est pas significativement différent. Suite au transfert en PHS et au second traitement, une augmentation importante est observée atteignant 60% de la population totale à 4 semaines et 80% après le troisième traitement à 8 semaines. La population de producteurs varie au cours du temps mais ces variations sont indépendantes de l'application de GCL. Dans ce système hydroponique de production de tubercules à grande échelle, une stimulation des bactéries dégradant les signaux NAHL est possible.

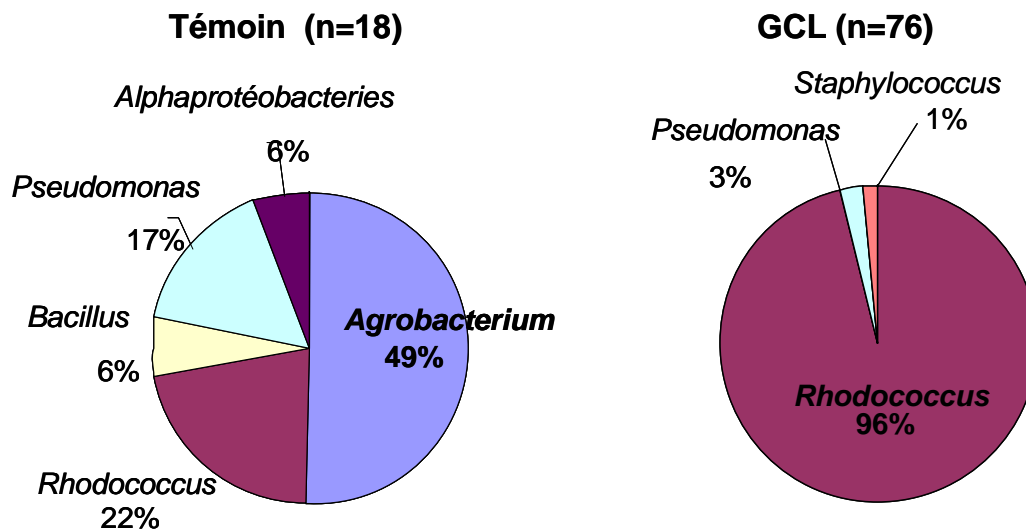
Figure 3 : Impact de la GCL en système PHS (Impact of GCL in PHS). La GCL est appliquée à une concentration de 0.4 g/L à 0, 2 et 7 semaines. Des prélèvements sont effectués avant le traitement, puis 2, 4, 7 et 8 semaines après traitement. Les valeurs sont comparées au cours du temps (test T de Student t; 0.05).



IDENTIFICATION DES POPULATIONS CIBLES DES BIOSTIMULANTS

Les souches isolées des expériences précédentes et dégradant les NAHL ont été identifiées par séquençage du gène *rrs*. Les résultats présentés dans la figure 4 montrent une forte modification des populations bactériennes en faveur des souches du genre *Rhodococcus* qui dominent dans les conditions traitées avec la GCL. Dans la condition non traitée, le genre *Agrobacterium* domine avec 49%, mais sont aussi présents des isolats des genres *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et d'autres Alphaprotéobactéries.

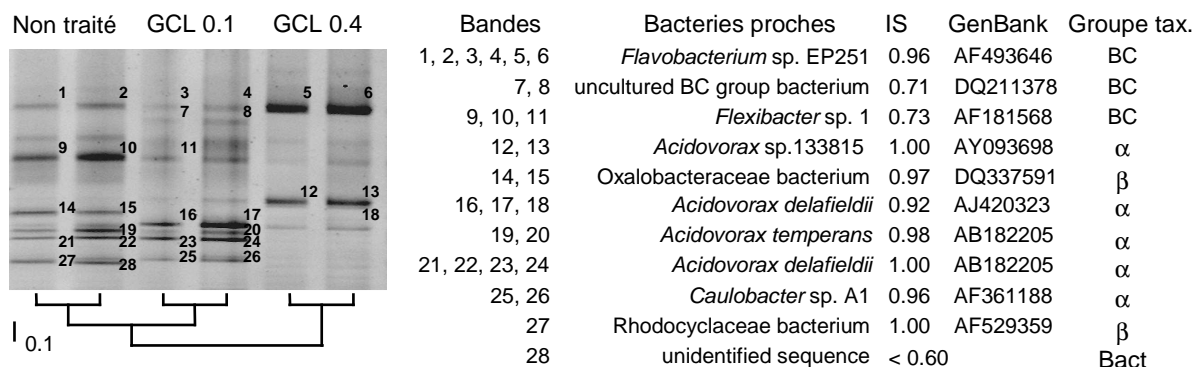
Figure 4 : Identification des souches dégradant les NAHL (Identification of NAHL-degrading strains)



ANALYSE GLOBALE DE L'IMPACT DE LA GCL PAR DGGE

L'étude des populations cultivables a été complétée par une approche d'analyse globale par DGGE. Cette analyse a été réalisée lors de l'expérience en bac (figure 2) pour les temps 2 et 4 semaines. Seuls les résultats du temps 2 semaines sont montrés (Figure 5), des données similaires sont obtenues à 4 semaines (Cirou et al., 2007).

Figure 5 : Analyse DGGE (DGGE Analyse). Deux analyses sont effectuées pour chaque bac ; les bandes identifiées par séquençage sont numérotées (de 1 à 28) ; leur similarité (IS) avec les séquences disponibles dans la banque GenBank est mentionnée, ainsi que le groupe taxonomique de séquences proches (Bact. Bacteria ; BC, groupe des Bacteroidetes/Chlorobi ; α et β ; alpha- et bêta-protéobactéries).



Cette analyse révèle une modification importante de la structure des populations bactériennes après traitement par la GCL. Notamment, des populations proches du genre *Flavobacterium* sont stimulées après l'application de fortes concentrations de GCL (bandes 1 à 6). D'autre part, des populations différentes de par leur *rrs*, mais proches du genre *Acidovorax* (bandes 12-13 ; 17 à 24) voient leur signal augmenter ou décroître après l'application de GCL, suggérant une sélection/contre-sélection de populations spécifiques au sein de ce groupe proches d'*Acidovorax*.

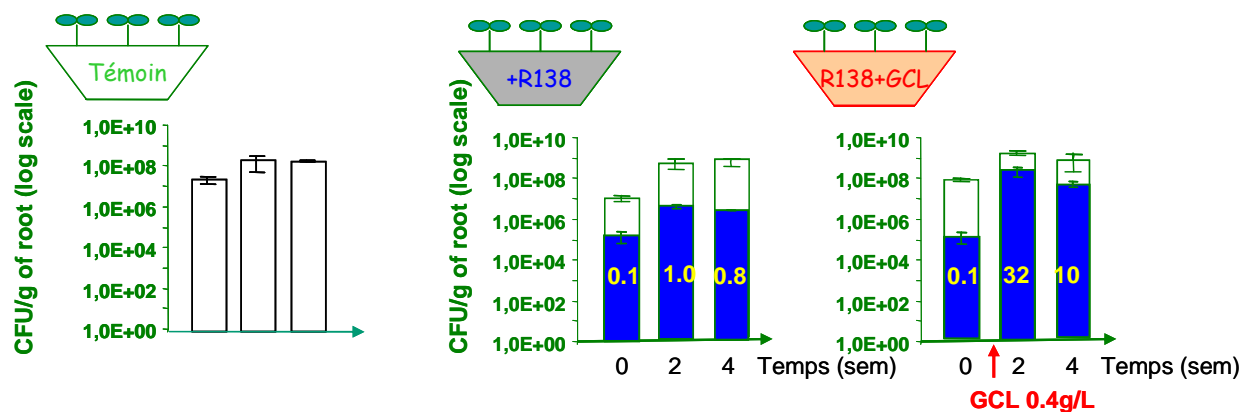
COUPLAGE DE LA GCL AVEC RHODOCOCCUS R138

Afin de suppléer l'absence de *Rhodococcus* indigènes dans l'environnement végétal au début du traitement, nous avons essayé d'associer à l'amendement par la GCL l'inoculation d'une souche de *Rhodococcus*. La souche de *Rhodococcus* R138 est issue d'un criblage de souches pour les trois caractéristiques suivantes : la capacité à dégrader rapidement les signaux du QS, la capacité à assimiler la GCL comme seule source de carbone, et l'activité de protection contre le pathogène *Pectobacterium*. Parmi différentes souches testées, celle qui répond le mieux à ces trois critères est une souche du genre *Rhodococcus* appelée R138.

La technique de couplage a été testée en système bac. A t=0 la souche R138 a été inoculée à 10^5 UFC/mL, soit 0.1% de population bactérienne cultivable totale. En absence de traitement, la souche R138 se maintient dans les bacs et représente jusqu'à 1% des bactéries dénombrées. Lorsque la GCL est appliquée, la proportion de R138 augmente significativement pour atteindre 30% des isolats cultivables (figure 6).

Cette expérience en solution hydroponique a été réalisée avec la GHL et donne les mêmes résultats que ceux décrits plus haut. De plus, le couplage GHL et R138 a été réalisé en serre avec du sol issu d'un champ expérimental appartenant au CNPPT. Les résultats obtenus sont semblables à ceux obtenu en bac.

Figure 6 : Couplage entre un biostimulant (GCL) et la souche bactérienne R138 (Coupling between a biostimulant GCL and *Rhodococcus* R138). Les histogrammes blancs représentent la population totale et les histogrammes bleus la population de R138 dont la proportion est exprimée en pourcentage de la population totale (valeurs en jaune).



DISCUSSION

A l'heure actuelle, seules des mesures prophylactiques (rotation des cultures, élimination des plants présentant des symptômes, limitation des excès d'humidité) permettent d'éviter les maladies bactériennes provoquées par *Pectobacterium*. Malgré les efforts des sélectionneurs, aucune variété de pomme de terre résistante à ce pathogène n'est actuellement commercialisée. La stratégie que nous proposons est basée sur la connaissance des mécanismes de virulence (*quorum sensing*) et de la diversité des populations bactériennes dégradant les NAHL dans les sols. Elle consiste à appliquer une biomolécule, GCL ou GHL, qui stimule la croissance des populations dégradant les signaux

NAHL. La GCL est une molécule présente à faible concentration dans les pommes de terre ; à l'heure actuelle sa fonction n'est pas connue. La GHL est détectée dans différentes plantes. La GCL et la GHL sont utilisées dans les filières cosmétique et agroalimentaire comme arômes (noisette/noix de coco). Ces deux molécules bénéficient donc d'un historique toxicologique (sur rat et lapin) depuis plusieurs décennies. De plus, au laboratoire, nous avons mis au point un système de détection de ces deux molécules et de leur produit de dégradation (formes hydrolysées) par HPLC/MS. Cette technique de détection de pointe nous permet de suivre la disparition des composés chimiques au cours du temps dans la solution nutritive et dans les plantes. La disparition du composé est très rapide et il est indétectable au bout d'un mois que ce soit dans la solution nutritive, dans les plantes ou les tubercules (données non montrées). En parallèle, une autre stratégie de lutte contre *Pectobacterium* est développée au laboratoire. Elle consiste à identifier des molécules chimiques dites QSI (*Quorum Sensing Inhibitors*) capables de bloquer la communication par QS sans perturber la croissance des bactéries. Ces stratégies de lutte biologique peuvent être étendue à d'autres systèmes plantes-pathogènes dont la virulence repose sur la communication QS comme le système Riz- *Burkholderia*. De nombreuses équipes de recherche en France et à l'international s'affèrent à développer de nouvelles méthodes de lutte efficace pour maîtriser la virulence et la dissémination de ce pathogène qui demeure un problème économiquement important en agriculture. Dans le même esprit, une équipe américaine a démontré que la stimulation de certaines souches capables de dégrader un signal bactérien appelé DSF pour *Diffusible signal factor* permet de diminuer fortement l'agressivité d'une souche de *Xanthomonas* sur plants de moutarde et sur chou (Newman et al., 2007). Les études de bio-stimulation se multiplient et ouvrent de nouvelles portes en matière de lutte contre les phytopathogènes.

CONCLUSION

Nous proposons une nouvelle stratégie de lutte contre *Pectobacterium*, bactérie pathogène de la pomme de terre. Cette stratégie consiste à appliquer un biostimulant (GCL ou GHL) capable de favoriser les populations bactériennes dégradant les signaux NAHL du QS. Ce système de lutte a été validé en culture hydroponique (bac et PHS). Un couplage de ce traitement avec l'introduction d'un isolat *Rhodococcus* R138 a été testé en système hydroponique et également en sol sous serre. Actuellement nous planifions de futures expériences en champs afin d'évaluer ce procédé dans un système ouvert.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Comité Nord pour la mise à disposition de ses installations, ses conseils techniques et le financement du doctorat d'AC, la plateforme HPLC/MS de l'ICSN et en particulier Odile Thoison pour la mise au point des techniques de détection des GCL et GHL.

BIBLIOGRAPHIE

Barnard AM., Salmond GP., 2007 Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal. Bioanal. Chem* 387: 415-423

Cirou A., Diallo S., Kurt C., Latour X., Faure., D 2007 Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environmental Microbiology* 9, 1511-1522.

- D'Angelo-Picard C., Faure D., Carlier A., Uroz S., Raffoux A., Fray R., Dessaux Y., 2004 Bacterial populations in the rhizosphere of tobacco plants producing the quorum sensing signals hexanoyl- and 3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:19-29.
- D'Angelo-Picard C., Faure D., Penot I., Dessaux Y., 2005. Diversity of N-acylhomoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ. Microbiology* 7, 1796-1808.
- Dong YH., Zhang LH., 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* 43 Spec No:101-109.
- Faure D., Cirou A., Dessaux Y. 2008. Chemicals promoting the growth of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria. Demande Internationale n° PCT/IB2008/001156 du 18 janvier 2008, publiée sous le n°WO 2008/090479 le 31 juill et 2008.
- Keller L., Surette MG. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:249-258
- Newman KL., Chatterjee S., Ho KA., Lindow SE., 2007. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 21: 326-334.
- Ordax M., Marco-Noales E., Lopez MM., Biosca EG., 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: Induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl Environ Microbiol.* 72: 3482-3488.
- Priou S., Jouan B., 1996. Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In : Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC, eds. *Mieux comprendre la pomme de terre*. Paris Inra éditions, 607 p.
- Rasmussen TB., Givskov M., 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology.* 152:895-904
- Silver S., 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions-Review- *Gene* 179:9-19
- Uroz S., D'Angelo-Picard C., Carlier A., Elasri M., Petit A., Oger P., Faure D., Dessaux Y., 2003. Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology.* 149: 1981-1989.
- Uroz S., Chhabra SR., Camara M., Williams P., Oger P., Dessaux Y., 2005. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology.* 151: 3313-3322
- Uroz S., Oger PM., Chapelle E., Adeline MT., Faure D., Dessaux Y., 2008 QsdA, a novel N-AHSL degradation enzyme related to phosphotriesterases, is widespread in the *Rhodococcus* genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1357-1366.

**EFFICACITE ET SELECTIVITE DE QUATRE PHYSTOSTIMULANTS CONTRE L'OIDIUM
DU ROSIER**

A. POMMELET⁽¹⁾, O. STAPEL⁽²⁾

⁽¹⁾ Agrocampus Ouest Centre d'Angers-INHP, 2 rue Le Nôtre, 49045 Angers – France – mail : audrey.pommelet@wanadoo.fr

⁽²⁾ Station Technique d'Expérimentation des Plantes en Pot de Bretagne, 52 rue de Saint-Illan, 22360 Langueux – France – mail : stepp_bretagne@astredhor.fr

RESUME

Cette étude permet d'évaluer l'efficacité et la sélectivité de plusieurs phytostimulants contre l'oïdium du rosier (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*). Les produits testés sont un produit C à base d'extraits d'algues, d'acides aminés et de matières fertilisantes NPK, un produit B contenant un extrait d'algues brunes, un produit D à base d'extraits d'écorce d'agrumes, un produit A issu de la macération de plantes et d'algues et une alternance des produits C et D. La comparaison se fait par rapport à un témoin traité à l'eau et à un témoin chimique de référence. Les produits B, C, D et l'alternance C/D, présentent une efficacité partielle contre l'oïdium du rosier mais s'avèrent moins efficaces que le témoin chimique de référence. Ces trois produits phytostimulants peuvent cependant constituer une solution intéressante pour diminuer l'application de produits chimiques sur les cultures de rosiers.

Mots-clés : phytostimulant, oïdium, rosier, efficacité, sélectivité

SUMMARY

EFFICIENCY AND SELECTIVITY OF FOUR NATURAL PRODUCTS AGAINST POWDERY MILDEW

In this study we evaluate the efficiency and the selectivity of several biological and chemical products against powdery mildew. The products tested are a product C containing seaweed extracts, amino acids and fertilizing elements NPK, a product B containing dark seaweed extracts, a product C containing peel citrus fruit extracts, a product A containing fermented plant extracts and an alternated application of product C and product D. A treatment with water and a chemical control allow an adequate comparison to verify product effectiveness. The products B, C, D and the alternated application of C/D, presented a partial efficiency against the powdery mildew. However, the efficacy of these products was inferior to that of the alternated chemical treatment. The three natural products B, C, D may nevertheless offer a solution to reduce the use of chemical products in potted rose cultures.

Key words: natural product, powdery mildew, rosebush, efficiency, selectivity

INTRODUCTION

Sphaerotheca pannosa var. *rosae*, appelé plus communément oïdium du rosier, est une maladie fongique apparaissant très fréquemment chez les producteurs de rosiers. L'agent pathogène responsable de cette maladie, appartenant à la sous-classe des Ascomycètes, est favorisé par des conditions de chaleur et d'humidité qui provoquent la germination des spores infectieuses. Le symptôme principal est un feutrage blanc-grisâtre composé d'un réseau de filaments mycéliens externe à partir duquel les champignons envoient des suçoirs dans les tissus pour y puiser leur nourriture. Ce feutrage recouvre peu à peu toutes les parties aériennes de la plante : tiges, feuilles, fleurs et altère ainsi la beauté de la plante tout en l'affaiblissant. L'apparition de la maladie dans la culture étant difficile à prévoir, les producteurs appliquent actuellement à intervalles réguliers et préventivement les quelques produits chimiques dont les molécules sont encore autorisées sur le marché.

Ainsi, devant les nombreuses contraintes qui pèsent sur les interventions fongicides et insecticides et l'apparition de limites vis-à-vis de leur efficacité, une nouvelle classe de produits destinés à stimuler les mécanismes de défenses de la plante est apparue depuis quelques années. Il s'agit des phytostimulants, ou éliciteurs, qui stimulent les défenses naturelles de la plante, pour lui permettre de lutter plus efficacement contre les pathogènes fongiques et les bioagresseurs. Ces éliciteurs comprennent les bactéries comme *Pseudomonas* sp., les composés bactériens tels que les harpines, les SDN à base d'extraits de plantes (fenugrec, renouée de Sakhaline,...), les préparations à base d'algues (laminarine,...), les SDN synthétiques (acibenzolar-S-méthyl, acide Beta Amino-Butyrique,...) et les éléments minéraux (monosilicate de potassium,...).

Des essais sur des phytostimulants très différents les uns des autres ont été menés ces dix dernières années, que ce soit en laboratoire ou en condition de production, pour tester ces produits et prouver leur efficacité. Ainsi, de nombreux essais ont été effectués sur des analogues structuraux de l'acide salicylique contre des maladies et pathogènes divers. L'acibenzolar-S-méthyl (ASM) a montré son efficacité contre le feu bactérien, la tavelure du pommier, l'oïdium et divers bioagresseurs (Brisset *et al*, 2005). Un autre essai mené par Godard *et al*. (1999) montre que le benzothiadiazole (BTH) est capable d'induire les défenses du chou-fleur vis-à-vis du mildiou pendant 30 jours mais entraîne alors des retards de croissance. Le BTH peut également avoir une efficacité sur les virus, notamment le virus de la mosaïque du concombre en empêchant la réplication de ce dernier dans les tissus de la plante (Gandhi, 2000). Il a également un effet positif, en plein champ, sur les attaques de larves de mineuse, d'aleurodes, de champignons et de bactéries (Inbar *et al*, 1998). Parmi les nouvelles molécules apparues, on peut également citer l'acide β -aminobutyrique (BABA) et le Phytogard® (K_2HPO_3), qui induisent eux aussi une résistance contre le mildiou du chou-fleur (Bécot *et al*, 2000). Cependant, le BABA pourrait engendrer des réactions d'hypersensibilité (Silué *et al*, 2002).

L'utilisation de bactéries pour induire les défenses naturelles des plantes a également été beaucoup étudiée ces dernières années. *Bacillus subtilis* et *Trichoderma harzianum* ont montré une bonne efficacité contre l'oïdium du fraisier mais moins que des produits chimiques. Lorsque ces micro-organismes sont utilisés en alternance avec des fongicides, on obtient alors un très bon contrôle sur l'oïdium (Pertot *et al*, 2008).

Les SDN extraits de plantes tels ceux extraits de *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, la renouée de Sakhaline, ont montré des résultats semblables à ceux obtenus avec des fongicides classiques contre l'oïdium du concombre (Konstantinidou-Doltsinis and Schmitt, 1999) tandis que ceux issus des racines de *Rumex crispus* constitués

de chrysophanol, parietin et nepodin réduisent significativement le développement de l'oïdium de l'orge et ont un effet aussi bien préventif que curatif (Choi *et al.*, 2004). En ce qui concerne le rosier, un essai mené par Scarito *et al.* (2005), a montré l'effet inhibiteur des huiles essentielles extraites de clou de girofle et d'inflorescences d'origan sur l'oïdium. En condition *in vitro*, elles empêchent la germination des conidies et en condition de production, à forte concentration, elles montrent une efficacité plus importante que celle des fongicides.

Ces résultats ouvrent de nombreuses pistes concernant les alternatives aux produits chimiques. Cependant, en 2008, seulement quatre produits sont homologués pour la lutte contre des agents pathogènes : Iodus 2® céréales, Iodus 2® cultures spécialisées, Bion® 50 WG et Stifénia® contre seulement 8 pathogènes sur 6 cultures. Une partie des phytostimulants est homologuée en tant que matières fertilisantes car, pour le moment, leur homologation est soumise à la même réglementation que les produits phytosanitaires (Piasentin, 2009).

L'essai présenté ci-dessous s'inscrit dans les programmes nationaux de l'Astredhor consacrés aux stimulateurs de défenses naturelles sur les couples rouille/chrysanthème, fusariose/cyclamen et oïdium/rosier. Un essai semblable, mené en 2008 à la station expérimentale, a montré des résultats encourageants (stepp, 2008). L'objectif est de poursuivre les essais sur de nouveaux produits et de confirmer l'efficacité de certains contre l'oïdium du rosier.

MATERIEL ET METHODE

La méthode utilisée pour tester l'efficacité des produits sélectionnés est basée sur la méthode d'essai d'efficacité pratique de fongicides destinés à combattre l'oïdium du rosier (Rossi *et al.*, 2001) élaborée par la Commission des essais biologiques. Cette méthode a été adaptée pour prendre en compte les contraintes techniques et spatiales.

MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal utilisé est la variété de rosier Kordana® rouge, très sensible à l'oïdium. Les 294 rosiers nécessaires à l'essai ont été reçus en semaine 18 et ont été placés sous serre-verre, sur tablettes de sub-irrigation flux-reflux. En semaine 20 et 21, un traitement préventif au kresoxim-méthyl à 0,3g/L a été effectué pour empêcher l'apparition du pathogène avant le début de l'essai. En effet, les phytostimulants doivent être appliqués avant l'attaque du champignon pour que la plante ait le temps de mettre en place ses défenses naturelles. Les rosiers ont été rempotés en semaine 22 en pots d'1,3L octogonaux (diamètre 14cm). Le terreau utilisé est le terreau professionnel cyclamen 6B (85% tourbe blonde, 15% perlite, 4 kg/m³ de chaux, 0,8 kg/m³ de Pgmix 14.16.18, PH : 5,5/6). Un fertilisant 14-14-28 est apporté avec l'eau d'irrigation. La même semaine, les rosiers sont taillés à cinq folioles. En semaine 23, 4 jours avant le début de l'essai, l'apparition des premiers symptômes d'oïdium est constatée. Un traitement au bupirimate à 0,15% est alors effectué immédiatement.

AUTRES TRAITEMENTS PHYTOSANITAIRES

Pour éviter les interactions entre les phytostimulants et les produits chimiques utilisés traditionnellement contre les ravageurs, l'essai est mené en Protection Biologique Intégrée. En semaine 21, un lâcher de microhyménoptères *Aphidius colemani* Viereck est effectué pour lutter contre les pucerons. En semaine 25, de nouvelles plaques jaunes, pour détecter

les aleurodes, et des plaques bleues pour la surveillance des thrips sont installées. En semaine 26, un nouveau lâcher de 2500 *A. colemani* est effectué contre les pucerons. Les plaques jaunes et bleues sont alors retirées pour éviter de piéger les auxiliaires. Le même jour, 250 000 *Amblyseius andersoni* Chant, acariens prédateurs, sont lâchés pour maîtriser les acariens phytophages. De plus, de nombreux *Aphidoletes aphidimyza* Rondani sont apparus naturellement dans la culture et ont permis une bonne maîtrise des pucerons.

PROTOCOLE ET DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les quatre produits testés sont codés A, B, C et D, car ils n'y a actuellement pas d'homologation phytosanitaire pour ces produits en culture ornemental. On teste également une modalité où les produits C et D sont appliqués en alternance. Le produit C est un produit à base d'extraits d'algues, d'acides aminés et de matières fertilisantes (N, P, K), qui avait montré une bonne efficacité en 2008 lors d'un essai semblable (stepp, 2008), lorsque la pression parasitaire restait modérée. Le produit D est fabriqué à partir d'extraits d'écorce d'agrumes et le produit B est un produit homologué en 2008 contre l'oïdium du fraisier, à base de laminarine issue d'extraits d'algues brunes. Le produit A est un macérat de plantes additionnées d'algues brunes riches en magnésium et oligo-éléments. Le dispositif expérimental est le même que lors de l'essai de 2008 (stepp, 2008), seuls les produits sont différents. Il est généré par Statbox (Grimmer Soft) et est composé de 6 blocs de Fisher à 7 modalités de traitements : 4 modalités de produits C à 1%, D à 1%, B à 0,3%, A à 0,5%, 1 modalité alternance de C à 1% et de D à 1%, 1 modalité eau et 1 modalité produit chimique de référence, constituée d'une alternance Nimrod® (substance active : bupirimate) à 0,15% et Systhane® (substance active : myclobutanil) à 0,125%. Une parcelle élémentaire est formée de 7 pots, dont celui situé au centre n'est pas traité (figure 1). Cela permet de vérifier si la dispersion du pathogène a été régulière au cours de l'essai.

Figure 1 : Dispositif expérimental en 6 blocs et parcelle élémentaire
Experimental system with 6 units and elementary plot



Les traitements sont réalisés en pulvérisation (pulvérisateur à pression constante), à partir de la semaine 24, sur les plants indemnes d'oïdium. L'application des produits s'effectue jusqu'au point de ruissellement et le volume de chaque produit appliqué est mesuré. Quatre traitements au total sont effectués à intervalle de 10 jours.

OBSERVATIONS ET NOTATIONS

Les pots sont numérotés de 1 à 294 et une tige par pot est sélectionnée avant le début de l'essai pour suivre l'évolution des symptômes. Les notations sont effectuées le jour du traitement, 3 jours après et 7 jours après (T, T+3 et T+7). Pour évaluer globalement la sévérité de l'attaque du champignon sur la plante, on note chaque plante selon 4 niveaux d'infestation (1 : aucune infestation n'est constatée, 2 : légère infestation, 3 : infestation modérée, 4 : forte infestation). Après cette première notation, une notation plus précise est effectuée en comptabilisant sur la tige sélectionnée le nombre de folioles totales et le nombre de folioles atteintes. Le niveau de phytotoxicité (nul, faible, moyen, fort) des produits et le type de réactions phytotoxiques sont également notés. Un comptage des fleurs est également effectué ainsi qu'une mesure du diamètre et de la hauteur des plantes à la fin de l'essai. Cela permet de savoir si les produits ont une influence sur la floribondité et la croissance des rosiers. D'autres données complémentaires sont également recueillies : Températures moyenne, maximale et minimale jour, nuit et 24h ; Humidités moyenne, maximale et minimale jour, nuit et 24h ; Période de floraison ; Volume et pH des bouillies utilisées ; Temps de séchage des feuilles après traitement, Période, climat et ensoleillement pendant l'application des produits.

TRAITEMENT DES RESULTATS

L'efficacité des produits testés est évaluée par les niveaux d'intensité de l'infestation (I) et la proportion de folioles malades par rapport au nombre total de folioles sur la tige (P). Les données sont utilisables si le développement de l'oïdium est effectif sur les plants traités à l'eau et les plants non traités. Les données sont soumises à une analyse de variance et la comparaison entre les traitements s'effectue grâce au test de NEWMAN-KEULS. Les produits sont évalués par leur pourcentage d'efficacité par rapport au témoin eau [$((\text{Teau-NT})/\text{Teau}) \times 100$]. L'évolution de la maladie s'exprime à travers les témoins eau et les témoins non traités et on vérifie également que ces deux témoins ont une dynamique semblable. Concernant la phytotoxicité des produits, la seule variable mesurée est le niveau de phytotoxicité. Pour que la phytotoxicité d'un produit soit avérée, on vérifiera au préalable que les témoins (eau et non traités) ne présentent pas de traces de phytotoxicité. Une analyse de variance et une comparaison des moyennes sont également effectuées sur les données concernant le nombre de fleurs et les diamètres et hauteurs en fin de culture.

RESULTATS

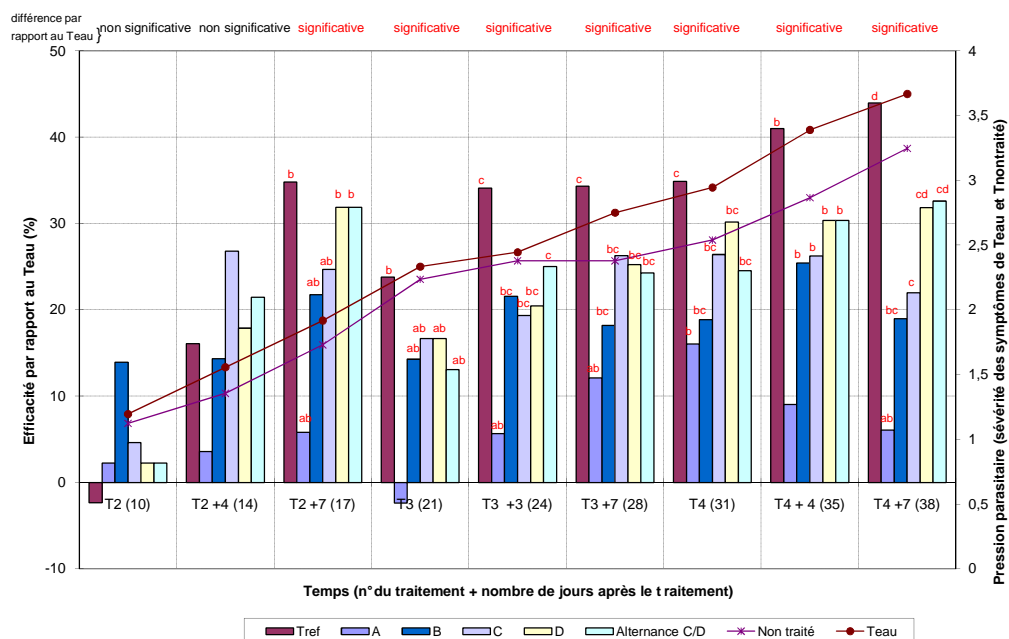
INTENSITE DES SYMPTOMES

L'infestation n'étant pas effective sur les témoins eau et les témoins non traités avant le deuxième traitement, les résultats ne sont analysés qu'à partir du deuxième traitement, c'est-à-dire 10 jours après le début de l'essai (*figure 2*). Les témoins traités à l'eau et les témoins non traités indiquent que la pression parasitaire a fortement augmenté durant toute la durée de l'essai, passant d'un indice 1 à un indice 3,5, avec une progression très forte entre le 10^{ème} et le 21^{ème} jour. Jusqu'à T2 + 7, le test statistique ne révèle aucune différence significative entre les traitements. A partir de T2 + 7, le témoin chimique de référence est toujours significativement différent du témoin eau, avec une efficacité supérieure à 30% sauf à T3 (environ 23% d'efficacité par rapport au témoin eau) et passant à plus de 40% à la fin de l'essai. En ce qui concerne les phytostimulants, une bonne efficacité par rapport au témoin eau est visible pour les produits B, C, D et l'alternance C/D, qui sont significativement

différents du témoin eau à partir de T2 + 7. Les phytostimulants les plus performants tout au long de l'essai sont le produit C et l'alternance C/D dont l'efficacité dépasse toujours 20% par rapport au Témoin eau (sauf pour T3) et même 30% à T2 + 7, T4 + 4 et T4 + 7. Le produit A n'a pas démontré une efficacité significative sauf à T4 (environ 15% d'efficacité).

Figure 2 : Efficacité des phytostimulants par rapport au témoin eau d'après l'intensité des symptômes observés.

Efficiency of natural products in comparison with the water treated control for the intensity of symptoms.

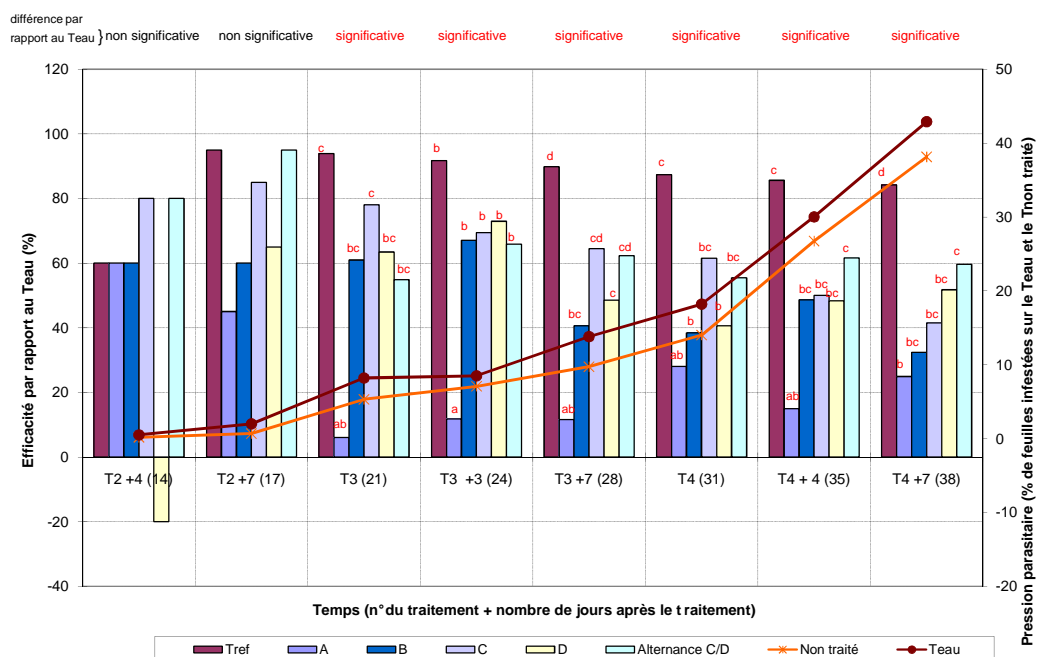


PROPORTION DE FOLIOLES INFESTEES

Les résultats de ces données permettent de confirmer ou d'infirmer les résultats des données concernant l'intensité d'infestation. En effet, plus l'intensité des symptômes est importante, plus la proportion de folioles infestée est grande. Les résultats sont analysés à partir de T2 + 4 car avant cette date l'infestation des témoins n'était pas effective et le test statistique a montré l'existence d'un résidu suspect en T2. Les témoins eau et les témoins non traités confirment la forte pression parasitaire (*figure 3*). En effet, entre T2 + 4 et T4 + 7, la proportion de folioles infestées pour ces témoins passe de 0 à 40%. A partir de T3, la comparaison de moyennes montre des différences significatives de certains produits par rapport au témoin eau. Le témoin chimique de référence montre toujours la plus grande efficacité par rapport au témoin eau, qui dépasse 80% voire 90% au début de l'essai. Les phytostimulants B, C, D et l'alternance C/D montrent une bonne efficacité, avoisinant les 50% tout au long de l'essai. Concernant le produit B, son efficacité semble cependant décroître lorsque la pression parasitaire devient très forte contrairement à l'alternance C/D, qui offre une bonne protection durant toute la durée de l'essai (environ 60% d'efficacité). Le produit A ne fournit pas une protection suffisante lors de cet essai (moins de 15% d'efficacité et pas de différence significative par rapport au témoin eau sauf à T4 + 7).

Figure 3 : Efficacité des phytostimulants par rapport au témoin eau d'après la proportion de folioles infestées comptabilisées.

Efficiency of natural products in comparison with the water treated control for the proportion of infested leaves.



PHYTOTOXICITE DES PRODUITS UTILISES

Aucun des produits utilisés n'a entraîné de réactions phytotoxiques. On notera cependant que le produit A marque très fortement le feuillage et les fleurs dès la première application. Les taches blanches nuisent à l'esthétique du rosier et restent apparentes même après des pulvérisations à l'eau répétées.

FLORIBONDITE ET VOLUME DE LA PLANTE EN FIN DE CULTURE

La comparaison de moyennes par le test de NEWMAN-KEULS ne montre aucune différence entre les traitements en ce qui concerne la floribondité et le volume de la plante. Il n'y a donc pas d'influence des produits, qu'elle soit positive ou négative, sur ces deux variables.

DISCUSSION

Cet essai a permis de tester quatre phytostimulants lorsque les rosiers sont soumis à une forte pression parasitaire. Il en ressort que trois produits (B, C, D) sur les quatre testés, ainsi que l'utilisation des produits C et D en alternance, sont efficaces pour lutter contre l'oïdium du rosier. Le produit C confirme ainsi les résultats obtenus en 2008 à la station expérimentale (stepp, 2008) mais montre cette année qu'il est efficace même lorsque la pression parasitaire est élevée. De plus, Le produit D avait déjà démontré son efficacité sur diverses cultures contre d'autres maladies fongiques et a également une efficacité contre l'oïdium du rosier. Cependant c'est l'alternance entre ces deux produits qui semble offrir la plus grande protection : le produit C avec son effet probablement indirect en stimulant les

défenses naturelles de la plante et le produit D avec son effet direct contre les spores et le mycélium. Le produit B est déjà homologué contre l'oïdium de la fraise et le feu bactérien du pommier et du poirier et son composant principal, la laminarine, affecte la germination des spores de l'oïdium (Renard-Merlier *et al*, 2007). Contrairement à l'essai de l'année précédente, les phytostimulants ont été moins efficaces qu'un produit chimique appliqué tous les 10 jours, surtout lorsque l'on alterne les molécules chimiques utilisées. Lorsque la pression parasitaire est très forte, l'utilisation d'un produit préventif tel que les phytostimulants, associée à un curatif pourrait être très efficace tout en permettant de réduire l'application de produits chimiques.

L'analyse statistique des données concernant le début de l'essai a décelé une variabilité entre les blocs, probablement due au fait que la maladie a tendance à se propager par foyer et se déclare spontanément, sans inoculation. La variabilité diminue ensuite lorsque l'oïdium est présent sur toutes les parcelles élémentaires. Pour une répartition de l'inoculum fongique régulière, il faudrait inoculer les témoins non traités. L'inoculation ne doit cependant pas avoir lieu dès le début de l'essai, pour permettre à la plante de mettre en place ses défenses naturelles sous l'effet des phytostimulants.

Les données climatiques (*annexe 1*) montrent également l'effet de l'humidité sur la propagation de l'oïdium. En effet, l'humidité dans la serre est d'environ 75% entre T1 et T3 puis passe à environ 45 %. Les figures 2 et 3 montrent que la progression de l'oïdium se ralentit à partir de T3. Il peut alors être intéressant d'utiliser des déshumidificateurs dans les serres de production pour éviter l'apparition de la maladie et limiter sa propagation. Il est cependant à noter qu'à partir de 90% d'humidité, la maladie serait également freinée (Mortensen et Gislerod, 2005).

CONCLUSION

Certains phytostimulants ont montré lors de cet essai une bonne efficacité en application tous les 10 jours, en condition de forte pression parasitaire, sans présenter de phytotoxicité aux doses utilisées. Cette efficacité s'avère cependant inférieure à celle engendrée par l'alternance de deux molécules chimiques classiques. Les phytostimulants, sans supprimer totalement l'application de produits chimiques, peuvent cependant permettre une diminution de la pression parasitaire du pathogène, une réduction de l'utilisation des produits chimiques et donc un ralentissement de la résistance aux produits chimiques.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement mon maître de stage Oscar Stapel pour son suivi et la correction de cet article ainsi que Magali Younsi et Laurent Beunel pour leurs conseils et l'aide apportée pendant la réalisation de cet essai à la STEPP Bretagne.

BIBLIOGRAPHIE

Bécot S., Pajot E., Le Corre D., Monot C., Silué D, 2000. Phytogard® (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. Crop Protection, 19, 417-425.

Brisset M.N., Chartier R., Didelot F., Parisi L., Paulin J.-P., Robert P., Tharaud M., Lemarquand A., Orain G., Toubon J.-F., Brun L., Derridj S., Sauphanor B., 2005. Inducteurs

de défenses naturelles des plantes : potentialités contre les bioagresseurs du pommier et du poirier. Phytoma – la défense des végétaux, 581, 20-24.

Choi, G.J., Lee, S.-W., Jang, K.S., Kim, J.-S., Cho, K.Y., Kim, J.-C., 2004. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. Crop Protection, 23, 1215-1221.

Gandhi H. A., 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. Crop Protection, 19, 401-405.

Godard J.-F., Ziadi S., Monot C., Le Corre D., Silué D., 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. Crop Protection, 18, 397-405.

Inbar M., Doostdar H., Sonoda R. M., Leibee G. L., Mayer R. T., 1998. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. Journal of Chemical Ecology, 24, 135-149.

Konstantinidou-Doltsinis, S., Schmitt, A., 1998. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. Crop Protection, 17, 649-656.

Mortensen, L.M. and Gislerod, J.R., 2005. Effect of air humidity variation on powdery mildew and keeping quality of cut roses. Scientia Horticulturae, 104, 49-55.

Pertot, I., Zasso, R., Amsalem, L., Baldessari, M., Angeli, G., Elad, Y., 2008. Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. Crop Protection, 27, 622-631.

Piasentin J., 2009. Simulation des mécanismes de défenses naturelles des plantes : protection des cultures, production de composés secondaires d'intérêt. Terres d'innovation, 47-48.

Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F. Durand, R., Reignault, P., 2007. Ioduric acid, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. Phytochemistry, 68, 1156-1164.

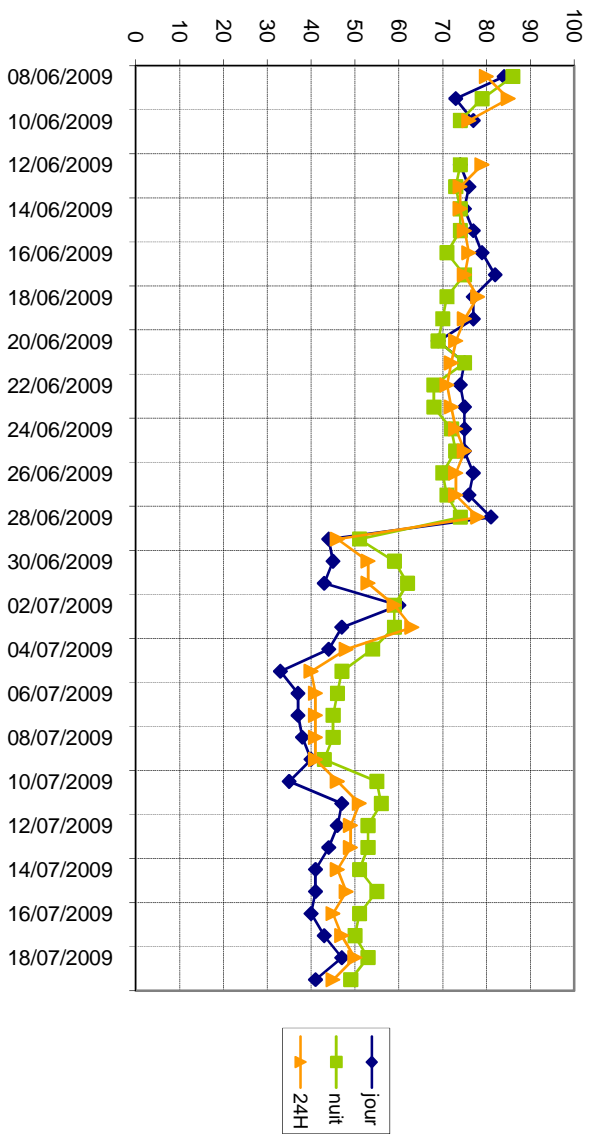
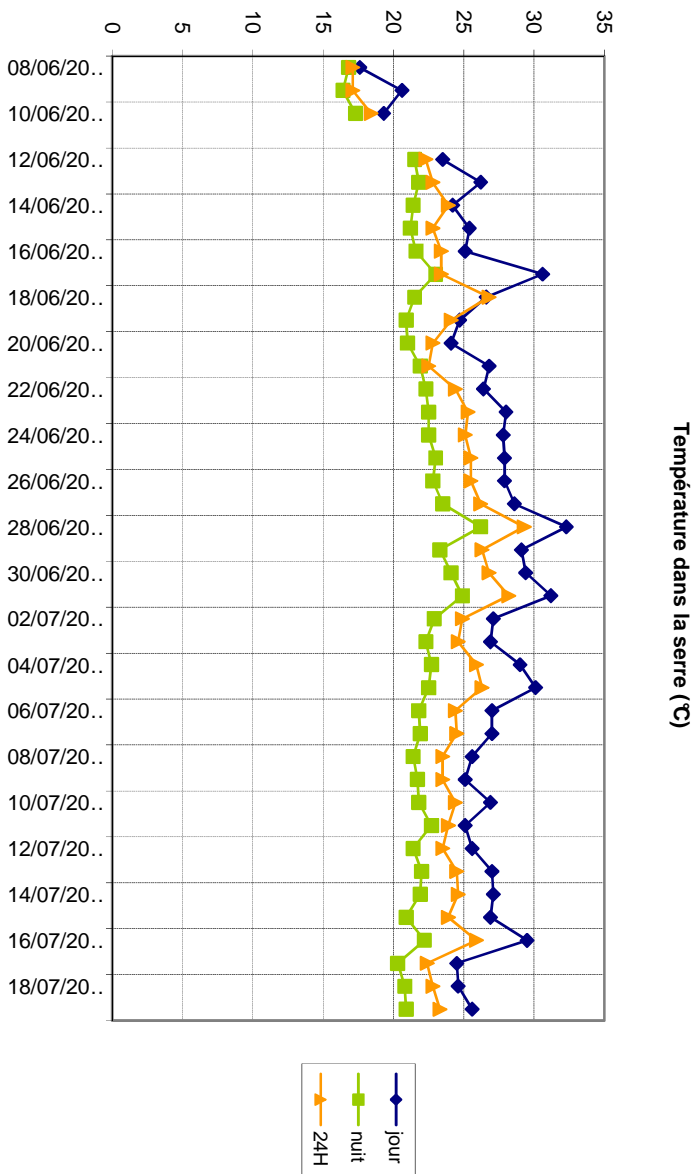
Rossi, M., Antonini, C., Bain, C., Crocetti, P., Denninger, C., James, P., Le Brun Keris, N., Tramier, R. et Tranchefort, J., 2001. Méthode d'essai d'efficacité pratique de fongicides destinés à combattre l'oïdium du rosier *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Desm.). Commission des Essais Biologiques, méthode n°117, 15p.

Scarito G., Salamone A., Vito Zizzo G., Agnello S., 2005. Use of natural products for the control of powdery mildew of rose plants. ISHS Acta Horticulturae, 751, IV International Symposium on Rose Research and Cultivation.

Silué D., Pajot E., Cohen Y., 2002. Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL- β -amino-n-butanoic acid (BABA). Plant Pathology, 51, 97-102.

Stepp (2008). Efficacité des phytostimulants contre les maladies et ravageurs en cultures ornementales : développement d'une nouvelle stratégie phytosanitaire. Astredhor, Paris, 91 pages. Compte-rendu du programme national STEPP-08PNSDN

Annexe 1 : données climatiques à l'intérieur de la serre



**STIMULATION DES DEFENSES NATURELLES DES PLANTES ET STRESS
ABIOTIQUES : DES INTERACTIONS PAS SI DEFAVORABLES, A EXPLOITER POUR
SECURISER L'EFFICACITE DES SDN !**

B. FAYAUD, E. PAJOT¹

Valinov- *Centre d'Innovation et de Transfert du Végétal Spécialisé* - 3 rue Alexandre
Fleming, 49066 Angers Cedex 1

1: correspondance à emmanuel.pajot@valinov.fr

RESUME

La Stimulation des Défenses Naturelles des Plantes (SDN) apparaît comme une stratégie de protection des cultures séduisante. Cependant, son efficacité semble trop souvent aléatoire notamment lors de la mise en place d'expérimentations de terrain. Aujourd'hui, pour que cette stratégie prenne toute la place qu'elle mérite dans le secteur de la protection intégrée des cultures, le principal enjeu est d'identifier les différents facteurs jouant sur la réceptivité des plantes traitées. Peu de travaux sont conduits sur ce sujet. Obtenus au cours d'un stage de fin d'étude d'une durée de 7 mois, les résultats des premiers travaux d'étude de l'effet d'un stress agronomique du pois, appelé « dégâts d'imbibition », sur l'efficacité de protection d'un éliciteur de référence vis-à-vis de la fusariose du pois seront présentés. Les essais menés ont montré un impact positif des dégâts d'imbibition sur le niveau d'efficacité de l'éliciteur. En effet, le stress abiotique appliqué, en présence du pathogène, a permis de sécuriser l'efficacité de protection du SDN en accélérant la synthèse de métabolites de défenses d'intérêts. La méthodologie développée va permettre de mieux comprendre les interactions potentielles entre stress abiotiques et induction des défenses afin d'optimiser, demain, le positionnement des SDN.

Mots-clés : Eliciteur, SDN, Efficacité, stress abiotiques, pois

AFPP – 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT DISEASES
TOURS, FRANCE, 8 AND 9 DECEMBER 2009

**SENSITIVITY OF *STEMPHYLIUM VESICARIUM* TO THE MOST USED FUNGICIDES TO
CONTROL PEAR BROWN SPOT IN ITALIAN ORCHARDS**

G. ALBERONI, D. CAVALLINI, M. COLLINA, A. BRUNELLI*

*Department of Agri-food Protection and Improvement of the University of Bologna.
Viale G. Fanin, 46, 40127 Bologna, Italy*

* brunelli@agrsci.unibo.it

SUMMARY

In Italy, one of the most important concern for pear growers is the control of pear brown spot, caused by *Stemphylium vesicarium*, also present in some other European countries. Up-to-date knowledge of pathogen sensitivity to the most used fungicides is fundamental for the success of pear brown spot control, especially after the occurrence in northern Italy of a widespread resistance to dicarboximides in the early 1990s and recently of the first case of control failure caused by strobilurin resistance (2006). After several years of *in vitro* sensitivity monitoring we can state that the resistance to dicarboximides is stable or regressing while the resistance to strobilurins is increasing. In a very few cases a cross resistance between dicarboximides and fludioxonil was found whereas a good activity was recorded for dithiocarbamates, despite intense use for about 30 years. After some years of applications, *S. vesicarium* sensitivity to boscalid is still comparable to baseline values.

Key-words : *Stemphylium vesicarium*, pear, fungicides, resistance, brown spot

RÉSUMÉ

**SENSIBILITÉ DE *STEMPHYLIUM VESICARIUM* AUX FONGICIDES LES PLUS UTILISÉS
DANS LE CONTRÔLE DE LA STEMPHYLIOSE DU POIRIER EN ITALIE**

La préoccupation majeure des producteurs de poires en Italie est le contrôle de la stemphyliose, causée par *Stemphylium vesicarium*, présente aussi dans d'autres pays de l'Europe. Un état des lieux actualisé de la sensibilité du pathogène aux fungicides les plus utilisés est fondamentale pour contrôler cette maladie, spécialement après l'apparition dans l'Italie du nord d'une résistance généralisée aux dicarboximides au début des années 90 et plus récemment (2006) du premier échec du contrôle de la stemphyliose du à résistance aux strobilurines. Après plusieurs années de monitoring de la sensibilité de *S. vesicarium in vitro* nous avons pu observer que la résistance aux dicarboximides est stable ou en régression alors que la résistance aux strobilurines est en augmentation. Pour quelques souches, une résistance croisée a été observée entre les dicarboximides et le fludioxonil. Une bonne activité a été montrée par les dithiocarbamates, utilisés depuis à peu près 30 ans. Après quelques années d'application la sensibilité de *S. vesicarium* au boscalid n'a pas varié.

Mots-clés : *Stemphylium vesicarium*, poirier, fungicides, résistance, stemphyliose

INTRODUCTION

In Italy the most important fungal disease of pear is brown spot, caused by *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simm., a necrotrophic fungus specific for some pear cultivars, among them the most cultivated in Italy such as Abbé Fétel and Conference. Many treatments are required from petal fall to fruit ripening to avoid the heavy yield losses, which can reach up to 90% of the production in the worst cases. This pathogen therefore has economic importance in pear-growing areas in Italy but also in other European countries such as Spain, Portugal, France, The Netherlands and Belgium (Llorente & Montesinos, 2006). The most commonly used fungicides are dithiocarbamates (mainly thiram), iprodione (the most used procymidone is no longer allowed since 2007), tebuconazole, strobilurins, boscalid and the ready mixtures fludioxonil+cyprodinil and pyraclostrobin+boscalid (Ponti *et al.*, 1996; Brunelli *et al.*, 2004). Besides their environmental and economic impact, the intense use of fungicides led to the occurrence of resistance phenomena as reported for dicarboximides in the early 1990s (Brunelli *et al.*, 1997) and for strobilurins in 2006 (Collina *et al.*, 2007). In the case of dicarboximides, besides sensitive isolates, 3 different resistant phenotypes were characterised: S₊ low resistant phenotype; R₁ phenotype moderately resistant to iprodione and highly resistant to procymidone and R₂ highly resistant phenotype (Alberoni *et al.*, 2005). A cross resistance between dicarboximides and fludioxonil was observed only for this last phenotype, which is very rare in the field (Alberoni *et al.*, 2008a). Up-to-date knowledge of the sensitivity of *S. vesicarium* populations within orchards to fungicides is fundamental for the application of only the truly effective compounds and for prompt detection of the first resistant isolates to avoid their outbreak in the field with remarkable yield losses, as happened for dicarboximides. In the case of strobilurins, resistance arose 8 years after their market introduction, causing disease control problems only in one orchard where these fungicides were applied for several years with more than the suggested number of applications (Collina *et al.*, 2007).

The aim of this paper is to update the knowledge on the sensitivity of a large number of isolates to the most used fungicides in Italy such as fludioxonil, dithiocarbamates, boscalid and especially dicarboximides and strobilurins, in which resistance problems were already known. For these two groups of fungicides, quick and easy assays were carried out (on the basis of previous studies) to assess a greater number of isolates and to create an increasingly more reliable picture of *S. vesicarium* population sensitivity and to promptly identify any resistant isolates.

MATERIALS AND METHODS

ORIGIN OF ISOLATES

Fruits with brown spot symptoms were collected in several areas of the Po valley from different pear cultivars, mainly Abbé Fétel and Conference, but also Doyenne, Kaiser, S. Maria and Passe Crassane, both in orchards in which disease control was unsatisfactory and in those where it was effective. For each orchard more than 15 fruits were considered, after 2% sodium-hypochlorite disinfection (1 min) to isolate the pathogen on V8 agar (20% V8 (vegetable juice, Campbell's Grocery Ltd), 1.5% technical agar (Agar Grade A, Becton Dickinson), 0.4% calcium carbonate (Fluka) in dH₂O) amended with 50 mg/l of streptomycin sulphate (Sigma Aldrich).

SENSITIVITY TO DICARBOXIMIDES

The identification of the phenotypes with different levels of sensitivity to dicarboximides (sensitive S and S₊, R₁ and R₂ resistant ones) was performed on 3217 isolates (collected between 2004-2008) observing mycelial growth at different discriminatory concentrations. Three concentrations were used: 10 mg/l of procymidone (SUMISCLEX, 50% WG, Isagro), 50 mg/l of iprodione (ROVRAL, 50% WP, Basf) and 50 mg/l of dicloran (active ingredient, Sigma Aldrich). The phenotypes can be distinguished at these concentrations on V8 agar after 3 days at 23°C and 12 hours light/dark, because S₊ resistant isolates are able to grow only at the concentration of dicloran, while R₁ resistant isolates grow with both dicloran and

procymidone and R₂ resistant isolates with dicloran, procymidone and iprodione. No mycelial growth is observed in the sensitive isolates at any concentration apart from the untreated control.

SENSITIVITY TO FLUDIOXONIL

Mycelium growth assays on V8 agar at the concentrations of 0, 0.25, 0.5, 2, 5, 10 mg a.i. /l (SAPHIRE, 50% WG, Syngenta) (higher concentrations from 50 to 2000 mg/l were used for R₂ resistant isolates) were carried out on 177 *S. vesicarium* isolates collected between 2003 and 2007 in orchards where fludioxonil was applied or not. After 3 days of incubation at 23°C and 12 hours light/dark, the evaluation considered two orthogonal diameters for each colony. EC₅₀ values were obtained with the linear regression between probit efficacy and the logarithm of concentrations.

SENSITIVITY TO STROBILURINS

The sensitivity to strobilurins was investigated on 24 populations collected before the introduction of these compounds in pear brown spot control and on 461 populations collected from 2002 to 2008. The populations were obtained mixing the sporulation of the isolates obtained from a single spot of each fruit collected in the same orchard.

Conidial germination was observed on 1.5% water agar plates amended with the discriminatory concentration of 0.5 mg/l of kresoxim-methyl, trifloxystrobin or pyraclostrobin (active ingredients, Sigma Aldrich; stock solution dissolved in acetone) in the presence of 100 mg/l of SHAM (salicylhydroxamic acid, Sigma Aldrich; stock solution dissolved in methanol), which is an alternative oxidase inhibitor. The evaluation was performed after 5 hours of incubation at 23°C counting the percentage of germinated conidia over 100 conidia compared to an unamended control. A population was considered to be sensitive when no germinated conidia were observed at the discriminatory concentration; otherwise it was considered to be resistant.

SENSITIVITY TO DITHIOCARBAMATES

Conidial germination was observed on 1.5% water agar plates amended with concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5, 3, 5 mg/l of active ingredients of thiram and ziram (stock solutions dissolved in acetone). The evaluation was performed after 3, 5 and 24 hours of incubation at 23°C counting the percentage of germinated conidia over 100 conidia compared to an unamended control. EC₅₀ values were obtained with the linear regression between probit efficacy and the logarithm of concentrations.

SENSITIVITY TO BOSCALID

Mycelium growth assays on YBA medium (10g yeast extract, 10g bacto peptone, 20g sodium acetate, 15g agar in 1l dH₂O) at the concentrations of 0, 0.05, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/l of boscalid (Sigma Aldrich; stock solutions dissolved in acetone) were carried out on 150 isolates collected in orchards with and without boscalid treatments. After 3 days of incubation at 23°C and 12 hours light/dark, the evaluation considered two orthogonal diameters of each colony. EC₅₀ values were obtained with the linear regression between probit efficacy and the logarithm of concentrations.

RESULTS

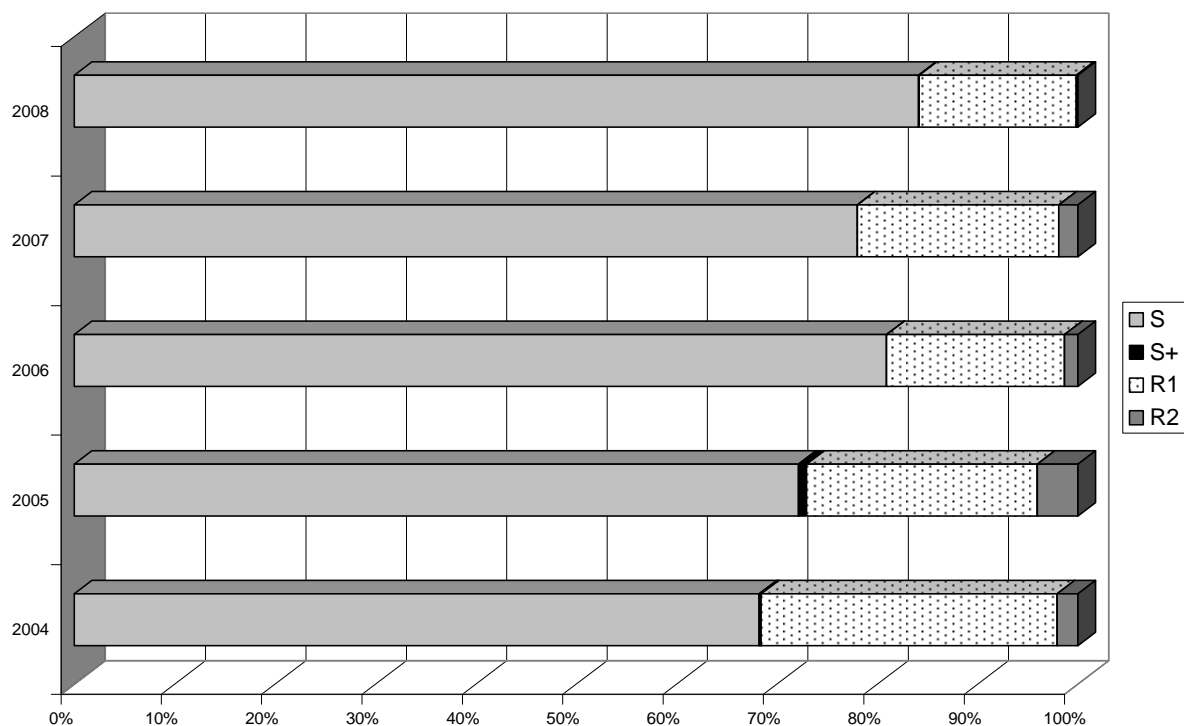
SENSITIVITY TO DICARBOXIMIDES

After several years of monitoring *S. vesicarium in vitro* sensitivity we can state that the resistance to dicarboximides is stable or regressing. The most frequent phenotype was indeed the sensitive one and the number of resistant isolates detected in the orchards of the Po valley decreased over the years as can be observed from 2004 to 2008 (figure 1). The majority of the resistant isolates belonged in all the years to the R₁ phenotype, while the R₂ resistant isolates were rare and the S₊ phenotype even less frequent.

This trend was confirmed by the distribution of these different phenotypes within each population collected in each orchard. The majority of the populations are indeed formed only by sensitive isolates especially in 2008, while populations with only resistant isolates are rarer. The mixed populations with both resistant and sensitive isolates ranged from 24 to 28.6% (table I).

Figure 1: Frequency of phenotypes of *S. vesicarium* with different levels of sensitivity to dicarboximides (S= sensitive, S₊= low resistant to procymidone and iprodione, R₁= highly resistant to procymidone and moderately resistant to other dicarboximides, R₂= highly resistant to all dicarboximides). The evaluation was on the mycelial growth of 3217 isolates belonging to 449 populations collected in the Po valley between 2004 and 2008.

Figure 1: Fréquence de phénotypes de *S. vesicarium* avec différente sensibilité aux dicarboximides (S= sensible, S₊= résistance faible, R₁= résistance forte à la procymidone et moyenne aux autres dicarboximides, R₂= résistance forte à toutes les dicarboximides). L'évaluation a été sur la croissance mycélienne de 3217 souches appartenant à 449 populations collectées dans la plaine du Pô de l'année 2004 à l'année 2008.



In some cases where, after suspension of dicarboximide treatments for a number of seasons, the complete regression of the resistance was demonstrated to be stable for several years through *in vitro* tests, the use of dicarboximides was reintroduced with good results, as also confirmed in an experimental trial (Alberoni *et al.*, 2008b). Nevertheless in one case a few resistant isolates were once again detected within the population, although with a low frequency that did not cause failures in pear brown spot control.

Table I – Characterisation of the 449 populations of *S. vesicarium* collected in 2004-2008 in different areas of the Po valley, based on their phenotypic composition related to dicarboximide sensitivity on mycelial growth (S= sensitive, S₊= low resistant to procymidone and iprodione, R₁= highly resistant to procymidone and moderately resistant to other dicarboximides, R₂= highly resistant to all dicarboximides). The frequency is expressed as a percentage.

Tableau I – Caractérisation des 449 populations de *S. vesicarium* collectées pendant 2004-2008 in différentes zones de la plaine du Pô basée sur leur composition phénotypique relative à la sensibilité aux dicarboximides sur la croissance mycélienne (S= sensible, S₊= résistance faible, R₁= résistance forte à la procymidone et moyenne aux autres dicarboximides, R₂= résistance forte à toutes les dicarboximides). La fréquence est montrée comme pourcentage.

| Year of sampling | No. of tested populations | % of populations with only sensitive isolates (S) | % of populations with only resistant isolates | | % of populations with both sensitive and resistant isolates | | |
|------------------|---------------------------|---|---|---|---|------------------------------|--|
| | | | R ₁ phenotype | S ₊ , R ₁ , R ₂ phenotypes | S, R ₁ phenotypes | S, R ₂ phenotypes | S, S ₊ , R ₁ , R ₂ phenotypes |
| 2004 | 108 | 57.4 | 13.9 | 1.8 | 26 | 0.9 | 0 |
| 2005 | 75 | 61.3 | 10.7 | 4 | 17.3 | 2.7 | 4 |
| 2006 | 72 | 65.3 | 4.2 | 5.5 | 23.6 | 0 | 1.4 |
| 2007 | 42 | 57.1 | 11.9 | 2.4 | 26.2 | 0 | 2.4 |
| 2008 | 152 | 69 | 3.3 | 0 | 25.7 | 0.7 | 1.3 |

SENSITIVITY TO FLUDIOXONIL

The isolates sensitive to dicarboximides and the R₁ and S₊ resistant isolates showed low EC₅₀ values to fludioxonil while the R₂ isolates had values almost always greater than the highest concentration tested, although the range was shifted up to 50-2000 mg/l (table II). The cross resistance between dicarboximides and phenylpyrroles was therefore confirmed in *S. vesicarium* only in the isolates that were highly resistant to all dicarboximides (R₂) while a greater number of R₁ isolates still showed a sensitivity comparable to isolates sensitive to dicarboximides, thus no cross resistance was observed in this case just like in the case of S₊ resistant isolates.

Table II – Sensitivity to fludioxonil of *S. vesicarium* isolates of the four phenotypes with different levels of sensitivity to dicarboximides (S, S₊, R₁, R₂).

Tableau II – Sensibilité au fludioxonil des souches de *S. vesicarium* appartenant aux quatre phénotypes avec différente sensibilité aux dicarboximides (S, S₊, R₁, R₂).

| Phenotypes to dicarboximides | No. of isolates | EC ₅₀ geometric mean (mg/l) | EC ₅₀ min value (mg/l) | EC ₅₀ max value (mg/l) |
|------------------------------|-----------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S sensitive | 106 | 0.95 | 0.1 | 3.95 |
| S ₊ resistant | 4 | 1.27 | 0.83 | 1.7 |
| R ₁ resistant | 56 | 1 | 0.08 | 3.51 |
| R ₂ resistant | 11 | >2000 | 544 | >2000 |

SENSITIVITY TO STROBILURINS

An extensive monitoring programme started in 2002 made it possible to follow the evolution of *S. vesicarium* sensitivity to strobilurins, as shown in figure 2.

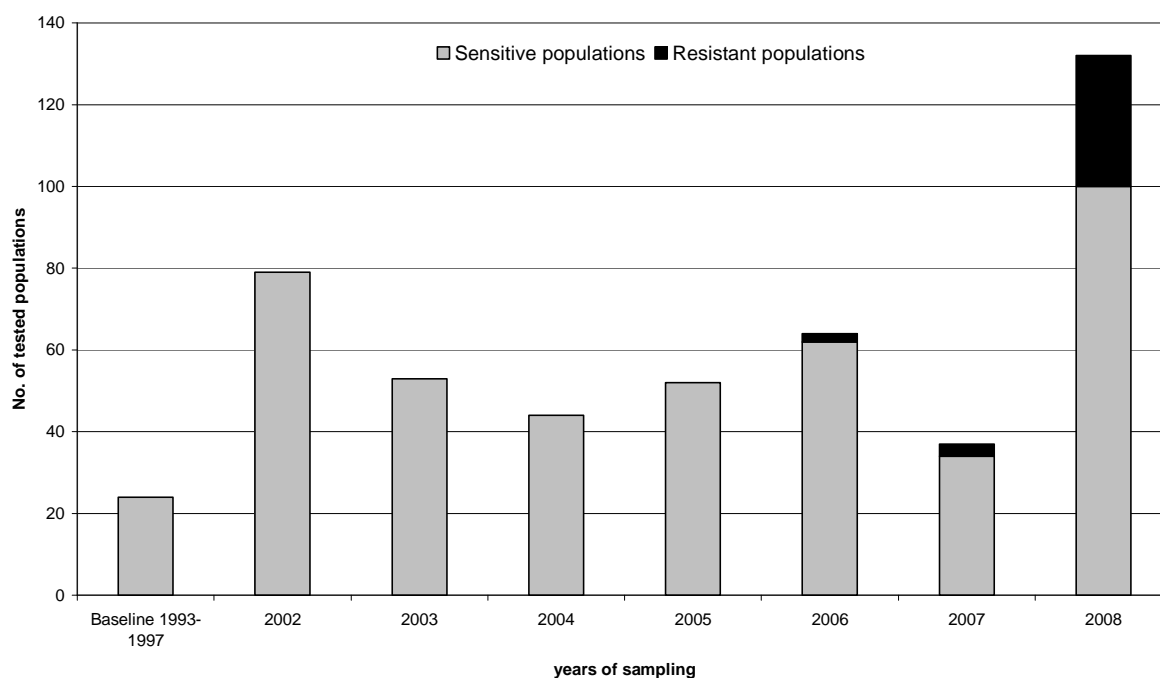
Until 2006 (8 years after the commercial introduction of strobilurins in Italy on pear) no germination was observed at 0.5 mg/l of kresoxim-methyl, trifloxystrobin and pyraclostrobin

as in the populations considered for the baseline. In 2002-2004, the corresponding EC₅₀ values ranged from 0.006 to 0.06 mg/l for kresoxim-methyl and from 0.003-0.06 mg/l for trifloxystrobin and were fully comparable to baseline EC₅₀ values (0.01 to 0.03 mg/l for kresoxim-methyl) (Alberoni *et al.*, 2008a).

Unfortunately, in 2006 two populations showed a high germination rate at this concentration (50-90%), one of them linked to control failure in the field and both with the presence of G143A substitution (Collina *et al.*, 2007). In the following year the same two populations confirmed their lower sensitivity together with a new population in another orchard. These three orchards were located sufficiently far away from each other to exclude contamination from a single centre in favour of the hypothesis of a co-evolution of resistant isolates caused by 4-6 applications of strobilurins for 5-7 years. In 2008 we were able to observe an increase of the resistance phenomenon, because in 32 out of 132 populations conidial germination was observed at 0.5 mg/l of the three strobilurins. Nevertheless, only in a few cases were the resistant isolates found in *in vitro* assays linked to control failures in the field, probably because of their low frequency in the population and a low severity and incidence of the disease.

Figure 2: Sensitivity to strobilurins of *S. vesicarium* populations collected before market introduction of these fungicides (baseline 1993-1997) and then in orchards where they were more or less used or not used.

Figure 2 : Sensibilité aux strobilurines des populations de *S. vesicarium* collectées avant l'introduction sur le marché de ces fungicides (baseline 1993-1997) et après en vergers où ils on été plus ou moins (ou pas) utilisés.



SENSITIVITY TO DITHIOCARBAMATES

The samples collected in orchards where a different number of treatments with dithiocarbamates were applied both in the year of sampling and in the previous years showed EC₅₀ values ranging from 0.21 to 1.97 mg/l for thiram (36 isolates) and from 0.47 to 2.08 mg/l for ziram (25 isolates) after 3 hours of incubation. These sensitivity values were comparable to those obtained in two isolates collected in organic orchards, i.e. untreated with dithiocarbamates (1.04 < EC₅₀ < 1.21 mg/l for thiram and 0.99 < EC₅₀ < 1.05 mg/l for ziram), which are used as reference values in the absence of real baseline values. The same trend was also observed in the following evaluations. No sensitivity shifts or reductions in efficacy were

then observed, although these fungicides have been applied for many years and with a great number of treatments since the early 1980s.

SENSITIVITY TO BOSCALID

The isolates collected in 2007-2008 (table III) both in orchards treated and not treated with boscalid showed EC₅₀ values very similar to baseline values obtained before the use of this fungicide against brown spot on pear (Alberoni *et al.*, 2009).

Table III - Sensitivity to boscalid of *S. vesicarium* isolates collected before boscalid introduction in pear brown spot control (baseline 1995-2006) and of isolates collected between 2007 and 2008. The sensitivity was evaluated on mycelial growth as EC₅₀.

Tableau III - Sensibilité au boscalid des souches de *S. vesicarium* collectées avant l'introduction du boscalid sur poirier pour le contrôle de la stemphyliose (baseline 1995-2006) et des souches collectées de l'année 2007 à l'année 2008. La sensibilité a été évaluée sur la croissance mycélienne comme CI₅₀.

| Years of sampling | Orchards | no. of tested samples | EC ₅₀ (mg/l) |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1995-2006 | baseline | 57 | 0.11-0.81 |
| 2007-2008 | not treated with boscalid | 58 | 0.07-0.97 |
| | treated with boscalid | 92 | 0.12-0.98 |

DISCUSSION AND CONCLUSION

This extensive monitoring study gives a reliable picture of the sensitivity of *S. vesicarium* and its evolution over time to the main fungicide groups used to control it in Italy.

The well-known dicarboximide resistance is the main concern in pear brown spot control, even if the use of these fungicides was reduced after the withdrawal of procymidone (Plant Protection Products Directive 91/414/EEC). Although the majority of pathogen isolates collected in 2004-2008 were sensitive, in all the pear growing areas monitored in the Po valley, resistant isolates were found, albeit with a decreasing frequency over the years. In particular, the most widespread resistant phenotype was confirmed to be highly resistant to procymidone and moderately resistant to iprodione (R₁), as observed in previous studies (Alberoni *et al.*, 2008a). The other two resistant phenotypes (S₊ e R₂) were found very rarely and always in populations where R₁ and/or sensitive phenotypes were present. In a few cases, where iprodione was reintroduced in pear brown spot control after an ascertained complete regression of dicarboximide resistance, it showed good performance as also confirmed by a field trial (Alberoni *et al.*, 2008b). In accordance with these results a reintroduction of this compound can be considered, although the anti-resistance strategy must be respected because new resistant isolates can be more easily selected.

The resistance to fludioxonil was confirmed to be limited to the isolates highly resistant to dicarboximides (R₂), which are very rare and thus do not represent a true concern for pear growers. *In vitro* study and pathogenicity tests *in vivo* did not show fitness penalty for this phenotype compared to the other resistant phenotypes and the sensitive one (Alberoni *et al.*, 2006 and unpublished data). These results were similar to *Alternaria brassicicola* isolates highly resistant to both dicarboximides and fludioxonil (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004) and supported by the observation of the persistence of *S. vesicarium* R₂ isolates in one orchard even 5 years after dicarboximide treatment interruption. Molecular studies on the histidine kinase gene highlighted that this phenotype has a single point mutation which causes an amino acid change in a different position (histidine-kinase domain) of the protein histidine kinase respect to the other resistant phenotypes. The most frequent R₁ phenotype and the S₊ phenotype have, indeed, respective single point mutations in the coil coiled region, which is probably directly involved in dicarboximide binding site (Cui *et al.*, 2002); in this case fludioxonil resistance in *S. vesicarium* is not involved (Alberoni *et al.*, unpublished data). The

dicarboximide procymidone was the most used fungicide and, probably, it was able to select mainly the R₁ resistant isolates, while very rarely the R₂ phenotype. Nevertheless the selection of the latter does not seem linked to the use of iprodione or fludioxonil, maybe because these two compounds were not much used in the field. Their role in the selection of R₂ resistant isolates might be clarified in the following years, because sometimes they have replaced the use of procymidone since 2007.

About ten years after their market introduction in Italy against pear brown spot, strobilurins are still effective fungicides for the control of *S. vesicarium* because the sensitivity of the pathogen was generally still comparable to baseline values. This trend was quite in contrast with what happened for other pathogens, where the resistance occurred only a few years after their introduction in the field (Heaney *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003). Nevertheless, the first resistant isolates occurred after several treatments for many years, and the populations with these isolates are increasing even if the occurrence of control failure is still rare. Anti-resistance strategies are therefore fundamental to keep the phenomenon limited and under control. In *S. vesicarium* the strobilurin resistance seems to be linked to G143A substitution in cytochrome b, as demonstrated through the sequencing of portion of the corresponding gene in the resistant isolates collected in 2006 and 2007 (Alberoni *et al.*, unpublished data), in accordance with several other pathogens (Heaney *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; Koller *et al.*, 2004). Further studies are in progress on the more numerous resistant isolates collected in 2008 to confirm the same resistance mechanism considering the high level of resistance also observed in these cases, which is typical of the presence of G143A substitution.

No changes in sensitivity, compared to samples from untreated orchard, were observed in the case of the dithiocarbamates in spite of their intense use for about 30 years, but in accordance with their low risk of resistance.

Also boscalid, which has been registered for pear for only two years but is considered to have a medium risk of resistance due to its mono-site activity (Stammli *et al.*, 2007; www.frac.info), did not show a shift from baseline sensitivity. Nonetheless, resistant isolates were detected in *Alternaria alternata* (Avenot & Michailides, 2007) after only a few years of boscalid applications.

Finally, no cross-resistance was observed among the groups of fungicides apart from the case of R₂ dicarboximide resistant isolates and fludioxonil, although a multiple resistance (to dicarboximide and strobilurins) was observed in 7 isolates collected in 2008 out of 3217 isolates tested in the monitoring programme.

This picture of *S. vesicarium* sensitivity to fungicides highlights once again the importance of anti-resistance strategies, especially concerning the number of applications and the use of mixtures and/or alternating fungicides with different mechanisms of action. This is the basis for the management of iprodione and strobilurin resistance and to delay the possible occurrence of boscalid practical resistance as long as possible.

The constant monitoring of *S. vesicarium* sensitivity also has an important role because it led to the prompt detection of the possible occurrence of resistant isolates in order to monitor resistance frequency and, if necessary, to suspend the fungicide treatments so as to avoid a strong selection that could lead to yield losses. In these cases, after some years of suspension these compounds should be re-introduced effectively, as happened for dicarboximides.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Emilia Romagna Region (L.R. 28/98), Lombardy Region and BASF Italia Srl - Divisione Agro. We thank the local technical assistance for the help in collecting pear samples.

REFERENCES

- Alberoni G., Cavallini D., Collina M., Brunelli A., 2009 - Baseline sensitivity of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of pear brown spot, to boscalid. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University*. In press.
- Alberoni G., Collina M., Brunelli A., 2006 - Biological characteristics of dicarboximide resistant isolates of *Stemphylium vesicarium* from Italian pear orchards. *IOBC/wprs Bulletin*, 29 (1), 109-115.
- Alberoni G., Collina M., Cavallini D., Brunelli A., 2008a - *Stemphylium vesicarium* resistance to fungicides on pear in Italy. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*, eds. Dehne H.W., Deising H.B., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E. and Lyr H. Bonn, Germany pp. 167-172.
- Alberoni G., Collina M., Cavallini D., Brunelli A., Allegri A., Fagioli L., Lombardi L., Pelliconi F., 2008b - Verifiche di campo e di laboratorio sulla sensibilità di *Stemphylium vesicarium* ai fungicidi analoghi delle strobilurine e dicarbossimidici. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 165-172.
- Alberoni G., Collina M., Pancaldi D., Brunelli A., 2005 - Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 211-219.
- Avenot H.-F., Michailides T.-J., 2007 - Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease*, 91, 1345-1350.
- Brunelli A., Gherardi I., Adani N., 1997 - Ridotta sensibilità di *Stemphylium vesicarium*, agente causale della maculatura bruna del pero ai fungicidi dicarbossimidici. *Informatore Fitopatologico*, 47, 44-48.
- Brunelli A., Gianati P., Berardi R., Flori P., Alberoni G., Pancaldi D., 2004 - Verifiche sperimentali sull'attività di fungicidi contro la maculatura bruna del pero (*Stemphylium vesicarium*). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 109-114.
- Collina M., Alberoni G., Brunelli A., 2007 - First occurrence of strobilurin-resistant isolates of *Stemphylium vesicarium* in an Italian pear orchard. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University*, 72, 735-738.
- Cui W., Beever R.-E., Parkes S.-L., Weeds P.-L., Templeton M.-D., 2002 - An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology*, 36, 187-198.
- Heaney S.-P., Hall A.-A., Davies S.-A., Olaya G., 2000 - Resistance to fungicides in the Qol-STAR cross-resistance group: current perspectives. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases*, pp. 755-762.
- Iacomi-Vasilescu B., Avenot H., Bataillé-Simoneau N., Laurent E., Guénard M., Simoneau P., 2004 - *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*, 23, 481-488.
- Ishii H., Freaije B.-A., Sugiyama T., Noguchi K., Nishimura K., Takeda T., Amano T., Hollomon D.-W., 2001 - Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91, 1166-1171.
- Kim Y.-S., Dixon E.-W., Vincelli P., Farman M.-L., 2003 - Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology*, 93 (7), 891-900.
- Koller W., Parker D.-M., Turechek W.-W., Avila-Adame C., 2004 - A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease*, 88, 537-544.
- Llorente I., Montesinos E., 2006 - Brown spot of pear: an emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90, 1368-1375.
- Ma Z., Felts D., Michailides T.-J., 2003 - Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77, 66-74.
- Ponti I., Brunelli A., Tosi C., Cavallini G., Mazzini F., 1996 - Aggiornamenti sull'attività dei fungicidi contro la maculatura bruna del pero. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 165-172.
- Stammler G., Brix H.-D., Glättli A., Semar M., Schoefl U., 2007 - Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases* pp. 40-45.

**SITUATION DE LA RÉSISTANCE DE L'OÏDIUM DU FRAISIER (*PODOSPHAERA
APHANIS*) AUX FONGICIDES IDMs EN FRANCE**

M.-F. CORIO-COSTET¹, M.-C. DUFOUR¹, D. BLANCARD¹, A. SOMBARDIER²

1: INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard bourleaux, BP81, 33883, Villenave
d'Ornon, France

2: CTIFL, Centre de Lanxade, Bergerac, 24130, Prigonrieux, France

RESUME

Une méthode permettant d'évaluer la sensibilité aux fongicides de plusieurs souches d'oïdium du fraisier (*Podosphaera aphanis*) collectés au cours des années 2006-2007 dans différents bassins de production en France a été mise au point sur disques de feuilles de fraisier en survie. Les ED₅₀ obtenus pour le myclobutanil varient de moins de 0,1 à 14, 67 mg/L et celles pour le penconazole sont comprises entre 0,04 et 4,2 mg/L. Un facteur supérieur à 100 sépare la souche la plus sensible des plus résistantes. Des doses discriminantes, respectivement de 5 et 2 mg/L permettent de sélectionner les individus les plus résistants et de suivre l'évolution de la sensibilité des populations au champ. Une analyse de la résistance montre qu'il existe une résistance croisée positive entre les souches résistantes au myclobutanil et au penconazole. 73,9% des souches testés sont résistantes à l'un des deux fongicides IDMs et 47,8% montrent une sensibilité réduite au deux molécules

Mots-clés : Oïdium, fongicide IDM, fraise, résistance croisée, myclobutanil , penconazole

SUMMARY

**STATEMENT OF STRAWBERRY POWDERY MILDEW (*PODOSPHAERA APHANIS*)
RESISTANCE TO DMI FUNGICIDES IN FRANCE**

In this study, a simple bioassay on leaf discs was used to establish the state of fungicide sensitivity distribution of strawberry powdery mildew (*Podosphaera aphanis*) to two triazole DMI fungicides, myclobutanil and penconazole. The distribution of the EC₅₀ of 23 isolates shows a progressive variation depending on the different mechanisms involved in the resistance acquisition process. Discriminatory doses (5 or 2 mg/L) of myclobutanil and penconazole were selected to identify highly resistant individuals or detect significant shifts in the field populations. 73.9% of isolates were less sensitive to a DMI and 47.8% exhibited less sensitivity to both fungicides. This is the first study to measure *P. aphanis* sensitivity to DMI fungicides in France.

Keywords: cross-resistance, powdery mildew, DMI fungicide, strawberry

INTRODUCTION

L'oïdium du fraisier, causé par le parasite obligatoire *Podosphaera aphanis* (Wallr.) [syn. *Sphaerotheca macularis* f. *fragaria* (Harz)], s'avère une maladie préoccupante qui affecte tous les organes aériens du fraisier. En France, comme dans toute l'Europe, les cultures hors-sol sous tunnels plastiques ou en serres sont des contextes culturels, qui favorisent malheureusement le développement de l'oïdium du fraisier. Ces systèmes de production nécessitent de nombreux traitements fongicides, en particulier sur les variétés remontantes. Actuellement, ils requièrent, comme en Italie, généralement de 6 à 8 traitements par cycle végétatif, parfois jusqu'à 15 (Pertot *et al*, 2008).

Depuis quelques années, de nombreux producteurs de fraises se plaignent de l'incidence des épidémies d'oïdium en culture sous abri, notamment en hors sol, et du manque d'efficacité des traitements anti-oïdium. La mise en oeuvre de ces derniers est devenue pour eux un véritable casse-tête car ils doivent jongler notamment entre le peu de produits homologués et les difficultés d'organiser cette protection en période de récolte. L'une des hypothèses avancées pour expliquer l'émergence de *P. aphanis*, serait une diminution de sa sensibilité aux fongicides les plus utilisés, et en particulier aux fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols de type IDM, qui inhibent une stérol 14α déméthylase (Kuck *et al*, 1995). Nous présentons dans cet article les résultats d'une étude portant sur le comportement, à l'égard de deux fongicides IDMs, de 24 souches d'oïdium du fraisier collectés dans différents contextes et zones de production françaises.

MATERIEL ET METHODE

Collection d'isolats et production d'inoculum

À partir d'échantillons collectés entre décembre 2006 et décembre 2007 sur différents systèmes de production, 24 isolats monospores ont été obtenus. Tous ont été exposés aux fongicides IDMs (myclobutanil ou penconazole) et proviennent majoritairement de sites sur lesquels des problèmes d'efficacité ont été observés. Les méthodes d'isolement et de multiplication ont été décrites par Willocquet *et al*, en 2008 et Sombardier *et al*, en 2009a, b. Les cultures sont réalisées sur la face abaxiale de feuilles de plants âgés de 2 mois de la variété Darselect.

Détermination de la sensibilité aux fongicides

La méthode a été décrite par Sombardier *et al*, (2009b) et Corio-Costet *et al*, (2009). Des boîtes de Pétri contenant 8 disques foliaires sont pulvérisées avec des solutions de fongicides à différentes concentrations. Les deux triazoles utilisés sont le myclobutanil (2-p-chlorophenyl-2-(1H-1, 2, 4-triazol-1-ylmethyl) hexanenitrile, Systane 12E EW, Dow Agrosiences, 125 g litre⁻¹) et le penconazole (1-(2,4-dichloro- β -propylphenethyl)-1H-1,2,4-triazole, Topaze, EC, Syngenta Agro, 100 g litre⁻¹). Les concentrations standard de myclobutanil varient de 0 à 15 mg de matière active par litre. Selon la sensibilité des souches des gammes plus importantes de 0 à 40 mg/L ou plus faibles de 0 à 3 mg/L ont également été testées. La gamme de concentration à progression géométrique standard pour le penconazole s'étend entre 0 et 10 mg de matière active par litre, avec des gammes supplémentaires ajustées selon la sensibilité des souches variant de 0 à 20 mg/L et de 0 à 3 mg/L.

Après une nuit, les disques sont séchés sous une hotte puis inoculés par saupoudrage de conidies de chaque isolat à la concentration de 400 à 600 conidies par cm². Les boîtes sont ensuite mises en incubation durant 8 jours dans une chambre climatique à 22°C. Le développement de l'oïdium est déterminé en appréciant le pourcentage de recouvrement de chaque disque (8) pour chaque concentration de fongicide. La valeur moyenne des 8 répétitions est utilisée pour calculer la croissance relative [CR = (valeur obtenue pour une concentration/ valeur du témoin sans traitement) x 100]. Des courbes doses réponses pour chaque individu sont réalisées et utilisées pour déterminer la ED₅₀ (dose inhibant 50% de la

croissance mycélienne) et la CMI (concentration minimal inhibitrice) calculée comme décrit par Délye *et al*, 1997. Les expériences sont au minimum dupliquées.

Les analyses statistiques ont été réalisées comme décrit par Sombardier *et al*, (2009b).

(ANOVA, et comparaison des EC₅₀ par un Tukey- *t*-test avec $P < 0.05$). La résistance croisée a été évaluée par une analyse de régression et un facteur relatif de résistance a été calculé.

RESULTATS

Sensibilité au myclobutanil

Les valeurs des ED₅₀ révèlent une variabilité importante de la sensibilité des souches au myclobutanil avec des valeurs variant de 0,1 mg/L à 14,67 mg/L (tableau I).

Tableau I : Origine et sensibilité des différentes souches de la collection au myclobutanil et au penconazole.

Table I: Origin and sensitivity of different isolates to myclobutanil and penconazole

| Nom des souches ^a | Département d'Origine | Système de production ^b | Concentration de Myclobutanil (mg litre ⁻¹) | | Concentration de Penconazole (mg litre ⁻¹) | |
|------------------------------|-----------------------|------------------------------------|---|-------|--|------|
| | | | ED ₅₀ | CMI | ED ₅₀ | CMI |
| ABA | Vaucluse | Hors-sol | 3.75 ^c | 9.0 | 1.25 ^d | 2.85 |
| AVI | Dordogne | Hors-sol | 0.5 | 2.0 | 0.58 | 1.8 |
| ART | Lot et Garonne | Hors-sol | 3.9 | 10.75 | 2.2 | 6.6 |
| BRA | Loir et Cher | Hors-sol | 1.3 | 3.0 | 1.48 | 2.6 |
| BRE | Vaucluse | Hors-sol | 5.3 | 13.75 | 1.9 | 6.0 |
| CAM | Lot et Garonne | Hors-sol | 2.6 | 5.5 | 0.9 | 2.5 |
| DAR1* | Lot et garonne | Champ ouvert | 4.75 | 15 | 2 | 3.0 |
| DAR18* | Lot et garonne | Champ ouvert | 14.67 | 31 | 3.5 | 9.0 |
| DOU* | Dordogne | Hors-sol | 8.9 | 15.5 | 1.3 | 2.0 |
| GUI | Vaucluse | Hors-sol | 1.15 | 2.35 | 0.9 | 2.1 |
| HOR | Dordogne | Hors-sol | 4.25 | 10.75 | 0.8 | 2.0 |
| LBP* | Landes | Champ ouvert | 4.8 | 12.5 | 4.2 | 9.5 |
| LI1* | Lot et Garonne | Hors-sol | 3.6 | 8.5 | 2.45 | 5.15 |
| MAR* | Lot et Garonne | Champ ouvert | 5.5 | 16 | 2.55 | 10 |
| MEG | Vaucluse | Champ s/abri | 1.0 | 2.35 | 0.43 | 1.0 |
| MEP | Vaucluse | Champ s/abri | 0.8 | 3 | 0.3 | 0.8 |
| PAJ | Lot et Garonne | Hors sol | 3.0 | 6.9 | 2.9 | 3.9 |
| PES | Vaucluse | Champ s/abri | <0.1 | <0.1 | 0.04 | 0.15 |
| SAG | Lot et Garonne | Hors sol | 1.7 | 5.33 | 0.28 | 0.5 |
| SIL | Lot et Garonne | Hors sol | 2.0 | 6.5 | 0.4 | 1..0 |
| SOC* | Vaucluse (84) | Hors sol | 6.45 | 26.0 | 3.2 | 7.9 |
| SOD* | Vaucluse | Hors sol | 13.1 | 21.5 | - | - |
| SOU* | Vaucluse | Hors sol | 10 | 23.0 | 2.1 | 9.8 |
| VIR | Vaucluse | Hors sol | 1.8 | 5.0 | 2.0 | 5.0 |

^a : Les souches proviennent de cultures dans lesquelles des pertes d'efficacité ont été observées à plusieurs reprises en situation de traitements répétés avec des DMLs ^b : Toutes les souches sont issues de cultures sous abri, excepté les quatre souches DAR, DAR18, LBP, et MAR qui proviennent de plein champ ouvert. ^c : La déviation standard des ED₅₀ du myclobutanil est comprise entre 0 et 3.18 mg litre⁻¹, avec une déviation moyenne correspondant à 20.44% de chaque valeur. ^d : La déviation standard des ED₅₀ du penconazole est comprise entre 0.005 et 0.85 mg litre⁻¹ avec une déviation moyenne correspondant à 13.51% de chaque valeur.

Trois groupes significativement différents ont été identifiés (tableau II) :

- un premier groupe A avec 6 souches (PES, AVI, MEP, MEG, GUI et BRA) possédant une CMI moyenne de 2,13 mg/L. À noter la présence d'une souche très sensible PES qui exhibe une CMI plus de 20 fois inférieure à celles des autres souches ;
- un second groupe B associant 14 souches (SAG, VIR, SIL, CAM, PAJ, ABA, LI1, ART, DAR, HOR, LBP, BRE, MAR, SOC) avec des ED₅₀ variant de 1,70 à 6,45 mg/L et une CMI moyenne de 10,82 mg/L ;
- et un troisième groupe C contenant 4 souches possédant des ED₅₀ comprises entre 8,9 et 14,67 mg/l avec une CMI moyenne de 22,75 mg/l.

La distribution des 24 souches montre une fréquence élevée de 74% des souches possédant une sensibilité réduite au myclobutanil (groupe B et C) (figure 1).

Tableau II : Sensibilité moyenne au myclobutanil et au penconazole et distribution statistique des souches de *P. aphanis*.

Table II : Sensitivity of *P. aphanis* and distribution to myclobutanil and penconazole

| Myclobutanil | | | | Penconazole | | | |
|----------------------|----|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------|---|-------------------------------------|------------------------|
| Gr | N | ED ₅₀ moyenne (mg/L± SEM) | CMI moyenne (mg/L±SEM) ^b | Gr | N | ED ₅₀ moyenne (mg/L±SEM) | CMI moyenne (mg/L±SEM) |
| A^a | 6 | 0.81 ± 0.126 | 2.13 ± 0.147 | A | 6 | 0.34 ± 0.074 | 0.88 ± 0.229 |
| B | 14 | 3.81 ± 0.39 | 10.82 ± 1.52 | AB | 3 | 0.87 ± 0.035 | 2.20 ± 0.150 |
| C | 4 | 11.67 ± 1.34 | 22.75 ± 3.19 | BC | 3 | 1.34 ± 0.069 | 2.48± 0.250 |
| | | | | CD | 3 | 2.3 ± 0.300 | 3.97± 0.709 |
| | | | | D | 6 | 2.40 ± 0.188 | 7.58± 0.823 |
| | | | | E | 2 | 3.85 ± 0.347 | 9.25± 0.248 |

G : groupe statistique ; N : nombre d'individus ; ^a: L'ED₅₀ moyenne et la CMI ont été calculée sans la souche PES.

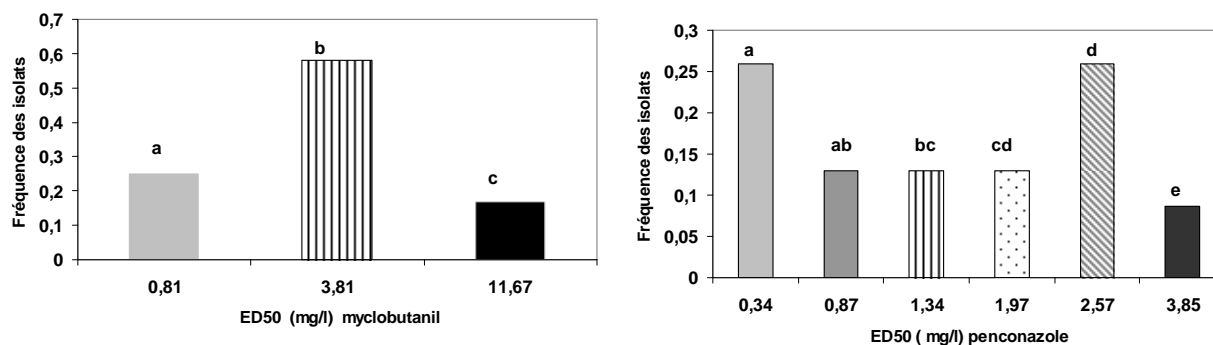
Pour détecter les souches les moins sensibles au myclobutanil, une dose discriminante de 5 mg/l a été choisie ; elle s'avère plus deux fois supérieure à la CMI des souches du groupe A, les plus sensibles. Une relation significative existe, entre la croissance des souches et le niveau de résistance, décrite par la fonction $ED_{50} = 0.0996CR + 0.9785$, avec $R^2 = 0.7801$ ($p < 0,0001$).

Sensibilité au penconazole

Les ED₅₀ obtenues pour les 23 souches testées révèlent une variabilité importante de la sensibilité des souches au penconazole avec des valeurs variant de 0,04 mg/L à 4,2 mg/L (tableau I) et une CMI variant de 0,15 à 9,8 mg/L. Six groupes significativement différents ont été identifiés (tableau II). Un premier groupe A' comporte 5 souches (PES, AVI, MEP, MEG, SAL et SIL), dont 4 sont également communs au groupe le plus sensible au myclobutanil. Ces souches possèdent une CMI moyenne de 0,88 mg/L. À noter également que la souche PES est beaucoup plus sensible au penconazole que les autres isolats sensibles. Trois groupes de sensibilité intermédiaires (AB, BC, CD) sont également obtenus, avec des CMI moyennes comprises entre 2,20 et 3,97 mg/L. Deux groupes (D et E) exhibent une sensibilité réduite avec des ED₅₀ moyennes comprises entre 2,4 et 3,85 mg/L, et des CMI moyenne variant de 7,58 à 9,25 mg/L.

Figure 1 : Distribution des souches de *P. aphanis* en fonction de leur sensibilité (ED₅₀) au myclobutanil et au penconazole.

Figure 1: Sensitivity of *P. aphanis* distribution to myclobutanil and penconazole



Les ED₅₀ des souches au sein des différents groupes (figure 1) montrent clairement l'existence d'un groupe de souches sensibles (A), de souches ayant une sensibilité intermédiaire (AB, BC, CD) et de groupes beaucoup résistantes (D, E).

Comme précédemment, afin de détecter les souches les moins sensibles au penconazole, une dose discriminante de 2 mg/L a été choisie, laquelle s'avère deux fois supérieure à la CMI des souches du groupe A' les plus sensibles. Une relation significative existe décrite par la fonction $ED_{50} = 0.0297 CR + 0.6271$, avec $R^2 = 0.8592$ ($p < 0,0001$).

Facteur relatif de résistance

Afin d'évaluer la perte de sensibilité aux deux fongicides manifestée par chacun des groupes de souches mis en évidence, des facteurs de résistance relative FRR entre les différents groupes ont été calculés en divisant la moyenne de la ED₅₀ du groupe de souches les moins sensibles par celle du groupe de souches les plus sensibles considéré.

À titre d'exemple, le FRR calculé à partir des ED₅₀ de la souche la plus sensible et la moins sensible au myclobutanil montre qu'une souche récolté sur la variété Darselect dans le Lot-et-Garonne en plein champ est 183 fois moins sensible qu'une souche du Vaucluse prélevée sur la variété Pajaro. Dans le cas du penconazole, cette même souche du Vaucluse est 105 fois plus sensible à ce fongicide qu'une autre souche prélevée sur Darselect dans les Landes en plein champ. Notons que généralement les souches les moins sensibles proviennent d'exploitations de plein champ. Les FRR obtenus entre les différents groupes révèlent que les souches les moins sensibles (groupe C et E) montrent une différence d'un facteur compris entre 14 à 7, respectivement pour le myclobutanil et le penconazole.

Tableau III : Facteurs relatifs de résistance calculés pour les différents groupes de souches de *P. aphanis*

Table 3 : Relative resistance factor of *P. aphanis* to myclobutanil and penconazole

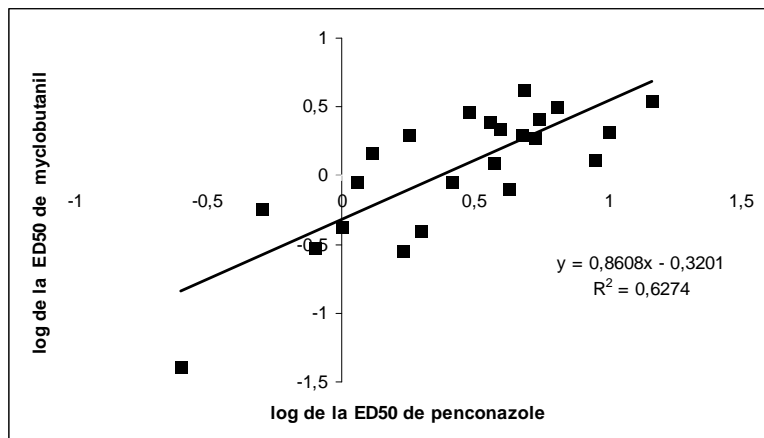
| Groupe de souches | Myclobutanil FRR | Penconazole FRR |
|------------------------|---------------------|--------------------|
| Groupe A vs Group B | 4,70 | |
| Groupe B vs groupe C | 3,06 | |
| Groupe C vs Group A | 14,40 | |
| Groupe A' vs groupe BC | | 3,94 |
| Groupe A' vs groupe CD | | 6,76 |
| Groupe A' vs groupe D | | 7,06 |
| Groupe A' vs groupe E | | 11,32 |

Résistance croisée positive

L'étude de la corrélation entre les ED₅₀ calculés pour le myclobutanil et le penconazole montre (figure 2) qu'il existe une corrélation significative, et donc une résistance croisée positive, entre les souches d'oïdium de fraisier les moins sensibles au myclobutanil et celles les moins sensibles au penconazole. De tels cas de résistance croisée positive pour des molécules inhibitrices de la biosynthèse des stérols de type DMIs sont connus chez plusieurs champignons phytopathogènes, mais celle-ci n'est cependant pas systématique et dépend de la famille chimique à laquelle appartient la molécule. Notons que les deux molécules DMIs homologuées sur fraisier en France, le myclobutanil et le penconazole sont deux triazoles ; il n'est donc pas étonnant d'avoir mis en évidence une résistance croisée entre ces 2 fongicides chez *P. aphanis*.

Figure 2 : Relation entre la sensibilité au myclobutanil et au penconazole des différentes souches de *P. aphanis*.

Figure 2 : Relationship between sensitivity to myclobutanil and penconazole among 23 isolates of *P. aphanis*.



DISCUSSION

L'étude du comportement de 23 souches de *P. aphanis* issues de cultures de fraisier à l'égard de deux fongicides IDMs a permis de constater que la majorité d'entre-elles sont moins sensibles, voire résistantes à ces fongicides, excepté six d'entre eux classées comme très sensibles. La distribution des ED₅₀ de ces souches montre une diminution progressive de leur sensibilité certainement dépendante des différents mécanismes impliqués dans l'acquisition de la résistance. Les doses discriminantes choisies, respectivement de 5 et 2mg/L pour le myclobutanil et le penconazole, permettent de disposer d'outil pour la détection des pertes de sensibilité des populations de *P. aphanis* aux fongicides IDMs. Cette étude montre également que le penconazole est le triazole le plus efficace sur l'oïdium du fraisier.

Cette étude sur la résistance aux IDMs de l'oïdium fraisier, la première en France, complète celle réalisée par Bal et Gilles (1986). Ces auteurs ont en effet décrit des pertes importantes d'efficacité, de l'ordre de 20 à 90%, pour des fongicides tels que le triadiménol, le nuarimol, l'imazalil et le prochloraze, ceci à la suite d'un monitoring réalisé entre 1975 et 1985. L'hypothèse, qui prévalait, était que le nombre de traitements par saison (10 à 14) avait largement contribué au développement et à la sélection de populations moins sensibles ou résistantes. Notre étude, réalisée avec le myclobutanil et le penconazole, montre aussi une large variabilité de la sensibilité à ces fongicides des souches d'oïdium isolées sur

différentes variétés et dans différentes conditions de production, ceci après plus de 15 ans de d'utilisation.

Peut-on parler de résistance de *P. aphanis* aux fongicides IDMs en France ? Dans le cas de l'oïdium du fraisier, il est difficile aujourd'hui d'établir avec exactitude une ligne de base de la sensibilité, car nous ne disposons pas de populations clairement identifiées comme sensibles ou non exposées aux fongicides IDMs. Cependant, Okayama *et al.* (1995) ont défini la dose de 1,25 mg/l de myclobutanil comme capable d'inhiber totalement la croissance de l'oïdium du fraisier sur folioles. Cette dose s'avère nettement inférieure à celle déterminée aujourd'hui pour les souches qualifiées de « sensibles » (CMI= 2,13 mg/L). Cette différence suggère que les souches considérées comme sensibles dans notre étude semblent déjà en cours d'évolution vers une moindre sensibilité. *A fortiori*, pour les souches des groupes B et C, cette perte de sensibilité est encore plus marquée. Les FRR pour le myclobutanil entre les différents groupes de souches varient de 3,06 à 14,40. Ces valeurs sont très proches de celles obtenues pour des souches résistantes d'autres champignons parasites comme *Venturia inaequalis*, *Colletotrichum cereale* ou encore *Erysiphe necator* (Köller *et al.*, 1991 ; Wong *et al.*, 2007 ; Délye *et al.*, 1997 ; Northover *et al.*, 2001). Dans le cas du fraisier en France, les variations moyennes de sensibilité observées entre les différents groupes sont de l'ordre de 5-12 fois pour le myclobutanil et de 6-9 fois pour le penconazole, et elles sont également associées à des pertes d'efficacité aux IDMs dans les cultures. Ajoutons que Köller *et al.* (1991) considèrent que la maîtrise de l'oïdium dans une culture est remise en cause dès que l'on atteint 40% de souches résistantes au produit testé. C'est le cas en France sur fraisier puisque 73,9% des souches étudiées sont peu sensibles au myclobutanil et 47,8% au penconazole.

La perte d'efficacité des souches de *P. aphanis* aux 2 IDMs n'est pas étonnante pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, des précédents de résistances de l'oïdium du fraisier aux IDMs ont déjà été décrits en Europe dès 1986 (Bal et Gilles, 1986), et au Japon en 1992 (Nakano *et al.*, 1992). Si l'on considère le contexte agronomique français, les producteurs n'ont actuellement à leur disposition qu'un nombre limité de fongicides pour contrôler l'oïdium dans les fraiseraies. Seuls un QoI (azoxystrobine), le bupirimate, le soufre micronisé et les deux DMIs (myclobutanil et penconazole) sont officiellement homologués en 2009 pour cet usage. De plus, un minimum de 6 à 8 traitements, jusqu'à 15 à 20, est effectué par cycle de production. Aussi, les IDMs, de par leurs propriétés systémiques, sont largement utilisés sur fraisier, de 3 à 8 fois par cycle de production. Dans ces conditions, il n'est pas surprenant qu'une perte d'efficacité de ces produits se manifeste chez l'oïdium du fraisier.

Devant le peu de produits homologués pour l'usage « oïdium du fraisier » et face à l'émergence en France de souches résistantes aux IDMs sur cette culture, il est impératif de réduire l'utilisation de ces fongicides si des pertes d'efficacité sont observées sur le terrain, et de se conformer aux préconisations d'usages pour limiter au maximum l'extension de la résistance. Pour cela, il conviendra donc de limiter le nombre de traitements avec des IDMs par campagne de production, et de les alterner absolument avec des fongicides présentant des mécanismes d'action différents (QoI, bupirimate, soufre). Il serait également intéressant de pouvoir faire appel à des molécules fongiques pour lesquelles la résistance n'est pas avérée, comme par exemple le quinoxifen utilisé sur fraise au Canada depuis plusieurs années, mais qui n'est pas homologué en France.

Par ailleurs, il paraît indispensable aujourd'hui de valoriser au mieux les moindres sensibilités à l'oïdium connues chez plusieurs variétés de fraisier déjà disponibles. D'autres méthodes alternatives, en cours d'expérimentations, devraient pouvoir à terme prendre une part non négligeable dans la maîtrise de l'oïdium sur fraisier.

CONCLUSION

Cette étude :

- apporte des informations sur les méthodes de monitoring de *Podosphaera aphanis* au myclobutanil et au penconazole,
- met en évidence l'existence d'une forte diminution de la sensibilité et l'apparition de la résistance du champignon au myclobutanil et au penconazole,
- montre l'existence d'une résistance croisée positive entre les deux molécules de triazoles,
- décrit l'utilisation de doses discriminantes qui doivent permettre de détecter et de suivre facilement les évolutions des populations.

Devant la situation délicate de certaines exploitations il est important de trouver des systèmes de gestion permettant de limiter l'extension de la résistance. La résistance aux IDMs étant de type polygénique, avec mise en cause d'un gène majeur, un usage modéré des IDMs pourrait permettre une régression potentielle de la résistance via le brassage génétique annuelle des populations d'oïdium après la reproduction sexuée. Il est également important dans le cadre d'une protection intégrée d'envisager l'utilisation de variétés de fraise moins sensibles à l'oïdium, caractère variétal peut exploité jusqu'à ce jour en France, ainsi que l'utilisation de nouvelles matières actives ou d'exploiter les méthodes de lutte alternatives. Actuellement, il est recommandé d'utiliser les IDMs avec précaution selon l'état de sensibilité de la parcelle et d'alterner les traitements avec les différentes matières actives disponibles et homologuées. Il conviendra également d'être attentif en cas de forte épidémie d'appliquer au mieux les produits afin de limiter au maximum les cycles de reproduction asexuées du pathogène, sachant qu'en condition optimale le cycle complet peut être réalisé en 5 jours (Willoquet *et al*, 2008).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M. Lafarge et J. Lemoine pour leur aide technique et S. Gambier pour l'entretien des plants de fraisier. Nous sommes reconnaissants à A. Bardet du CTIFL pour la fourniture de matériel végétal, les résultats préliminaires des enquêtes et à J-J Pommier d'Hortis pour les informations pratiques et à l'ensemble des chambres d'agriculture pour la collecte des échantillons. Ce travail a fait l'objet d'un financement CASDAR et INRA.

BIBLIOGRAPHIE

Bal E., Gilles G., 1986- Problems of resistance in powdery mildew control on strawberries. *Med Facult Landbouw Rijk Gent* 51:707-714.

Corio-Costet MF., Blancard D., Dufour M-C, Sombardier A., 2009 - Oïdium du fraisier : des pertes d'efficacité des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols confirmées. *P.H.M*, sous presse.

Délye C., Laigret F., Corio-Costet MF., 1997 - New tools for studying epidemiology of resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides, *Pestic Sci* 51: 309-314

Köller W., Parker DM., and Reynolds KL., 1991 - Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. *Plant Dis*, 75:726-728.

Kuck KH., Scheinpflug H., Pontzen R., 1995 - DMI fungicides, *In: Lyr H, Modern selective* Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany, pp 205-258

Nakano T., Higihara T., Okayama K., 1922 - Decreased sensitivity of strawberry powdery mildew to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Bull Nara Agric Exp Station* 23:27-32.

Northover J., Homeyer CA., 2001- Detection and management of myclobutanil-resistant grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) in Ontario. *Can J Plant Pathol*, 23:337-345.

Okayama K., Nakano T., Matsutani S., Sugimura T., 1995 - A simple and reliable method for evaluating the effectiveness of fungicides for control of powdery mildew (*Sphaerotheca macularis*) on strawberry. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 61: 536-540.

Pertot I., Zasso R., Amsalem L., Baldessari M., Angeli G., Elad Y., 2008 - Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Prot* 27:622-631

Sombardier A., Willocquet L., Corio-Costet M.-F., Petit A., Blancard D., 2009a - Maîtriser l'oïdium du fraisier au laboratoire pour mieux l'étudier. *P.H.M*, 516 :39-44

Sombardier A., Dufour M.-C., Blancard D., Corio-Costet M.-F., 2009b - Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides : distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag. Sci*, 65, sous presse.

Willocquet L., Sombardier A., Blancard D., Jolivet J., Savary S., 2008 - Spore dispersal and disease gradients in strawberry powdery mildew. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30, 434-441

Wong FP., Midland SL., 2007 - Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides Propiconazole, Myclobutanil, Tebuconazole, and triadimefon. *Plant Dis*, 91:1547-1555.

**RESISTANCE DE *PLASMOPARA VITICOLA* AUX FONGICIDES QOIs : VARIABILITE ET
COMPETITIVITE**

M.-F. CORIO-COSTET¹, M.-C. DUFOUR¹, J. CIGNA¹, P. ABADIE^{1,2}, W.-J. CHEN^{1,3}

1: INRA, UMR Santé végétale, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave d'Ornon, France ; 2: INRA, UMR 1202 BIOGeCo, Laboratoire de génétique des arbres forestiers, 69 route d'Arcachon, 33612, Cestas, France; 3 : Institute of Oceanography, National Taiwan University, No.1 Sec. 4 Roosevelt Rd., Taipei 10617, Taiwan

RESUME

Depuis son introduction en Europe *Plasmopara viticola* (mildiou de la vigne) développe régulièrement des résistances aux produits phytosanitaires, y compris à des molécules récentes telles que les inhibiteurs de la respiration mitochondriale de type QoI (Quinone outside Inhibitor). L'analyse du gène codant pour l'enzyme cible (cytochrome b) révèle la présence d'une mutation majeure en position G143A, impliquée dans l'acquisition de cette résistance. L'étude de la variabilité de cette zone du génome mitochondrial démontre l'existence d'au moins deux phénomènes d'apparition de la résistance indépendants chez le mildiou de la vigne en Europe. À partir de 1015 isolats de mildiou collectés dans le vignoble français en 2003 et 2004, nous montrons la prévalence de 4 haplotypes majeurs que nous avons appelés IS, IR, IIS et IIR. L'haplotype I est le plus fréquent (77,44%). La distribution des allèles de résistance en début de saison représente 23,25% en France. L'évaluation de différents paramètres impliqués dans le développement de l'agent pathogène durant son cycle de reproduction asexuée et la mise au point d'un indice de fitness (IA) ont permis d'estimer le coût de la résistance. Des tests de compétitivité réalisés entre une souche sensible et deux résistantes aux QoIs complètent cette étude qui montre que les souches résistantes possèdent un aussi bon potentiel de survie que les souches sensibles durant la phase asexuée en conditions de laboratoire, lequel dépend essentiellement de leur fitness.

Mots-clés : Mildiou de la vigne, résistance fongicide, variabilité mitochondriale, QoIs, fitness

SUMMARY

**RESISTANCE OF *PLASMOPARA VITICOLA* TO QOI FUNGICIDES: VARIABILITY AND
COMPETITIVENESS**

The efficacy of QoI fungicides against grape downy mildews in European vineyards has decreased significantly in the last years. A single nucleotide polymorphism, G143A in the cytochrome b gene of *Plasmopara viticola* was detected to confer QoI resistance. Polymorphism analyses on the mitochondrial genome showed that 4 major haplotypes (IR, IS, IIR, IIS) coexisted in French vineyards. In France, the most frequent haplotype (IR, IS) reached 77.44% in *P. viticola* populations. The resistant alleles (IR, IIR) frequencies ranged from 0 to 75% with an average of 23.25%. Based on determination of the fitness index (Fi), QoI-resistant strains did not exhibit a cost and often tended to have good fitness. To assess these results, competition assays with different mixtures of sensitive and resistant strains using biological and molecular (Q-PCR) tests were done. The competitiveness of resistant isolates varied according to their aggressiveness index, suggesting that there is no noticeable cost of QoI resistance in controlled conditions in *P. viticola*.

Keywords: Grapevine, downy mildew, fungicide resistance, fitness

INTRODUCTION

Plasmopara viticola, l'agent responsable du mildiou de la vigne, natif du nord de l'Amérique, a été introduit en Europe en 1878 et son contrôle nécessite de nombreuses interventions phytosanitaires. Pour limiter la maladie, de nouvelles molécules sont mises régulièrement sur le marché, dont les fongicides Qol (Quinone outside inhibitor) qui sont des inhibiteurs du cytochrome b, impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Jordan *et al.*, 1999). Introduit en France en 1998, deux ans plus tard les premiers cas de résistance étaient détectés dans le vignoble français (Magnien *et al.*, 2003). La sélection d'une mutation majeure en position G143A du gène du cytochrome b caractérise l'acquisition de la résistance de nombreux agents pathogènes dont le mildiou de la vigne aux fongicides Qols (Grasso *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2007). Une étude phylogénétique d'une large portion du génome mitochondrial (2281 pb) incluant le gène du cytochrome a permis de démontrer l'existence de différents haplotypes (IS, IR, IIS, IIR) qui indiquent d'une part l'existence d'au moins deux événements indépendants pour la sélection de la résistance, mais également l'existence de différents groupes génétiques (voire sous-espèces) sur le continent américain (Chen *et al.*, 2007, Corio-Costet *et al.*, 2008). En France, des études de variabilité génétique réalisées à l'aide de marqueurs microsatellites confirment l'existence d'une seule espèce de mildiou en Europe qui présente une forte variabilité génétique en début de saison (Corio-Costet *et al.*, 2006).

Cependant, il existe peu de données concernant la valeur sélective (fitness) des souches de mildiou résistantes au Qols et leur maintien dans les populations. Une étude montre qu'une population artificielle contenant seulement 5% d'isolats résistants tend à augmenter sa sensibilité aux Qols (Genet *et al.*, 2006) et que dans un mélange d'isolats sensibles et résistants (99:1 ; 90:10), la population devient sensible après deux cycles de développement sur disques de feuilles (Sierotzki *et al.*, 2008). Pour comprendre l'évolution de la résistance aux fongicides, il est nécessaire de réaliser des mesures de fitness, laquelle peut être définie comme la capacité à survivre et à se reproduire d'un allèle, d'un individu ou d'un groupe, ou la capacité d'un organisme à contribuer ultérieurement à un pool de gènes (Vanderplank, 1982). Elle peut être estimée soit par des mesures de différentes composantes telles la capacité à se reproduire, la pathogénie ou par évaluation de la compétitivité entre deux populations sur une plante hôte. La capacité des agents pathogènes en conditions naturelles à acquérir des mutations sans perte de fitness est largement méconnue, mais quelques études assurent que l'apparition de la résistance aux fongicides n'est pas forcément liée à une perte de fitness en absence de fongicide (Anderson, 2005). L'apparition rapide de la résistance aux fongicides Qols et le comportement des isolats résistants dans les populations suggèrent une bonne valeur sélective de ces isolats. Nous avons testé cette hypothèse en estimant la valeur sélective de 11 souches sensibles et 12 souches résistantes aux Qols sur la base de mesures de différents paramètres (temps de latence, taux de sporulation, fréquence d'infection) et de tests de compétitivité (Corio-Costet *et al.*, 2008a, b).

MATERIEL ET METHODE

Collection d'isolats et production d'inoculum

1015 symptômes de mildiou ont été collectés en 2003 et 2004 dans le vignoble français. Chaque symptôme provient d'une lésion isolée prélevée en début de saison. Les isolats sensibles ou résistants aux Qols utilisés pour les tests de fitness et de compétitivité ont été collectés en 2003 dans le vignoble bordelais. Ils proviennent tous d'isolement mono sporangiaux et sont conservés sur des feuilles de vigne au congélateur à -20°C. La production d'inoculum est réalisée sur des feuilles de vigne comme décrit par Chen *et al.*, 2007.

Détermination de la sensibilité aux fongicides

La sensibilité aux fongicides a été testée sur des disques de feuilles de vigne de cépage Cabernet-Sauvignon, après pulvérisation de différentes doses de fongicides sur la face

inférieure des disques. Trois gouttes de 10µl contenant 20 000 sporanges par ml ont été déposés, une fois les disques feuilles secs. L'inoculation ainsi que les lectures des tests ont été réalisés comme décrit par Genet *et al*, 1997 et Corio-Costet *et al*, 2006 après incubation dans une chambre de culture à 22°C. Le Qol utilisé a été la famoxadone (3-anilino-5-méthyl-5-(4-phenoxyphenyl)-1, 3-oxazolidine-2,4-dione) (WG 50%, Dupont de Nemours).

Paramètres de la fitness

Plusieurs paramètres ont été mesurés et comparé entre les souches sensibles et résistantes : la période de latence, le nombre de spores obtenu par spore déposé après 7 jours de croissance, et la fréquence d'infection en utilisant des méthodes similaires à celles décrites par Tooley *et al.*, 1986. Toutes les mesures sont réalisés en triplicat, dans des boîtes de Pétri contenant chacune 5 disques de feuilles inoculés avec 3 gouttes d'une suspension de sporange à 2500 spores/ml. Deux expériences indépendantes ont été effectuées.

Période de latence (PL)

La période de latence a été déterminée par une observation journalière des disques et la détection de l'apparition de la première sporulation. Elle est exprimée comme la période (en heures) nécessaire pour obtenir 50% de la sporulation totale pour une souche considérée. Pour chaque souche nous avons disposé de 45 données par expérience.

Sporulation

La production de spore (N_t / N_{t0}) est obtenue après lavage des 5 disques de chaque boîte (3) dans une fiole de 16 ml d'isoton II et le nombre de sporanges produit par boîte (15 gouttes d'inoculum) est mesuré (N_t) à l'aide d'un compteur à particule. L'expérience est répétée au moins deux fois, produisant 6 mesures pour chaque isolat correspondant à la sporulation obtenue pour 562 sporange déposés (N_{t0}).

Fréquence d'infection (FI)

La fréquence d'infection a été définie comme la proportion de disques de feuilles inoculés sur lesquels une lésion s'est développée. Le nombre de point d'inoculation (3 gouttes de 15 µl à 2500 sp/ ml) ayant conduit à une lésion est comptabilisé après 7 jours d'incubation. L'expérience est répétée au moins deux fois indépendamment dans le temps.

Indice d'agressivité (IA)

De l'ensemble des paramètres un indice de fitness est calculé selon la formule $IA = \ln(N_t / N_{t0} \times IF \times 1/LP)$.

Tests de compétitivité

La compétitivité relative de deux paires de souches a été évaluée (R7/S2) et (R11/S2) à partir d'un mélange de spores résistantes et sensibles dans les proportions suivantes : 20 :80, 50 :50, et 80 :20. Le mélange d'inoculum est amené à la proportion désirée du mélange R/S à la concentration de 40 000 spores par ml final. Quatre boîtes de Pétri contenant 5 disques de feuilles sont inoculées pour chaque mélange et tous les 7 jours (1 cycle) quatre nouvelles boîtes sont à nouveau inoculées. Afin d'évaluer la proportion de souche résistante présente après chaque cycle de multiplication, nous réalisons soit un test biologique avec des feuilles traitées avec 100 mg/L de famoxadone (mesure du pourcentage de croissance), soit un test de quantification des sporanges obtenus par Q-PCR pour quantifier les allèles résistants présents dans les mélanges.

L'ensemble des données de fitness a été soumis à une analyse de variance (ANOVA). La valeur des groupes sensible et résistant a été comparée à l'aide d'un test de Tukey ($P < 0,05$), les essais de Q-PCR avec un test de Fisher ($P < 0,05$), et l'analyse de la fréquence des haplotypes avec un Chi2.

Méthodes moléculaires

Détection des haplotypes

La détection des haplotypes a été réalisée selon les méthodes décrites précédemment par Corio-Costet *et al*, 2006, et Baudoin *et al.*, 2008. Après extraction de l'ADN comme décrit par

Chen *et al.*, 2008, l'ADN mitochondrial est amplifié spécifiquement avec les amorces décrites par Baudoin *et al.*, 2008. Puis à l'aide d'enzyme de restriction spécifiques (Sat1 et Hinf1) qui coupent les séquences amplifiées par PCR en des loci précis, il est possible grâce à la présence de mutations spécifiques des différents haplotypes IS, IR, IIR et IIS de générer des fragments spécifiques de chaque haplotype visualisable sur gel d'agarose (Corio-Costet *et al.*, 2006).

Méthode de Q-PCR

La méthode de PCR quantitative, pour la détection et la quantification de la présence de l'allèle de résistance G143A sur le gène du cytochrome b de *P. viticola* dérive de la méthode décrite par Sirven et Beffa, 2002. Des sondes d'ADN spécifiques ont été dessinés afin d'amplifier spécifiquement l'un des allèle décrits dans Corio-Costet *et al.*, 2009. La détection est réalisée avec le marqueur de fluorescence bleue SYBR green. L'amplification et la détection sont réalisées sur une machine PCR thermofast dans des plaques de 96 puits dans les conditions suivantes : un cycle à 94°C dur ant 15 min, suivi de 40 cycles à 94°C 10 s, 60°C avec les sondes adéquates 10s, et à 72°C du rant 20s. L'émission de la fluorescence est calculée à 72°C. Les données sont analysées par le logiciel de la machine. Pour chaque échantillon la quantité d'ADN cible est quantifié en utilisant des courbes de calibration appropriées (*Ct* (cycle threshold)).

RESULTAT

Distribution des haplotypes dans le vignoble français

À partir de 1015 isolats collectés en début de saison en 2003 et 2004, nous avons évalué la présence des différents haplotypes mitochondriaux dans le vignoble français à l'aide d'outils moléculaires détectant les SNP (single nucleotide polymorphism) spécifiques de chaque haplotype.

Tableau 1: Distribution des différents haplotypes mitochondriaux de *P. viticola* dans le vignoble français en 2003-2004.

Table I : Distribution of *P. viticola* mitochondrial haplotype in French vineyard

| Régions françaises | N | Année de collecte | Haplotypes mitochondriaux (%) | | | |
|-----------------------|-----|-------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | | | IS | IR | IIS | IIR |
| Bordeaux | 506 | 2003 | 50.2 | 23.9 | 22.7 | 3.2 |
| Champagne | 122 | 2003 | 73.8 | 22.1 | 4.1 | 0 |
| Dordogne | 84 | 2003 | 47.6 | 21.5 | 30.9 | 0 |
| Loire | 121 | 2003 | 69.4 | 8.3 | 22.3 | 0 |
| Vallée du Rhône | 86 | 2003 | 80.2 | 5.8 | 14.0 | 0 |
| Bourgogne | 33 | 2004 | 36.4 | 30.3 | 12.1 | 21.2 |
| Jurançon-Gers | 63 | 2004 | 38.1 | 34.9 | 27.0 | 0 |
| Moyenne | | | 56.45 ±17.7 | 20.99 ± 10.7 | 20.3 ± 9.4 | 2.26 ± 7.9 |

Comme dans les études précédentes (Corio-Costet *et al.*, 2006 ; 2008 ; Chen *et al.*, 2008) l'haplotype I (IS, IR) est largement majoritaire (77,44%), et l'haplotype II (IIR, IIS) ne représente que 22,56%. Concernant la résistance aux Qols, la situation semble variable selon les régions et les échantillons prélevés. L'état de résistance varie de 51,5 % d'isolats résistants en Bourgogne à 5,8% dans la vallée du Rhône, avec une moyenne de 23,25% sur

l'ensemble des vignobles. À noter que la présence de l'haplotype II résistant est plutôt rare excepté en Bourgogne.

Sensibilité des souches sensibles et résistantes de la collection

L'étude de la fitness des souches sensibles et résistantes a été réalisée sur 11 souches sensibles appartenant aux haplotypes IIS (7) et IS (4) et sur 12 souches résistantes appartenant essentiellement à l'haplotype IR (9/12). Les valeurs des CI_{50} des souches sensibles à la famoxadone varient de 0,05 à 0,28 mg/L, avec une valeur moyenne de 0,115 mg/L. Toutes les souches résistantes, possédant une CI_{50} supérieure à 1000 mg/L, possèdent également la mutation conférant la résistance en position G143A.

Tableau II : Origine et caractéristique haplotypique des isolats utilisés pour l'étude de la fitness de *P. viticola*

Table II : Characteristics of isolates used in fitness studies

| Souches ¹ | Région d'origine | année | Haplotype mitochondrial (I or II) | CI_{50} moyenne (mg/ml \pm SEM) |
|----------------------|------------------|-------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| S1 | Champagne | 2003 | IIS | 0,115 \pm 0,013 |
| S2 | Bordeaux | 2003 | IS | |
| S3 | Bourgogne | 2003 | IIS | |
| S4 | Bordeaux | 2003 | IIS | |
| S5 | Bordeaux | 2003 | IIS | |
| S6 | Bordeaux | 2003 | IIS | |
| S7 | Champagne | 2003 | IS | |
| S8 | Bordeaux | 2003 | IIS | |
| S9 | Bourgogne | 2003 | IIS | |
| S10 | Rhône Valley | 2003 | IS | |
| S11 | Alsace | 2003 | IS | |
| R1 | Bordeaux | 2003 | IR | >1000 |
| R2 | Bordeaux | 2003 | IIR | |
| R3 | Midi-Pyrenees | 2003 | IR | |
| R4 | Freiburg | 2003 | IR | |
| R5 | Midi-Pyrenees | 2003 | IR | |
| R6 | Midi-Pyrenees | 2003 | IR | |
| R7 | Midi-Pyrenees | 2003 | IR | |
| R8 | Bordeaux | 2003 | IR | |
| R9 | Bordeaux | 2003 | IR | |
| R10 | Bordeaux | 2003 | IR | |
| R11 | Bordeaux | 2003 | IIR | |
| R12 | Bordeaux | 2003 | IIR | |

Evaluation des paramètres de fitness des 23 souches testées.

L'évaluation de la période de latence (PL), du taux de sporulation et de la fréquence d'infection (FI) entre les deux groupes de souches, en conditions de laboratoire, révèle d'une manière générale une variabilité importante au sein de chaque groupe. Aucune différence significative de la période de latence entre les deux groupes n'a été trouvée (tableau 3). La période latence varie de 140 à 86,5 heures dans le groupe des souches sensibles, avec une moyenne de 102,7 heures. De manière similaire cette période de latence varie de 89 à 139 heures au sein du groupe résistant avec une moyenne de 100,9 heures.

Tableau III : Paramètres de la fitness des souches sensibles et résistantes aux Qols.
Table III : Fitness parameters of sensitive and Qol resistant isolates

| Isolat | Sensibilité aux Qol | Période de latence (heures) | Sporulation ^a (Nt/Nt ₀) | Fréquence d'infection | IA (Ln (Nt/Nt ₀ · FI / PL) |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------|--|-----------------------|---------------------------------------|
| S1 | S | 86,5 | 1022 | 0,94 | 2,41 |
| S2 | S | 88 | 534 | 0,98 | 1,78 |
| S3 | S | 97 | 783 | 0,91 | 1,99 |
| S4 | S | 103 | 896 | 0,76 | 1,99 |
| S5 | S | 110 | 421 | 0,42 | 0,48 |
| S6 | S | 96 | 332 | 0,86 | 1,09 |
| S7 | S | 107,5 | 351 | 0,72 | 0,86 |
| S8 | S | 97 | 783 | 0,91 | 1,99 |
| S9 | S | 103 | 783 | 0,79 | 1,77 |
| S10 | S | 97,5 | 1267 | 0,97 | 2,53 |
| S11 | S | 140 | 537 | 0,97 | 1,28 |
| Moyenne^b | | 102,7 ± 1,57 | 704 ± 139 | 0,84 ± 0,035 | 1,75 ± 0,65 |
| R1 | R | 89,5 | 565 | 1 | 1,84 |
| R2 | R | 108,5 | 555 | 0,96 | 1,59 |
| R3 | R | 91,5 | 1015 | 1 | 2,41 |
| R4 | R | 104,5 | 550 | 1 | 1,66 |
| R5 | R | 93,25 | 996 | 0,99 | 2,36 |
| R6 | R | 103 | 802 | 0,93 | 1,98 |
| R7 | R | 92,5 | 844 | 0,94 | 2,15 |
| R8 | R | 93,25 | 901 | 0,94 | 2,21 |
| R9 | R | 95 | 1048 | 0,91 | 2,31 |
| R10 | R | 96 | 1508 | 1 | 2,75 |
| R11 | R | 139 | 693 | 0,96 | 1,57 |
| R12 | R | 105 | 484 | 0,68 | 1,14 |
| Moyenne^b | | 100,9 ± 1,32 | 830 ± 171 | 0,94 ± 0,02 | 2,05 ± 0,45 |

^a: la sporulation est exprimée comme le ratio du nombre de spores produites après 7 jours de croissance / le nombre de spores déposées. ^b: Les moyennes sont exprimées +/- la déviation standard.

La production de spores est également très variable selon les souches, avec des souches sensibles produisant de 332 à 1287 sporanges par sporange déposé et des souches résistantes produisant de 484 à 1508 sporanges. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes qui montrent respectivement une moyenne de production de 704 à 830 sporanges pour les groupes sensible et résistant. Au sein d'un même groupe certaines souches produisent 3 fois plus de sporanges qu'une autre souche (ex : S6 et S10, ou R12 et R10).

Concernant la fréquence d'infection (FI) (tableau III), une différence significative est observée ($P= 0,02$) entre les deux groupes de souches, avec respectivement une FI de $84 \pm 0,035$ et de $0,94 \pm 0,02$ pour les groupes sensible et résistant.

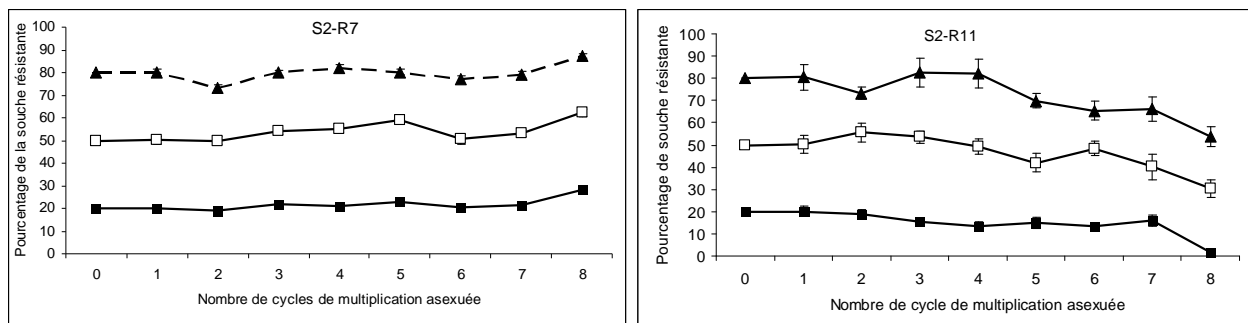
À partir de l'ensemble de ces paramètres, nous avons calculé un indice d'agressivité (AI) des souches), lequel ne montre aucune différence significative ($P = 0.147$) entre les deux groupes de souches avec des valeurs moyennes de $1,75 \pm 0,65$ pour le groupe sensible et de $2,05 \pm 0,45$ pour le groupe résistant.

Compétitivité de deux souches résistantes aux Qols

Afin d'estimer la compétitivité d'isolats résistants aux Qols, nous avons mis en mélange dans différentes proportions une souche sensible (S2) possédant un IA (1,78) représentatif de la moyenne du groupe avec deux souches résistantes aux Qols (R7 et R11) ayant des AI respectivement de 2,15 et 1,57. Le développement de mélanges contenant 20%, 50% ou 80% d'isolats résistants en mélange avec la souche S2 a été suivi sur 8 cycles de reproduction asexuée consécutifs.

Figure 1 : Evolution de la fréquence des deux isolats résistants R7 et R11 au cours de 8 cycles successifs de multiplication asexuée. Le mélange initial contient soit 20% (-■-), 50% (-□-) ou 80% (--▲--) de sporanges résistants. Chaque point correspond à la moyenne de 6 répétitions.

Figure 1 : Dynamic changes in the frequency of Qol resistant isolates in sporangial populations harvested from grapevine leaf disks inoculated with three mixtures of Qol sensitive S2 and Qol resistant isolates R7 and R11 in various proportions (20:80(-■-), 50:50 (-□-) or 80:20 (--▲--). during eight asexual generations.



Le changement de fréquences des souches résistantes dépend largement de la fitness des souches et de leur indice d'agressivité (AI). Le premier mélange S2-R7, montre une stabilité de la souche résistante quelle que soit la proportion de mélange considéré. On note même pour le mélange à 50 :50 et à 20-80 une légère augmentation significative de la proportion d'isolats résistants ($P < 0,05$). La souche R7 est une souche compétitrice en absence de fongicide Qol.

Concernant la seconde paire de souches testée, une diminution progressive de la teneur en souche résistante dans le mélange est observée à partir du quatrième cycle, pour aboutir après 8 cycles de reproduction à une diminution de 20 à 25% du mélange initial 80 :20 et 50 :50. Encore plus marqué, après 8 cycles du mélange contenant 20% de souches résistantes il ne reste plus que 1,27% de la souche R11 dans le mélange. La souche R11 s'avère un mauvais compétiteur en absence de pression de sélection.

DISCUSSION-CONCLUSION

Répartition de la résistance

En accord avec les résultats décrits précédemment dans le vignoble français (Chen et al, 2007 ; Corio-Costet 2006, 2008a, b), l'haplotype I est le plus largement répandu avec une moyenne de 77,44% (IS, IR). Concernant la résistance, les données obtenues en 2003 et 2004, montre que la résistance représente 23,25% des isolats collectés en début de saison. Le rôle des haplotypes mitochondriaux et leur importance dans le maintien et la dispersion de la résistance mériteraient d'être clarifié. Pourquoi si peu d'haplotype II ? Pourquoi la Bourgogne aurait-elle autant d'haplotype II ?

Des études antérieures montraient qu'en 2002 et 2003 60% des isolats étaient résistants dans le vignoble français et que la résistance se maintenait en 2005 et 2006 (Sierotzki *et al*, 2005, 2008). Cependant, selon la date de prélèvement et la méthode utilisée (isolats ou populations) les fréquences de résistance observées ne sont pas identiques dans tous les

vignobles. Elles dépendent essentiellement de la pression fongicide et de la fitness des populations présentes.

Fitness et compétitivité

L'un des facteurs majeurs affectant l'évolution de la résistance aux fongicides est certainement la fitness des isolats résistants. Nous avons montré dans cette étude qu'il n'existe pas globalement de différence significative entre le groupe de souches sensible et celui des résistantes pour l'ensemble des paramètres étudiés, à savoir la vitesse de croissance, le taux de sporulation et la qualité de l'infection dans nos conditions expérimentales. Seule la fréquence d'infection évaluée au niveau individuel révèle un léger avantage pour le groupe de souches résistantes.

Concernant la compétitivité, l'étude réalisée montre que selon les souches considérées, la proportion d'isolats résistants peut demeurer stable voire même augmenter sur plusieurs cycles de multiplication asexuée, ou bien chuter en fonction de l'indice d'agressivité des souches. Ainsi, la compétitivité semble-t-elle dépendre très largement de l'indice d'agressivité des souches qu'elles soient sensibles ou résistantes aux Qols. Dans la littérature, des auteurs montrent que des ratios de 90:10 ou 99:1 conduisent rapidement à la disparition des souches résistantes après seulement deux cycles (Sierotzki *et al*, 2008), mais les auteurs ne donnent pas quelles sont les mutations présentes dans le gène du cytochrome b. En effet, au côté de la mutation majeure G143A, qui est décrite comme n'affectant nullement le fonctionnement de la mitochondrie (Esser *et al*, 2004) il existe des mutations mineures, telle F129L (présente à moins de 0,2% dans le vignoble français), qui peuvent à l'inverse limiter le fonctionnement mitochondrial et éventuellement conduire à un coût de la résistance. Dans cette étude, les séquences réalisées du cytochrome b des souches choisies montrent exclusivement la présence de la mutation G143A.

Conclusion générale

Notre étude indique que les souches résistantes aux fongicides Qols n'exhibent pas de coût apparent pour cette résistance et que la compétitivité des souches dépend essentiellement de l'indice d'agressivité des souches mises en présence. Ce point est conforté par le suivi de souche sur le terrain en absence de pression de sélection où durant la saison végétative le taux de souches résistantes demeure stable (Corio-Costet *et al.*, 2006, 2008). Toutefois, cette résistance est à héritabilité mitochondriale, et après chaque cycle de reproduction sexuée, le taux de souches résistantes décroît et par conséquent la proportion de souches résistantes l'année N+1 en absence de pression de sélection (Toffolati *et al*, 2007).

N'ayant pas détecté de coût de la résistance aux Qols nous pouvons émettre les trois hypothèses suivantes : 1° la résistance aux fongicides Qols basée sur la mutation G143A n'induit aucun coût et aucune perte de fitness, 2° le coût existe mais seules les souches possédant la fitness la meilleure ont été sélectionnées et donc le coût n'est pas apparent, 3° le coût existe, mais rapidement des mutations compensatrices ont été sélectionnées et permettent aux souches résistantes d'atteindre une fitness moyenne. Finalement, les souches résistantes semblent pouvoir survivre aussi bien que les souches sensibles et seul le maintien de la résistance semble affecté suite à l'héritabilité mitochondriale en absence de pression de sélection.

Si nous voulons mieux maîtriser la dispersion et le maintien de la résistance aux fongicides, prendre en compte le coût de la résistance ainsi que les supports génétiques impliqués paraît nécessaire pour une meilleure compréhension des phénomènes d'évolution des populations de pathogènes soumis à des pressions de sélection

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'IFV, le CIVC, la protection des végétaux et les chambres d'agriculture pour la collecte des échantillons. Nous remercions également G Taris, L. Douence, S Richart-Cervera et S Gambier pour leur aide technique, JL Genet pour la famoxadone et la Région Aquitaine et l'INRA pour leur soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson J. B., 2005 - Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 547-556

Baudoin A. I., Olaya G., Delmotte F., Colcol J. F., Sierotzki H., 2008 - QoI resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United States. *Plant Management Network. Plant Health Progress*. Doi:10.1094/PHP-2008-0211-02-RS

Chen WJ., Delmotte F., Richard-Cervera S., Douence L., Greif C., Corio-Costet MF., 2007 - At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied Environ. Microbiol.* 73: 5162-6172.

Corio-Costet M-F., Delmotte F., Martinez F., Giresse X., Raynal M., Richart-Cervera S., Douence L., Panon ML., Chen WJ., 2006 - Resistance aux Qois du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) : origine et diversité. 8th Int. Conf on Pest and Diseases, AFPP, Tours, 5-6 décembre, France).pp 612-620 CD-Rom.

Corio-Costet M-F., Martinez F., Delmotte F., Douence L., Richart-Cervera S., Chen WJ., 2008 - Resistance of *Plasmopara viticola* to Qois fungicides : Origin and Diversity. In: Modern fungicides and antifungal compounds V. Dehne H.W., Deising H.B., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E., and Lyr H (eds). DPG, Braunschweig, Germany, 107-112

Corio-Costet MF., Dufour MC., Cigna J., Abadie P., Martinez F., Chen WJ., 2008 - Resistance of *Plasmopara viticola* to QoI fungicides : origin, diversity and fitness. *J Plant Pathol*, 90, 31.6, p S2.136

Corio-Costet MF., Dufour MC., Cigna J., Abadie P., Chen WJ., 2009 - Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. special issue downy mildew, Ed A Lebeda. Soumis à *Eur J Plant Pathol*,

Esser L., Quinn B., Zhang M. Q., Elberry M., Yun L., Yunn C. A., Xia, D., 2004 - Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for the cytochrome bc (1) complex. *Journal of Molecular Biology*, 341, 381-302

Genet J.-L., Steva H., Vincent O., Cazenave C., 1997 - A method for measuring the level of sensitivity of *Plasmopara viticola* populations to cymoxanil. *EPPO bulletin*, 27, 217-225.

Genet J.-L., Jaworska G., Deparis F., 2006 - Effect of dose rate and mixture of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pesticide Management Science*, 62, 188-194.

Grasso V., Palermo S., Sierotzki H., Garibaldi A., Gisi, U., 2006 - Cytochrome b structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pesticide Management Science*, 62, 465-472

Jordan D. B., Livingston R. S., Bisaha J. J., Duncan K. E., Pember S. O., Piccollelli M. A., Schwartz R. S., Sternberg J. A., Tang X., 1999 - Mode of action of famoxadone. *Pesticide Science*, 55, 105-108.

Magnien C., Micoud A., Glain M., Remuson F., 2003 - QoI resistance of downy mildew-monitoring and tests 2002. (Paper presented at the 7th Int. Conf. on Pest and Diseases 2003, 8 pages. AFPP Eds, CD-Rom.

Tooley P. W., Sweigard J. A., Fry W.E., 1986 - Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* from sexual and asexual populations. *Phytopathology* 76, 1209-1212.

Sierotzki H., Kraus N., Pepin S., Ferandes N. Gisi H., 2008 - Dynamics of QoI resistance in *Plasmopara viticola* (In H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, & H. Lyr (Eds.), *Modern fungicides and Antifungal compounds V* (pp. 151-157). DPG Selbstverlag, Braunschweig.)

Sierotzki H., Kraus N., Assemat P., Stanger C., Cleere C., Windass J., Gisi H., 2005 - Evolution of resistance to QoI fungicides in *Plasmopara viticola* populations in Europe. (In H.W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, & H.

Sirven C., Beffa R., 2003 - Resistance to fenamidone: monitoring by real-time quantitative PCR on *Plasmopara viticola*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 56, 523-5332.

Toffolatti S. T., Serrati L., Sierotzki H., Gisi U., Vercesi A., 2007 - Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pesticide Management Science* 63, 194-201.
Wong, F. P. & Wilcox, W.F. (2000). Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*, 84, 275-281

Vanderplank, J. E. 1982 - *Host-pathogen Interactions in plant Disease*. New-York, USA, Academic Press, 27 pp.

**"RESEAU PERFORMANCE": UNE SIXIEME ANNEE DE DIAGNOSTIC DE LA
RESISTANCE DE *SEPTORIA TRITICI* AUX PRINCIPAUX FONGICIDES UTILISES EN
FRANCE**

G. COULEAUD ⁽¹⁾, C. MAUMENE ⁽¹⁾, A.-S. WALKER ⁽²⁾, P. LEROUX ⁽²⁾

⁽¹⁾ ARVALIS - Institut du végétal – station expérimentale – 91720 Boigneville

⁽²⁾ INRA – UMR 1290 BIOGER-CPP Bât 13 Avenue Lucien Brétignières BP01
78850 Thiverval-Grignon

RÉSUMÉ

En France, la détection en 2003 des premiers signes de résistance aux strobilurines de souches de *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) a conduit à construire un réseau national multipartenaires baptisé "réseau Performance" et coordonné par ARVALIS – Institut du végétal. Ce réseau réunit l'INRA BIOGER-CPP et des partenaires de terrain (chambres d'agriculture, coopératives et négoce, sociétés phytosanitaires) autour de la question centrale de la résistance de *Septoria tritici* aux strobilurines, mais aussi aux Inhibiteurs de la 14 α -Déméthylation des Stérols (IDM) et depuis 2008 aux carboxamides (ou SDHIs). Depuis 2004, ce sont au total une centaine d'essais mis en place par an avec une soixantaine de partenaires sur les principales régions céréalières françaises.

Outre la bonne connaissance de la réalité de la résistance au champ et des spécialités fongicides efficaces en situation de résistance, cela a permis à ARVALIS – Institut du végétal et à chacun de ses partenaires de diffuser auprès des producteurs les conseils de lutte les plus adaptés à la généralisation de la résistance aux strobilurines et aux IDM.

Mots-clés : résistance, septoriose, lutte chimique, strobilurine, IDM

SUMMARY

**"RÉSEAU PERFORMANCE" : A SIXTH YEAR OF DIAGNOSIS OF THE RESISTANCE OF
SEPTORIA TRITICI TO PRINCIPAL FUNGICIDES USE IN FRANCE**

In France, the detection in 2003 of the first strobilurin resistant strains in *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) populations brought about the setting up of the national multipartners network called "réseau performance" and coordinated by ARVALIS – Institut du végétal. This network brought together INRA BIOGER CPP and field partners (chambres d'agriculture, cooperatives and grain merchants) around the main problem of *S. tritici* resistance to strobilurins, and also to DMIs (Inhibitors of sterol 14 α -demethylation) and since 2008 with the carboxamides (SDHIs). Since 2004, a total of a hundred of trials has been carried out per year with around sixty partners in the main French wheat growing areas.

Apart from the efficient monitoring of resistance and the choice of the appropriate treatments in each situation, this has allowed ARVALIS – Institut du végétal and its partners to advise the farmers with the most accurate solutions in fighting the generalization of strobilurin resistance and DMIs resistance.

Key-words : resistance, septoria, chemical treatment, strobilurin, DMI

INTRODUCTION

En France, l'utilisation de fongicides est la principale méthode de lutte contre la septoriose du blé due à *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) pour assurer une production adaptée en quantité comme en qualité aux besoins du marché. Il est donc important d'en faire une utilisation raisonnée, de façon à préserver la performance de cette technique et contribuer à la rendre plus durable.

Les strobilurines introduites en 1997 présentaient de bonnes potentialités sur cette maladie et ont certainement masqué la généralisation de la résistance aux IDM (inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols) liée à la présence de souches faiblement à moyennement résistantes dans toutes les régions céréalières françaises (Leroux *et al*, 2005).

La détection dans de nombreuses régions françaises de souches de *Septoria tritici* résistantes aux strobilurines en 2003 n'était pas une surprise (Leroux *et al*, 2004). Cette résistance a été identifiée dès 2002 en Irlande, mais aussi en Angleterre et ponctuellement en France et en Allemagne. En 2002, des cas d'échecs de contrôle de *S. tritici*, associés à la présence de ces souches résistantes ont été observés en Irlande et dans le Sud de l'Angleterre (Kent) ou encore en Ecosse.

Les carboxamides (ou SDHIs), représentées par le boscalid en France depuis 2007 et plusieurs autres matières actives en développement constituent un nouveau groupe de fongicides unisites disponibles pour lutter contre la septoriose. Ces molécules sont des inhibiteurs respiratoires du complexe mitochondrial II ou succinate deshydrogénase. Des cas de résistance au boscalid ayant été récemment signalés pour *Botrytis cinerea* et pour *Podosphaera xanthii* (oïdium du concombre).

Afin de prévenir une telle dérive, la promotion de l'usage raisonné des fongicides constitue la seule voie envisageable pour assurer une durabilité aux outils de lutte chimique. Cette approche passe par une bonne connaissance de la réalité de la résistance au champ et des différentes spécialités efficaces en situation de résistance. C'est sur cette base que s'est construit fin 2003 un réseau national baptisé « réseau performance », réunissant des partenaires de terrain autour de la question centrale de la résistance de *S. tritici* aux strobilurines (QoI), mais aussi aux triazoles (IDM) et aux carboxamides (SDHI), afin de suivre l'évolution de la résistance aux principaux fongicides utilisés et d'évaluer les conséquences pratiques sur l'efficacité des molécules concernées.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

En 2004, 47 organismes ont collaboré dans un réseau d'essai fongicides coordonné par ARVALIS - Institut du végétal et en relation avec l'INRA. L'objectif de ce réseau est d'unir des moyens expérimentaux répartis sur le territoire pour augmenter la capacité de collecte d'informations sur la lutte contre la septoriose. Grâce à cette démarche commune, sur les 104 essais suivis, la situation de la résistance aux strobilurines a été mieux appréhendée et les résultats d'efficacité des produits sont plus robustes tout en privilégiant les approches locales.

Il fallait proposer un dispositif simple avec un faible nombre de modalités communes (tableau 1) pour évaluer la dérive de performance des strobilurines et des triazoles pour lutter contre *S. tritici*. Un prélèvement de 30 feuilles septoriées est réalisé avant les traitements uniquement sur les essais ARVALIS et pour tous les essais au moment de la notation finale à T+30 jours sur les parcelles témoin non traité et sur certaines parcelles brutes

Tableau 1 : Tronc commun proposé aux partenaires du réseau Performance en 2004
Core of treatments proposed to the partners of "réseau Performance" in 2004

| N° modalités | Traitement unique Z37 à Z39 |
|--------------|---|
| (1) | Témoin non traité |
| (2) | Azoxystrobine 250 g/ha |
| 3 | Epoxiconazole 125 g/ha |
| (4) | Azoxystrobine + époxiconazole 125 + 62.5 g/ha |
| 5 | Epoxiconazole 62.5 g/ha |

(x) : modalités analysées par l'INRA

Outre la mesure de l'efficacité des différents fongicides, ce dispositif a permis d'analyser plus de 320 échantillons de blé selon le test biologique quantitatif mis au point et réalisé par l'INRA. A partir d'un échantillon parcellaire de feuilles de blé porteuses de pycnides de *Septoria tritici*, des fragments de limbe (1 à 2 cm) sont prélevés puis agités dans de l'eau stérile. Cette opération permet d'obtenir une suspension de pycnidiospores qui sera ensuite déposée à la surface de milieux gélosés contenant des concentrations discriminantes de fongicides. Après une incubation de 48 h, des observations microscopiques permettent d'évaluer les pourcentages de spores sensibles (absence de germination ou filaments courts) et de spores résistantes (filaments longs) (Leroux *et al*, 2005).

En ce qui concerne la résistance aux strobilurines et plus généralement aux Qols (phénotype StrR), la méthode retenue utilise à la fois l'azoxystrobine et la famoxadone à des concentrations discriminantes comprises entre 0,1 et 1 mg/l pour entraîner des réponses différentes entre les phénotypes sensibles et résistants. Enfin, dans le cas des triazoles et plus généralement des IDM, en criblant les spores sur du tébuconazole, du triflumizole, du pyrifénox et du prochloraze à des concentrations comprises entre 0,003 et 0,05 mg/l, il est possible de discriminer des souches faiblement à moyennement résistantes.

En 2005, le réseau performance a réuni 60 partenaires, principalement des chambres d'agriculture, mais aussi des coopératives et des négoce, le Service de la Protection des Végétaux et des firmes phytosanitaires. Sur le terrain, 142 essais mis en place par l'ensemble des partenaires (tableau 2) dans 16 régions ont permis de produire, collecter et traiter des milliers de données. Des analyses de résistance ont été conduites sur 460 échantillons issus de ces essais.

Tableau 2 : Organismes participant au réseau Performance en 2005*
Partners of the « réseau Performance » in 2005

| | | | |
|--------|-------------------|------------------------|----------------------|
| AGRIAL | CA 41 | CA 89 | GRCETA Aube |
| APVA | CA 45 | CA d'Ile de France | GRCETA Evreucin |
| BASF | CA 50 | CAM 53 | GRCETA Ile de France |
| BAYER | CA 51 | CAPSEINE | LA DAUPHINOISE |
| CA 02 | CA 52 | CDA 54 | LEPICARD Agriculture |
| CA 03 | CA 58 | CDA 55 | NATEA AGRICULTURE |
| CA 10 | CA 60 | CDA 88 | NORIAP |
| CA 14 | CA 61 | CECAB | OCEAL |
| CA 16 | CA 62 GRDA Artois | Cérégrain-Agridev | SRPV 67 |
| CA 21 | CA 71 | CETA HAM | SRPV FRANCHE COMTE |
| CA 27 | CA 72 | COOPAGRI | SUAD 68 |
| CA 28 | CA 76 | Coopérative de BROONS | TERRE DE FRANCE |
| CA 36 | CA 79 | Coopérative de CREULLY | TERRENA |
| CA 37 | CA 80 | Epis Centre | UCATA |
| CA 39 | CA 86 | FDGEDA 18 | UNEAL |

(*) Que les acteurs qui ont contribué à ce réseau trouvent ici l'expression de notre gratitude.

Pour la seconde année, l'objectif du réseau était de poursuivre la surveillance des populations françaises mais également d'évaluer l'intérêt technique et économique du maintien des strobilurines en fonction de l'implantation de la résistance à ces fongicides. Pour se rapprocher des conditions d'utilisation pratique, nous avons testé différents programmes en double application (tableau 3). Nous avons par exemple comparé des solutions avec "triazole+strobilurine" appliquées deux fois, à des solutions s'appuyant exclusivement sur des triazoles. La même comparaison a été réalisée pour une seule application au T1 ou au T2. Enfin, certains essais ont inclus des produits de contact comme le chlorothalonil.

Tableau 3 : Tronc commun proposé aux partenaires du réseau Performance en 2005
Core treatments proposed to the partners of «réseau Performance» in 2005

| N° modalités | T1 de Z32 à Z37 | T2 de Z45 à Z55 |
|--------------|--|--|
| (1) | Témoin non traité | Témoin non traité |
| (2) | Epoxiconazole 75 g/ha | Epoxiconazole 75 g/ha |
| 3 | Epoxiconazole 50 g/ha | Epoxiconazole 50 g/ha |
| (4) | Epoxiconazole + Pyraclostrobine* 50 + 50 g/ha | Epoxiconazole + Pyraclostrobine* 50 + 50 g/ha |
| 5 | Epoxiconazole 75 g/ha | Epoxiconazole + Pyraclostrobine* 50 + 50 g/ha |
| 6 | Epoxiconazole + Pyraclostrobine* 50 + 50 g/ha | Epoxiconazole 75 g/ha |

* pyraclostrobine à 50 g/ha peut être remplacée par azoxystrobine ou trifloxystrobine ou picoxystrobine à 50 g/ha
(x) : modalités analysées par l'INRA

En 2006, en troisième année, l'objectif du réseau a été de poursuivre la caractérisation et la distribution des souches de *S. tritici*. Au-delà de la résistance aux strobilurines généralisée dans les régions septentrionales, c'est à l'analyse de la structure des populations de *S. tritici* vis-à-vis des IDM et après différents traitements que doit répondre le réseau performance. Une double application exerçant une pression de sélection plus forte a été retenue (tableau 4).

Tableau 4 : Tronc commun proposé aux partenaires du réseau Performance en 2006
Core treatments proposed to the partners of «réseau Performance» in 2006

| N° modalités | T1 de Z32 à Z37 | T2 de Z45 à Z55 |
|--------------|---|---|
| (1) | Témoin non traité | Témoin non traité |
| (2) | Epoxiconazole 75 g/ha | Epoxiconazole 75 g/ha |
| 3 | Epoxiconazole 50 g/ha | Epoxiconazole 50 g/ha |
| 4 | Epoxiconazole + Mancozebe 50 g/ha + 1500 g/ha | Epoxiconazole + Mancozebe 50 g/ha + 1500 g/ha |
| (5) | Epoxiconazole + Prochloraze 50 g/ha + 315 g/ha | Epoxiconazole + Prochloraze 50 g/ha + 315 g/ha |
| (6) | Epoxiconazole + Pyraclostrobine* 50 + 50 g/ha | Epoxiconazole + Pyraclostrobine* 50 + 50 g/ha |

* pyraclostrobine à 50 g/ha peut être remplacé par azoxystrobine ou trifloxystrobine ou picoxystrobine à 50 g/ha
(x) : modalités analysées par l'INRA

En 2006, ceux sont au total plus de 800 échantillons prélevés et qui ont fait l'objet de multiples analyses de résistance et sur le terrain un total de 115 essais a été mis en place sur 18 régions françaises. Les organismes suivants ont participé :

Tableau 5 : Organismes participant au réseau Performance en 2006*
Partners of the « réseau Performance » in 2006

| | | | |
|-------------|-----------|-------------------------|--------------------|
| AGRIAL | CA 51 | CDA 88 | LEPICARD |
| AGRODOC | CA 58 | CECAB | MCA |
| ANJOU MAINE | CA 60 | Cérégrain-Agridev | NATEA AGRICULTURE |
| APVA 52 | CA 61 | CERENA | NORIANP |
| BASF | CA 62 | CEREXAGRI | OCEAL |
| BAYER | CA 72 | CETA Champagne | RAGT |
| CA 02 | CA 76 | CETA HAM | SILO DU MIRANDAIS |
| CA 14 | CA 79 | COHESIS | SRPV Alsace |
| CA 16 | CA 80 | COOPAGRI BRETAGNE | SRPV Franche-Comté |
| CA 27 | CA 86 | Coopérative de Bröons | SYNGENTA |
| CA 28 | CA 89 | Coopérative de Creully | TERRE DE France |
| CA 33 | CA 95 | Coopérative EPIS CENTRE | TERRENA |
| CA 36 | CAPSEINE | La Dauphinoise | TERRES DE |
| CA 37 | CAPServal | CRA BRETAGNE | UCATA |
| CA 39 | CASCAP | EMC2 | UNEAL |
| CA 41 | CAVAC | FDGEDA 18 | UNION SET |
| CA 45 | CDA 54 | GCO | |
| CA 50 | CDA 55 | LA TOULOUSAINE | |

En 2007, ce sont au total plus de 940 échantillons prélevés et qui ont fait l'objet de multiples analyses de résistance. Sur le terrain 119 essais ont été mis en place sur 18 régions françaises. Si la présence de rouille brune a perturbé notablement les essais aux champs, les analyses au laboratoire ont pu être réalisées dans de bonnes conditions. Le dispositif terrain a été coordonné par ARVALIS - Institut du végétal ; les organismes ayant participé, sont présentés au Tableau 6

Tableau 6 : Organismes participant au réseau Performance en 2007*
Partners of the « réseau Performance » in 2007

| | | | |
|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| AGRIAL | CA 50 | Cérégrain-Agridev | La Toulousaine |
| AGRODOC | CA 54 | CERENA | LEPICARD |
| ANJOU MAINE CEREALES | CA 55 | CEREXAGRI | LORCA |
| APVA | CA 58 | CETA de HAM | MAKHTESHIM-AGAN |
| BASF | CA 60 | COHESIS | MCA |
| BAYER | CA 61 | Coopérative CREULLY | NORD NEGOCE |
| CA 10 | CA 62 (GRDA Artois) | EPIS CENTRE | NORIANP |
| CA 14 | CA 76 | NATEA | OCEAL |
| CA 16 | CA 80 | COOPAGRI | SEPAC |
| CA 17 | CA 86 | Coopérative de BROONS | SRPV Alsace |
| CA 27 | CA 88 | CRA BRETAGNE | SRPV FREDON Franche Comté |
| CA 28 | CA Ile de France | DOW AGROSCIENCE | SYNGENTA |
| CA 33 | CAM 53 | EMC2 | TERRENA |
| CA 36 | CAPROGA | Ets HAUBOIS | UCATA |
| CA 41 | CAPSEINE | FDGDA 18 | UNEAL |
| CA 45 | CAVAC | GRCETA d'Issoudun | UNION SET |
| CA 49 | CECAB | La Courcelle | |

En 2007, le protocole a encore évolué. Deux doses ont été testées pour le prothioconazole dans un rapport du simple au double pour déceler un effet dose. Les deux triazoles les plus utilisées sont comparés à forte dose (0.75 à 0.8N) en double application pour déceler d'éventuelles souches fortement résistantes aux IDM (TriHR) (tableau 5).

Tableau 5 : Tronc commun proposé aux partenaires du réseau Performance en 2007

Core treatments proposed to the partners of «réseau Performance» in 2007

| N° modalités | T1 de Z32 à Z37 | T2 de Z45 à Z55 |
|--------------|--|--|
| (1) | Témoin non traité | Témoin non traité |
| (2) | Prothioconazole 150 g/ha | Prothioconazole 150 g/ha |
| (3) | Prothioconazole 75 g/ha | Prothioconazole 75 g/ha |
| (4) | Epoconazole 100 g/ha | Epoconazole 100 g/ha |
| (5) | Prothioconazole 75 g/ha + Prochloraze 315 g/ha | Prothioconazole 75 g/ha + Prochloraze 315 g/ha |

(x) : modalités analysées par l'INRA

En 2008 et en 2009, ce sont au total plus de 886 et 690 échantillons prélevés et qui ont fait l'objet de multiples analyses de résistance. Sur le terrain 116 et 108 essais ont été mis en place sur 17 régions françaises.

L'unité UMR 1290 BIOGER-CPP (ex-phytopharmacie de l'INRA Versailles) a réalisé l'ensemble des analyses (P. Leroux *et al*). Le dispositif terrain a été coordonné par ARVALIS - Institut du végétal ; les organismes ayant participé, sont présentés au Tableau 7.

Tableau 7 : Tronc commun proposé aux partenaires du réseau Performance en 2008
Core treatments proposed to the partners of «réseau Performance» in 2008

| | | | |
|--------|--------|---------------------------------------|-----------------------|
| AGRIAL | CA 58 | CETA Champagne Berrichonne | La Toulousaine |
| ARYSTA | CA 59 | CETA de HAM | NORIAP |
| AXION | CA 60 | CETA des 3 vallées | OCEAL |
| BASF | CA 61 | Chambre d'Agriculture d'Ile de France | SRPV 68 |
| BAYER | CA 80 | COHESIS | SYNGENTA |
| CA 02 | CA 86 | Coopérative EPI CENTRE | UCARA |
| CA 14 | CAM 53 | Coopérative de Bonneval | UCATA |
| CA 36 | CDA 54 | DOW AGROSCIENCE | Union Set |
| CA 37 | CDA 88 | Ets HAUTOBOIS | Union Terre de France |
| CA 53 | CERENA | FDGDA 18 | |

(*) Que les acteurs qui ont contribué à ce réseau trouvent ici l'expression de notre gratitude

En 2008 et 2009, nous avons utilisé le prothioconazole et l'époconazole associé au boscalid en référence pour évaluer leur effet respectif sur les proportions des différents phénotypes résistants aux IDM. S'agissant des carboxamides (boscalid) les premières analyses ont été conduites à partir de 2008 avec une concentration discriminante 10 fois supérieure à la CI_{50} des souches sensibles.

Tableau 8 : Tronc commun proposé aux partenaires du réseau Performance en 2008, 2009
Core treatments proposed to the partners of «réseau Performance» in 2008, 2009

| N° modalités | T1 de Z32 à Z37 | T2 de Z45 à Z55 |
|--------------|--|--|
| (1) | Témoin non traité | Témoin non traité |
| (2) | Prothioconazole 125 g/ha | Prothioconazole 125 g/ha |
| (3) | Epoconazole 60 g/ha + Boscalid 210 g/ha | Epoconazole 60 g/ha + Boscalid 210 g/ha |
| (4) | Epoconazole 62.5 g/ha + Prochloraze 315 g/ha | Epoconazole 62.5 g/ha + Prochloraze 315 g/ha |
| 5* | Epoconazole 60 g/ha + Boscalid 210 g/ha | Prothioconazole 125 g/ha |

(1) : modalités analysées par l'INRA

* uniquement 2008. En 2009, Cyproconazole 64 g/ha + Propiconazole 100 g/ha + Chlorothalonil 500 g en T1 puis Epoconazole 62.5 g/ha + Prochloraze 315 g/ha

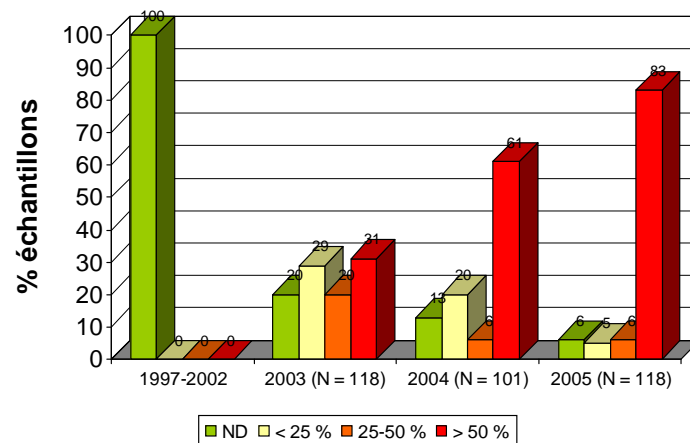
RESULTATS

Etat de la résistance :

UNE PROGRESSION RAPIDE ET CONTINUE DE LA RESISTANCE AUX STROBILURINES

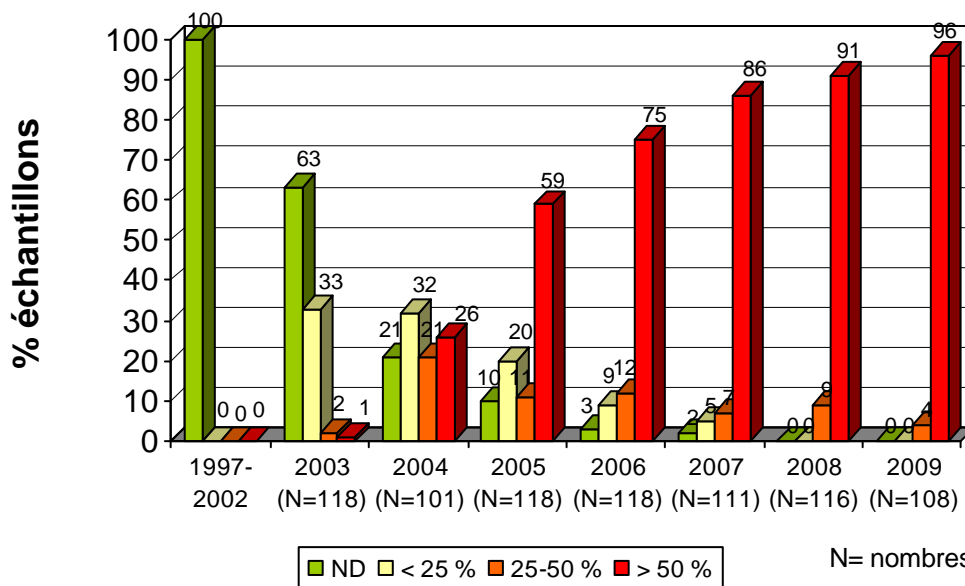
En France, comme dans beaucoup d'autres pays européens, une progression rapide de la résistance aux strobilurines est observée entre 2003 et 2005. A titre indicatif, la proportion d'échantillons qui présentent une fréquence de souches résistantes supérieure à 50 %, après traitement strobilurines, passe de 31 % en 2003 à 61 % en 2004 à 83 % en 2005 (Figure 4). Il convient également de noter la correspondance entre la situation de fin de saison sur les parcelles traitées en 2004 et celle au printemps avant traitement (Figures 4 et 5).

Figure 4 : Evolution temporelle de la résistance aux Strobilurines en France (échantillons du réseau Performance traités strobilurines pour 2004 et 2005)
Evolution over time of strobilurin resistance in France (samples from the "réseau Performance" treated with strobilurins in 2004 and 2005)



N= nombres d'échantillons

Figure 5 : Evolution temporelle de la résistance aux strobilurines en France (échantillons du réseau Performance témoins non traités)
Evolution through time of strobilurin resistance in France (untreated samples from the "réseau Performance")



N= nombres d'échantillons

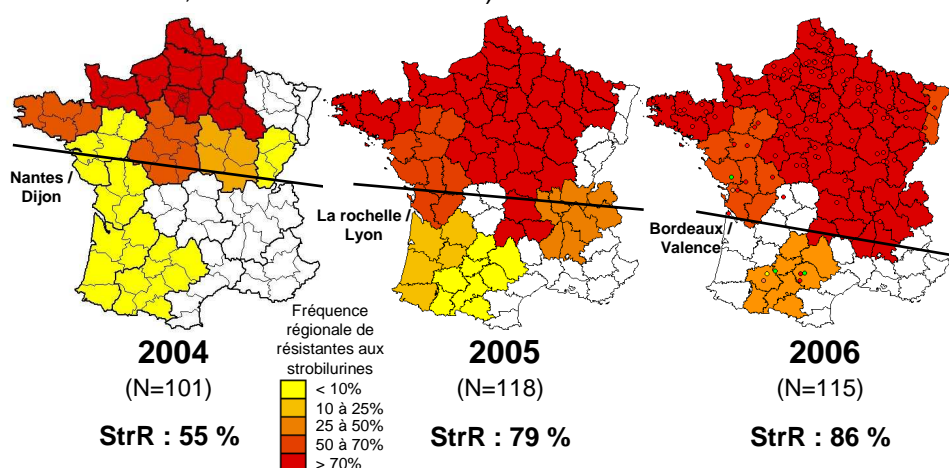
Pour 2009, l'ensemble des 108 sites d'essai analysés, la fréquence de la mutation G143A dépasse 50% dans 96% des cas (75% et 86% et 91% respectivement en 2006, 2007, et 2008). Il n'y a donc plus lieu de compter sur les strobilurines pour lutter contre la septoriose du blé tendre.

DISTRIBUTION SPATIALE DE LA RESISTANCE AUX STROBILURINES

Entre 2003 et 2004, la fréquence des résistances aux strobilurines a progressé sur l'ensemble du territoire pour atteindre des valeurs élevées au nord d'un axe Nantes - Dijon et pouvant atteindre localement jusqu'à 100 % au Nord de Paris (Figure 6). En 2005, les résultats d'analyse attestent d'une nouvelle progression de la résistance aux strobilurines désormais généralisée sur la moitié Nord de la France.

Le Nord, l'Est, l'Ouest et le Centre de la France sont les plus touchés par cette résistante. Le Poitou-Charentes, la Franche-Comté et Rhône-Alpes sont également concernés mais de façon plus modérée. Fin 2005, seules les régions au Sud d'une ligne La Rochelle - Lyon semblent encore épargnées.

Figure 6 : Distribution régionale de la résistance de *S. tritici* aux strobilurines entre 2004 et 2006 (101, 118 et 115 sites du réseau Performance ; analyses INRA en fin de saison après traitement strobilurines)
Regional distribution of *S. tritici* resistance towards strobilurins, between 2004 and 2006 (101, 118 et 115 locations from the "réseau performance"; analyses from INRA at the end of the season, after strobilurin treatment)



Il faut noter que ce phénomène ne semble pas lié à la gravité des attaques de septoriose puisqu'il s'est produit en France avec des années peu favorables à la septoriose comme 2003 et 2004. Au contraire, les précipitations du printemps 2005 ont conduit à une pression de maladie exceptionnelle, révélant les faiblesses de la lutte fongicide.

Le suivi parcellaire des populations de *S. tritici* indique que les strobilurines seules ou associées sélectionnent la résistance, la pression étant généralement supérieure avec les strobilurines solo (Couleaud *et al*, 2006).

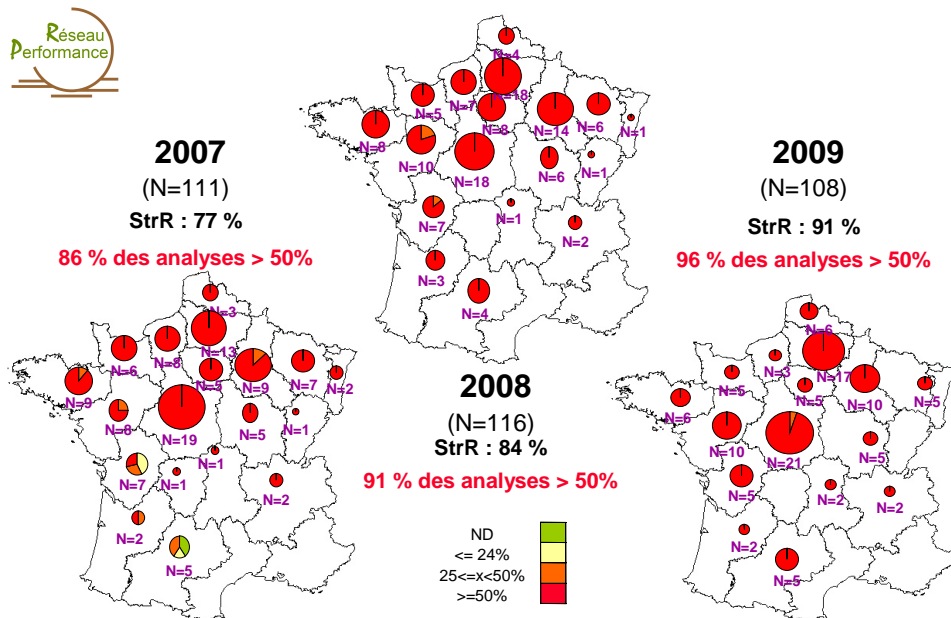
Quant à la progression pluriannuelle de la résistance, elle peut aussi résulter de la dissémination des allèles de résistance aux strobilurines entre parcelles par l'intermédiaire des ascospores issues de la reproduction sexuée de *M. graminicola*, comme le suggèrent les observations de l'INRA de Versailles sur un dispositif n'ayant jamais reçu de strobilurines (Leroux *et al*, 2003, 2004).

En 2007, la situation de la résistance aux QoI était généralisée sur l'ensemble du territoire à l'exception des régions les plus méridionales, où co-existaient des souches résistantes et des souches sensibles. En 2008, la situation avait encore progressé dans le sud de la France. Toutes les régions sont désormais affectées, y compris les régions sud (Figure 7).

En revanche les rares analyses réalisées en 2009 sur blé dur font apparaître des souches sensibles ou faiblement résistantes aux strobilurines.

Figure 7 : Distribution régionale de la résistance de *S. tritici* aux strobilurines entre 2007 et 2009 (111, 116 et 108 sites du réseau Performance ; analyses INRA en fin de saison sur les témoins non traités en fin de saison)

Regional distribution of *S. tritici* resistance towards strobilurins, between 2007 and 2009 (111, 116 et 108 locations from the « réseau performance »; analyses from INRA at the end of the season on untreated plot)



UNE RESISTANCE GENERALISEE AUX IDM

Les IDM (Inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols) constituent la principale famille de fongicides inhibant la biosynthèse des stérols (IBS). Ils incluent des pyridines (ex pyrifénox), des imidazoles (ex prochloraze, triflumizole) et des triazoles (ex cyproconazole, difénoconazole, époxiconazole, fluquinconazole, metconazole, propiconazole, tébuconazole, triadimérol) ; le prothioconazole est une triazolinethione proche des triazoles. Leur cible commune est le stérol 14 α -déméthylase, une enzyme à cytochrome P450 codée par le gène *CYP51*.

Les analyses conduites en France depuis 1997 montrent que dans toutes les régions céréalières les souches sensibles aux IDM sont très rares. Jusqu'au début des années 2000, la plupart des souches étaient faiblement résistantes aux IDM (TriLR), mais actuellement, de nouveaux phénotypes moyennement résistants (TriMR) se sont implantés (Leroux *et al*, 2006). Les travaux conduits dans le cadre du « réseau performance », indiquent que dans les sites où dominent des souches faiblement résistantes, l'application d'un triazole comme l'époxiconazole sélectionne des souches moyennement résistants.

Depuis 2006, les souches moyennement résistants sont majoritaires dans toutes les régions françaises. Elles restent cependant faiblement résistantes et pour une part entièrement sensibles au prochloraze, en particulier sur les régions de la façade atlantique. Noter que le prochloraze, bien qu'appartenant aux IDM est particulièrement efficace en association, et exerce une contre pression de sélection sur une partie des souches moyennement résistants aux IDM.

Plusieurs types de souches de *S. tritici* faiblement (TriLR) à moyennement résistantes (TriMR) aux IDM ont été décelées au champ. 8 phénotypes ont été identifiés par P. Leroux (Leroux et al, 2007.). Chaque type ou phénotype est caractérisé par sa sensibilité CI_{50} au pyrifénox, au triflumizole, au prochloraze, au triadiménol, au tébuconazole, au fluquinconazole, au metconazole et à l'époxiconazole (tableau 9). Les doses discriminantes sont comprises entre 0.0025 et 5 mg/l permettent notamment de séparer les TriR actuelles en deux sous-classes caractérisées respectivement par des niveaux de résistance faibles (TriLR) et moyens (TriMR) vis-à-vis de la majorité des IDM (le triflumizole à une forte concentration est le meilleur discriminant). En outre, pour détecter d'éventuelles souches fortement résistantes aux IDM (TriHR), un criblage est réalisé avec de l'époxiconazole, du prochloraze et du prothioconazole à des concentrations discriminantes de 50 à 100 fois supérieures à leur CI_{50} respectives pour les souches TriS.

Il n'y a pas de résistance croisée systématique entre tous les IDM (tableau 9)

Par ailleurs, pour ces différents phénotypes, la résistance est déterminée par une ou plusieurs mutation dans le gène *CYP51* ainsi que par une double délétion Y459/G460 (Leroux et al, 2007).

Tableau 9 : Caractérisation in-vitro des souches de *Septoria tritici* résistantes aux IDM
Resistance factors of different types of strains of *Septoria tritici* to different DMI's assessed in-vitro

| Fongicides | CI_{50} en mg/l | Facteurs de Résistance (FR) | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | TriS | TriLR | | | | | TriMR | | |
| | | | TriR1 | TriR2 | TriR3 | TriR4 | TriR5 | TriR6 | TriR7 | TriR8 |
| Pyrifénox | 0,001 | 3 | 8 | 10 | 27 | 28 | 36 | 31 | 40 | |
| Propiconazole | 0,004 | 2 | 6 | 14 | 13 | 21 | 35 | 27 | 54 | |
| Cyproconazole | 0,05 | 2 | 2 | 7 | 4 | 6 | 11 | 8 | 13 | |
| Metconazole | 0,002 | 4 | 3 | 9 | 10 | 8 | 16 | 10 | 18 | |
| Epoxiconazole | 0,002 | 4 | 3 | 14 | 6 | 9 | 26 | 11 | 23 | |
| Prothioconazole | 0,04 | - | 3 | 4 | 4 | 5 | 8 | 7 | 7 | |
| Triadiménol | 0,6 | 17 | 2 | 25 | 7 | 3 | 27 | 21 | 22 | |
| Triflumizole | 0,004 | 0,3 | 10 | 0,8 | 28 | 31 | 333 | 194 | 722 | |
| Fluquinconazole | 0,003 | 0,5 | 3 | 1,3 | 6 | 14 | 20 | 15 | 23 | |
| Difénoconazole | 0,0002 | 3 | 6 | 20 | 16 | 1,6 | 30 | - | 67 | |
| Tébuconazole | 0,01 | 4 | 8 | 14 | 21 | 1,8 | 75 | 52 | 92 | |
| Prochloraze | 0,002 | 3 | 4 | 9 | 7 | 15 | 7 | 1,5 | 0,8 | |

(Leroux et al, 2007) $FR = CI_{50} \text{ TriR} / CI_{50} \text{ TriS}$

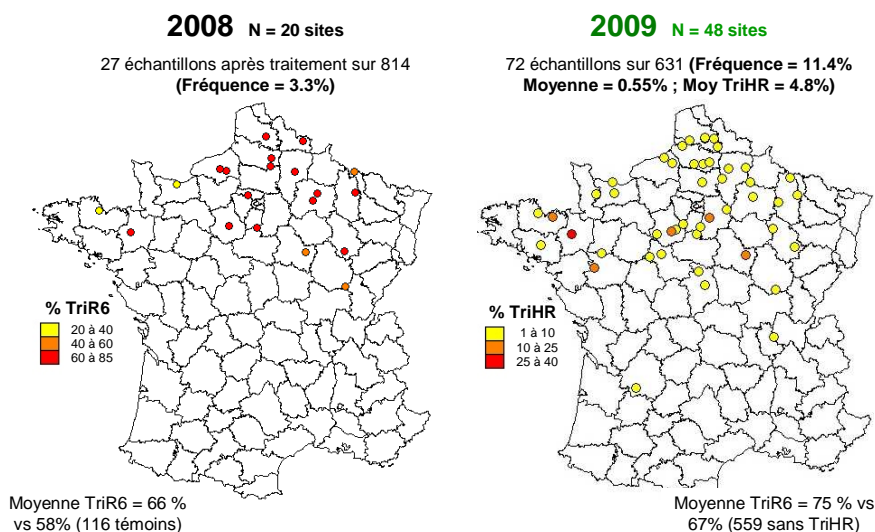
En 2009 comme depuis 3 ans, les phénotypes détectées sont TrR2+TriR4, TriR5 parmi les souches TriLR et TriR6, TriR7+TriR8 pour les TriMR, avec, comme depuis 2006 dans la plupart des régions, une large majorité de souches TriMR (TriR6+TriR7+TriR8).

Jusqu'à 2007 aucune souche de type TriHR n'avait été détectée. En 2008, quelques rares souches TriHR ont été décelées au niveau national (3.5%)(communiqué disponible sur le site de l'AFPP :

<http://www.afpp.net/commande/commissions/Maladies/Communiqué%20INRA%20Bioger%20résistance%20septoriose.pdf>

Sur les échantillons prélevées en fin de saison 2009, la fréquence d'échantillons où ces souches TriHR sont détectées, passe à un peu plus de 11%. Au sein des populations la fréquence moyenne des souches TriHR est en moyenne de 4.8% sur les échantillons du réseau performance (72 échantillons) (Figure 1)

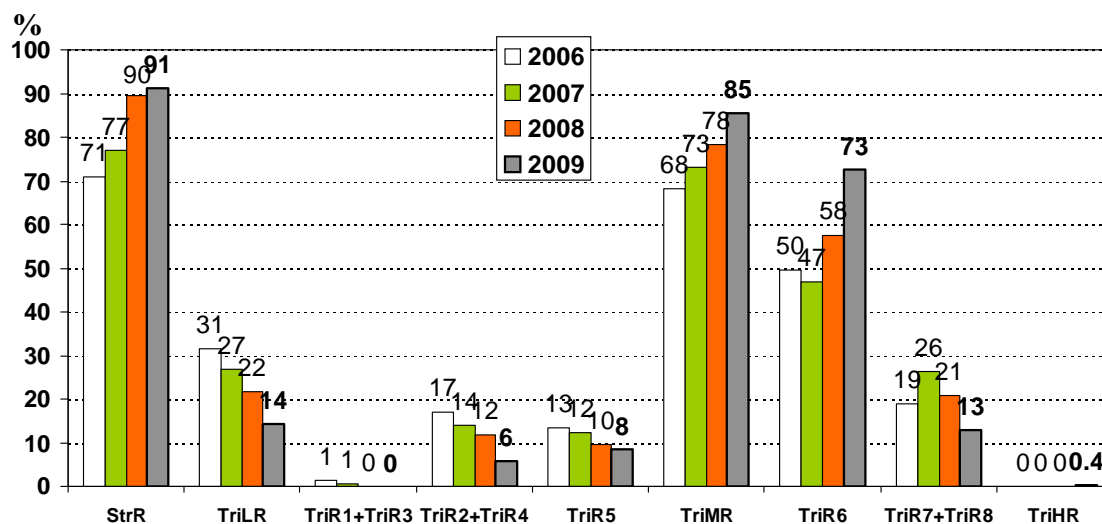
Figure 1 : Distribution géographique des souches de *Septoria tritici* TriHR hautement résistantes aux IDM en 2009



Les souches TriHR ont été détectées sur 48 sites, situés presque exclusivement au nord de la Loire, et donc au sein de population où dominent très largement les souches de types TriR6

Si l'émergence de souches TriHR est l'évènement marquant de l'année 2009, on note également une évolution significative des souches TriMR et en particulier TriR6, qui représentent à elles seules 85% de la population en fin de saison (respectivement 68%, 73% et 78% en 2006, 2007 et 2008)(Figure 2).

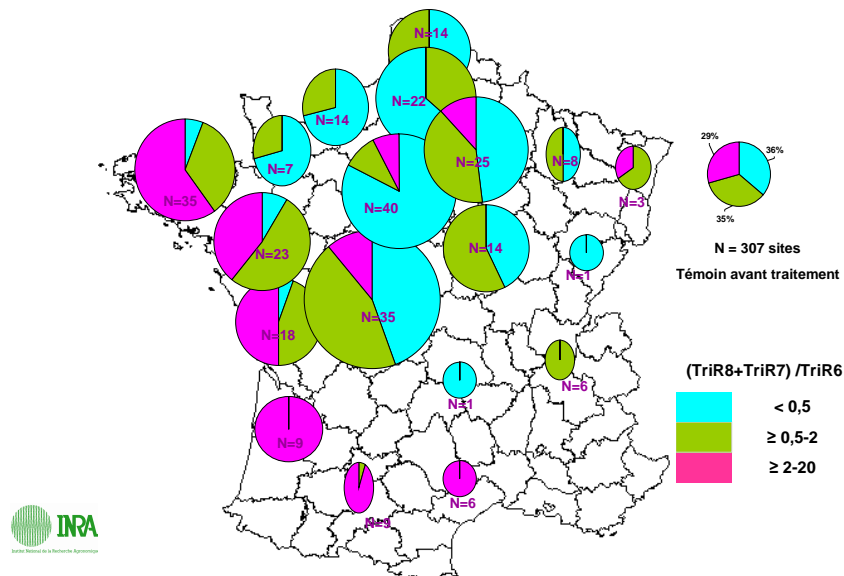
Figure 2 : Evolution des populations de *Septoria tritici* sur le "Réseau Performance" de 2006 à 2009
118, 111, 116, 108 situations analysées en 2006, 2007, 2008 et 2009 : en fin de saison et en l'absence de traitement - analyses : INRA-UMR Bioger-CPP



Sur l'ensemble des sites du "Réseau Performance", on constate une nette augmentation des phénotypes TriMR sur les témoins non traités, au détriment des souches TriLR. Autre élément marquant l'émergence de souches TriHR, qui représentent en fréquence moyenne sur l'ensemble des essais 0.4% des populations caractérisées

En 2008, les résultats des analyses avaient fait apparaître une structuration géographique des populations. Si les souches TriMR dominaient dans toutes les régions, les souches TriR6 et TriR7+TriR8 présentaient des équilibres variables selon les régions (Figure 3).

Figure 3 : Distribution régionale des souches de *Septoria tritici* résistantes aux DMI portant la double délétion $\Delta Y459/G460$ (TriR7+TriR8) en 2008



En 2009, la forte progression des souches TriR6 tend à uniformiser ces différences. Les souches TriR7 + Tri R8 (les plus sensibles au prochloraze) dominent plus rarement. Elles restent dominantes uniquement dans les populations des régions Midi Pyrénées, Aquitaine, et Poitou Charentes, Tandis qu'ailleurs les souches TriR6 (légèrement résistantes au prochloraze) sont ultra dominantes.

Toutefois, comme nous allons le voir par la suite, l'efficacité pratique des IDM reste correcte vis-à-vis de la septoriose.

UNE PREMIERE DETECTION DE SOUCHES MOINS SENSIBLES AUX CARBOXAMIDES ?

S'agissant des carboxamides (boscalid) les premières analyses ont été conduites en 2008. Aucune souche résistante n'avait été détectée. En 2009, aucune souche moyennement ou fortement résistante n'a été détectée. En revanche, les souches TriHR moins sensibles à cette famille de fongicides

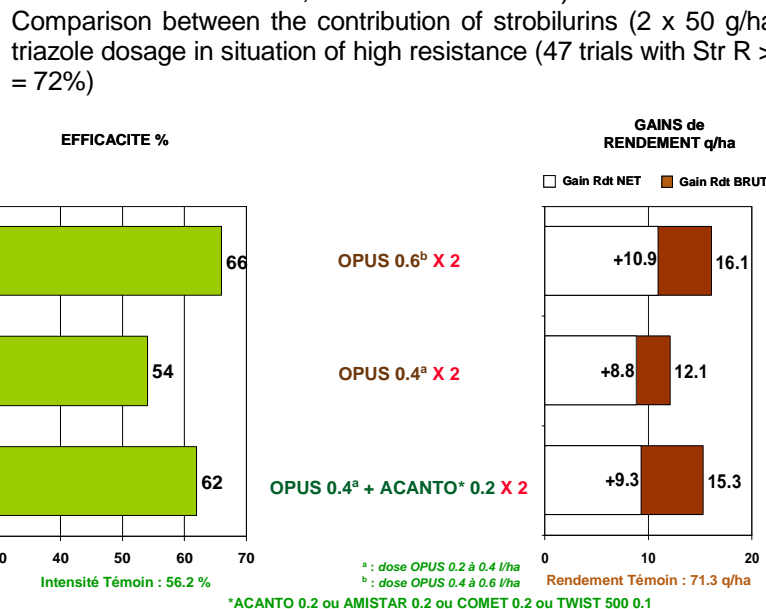
UNE RESISTANCE AUX STROBILURINES QUI REMET EN CAUSE L'UTILISATION DE CES FONGICIDES VIS-A-VIS DE LA SEPTORIOSE

En 2004, une mise en évidence de la résistance en pratique (Couleaud *et al*, 2006)

En 2005, l'efficacité des strobilurines est le plus souvent réduite à une activité résiduelle dans les régions du Nord de la France. Les premiers signes de perte d'efficacité constatés en 2004 se confirment. On peut, par exemple, observer des niveaux d'efficacité résiduels de l'ordre de 15 à 30 % avec les strobilurines utilisées seules (Maufras et Maumené, 2005).

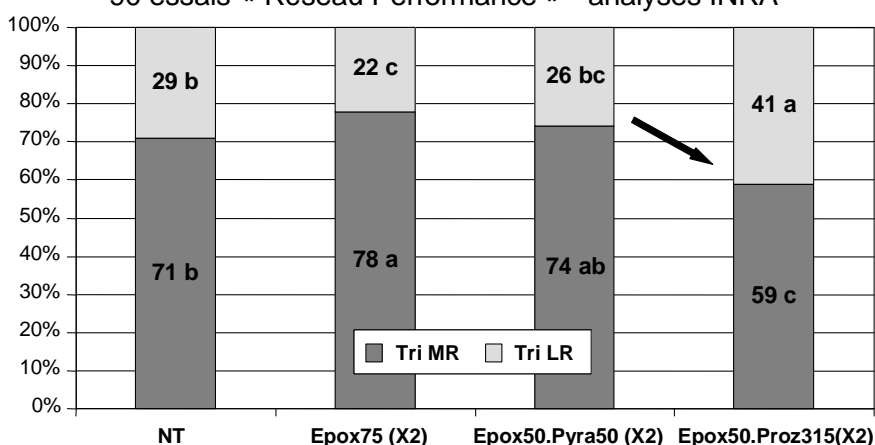
Dans ces conditions, faut-il en situation de résistance maintenir les strobilurines pour lutter contre la septoriose, ou renforcer la dose de triazole, ou encore opter pour l'introduction d'un autre partenaire comme le chlorothalonil ? Compte tenu de la pression septoriose de 2005, les réponses à ces interrogations ont été particulièrement claires. En situations de résistance, bien implantée, même si les strobilurines continuent d'apporter un plus tant en efficacité qu'en rendement brut (2 à 3 q/ha), la réponse apportée par un renforcement de la dose de triazole s'est avérée économiquement supérieure (Figure 8).

Figure 8 : Comparaison d'un apport de strobilurines (2 x 50 g/ha) par rapport à une augmentation de la dose de triazole en situations de résistance généralisée (47 essais avec StrR>30%, StrR témoin = 72%).



En 2006, si l'on s'intéresse à la répartition des phénotypes en fonction des traitements, on constate d'une part que l'application de 2 doses fortes d'époxiconazole (2 x 75 g/ha) ou de prothioconazole (résultats non illustré) sélectionne les souches moyennement résistantes (TriMR). D'autre part, le prochloraze seul ou associé à l'époxiconazole fait diminuer la fréquence de souches TriMR (Figure 9).

Figure 9 : Répartition des phénotypes résistants aux IDM en fonction des traitements
90 essais « Réseau Performance » - analyses INRA



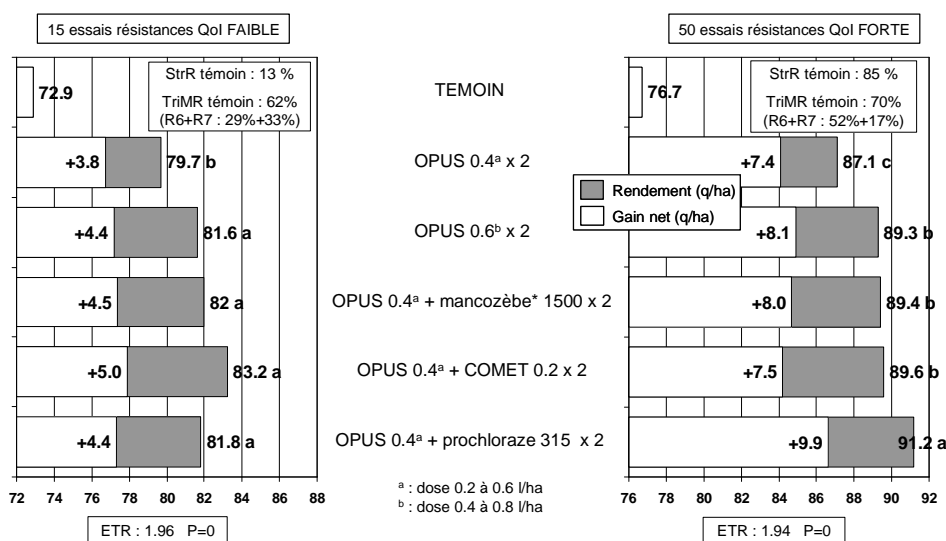
Le prochloraze contre sélectionne de façon significative les souches moyennement sensibles aux triazoles

Si l'on considère les essais (50 essais) où la résistance est fortement implantée (StrR > 30% sur les témoins), les conclusions sont identiques à celles de 2005. L'efficacité de la strobilurine, est certes significative, mais techniquement et/ou économiquement inférieure aux solutions alternatives. La rendement et la rentabilité du programme Opus 0.4 l + Comet 0.2 l/ha est par exemple significativement inférieure au programme associant Opus avec du prochloraze. Par ailleurs, si la solution (Opus + Comet) dans ces situations est équivalente à la solution triazole solo ou triazole + contact, le résultat économique reste inférieur (Figure 10). Il n'est donc pas nécessaire de maintenir dans les programmes une strobilurine comme partenaire des triazoles pour lutter contre la septoriose, en situation de résistance au Qol.

Si l'on considère maintenant les 15 essais où la résistance est faiblement implantée (StrR < 30% sur les témoins), le gain de productivité permis par 2 fois 50 g de strobilurines est de 3.5 q/ha, c'est à dire supérieur de 1.6 q/ha à celui d'une dose renforcée d'OPUS. Dans ces situations, principalement localisées au Sud de la France, l'utilisation d'une strobilurine reste encore économiquement intéressante.

Noter que sur quelques essais, la présence de rouille brune ou de *Microdochium nivale* a contribué favorablement aux résultats positifs des strobilurines.

Figure 10 : résultats rendements sur le « Réseau Performance » en fonction du niveau de résistance



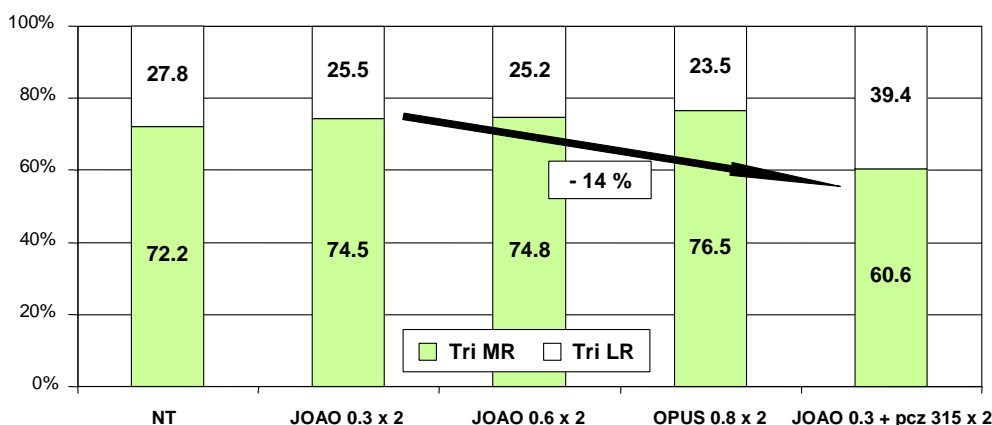
Toutes situations confondues (65 essais), le gain brut permis par l'ajout de 100 g/ha de pyraclostrobine est de 2.8 q/ha, quand l'apport de 630 g/ha de prochloraze sur une base OPUS permet un gain brut de 3.6 q/ha

EFFICACITE EN PRATIQUE DES IDM

En 2007, l'effet des traitements sur la structure des populations en particulier sur la proportion des types TriLR et TriMR est comparable à celui observé en 2006. Aucune différence n'est apparente entre le prothioconazole et l'époxiconazole sur ce critère.

Deux doses ont été testées pour le prothioconazole dans un rapport du simple au double. En moyenne sur 55 situations, aucun effet dose n'est observé. Il est vrai que la proportion de souches TriMR est déjà très élevée au départ et que dans ces conditions, un éventuel effet est plus difficilement décelable. En revanche l'impact de l'association de prothioconazole et de prochloraze, apparaît clairement et se distingue de celui des autres modalités étudiées. Après traitement avec cette association, la proportion de souches TriMR diminue sensiblement (-14 points). La contre sélection exercée par le prochloraze sur la fréquence de souche TriMR est confirmée (Figure 11)

Figure 11 : Effet des traitements sur les souches de Septoriose résistantes aux IDM
55 situations Réseau Performance 2007



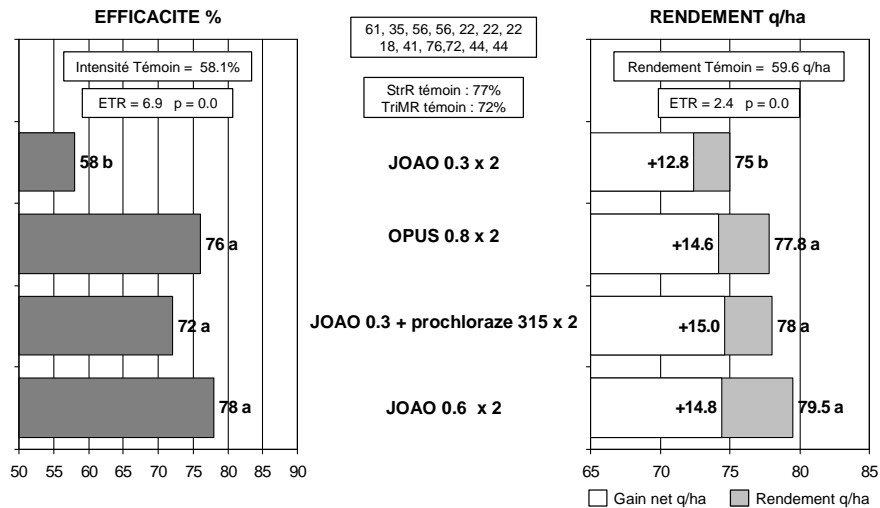
Comme en 2006, le prochloraze contre sélectionne les souches moyennement sensibles aux triazoles

En termes d'efficacité et de rendement, sur les 13 essais où seule la septoriose était présente, les résultats d'efficacité du prothioconazole (Joao 0.6) et de l'époxiconazole (OPUS 0.8) sont comparables, respectivement 78 % et 76 %. Les résultats de rendement sont à l'image des efficacités et en tendance favorables au prothioconazole avec 1.7 q/ha de mieux que l'époxiconazole : de quoi compenser la différence de prix de ces deux solutions. Ces résultats sont cohérents avec ceux acquis en 2006, dans un contexte de maladie purement « septoriose ». Les qualités du prothioconazole pour lutter contre la septoriose sont confirmées.

S'agissant de l'effet dose du prothioconazole sur septoriose il est très clairement perceptible. La dose de 0.3 l/ha de JOAO est statistiquement différente des autres solutions testées et est à la fois techniquement et économiquement inférieure (Figure 12).

Enfin l'addition de prochloraze sur une base de 0.3 l/ha de Joao, améliore à la fois les efficacités et les rendements. On confirme ainsi dans un contexte différent, en association avec un autre triazole, les résultats acquis par le réseau en 2006 avec de l'époxiconazole. L'intérêt pratique du prochloraze est confirmé sur le terrain. Ces résultats justifient son utilisation comme partenaire des triazoles sur septoriose. Sa capacité à contre sélectionner les souches TriMR, renforce son intérêt en mélange. Cela ne justifie pas pour autant de systématiser l'utilisation de cette matière active, quel que soit le partenaire envisagé.

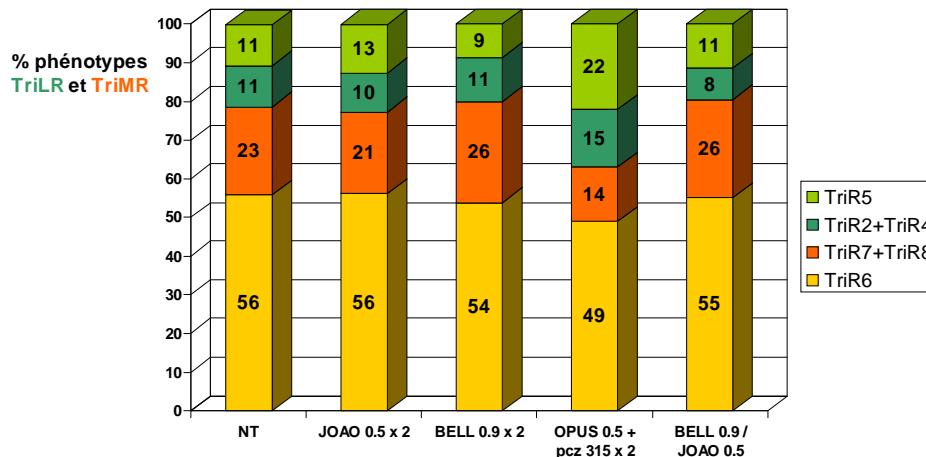
Figure 12 : Résultats d'efficacité et de rendement en situation à dominante septoriose
13 essais « Réseau Performance » 2007



Le prochloraze confirme son rôle de partenaire pour lutter contre la septoriose

En 2008, aucune différence n'est apparente entre les deux traitements de référence (JOAO, BELL), et la structure de la population reste comparable à celle observée en l'absence de traitement. Comme les années précédentes le prochloraze (ici associé à l'époxiconazole) contre sélectionne les souches moyennement sensibles aux triazoles (Figure 13). Ce sont principalement les souches TriR7+TriR8, les plus sensibles au prochloraze qui disparaissent au profit des souches TriR5.

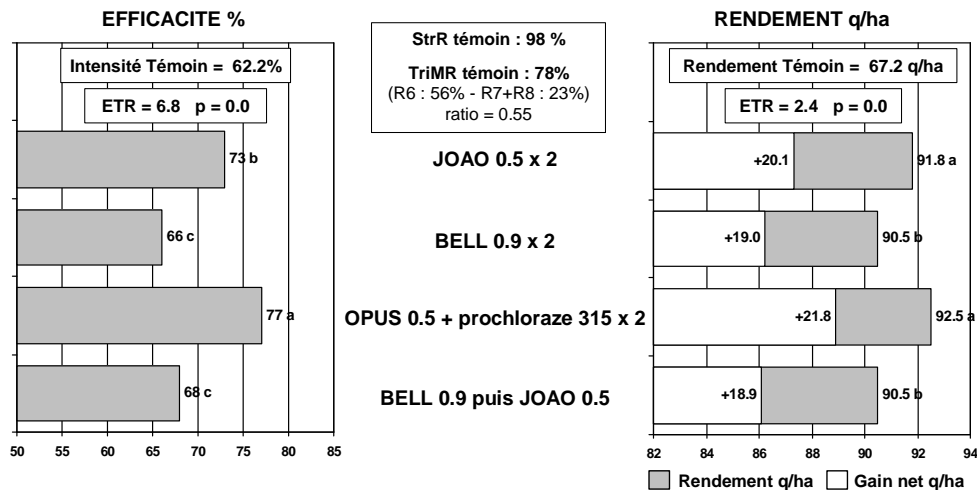
Figure 13 : Effet des traitements sur la structure des populations de *S. tritici* résistantes aux IDM - 67 essais Réseau Performance 2008



En efficacité, comme en rendement brut et net, la solution époxiconazole + prochloraze rivalise et même dépasse les résultats obtenus avec les spécialités BELL et JOAO. A quelques grammes près (mais pour un coût sensiblement supérieur) BELL 0.9 apporte la même quantité d'époxiconazole à l'hectare que Opus 0.5 + prochloraze. L'écart technique entre ces 2 solutions dépend donc uniquement des partenaires associés : boscalid et prochloraze respectivement. A ce jeu là, l'avantage est sans équivoque au prochloraze, confirmant ainsi les résultats de 2007 où cette matière active était déjà apparue comme un excellent partenaire pour l'époxiconazole.

La comparaison avec JOAO tourne également à l'avantage de l'association OPUS + prochloraze. Même s'il est vrai que la différence est plus faible, en particulier en terme d'efficacité.

Figure 14 : Résultats d'efficacité et de rendement en situation à dominante septoriose 42 essais « Réseau Performance » 2008

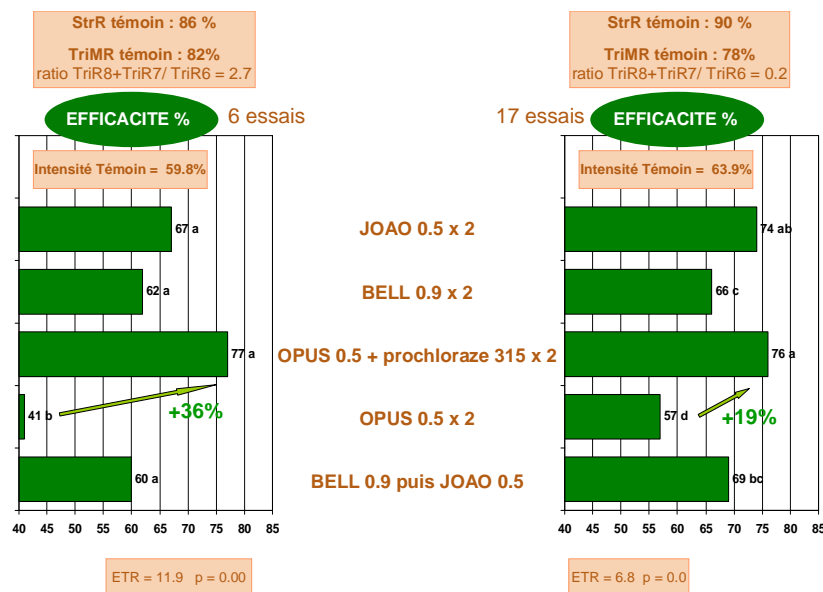


Le prochloraze porte l'efficacité de l'époxiconazole au-delà des performances des innovations BELL et JOAO

L'analyse des résultats d'essais en fonction de la distribution des phénotypes, permet de souligner l'apport du prochloraze particulièrement marqué sur les essais où dominent les phénotypes les plus sensibles (TriR7 et TriR8) à cette matière active (Figure 15). Ces différences sont confirmées en terme de rendement, puisque sur les mêmes essais la réponse rendement à l'apport de 315 de prochloraze est respectivement de 10.2 et de 6.3 q/ha pour des ratio TriR7+Tri R8/ TriR6 de 2.7 et 0.2.

Figure 15 : Résultats d'efficacité en fonction du ratio TriR7+TriR8/ TriR6

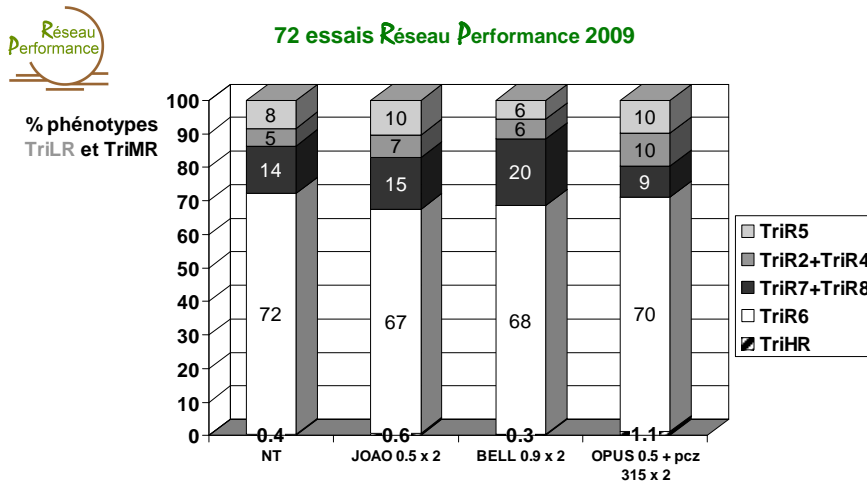
23 essais « Réseau Performance » 2008



L'apport du prochloraze, comme en 2007, est encore plus marqué dans les essais où dominent les souches TriR7+TriR8

En 2009, L'effet des traitements sur la proportion des types TriLR et TriMR est comparable à celui observé ces 3 dernières années. Aucune différence n'est apparente entre les structures des populations témoins et les populations issues des parcelles traitées avec JOAO ou BELL. Mais comme les années précédentes le prochloraze (associé à l'époxiconazole) contre sélectionne les souches résistantes TriMR moyennement résistantes aux triazoles. Ce sont principalement les souches TriR7+TriR8, les plus sensibles au prochloraze (Figure 16) qui disparaissent, au profit des souches TriLR.

Figure 16 : Effet des traitements sur la structure des populations de *S. tritici* résistantes aux IDM



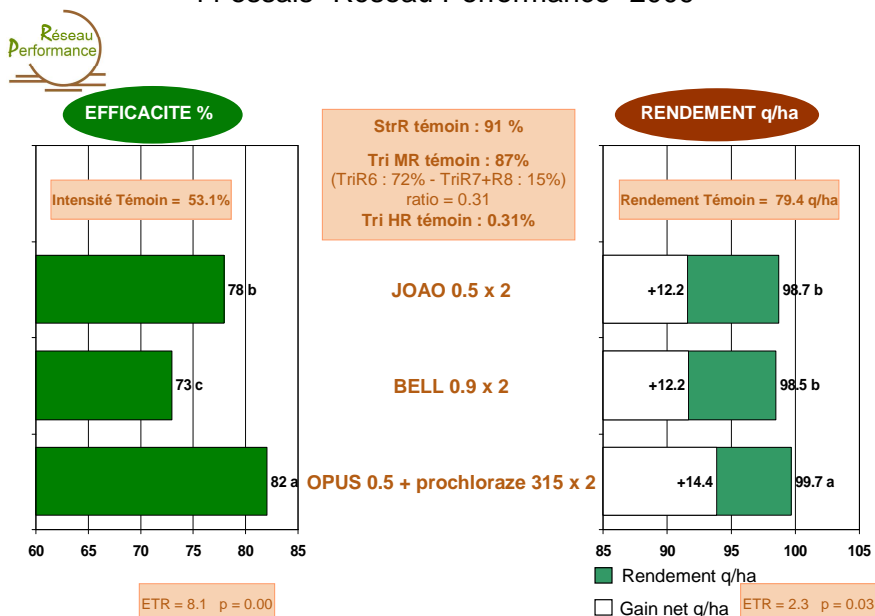
Les efficacités observées en 2009 sur le réseau Performance sont en moyenne d'un très bon niveau et sont de ce point de vue rassurants. Si des souches TriHR sont bien présentes et tendent à s'installer, elles restent suffisamment rares pour ne pas affecter l'efficacité des solutions testées, tout au moins à l'échelle des moyennes observées.

Les résultats sont en effet tout à fait comparable à ceux de 2008. En efficacité, comme en rendement brut et net, OPUS + prochloraze rivalise et même surpasse les résultats obtenus avec les spécialités BELL et JOAO.

A quelques grammes près (mais pour un coût sensiblement supérieur) BELL 0.9 apporte la même quantité d'époxiconazole à l'hectare que OPUS 0.5 + prochloraze. L'écart technique entre ces 2 solutions dépend donc uniquement des partenaires associés : boscalid et prochloraze respectivement. A ce jeu là, l'avantage est encore une fois sans équivoque et à l'avantage du prochloraze, confirmant ainsi les résultats de 2007 et 2008.

La comparaison avec JOAO tourne également en faveur de l'association OPUS + prochloraze (Figure 17). Même s'il est vrai que la différence est plus faible, en particulier en terme d'efficacité. La prise en compte des données économiques, (prix des produits) ne fait qu'accentuer l'avantage technique donné à la solution Opus+prochloraze.

Figure 17 : Résultats d'efficacité et de rendement en situation à dominante septoriose 44 essais "Réseau Performance" 2009



Comme en 2007 et 2008 l'efficacité de l'époxiconazole + prochloraze surpasse techniquement et économiquement les spécialités BELL et JOAO

CONCLUSION

La lutte contre la septoriose du blé reposait presque exclusivement sur des fongicides appartenant à la famille des triazoles (IDM) et sur les inhibiteurs respiratoires de la famille des QoI (strobilurines). Le « réseau performance » et le partenariat avec l'INRA ont permis d'établir un diagnostic complet de la résistance aux strobilurines en France depuis 2004, tant au niveau du laboratoire que sur le terrain. ARVALIS - Institut du Végétal et ses partenaires ont pu ainsi diffuser les conseils de lutte les plus appropriés pour chaque région en se référant à des expérimentations nationales mais aussi locales.

L'extension des résistances aux strobilurines depuis 2003 dans les régions du Nord de la France a imposé de modifier le raisonnement du choix des fongicides. Les triazoles et plus généralement les IDM occupent à nouveau un rôle central dans la lutte contre *S. tritici* et à ce titre ils ont fait l'objet de toutes les attentions. Il faut souhaiter que l'apparition récentes en France des souches fortement résistantes ne progresse pas en fréquence et en intensité dans les années à venir. Ce fait doit nous inciter à renforcer les messages d'alternance et de diversification des modes d'action.

Un seul prochloraze par saison, un seul carboxamide, alterner scrupuleusement les IDM en eux, ne pas hésiter à recourir à des multi sites comme le chlorothalonil.

Une bonne connaissance de la réalité de la résistance au champ et des différentes spécialités efficaces en situation de résistance, la promotion de pratiques phytosanitaires intégrant des pratiques culturales, le choix variétal et le recours limité et raisonné aux différentes familles de produits doivent permettre de proposer des moyens de lutte pour minimiser l'impact économique de la résistance.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Agence du Développement Agricole et Rural (ADAR) qui assure le financement de programmes portant sur la recherche appliquée et sur la diffusion des innovations techniques auprès des exploitants agricoles et en particulier dans le cadre du projet CASDAR 6128 : «Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives.

Que tous les acteurs de terrain qui ont contribué au « réseau performance » trouvent ici l'expression de notre gratitude.

BIBLIOGRAPHIE

Collectif, 2009. Note Commune INRA, SPV, ARVALIS-Institut du végétal. Résistances aux fongicides : maladies des céréales à paille – 2009. <http://www.afpp.net/commande/commissions/maladie.htm#Résistances%20aux%20fongicides>

FRAC : Fungicide resistance action Committee : <http://www.frac.info/frac/index.htm> : [Minutes of 2008 Meeting Recommendations for 2009](#)

Leroux P., Mille B., Fourbet J.F, 2003 - Evolution de la flore fongique chez le blé tendre d'hiver dans un dispositif pluriannuel mis en place à l'INRA de Versailles. *7^{ème} Conférence internationale sur les maladies des plantes, AFPP Tours (CD rom)*.

Leroux P., Gredt M., Walker A.S, Caron D., Moinard J., 2004 - La septoriose du blé : caractéristiques et distribution des souches de *Septoria tritici* résistantes aux fongicides *Phytoma-LDV*, 574, 8-13.

Leroux P., Gredt M., Walker A.S, Couleaud G., Moinard J., LeHenaf G., 2005 - La septoriose du blé en France en 2004 : Les strobilurines en péril ? *Phytoma-LDV*, 579, 7-12.

Couleaud G., Leroux P., Walker A.S, 2006 - Un diagnostic complet de la résistance de *Septoria tritici* aux principaux fongicides en France. 8^{ème} Conférence internationale sur les maladies des plantes, AFPP Tours (CD rom).

Leroux, P., Walker, A.S., Albertini,C., Gredt, M., 2006. Resistance to fungicides in French populations of *Septoria tritici*, the causal agent of wheat leaf blotch. In Fungicide resistance are we winning the battle but losing the war ? *Aspects of Applied Biology*, 178 :153-162

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., and Walker, A.S. 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14a-demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 63 : 688-698

Leroux P., Gredt M., Albertini C. et Walker AS., 2006 - Résistance de *Septoria tritici*, l'agent de la septoriose du blé, aux fongicides : des gènes aux champs. 8^{ème} conférence internationale sur les maladies des plantes, AFPP,564-573.

**AFPP- 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS-8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**MISE AU POINT D'OUTILS DE q-PCR POUR LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION
DES DEUX GROUPES GENETIQUES (A, B), DE LA RESISTANCE AUX DMIS ET AUX
QOIS CHEZ L'OÏDIUM DE LA VIGNE (*ERYSIPHE NECATOR*) EN FRANCE**

M.-C. DUFOUR¹, S. FONTAINE², A. MICOUD², M.-F. CORIO-COSTET¹

1: INRA, UMR Santé végétale, ISVV, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883, Villenave
d'Ornon, France

2: AFSSA, 31, avenue Tony Garnier, 69364 LYON Cedex 07

RESUME

Des outils de détection et de quantification rapides ont été développés pour *Erysiphe necator* (l'oïdium de la vigne) pour évaluer la distribution des deux groupes génétiques A et B dans le vignoble français, ainsi que le niveau de résistance aux fongicides IDMs (Inhibiteur de la C14-sterol déméthylase) et Qols (Quinone outside inhibitor, inhibiteur de la respiration mitochondriale). Sur la base de la détection de différents SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) positionnés respectivement en position G37V et Y136F du gène *Cyp51* de la C14-éburicol déméthylase et en position G143A du gène mitochondrial du cytochrome b, différents marqueurs de PCR quantitative ont été développés et testés dans le vignoble français. Cinquante populations d'oïdium de la vigne collectées en 2008 et provenant de différentes régions ont permis de décrire un nouvel état de la variabilité et de la résistance de l'oïdium de la vigne en France.

Mots-clés :Oïdium de la vigne, fongicide Qol, IDM, résistance, groupe génétique A et B, Detection, Q-PCR

SUMMARY

**REAL TIME PCR ASSAYS FOR QUANTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF
ERYSIPHE NECATOR GENETIC GROUPS IN GRAPEVINE SAMPLES**

Real time PCR assays using SYBR green technology were developed to detect and quantify several *Cyp51* gene SNPs and one mitochondrial *cyt b* gene SNP of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). These tools allowed to identify and quantify the two genetic groups A and B of *E. necator*, the presence or absence of a high resistance to fungicides DMIs (Demethylase inhibitors), and the presence or absence of resistance to Qols (Quinone outside inhibitor) in powdery mildew populations in French vineyard. Fifty populations sampled in six French regions were used, describing a new picture of *E necator* population diversity in French vineyard.

Keywords: grape powdery mildew, DMI fungicide, Qol, genetic group, grapevine, Q-PCR.

INTRODUCTION

L'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*, syn : *Uncinula necator*) depuis son apparition sur le continent en 1845, a régulièrement fait écho de par la gravité de ses attaques dans le vignoble français, en particulier en 1852 où les pertes de récolte atteignirent entre 50 et 70%. Combattu à l'aide du soufre, puis à l'aide de molécules de synthèse, il est souvent considéré comme un agent pathogène bien connu et maîtrisé. Pourtant, sporadiquement des viticulteurs rencontrent d'importants problèmes dans la gestion des épidémies qui résultent parfois non pas de traitements mal administrés mais bien de la sélection de souches d'oïdium résistantes. Parmi les fongicides les plus utilisés, les IDMs (inhibiteur de la C14-stérol déméthylase) inhibent la biosynthèse d'un lipide (stérol) nécessaire à la constitution des membranes cellulaires fongiques. Suite à leur usage parfois intensif, la résistance est apparue vers la fin des années 80 (Steva *et al.*, 1989). Cette dernière a été bien gérée dans la plupart des vignobles en appliquant les principes classiques de gestion de la résistance : une utilisation raisonnée du nombre de traitements à l'aide de ces molécules et l'alternance des familles chimiques possédant des modes d'action différents.

Plus récemment, l'arrivée sur le marché de molécules fongicides bloquant la respiration cellulaire (QoI ex : strobilurines) a permis d'obtenir d'excellentes efficacités vis-à-vis de l'oïdium de la vigne (Wong et Wilcox, 2002). Cependant, des cas de résistance ont été décrits dans les vignobles américains en 2008 (Baudoin *et al.*, 2008), et dans le vignoble Hongrois (D. Bencené, comm. pers) associées à des difficultés dans la maîtrise des épidémies.

Ce parasite obligatoire présente également la particularité d'être représenté sur le territoire français par deux groupes de populations appelés A et B (I et III) qui sont génétiquement assez éloignés et qui possèdent des modes de conservation hivernale différents. Ainsi la population B se conserve-t-elle majoritairement par reproduction sexuée (cleistothèces) mais peut également hiverner dans les bourgeons dormants (Corio-Costet, 2007). A l'inverse, la population A hiverne dans les bourgeons dormants et semble à ce jour, peu capable, voire incapable, de se reproduire sexuellement en France (Délye *et al.*, 1997 ; Peros *et al.*, 2006, Corio-Costet, 2007). La distribution et la signification épidémiologique de ces deux groupes sont encore mal connues (Amrani et Corio-Costet, 2006 ; Corio-Costet, 2007 ; Montarry *et al.*, 2008). Des travaux réalisés dans notre laboratoire montrent également que le groupe A serait plus sensible aux fongicides que les souches appartenant au groupe génétique B (Corio-Costet *et al.*, 2000).

Les méthodes de détection moléculaires basées sur des méthodes PCR-RFLP, Nested-PCR, utilisée à ce jour impliquaient d'isoler chaque individu pour déterminer son appartenance à un groupe (Corio-Costet, 2007). Concernant les populations, les tests biologiques existant permettent d'estimer la proportion de la population résistante ou non, mais implique un lourd travail de tests fongicides sur des feuilles de vigne inoculées avec les échantillons de terrain.

La méthode de détection et de quantification de la variabilité des souches d'oïdium décrite dans cet article, fait appel à une technique quantitative de détection moléculaire de différentes mutations présentes dans les gènes impliqués dans la résistance aux fongicides de type IDMs ou QoIs. En complément, toujours basé sur ce même principe de détection qualitatif et quantitatif nous avons également évalué la distribution des deux groupes génétiques A et B d'oïdium dans le vignoble. L'objectif de cette étude a donc été de dresser un état des lieux de la résistance pour d'anciennes molécules telles que les IDMs et pour de plus récentes telles que les QoIs dans le vignoble français, associé à la distribution des groupes génétiques A et B.

MATERIEL ET METHODE

Echantillonnage

Dans différentes parcelles de diverses régions viticoles françaises (tableau I), des lésions isolées (689) ont été prélevées entre mai et septembre à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre. Chaque échantillon provenant d'une parcelle correspond à un minimum de 15 lésions. Pour les grappes, le matériel fongique est gratté sur les baies et réuni dans un tube Eppendorf et stocké à -20°C, en attendant d'en extraire l'ADN.

Tableau I: Localisation géographique et nombre de parcelles échantillonnées dans le vignoble français en 2008.

(Table I : Geographic Localization and number of sampled parcel in French Vineyard in 2007)

| Région viticole | Nombre de parcelles échantillonnées |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Aquitaine | 5 |
| Bourgogne | 6 |
| Champagne | 5 |
| Languedoc-Roussillon 1* | 6 |
| Languedoc-Roussillon 2* | 11 |
| Midi-Pyrénées (dont 5 « Gers ») | 15 |
| PACA | 2 |

* : LR1 prélèvement réalisés début juillet, LR2 prélèvement réalisés début mai

Collection d'isolats et production d'inoculum

Les souches utilisées pour mettre au point la méthode de Q-PCR proviennent de la collection du laboratoire (tableau II)

Tableau II : Caractéristiques des souches utilisées pour la mise au point du test Q-PCR

Table II : List of *E. necator* isolates used to Q-PCR assays

| Nom | Origine géographique et date de prélèvement | Groupe génétique | Sensibilité DMI ^b | Sensibilité Qol ^c |
|--------|---|------------------|------------------------------|------------------------------|
| TOU01 | Languedoc-Roussillon, France, 2004 | A | S | S |
| ROU08 | Languedoc-Roussillon, France, 2004 | A | S | S |
| PVR 43 | Languedoc-Roussillon, France, 2004 | A | S | S |
| LAT12 | Aquitaine, France, 2003 | B | S | S |
| CHL02 | Aquitaine, France, 2004 | B | S | S |
| IBA11 | Bengalore, Inde, 1995 | A | R | S |
| HU1 | Eger, Hongrie, 2008 | - | - | S |
| HU3 | Eger, Hongrie, 2008 | - | - | R |

b : Sensibilité aux fongicides triadiménole, penconazole, tébuconazole ; c : sensibilité à la trifloxystrobine

Les différents isolats ont été multipliés en condition stérile sur des feuilles de vigne Cabernet-Sauvignon dans des boîtes de Pétri comme décrit par Délye et Corio-Costet, 1998. Les inoculations ont été réalisées avec 1000 à 1500 conidies par cm² de feuilles et les boîtes sont mises à incuber durant 12 jours à 22°C dans une chambre climatique. Le matériel fongique est récupéré par grattage, puis déposé dans un tube Eppendorf et stocké à -20°C.

Détermination de la sensibilité aux fongicides

La sensibilité aux IDMs (triadiménol) a été déterminée selon la méthode décrite par Délye *et al.*, 1997 et la présence de la mutation en position 136 du gène *Cyp51* a été recherchée comme décrit par Délye *et al.*, 1999. La sensibilité aux QoI a été déterminée sur la base d'une dose discriminante de 10mg/L de matière active de trifloxystrobine appliquée sur des disques de feuilles inoculés avec 600 conidies par cm².

Extraction D'ADN et confirmation des biotypes

L'ADN est isolé soit de tissus d'*E. necator* congelés, soit directement à partir de disques de feuilles infectés provenant du vignoble. Le matériel est extrait dans un mélange chloroforme-alcool isoamylique (Délye *et al.*, 1995). L'ADN récupéré en solution aqueuse est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm et stocké à -20°C.

Une méthode de PCR-RFLP, utilisant l'enzyme *Acc1*, après amplification d'un fragment du gène de la β -tubuline (Genbank N°AY074934) permet d'identifier l'appartenance au groupe A ou B sur la détection d'une simple substitution T/C (Amrani et Corio-Costet, 2006 ; Montarry *et al.*, 2008).

Amplification par Q-PCR

Cette méthode de diagnostic permet d'évaluer quantitativement la proportion de chaque type d'allèle dans des échantillons réunissant plusieurs prélèvements. La spécificité de l'amplification est obtenue en plaçant l'extrémité 3' d'une des amorces directement sur un SNP qui permet uniquement l'amplification de l'allèle spécifique. L'allèle spécifique est alors quantifié comme une quantité relative en utilisant un allèle commun aux deux biotypes (EN pour *Erysiphe necator*) considéré comme standard interne. La différence entre les résultats des deux réactions PCR ($\Delta Cq = Cq_{EN} - Cq_{\text{allèle spécifique}}$) servira pour calculer la fréquence allélique en exploitant la corrélation qui existe entre le ΔCq et le logarithme décimal de la fréquence allélique.

Les réactions sont réalisées dans un volume de 14 μ l contenant 7 μ l d'un mélange fluorescent pour Q-PCR Blue SYBR[®] Green fluorescein, 5 μ l d'ADN et 1 μ l de chaque amorce (10nM). Chaque mesure est au minimum dupliquée. La réaction est effectuée dans un thermocycler real-time thermal icycler iQ. Trois étapes sont réalisées : un premier cycle à 95°C durant 15 min ; puis 40 cycles à 95°C pendant 10s, puis 10 s à la température adéquate selon l'amorce (56°C pour les amorces génotypiques, 58°C pour détecter la résistance DMI et 60°C pour la détection de la résistance QoI), et à 72°C pendant 20 s. La fluorescence du SYBR green est enregistrée à 72°C. L'absence de produit indésirable est confirmée par une analyse de la courbe de fusion automatique des amplicons avec une augmentation de 0,5°C graduelle de 65°C à 95°C. Les amorces utilisées dans cette étude ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 sur la base de séquences des gènes et sont décrites dans Dufour *et al.*, 2009). Elles génèrent des fragments de 153, 78 et 100 pb pour le gène *Cyp51* (N° genbank : AF042067).

Pour valider la Q-PCR, les efficacités d'amplification des différents jeux d'amorces doivent être similaires. Pour chaque amorce des tests de normalisation ont donc été effectués.

Des courbes de calibration standard ont été réalisées pour des fréquences alléliques variant de 0,36 à 100% en utilisant des ADN purs spécifiques de chaque allèle. La méthode a également été validée en recherchant les limites de détection (LOD) de quantification (LOQ) selon la méthode décrite par Schwarz *et al.*, (2007). En supposant une distribution normale des ΔCq , la LOD et la LOQ ont été calculées à partir de l'écart-type résiduel de la régression linéaire obtenue de la manière suivante :

$$LOD = 3 \times (S_{xy}/b)$$

$$LOQ = 10 \times (S_{xy}/b)$$

où S_{xy} est la déviation standard résiduelle et b est la pente de l'équation de la régression linéaire.

Validation de la méthode

Des disques de feuilles contaminés avec chaque génotype à tester (groupe A, B, IDM S, IDM R, QoIS, QoI R) sont utilisés pour réaliser différents mélanges des deux allèles à quantifier et obtenir différentes proportions connues (10, 20, 30,40,50, 60, 70, 80, 90,100% de groupe A, IDM R et QoI R). Les ΔC_q s obtenus pour ces échantillons, pris comme inconnus, sont utilisés pour calculer les fréquences alléliques suivant les équations de droites obtenues avec les courbes de calibration. Ainsi, la corrélation entre les fréquences alléliques mesurées par cette méthode et les fréquences alléliques connues est-elle établie.

RESULTATS

Spécificité des amorces dessinées pour les réactions de q-PCR

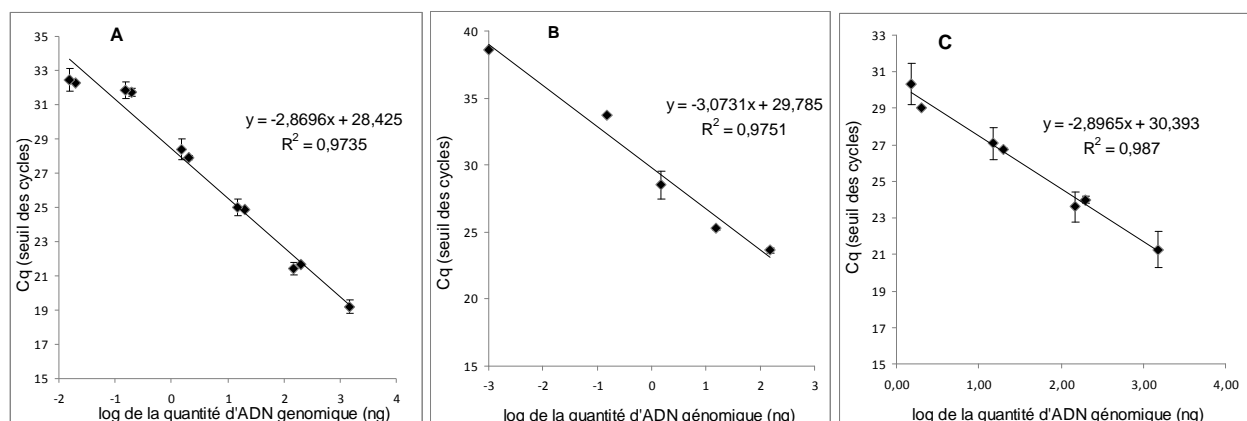
La mutation ponctuelle spécifique du groupe A (T143G) se situe en position 143 de la séquence AF042067 le nucléotide T chez les souche du groupe A est remplacé par un G chez les souches de groupe B, conduisant à une substitution d'une glycine en position 37 de la séquence en acide aminé pour les groupes A vers une valine pour les groupes B (G37V). Le jeu d'amorces dessiné pour amplifier spécifiquement l'allèle de groupe A (37A) génère un fragment de 79 bp.

La mutation ponctuelle conférant la résistance aux IDMs (A495T) se situe en position 495 de la séquence AF042067, le nucléotide A chez les sensibles est remplacé par un T chez les isolats résistants. La séquence en acides aminés de la protéine est modifiée en position 136, une phénylalanine est remplacée par une tyrosine (Y136F). Le jeu d'amorces dessiné pour amplifier spécifiquement l'allèle résistant (136 R) génère un fragment de 100 bp.

Un jeu d'amorce est dessiné dans une zone du gène *Cyp51* ne présentant aucune mutation ponctuelle spécifique à un allèle donné, commune à tous les groupes alléliques, mais spécifique d'*Erysiphe necator*. Ce jeu d'amorce (EN) sert de calibrateur interne et génère un fragment de 153 bp. Le jeu d'amorces utilisé pour quantifier la résistance aux QoIs a été emprunté à Baudouin *et al.*, 2008.

Figure 1 : Courbes standard obtenues par amplification Q-PCR, avec (A) la paire d'amorce pour amplifier le gène *Cyp51* d'*E. necator*, (B) la paire d'amorces spécifiques du groupe génétique A d'*E. necator*, (C) la paire d'amorces spécifiques de la mutation 136 impliquée dans la résistance aux IDMs.

(Figure 1 : Standard curves obtained by real-time PCR amplifications with (A) the primer pair specific to *E. necator*, (B) primer pair specific of genetic group A, (C) primer pair specific to DMI resistance)



Chaque système PCR (EN, 37 A, 136R et 143 R) est testé sur différentes dilutions d'ADN d'*E. necator* appartenant soit au groupe A, soit au groupe IDM-résistant (dont le triadiménol) (Figure 1). Les valeurs de Cq sont directement proportionnelles au logarithme de la quantité d'ADN. À partir de ces courbes, on en déduit une bonne efficacité de PCR proche de 1.

Des amplifications de Q-PCR avec les différentes paires d'amorces sont également réalisées sur des échantillons de disques de feuilles avec une inoculation calibrée, possédant des fréquences alléliques variables, pour réaliser des courbes de calibration. À partir de ces courbes, les différentes fréquences alléliques des échantillons analysés sont calculées (tableau III).

Les seuils de détection sont inférieurs à 1% pour l'ensemble des amorces de q-PCR et les seuils de quantification sont compris en 2,4 et 2,85% pour la détection du groupe génétique A et la résistance aux IDMs et de l'ordre de 10% pour la détection de la résistance aux Qols.

Distribution des différents allèles dans le vignoble français

Répartition des génotypes A et B

La présence du génotype A est détectée sur 17 parcelles, soit 34% des prélèvements étudiés (tableau III), avec des variations importantes de 0 à 100% selon les parcelles et les régions.

Le groupe A est majoritairement présent dans les régions du pourtour méditerranéen, avec certaines parcelles constituées de 100% de génotype A (Languedoc-Roussillon). La moyenne nationale de la fréquence du génotype A est de 12,07%, avec des différences importantes d'une région à une autre. Ainsi dans les régions d'Aquitaine, de Bourgogne et de Champagne, le groupe A est peu ou pas présent (de 0 à 1,156 %, moyenne par région). À l'inverse dans les vignobles du Sud, il représente de 7,16 à 54,66 % (Figure 2A).

Répartition de l'allèle de résistance F136Y (résistance aux fongicides IDMs)

La présence de l'allèle de résistance est détectée sur 7 parcelles, soit 14% des prélèvements évalués (tableau III). La variabilité de l'allèle est comprise entre 0 et 93,85%, avec une moyenne nationale de l'ordre de 2,41%. Peu ou pas d'allèle (moins de 3%) de résistance aux IDMs ont été détectés dans les régions d'Aquitaine, de Champagne Ardennes et du Languedoc-Roussillon. L'allèle de résistance a été détecté en Bourgogne (6,42%), dans la région Midi-Pyrénées, en particulier dans une parcelle du Gers (MP-0812) qui exhibe 93,85% de l'allèle de résistance F136Y.

L'ensemble des autres parcelles évaluées de cette région ne contenait pas l'allèle de résistance. Il semble que les parcelles les plus touchées par la résistance sont celles dans lesquelles le génotype A est absent ou peu présent (ex : les parcelles B-083 et MP-0812 dans lesquelles seul le génotype B est présent, montre une résistance de 25,07 et 93,85 %). Aucune parcelle contenant 100 % de génotype A n'a été détectée résistante.

Répartition de l'allèle de résistance G143A (résistance aux fongicides Qols)

Parmi l'ensemble des parcelles évaluées une seule a répondu positivement, il s'agit de la même parcelle du Gers (MP-0812) qui présentait déjà un fort pourcentage de l'allèle F136Y, pour laquelle nous avons quantifié 30,99% d'allèle de résistance aux Qols. À notre connaissance il s'agit de la première mise en évidence de la présence de cet allèle dans le vignoble français.

DISCUSSION

Groupe génétique A d' *E. necator*

À l'aide de différents outils moléculaires développés au laboratoire, il est possible de détecter et de quantifier différents génotypes du parasite obligatoire *E. necator* sur la base de SNP présent dans le gène *Cyp51*. Cette première étude nationale conforte les résultats précédents, à savoir que les souches de groupe A sont plus présentes dans les vignobles du

Sud que dans les vignobles septentrionaux ou le Bordelais (Corio-Costet, 2007 ; Montarry *et al.*, 2009). Cependant des populations contenant de l'ordre de 5% de souches A ont été détectées en Bourgogne et en Champagne. Est-ce à dire que les souches A colonisent plus aisément les vignobles du Nord suite au réchauffement climatique ? Est-ce que les souches A possèdent aujourd'hui la capacité de se reproduire sexuellement dans les vignobles français, ce qui n'était pas le cas en France jusqu'en 1998 ? Est-il possible d'obtenir des hybrides entre les souches A et B en France en 2008 ? De nouvelles campagnes de quantification des deux groupes génétiques en collaboration avec l'AFSSA de Lyon sont actuellement en cours et devrait permettre de conforter ces résultats.

Tableau III : Fréquences des différents allèles quantifiés par Q-PCR dans les 50 prélèvements du vignoble français.

(Table III: Frequency of genotype A and Y136F allele in field populations of *E. necator* determined by allele-specific real-time PCR)

| Nom de l'échantillon | Région (N° du département) | Pourcentage de génotype A | Pourcentage de résistance aux DMIs |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--|
| AQ-081, AQ-082, AQ-083, AQ-085 | Aquitaine (33) | 0 | 0 |
| AQ-084 | Aquitaine (33) | Tr ² | 0 |
| B-081 | Bourgogne (21) | 5,62 | 0 |
| B-082 | Bourgogne (21) | 0 | 0 |
| B-083 | Bourgogne (21) | Tr | 25,07 |
| B-084 | Bourgogne (21) | 0 | 5,78 |
| B-085 | Bourgogne (21) | 0 | 7,71 |
| B-086 | Bourgogne (21) | Tr | 0 |
| CA-081, CA-083, CA-085 | Champagne Ardennes (51) | 0 | 0 |
| CA-082 | Champagne Ardennes (51) | Tr | 0 |
| CA-084 | Champagne Ardennes (51) | 5,78 | 0 |
| LR1-081, LR1-082, | Languedoc-Roussillon (34) | 0 | 0 |
| LR1-083 | Languedoc-Roussillon (34) | 40,92 | 0 |
| LR1-084 | Languedoc-Roussillon (34) | 25,42 | 0 |
| LR1-085 | Languedoc-Roussillon (34) | Tr | 0 |
| LR1-086 | Languedoc-Roussillon (34) | Tr | 0 |
| LR2-081 | Languedoc-Roussillon (11) | 100 | 0 |
| LR2-082 | Languedoc-Roussillon (11) | 15,49 | 4,99 |
| LR2-083 | Languedoc-Roussillon (11) | 100 | 0 |
| LR2-084 | Languedoc-Roussillon (66) | 6,62 | 9,26 |
| LR2-085 | Languedoc-Roussillon (66) | 0 | 0 |
| LR2-086 | Languedoc-Roussillon (66) | 100 | 0 |
| LR2-087, LR2-088 | Languedoc-Roussillon (11) | 100 | 0 |
| LR2-089 | Languedoc-Roussillon (11) | 79,19 | 0 |
| LR2-0810, LR2-0811 | Languedoc-Roussillon (11) | 100 | 0 |
| MP-081, MP-083, MP- 0810, MP-0813 | Midi Pyrénées (31, 32) | Tr | 0 |
| MP-082, MP-087, MP- 0814 | Midi Pyrénées (31, 32) | 0 | 0 |
| MP-084 | Midi Pyrénées (82) | 57,59 | 0 |
| MP-085 | Midi Pyrénées (82) | 44,08 | 0 |
| MP-086, MP-089, MP- 0811 | Midi Pyrénées (81) | Tr | Tr |
| MP-088 | Midi Pyrénées (81) | 0 | Tr |
| MP-0812¹ | Midi Pyrénées (32) | 0 | 93, 85 |
| MP-0815 | Midi Pyrénées (32) | 5,78 | 0 |
| PA-081 | PACA (13) | 15,62 | Tr |
| PA-082 | PACA (13) | 3,15 | 5,23 |

¹ : Seul l'échantillon, MP-0812 a été détecté comme résistant aux QoI, avec un pourcentage trouvé de 30,99%.

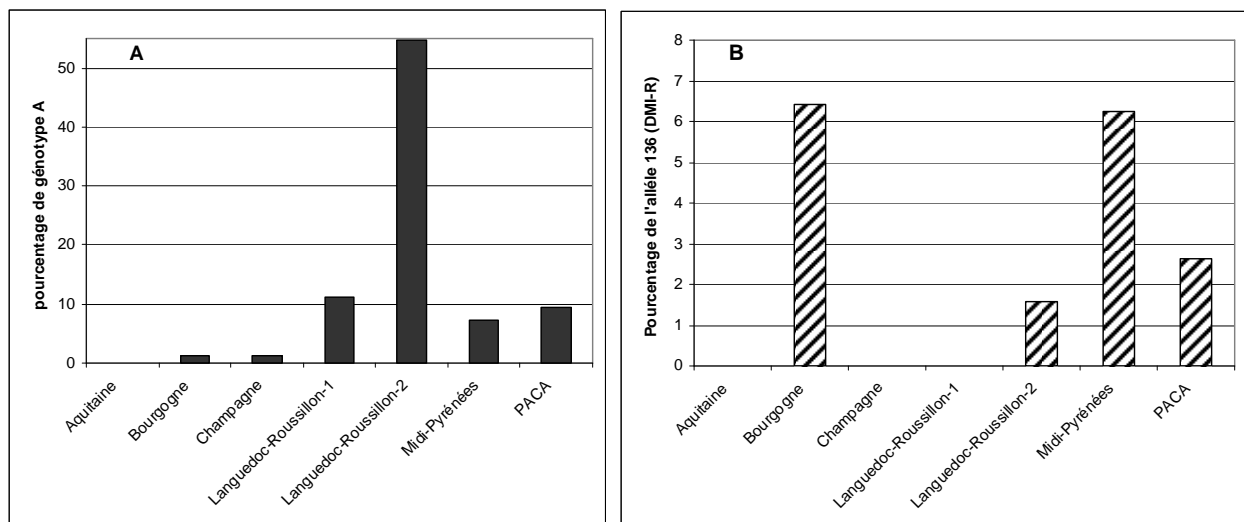
² : Tr = trace c'est-à-dire un pourcentage de détection > 0 mais inférieur au seuil de quantification.

Détection et quantification de l'allèle de résistance Y136F

La présence de l'allèle de résistance aux fongicides IDMs a été corrélée dans le passé à une forte résistance au triadiménol mais également à d'autres fongicides IDMs, malgré l'existence d'une résistance aux IDMs d'ordre polygénique (Corio-Costet *et al.*, 2000 ; Délye *et al.*, 1998). L'outil de PCR quantitative élaboré permet la détection de cette mutation et montre que la résistance est peu présente, à l'exception de quelques parcelles dans lesquelles elle est fortement implantée (Gers : 93,85 et Bourgogne : 25,07). Le panorama obtenu suggère qu'il est tout à fait possible de gérer cette situation de résistance dans la plupart des parcelles et des régions. Les préconisations d'usage consistant à limiter l'utilisation des DMIs et à les alterner avec d'autres molécules possédant des modes d'action différents paraissent efficaces. Toutefois, l'Oïdium de la vigne réalisant un cycle de reproduction sexuée annuel, il convient d'être prudent et un suivi pluriannuel des parcelles, sur lesquelles la présence de cet allèle a été détectée, serait intéressant pour évaluer le poids de la reproduction sexuée dans l'évolution de la résistance. Une question cependant demeure, quel est le poids des groupes génétiques A et B dans l'évolution de la résistance ? Des résultats obtenus en 2000 montraient que les souches de groupe A sensibles contrôlées par des traitements fongicides (triadiménol, tébuconazole, penconazole, azoxystrobine, quinoxifène) étaient significativement plus sensibles que les souches de groupe B également contrôlées (Corio-Costet *et al.*, 2000). Sous la pression de sélection des traitements fongicides, quelle évolution peut-on envisager pour les deux groupes de souches aujourd'hui dans le vignoble français ?

Figure 2 : Fréquences des différents allèles, (A) génotype A, (B) allèle Y136F, dans les différentes régions viticoles françaises.

Figure 2 : Frequency of V37G (A) et Y136F (B) alleles in different French vineyard areas.



Détection de l'allèle de résistance G143A

La présence de l'allèle de résistance G143A impliqué dans la résistance aux fongicides inhibiteurs du cytochrome b mitochondrial a été détectée pour la première fois en France dans un vignoble. Il se trouve qu'il s'agit de la même parcelle du Gers qui montrait également une forte présence de l'allèle de résistance aux DMIs. 30,99% de la population récoltée serait résistante aux QoIs lors du prélèvement réalisé début septembre. Dans cette parcelle il serait intéressant d'obtenir des prélèvements d'organes oïdiés en début de saison

pour évaluer également le poids de la reproduction sexuée sur la résistance de la parcelle, sachant que le support héréditaire du gène du cytochrome b est mitochondrial.

CONCLUSION

En conclusion, il est possible aujourd'hui de quantifier, à partir de pools de fragments de feuilles ou de baies oïdiées, le taux de résistance d'une parcelle aux fongicides de types DMIs ou Qols. De même, réaliser la typologie oïdium d'un vignoble en estimant les proportions des deux groupes génétiques présents sur une parcelle est aujourd'hui réalisable sans passer par des analyses lourdes « prélèvement par prélèvement » (tache par tache).

Il faut noter que cette étude a également permis de confirmer la présence d'allèle de résistance aux fongicides Qol (G143A) dans le vignoble français, sachant que cette résistance est observée ponctuellement en Europe depuis 2007 (détection en Hongrie et en France, www.frac.info)

Cette première année d'étude devrait se poursuivre en 2009 par le suivi d'un plus grand nombre de parcelles, afin d'estimer l'évolution de la résistance aux Qols et aux DMIs, sachant qu'aujourd'hui la situation est loin d'être dramatique exceptée dans la parcelle du Gers où 31% de résistance aux Qols et 93,85% de résistance aux DMIs ont été trouvés.

Néanmoins, si la situation est loin d'être catastrophique, il convient d'être attentif et d'appliquer les préconisations de la « note nationale oïdium de la vigne 2009 », pour éviter les problèmes de résistance. Afin d'anticiper les problèmes de résistance et appliquer une protection raisonnée, il paraît important de suivre les populations d'oïdium via un monitoring afin de déceler d'éventuelles dérives des produits et de suivre leur évolution spatio-temporelle. Ainsi selon le profil « Oïdieux » de la parcelle, des traitements plus adéquats peuvent être envisagés afin de limiter les traitements à risque et d'obtenir une bonne qualité de récolte.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient D. Bencené (Hongrie) pour les souches résistantes aux Qols, tous les SRAL, FREDON et P Cartolaro pour le prélèvement d'échantillons. Un grand merci à J Grosmann du SRAL de Lyon pour avoir permis la réalisation de ce projet. Ce travail a bénéficié d'un financement de la région Aquitaine et de l'INRA.

BIBLIOGRAPHIE

- Amrani L., Corio-Costet M-F.. 2006 - Single nucleotide polymorphism (SNP) in β -tubulin gene distinguishes two genotypes of *E. necator* : PCR assays from different symptoms in the vineyard, *Plant Pathology*, 55, 505-512.
- Baudoin A I., Olaya G., Delmotte F., Colcol J. F. Sierotzki H., 2008 - Qol resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic united states. *Plant Management Network. Plant Health Progress*. Doi:10.1094/PHP-2008-0211-02-RS
- Corio-Costet M.F., 2007 - *Erysiphe necator*. Monographie, Tec/Doc Lavoisier, Paris, 132 p.
- Corio-Costet M-F., Douence L., Richard-Cervera S., Delye C., Barreau C. Moroy S., 2000 - Résistance de l'oïdium de la vigne aux fongicides. Rôle de la biodiversité. AFPP, 6^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes (Tours, 6-8 décembre), II, 763-770.
- Délye C., Corio-Costet M-F., Laigret F., 1995 - A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. *Experimental. Mycol.*, 19, 234-237.

Délye C., Laigret F., Corio-Costet M-F, 1997 - New tools for studying epidemiology and resistance of grape powdery mildew to DMI fungicides. *Pesticide Science* 51(3): 309-314.

Délye C., and Corio-Costet M-F.. 1998 - Origin of primary infections of grape powdery mildew *Uncinula necator*: RAPD analysis discriminate two biotypes. *Mycol. Research*, 102, 283-288.

Délye C., V Ronchi, Laigret F., Corio-Costet M.-F., 1999 -Nested allele-specific PCR primers distinguish genetic groups of *Uncinula necator*. *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 3950-3954.

Dufour M.-C., Montarry J., Corio-Costet M.-F., 2009 – High-throughput SNP allele frequency determination of genetic groups (biotypes and DMI resistant) of *Erysiphe necator* in pooled field samples by a real-time PCR assay. En preparation pour *Appl. Envir. Microbiol.*

Montarry J., Cartolaro P., Jolivet J., Willocquet L., 2008 - Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during Grapevine powdery mildew epidemics. *Appl. Envir. Microbiol.* 74, 6327-6332.

Montarry J., Cartolaro P., Richard-Cervera S., Delmotte F., 2009 - Spatio-temporal distribution of *Erysiphe necator* genetic groups and their relationship with disease levels in vineyards, *European J. Plant Pathol*, 123, 61-70.

Peros J.P., Nguyen T.H., Troulet C., Michel-Romiti C., Notteghem J.L., 2006 - Assessment of powdery mildew resistance of grape and *Erysiphe necator* pathogenicity using a laboratory assay. *Vitis*, 45, 29-36.

Schwarz G., Baumler S., Block , A., Felsenstein F.G., Wenzel G., 2004 - Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Research* 32(3): E24.

Steva H., Clerjeau M., Da Silva M.T., 1989 - Reduced sensitivity to triadimenol in Portuguese field populations of *Uncinula necator*. *ISPP Chem. Control Newletters*, 12, pp. 30-31.

Wong F.P., Wilcox W.F., 2002 - Sensitivity to azoxystrobin among isolates of *Uncinula necator*: baseline distribution and relationship to myclobutanil sensitivity. *Plant Dis.* 86, pp. 394-404.

**MUTATIONS IN THE TARGET PROTEINS OF SUCCINATE-DEHYDROGENASE
INHIBITORS (SDHI) AND 14 α -DEMETHYLASE INHIBITORS (DMI) CONFERRING
CHANGES IN THE SENSITIVITY – STRUCTURAL INSIGHTS FROM MOLECULAR
MODELLING**

A. GLÄTTLI⁽¹⁾, G. STAMMLER⁽²⁾, S. SCHLEHUBER.⁽²⁾

⁽¹⁾ BASF SE, D-67056 Ludwigshafen, Germany

⁽²⁾ BASF SE, D-67117 Limburgerhof, Germany

SUMMARY

Fungicide resistance of fungal plant pathogens is mostly based on point mutations in the target proteins. For a better understanding of the structural and mechanistic impact of these mutations, the knowledge of the three-dimensional structure of the target (with the active ingredient bound) is highly desirable, but often not available. The use of molecular modelling techniques such as protein homology modelling and ligand-docking offers a quick access to structural information of the target of interest. The homology models constructed for two fungicidal targets are described: succinate dehydrogenase (SDH) and 14 α -demethylase (CYP51). For both targets, the point mutations identified in field isolates are reviewed and their structural implications and effect on fungicide binding is discussed based on the three-dimensional protein models.

Key words : succinate dehydrogenase, 14 α -demethylase, carboxamides/benzamides, azoles, sensitivity, homology modelling

RÉSUMÉ

**MUTATIONS DES PROTEINES CIBLES DES INHIBITEURS DE LA SUCCINATE
DESHYDROGENASE (SDHI) ET DE LA 14 α DEMETHYLASE (DMI) CONFERANT DES
CHANGEMENTS DE SENSIBILITE – APERÇUS STRUCTURELS OBTENUS PAR
MODELISATION**

La résistance des phytopathogènes fongiques est due essentiellement à des mutations ponctuelles des protéines cibles. Afin de mieux comprendre les impacts structurels et mécanistiques de ces mutations, la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine cible liée à la molécule active est fortement désirable mais demeure souvent inconnue. L'utilisation des techniques de modélisation comme la modélisation de protéines homologues et le docking de ligands permet un accès rapide à des informations structurelles sur la protéine étudiée. Nous reportons ici les modèles d'homologie construits pour deux protéines cibles fongicides, la succinate déshydrogénase (SDH) et la 14 α -déméthylase (CYP51). Les points de mutation identifiés pour les deux cibles à partir d'échantillons prélevés dans les champs sont décrits dans cette présentation. Leurs implications structurelles et leurs effets sur le site d'action, déduits de modèles tridimensionnels des protéines, sont également discutés.

Mots-clés: succinate déshydrogénase, 14 α déméthylase, carboxamides/benzamides, azoles, sensibilité, modélisation par homologie

INTRODUCTION

Intensive use of site-specific, systemic and highly effective fungicides has become an integral part of modern farming to ensure high yield and excellent quality of agricultural products. However the use of such fungicides in this way can lead to the risk of resistance development to these fungicides. Continuous sensitivity monitoring studies are therefore essential to assess the resistance risk and resistance events in the field as a basis for the design of effective resistance management strategies. A key factor here is the understanding of the underlying mechanisms. Although the modes of resistance are in principle manifold, ranging from increased efflux of active ingredients via overexpression of transporter proteins, over detoxification by enhanced metabolism and overexpression of the target protein to point mutations in the target site, the strongest fungicide resistance of fungal plant pathogens appears to be mainly based on target protein alterations (Hollomon *et al.*, 1997).

The mutation of an amino acid in the target by point mutations may result in a structural alteration of the protein topology that reduces the binding affinity of the fungicide. However, based on the amino acid sequence alone such mechanistic interpretations are difficult to conduct. The knowledge of the three-dimensional structure of the target would enable a structural analysis of the mutations and their impact on the fungicide binding could be investigated by molecular modeling techniques. Unfortunately, the target structure from the fungus of interest is often not elucidated, as most fungicidal targets are difficult to express and purify. For some cases though, the structure of a closely related protein or the protein itself from a different organism is known enabling the construction of a protein model-structure by homology modeling (Sali, 1995).

Based on molecular modeling studies, the structural implications of mutations causing reduced sensitivity and their effect on the fungicide binding are discussed for two important fungicidal targets: succinate dehydrogenase (SDH) or succinate:ubiquinone reductase (SQR), a membrane bound enzyme of the citric acid cycle and the mitochondrial respiration chain, and 14 α -demethylase (CYP51), a cytochrome P450 involved in the biosynthesis of ergosterol. The latter is the target enzyme for DMI fungicides (azoles) efficiently controlling e.g. *Mycosphaerella graminicola*, one of the most important cereal pathogens in Northern Europe. The activity of succinate dehydrogenase on the other hand is inhibited by the class of carboxamides/benzamides controlling a wide range of plant pathogens including *Botrytis cinerea*. For each fungicidal class the most important identified mutations are briefly reviewed and structurally interpreted on the basis of homology models created for SDH and CYP51, respectively.

MATERIAL AND METHODS

SENSITIVITY MONITORING

Monitoring of the sensitivity of different target pathogens of the SDH inhibitor boscalid was carried out in the recent years. While in most species the sensitivity of all isolates were within the normal or baseline range, cases of resistance were found e.g. in *B. cinerea* (Stammler *et al.*, 2007), *Corynespora cassiicola* (Ishii, 2008) or *Alternaria alternata* (Avenot *et al.*, 2008). Target gene analysis of such isolates showed mutations in the subunits of the SDH B, C and D.

Sensitivity towards DMIs was monitored in the last years in extensive monitoring programmes, particularly for *M. graminicola*. A slight shift in populations of this fungus in the early 2000s to a reduced *in vitro* sensitivity towards different triazoles was determined with isolates from the most important cereal growing regions in Europe. Recently, this shift has stabilized. Mutations in the CYP51 have been studied as a reason for this shift. Particularly the impact of the amino acid exchanges V136A, A379G, I381V, and mutations or deletions in the YGYG region (at positions 459-462) on the sensitivity towards triazoles have been controversially discussed.

MOLECULAR MODELLING

Homology modelling of SDH (*B. cinerea*) and CYP51 (*M. graminicola*)

Both homology models, SDH (*B. cinerea*) and CYP51 (*M. graminicola*), have been generated using the standard settings of the homology modelling workflow of the MOE software (Molecular Operating Environment, version 2008.10, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada).

From the available SDH x-ray structures, the structure of the SDH-carboxin complex from *Gallus gallus* (PDB-code: 2FBW) with a resolution of 2.1 Å was chosen as a structural template (Huang *et al.*, 2006). This choice was based on (a) the overall sequence identity to *B. cinerea* for all four subunits (70% for SDHA & SDHB, 35% for SDHC, 31% for SDHD between *B. cinerea* and *G. gallus*), (b) the resolution of the x-ray structure and (c) the nature of the co-crystallised ligand. The amino acid sequence alignments have been performed using the BLOSUM62 substitution matrix. To ensure that the conserved regions of the four subunits of SDH were correctly aligned between *G. gallus* and *B. cinerea*, a multiple sequence alignment was performed including SDH sequences from *S. cerevisiae*, *E. coli*, a collection of phytopathogenic fungi and mammals. The resulting sequence alignment between *G. gallus* and *B. cinerea* was then used to construct the *B. cinerea* homology model from the 2FBW template structure. A total of ten protein models were constructed. The model with the smallest number of structural violations (side-chain rotamers, bond lengths, angles and dihedral angles) was subjected to a structural refinement using the AMBER99 force field.

The same strategy was applied to build the CYP51 homology model. The x-ray structure of CYP51 from *Mycobacterium tuberculosis* with fluconazole bound in the active site served as a template (PDB-code: 1EA1, 2.21 Å resolution, Podust *et al.*, 2001a). The overall sequence identity between *M. tuberculosis* and *M. graminicola* is relatively small (27 %). Nevertheless, as the overall fold of CYP P450 enzymes is highly conserved and the sequence identity in the binding site shows a higher degree of similarity (amino acid identity of 34%, similarity of 61%), a construction of a three-dimensional CYP51-model is feasible. However under these circumstances, a multiple sequence alignment of CYP51 sequences from different organisms (mammals, plants, fungi and bacteria) was essential to assign the conserved regions of the protein.

Docking experiments

In order to examine the binding mode of SDHI's and DMI's, docking experiments into the binding sites of the above constructed homology models have been performed with selected fungicides using the Schrödinger suite of programs embedded in Maestro (version 8.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008). To that end, the SDH and CYP51 homology model have been subjected to the protein preparation workflow of Schrödinger. The docking grid has been generated using Glide's standard settings. The compounds to be docked into the proteins have been prepared using the LigPrep procedure and structural conformations have been generated using the conformational search program MacroModel. The resulting compound conformations have been flexibly docked using Glide's single precision docking procedure (SP). No structural constraints have been employed. The best 20% of the resulting poses (ranked by docking score) have been visually inspected and for every compound docked the most plausible pose (reasonable compound geometry, no van-der-Waals overlaps or clashes with the protein, reasonable binding mode) has been determined.

RESULTS & DISCUSSION

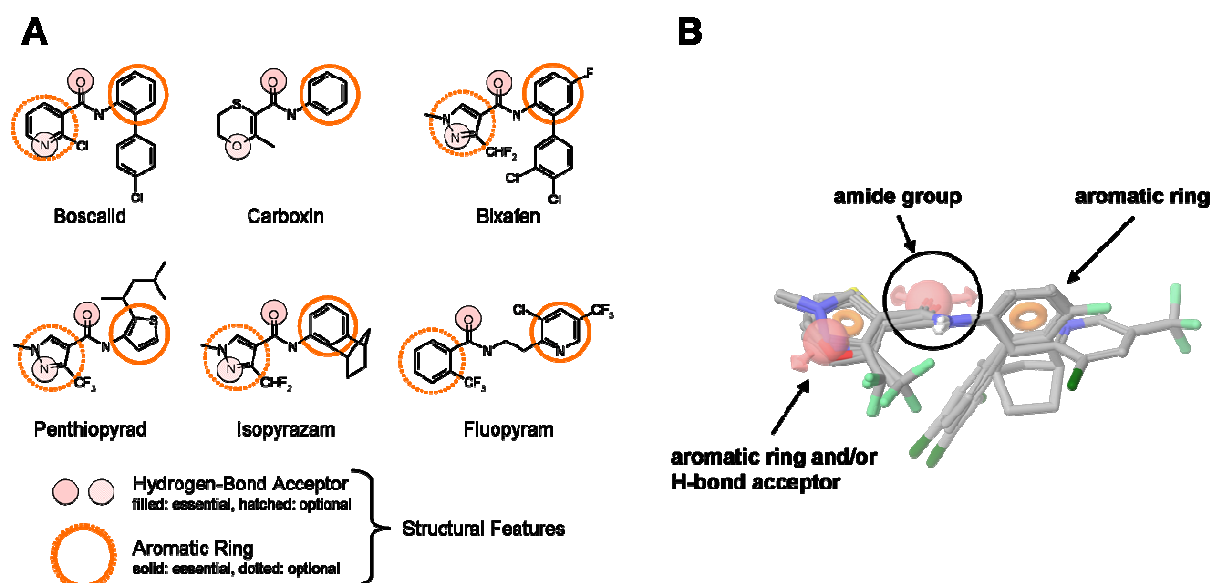
SUCCINATE-DEHYDROGENASE INHIBITORS (SDHI's)

Structural comparison of carboxamides

Comparing the chemical structures of carboxamides, of which a representative subset is shown in Figure 1, reveals their common structural features such as the central amide moiety essential for hydrogen-bond interactions in the ubiquinone binding-site of SDH, the aromatic ring in the aniline part ensuring optimal hydrophobic contacts or π - π interactions to the binding site. Furthermore, most 2nd generation carboxamides, such as boscalid, bixafen and isopyrazam appear to bear a nitrogen-containing heterocycle (pyrimidine or pyrazole) increasing the binding affinity via π - π interactions and additional hydrogen-bonding (through the aromatic nitrogen) to the binding site. The analysis of the common structural features of the carboxamides and the alignment of their three-dimensional structures suggest an identical binding mode, which is also confirmed by docking experiments into the Q-site (see also Figure 2).

Figure 1 : Chemical structures of different carboxamide/benzamide fungicides (A) and their structural alignment (B) illustrating the common chemical features essential for the binding to the Q-site of SDH.

Structures chimiques de différents amides carboxyliques et benzoïques fongicides et leur superposition tridimensionnelles illustrant les caractéristiques structurales communes essentielles pour l'attachement au site Q de la SDH.



Carboxamide resistance mutations and their localisation in the SDH structure

To date several crystal structures of SDH are available, the first to be solved was the one from *E. coli* revealing that SDH forms a tightly packed homo-trimer (Yankovskaya *et al.*, 2003). Each of the monomers consists of four subunits: the flavoprotein subunit (SDH A) catalyzing the oxidation of succinate to fumarate, the iron-sulphur protein (SDH B) containing the three iron-sulphur centers responsible for the electron transfer from succinate to quinone and the two membrane anchor subunits (SDH C and SDH D) with heme b located between two antiparallel helices of SDH C and SDH D (Figure 2). The quinone binding site is a hydrophobic pocket

formed by residues of the subunits B, C, and D and is highly conserved throughout a range of organisms (Horsefield *et al.*, 2004). Different studies indicate that the Q-site is also the site of action of the carboxamides (Keon *et al.*, 1991, Matsson *et al.*, 2001).

Figure 2: Homology model of SDH from *B. cinerea*: Full view of one SDH monomer with subunits A (flavoprotein, blue), B (iron-sulphur protein, red), C and D (membrane anchors, yellow and green) (A). The orange arrow points at the Q-site. Zoom-in view of the Q-site with carboxin (cyan), boscalid (orange) and penthiopyrad (magenta) bound (B).

Modèle d'homologie de la SDH de *B. cinerea*. Vue complète d'un monomère de la SDH avec les sous-unités A (flavoprotéine, bleu), B (protéine fer-soufre, rouge), C et D (protéines membranaires, jaune et vert) (A). La flèche orange indique le site Q. Agrandissement du site Q avec respectivement carboxine (bleu ciel), boscalid (orange) et penthiopyrad (violet) attachés (B).

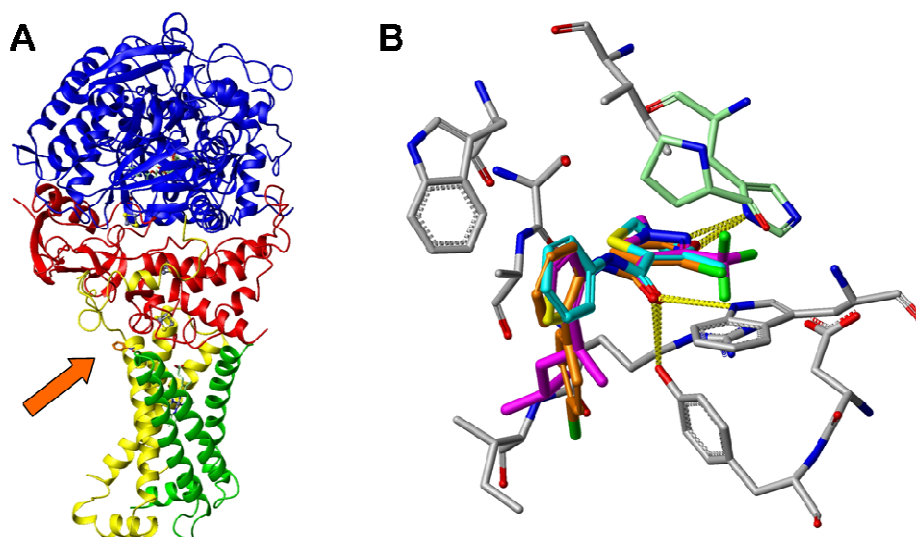


Table I: Overview over carboxamide resistance mutations in fungi:
Résumé des mutations de résistance fongique aux amides carboxylique:

| Pathogen | Subunit | Mutation | Origin |
|------------------------|----------------|-----------------|---------------|
| <i>B. cinerea</i> | B | H272Y | Field |
| | B | H272R | Field |
| | B | P225L | Field |
| | B | P225F | Field |
| | B | P225T | Lab |
| <i>B. elliptica</i> | B | H272Y | Field |
| | B | H272R | Field |
| <i>A. alternata</i> * | B | H277Y | Field |
| | B | H277R | Field |
| | C | H134R | Field |
| <i>S. sclerotiorum</i> | D | H132R | Field |
| <i>C. cassicola</i> ** | B | H278Y | Field |
| | C | S73P | Field |
| | D | S89P | Field |

*Avenot *et al.* 2008

**Ishii 2008, Miyamoto *et al.* in press

The most important SDH mutations conferring reduced carboxamide sensitivity of different pathogens are listed in Table I. In *B. cinerea* up to now mutations were only found in the SDH B subunit at the positions 225 (P225L/F/T) and 272 (H272Y/R). The homologous histidine (Figure 3) to the H272 in *B. cinerea* was also a hot spot in *Botrytis elliptica* (H272Y/R), in *A. alternata* (H277Y) and in *C. cassiicola* (H278Y). Mutations in SDH C subunit have been identified in *A. alternata* (H134R) and *C. cassiicola* (S73P) and in the SDH D subunit mutations were found in *S. sclerotiorum* (H132R) and *C. cassiicola* (S89P).

Figure 3: Partial sequences of the SDH b of *B. cinerea*, *A. alternata* and *C. cassiicola*
Séquences partielles de la SDH b de *B. cinerea*, *A. alternata* et *C. cassiicola*.

***Botrytis cinerea*:**

Bc (wt) 213ECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKAALDNSMSLYRCHTILNCSRTCP
Bc (P225L) 213ECILCACCSTSCLSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKAALDNSMSLYRCHTILNCSRTCP
Bc (P225T) 213ECILCACCSTSCTSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKAALDNSMSLYRCHTILNCSRTCP
Bc (P225F) 213ECILCACCSTSCFSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKAALDNSMSLYRCHTILNCSRTCP
Bc (H272Y) 213ECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKAALDNSMSLYRCYTILNCSRTCP
Bc (H272R) 213ECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKAALDNSMSLYRCRTILNCSRTCP

***Alternaria alternata*:**

Aa (wt) 218ECILCACCSTSCPSYWWNQEEYLGPAVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYRCHTILNCSRTCP
Aa (H277Y) 218ECILCACCSTSCPSYWWNQEEYLGPAVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYRCYTILNCSRTCP
Aa (H277R) 218ECILCACCSTSCPSYWWNQEEYLGPAVLLQSYRWIADSRDEKKAERQDALNNSMSLYRCRTILNCSRTCP

***Corynespora cassiicola*:**

Cc (wt) 219ECILCACCSTSCPSYWWNQEEYLGPAVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCHTILNCSRTCP
Cc (H278Y) 219ECILCACCSTSCPSYWWNQEEYLGPAVLLQSYRWIADSRDEKTAQRQDALNNSMSMYRCYTILNCSRTCP

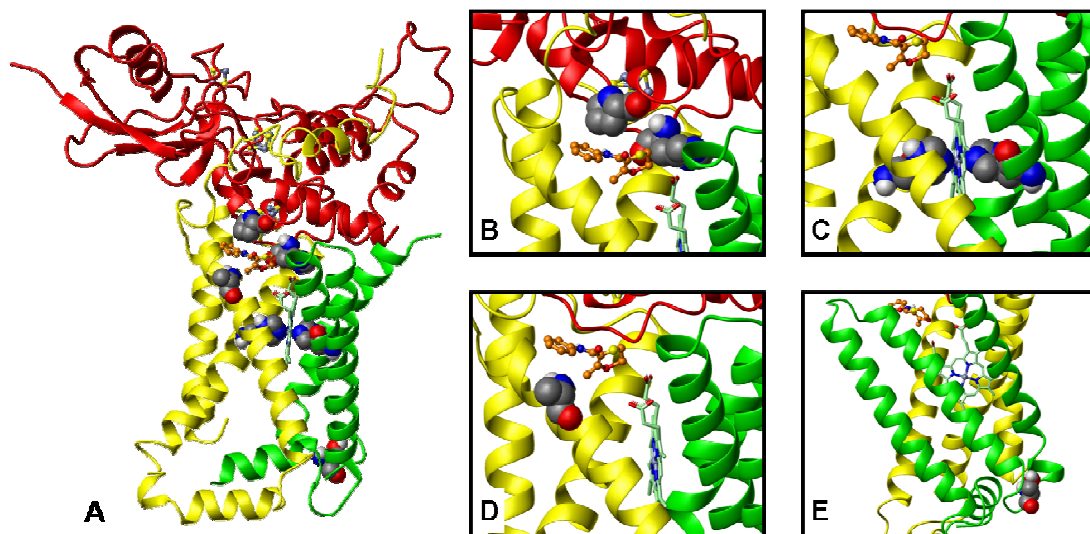
Locating the mutations in the three-dimensional homology model of SDH (Figure 4) shows that all mutations found in *B. cinerea* isolates are situated in direct proximity of the ubiquinone binding-site (Q-site) of SDH B. Proline at position 225 is an integral part of the Q-site contributing to carboxamide binding through hydrophobic contacts. The mutation of proline into an amino acid with a bulkier side-chain such as phenylalanine and leucine or into a slightly more polar residue such as threonine could result in a decreased binding affinity for carboxamides. A loss in binding affinity can also be expected in the case of the mutations at position H272, with its side-chain located at the furthest point from the opening of the Q-site. X-ray structures of co-crystallized SDH-inhibitors (e.g. Atpenin - *E. coli* SDH complex) as well as docking studies of carboxamides in the Q-site suggest that SDH inhibitors bind deeper into the Q-site than ubiquinone and interact directly with H272 via hydrogen-bonding (Horsefield *et al.*, 2006, see also Figure 2). Furthermore it is noteworthy that both mutations, H272Y/R and P225L/F/T, are in close vicinity to the [3Fe-4S]-cluster. This could alter the reduction potential of the [3Fe-4S]-cluster and consequently affect the electron transfer from succinate to quinone. Due to the high sequence similarity of the different SDH subunits among plant pathogenic fungi (>75% for SDHB, ~50% for SDHC and SDHD) similar conclusions can be drawn for the SDH B mutations observed for other fungi.

In addition to the mutations in the SDH B subunit, pathogens such as *A. alternata*, *C. cassiicola* and *S. sclerotiorum* show also mutations in the membrane anchor of SDH (subunit C & D). The histidine at position 134 in subunit C of *A. alternata* is a highly conserved residue located about 12-13 Å from the Q-site. It is involved in the iron coordination of heme b. A mutation at this position may result in some structural rearrangement indirectly affecting the topology of the Q-site and hence the binding affinity of carboxamides. A comparable structural effect could be expected from the H132R mutation in subunit D of *S. sclerotiorum*, which corresponds to the second axial histidine coordinating the iron of heme B. Curiously, the

mutation of one of this two histidine residues into arginine would not only result in change of reduction potential of the heme b group, but also in loss of one coordination partner of the heme b iron, as arginine is not known to be able to act as a metal coordinating residue (Dokmanic *et al.*, 2007). To date the exact role of heme b in the electron transfer is still unclear (Horsefield *et al.*, 2004). Site-directed mutagenesis experiments of the axial histidines in the SDH from *S. cerevisiae* indicate that heme b is not required for quinone reduction (Oyedotun *et al.*, 2007), whereas under similar conditions in *E. coli* (mutated axial histidines) the production of superoxide radicals has been observed to increase significantly compared to the wild-type SDH (Zhao *et al.*, 2006). These results would suggest that heme b is not directly involved in the electron transfer, but acts as an electron sink to prevent the formation of reactive oxygen species (ROS). In the light of these findings the investigation of the structural and functional consequences of the C-H134R and D-H132R for fungal SDH would be of enormous interest.

Figure 4: Location of the resistance mutations listed in Table I in the structural model of SDH from *B. cinerea* (subunit SDH A not shown) (A). B-H272Y/R (H277Y in *A. alternata* and B-H278Y in *C. cassiicola*) and B-P225L/F/T (B), C-H134R in *A. alternata* and D-H132R in *S. sclerotiorum* (C), C-S73P in *C. cassiicola* (D) and D-S89P in *C. cassiicola* (E).

Localisation des mutations de résistance décrites dans le tableau I dans le modèle structurel de la SDH de *B. cinerea* (la sous-unité SDH A n'est pas incluse) (A). B-H272Y/R (H277Y dans *A. alternata* et B-H278Y dans *C. cassiicola*) et B-P225L/F/T (B), C-H134R dans *A. alternata* et D-H132R dans *S. sclerotiorum* (C), C-S73P dans *C. cassiicola* (D) et D-S89P dans *C. cassiicola* (E).



Serine to proline mutations in the C (S73P) and D (S89P) subunit have been detected for *C. cassiicola*. The S89P mutation is located at the far end of a helix of subunit D with a distance of more than 38 Å to the Q-site. Such a mutation may cause a subtle reorientation of the transmembrane helix, which could affect the orientation of the Q-site residues such as Asp143 or Tyr144 at the other side of the helix. Note that Tyr144 is a hydrogen bonding partner to quinone and SDH inhibitors. The S73P mutation on the other hand is located at the edge of the quinone-binding site. As the steric constraints of a proline residue located in the middle of an α -helix induces a kink in this helix, the observed loss in sensitivity for the S73P mutation could be a result of a conformational rearrangement of the backbone of this helix. Consequently, the binding-site would adopt a different topology which may be less favourable for the binding of carboxamides.

DEMETHYLATION INHIBITORS (DMI's)

DMIs act on the 14 α -demethylase (CYP51) causing a depletion of ergosterol in the fungal cell membrane which increases the membrane permeability (Kelly *et al.* 1993). This facilitates cell lysis and leads consequently to an early death of the pathogen. Most DMI fungicides contain either a triazole or imidazole ring which blocks the active site of CYP51 by coordination of the heme iron. Mutations in CYP51 have been described to lead to changes in the sensitivity to azoles in different human and plant pathogenic fungi, also for *M. graminicola* (Leroux *et al.* 2006, 2007, Cools *et al.*, 2008, Stammler *et al.*, 2008). The most relevant mutations are summarized in Table II. Curiously they always occur in combination with amino acid deletions or mutations in the YGYG-region at position 459-462 (besides Y137F). Microtiter assays of field isolates with epoxiconazole showed a wide range of ED₅₀ values for all CYP51 haplotype classes (Figure 5) indicating that the contribution of the CYP51 haplotype to the sensitivity response is limited for this triazole but can be greater for others (Leroux *et al.*, 2007) and that other mechanisms may be involved. Furthermore, it is of practical value that no significant correlation of the frequency of different mutations to the field efficacy of epoxiconazole can be detected (Stammler *et al.*, 2008).

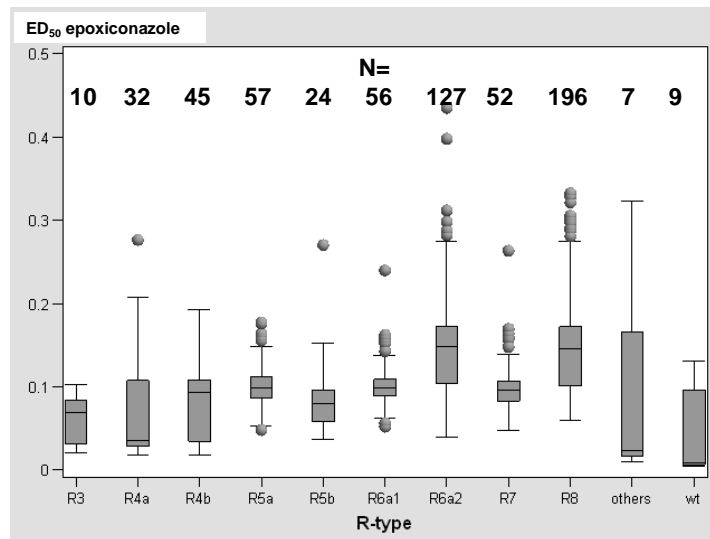
Table II: Amino acid substitutions in CYP51 at position 136, 137, 379, 381, 459 – 462. The classification is according to Leroux *et al.* (2006, 2007). The first line describes the wild type, letters in the table the amino acid substitutions or deletions (Del) which characterise the R-classes.

Substitutions des acides aminés dans CYP51 aux positions 136, 137, 379, 381, 459 – 462. Classification conforme à Leroux *et al.* (2006, 2007). La première ligne décrit le type naturel, les lettres dans le tableau décrivent les substitutions ou délétions (Del) des acides aminés qui caractérisent les classes.

| | V136 | Y137 | A379 | I381 | Y459 | G460 | Y461 | G462 |
|------|------|------|------|------|--------|--------|------|------|
| wt | | | | | | | | |
| R3 | | F | | | | | | |
| R4a | | | | | | | S/H | |
| R4b | | | | | Del | Del | | |
| R5a | A | | | | | | S/H | |
| R5b | A | | | | (Del)* | (Del)* | Del | Del |
| R6a1 | | | | V | S/D/N | | | |
| R6a2 | | | | V | | | S/H | |
| R7 | | | | V | Del | Del | | |
| R8 | | | G | V | Del | Del | | |

*some isolates with deletion at 459 and 460 instead of 461 and 462 (or 460, identified by DNA-sequence)

Figure 5: Distribution of the ED₅₀ values (epoxiconazole) in the different R-types displayed as box and whisker plots (total: 615 isolates).
 Distribution des résultats d'ED₅₀ (époxyconazole) en fonction des différents types R représentée en boîte à moustaches (total de 615 isolats).

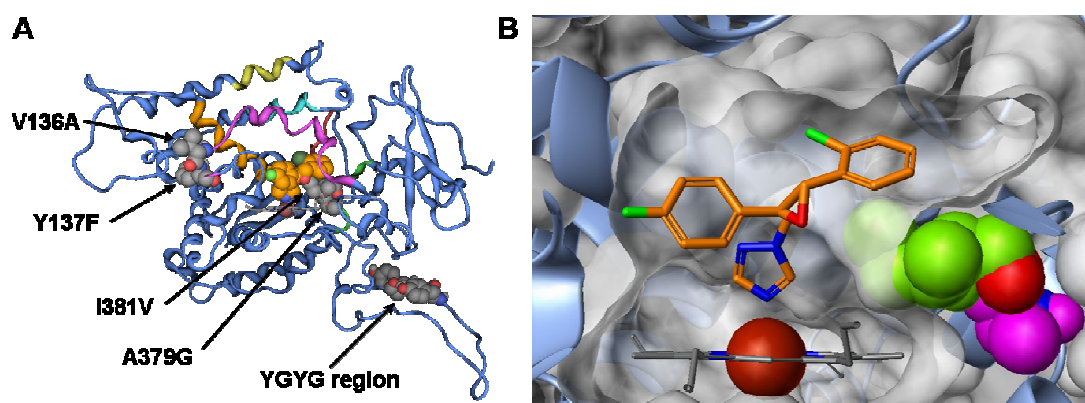


The homology model for CYP51 from *M. graminicola* allows to locate the mutations described in Table II in the three-dimensional structure (Figure 6). As CYP51 from *M. tuberculosis*, the template for the homology model at hand, does not contain a membrane anchor, the structure YGYG region is not properly described by this model. Therefore, we only focus on the V136A, Y137F, A379G and I381V mutations. In contrast to the resistance mutations in SDH, they all lead to residues with smaller, less bulkier side-chains introducing more space and in the case of A379G may also lead to a higher degree of conformational flexibility. The mutations V136A and Y137F are located about 18 Å from the center of the binding site and are part of the BC loop, defining one of the two possible active site access channels. According to Gotoh's substrate recognition site (SRS) analysis, which provide a general view on CYP P450 substrate binding mechanisms (Gotoh, 1992), they belong to SRS1 (Podust *et al.*, 2001b). As both residues appear to show no direct contact with epoxiconazole or similar DMI's, it could be speculated that they are involved in the entrance process of the substrate (or inhibitor) to the binding site.

The mutations A379G and I381V on the other hand lie in direct proximity to the binding site as part of SRS5. While I381V is in direct contact with DMI's such as epoxiconazole exerting hydrophobic interactions with the 2-chlorophenyl ring, A379G lies in the second shell of the binding site with a distance of more than 8 Å to epoxiconazole. Docking studies suggest that a mutation into valine at position 381 does not alter the binding mode of epoxiconazole and does only marginally reduce its binding affinity to CYP51 caused by a small loss in van-der-Waals interactions (results not shown). The influence of A379G on DMI binding has been investigated with molecular dynamics simulations (Santos *et al.*, 2009). The results of this study suggest that the mutation to glycine increases the flexibility of the binding site and is partly destabilizing inhibitor-protein interactions. A379G in combination with I381V may have a higher impact on the binding affinity of azoles than taken alone. Comparing the mean and spread of the *in vitro* ED₅₀ values between the R7 and R8 haplotype indeed support this conclusion. However experimental studies such as site-directed mutagenesis studies combined with biochemical assays would have to be carried out to put these findings on firm ground.

Figure 6: A: CYP51 homology model from *M. graminicola* with epoxiconazole (orange) docked to the binding site. The substrate recognition sites (SRS) of CYP51 (Gotoh, 1992, Podust *et al.*, 2001b) are highlighted in color: SRS1 (aa 119-138) in magenta, SRS2 (aa 225-233) in cyan, SRS3 (aa 249-255) in yellow, SRS4 (aa 300-316) in orange, SRS5 (aa 376-387) in green and SRS6 (aa 520-528) in red. The amino acids for which mutations are observed (Table II) are shown in spacefill mode. B: Binding site of CYP51 with epoxiconazole bound. The residues A379 and I381 are depicted in magenta and green, respectively. The triazole ring is coordinating the iron of the heme group and hence blocking the catalytic site of CYP51. The 2-chlorophenyl ring is in direct contact with I381.

A: Modèle d'homologie de *M. graminicola* avec époxiconazole (orange) attaché au site d'action. B: Agrandissement du site actif de CYP51 montrant le mode de liaison d'époxiconazole en détail.



CONCLUSION

For two important fungicidal targets, SDH and CYP51, the target mutations showing reduced *in vitro* sensitivity to commercial fungicides have been reviewed and their possible impact on the protein structure and inhibitor binding has been analysed based on homology models. It could be shown that for SDH the majority of detected mutations may have an impact on the SDHI binding as they significantly alter the topology and shape of the binding site (either directly or indirectly). Additionally, some mutations in SDH (B-H272Y/R, B-P225L/F/T, C-H134R, D-H132R) may also alter the reduction potential of prosthetic groups and thus have an effect on the quinone reduction activity of the enzyme. This would be worth investigating experimentally. In the case of CYP51 most mutations identified so far are quite conservative. The only amino acid alteration directly located in the binding site (I381V) appears to have a limited effect on azole binding as compared to the binding site mutations in the case of SDH.

In summary, three-dimensional protein models combined with known principles from structural biology and molecular recognition provide an additional tool to analyse and structurally investigate target mutations conferring changes in the sensitivity to fungicides. However, the effect of some mutations, remotely located from the binding site, is difficult to assess as they cause structural rearrangements indirectly affecting the topology of the binding site. In these cases experimental mutagenesis studies, binding assays and x-ray studies in combination with more sophisticated methods such as molecular dynamics simulations are necessary to fully understand the structural effect of such remote mutations.

REFERENCES

- Avenot H.F., Sellam A., Karaoglanidis G.S., Michaelidis T.J., 2008 - Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* 98, 736-742.
- Cools H. J., Fraaije B. A., 2008 – Are azoles fungicides losing ground against Septoria wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. *Pest. Manag. Sci.*, 64, 681-684.
- Dokmanic I., Sikic M., Tomic S., 2007 – Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Cryst.*, D64, 257-263.
- Hollomon D.W., Butters J. A., Kendall, S.J., 1997 – Mechanism of resistance to fungicides. In: *Chemistry of Plant Protection*, Vol 13, Springer, Berlin Heidelberg, Germany, 1-20.
- Horsefield R., Iwata S., Byrne B., 2004 – Complex II from a structural perspective. *Curr. Protein Peptide Sci.*, 5, 107–118.
- Horsefield R., Yankovskaya V., Sexton G., Whittingham W., Shiomi K., Omura S., Byrne B., Checchini G., Iwata S., 2006 – Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *J. Biol. Chem.*, 281, 7309-7316.
- Huang L., Sun G., Cobessi D., Wang A.C., Shen J.T., Tung E.Y., Anderson V.E., Berry E. A., 2006 – 3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 281, 5965–5972.
- Ishii H. , 2008 - Fungicide research in Japan – an overview. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Germany, 45-51.
- Kelly S. L., Arnoldi A., Kelly D. E., 1993 – Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 1034-1038.
- Keon J.P.R., White G.A., Hargreaves J.A., 1991 – Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* 19, 475-481.
- Leroux P., Walker A.S., Albertini A., Gredt M., 2006 – Resistance to fungicides in French populations of *Septoria tritici*, the casual agent of wheat leaf blotch. Fungicide resistance: are we winning the battle but loosing the war? *Aspects Appl. Biol.*, 78, 153-162.
- Leroux P., Albertini A., Gautier A., Gredt M., Walker A. S., 2007 – Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.*, 63, 688-698.
- Matsson M., Hederstedt L., 2001 - The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 33, 99-105.
- Miyamoto T., Ishii H., Seko T., Kobori S., Tomita Y., Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathol.*, in press

Oyedotun K.S., Sit C.S., Lemire, B.D., 2007 – The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase does not require heme for ubiquinone reduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1436-1445.

Podust L. M., Poulos T. L., Waterman M. R., 2001a – Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *PNAS*, 98, 3068-3073.

Podust L. M., Stojan J., Poulos T. M., Waterman M. R., 2001b – Substrate recognition sites in 14 α -sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structures of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. *J. Inorg. Biochem.*, 87, 227-235.

Sali A., 1995 – Modelling mutations and homologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnology*, 6, 437-451.

Santos R., Oostenbrink C., Glättli A., 2009, internal research report, BASF SE, Ludwigshafen, Germany.

Stammler G., Brix H. D., Glättli A., Semar M., Schoefl U., 2007 - Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In: *Proc. BCPC XVI Int. Plant Prot. Cong.*, Alton, Hampshire, UK: British Crop Protection Council Publications, 16-21.

Stammler G., Carstensen M., Koch A., Semar M., Strobel D., Schlehner S., 2008 – Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and –field efficacy. *Crop Prot.*, 27, 1448-1456.

Yankovskaya V., Horsefield R., Törnroth S., Luna-Chavez C., Miyoshi H., Léger C., Byrne B., Checcini G., Iwata S., 2003 – Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299, 700-704.

Zhao Z., Roherty R.A., Weiner J.H., 2006 – Effects of the site-directed mutations in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase on the enzyme activity and production of superoxide radicals. *Biochem. Cell Biol.*, 84, 1013-1021.

**LA RESISTANCE DE *BOTRYTIS CINEREA*, AGENT DE LA POURRITURE GRISE DE LA
VIGNE AUX FONGICIDES
RESULTATS DES PLANS DE SURVEILLANCE DE LA SOUS DIRECTION DE LA
QUALITE ET DE LA PROTECTION DES VEGETAUX ET DU COMITE
INTERPROFESSIONNEL DU VIN DE CHAMPAGNE DE 2004 A 2008**

J. GROSMAN ⁽¹⁾ – A. MICOUD ⁽²⁾ – F. REMUSON ⁽²⁾ – M.-L. PANON ⁽³⁾

⁽¹⁾ DGAL/SDQPV-DRAAF/SRAL Rhône-Alpes – 165 Rue Garibaldi – BP 3202
69401 LYON CEDEX 3

⁽²⁾ AFSSA-URPP – 31 Avenue Tony Garnier – 69364 LYON CEDEX 07

⁽³⁾ CIVC - 5 rue Henri-Martin - BP 135 - 51204 EPERNAY

RESUME

Cette communication rapporte les résultats des plans de surveillance concernant la résistance de la pourriture grise de la vigne aux différentes familles chimiques, réalisés par les Services de la protection des végétaux et le Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne entre 2004 et 2008. Ces plans permettent de suivre la présence et la fréquence des souches résistantes et, le cas échéant, d'adapter les stratégies de protection au vignoble.

Mots-clés : *Botrytis cinerea*, pourriture grise, vigne, résistance, plan de surveillance

SUMMARY

**GRAPE VINE GREY-MOULD RESISTANCE TO FUNGICIDES – RESULTS OF THE
MONITORING DIRECTED BY THE FRENCH PLANT PROTECTION ORGANIZATION AND
THE INTER-PROFESSIONAL CHAMPAGNE COMMITTEE BETWEEN 2004 AND 2008**

This communication presents the results of the grapevine grey-mould resistance monitoring to the different chemical families used against this disease as realized by the National Plant Protection Organization and the Comité interprofessionnel du vin de Champagne between 2004 and 2008. This monitoring enables to follow the presence and frequency of resistant strains and, if needed, to adapt plant protection strategies.

Key-words: *Botrytis cinerea*, grey-mould, grapevine, resistance, monitoring.

INTRODUCTION :

Le plan national de surveillance des phénomènes de résistance, organisé par le Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche (Direction Générale de l'Alimentation, Sous-direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux), est mis en œuvre dans le contexte des suivis de post-autorisation des produits phytosanitaires. Il a pour objet de recueillir des informations sur d'éventuelles dérives de sensibilité des champignons aux fongicides, indépendamment des informations que les firmes doivent communiquer dans le cadre de la post-autorisation. En cas de réponse positive, des investigations complémentaires renseigneront sur les pertes d'efficacité susceptibles d'être engendrées par le développement de la résistance. La collecte de toutes ces données est primordiale pour redéfinir, si nécessaire, les conditions d'utilisation des produits phytosanitaires concernés, notamment par l'intermédiaire des notes nationales.

Dans cette communication, nous rapportons principalement les modalités et les résultats des plans de surveillance des Services de la protection des végétaux relatifs à *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne de la vigne acquis sur la période 2004-2008. Ils sont complétés par les résultats des plans de surveillance du Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC) entre 2006 et 2008. Ces plans ont concerné l'ensemble de familles chimiques utilisées contre cette maladie. Ils ont été mis en place depuis le début des années 1980 par l'INRA, le CIVC et les Services de la protection des végétaux. Ils ont fait l'objet de nombreuses publications, notamment dans PHYTOMA (Leroux et al, 2002 ; Leroux et al, 2006), et de communications dans les éditions précédentes des conférences de l'AFPP sur les maladies des plantes (Leroux et al, 2007).

Le tableau 1 présente les différentes familles de fongicides ainsi que les substances actives incorporées dans les préparations actuellement autorisées. Il donne les types de résistance rencontrées en France à ce jour. Certaines substances actives largement utilisées dans le passé, ne sont plus autorisées : carbendazime (famille des benzimidazoles), vinchlozoline et procymidone (famille des dicarboximides), diéthofencarbe (famille des phénylcarbammates, associée à la carbendazime).

Tableau 1 : Fongicides antibotrytis autorisés en France et types de résistances
Fungicides against grey mould authorized in France and resistance types

| Familles chimiques | Substances actives | Présence en France, de souches résistantes ou à sensibilité réduite | |
|--------------------|--------------------|---|-----------------------------|
| | | Résistance spécifique | Multirésistance de type MDR |
| Anilinopyrimidines | pyriméthanil | oui | oui |
| | mépanipyrim | | |
| | cyprodinil | | |
| Phénylpyrroles | fludioxonil | non | oui |
| Benzimidazoles | thiophanate-méthyl | oui | oui |
| Carboxamides | boscalid | oui | oui |
| Dithiocarbammates | thirame | non | oui |
| Hydroxyanilides | fenhexamid | oui | oui |
| Dicarboximides | iprodione | oui | oui |
| Pyridinamines | fluazinam | non | oui |

Chez *B. cinerea*, 2 types de résistance peuvent être observés : une résistance spécifique (résistance à une seule famille chimique par mutation spécifique du gène codant pour la cible du fongicide) et une multirésistance résultant d'une excrétion cellulaire accrue de fongicides appartenant à plusieurs familles chimiques. Les plans de surveillance de la résistance chez *B. cinerea* montrent que le second phénomène, qualifié de MDR (MultiDrug Resistance), est en progression depuis la fin des années 1990. Toutefois, comme les facteurs de résistance de souches de type MDR sont faibles, les baisses d'efficacité de la protection chimique semblent limitées au vignoble (Leroux, Walker, 2009). Ce qui n'est pas le cas de la résistance spécifique qui peut entraîner des baisses d'efficacité au champ telles que constatées dans le passé pour les dicarboximides, quand les programmes de protection faisaient appel à une utilisation quasi exclusive de cette famille (Leroux, Besselat, 1984).

MATERIEL ET METHODE

GENERALITES.

Sur la période 2004-2008, le plan de surveillance a concerné l'ensemble des familles chimiques utilisées contre la pourriture grise de la vigne. Il permet de détecter, à partir de prélèvements de baies botrytisées dans le vignoble, la présence et la fréquence de souches présentant divers phénotypes (Leroux et al, 1998) :

ImiR1 : souches résistantes aux dicarboximides ou imides cycliques (iprodione, procymidone, vinchlozoline).

BenR1 : souches résistantes aux benzimidazoles (carbendazime, méthyl-thiophanate) et sensibles aux phénylcarbammates (diéthofencarbe).

BenR2 : souches résistantes aux benzimidazoles et aux phénylcarbammates.

AniR1 : souches fortement résistantes aux anilinopyrimidines (pyriméthanil, mépanipyrin, cyprodinil)

MDR1 : souches résistant faiblement, et simultanément, aux anilinopyrimidines, aux phénylpyrroles et dans une moindre mesure aux dicarboximides, aux pyridinamines et aux carboxamides

MDR2 : souches résistant faiblement, et simultanément, aux anilinopyrimidines, aux imides, aux hydroxyanilides, aux carboxamides, et aux DMI

PheR1 : souches résistantes aux phénylpyrroles (fludioxonil)

PyrR : souches résistantes aux pyridinamines (fluazinam)

HydR3 : souches résistantes aux hydroxyanilides (fenhexamid).

CarLR-MR : souches faiblement à moyennement résistantes aux carboxamides (boscalid).

CarHR : souches fortement résistantes aux carboxamides

Le suivi de la résistance aux carboxamides a commencé en 2008.

NOMBRE, REPARTITION ET DATE DES PRELEVEMENTS

Ce plan de surveillance est représentatif des vignobles du Nord et de l'Ouest de la France sur lesquels la pression de traitements est importante (au moins 1 à 2 traitements en moyenne).

Les prélèvements ont lieu de telle sorte que l'échantillonnage de parcelles soit représentatif de la région ou des vignobles considérés.

Les baies de raisin sont prélevées dans les jours précédant la récolte (20 baies provenant de 20 grappes présentant de la pourriture grise). Ces 20 baies doivent être issues de 20 ceps différents, choisis sur la plus large surface possible dans la parcelle.

Chaque parcelle est référencée. Il est demandé de noter la fréquence et l'intensité de pourriture grise et de renseigner l'historique des traitements.

Les échantillons sont acheminés rapidement vers les laboratoires (tableau 2).

Tableau 2 : Nombre d'échantillons exploitables par région et laboratoires destinataires
Number of usable samples per area and per addressee laboratory

| Régions | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | Laboratoire |
|----------------------|---------|------|------|------|------|-------------------------------------|
| Alsace | 11 | 9 | 7 | 0 | 4 | SRPV Lyon ¹ |
| Aquitaine | 12 | 4 | 9 | 10 | 11 | SRPV Lyon |
| Bourgogne | 27 à 30 | 17 | 42 | 33 | 22 | SRPV Lyon |
| Centre | - | 4 | 15 | 7 | - | SRPV Lyon |
| Champagne | 118 | 113 | 47 | 48 | 49 | SRPV Reims (sauf fluazinam) |
| Midi-Pyrénées | 29 | 38 | 25 | 2 | 9 | SRPV Lyon |
| Pays de La Loire | 13 | 15 | 25 | 20 | 13 | SRPV Lyon |
| Poitou- Charentes | 47 | 20 | 20 | 20 | 20 | SRPV Poitiers (sauf fenhexamid) |
| Rhône-Alpes | 11 | 9 | 5 | 15 | 14 | SRPV Lyon |
| Total | 271 | 229 | 195 | 155 | 142 | |

Remarque : la résistance au boscalid a été testé par le laboratoire du SRPV de Lyon en 2008.

METHODES D'ANALYSE ET PRESENTATION DES RESULTATS

Les tests de laboratoire, mis au point par P. Leroux (INRA Versailles), sont réalisés sur conidies de *Botrytis cinerea* et les fongicides testés sont utilisés sous forme de produits techniques. Ils sont incorporés dans le milieu gélosé autoclavé sous forme de solutions éthanoliques pour chaque dose de fongicide testé ; un milieu témoin (amendé avec la solution éthanolique seule) accompagne chaque test. Ces milieux sont ensuite distribués en boîte de Petri de diamètre 55 mm.

La suspension de spores (d'une concentration d'environ 100 000 à 150 000 spores/mL) réalisée dans de l'eau stérile à partir des baies sporulantes est alors déposée à la surface des milieux gélosés et amendés, à raison de 250 µL par boîte.

Après une incubation de 24 heures à 20°C et à l'obscurité, les pourcentages de germination et les longueurs moyennes des filaments germinatifs sont évalués sous microscope.

Le milieu de culture (2 milieux sont utilisés) ainsi que les doses discriminantes sont choisis suivant les phénotypes de résistance recherchés.

L'observation des spores au microscope permet de déterminer la proportion de spores (souches) résistantes de chaque échantillon.

A partir de ces résultats sont déterminés, pour chaque région viticole et pour chaque phénotype :

- le pourcentage moyen d'échantillons résistants, correspondant à la fréquence de parcelles présentant au moins une souche résistante,
- le pourcentage moyen (ou fréquence) de souches résistantes, ce qui indique un niveau d'intensité de cette résistance dans la région considérée.

RESULTATS ET COMMENTAIRES

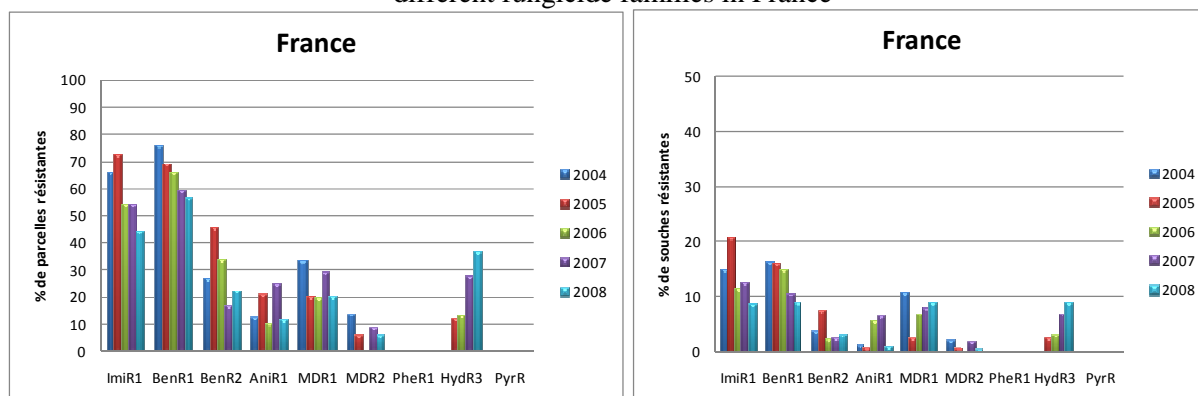
RESULTATS NATIONAUX

Comme indiqué précédemment, ces résultats nationaux (fig.1) reflètent une situation des résistances du Botrytis de la vigne aux fongicides, essentiellement dans les vignobles du Nord et de l'Ouest.

¹ Avec la réorganisation des services de l'Etat, le laboratoire du SRPV de Lyon, (le SRPV étant devenu SRAL : service régional de l'alimentation), a été transféré à l'AFSSA (Unité Résistance aux Produits Phytosanitaire) depuis le 1^{er} janvier 2009.

Figure 1 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en France.

Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in France



Plan de surveillance SDQPV

Dicarboximides (*ImiR1*) et benzimidazoles (*BenR1*, *BenR2*)

Malgré une utilisation actuellement limitée des fongicides à base de dicarboximides (iprodione, vinchlozoline et procymidone, ces 2 dernières n'étant plus autorisées), la fréquence de parcelles présentant une résistance à cette famille reste encore élevée, même si on constate une diminution progressive de cette fréquence (de 70 % à 40 % environ entre 2004 et 2008). Cette tendance à la baisse se remarque également sur le pourcentage moyen de souches résistantes (21 % en 2005, 9 % en 2008).

La tendance est similaire pour les benzimidazoles avec une évolution à la baisse des 2 phénotypes (*BenR1* et *BenR2*). Depuis l'interdiction en France du carbendazime (qui était associé au diéthofencarbe), seul reste le méthylthiophanate, peu utilisé. On peut donc s'attendre à une poursuite de cette évolution.

Anilinoypyrimidines et résistance multiple (*AniR1*, *MDR1*, *MDR2*)

En ce qui concerne le phénotype *AniR1* (souches fortement résistantes aux anilinoypyrimidines), sa fréquence reste non négligeable avec une évolution en dents de scie oscillant entre 10 et 25 %. La fréquence de souches résistantes dans les parcelles se maintient à un niveau bas. La fréquence et l'intensité des résistances de type MDR sont difficilement interprétables au niveau national, le niveau et l'historique de cette présence étant très variables d'une région à l'autre. Le phénotype *MDR1* est plus présent que le phénotype *MDR2*. Rappelons que les facteurs de résistance des souches de type MDR sont bas (Leroux, Walker, 2009).

Hydroxyanilines (*HydR3*)

Un fait remarquable dans le domaine des résistances du chez *B. cinerea* est l'évolution constante de la résistance à la famille des hydroxyanilides (représentée par la substance active fenhexamid, largement présente dans les programmes de protection). C'est la seule famille pour laquelle la fréquence de parcelles et la fréquence de souches est en progression constante depuis sa 1^{ère} détection en 2005, en Champagne, dans le cadre du plan de surveillance de la SDQPV. En 2008, 30 % des parcelles sont touchées et 10 % de souches de botrytis présentent cette résistance.

Phénylpyrroles (*PheR1*) et pyridinamines (*PyrR*)

Ces 2 familles ne sont pas concernées par la résistance spécifique : aucune souche résistante n'a encore été détectée.

Carboxamides

La résistance au boscalid a été testée par le laboratoire du SRPV de Lyon en 2007 et en 2008. Aucune résistance n'a été mise en évidence sur les 77 échantillons de 2007 et sur les 73 échantillons de 2008 (ces analyses concernaient les régions Alsace, Aquitaine, Centre, Bourgogne, Midi-Pyrénées, Pays de Loire et Rhône-Alpes).

Les chiffres nationaux masquent quelques différences au niveau des vignobles ; nous allons nous attacher aux 6 régions pour lesquelles le suivi est relativement régulier en nombre d'échantillons analysés : Aquitaine, Bourgogne, Champagne, Val de Loire, Charente et Rhône-Alpes.

Certains phénotypes n'ont pas été analysés dans quelques régions et pour certaines années. Ils sont mentionnés en dessous des graphiques.

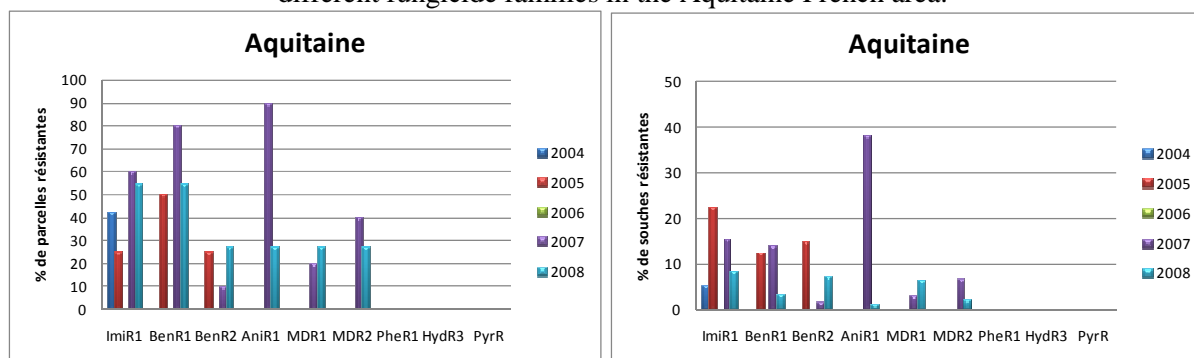
RESULTATS PAR VIGNOBLES

Ces résultats sont à interpréter avec prudence car dans certains cas, le nombre de parcelles prélevées ne garantit pas une parfaite représentativité de la situation vis-à-vis des résistances.

Dans le Bordelais, la fréquence de parcelles présentant une résistance aux anilinopyrimidines est la plus élevée de l'ensemble des vignobles sur les 2 dernières années étudiées (2007 et 2008). Cette situation est également caractérisée par une forte présence de souches possédant cette résistance. L'utilisation prépondérante de cette famille est sans doute une explication. La forte diminution constatée en 2008 est délicate à interpréter : effet de l'alternance avec d'autres familles chimiques ? L'autre fait marquant pour ce vignoble est l'absence de détection de la résistance aux hydroxyanilides.

Figure 2 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Aquitaine.

Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Aquitaine French area.

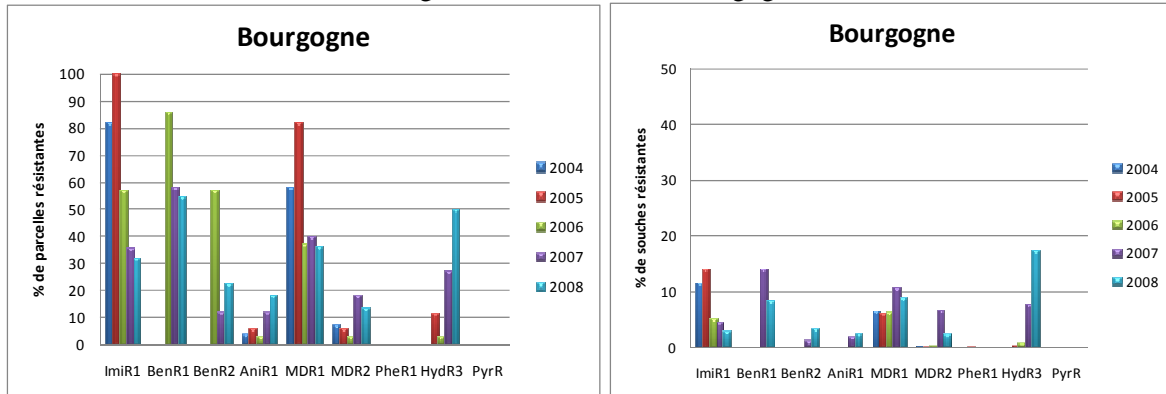


Plan de surveillance SDQPV
(BenR1, BenR2, HydR3 non analysés en 2004)

En Bourgogne, il faut noter la progression du phénotype AniR1, même si la fréquence des souches résistantes reste encore très faible. La fréquence de parcelles multirésistantes est élevée pour le phénotype MDR1 mais le pourcentage de souches résistantes se situe à un niveau encore limité. Plus inquiétante est la progression de la résistance au fenhexamid qui passe de 3 % en 2006 à 50 % en 2008 de parcelles touchées par la résistance et de 1 % à 17 % de souches résistantes en moyenne.

La résistance aux dicarboximides et benzimidazoles, encore bien présente dans le vignoble en 2004 et 2005, marque une nette tendance à la baisse.

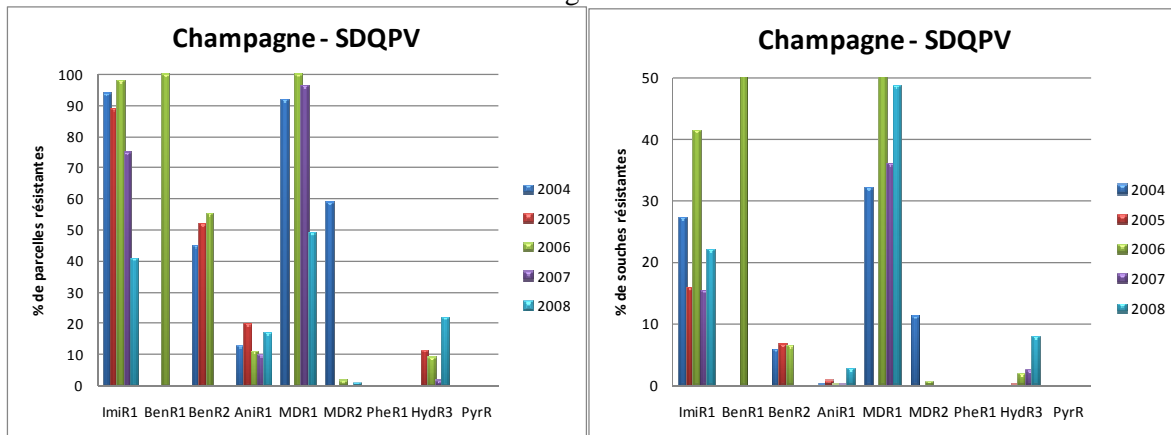
Figure 3 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Bourgogne.
 Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Bourgogne French area



Plan de surveillance SDQPV
 (BenR1 et BenR2 non analysés en 2004 et 2005)

En Champagne, le plan de surveillance de la SDQPV montre un profil similaire à celui de la Bourgogne : niveau et évolution similaires des dicarboximides, plus difficiles à évaluer pour les benzimidazoles (BenR1 analysés en 2005 uniquement, à un niveau très élevé), évolution sensible mais moins marquée pour les souches de type Hydr3. Les souches de type MDR sont beaucoup plus fréquentes qu'en Bourgogne (entre 30 et 50 % en fonction des années).

Figure 4 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Champagne- SDQPV
 Figure 4: Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Champagne French area – French Pl. Protect. Organization



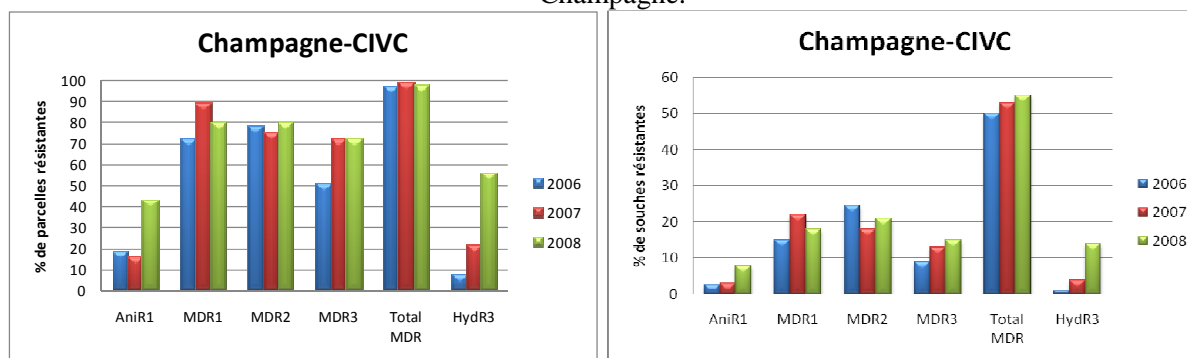
Plan de surveillance SDQPV
 (BenR1 non analysés en 2004, 2005 et 2008, BenR2 non analysés en 2007 et 2008, MDR1 non analysés en 2005)

Parallèlement, le plan de surveillance mis en place par le CIVC (Comité interprofessionnel du Vin de Champagne), en collaboration avec l'INRA de Versailles, sur un réseau pérenne de 130 parcelles réparties dans l'ensemble du vignoble champenois, permet de compléter ces résultats.

Les analyses montrent en 2008 une progression significative des fréquences de parcelles et des pourcentages de souches résistant spécifiquement aux hydroxyanilides et aux anilinopyrimidines. Cette évolution ne s'explique pas par les panels d'utilisation de ces familles de fongicides.

Figure 5 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Champagne- CIVC

Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Champagne French area – Comité interprofessionnel du vin de Champagne.



Plan de surveillance CIVC

Après une première campagne de commercialisation en 2006, la résistance spécifique aux carboxamides a été isolée dans 8 parcelles en 2008. La première détection date de 2007. La résistance aux imides et à l'association diéthofencarbe-carbendazime atteint les valeurs les plus faibles jamais enregistrées, en relation avec une utilisation faible à nulle.

La résistance aux benzimidazoles se maintient à des taux élevés, malgré l'absence de pression de sélection.

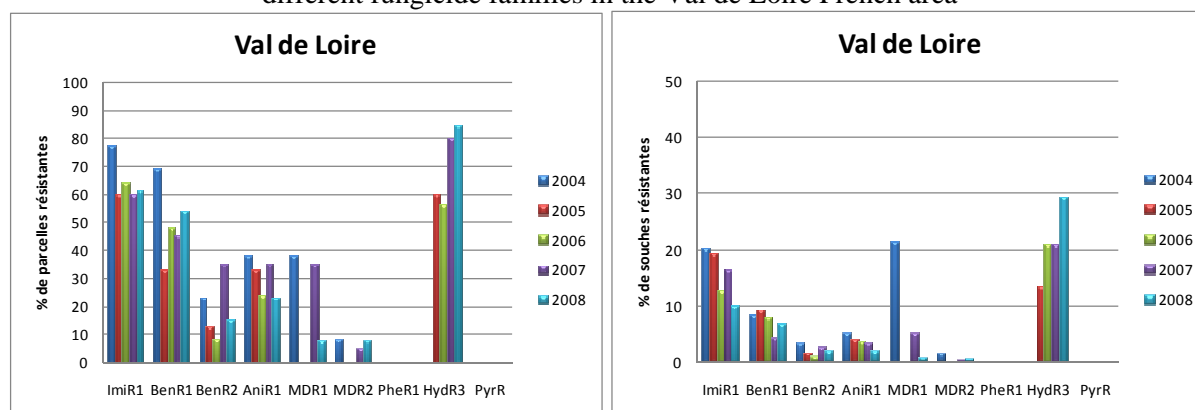
Avec 2,2 traitements spécifiques anti-botrytis en 2008, la multirésistance reste généralisée et fortement implantée en Champagne. Considérant l'ensemble des phénotypes MDR1, MDR2 et MDR3 (les souches MDR3 cumulant les caractéristiques des souches MDR1 et MDR2), 98% des parcelles hébergent des souches de phénotype « MDR », et en moyenne 55% de souches de type MDR sont isolées dans les populations de botrytis collectées. Cette situation reste inédite en France.

Jusqu'en 2008, l'efficacité de la lutte chimique n'est pas affectée par la résistance.

Le vignoble du **Val de Loire** se caractérise par la très forte progression de la résistance au fenhexamid (HydR3). En 2008, plus de 80 % de parcelles sont touchées et la fréquence moyenne de souches résistantes atteint 30 %, ce qui représente le chiffre le plus élevé en France.

Figure 6 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Val de Loire.

Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Val de Loire French area



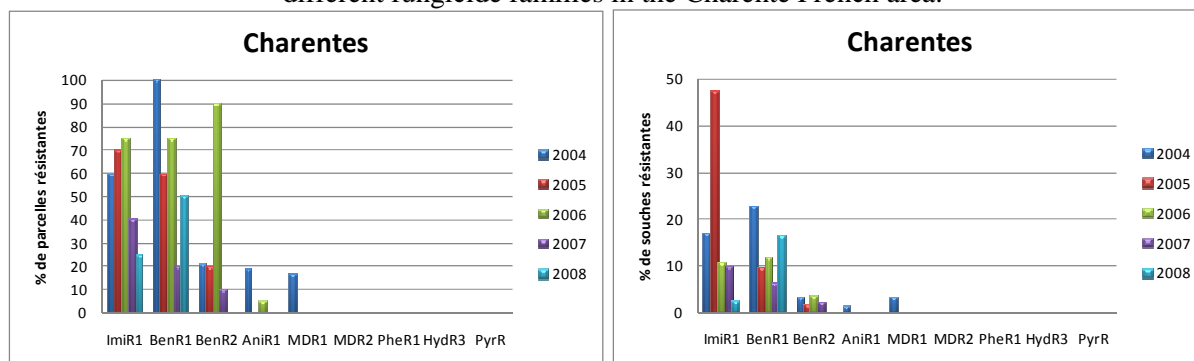
Plan de surveillance SDQPV

En **Charentes**, grâce sans doute à une pression fongicide contre la pourriture grise moins accentuée que dans les vignobles précédents, on ne note pas d'évolution des phénotypes

AniR1 et MDR, lesquels se maintiennent à un niveau très bas. Nous ne disposons pas de résultats pour les hydroxyanilides. Quant à la résistance aux dicarboximides et aux benzimidazoles, elle est toujours présente et marque la même tendance à la baisse que dans les autres vignobles.

Figure 7 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Charente.

Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Charente French area.



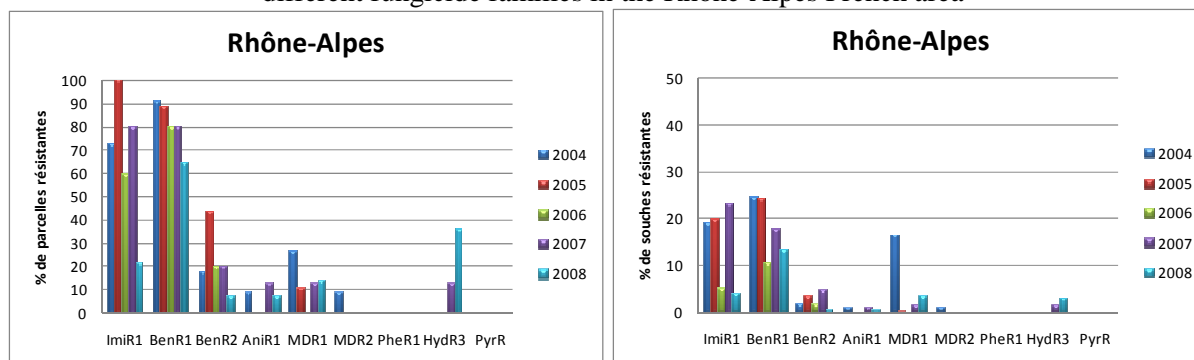
Plan de surveillance SDQPV

(MDR2 non analysés en 2004 et 2005, HydR3 non analysés de 2004 à 2007)

En **Rhône-Alpes**, les prélèvements, effectués majoritairement dans le **Beaujolais**, aboutissent à des résultats comparables à ceux, proches géographiquement, de la Bourgogne. Tout au plus constate-t-on une présence plus discrète des souches multirésistantes. La progression de la résistance au fenhexamid est à surveiller.

Figure 8 : Fréquence des parcelles (graphe de gauche) et fréquence de souches de botrytis (graphe de droite) présentant une résistance aux différentes familles de fongicides en Rhône-Alpes.

Plot frequency (left graph) and grey mould strains frequency (right graph) showing a resistance to different fungicide families in the Rhône-Alpes French area



Plan de surveillance SDQPV

CONCLUSION

Le plan de surveillance de la résistance de *B. cinerea* aux fongicides est réalisé depuis de nombreuses années par les Services de la protection des végétaux et le CIVC en collaboration avec l'INRA. Lors des 5 dernières années présentées ici (2004 à 2008), il a concerné l'ensemble des familles chimiques disponibles. Il se traduit globalement par :

- une diminution régulière de la résistance aux dicarboximides et aux benzimidazoles que l'on peut expliquer par une utilisation limitée de ces fongicides (aspects réglementaires et alternance). Ces 2 familles avaient, dans le passé, entraîné des baisses d'efficacité en pratique.

- une fluctuation importante en fonction des années et des régions de la résistance aux anilinopyrimidines, les fréquences les plus élevées étant atteintes en 2007 dans le Bordelais alors qu'une faible présence de souches résistantes est détectée dans les autres régions viticoles.

- une absence de détection de la résistance aux phénylpyrroles et aux pyridinamines.

- une présence importante et historique de souches multirésistantes en Champagne (plan de surveillance CIVC-INRA) et en Bourgogne, mais les faibles facteurs de résistance de ces souches ne se traduisent pas pour l'instant par une baisse d'efficacité au champ.

- une augmentation, en Bourgogne, Beaujolais et surtout dans le Val de Loire de la présence et de la fréquence des souches résistantes aux hydroxyanilides. Cette progression inquiétante doit être surveillée.

Comme il est indiqué dans la *note nationale Botrytis de la vigne 2009*, seule une stricte application des stratégies consistant à adapter la protection à la sensibilité de la parcelle, à appliquer les mesures prophylactiques (comme l'aération de la végétation) et à alterner les familles chimiques de façon pluriannuelle est susceptible de garantir un bon niveau d'efficacité des programmes de protection.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les agents des SRPV (SRAL), des FREDON et des organismes professionnels qui ont participé à ces plans de surveillance en réalisant les prélèvements d'échantillons.

Nous remercions également Anne-Sophie Walker (INRA de Versailles) pour la relecture attentive et critique de ce texte.

Une grande reconnaissance à Isabelle Renaudin qui a initié ce travail de synthèse entre 2004 et 2007.

BIBLIOGRAPHIE

Leroux P., Besselat B, 1984. Pourriture grise : la résistance aux fongicides de *Botrytis cinerea*- *Phytoma* 359, 25-31)

Leroux P. et al, 1998 – Résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides, du laboratoire au vignoble et vice versa. *Phytoma la Défense des Végétaux*,504, 62-67.

Leroux P. et al, 2002 – Biodiversité et variabilité chez *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise. *Phytoma la Défense des Végétaux*,554, 38-42.

Leroux P et al, 2006. Caractéristiques et distribution des souches de *Botrytis cinerea* résistantes aux fongicides dans le vignoble champenois. 8^{ème} Conférence internationale sur les Maladies de plantes de l'AFPP, Tours, 10 et 11 décembre 2006. Session *Résistances*, 584-592.

Leroux P., Walker A.S., 2009. La résistance aux fongicides de type MDR (multidrug resistance) chez les champignons phytopathogènes : mythe ou réalité ? - 9^{ème} Conférence internationale sur les Maladies de plantes de l'AFPP, Tours, 8 et 9 décembre 2009. Session *Résistances*

Groupe national résistance aux fongicides de la vigne (DGAL-SDQPV, INRA, IFV, APCA, CIVC), 2009 – *Note nationale résistance du Botrytis de la vigne*. <http://www.afpp.net> ou http://www.draaf.rhone-alpes.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/BOTRYTIS_cle8ea775.pdf

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**SUIVI DE L'ÉVOLUTION DE LA SENSIBILITÉ AUX FONGICIDES DES POPULATIONS
DE *BOTRYTIS CINEREA* EN GIRONDE, CHARENTE ET MIDI-PYRÉNÉES**

L. LE COZ, E. TERRIBILE, G. GASTALDI, L. DE BASTARD¹, P. LEROUX²,
A.-S. WALKER², G. GIRARD³, B. BOURGOUIN⁴, P. RETAUD⁵, H. CONSTANT⁶,
T. COULON⁷, L. DAVIDOU⁸, P. SAURIS⁹, J. ROUDET⁹

- 1 Syngenta Agro SAS, 1, avenue des prés, CS 10537, 78286 Guyancourt Cedex, France,
laure.le_coz@syngenta.com
- 2 INRA, UMR 1290 BIOGER-CPP, Bât 13, Avenue Lucien Brétignières, BP01, 78850
Thiverval-Grignon, France, lerouxp@versailles.inra.fr
- 3 SRAL Aquitaine, 51 rue Kiéser, 33 077 Bordeaux Cedex, France
- 4 SRAL Midi-Pyrénées, Cité administrative, bâtiment E, Boulevard Armand Duportal
31 074 Toulouse CEDEX, France
- 5 SRAL Poitou-Charentes, 20 rue de la Providence, BP 537, 86020 Poitiers cedex, France
- 6 FREDON Poitou Charentes, 13, route Forêt, 86580 Biard, France
- 7 IFV, Domaine de l'Espiguette, 30240 Le Grau du Roi, France
- 8 CA Aquitaine, 14 quai Chartrons, 33000 Bordeaux, France
- 9 INRA Aquitaine, 71 rue Edouard Bourleaux, 33140 Villenave d'Ornon, France

RÉSUMÉ

Depuis 1999, un groupe de travail associant différents acteurs a réalisé la surveillance des populations de *Botrytis cinerea* dans les différents vignobles du Sud-ouest de la France. Chaque année, une centaine d'échantillons sont prélevés dans des parcelles de vigneron puis analysés au laboratoire afin de définir les niveaux de sensibilités de ces populations aux différents fongicides utilisés.

Les résultats de ces analyses montrent l'absence de spores résistantes aux phénylpyrroles, pyridinamines et carboxamides. Pour les autres familles : hydroxyanilides, dicarboximides et anilinopyrimidines, la fréquence de souches résistantes évolue au cours des années et reste variable d'une famille à l'autre.

En conclusion, ce suivi montre l'importance de rester vigilant et de maintenir les recommandations d'alternance.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, vigne, fongicide, résistance, monitoring

SUMMARY

SENSITIVITY MONITORING OF *BOTRYTIS CINEREA* STRAINS TOWARD FUNGICIDES IN GIRONDE, CHARENTE AND MIDI-PYRENEES VINEYARDS

Since 1999, a monitoring group realized a *Botrytis cinerea* populations monitoring in the South West French vineyards. Each year, around 100 sampling were collected from producer fields and analyzed in laboratory to assess *Botrytis* strains sensitivity toward anti-*Botrytis* fungicides.

Analysis doesn't show any *Botrytis* resistant strains toward phenylpyrroles, pyridinamines and carboxamides. *Botrytis* resistant strains had been detected toward other fungicides families as hydroxyanilides, dicarboximides and anilinopyrimidines. Resistant strains levels vary over years and are different between anti-*Botrytis* families.

To conclude, this monitoring shows the importance to maintain alternation recommendations.

Key-words: *Botrytis cinerea*, grapevine, fungicide, resistance, monitoring

INTRODUCTION

Botrytis cinerea, agent de la pourriture grise, est pathogène de nombreuses cultures ornementales, fruitières et maraichères. En particulier sur la vigne, il cause de graves pertes quantitatives mais également qualitatives. La lutte chimique reste la principale solution pour protéger vignes et vendanges (Leroux *et al.*, 2002). Plusieurs familles de fongicides sont disponibles : les imides cycliques ou dicarboximides (iprodione), les phénylpyrroles (fludioxonil), les anilinopyrimidines (cyprodinil, mepanipyrim et pyrimethanil), les hydroxyanilides (fenhexamid) et les carboxamides (boscalid).

En raison de l'émergence de souches de *Botrytis* résistantes, l'utilisation de ces molécules doit faire l'objet de stratégies bien définies (Note nationale *Botrytis*, 2009).

Syngenta Agro en collaboration avec l'INRA de Bordeaux, des SRAL Aquitaine et Midi-Pyrénées et SRAL - FREDON Poitou-Charentes, de l'Institut Français de la Vigne et du Vin et de la chambre d'agriculture de la Gironde, a mis en place un réseau de surveillance de la sensibilité des souches de *Botrytis* dans les vignobles du Sud-ouest de la France (Albert *et al.*, 2004 - de Bastard *et al.*, 2005).

MATERIEL ET METHODE

Echantillonnage à la parcelle

Protocole du prélèvement

Les parcelles prélevées sont uniquement des parcelles de vigneron.

De 1999 à 2003, le monitoring était réalisé en Aquitaine, puis il a été élargi en 2004 aux régions Midi-Pyrénées et Poitou-Charentes.

La répartition annuelle des prélèvements est présentée dans le tableau suivant.

Tableau I : Répartition des échantillons analysés par vignoble
Sampling distribution on the different wine-growing area

| Année | Vignoble | | |
|-------------------|-----------|---------------|------------------|
| | Aquitaine | Midi-Pyrénées | Poitou-Charentes |
| 1999 | 115 | | |
| 2000 | 71 | | |
| 2001 | 102 | | |
| 2002 | 86 | | |
| 2003 | 73 | | |
| 2004 | 121 | 9 | 13 |
| 2005 | 63 | 9 | 23 |
| 2006 | 76 | 13 | 16 |
| 2007 | 83 | 21 | 3 |
| 2008 | 91 | 34 | 12 |
| Total pluriannuel | 881 | 86 | 77 |

Sur l'ensemble des échantillons du monitoring, 42 parcelles ont été suivies régulièrement depuis 1999. Ces parcelles permettent d'avoir une estimation de l'impact à long terme des pratiques culturales au vignoble.

Les principaux cépages sont présents dans l'échantillonnage, Merlot et Cabernet Sauvignon représentent respectivement 47 et 21 % des échantillons analysés. Les cépages moins prélevés sont Sauvignon, Cabernet Franc, Sémillon et Ugni blanc avec respectivement 9, 6, 5 et 4%. De façon plus exceptionnelle, d'autres échantillons ont été prélevés sur Colombard, Muscadelle, Négrette, Malbec et Chardonnay.

Méthode de prélèvement

Lors de la période de vendange, les préleveurs récupèrent, de manière aléatoire au centre de la parcelle, des baies *Botrytis*ées ou réalisent un frottis sur 5 cotons-tiges par grattage léger des lésions visibles et sporulantes.

Pour chaque prélèvement, une fiche d'identification est remplie avec le cépage, la localisation de la parcelle, la pression de *Botrytis* et le programme anti-*Botrytis* réalisé.

Analyses *in-vitro* de la sensibilité des souches de *Botrytis*

Les analyses de sensibilité ont été réalisées, selon les années, par les laboratoires Biorizon, Biotransfer ou par l'INRA de Versailles.

Le protocole, défini par Pierre Leroux (Leroux *et al.*, 1998), est le suivant : des suspensions de conidies sont préparées à partir des prélèvements (baies ou frottis). Ces suspensions constituent un échantillon représentatif de la population de *Botrytis cinerea* de chaque parcelle. Les suspensions sont distribuées à raison de 100 µl sur milieu gélosé additionné de fongicide. Les essais sont réalisés en présence d'iprodione (2,5 et 10 mg/L), procymidone (10 mg/l), pyriméthanil (2,5 mg/l), fludioxonil (1 mg/l), fenhexamid (1 mg/l), fluazinam (0.3 ou 1 mg/l), boscalid (1 et 3 mg/l). L'incubation est réalisée pendant 24 heures à 21°C dans l'obscurité.

Les comptages microscopiques sont réalisés ensuite sur 100 à 200 conidies par fongicide et par concentration. Ces comptages permettent d'évaluer les pourcentages de sensibilité de chaque population à chaque famille. La longueur du tube germinatif permet d'évaluer la sensibilité de chaque conidie. Lorsque cette longueur est supérieure à la moitié de celle dans les témoins, la conidie est résistante.

Les suspensions, représentatives d'une parcelle, sont réparties en 3 classes :

- taux de conidies résistantes inférieur à 5 % : « parcelle sensible »
- taux de conidies résistantes compris entre 5 et 30 % : « parcelle peu sensible »
- taux de conidies résistantes supérieur à 30% : « parcelle résistante »

Pour les résistances spécifiques, les phénotypes suivants ont été recherchés (Leroux *et al.*, 2006) :

- Le phénotype Imi R1 (Imi LR-MR) faiblement à moyennement résistant aux dicarboximides, sensible aux phénylpyrroles.
- Les phénotypes résistants aux benzimidazoles : Ben R1, fortement résistant aux benzimidazoles et sensible aux phénylcarbammates, et Ben R2, résistant à ces deux familles.
- Phe MR-HR moyennement à fortement résistant aux Phénylpyrroles. Ce phénotype n'a jamais été détecté au vignoble.
- AniR1 (ou Ani MR-HR), phénotype moyennement à fortement résistant aux anilinopyrimidines.
- Pyr MR-HR, souche moyennement à fortement résistante aux pyridinamines. Aucune souche n'a été trouvée au vignoble.
- HydR3 (ou Hyd MR-HR) : phénotypes moyennement à fortement résistants aux hydroxyanilides.
- Car LR-MR et Car HR, respectivement faiblement à moyennement résistant et fortement résistant au boscalid.

Les souches multirésistantes de type MDR (pour Multi Drug Resistance) présentent simultanément une faible résistance à plusieurs familles de fongicides. Elles se répartissent en trois catégories (MdR1, MdR 2 et MdR 3) et leur caractérisation se fait à l'aide de plusieurs anti-*Botrytis* (fludioxonil, fenhexamid, iprodione) et aussi de fongicides IBS (tiophanate methyl, tébuconazole) (Leroux *et al.*, 2006).

RESULTATS

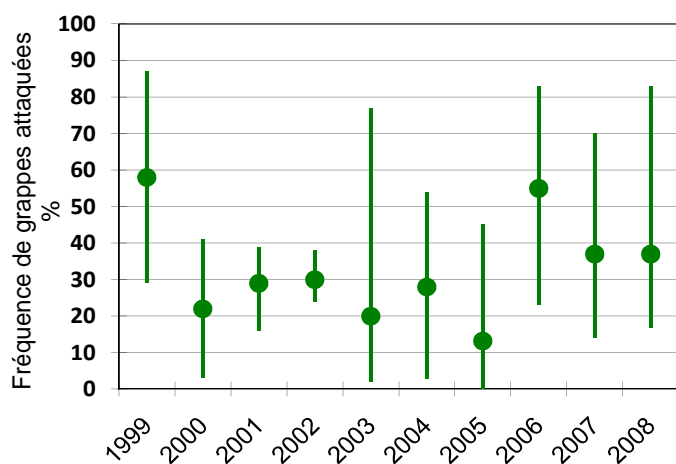
Informations agronomiques

Evolution de la pression de *Botrytis*

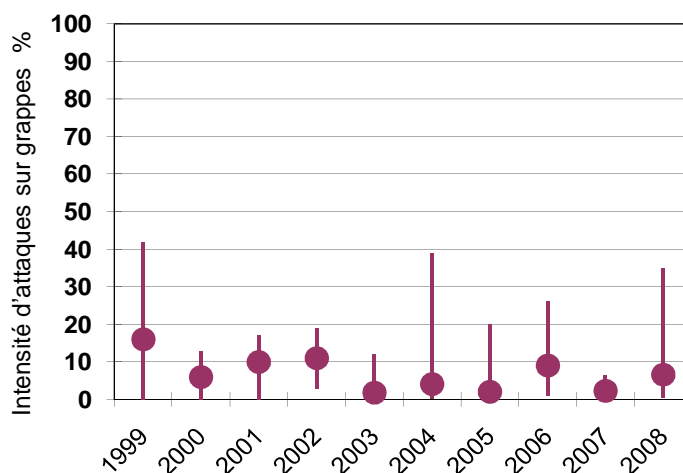
Dans les prélèvements, la proportion de parcelles non traitées varie entre 10 et 20 %. Elles permettent d'avoir une estimation de la pression de maladie. Depuis 10 ans, l'année 1999 présente la plus forte pression suivie, dans une moindre mesure, par les années 2001 et 2002. L'épidémiologie de ces 2 années diffère par l'émergence de la maladie : tardive en 2001 et précoce en 2002. L'année 2004 a été marquée par des fréquences de même niveau que 2001 et 2002 mais avec une intensité plus faible. Les années 2000, 2003 et 2005 ont montré des pressions faibles, voire très faibles comme en 2003. Toutefois, le temps chaud et sec de 2003 a fragilisé les baies permettant à *Botrytis cinerea* de se développer juste avant la vendange. Les trois dernières années de 2006 à 2008 se caractérisent par une fréquence aussi forte que 1999 mais avec de faibles intensités.

Figure 1 : Evolution de la pression de *Botrytis* (fréquence (a) et intensité (b) sur grappe)
Botrytis disease pressure over the last 10 years (frequency (a) and bunch rot surface (b))

a- fréquence



b- intensité



Programme de protection contre le *Botrytis*

Dans notre échantillonnage, 60 % des parcelles reçoivent deux applications principalement aux stades "chute des capuchons floraux" (A) puis "véraison" (C) ou "fermeture de la grappe" (B) puis "véraison" (C). Environ 12 % des parcelles ont reçu une application unique d'anti-*Botrytis* et 3 % des parcelles ont reçu trois applications. L'échantillonnage est donc représentatif des pratiques d'application des fongicides anti-*Botrytis*.

Toutefois, 60 % des parcelles prélevées appartiennent à des vignerons utilisateurs de produits Syngenta, ce qui constitue un biais. Ainsi, les programmes à base d'anilinopyrimidines et phénylpyrroles sont sur représentés dans l'échantillonnage par rapport aux utilisations réelles (notamment le mélange cyprodinil+fludioxonil ou Switch®). Les autres familles chimiques suivies dans le monitoring sont présentées dans le tableau ci-après.

Tableau II : Principales familles chimiques de fongicides utilisées contre *B. cinerea* et étudiées dans le monitoring.

Main chemical fungicides, used against *B. cinerea*, studied in the monitoring.

| Famille chimique | Matière actives | Spécialité commerciale |
|-------------------|-------------------|------------------------|
| | Cyprodinil | Switch© |
| Anilinopyrimidine | Mepanipyrin | Japica© |
| | Pyriméthanil | Scala© |
| Pyridinamine | Fluazinam | Sekoya© |
| Benzimidazole | Tiophanate methyl | Topsin© |
| Carboxamide | Boscalid | Cantus© |
| Dicarboximides | Iprodione | Rovral© |
| Hydroxyanilide | Fenhexamid | Teldor© |
| Phénylpyrrole | Fludioxonil | Switch© |

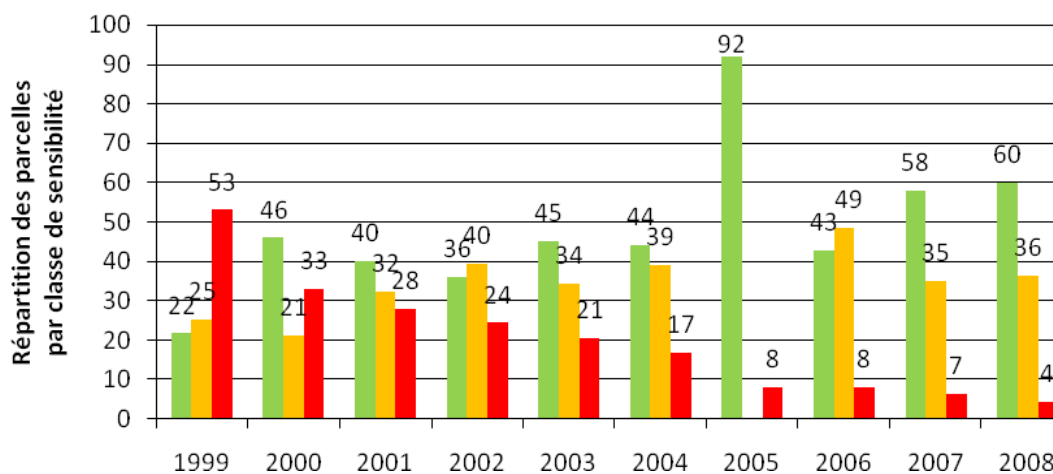
Sensibilité des populations de *Botrytis cinerea* à différents fongicides

Depuis les publications du groupe en 2004 et 2005 (Albert JP *et al.*, 2004 et de Bastard L. *et al.*, 2005) , la sensibilité des souches de *Botrytis* aux différentes familles de fongicides a évolué.

Sensibilité aux dicarboximides

Figure 2 : Evolution de la résistance spécifique aux dicarboximides.
Evolution of specific resistance towards dicarboximides

- Parcelle sensible - % de conidies résistantes < 5%
- Parcelle peu sensible - % de conidies résistantes comprise entre 5 et 30%
- Parcelle résistante - % de conidies résistantes > 30%



La figure 2 montre que le nombre de parcelles dites "résistantes", c'est-à-dire présentant plus de 30% de souche Imi R1, diminue régulièrement. Cette diminution s'explique par la baisse des utilisations des dicarboximides induisant ainsi une pression de sélection plus faible.

Sensibilité aux benzimidazoles

Les deux phénotypes résistants aux benzimidazoles sont : Ben R1, fortement résistant aux benzimidazoles et sensible aux phénylcarbamates, et Ben R2, résistant à ces deux familles. Cette résistance, apparue deux ans après la première utilisation, était très importante dans les années 90 et depuis, malgré la forte diminution des utilisations de produits de cette famille, la résistance n'a pas disparu. (Leroux, 2004)

Figure 3 : Evolution de la résistance spécifique aux benzimidazoles (Ben R1)
Evolution of specific resistance towards benzimidazoles (Ben R1)

- Parcelle sensible - % de conidies résistantes < 5%
- Parcelle peu sensible - % de conidies résistantes comprise entre 5 et 30%
- Parcelle résistante - % de conidies résistantes > 30%

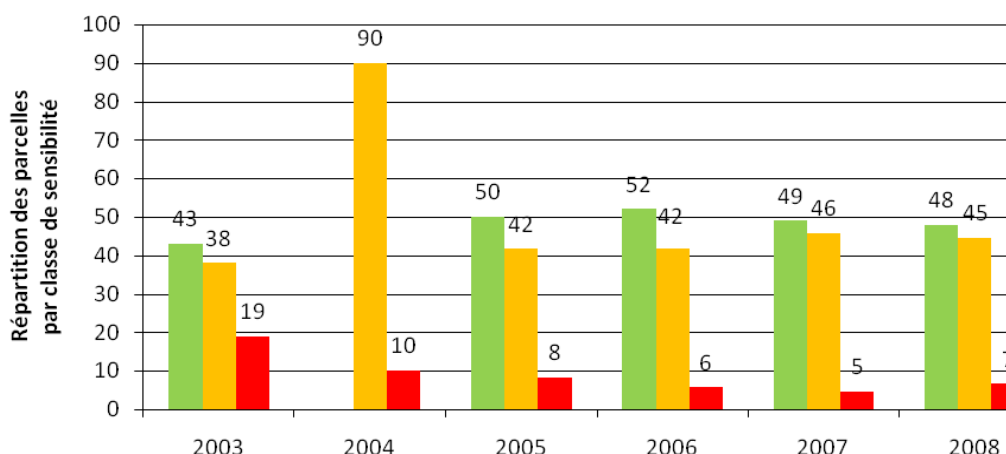
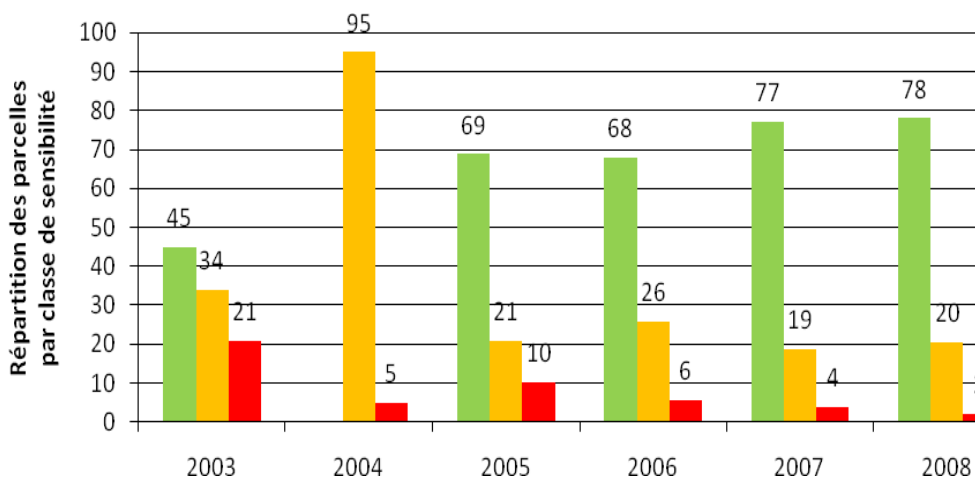


Figure 4 : Evolution de la résistance spécifique aux benzimidazoles (Ben R2)
Evolution of specific resistance towards benzimidazoles (Ben R2).

- Parcelle sensible - % de conidies résistantes < 5%
- Parcelle peu sensible - % de conidies résistantes comprise entre 5 et 30%
- Parcelle résistante - % de conidies résistantes > 30%



Les souches résistantes Ben R1 et Ben R2 diminuent régulièrement depuis 2003 et ne sont fortement implantées que dans respectivement 7 et 2 % des parcelles du monitoring en 2008.

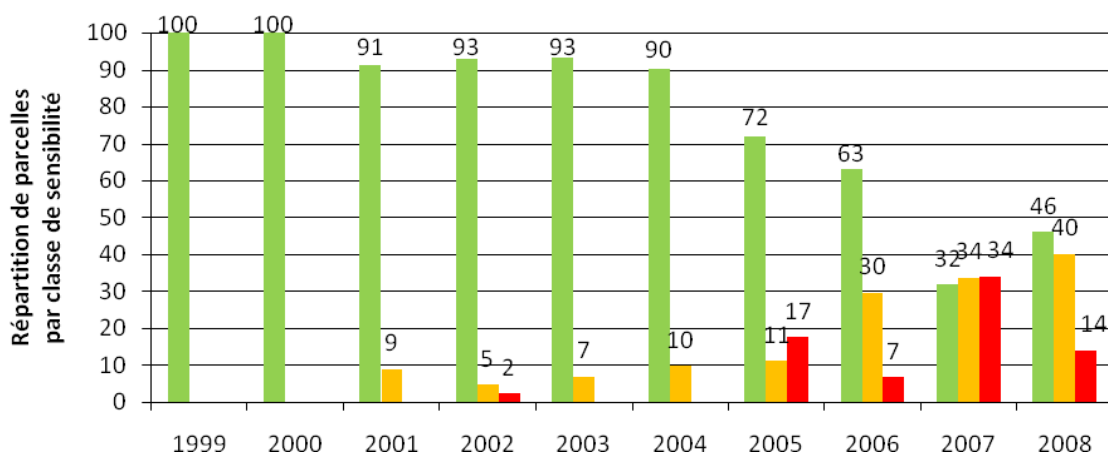
Sensibilité aux phénylpyrroles

Après 13 années d'utilisation, aucune parcelle ne présente de souches de *B. cinerea* résistantes à cette famille.

Sensibilité aux anilinoypyrimidines

Figure 5 : Evolution de la résistance spécifique aux anilinoypyrimidines.
Evolution of specific resistance towards anilinoypyrimidines.

- Parcelle sensible - % de conidies résistantes < 5%
- Parcelle peu sensible - % de conidies résistantes comprise entre 5 et 30%
- Parcelle résistante - % de conidies résistantes > 30%



Les parcelles présentant des populations sensibles (<5% de souches Ani R1) ont diminué en 2005 puis en 2007. Les parcelles dites "peu sensibles" (de 5 à 30% de souches Ani R1) sont apparues en 2001, et ont augmenté en 2006. Les parcelles présentant des populations résistantes (> 30% d'Ani R1) sont apparues en 2005, et depuis leur fréquence fluctue d'une année sur l'autre. En 2008, la fréquence de parcelles de moindre sensibilité est équivalente à celle de 2005. Ces fluctuations peuvent s'expliquer par le caractère réversible de la résistance aux anilinoypyrimidines chez de nombreuses souches (Leroux, non publié).

Il apparaît que 2005 et 2007 présentent un profil assez différents des années antérieures. Il est possible que l'échantillonnage de ces deux années ait été biaisé, du fait de la très faible pression de *Botrytis*.

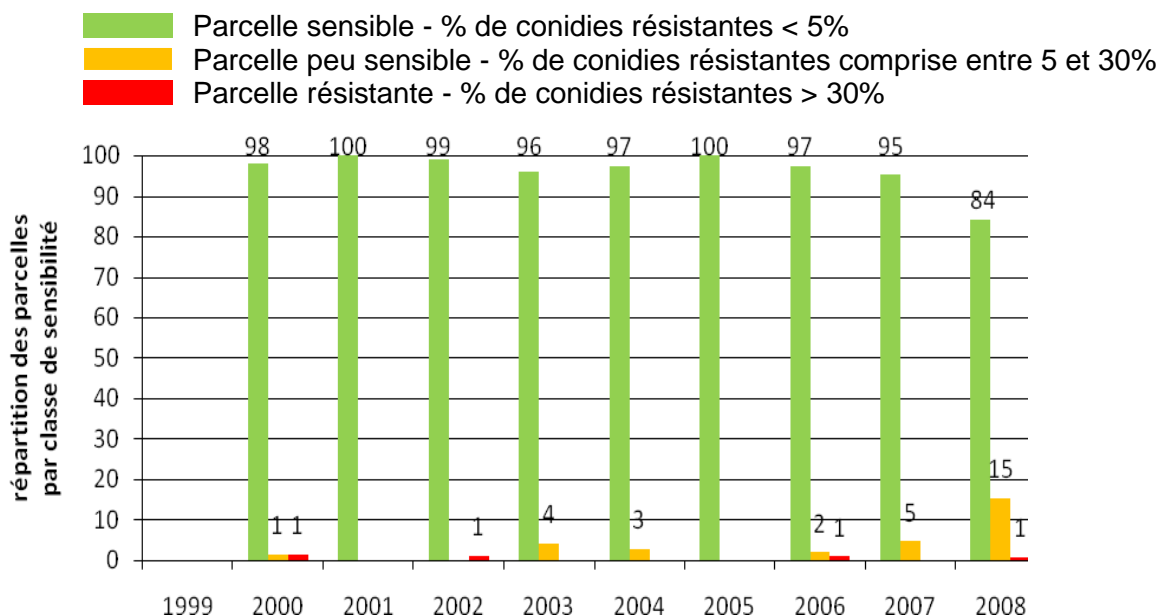
Sur les parcelles présentant des souches AniR1 en 2007, aucune baisse d'efficacité aux anilinoypyrimidines n'a été constatée.

Sensibilité aux pyridinamines

Après 11 années d'utilisation, aucune parcelle ne présente de souches de *B. cinerea* résistantes à cette famille.

Sensibilité aux hydroxyanilides

Figure 6 : Evolution de la résistance spécifique aux hydroxyanilides de 1999 à 2008.
Evolution of specific resistance towards hydroxyanilides from 1999 to 2008.



Les premières parcelles présentant des souches de moindre sensibilité sont apparues en 2000, après 2 années d'utilisation.

En 2008, la proportion des parcelles "peu sensibles" a augmenté visiblement.

Sensibilité aux carboxamides

Depuis 2006, date de la première analyse pour la famille des carboximides, aucune souche résistante n'a été détectée dans notre échantillonnage.

Analyses des multirésistances de type MDR

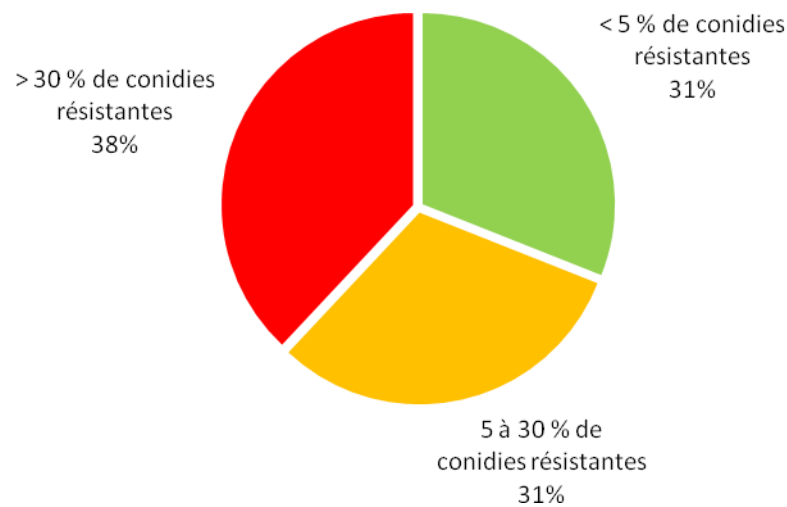
Depuis 2006, la détection des souches MDR a été réalisée sur l'échantillonnage. Globalement, la fréquence de souches MDR est stable dans les vignobles du Sud-ouest de la France. 2/3 des parcelles ne présentent pas de souches de ce type, et la fréquence des parcelles présentant plus de 30% de souches MDR oscille entre 5 et 10%. Ce phénomène est donc beaucoup moins implanté qu'en Champagne (Leroux, 2006)

Relation entre emploi des anti-*Botrytis* et évolution des résistances

L'un des intérêts d'avoir un monitoring basé sur des parcelles de viticulteurs depuis 10 ans est d'évaluer l'impact des programmes de protection phytosanitaire à long terme.

L'analyse comparative des 42 parcelles suivies régulièrement depuis 1999 ne permet pas de dégager de tendance générale sur les relations entre applications anti-*Botrytis* et résistance. Par exemple, pour les 16 parcelles ayant reçu le produit Switch® (cyprodinil + fludioxonil) pendant au moins 5 années consécutives entre 1999 à 2008, plusieurs situations existent. 7 de ces parcelles ont présenté au moins une fois une fréquence élevée de souches AniR1 (>30%) alors que 9 des parcelles peuvent être qualifiées de sensibles, car elles présentent un niveau inférieur à 30 % de souches AniR1 (voir figure 7).

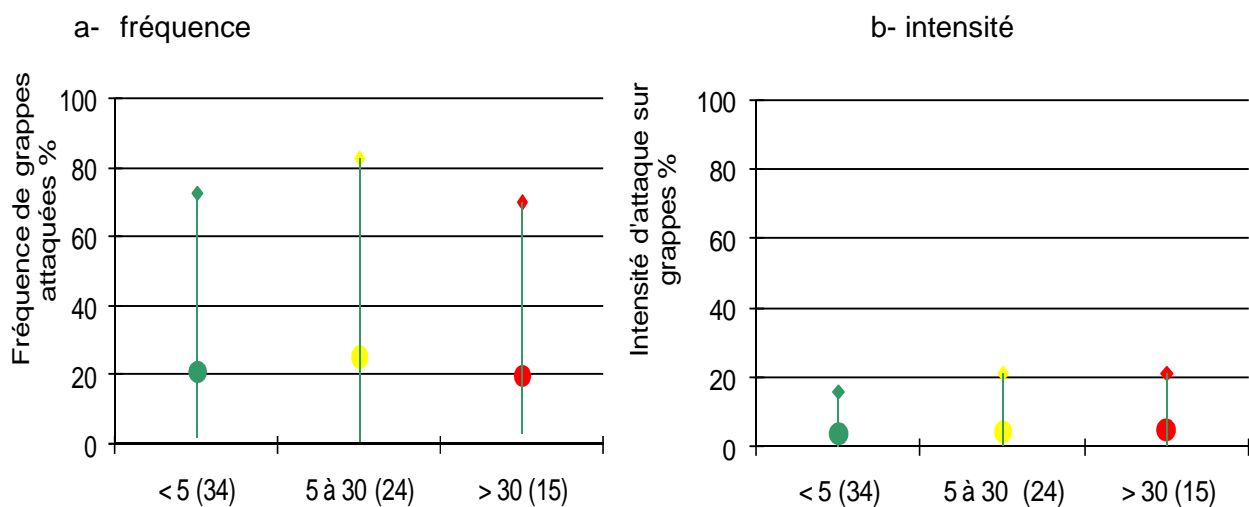
Figure 7 : Répartition des 16 parcelles ayant reçu au moins 5 Switch® consécutifs selon le taux de conidies résistantes observées.
 Distribution of 16 fields that received at least 5 consecutive Switch® according to the rate of resistant conidia observed.



Relation entre la détection de résistances et l'efficacité des produits

L'efficacité du programme de protection peut être évaluée par la fréquence et l'intensité de la pourriture grise à la vendange. En effet, si le programme avait une efficacité réduite, la pression de maladie devrait être supérieure.
 Dans les parcelles ayant reçu le produit Switch® en 2008, la fréquence et l'intensité de *Botrytis* à la vendange ont été comparées selon la sensibilité aux anilinoypyrimidines.

Figure 8 : Répartition de la pression de pourriture grise selon la sensibilité des parcelles en 2008 (fréquence (a) et intensité (b))
Botrytis disease pressure in different anilinoypyrimidines sensitivity situation in 2008 (frequency (a) and bunch surface (b))



On ne constate aucune différence de fréquence, ni d'intensité entre les différentes classes de sensibilité. Ces résultats confirment le maintien de l'efficacité de Switch® dans ces situations à forte proportion d'AniR1.

CONCLUSION

Ce monitoring permet de confirmer que toutes les familles de fongicide ne présentent pas le même risque d'apparition de résistances spécifiques. Les benzimidazoles, anilinopyrimidines, hydroxyanilides et dicarboximides présentent des risques importants alors qu'ils sont très faibles pour les pyridinamines et phénylpyrroles.

Le temps d'apparition des premières souches résistantes est également variable d'une famille à l'autre. La résistance aux dicarboximides est apparue 6 années après la première utilisation. En comparaison, 7 années ont été nécessaires pour développer une résistance aux anilinopyrimidines et 4 années pour les hydroxyanilides. La résistance aux carboxamides a été détectée 2 ans après la première utilisation (Note nationale *Botrytis* 2008).

Dans les situations où la fréquence de souches résistantes est élevée (>30%), l'efficacité des anti-*Botrytis* peut être affectée et ceci a été constaté, par le passé, dans les vignobles français avec les dicarboximides, et les fongicides anti-microtubules (benzimidazoles et phénylcarbammates). Par contre, à ce jour, un tel phénomène n'a pas été rencontré avec des anti-*Botrytis* plus récents (anilinopyrimidines, phénylpyrroles, hydroxyanilides, carboxamides). L'analyse des parcelles protégées avec le produit Switch®, montre l'intérêt de l'association, anilinopyrimidine et phénylpyrrole, qui garde toute son efficacité contre la pourriture grise même en situation de résistance.

Les résultats de ce monitoring justifient les recommandations en matière de stratégie de lutte contre *B. cinerea* sur vigne : 1 application par famille et par an. De plus, pour les familles développant rapidement des souches résistantes, il est nécessaire d'alterner une année sur deux avec une autre famille chimique.

BIBLIOGRAPHIE

- Albert JP, Stéva H., Olivier P., Coulon T., Herlemont B., Laveau E., 2004 - Evolution de la sensibilité aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea* en Gironde de 1999 à 2003. *Phytoma*, 574, 37-40.
- Chapeland F., Fritz R., Lanen C., Gredt M., Leroux P., 1999 – Inheritance and Mechanisms of Resistance to anilinopyrimidines Fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) . *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64, 85-100.
- de Bastard L., Le Coz L., Ricard S., 2005 – Sensibilité aux fongicides, suivi de l'évolution. *Phytoma*, 585, 16.
- Note Nationale *Botrytis* 2009 – INRA, SDQPV, CIVC, IFV, 2008
- Leroux, P., 2004 – Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 12, 195-222
- Leroux P., 2008 – Monitoring INRA, non publié.
- Leroux P., Chapeland F., Arnold A., Gredt M., 1998 – Résistance de *Botrytis Cinerea* aux fongicides, du laboratoire au vignoble et vice versa, *Phytoma*, 504,62-67.
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach C., Gredt M., Chapeland F., 2002 – Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58, 876-888.

RESULTATS DU RESEAU D'ESSAI DE SUIVI DES RESISTANCES DE LA SEPTORIOSE
ET DE L'OÏDIUM AUX FONGICIDES (AFPP)

N LENNE¹, G LE HENAFF², G COULEAUD³, M.DELOS⁴, AS WALKER⁵ et A MICOUD⁶

¹SRAI-DRAAF "Picardie 518 Rue St Fuscien 80 092 AMIENS

²CEMAGREF 3, bis quai Chauveau, CP 220 69336 LYON cedex 09, France

³ARVALIS - Institut du végétal -Station Expérimentale 91720 BOIGNEVILLE

⁴SRAI-DRAAF "Midi-Pyrénées" – Bât. E – Bd Armand Duportal – 31074 TOULOUSE

⁵INRA, UMR 1290 BIOGER - CPP Bât 13 Avenue Lucien Brétignières BP01 78850
Thiverval-Grignon

⁶AFSSA Lyon 31, avenue Tony Garnier 69364 LYON Cedex 07

marc.delos@agriculture.gouv.fr

RESUME

Un réseau de surveillance des pertes d'efficacité des fongicides sur les principales maladies des céréales à pailles a été mis en place en France sous l'égide de l'Association Française de Protection des Plantes en 1997. Ce réseau d'essais de comparaison de spécialités fongicides mono substance active suit l'efficacité de fongicides représentatifs des modes d'action disponibles sur maladies des céréales. 2 séries d'essais permettent de suivre les principales maladies du blé : la septoriose des feuilles due à *Mycosphaerella graminicola* et l'oïdium (*Blumeria graminis*) Les efficacités sont mesurées au champ et une caractérisation de la sensibilité des populations des champignons est réalisée au laboratoire lorsqu'elle est possible. Complémentaire d'autres réseaux, le dispositif AFPP de suivi de l'érosion a permis de constater entre autres la perte d'efficacité des strobilurines sur la septoriose des feuilles. Des informations utiles pour caractériser la perte d'efficacité des strobilurines et une réduction d'efficacité du cyprodinil sur l'oïdium sont aussi à mettre au crédit de ce réseau, résultats cités mais non détaillés dans cette synthèse.

Mots-clés : *Septoria tritici*, *Blumeria graminis*, résistance, fongicides, triazoles, strobilurines

SUMMARY

RESULTS FROM *Septoria tritici* AND *Blumeria graminis* FUNGICIDES RESISTANCE TRIAL NET (AFPP)

A trial net for fungicides efficacy breakdown survey for the main cereals diseases have been launched in France under supervision of the French plant protection association in 1997. This trial net settled on one active ingredient preparations follows up efficacy of some fungicides characterising available modes of action for cereals diseases. Two trials protocols were undertaken on wheat diseases for *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of wheat leaf blotch disease and for powdery mildew (*Blumeria graminis*). Efficacies are established under field observations and a characterisation for sensitivity in laboratory is provided, when a method is available. Additional to other trials net, the AFPP device for follow up fungicides efficacy allowed to characterise fails in strobilurines efficacy on wheat leaf blotch diseases. Useful informations on strobilurines efficacy failure on powdery mildew and decrease for cyprodinil have been also possible through results from this device but not detailed.

Key-words: *Septoria tritici*, *Blumeria graminis*, resistance, fungicides, triazols, strobilurins

INTRODUCTION

La sélection de populations de champignons pathogènes pour les céréales résistantes aux fongicides est intervenue dès les premiers traitements réalisés. Les premiers exemples datent du début des années 70 avec la résistance de l'oïdium (dû à *Blumeria graminis*) aux benzimidazoles, puis suivront la septoriose des feuilles (due à *Mycosphaerella graminis*), le piétin-verse (dû à *Oculimacula spp*). à partir de 1981.

Si la caractérisation des souches résistantes au laboratoire est ancienne, l'organisation de la surveillance de la dérive de l'efficacité au champ (ou érosion) date de 1997 au sein d'un groupe de travail constitué sous l'égide de l'AFPP pour les triazoles et les amides initialement puis les strobilurines dès le début de l'utilisation de cette famille et prévus à terme les carboxamides dès qu'une spécialité « solo » sera autorisée considérant la septoriose.

Pour l'oïdium, ce seront en sus des substances actives spécifiques telles le cyprodinil, le quinoxyfène ou la métrafénone qui successivement feront l'objet d'une prise en compte par le réseau

Cette publication se propose de faire le point sur le travail réalisé depuis l'origine de cette activité au sein du réseau AFPP, une autre publication complémentaire rendant compte du travail réalisé au sein du réseau des DRAF-SRPV devenu depuis DRAAF-SRAI.

L'information est partagée au sein du groupe « Résistances des maladies des céréales aux fongicides » de l'Association Française de Protection des Plantes, qui rassemble des représentants de la recherche, de l'administration, de la profession agricole, des fournisseurs, de l'industrie phytosanitaire et de sociétés de service liées à l'agriculture, en complément du réseau spécifique produit par ce groupe. De fait, seuls les résultats concernant *Septoria tritici* feront l'objet d'une présentation complète. La difficulté de suivre dans le temps l'efficacité sur oïdium, en lien avec les grandes fluctuations de la maladie dans les essais notamment les années pluvieuses, ne permettra qu'une information générique s'appuyant sur les données de la dernière campagne où cette maladie a été suffisamment observée pour faire l'objet de notations en nombre suffisant.

MATERIELS ET METHODES

RESEAU EXPERIMENTAL

Le réseau d'essais de suivi de l'efficacité des fongicides et de la sensibilité de *S. tritici* et de *Blumeria graminis* aux produits utilisés existe depuis 1997 sur la base de 10 à 15 essais réalisés par an. Les lieux d'implantation sont situés majoritairement dans la moitié Nord de la France (au Nord d'une ligne Lyon-Nantes). Une majorité de sites expérimentaux se situe dans le Bassin Parisien (tableau I).

Tableau I : Localisation des essais du réseau de suivi des sensibilités de *S. tritici* aux fongicides.
Locations of the network trials of *S. tritici* sensitivity to fungicides.

| Année | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 |
|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|---|
| Nombre d'essais exploitables | 6 | 5 | 9 | 13 |
| Lieux (départements) | 01-02-27-76-80-91 | 14-21-41-76-91 | 02.1-02.2 14-21-27 28-76- 91.1- 91.2 | 02-18.1-18.2 21.1-21.2 -35 41-56-62-76-80.1- 80.2-91 |
| Année | 2006 | 2007 | 2008 | |
| Nombre d'essais exploitables | 13 | 10 | 15 | |
| Lieux (départements) | 02-18-18-21-21-35-41-56-62-80-80-91 | 51-18-18-80-62-56-80-76-41 | 02-07-18-18-21-21-49-51-56-62-76-80-80-80-91 | |

L'objectif du réseau septoriose est de suivre dans le temps l'efficacité des familles chimiques largement utilisées pour la protection fongicide du blé tendre et présentant des modes d'actions différents : inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols (IDM) pour les triazoles, multisite affectant les processus respiratoires pour le fongicide de contact testé et inhibiteur de la respiration mitochondriale au niveau du complexe III pour la strobilurine (Qol). Les fongicides représentatifs de ces familles et retenus pour cet observatoire sont respectivement le flusilazole (« ancien triazole » utilisé depuis plus de 20 ans), l'époxiconazole (triazole « récent » utilisé depuis 1993), le chlorothalonil et l'azoxystrobine.. A partir de 2006, un autre représentant de la famille des IBS a été testé : le prochloraze, pour évaluer l'effet de contre sélection des populations résistantes aux autres IBS de la famille des triazoles. Enfin l'autorisation du prothioconazole courant 2006 à permis d'introduire ce fongicide en 2007. Un mélange, dit mélange trois voies, a été inclus dans chaque essai. Il s'agissait au départ du mélange époxiconazole + chlorothalonil + azoxystrobine (désigné par ECA) remplacé, à partir de 2007, par le mélange prothioconazole + Chlorothalonil + prochloraze avec l'ajout du prochloraze dès 2006 au mélange (ECAP) et l'abandon de l'azoxystrobine en 2007 suite à la généralisation des phénomènes de résistance de la maladie aux strobilurines. Ce mélange est destiné à procurer une efficacité maximale sur *S. tritici*. Il est réalisé à titre strictement expérimental dans le cadre du réseau AFPP comme référence de stabilité de l'efficacité.

Pour cette expérimentation menée en réseau, le dispositif expérimental retenu est le bloc de Fisher à 4 répétitions avec témoins inclus. Les parcelles reçoivent deux applications de fongicides (tableau II): la première au premier nœud du blé (T1) puis une seconde trois semaines plus tard (T2). Sur le plan efficacité, deux notations de la septoriose sur feuilles sont réalisées après la seconde application : T2 + 21 jours puis T2 + 30-40 jours.

Tableau II : Protocole de traitements fongicides des essais du réseau AFPP.
Fungicides treatment protocol for the AFPP *Septoria tritici* network trials.

| Matières actives | g. m.a. / ha | T1 | T2 |
|--|--------------------|---------------|----------------|
| | | ST.31 - 32 | T1 + 21 à 28 j |
| Témoin non traité | - | - | - |
| époxiconazole | 125 | X | X |
| Prothioconazole en substitution au flusilazole(/2006) | 250 | X | X |
| chlorothalonil | 1100 | X | X |
| Prochloraze en substitution à l'azoxystrobine (/2006) | 450 | X | X |
| prothioconazole + chlorothalonil + prochloraze « PCP ex -ECA » | 125 1100 250 | X | X |

Le réseau concernant l'oïdium est structuré de la même façon avec une application unique au stade 1 nœud et une gamme de fongicides adéquate pour la maladie telle que présentée sur le tableau III. Le mélange 3 voies, référence de stabilité, est composée de métrafénone +quinoxifène et fenpropidine.

Ce réseau est confronté à deux difficultés d'une part, un nombre plus limité d'essais, généralement inférieur à 10 et surtout le caractère fugace de l'oïdium, présent de façon suffisante dans au mieux la moitié des essais au cours des dernières années. Ces deux raisons font qu'il ne sera pas possible de présenter de résultat d'évolution faute d'un nombre d'essais satisfaisant, seule l'indication majeure de ce réseau concernant une des substances, le cyprodinil sera indiquée.

Tableau III : Protocole de traitements fongicides des essais oïdium du réseau AFPP.
Fungicides treatment protocol for the AFPP *Blumeria graminis* network trials

| | Matières actives | Ttmt | |
|---|--|---------------------|-------|
| | | m.a./ha | ST.31 |
| 1 | Témoin non traité | - | |
| 2 | cyproconazole | 80 | x |
| 3 | fenpropidine | 562.5 | x |
| 4 | quinoxifène | 150 | x |
| 5 | cyprodinil | 750 | x |
| 6 | métrafénone | 150 | x |
| 7 | epoxiconazole+kresoxim methyl | 125+125 | x |
| 8 | métrafénone quinoxifène fenpropidine | 150 150 562.5 | x |

TESTS DE RESISTANCES AU LABORATOIRE DE L'INRA DE VERSAILLES

Lors des notations à T2+30-40 jours, des prélèvements de feuilles présentant des symptômes de *S. tritici*, issus de toutes les modalités des essais, sont envoyés au laboratoire de phytopharmacie de l'INRA pour analyses biologiques des populations. Chaque échantillon parcellaire comprend une vingtaine de fragments foliaires porteurs de pycnides. La méthode utilisée consiste à déterminer la sensibilité de pycniospores lors de leur germination sur un milieu nutritif gélosé en présence de doses discriminantes de fongicides. Les tests sont pratiqués vis-à-vis des benzimidazoles, des triazoles et autres IBS, des carboxamides et des strobilurines. La lecture au microscope optique permet de quantifier les proportions de spores sensibles ou résistantes.

RESULTATS

EVOLUTION DES RESISTANCES AUX FONGICIDES TESTES

La résistance aux benzimidazoles, due à une mutation entraînant des niveaux de résistance élevés, est toujours fortement implantée avec une sélection moins forte dans le sud de la France. La généralisation des souches résistantes aux triazoles est observée depuis de nombreuses années (niveaux de résistance généralement faibles à moyens avec, au sein d'une même parcelle, une population de souches de septoriose présentant

une grande diversité de sensibilité aux différents IBS. L'efficacité observée dans la pratique est la conséquence de cette diversité de souches et de la proportion des plus résistantes au fongicide utilisé ainsi que du placement du traitement par rapport aux contaminations les plus significatives. Les souches moyennement sensibles à un fongicide étant généralement mieux contrôlées avec les traitements qui précèdent les phases contaminatrices ou les suivent de peu pour les fongicides les plus curatifs. L'apparition de souches hautement résistantes à tous les IBS à partir de 2008, résultats confirmés en 2009 va cependant modifier le contexte de la lutte. Les résultats de ces monitorings sont fournis dans la communication de Walker et Leroux *et al* (2009) consacrée à la Septoriose du blé et présentée dans ce congrès.

Nous ne reviendrons pas sur la détection de souches résistantes aux strobilurines à partir de 2003 alors que le phénomène était généralisé en Irlande et au Royaume Uni.

CARACTERISTIQUES DES EPIDEMIES DE *SEPTORIA TRITICI* DE 2006 A 2008

Les situations sanitaires antérieures à 2006 ont déjà été décrites dans la communication précédente présentée en 2006 (Le-Hennaf *et al*, 2006).

2006 est une année à pression moyenne à élevée de *Septoria tritici*, généralement plus faible qu'en 2005, mais la nuisibilité a pu être localement plus importante dans les régions septentrionales océaniques, notamment le Nord Pas de Calais, c'est un ensemble de régions dans lesquelles l'essentiel du réseau d'essais a été implanté selon le tableau I.

Si la pression de la maladie est au final raisonnable, avec une apparition tardive sur les feuilles supérieures faisant l'objet des notations, l'existence de symptômes atypiques (taches blanchâtres sans halo jaune avec pycnides) sur plusieurs étages foliaires simultanément ont pu légèrement perturber les notations. Ce phénomène ne devrait pas avoir entraîné de difficultés quant à l'évaluation des performances des fongicides dans le réseau d'essais.

Il en est de même pour 2007 (Délors *et al*, 2008) qui a vu une pression moyenne à assez élevée de septoriose, généralement plus faible qu'en 2006 dans le Nord de la France en raison des attaques inhabituelles de rouille brune qui ont pu détruire prématurément le feuillage notamment les feuilles supérieures, avec une maladie qui a occupé l'espace et perturbé l'installation de *Septoria tritici*. L'explication du phénomène tient à une sécheresse notable durant tout le mois d'avril avec une maladie maintenue uniquement sur les étages foliaires inférieurs, tandis que la rouille brune, moins dépendante de la pluie, progressait sur les deux feuilles supérieures. Dans les parcelles traitées où la rouille a globalement été bien contenue, la surface verte intacte a permis une apparition tardive de *Septoria tritici* en fin de rémanence des triazoles utilisés prioritairement contre la rouille cette année.

La septoriose a donc été tardive en 2007 et c'est donc un complexe rouille + septoriose qui a entraîné un dessèchement prématuré du feuillage.

Ce complexe a rendu difficile le travail des observateurs y compris avertis, avec notamment le développement d'un champignon parasite de la rouille brune (*Sphaerollopsis filum*). L'écart observé entre l'efficacité de l'époxiconazole contrôlant correctement la rouille brune et le chlorothalonil, inefficace sur cette maladie peut avoir été influencé par ce phénomène, comme les performances observées pour les strobilurines anormalement performantes cette année. Etant donné la dynamique très tardive de la septoriose en 2007, les performances du chlorothalonil étaient attendues supérieures à ce qui a été constaté, d'où, le signalement du risque d'un résultat entaché par des erreurs de diagnostic nombreuses.

En 2008, la zone nord France a connu une implantation de la septoriose tardive avec un mois de mars froid qui a suivi un hiver peu favorable, le début mai chaud et sec a bloqué la montée sur les feuilles supérieures (Délors *et al*, 2009). C'est donc une maladie tardive et non explosive qui a caractérisé les résultats 2008 et a permis souvent des stratégies à

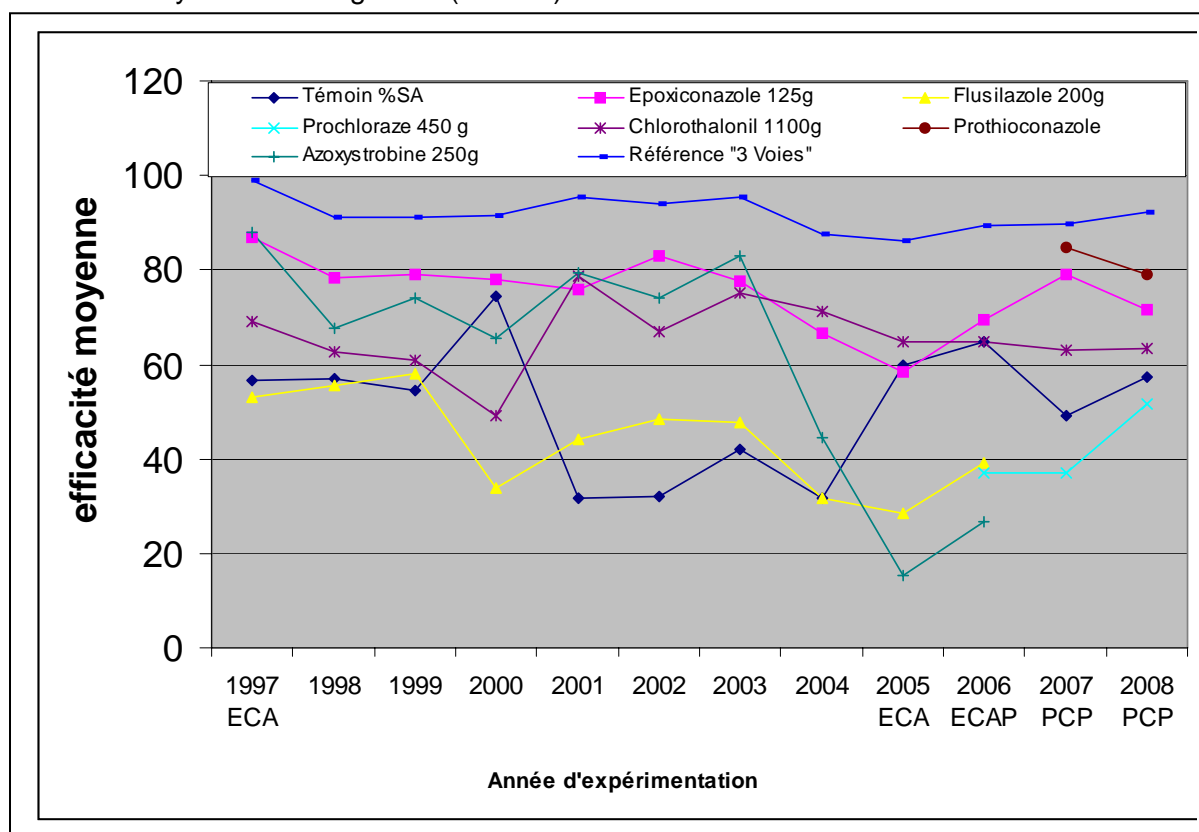
traitement unique avec un optimum au stade dernière feuille étalée, situation particulièrement favorable pour les stratégies à deux applications même si la seconde application a pu être localement curative sur F3.

Au bilan la série des trois dernières années analysées est caractérisée par des épidémies modérées à forte et généralement tardives permettant aux fongicide un positionnement préventif du premier traitement sur une feuille 3 totalement déployée lors de l'application au stade 2 nœuds, et très partiellement curatif lors de la seconde application.

EVOLUTION DE L'EFFICACITE SUR F3 DES FONGICIDES SUR *SEPTORIA TRITICI* DE 1997 A 2008

Depuis la mise en place du réseau AFPP en 1997, l'efficacité des différents fongicides testés est évaluée par rapport aux niveaux d'attaque du feuillage par la septoriose qui sont variables selon le climat de l'année (figure 2). Dans le cas de variations de faible amplitude il s'est agit donc, quand cela a été possible, de faire la part des choses entre les diverses causes de baisse d'efficacité : faible érosion d'efficacité, effet du positionnement ou plus simplement baisse relative d'efficacité due à une pression importante de la maladie.

Figure 1 : Efficacité de différents fongicides vis-à-vis de *S. tritici* sur F3 de 1997 à 2008
S. tritici efficacy towards fungicides (leave 3) between 1997 to 2008



Jusqu'en 2003, le mélange trois voies (ECA) remplit bien son rôle car il procure une efficacité stable de très haut niveau sur *S. tritici*. Puis la résistance aux strobilurines affecte également les performances de cette référence. Sur F3 son efficacité est passée sous la barre des 90 % depuis 2004, l'association du prochloraze et la substitution de l'époxiconazole par le prothioconazole n'améliorent pas ce résultat de façon significative, tout au plus peut-on considérer que l'amélioration observée à partir de 2006 est liée au remplacement de l'azoxystrobine par le prochloraze devenu plus efficace, notamment en

préventif, puis à partir de 2007, la substitution époxiconazole par le prothioconazole (figure 1).

L'efficacité du flusilazole, « ancien » triazole, se situe à plus de 50 % jusqu'en 1999. Elle chute assez logiquement face à la forte pression parasitaire en 2000. De 2001 à 2003, années à septoriose modérée, l'efficacité sur F3 oscille entre 45 et 50 %. Depuis 2004 le flusilazole reste inférieur à 40% d'efficacité. Ces performances limitées expliquent son abandon à partir de 2006.

L'époxiconazole à 125 g/ha, représentant des triazoles les plus efficaces, oscille autour des 80 % d'efficacité de 1997 à 2003. Depuis 2004, l'efficacité enregistrée varie entre 60 et 80%, en forte chute jusqu'en 2005 mais observée à un niveau plus conforme à partir de 2007. Il convient de noter cependant que les épidémies modérées en relatif de 2006 à 2008 et un placement du traitement généralement en préventif sont favorables à ce fongicide et ne permettent pas d'anticiper l'efficacité qui serait observée sur une année difficile telle 2005 ou pire 2000.

Le chlorothalonil, référence multisite utilisée à 1100 g/ha appliquée deux fois, en parallèle à son placement par rapport aux contaminations, plus difficile à caractériser, voit son efficacité généralement liée à la pression exercée par la septoriose : le coefficient de détermination (R^2) qui était de 0,67 entre l'efficacité et la pression parasitaire (% de surface septoriée dans les témoins) pour la période 1997–2005 sur F3 passe à 0,62 en rajoutant les données de 2006 à 2008, permettant de vérifier cette relation.

Ainsi sur F3, si l'efficacité d'une double application de 1100 g/ha de chlorothalonil est proche de 70% au cours des années 2001 à 2004, elle se maintient 60% les années suivantes. Nous avons noté qu'elle est seulement de 50% quand la septoriose occupe 80% de la surface foliaire, une année comme 2000, mais dans ce cas, avec des contaminations précoces massives qui avaient mis en difficulté la spécialité. L'inversion chlorothalonil / époxiconazole notée en 2004 et 2005, n'est pas observée au cours des années qui suivent. Cependant la possibilité de confusion avec les symptômes de rouille brune en 2007 a pu être à l'origine de l'avantage donné à l'époxiconazole, cette année-là, marquée par un retour fugace de cette dernière molécule au niveau moyen de 80%.

Avec l'azoxystrobine, nous avons deux périodes distinctes :

- de 1997 à 2003, l'efficacité moyenne est proche de 75%. Selon les années et le niveau final de septoriose dans les témoins, la double application de 250 g/ha d'azoxystrobine procurait entre 65 et 88% d'efficacité sur la F3.

En 2004 puis en 2005 et 2006, en relation avec la progression importante de la résistance aux strobilurines, les efficacités au champ s'érodent fortement. La perte est de 30 points d'efficacité par an : l'efficacité moyenne descend à 45% en 2004 et elle est seulement de 15% en 2005, efficacité résiduelle confirmée en 2006. 2007 s'avèrera une année difficile pour constater le phénomène en raison de confusions avec les symptômes d'un hyper parasite de la rouille brune. Le réseau de suivi de l'érosion des fongicides des SRAI ex SRPV confirmera le retour à des résultats attendus en 2008 pour la famille désormais très peu efficace sur la maladie.

Il est constaté pour ces molécules une liaison assez forte entre la proportion de souches résistantes quantifiée en fin de campagne et les baisses d'efficacité contrôlées lors des notations (figure 3). Sur 19 sites en 2004 et 2005 du réseau AFPP, il apparaît qu'à partir de 45-50% de souches résistantes Str R, les risques d'inefficacité de l'azoxystrobine ainsi que de l'ensemble des fongicides de la famille sont très importants (Le-Hennaf *et al*, 2006)

Le prochloraze testé depuis 2006 ne présente qu'une efficacité partielle, du fait de son mode d'action essentiellement préventif donc proche du chlorothalonil avec cependant une résistance au lessivage accrue mais surtout à un spectre d'efficacité plus notable sur les populations de souches moyennement résistantes TriR7 et TriR8.

Le prothioconazole testé depuis 2007, s'avère très légèrement plus efficace que l'époxiconazole mais peu différent en moyenne et évoluant dans le même sens.

La description des différentes populations de *Mycosphaerella graminicola*, leur évolution et leur sensibilité aux différentes substances actives est détaillée grâce aux travaux de Leroux et Walker (P Leroux et al, 2007)

POINT SUR L'EFFICACITE DES FONGICIDES EVALUES SUR F2 POUR *Blumeria graminis* EN 2008

2008, comme les années précédentes n'a pas permis d'obtenir une vision exhaustive de l'efficacité comparée des fongicides sur oïdium. Le caractère fugace de la maladie et le nombre plus limité d'essais mis en place ne permet pas de suivre une évolution de cette efficacité et le point qui est donné ici est *a minima*. Au travers des 4 essais suffisamment infestés disponibles pour des observations sur F2 entre 33 et 59 jours, il est possible de confirmer la faible efficacité du cyprodinil à 40% d'efficacité qui constitue un standard pour cette substance active depuis une dizaine d'années avec une efficacité qui s'est dégradée depuis son autorisation où elle était évaluée à plus de 70%.

L'association époxiconazole+kresoxim methyl est comprise entre 55 et 60% en raison de la généralisation des populations d'oïdium résistantes aux strobilurines, contre plus de 90% lors de l'autorisation de la spécialité en 1997, l'efficacité observée reposant désormais sur l'époxiconazole, intrinsèquement moins performant que les triazoles de référence sur cette maladie.

Les autres spécialités sont comprises entre à 68% et 78% pour une référence de stabilité : métrafenone + quinoxifen + fenpropidine évaluée à 91%.

CONCLUSION

L'examen des résultats des dernières campagnes du réseau AFPP illustre les évolutions au champ de l'efficacité des fongicides sur *Septoria tritici*. La période 1997-2003 correspond à une relative stabilité de l'efficacité des fongicides. Par contre, la comparaison des efficacités visuelles finales sur F3 et/ou F2 caractérisant celle de l'ensemble des feuilles protégées sur les dernières campagnes montre au champ la chute d'efficacité de la strobilurine testée (extrapolable à l'ensemble de la famille) génère des interrogations vis à vis des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (principalement des triazoles) avec, dans ce cas, une impossibilité d'une approche générique, comme c'est le cas pour les strobilurines.

Les efficacités de la strobilurine azoxystrobine chutent en 2004 et s'effondrent en 2005 et 2006, parallèlement à la forte progression de la résistance aux Qols au sein des populations de *S. tritici*. L'efficacité de l'époxiconazole, utilisé seul, baisse de 10% par an entre 2003 et 2005. Cette baisse n'est pas observée en 2006 et 2008, avec une incertitude pour l'année 2007 liée à des difficultés de diagnostic généralisées. Cette lente érosion de l'efficacité des triazoles coïncide avec le remplacement de souches faiblement résistantes aux IDM, par des souches moyennement résistantes (Leroux et al, 2006), il est vraisemblable que le phénomène se soit maintenu ensuite mais l'expérimentation de terrain touche ses limites avec l'interaction entre la sensibilité de la population du pathogène et le placement du produit par rapport aux contaminations, les applications curatives étant généralement davantage mises en difficulté par les populations moyennement résistantes. L'effet conjugué de ce phénomène et de la progression de la résistance aux strobilurines explique aussi les baisses d'efficacité récentes du mélange trois voies jusqu'en 2006. En revanche le chlorothalonil, multisite de référence, se maintient à un niveau élevé à plus de 60% pour le contrôle de la septoriose sur la F3.

Face aux importantes évolutions de la résistance de *S. tritici* aux fongicides observées ces dernières années et aux impacts en terme de lutte contre cette maladie, le réseau de suivi initié par l'AFPP en 1997 a permis de mettre en relation l'évolution des efficacités aux champs et celle des souches résistantes au sein des populations. C'est

particulièrement vrai dans le cas de la progression rapide de la résistance monoallélique aux strobilurines (mutation dans le gène du cytochrome b responsable de la substitution G143A) qui possède des niveaux de résistance élevés.

Ce type de relation est plus difficile à caractériser dans le cas de niveaux de résistance intermédiaires comme cela est observé pour les triazoles.

Ce type de réseau ne peut que s'inscrire dans la durée, les fluctuations des performances des triazoles permettent d'illustrer parfaitement cette assertion avec des années plus difficiles à interpréter comme 2007. Le réseau de suivi des phénomènes de résistance au champ de l'AFPP s'avère donc être un outil indispensable pour adapter les autorisations puis les recommandations à chaque famille chimique voire, pour le cas des IBS, à chaque substance active, au vu des évolutions de la sensibilité des populations du pathogène. Ces informations sont absolument capitales pour optimiser l'emploi des fongicides et dans la mesure du possible envisager (ou non) la possibilité d'une réduction de leur utilisation en sympathie avec le Grenelle de l'environnement et en accord avec les recommandations issues du plan Ecophyto 2018. Il s'agit là d'un véritable outil collectif, important pour la profession agricole, mais également pour la société civile afin de maintenir une capacité à produire tout en évitant l'utilisation de certains fongicides devenus peu ou pas utiles sur des usages donnés, du fait de la présence significative de populations des pathogènes devenues résistantes.

Remerciements : Les auteurs tiennent à remercier l'ensemble des participants, notamment les techniciens et ingénieurs qui ont mis en place les essais alimentant le réseau AFPP de suivi de l'érosion des fongicides sur les maladies de plantes : organismes publics, professionnels, sociétés de service, services d'expérimentation des sociétés phytopharmaceutiques. Sans leur participation active, cette synthèse n'aurait pas été possible.

Bibliographie :

Le Hénaff, G., Leroux, P., Delos, M. et Walker, A.S., 2006. Septoriose du blé tendre d'hiver, résultat de l'observatoire des résistances aux fongicides. Phytoma, La Défense des Végétaux 599, décembre 2006 : 15-19

Leroux P. Gredt M., Albertini C. et Walker A.S. 2006 – Résistance de *Septoria tritici*, l'agent de la septoriose du blé, aux fongicides : des gènes aux champs ; AFPP, Annales 8ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes,

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., and Walker, A.S. 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science, 63 : 688-698.

Délos, M., Lenne, N., Faure, A., Durand T., Huguet, B., Pillon, O. et Lepoutre, P., 2009 Céréales à paille Bilan phytosanitaire 2007-2008 –Phytoma, n°622/623, , p.26-28

Délos, M., Lenne, N., Faure, A., Durand T., Huguet, B., Pillon, O. et Lepoutre, P., 2008 Céréales à paille Bilan phytosanitaire 2006-2007 –Phytoma, no616, pp. 8-12

**ETAT DE LA RESISTANCE AUX FONGICIDES AU SEIN DES POPULATIONS
FONGIQUES FRANÇAISES RESPONSABLES DE LA FUSARIOSE DES CEREALES**

P. LEROUX et A.-S. WALKER

INRA, UMR BIOGER-CPP, Avenue Lucien Bretignières, F78850 Thiverval-Grignon
walker@versailles.inra.fr

RESUME

Chez les céréales à paille, diverses espèces fongiques appartenant aux genres *Microdochium* et *Fusarium* sont particulièrement dommageables au niveau des épis, entraînant des baisses de rendement et des altérations qualitatives des grains. L'application de fongicides au moment de la floraison est une pratique courante et implique trois classes principales de fongicides : des antimicrotubules, des inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes (IBS) et des inhibiteurs respiratoires Qols. A partir de souches collectées en 2007 et 2008, il apparaît que la résistance acquise aux antimicrotubules et aux Qols est fortement implantée chez *Microdochium sp.* ; une moindre sensibilité est également observée vis-à-vis de certains IBS. Quant aux *Fusarium sp.* qui sont naturellement tolérants aux Qols, ils demeurent globalement sensibles aux autres classes de fongicides.

Mots-clés : fusariose, céréale, *Microdochium*, *Fusarium*, fongicide, résistance

SUMMARY

STATUS OF RESISTANCE TO FUNGICIDES IN FRENCH FUSARIUM HEAD BLIGHT POPULATIONS

On cereals, several *Microdochium* and *Fusarium* species are responsible for Fusarium Head Blight (FHB) and cause alteration of spikes that lead to yield losses and decreases in grain quality. Fungicide spraying at flowering time is usual and concerns three main classes of inhibitors; antimicrotubules, inhibitors of sterol biosynthesis (SBIs) and respiratory inhibitors (Qols). Using strains collected in 2007 and 2008, we established that resistance towards Qols was generalized in *Microdochium sp.* populations; a lower susceptibility towards some SBIs was also observed. *Fusarium* species are naturally resistant to Qols but stay globally fully susceptible to other fungicide classes.

Keywords: fusarium head blight, cereal, *Microdochium*, *Fusarium*, fungicide, resistance

INTRODUCTION

Sur le blé et l'orge, la fusariose des épis entraîne des baisses de rendement et peut induire des altérations technologiques des grains. De plus, certaines espèces fongiques impliquées produisent des mycotoxines qui présentent des risques toxicologiques pour l'homme et les animaux. Cette maladie est provoquée par un complexe d'espèces appartenant aux genres *Microdochium* et *Fusarium*. Le premier genre est représenté par les espèces *M. majus* et *M. nivale* qui ont été très longtemps considérées comme deux variétés d'une même espèce ; elles ne produisent pas de mycotoxines. Le second genre comporte de nombreuses espèces qui peuvent partiellement être regroupées en fonction de la nature des mycotoxines qu'elles peuvent synthétiser. Ainsi, *F. graminearum* et *F. culmorum* produisent de la zéaralénone et des trichotécènes de type B (ex : deoxynivalnol, nivalnol). D'autres comme *F. sporotrichoides*, *F. poae* et *F. langsethiae* synthétisent des trichothécènes de type A (ex : toxines T2 et HT2). Les espèces apparentées *F. avenaceum* et *F. tricinctum* sont potentiellement productrices de moniliformine. Cette toxine, ainsi que les fumonisines sont synthétisables par les espèces du complexe *F. fujikuroi* (ex *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticilloides*) qui sont fréquentes sur maïs mais rares sur blé et orge. Dans une espèce donnée, il peut y avoir des différences quantitatives et qualitatives de production des mycotoxines (chénotypes). Il convient enfin de noter qu'au sein d'une espèce, ce polymorphisme n'a pas d'impact évident sur l'agressivité des souches (D'Mello *et al.*, 1999; Champeil *et al.*, 2004; Loos *et al.*, 2004; D'Mello *et al.*, 1998).

Ces différents agents de la fusariose des épis des céréales ont des cycles biologiques relativement similaires. Ainsi, au moment de la mise en place de la culture, les plantules sont détruites par de l'inoculum issu des semences ou des résidus de récolte. Par la suite, les pathogènes peuvent se développer sur la base des tiges et des gaines (seul le genre *Microdochium* semble infecter les limbes foliaires). Enfin, au moment de la floraison, les épis sont contaminés par des conidies et/ou des ascospores transportées par le vent ou projetées par les gouttes de pluie (Champeil *et al.*, 2004). De tels événements pluvieux se sont notamment produits en 2007 et 2008 dans de nombreuses régions céréalières françaises, expliquant les forts niveaux d'infestation. Par ailleurs, la recrudescence de *Microdochium sp.* dans des parcelles traitées avec des strobilurines laissent suspecter des problèmes de résistance.

Sur un plan pratique, pour limiter l'impact de ces agents de la fusariose, il convient de choisir des méthodes culturales adaptées (en évitant par exemple un précédent maïs ou le travail minimal du sol), des variétés tolérantes et d'appliquer des fongicides efficaces. Ceux-ci peuvent s'utiliser soit en traitement de semences pour limiter les fontes de semis (certains travaux suggèrent qu'ils pourraient aussi influencer sur les infestations des épis en limitant la migration systémique des champignons (ex : fludioxonil selon Syngenta), soit au moment de la floraison. Pour ce second type d'intervention, outre l'efficacité basée sur les symptômes visuels, il est important d'évaluer l'effet sur les teneurs en mycotoxines des produits récoltés. Ainsi, dans de nombreux essais au champ, il a été montré que les IDMs (fongicides inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols) entraînaient généralement une diminution des teneurs en mycotoxines, alors que les strobilurines avaient un effet inverse (Simpson *et al.*, 2001).

Grace aux fortes infestations observées sur blé et orge dans de nombreuses régions céréalières françaises en 2007 et 2008, il a été possible de constituer une collection importante de souches fongiques impliquées dans le complexe fusarié. Des essais ont été conduits en laboratoire pour évaluer leur sensibilité vis-à-vis des principaux fongicides utilisés sur semence ou en cours de végétation.

MATERIEL ET METHODE

Souches fongiques

La plupart des isolats de *Fusarium* et *Microdochium* sont issus de grains de blé ou d'orge infectés collectés en France par le Service Régional de la Protection des Végétaux de Nancy et par Arvalis. Les souches isolées dans notre laboratoire proviennent de la base de tiges de blé. Elles ont été identifiées par divers critères phénotypiques (loos *et al.*, 2004) ou moléculaires dans le cas de *Microdochium* (Walker *et al.*, 2009).

Essais fongicides

Toutes les substances actives sous forme de produits techniques sont dissoutes dans de l'éthanol puis ajoutée à un milieu gélosé après autoclavage. La concentration finale en alcool est de 0.5 mL^{-1} et pour chaque fongicide, 5 à 8 concentrations ont été testées. Le milieu de culture comporte du glucose, des sels minéraux (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 et NaNO_3), de l'extrait de levure et de l'agar agar et est réparti dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Un implant mycélien est déposé au centre de chaque boîte et les diamètres des plages mycéliennes sont mesurés chaque jour pendant une semaine d'incubation à 19°C et à l'obscurité. A partir de ces observations, pour chaque fongicide, la concentration inhibant de 50% (CI_{50}) la vitesse de croissance mycélienne est calculée. Le niveau de résistance est ensuite évalué en faisant le rapport EC_{50} souche résistante / EC_{50} souche sensible.

Analyses moléculaires

L'ADN des différentes souches est extrait avec le kit Qiagen Plant MiniKit. Le gène codant pour le cytochrome b chez *Microdochium sp.* a été amplifié en élaborant des amorces dégénérées basées sur les séquences de différentes espèces de *Fusarium*, mises en banques et annotées après séquençage complet des génomes de ces espèces. Une partie du gène *cytb* a finalement été amplifié par PCR pour des souches représentatives de nos différents phénotypes, après élaboration d'amorces spécifiques aux 2 espèces de *Microdochium*. Le fragment comprend les positions d'acides aminés 129, 137 et 143, connues dans la littérature pour avoir un lien avec la résistance aux Qols chez divers champignons phytopathogènes. Enfin, un test CAPS (Cleavable Amplified Polymorphism Sequence) a été mis en place pour tester en routine la présence de la substitution G143A : ce test nécessite l'amplification par PCR d'un fragment du gène *cytb* comprenant la position 143 puis la digestion de ce fragment par l'enzyme de restriction *SaI* qui reconnaît spécifiquement le site nucléotidique généré lors de la substitution de la glycine (G) en Alanine (A) (2 fragments de PCR au lieu d'un lorsque la mutation est présente. Le détail des protocoles a été décrit précédemment (Walker *et al.*, 2009).

RESULTATS ET DISCUSSION

Fongicides antimicrotubules

Dans le domaine agricole, les antimicrotubules efficaces contre des Ascomycètes ou des Adelomycètes sont des benzimidazoles (bénomyl, carbendazime, fubendazole, thiabendazole), des thiophanates (ex : thiophante-méthyl) et des phénylcarbammates (ex : diéthofencarbe). A noter que le benomyl et le thiophanate-méthyl sont des précurseurs du carbendazime. L'action primaire se situe au niveau des microtubules qui sont des constituants majeurs du cytosquelette et du fuseau achromatique. En fait, ces molécules se fixent sur la β -tubuline, un des composants protéique des microtubules. Ces fongicides vont entraîner un arrêt de l'élongation des filaments germinatifs et des hyphes mycéliens et induire d'importantes déformations. A fortes concentrations, certaines de ces substances actives affectent les processus respiratoires et provoquent l'inhibition de la germination des spores. Pour le thiophanate-méthyl, la réduction des teneurs en mycotoxines observées en pratique pourraient résulter de cet effet sur la respiration (Buschhaus and Ellner, 2007; Buschhaus and Ellner, 2008).

Les essais conduits sur *Microdochium* indiquent que le carbendazime comme le thiabendazole entraînent une forte inhibition de la croissance mycélienne avec des CI₅₀ inférieures à 0,1 mg/l. Les deux espèces ont un comportement similaire vis-à-vis du carbendazime alors que *M. nivale* est un peu moins inhibé que *M. majus* par le thiabendazole (tableau I). Toutefois, la réponse *in-vitro* des souches de *Microdochium* sensibles à ces deux fongicides est similaire à celle observée pour d'autres pathogènes comme *Oculimacula* sp. (piétin-verse) et *Mycosphaerella graminicola* (septoriose du blé). A côté de ces souches sensibles aux benzimidazoles, il a été possible de caractériser plusieurs phénotypes résistants. Le plus fréquemment rencontré tant en 2007-2008 qu'il y a une vingtaine d'années présentent une très forte résistance (BenR1) au carbendazime, au thiabendazole et également au thiophanate-méthyl (tableau II ; (Leroux and Gredt, 1988)). Ce phénomène, associé avec une sensibilité accrue aux phénylcarbamates (ex : diéthofencarbe) est probablement déterminé par une mutation en position 198 du gène codant pour la β -tubuline. A noter que chez *Oculimacula* sp. et *M. graminicola* le changement dominant est E198A. Actuellement, en France, ces souches sont généralisées chez *Oculimacula* sp., *M. graminicola* et *M. majus*, malgré un usage très limité des benzimidazoles depuis près de deux décennies ; ceci suggère qu'elles possèdent une excellente fitness (capacité de survie). Dans un contexte similaire, *M. nivale* se singularise par une fréquence limitée de ce phénotype fortement résistant aux benzimidazoles et sensible aux phénylcarbamates. En effet, sur l'ensemble des échantillons analysés en 2007 et en 2008, les fréquences respectives de résistances étaient respectivement de 92% et 24% chez *M. majus* et *M. nivale* (tableau III). Par ailleurs, chez *M. majus* et *M. nivale*, quelques souches faiblement résistantes et moyennement résistantes aux benzimidazoles et insensibles aux phénylcarbamates ont été détectées au champ (tableau II).

Les essais conduits en laboratoire indiquent que globalement les espèces du genre *Fusarium* sont naturellement plus tolérantes aux benzimidazoles (tableau I). Ainsi, vis-à-vis du carbendazime, les CI₅₀ (pour des souches sensibles) de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. langsethiae* et *F. poae* sont deux à trois fois supérieures à celles enregistrées pour *Microdochium* sp. ; ce facteur est de 40 pour *F. avenaceum* et *F. tricinctum*. Cette différence entre ces deux genres pourrait résulter du fait que *Microdochium* spp., comme beaucoup de champignons phytopathogènes, possède un seul type de β -tubuline alors que les espèces du genre *Fusarium* en possèdent deux (*tub1*, *tub2*). Concernant la résistance aux benzimidazoles et aux thiophanates, elle est très peu présente dans les populations de *Fusarium* spp. collectées en France en 2007 et 2008 ; ce phénomène concerne essentiellement *F. avenaceum* (tableau II). Par ailleurs, toutes les souches de *Fusarium* spp. résistantes à cette classe d'antimicrotubules sont sensibles aux phénylcarbamates. En Chine, où les benzimidazoles (et particulièrement le carbendazime) sont couramment utilisés sur blé contre *F. graminearum*, des baisses d'efficacité ont été constatées à la fin des années 1990 suite à la sélection de souches résistantes. En général, leurs fréquences ne dépassaient pas 25% et un arrêt des traitements entraînait leur regression, suggérant une moindre fitness. Les analyses moléculaires indiquent que ces mutants résistants possédaient généralement le changement F167Y au niveau de la β -tubuline 2 ; les substitutions E198Q et F200Y sont plus rarement observées. Enfin, l'acquisition de la résistance ne semble pas affecter l'agressivité de *F. graminearum* mais elle augmenterait par contre la capacité de production de trichotécènes (Yin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

Qols

Les strobilurines (ex : azoxystrobine, krésoxim-méthyl, pyraclostrobine, picoxystrobine, trifloxystrobine, fluoxastrobine, dimoxystrobine) constituent la principale classe de Qols dont la cible est le cytochrome b, un des composants du complexe mitochondrial III. Ces strobilurines sont particulièrement actives *in-vitro* sur *M. majus* et *M. nivale*, avec des CI₅₀ inférieures à 0,01 mg/l. A l'inverse, les espèces du genre *Fusarium* sont peu sensibles à ces Qols avec souvent une croissance importante même à 5 mg/l (tableau I). L'adjonction de SHAM, un inhibiteur d'une voie alternative de la respiration (alternative oxydase ou AOX)

provoque une augmentation significative de la fongitoxicité des strobilurines chez *Fusarium sp.* mais pas chez *Microdochium sp.* En outre, des mycelia de *M. nivale* et *F. graminearum* traités par l'azoxystrobine présentent des cinétiques et niveaux de transcription de l'AOX très différents : respectivement lent-faible et rapide-fort (Kaneko and Ishii, 2009). Ces résultats suggèrent que la faible efficacité des strobilurines vis-à-vis des *Fusarium* est liée au fonctionnement de la voie alternative de la respiration AOX.

Chez *Microdochium sp.*, nous avons pu caractériser (à côté des souches sensibles) des souches faiblement (Str r) et fortement résistantes (Str R) aux strobilurines (tableau IV). Chez la plupart des souches Str R, le cytochrome b porte le changement G143A qui correspond au mécanisme majeur de résistance spécifique aux Qols observés chez de nombreux champignons phytopathogènes. Dans notre étude, cette mutation a été détectée soit par séquençage direct, soit en utilisant le test CAPS (figure 1). Pour l'ensemble des souches collectées en 2007 et 2008, il apparaît que cette forte résistance concerne surtout *M. majus* (tableau III). Cette tendance également observée pour les antimicrotubules suggère qu'au champ la pression sélective des fongicides est différente pour les deux espèces de *Microdochium*, et/ou que leur biologie est différente. Concernant les souches faiblement résistantes, la synergie au SHAM constitue une preuve directe d'une production accrue de l'AOX (Walker *et al.*, 2009).

Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols

Deux types de fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS) sont utilisables sur céréales. Les plus nombreux, qui bloquent la 14 α -déméthylation des stérols incluent des triazoles (ex : bitertanol, metconazole, tébuconazole), un imidazole, le prochloraze et une triazolinethione, le prothioconazole. L'autre classe d'IBS qui affecte la Δ 14-réduction et/ou la Δ 8 \rightarrow Δ 7 isomérisation des stérols est constituée d'« amines » cycliques (ex : fenpropimorphe, fenpropidine, tridémorphe) ou non (ex : spiroxamine).

Au laboratoire, parmi les IDM, certains comme le bitertanol, le prothioconazole ou le prochloraze présentent une fongitoxicité équivalente sur les espèces des genres *Fusarium* et *Microdochium*. Par contre, le metconazole et le tébuconazole, largement utilisés au champ pour lutter contre la fusariose des épis, sont plus actifs sur *Fusarium spp.* que sur *Microdochium spp.* (tableau I). Par ailleurs, ces investigations conduites sur la croissance mycélienne en milieu gélosé indiquent que le prothioconazole est le moins fongitoxique alors qu'en pratique, c'est l'IDM le plus efficace sur l'ensemble des espèces fongiques responsables de la fusariose des épis (Maufras and Maumené, 2008). L'ensemble des souches de *Fusarium* collectées en 2007 et 2008 ne présentent pas de variabilité de sensibilité aux IDMs expérimentés et les valeurs de CI₅₀ sont similaires à celles observées sur des isolats collectés il y a une vingtaine d'années. Ces observations divergent de celles rapportées récemment en Allemagne et en Chine. En effet, dans le premier cas, des auteurs indiquent une légère dérive de sensibilité aux IDMs entre 1987 et 1999 chez *F. graminearum* mais le faible nombre de souches testées et les modalités expérimentales retenues ne permettent pas de l'affirmer avec certitude (Klix *et al.*, 2007). Les travaux conduits sur des populations chinoises de *F. asiaticum* et *F. graminearum* jamais traitées avec des IDMs indiquent la présence de quelques souches fortement résistantes (environ 2%) ; ce phénomène ne résulterait pas de changements qualitatifs de la cible de cette classe d'IBS (Yin *et al.*, 2009). Concernant *Microdochium*, une plus grande variabilité de réponse aux IDMs est observée entre souches comparativement à *Fusarium*. Ce phénomène particulièrement marqué avec le bitertanol fait apparaître une différence entre *M. majus* et *M. nivale* avec respectivement un gradient de variation et deux groupes de sensibilité différents (figure 2). A ce jour, nous ne connaissons pas les mécanismes de cette sensibilité réduite aux IDMs chez *Microdochium*, ni l'impact en pratique de ce phénomène.

Les IBS de la classe des amines sont principalement connus pour leur activité anti-oïdium. Toutefois, deux d'entre eux présentent une forte fongitoxicité *in-vitro* vis-à-vis de *Microdochium*. Il s'agit du tridémorphe et du fenpropimorphe. Cette seconde morpholine apparaît plus active sur *M. majus* que sur *M. nivale*. Par contre, les diverses espèces de *Fusarium* sont peu sensibles à l'ensemble des amines.

Autres fongicides

Le fludioxonil est utilisé en traitement de semences et sa fongitoxicité résulte d'une interaction avec une ou des protéines kinases impliquées dans l'osmorégulation. Ce phénylpyrrole a probablement le même mode d'action que les dicarboximides (ex : iprodione). Le fludioxonil présente une activité équivalente sur toutes les espèces de *Microdochium* et *Fusarium*. Par contre, l'iprodione est beaucoup moins fongitoxique et cette dicarboximide permet de classer les espèces fongiques en trois classes : (1) *M. majus* et *M. nivale* (2) *F. avenaceum* et *F. tricinctum* et (3) *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. langsethiae*, *F. poae*. Chez *M. majus* et *F. graminearum*, quelques souches résistantes au fludioxonil et à l'iprodione ont été détectées. De tels mutants sont directement induits au laboratoire (Leroux *et al.*, 1992) et leur faible fréquence au champ (2% pour les deux espèces fongiques citées précédemment) suggère une fitness réduite qui pourrait résulter d'une sensibilité accrue aux pressions osmotiques.

Le boscalid et plus généralement les carboxamides inhibitrices du complexe mitochondrial II sont peu fongitoxiques pour *Microdochium* et *Fusarium*. Toutefois, comme avec l'iprodione, une plus forte fongitoxicité est observée chez *M. majus*, *M. nivale*, *F. avenaceum* et *F. tricinctum*.

CONCLUSION

Plusieurs espèces appartenant aux genres *Microdochium* et *Fusarium* sont responsables de la fusariose des épis sur blé et orge. L'application de fongicides au moment de la floraison de ces céréales est une pratique courante en France. Trois classes principales de modes d'action sont utilisables. Il s'agit (1) d'antimicrotubules (benzimidazoles et thiophanates), (2) d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, principalement des IDMs et (3) des inhibiteurs respiratoires Qo1s (strobilurines). Des traitements de semences à base d'IDMs mais aussi de fongicides multisites (ex : manèbe) ou de phénylpyrroles affectent l'osmorégulation (ex : fludioxonil). Des molécules comme le fludioxonil et quelques IDMs dont le prochloraze et le prothioconazole présentent des fongitoxicités équivalentes sur tous les agents de la fusariose. Pour d'autres, l'activité est meilleure soit sur *Fusarium* (ex : metconazole, tébuconazole), soit sur *Microdochium* (ex : benzimidazoles et thiophanates, strobilurines, fenpropimorphe). De plus, il s'avère que les phénomènes de résistance acquise affectent particulièrement *M. majus*. Dans ces conditions, une lutte efficace contre les fusarioses des épis implique l'application au moment de la floraison soit d'une seule molécule efficace contre toutes les souches fongiques actuelles (ex : prothioconazole), soit d'une combinaison de matières actives complémentaires (ex : IDM à triazole, prochloraze, thiophanate méthyl, fenpropimorphe). Il convient de signaler que plusieurs substances actives ayant de fortes potentialités vis-à-vis de *Microdochium* peuvent induire une synthèse accrue de mycotoxines fongiques (Maufras and Maumené, 2008)(Maumené, non publié).

REMERCIEMENTS

Nous remercions Arvalis-Institut du Végétal, le service régional de la protection des végétaux de Nancy, la société Qualtech et l'université de Brest pour la collecte et l'isolement des souches de *Fusarium* et *Microdochium*.

BIBLIOGRAPHIE

Buschhaus, H. & Ellner, F. (2007). Impact of DONstopp (Thiophanate-Methyl 700 WDG) on mycotoxin production *in-vitro* et *in-vivo*. In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V* (Eds H. W. Dehne, H. Deising, U. Gisi, K. Kuck, P. Russell and E. Lyr). Friedrichroda, Germany.

Buschhaus, H. & Ellner, F. (2008). Impact of DONstopp (Thiophanate-Methyl 700 WDG) on mycotoxin production *in-vitro* et *in-vivo*. In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*

(Eds H. W. Dehne, H. Deising, U. Gisi, K. Kuck, P. Russell and E. Lyr). Friedrichroda, Germany.

Champeil, A., Dore, T. & Fourbet, J. F. (2004). Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant Science* 166(6): 1389-1415.

Chen, Y., Wang, J. X., Zhou, M. G., Chen, C. J. & Yuan, S. K. (2007). Vegetative compatibility of Fusarium graminearum isolates and genetic study on their carbendazim-resistance recombination in China. *Phytopathology* 97(12): 1584-1589.

D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijkema, W. T. P., Dujardin, A. & Placinta, C. M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology* 104(8): 741-751.

D'Mello, J. P. F., Placinta, C. M. & Macdonald, A. M. C. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80(3-4): 183-205.

Loos, 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* 158(3): 351-362.

Kaneko, I. & Ishii, H. (2009). Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*. *Journal of Genetic Plant Pathology*.

Klix, M. B., Verreet, J. A. & Beyer, M. (2007). Comparison of the declining triazole sensitivity of Gibberella zeae and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection* 26(4): 683-690.

Leroux, P. & Gredt, M. (1988). Activité *in-vitro* de fongicides antimitotiques et d'inhibiteurs de la biosynthèse des stéroïdes sur diverses espèces de *Fusarium*. *Annales AFPP - Second International Conference on Plant Diseases II*: 1303-1312.

Leroux, P., Lanen, C. & Fritz, R. (1992). Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against Botrytis cinerea and Fusarium nivale. *Pesticide Science* 36(3): 255-261.

Maufras, J. & Maumené, C. (2008). La floraison sous protection rapprochée. *Perspectives Agricoles* (351): 23-29.

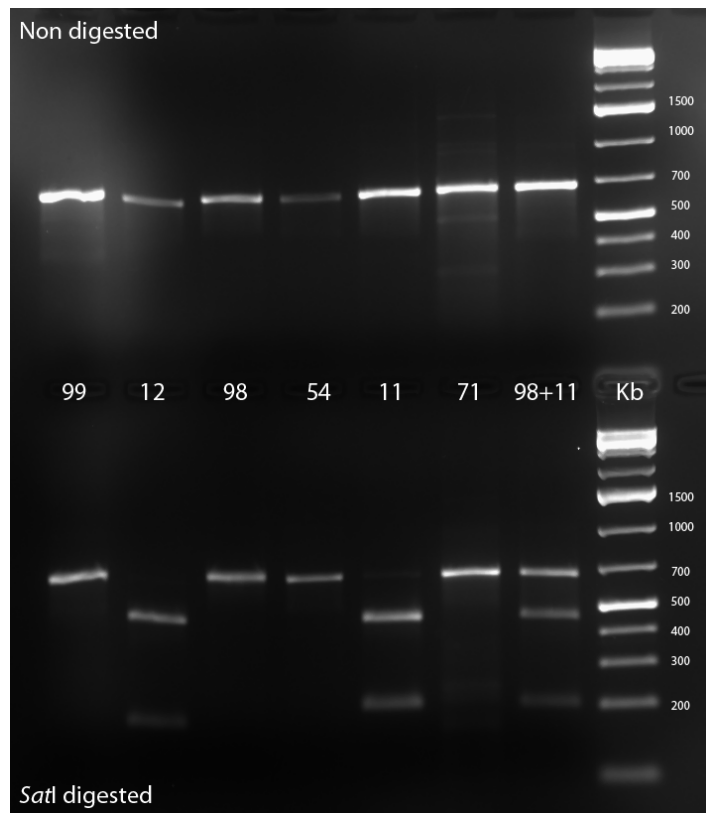
Simpson, D. R., Weston, G. E., Turner, J. A., Jennings, P. & Nicholson, P. (2001). Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* 107(4): 421-431.

Walker, A. S., Auclair, C., Gredt, M. & Leroux, P. (2009). First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. *Pest Management Science* 65(8): 906-915.

Yin, Y., Liu, X., Li, B. & Ma, Z. (2009). Characterization of Sterol Demethylation Inhibitor-Resistant Isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* Collected from Wheat in China. *Phytopathology* 99(5): 487-497.

Zhang, Y. J., Yu, J. J., Zhang, Y. N., Zhang, X., Cheng, C. J., Wang, J. X., Hollomon, D. W., Fan, P. S. & Zhou, M. G. (2009). Effect of Carbendazim Resistance on Trichothecene Production and Aggressiveness of Fusarium graminearum. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(9): 1143-1150.

Figure 1 : Exemple de test CAPS permettant la détection de la substitution G143A sur le cytochrome b d'isolats de *M. majus* et *M. nivale*
 Figure 1: Example of CAPS test results, helping to detect the G143A change within cytochrome b of *M. majus* and *M. nivale*



La première ligne du gel montre le résultat de l'amplification par PCR d'un fragment du gène codant pour le cytochrome b, utilisant des amorces spécifiques de *Microdochium*.

La deuxième ligne montre la digestion de ce fragment de PCR par une enzyme de restriction qui reconnaît spécifiquement le site créé par la mutation liée à la résistance et coupe le fragment en ce point.

99-12 : *M. nivale*, Str S et Str R respectivement
 98-54-11-71 : *M. majus*, Str S, Str r, Str R et Str R respectivement.
 98+11 : mélange des 2 ADN

Figure 2: Variabilité de la sensibilité au bitertanol et au tébuconazole chez des isolates de *Microdochium* collectés au champ en 2007 et 2008
 Figure 2: Variability of sensitivity towards bitertanol and tebuconazole within French populations of *Microdochium* collected in 2007 and 2008

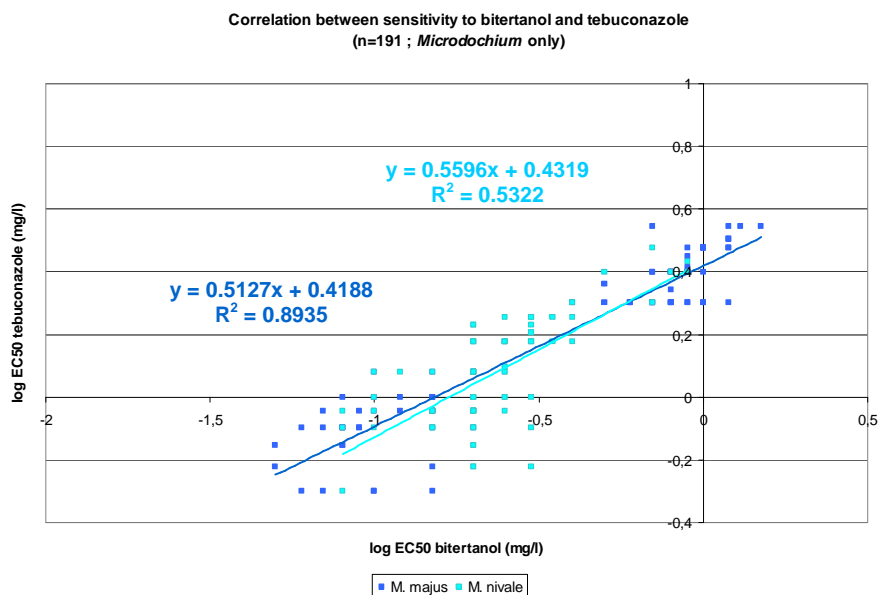


Tableau I: Effet de divers fongicides sur la croissance mycélienne de souches sensibles de *Microdochium spp.* et *Fusarium spp.* (EC₅₀ mg/l)

Table I: Effect of various fungicides on the mycelial growth of wild-type strains of *Microdochium spp.* and *Fusarium spp.* (EC₅₀ mg/l)

| Fongicide | <i>Microdochium</i> | | | | <i>Fusarium</i> | | | |
|-----------------|---------------------|--------------|--------------------|-----------------|--------------------|-------------|------------------|-------------------|
| | <i>nivale</i> | <i>majus</i> | <i>graminearum</i> | <i>culmorum</i> | <i>langsethiae</i> | <i>poae</i> | <i>avenaceum</i> | <i>tricinctum</i> |
| Carbendazime | 0,02 | 0,02 | 0,25 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,8 | 0,8 |
| Thiabendazole | 0,05 | 0,03 | 0,25 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 1,2 | 1,2 |
| Bitertanol | 0,10 | 0,10 | 0,40 | 0,20 | 0,15 | 0,10 | 0,35 | 0,45 |
| Metconazole | 0,50 | 0,50 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,02 |
| Tébuconazole | 0,80 | 0,80 | 0,10 | 0,05 | 0,08 | 0,10 | 0,15 | 0,10? |
| Prochloraze | 0,02 | 0,02 | 0,015 | 0,015 | 0,002 | 0,005 | 0,015 | 0,005 |
| Prothioconazole | 0,50 | 0,30 | 0,50 | 0,40 | 0,40 | 0,45 | 0,75 | 0,45 |
| Fenpropidine | 2,5 | 4,0 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 |
| Fenpropimorphe | 0,04 | 0,015 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 |
| Spiroxamine | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 |
| Tridémorphe | <0,02 | <0,02 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 | >5 |
| Azoxystrobine | 0,005 | 0,005 | >5 | >5 | 0,3->5 | >5 | 1->5 | >5 |
| Dimoxystrobine | 0,004 | 0,004 | 1,5->2,5 | >2,5 | 0,03->2,5 | >2,5 | 0,2->2,5 | 0,05->2,5 |
| Fludioxonil | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Iprodione | 3,0 | 3,0 | >10 | >10 | >10 | >10 | 6,0 | 6,0 |
| Boscalid | 1,5 | 3,5 | >10 | >10 | >10 | >10 | 1,5 | 1,5 |

Tableau II : Résistance aux fongicides anti-microtubules chez des populations françaises de *Microdochium spp.* et *F. avenaceum*

Table II: Resistance to antimicrotubules fungicides in French populations of *Microdochium spp.* and *F. avenaceum*

| Fongicides | CI ₅₀ mycélium en mg/l | | | | | | |
|--|-----------------------------------|--------|--------|--|-------|---------------------|-------|
| | <i>Microdochium</i> | | | <i>F. graminearum</i> et <i>F. culmorum</i> | | <i>F. avenaceum</i> | |
| | Ben S | Ben R1 | Ben R2 | Ben S | Ben R | Ben S | Ben R |
| Carbendazime | 0.02 | >10 | 0.2 | 0.3 | 1.0 | 0.8 | 3.0 |
| Thiabendazole | 0.04 | >5.0 | 1.0 | 0.3 | 1.0 | 1.2 | >10 |
| Diéthofencarbe | >10 | <1 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| % phénotypes dans les populations 2007-2008 | 28 | 70 | 2 | 97 | 3 | 84 | 16 |

NB : absence de résistance aux benzimidazoles chez *F. langsethiae*, *F. poae* et *F. tricinctum*.

Tableau III : Distribution des souches fortement résistantes aux benzimidazoles (Ben R1) et aux strobilurines (Str R) dans les populations françaises et anglaises de *Microdochium spp.*
 Table III: Distribution of strains highly resistant to benzimidazoles (Ben R1) and strobilurins (Str R) in French and English populations of *Microdochium spp.*

| Année | Espèce | % Ben R1 | % Str R |
|-------|------------------|----------|---------|
| 2007 | <i>M. nivale</i> | 20 | 18 |
| | <i>M. majus</i> | 90 | 91 |
| 2008 | <i>M. nivale</i> | 29 | 53 |
| | <i>M. majus</i> | 94 | 97 |

Tableau IV : Résistance aux fongicides Qols chez *Microdochium spp.*
 Table IV: Resistance to QoI fungicides in *Microdochium spp.*

| Fongicides | CI ₅₀ mycélium en mg/l | | |
|------------------|-----------------------------------|-------|-------|
| | Str S | Str r | Str R |
| Azoxystrobine | 0.005 | 0.12 | 2.9 |
| Trifloxystrobine | 0.004 | 0.03 | 2.6 |
| Krésoxim-méthyl | <0.003 | 0.04 | >5.0 |
| Picoxystrobine | 0.004 | 0.05 | 4.2 |
| Dimoxystrobine | 0.004 | NT | >2.5 |
| Famoxadone | 0.21 | 0.23 | >10 |

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**LES FUNGICIDES AFFECTANT LES PROCESSUS RESPIRATOIRES : MODES
D'ACTION ET PHENOMENES DE RESISTANCE**

P. LEROUX et A.-S. WALKER

INRA, UMR 1290 BIOGER-CPP, Bât 13, Avenue Lucien Brétignières, BP01, 78850
Thiverval-Grignon, France, walker@versailles.inra.fr

RÉSUMÉ

Les fongicides agricoles affectant les processus respiratoires occupent actuellement une place prépondérante dans le cadre de la lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes cultivées. Parmi les plus anciens, on y rencontre des produits minéraux et des molécules organiques de synthèse « multisites » qui n'ont jamais été confrontés à la résistance. Quant aux deux classes d'unisites qui affectent spécifiquement les complexes mitochondriaux II (SDHIs) ou III (Qols et Qils), leur utilisation peut entraîner la sélection de souches fongiques résistantes. Les modes d'action de ces inhibiteurs spécifiques, ainsi que les mécanismes moléculaires de résistance seront précisés.

Mots clés : fongicides, respiration mitochondrie, SDHI, Qol, Qil, carboxamide, strobilurine, résistance

SUMMARY

**FUNGICIDES AFFECTING RESPIRATION: MODES OF ACTION AND RESISTANCE
PEHNOMENA**

Respiratory inhibitors are widely used in agriculture for the chemical control of many phytopathogenic fungi. Among the old fungicides, the multisite toxicants such as copper, sulphur or dithiocarbamates have never been concerned to acquired resistance. On the other hand, the unisite molecules affecting either the mitochondria complexes II (SDHIs) or III (Qols and Qils) can be affected by this phenomenon. The modes of action of these respiratory inhibitors and the molecular mechanisms of resistance will be presented.

Key-words: fungicides, respiration, mitochondria, SDHI, Qol, Qil, carboxamide, strobilurin, resistance

1. INTRODUCTION

Au sein des cellules fongiques (et plus généralement chez celles des eucaryotes), les processus respiratoires, correspondant au catabolisme oxydatif de molécules organiques comme les lipides ou les glucides, génèrent de l'énergie sous forme d'ATP (Adenosine TriPhosphate). Les phases terminales s'opèrent au niveau des mitochondries via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire. Le cycle de Krebs, qui se réalise au sein de la matrice mitochondriale, comporte huit étapes enzymatiques dont trois d'entre elles génèrent du NADH (forme réduite du NAD ou NicotinAmide Dinucléotide). Ce cofacteur, comme le succinate, un des intermédiaires du cycle de Krebs, vont ensuite être oxydés par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire. Celle-ci comporte une série de transporteurs d'électrons susceptibles d'être sous forme oxydée ou réduite. Certains comme le coenzyme Q (dont les formes oxydées et réduites sont respectivement l'ubiquinone ou UQ et l'ubiquinol ou UQH₂) ou le cytochrome c sont relativement mobiles, alors que d'autres sont inclus dans des complexes protéiques insérés dans la membrane mitochondriale interne. Les quatre associations fonctionnelles composant cette chaîne respiratoire sont le NADH-ubiquinone réductase (complexe I), la succinate ubiquinone réductase ou succinate deshydrogénase (complexe II), l'ubiquinol-cytochrome c réductase (complexe III ou bc1) et le cytochrome oxydase (complexe IV). Enfin, un dernier complexe protéique membranaire correspond à l'ATP synthase (complexe V) qui fonctionne grâce à la translocation transmembranaire des protons induits par les complexes I, II et III (figure 1).

De nombreux fongicides agricoles affectent ces processus respiratoires et entraînent donc une carence énergétique de cellules fongiques et en particulier des spores. Par voie de conséquence, ils présenteront tous une activité préventive liée notamment à l'inhibition de la germination des spores de champignons ou l'immobilisation des zoospores des Oomycètes. Les plus anciennement utilisés sont des multisites ou des multicibles qui interagissent avec plusieurs enzymes et coenzymes respiratoires, ainsi que quelques fongicides qui interfèrent avec la formation ou le transport de l'ATP (figure 1). A l'inverse, d'autres substances actives, mises au point plus récemment ont des effets spécifiques au niveau des complexes mitochondriaux II et III.

L'objectif de cet article est de présenter les principales caractéristiques des fongicides agricoles affectant les processus respiratoires et il complète un article plus général sur les inhibiteurs respiratoires à usage agricole que nous avons publiés à la fin des années 1990 (Leroux and Delorme 1997). Nous nous focaliserons particulièrement sur les fongicides unisites inhibiteurs des complexes mitochondriaux II et III qui d'une part comportent des matières actives récentes ou en cours de développement et d'autre part sont concernées par les phénomènes de résistance.

2. PRODUITS MULTISITES ET FONGICIDES AFFECTANT LA BIODISPONIBILITE DE L'ATP

2.1 Fongicides multisites

Les fongicides multisites les plus anciens sont des produits minéraux à base de cuivre et de soufre. Ce dernier utilisé en poudrage ou en pulvérisation sous forme micronisée mouillable est particulièrement efficace contre les oïdiums à des doses allant de 2 à 20 kg/ha. Quant aux produits cupriques, sous forme de sels peu hydrosolubles, ils présentent une bonne efficacité préventive contre les mildious à des doses comprises entre 1,5 et 3 kg de cuivre / ha. Ces fongicides minéraux occupent une place prépondérante en culture biologique, mais les risques environnementaux liés au cuivre risquent de remettre en question l'utilisation des fongicides cupriques.

Après la seconde guerre mondiale, la montée en puissance de la chimie organique de synthèse a généré plusieurs classes de fongicides multisites dont notamment des dithiocarbamates (ex : manèbe, mancozèbe, métirame-zinc, thirame) et des N-chloroalkylmercaptans (ex : captane, folpel, tolylfluanide). Ils présentent un large spectre d'action incluant Ascomycètes, Basidiomycètes, Adélomycètes et Oomycètes et s'utilisent en

pulvérisation foliaire (1 à 2 kg de matière active / ha) ainsi qu'en traitement de semences. D'autres fongicides comme le chlorothalonil (phtalonitrile), la doguadine et la guazatine (guanidines) se classent également parmi les multisites organiques.

Si une grande diversité chimique existe parmi ces fongicides multisites, par contre, ils ont en commun une forte réactivité avec de nombreux constituants cellulaires et en particulier ceux possédant des groupements thiols (SH). Ainsi, au niveau des processus respiratoires, ils bloquent des enzymes de la glycolyse (ex : pyruvate deshydrogénase), du cycle de Krebs (ex : cetoglutarate deshydrogénase) et de la chaîne respiratoire. Cette forte réactivité non sélective des fongicides multisites les expose à des effets indésirables sur divers organismes. Ceci est d'ailleurs à l'origine du retrait ancien (ex : organomercuriques) ou récent de plusieurs d'entre eux. Par contre, ils présentent un aspect très positif vis-à-vis de la résistance puisque dans leur grande majorité, ils n'ont jamais été confrontés à ce phénomène en pratique. Pour cette raison, ils constituent, notamment en arboriculture et viticulture, des partenaires importants dans le cadre de stratégies anti-résistance impliquant l'utilisation de fongicides unisites à risque (ex : mildiou de la vigne).

2.2 Fongicides affectant la biodisponibilité de l'ATP

Dans le domaine phytosanitaire, les organostanniques qui sont des inhibiteurs de phosphorylation oxydative, ont été utilisés comme fongicides ou acaricides. Ainsi, le fentine-acétate ou le fentine-hydroxyde sont des fongicides de surface actifs vis-à-vis d'Ascomycètes et d'Oomycètes. Le seul cas de résistance observé en pratique concernerait la cercosporiose de la betterave et résulterait d'une mutation dans un gène mitochondrial codant une des sous-unités de l'ATP synthase.

Parmi les découplants protonophores qui perméabilisent les membranes mitochondriales aux protons et par voie de conséquence empêchent le fonctionnement de l'ATP synthase, il existe deux fongicides agricoles. L'un est le dinocap, un ester phénolique spécifique des oïdiums dont le toxophore est un hydroxyde qui n'a jamais été confronté à la résistance. Une nouvelle forme dénommée méthyl-dinocap va prochainement se substituer au dinocap. L'autre fongicide découplant est le fluazinam, une pyridineamine dont le toxophore est une amine secondaire qui agit préventivement contre divers Ascomycètes et Basidiomycètes. Aucune résistance n'a été rapportée en France vis à vis de ce fongicide, mais le phénomène a été signalé au Japon chez *B. cinerea*.

Le silthiofam est une silyamide qui possède une analogie structurale avec les carboxamides inhibitrices du complexe II. Toutefois, ce fongicide a la particularité d'être uniquement efficace vis à vis du piétin-échaudage du blé provoqué par *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Il n'a pas d'activité sur la variété *avenae* et même, en laboratoire, certains isolats de la variété *tritici* semblent naturellement résistants. Il a été montré que le silthiofam empêchait le transfert de l'ATP des mitochondries vers le cytoplasme.

3. INHIBITEURS DU COMPLEXE MITOCHONDRIAL II OU SDHs

3.1 Structure et fonctionnement du complexe II

La succinate deshydrogénase ou succinate-ubiquinone réductase qui permet l'oxydation du succinate en fumarate, est la seule enzyme du cycle de Krebs liée à la membrane mitochondriale. Elle est composée de quatre protéines, toutes codées par des gènes nucléaires. Premièrement, une flavoprotéine (FP ou SdhA), ayant le FAD (Flavine Adénosone Dinucléotide) comme cofacteur et orientée vers la matrice mitochondriale se lie au succinate pendant sa réduction. Une seconde protéine hydrophile (Ip), comportant 3 clusters fer-soufre participe à la fixation du coenzyme Q. Au sein de ces trois clusters désignés S1 [2Fe-2S], S2 [4Fe-2S] et S3 [3Fe-4S], la partie soufrée est issue d'une cystéine. Les électrons libérés lors de l'oxydation du succinate transitent successivement par la FAD puis les clusters S1, S2 et S3 avant de réduire l'ubiquinone. Quant aux deux autres protéines

(SdhC et SdhD) qui sont hydrophobes et comportent chacune trois hélices transmembranaires, elles permettent d'ancrer le complexe II dans la membrane mitochondriale interne. Ces deux protéines d'ancrage intègrent un hème (comme il en existe au sein des cytochromes) dont la fonction n'est pas clairement identifiée et par ailleurs, elles contribuent à la fixation de l'ubiquinone pendant sa réduction (figure 2 ; (Hagerhall 1997; Yankovskaya, Horsefield et al. 2003; Oyedotun and Lemire 2004).

3.2 Caractéristiques des fongicides SDHIs

Les fongicides inhibant la succinate deshydrogénase se caractérisent par des structures chimiques voisines (figure 3) et ont été rassemblées sous le vocable général de « carboxamides » ; plus récemment, les sociétés phytosanitaires proposent l'appellation « SDHIs » (pour Succinate Deshydrogenase Inhibitors). Les premières matières actives mises au point dans les années 1960 ont été la carboxine et l'oxycarboxine. Ces oxathiines sont systémiques et actives exclusivement sur des Basidiomycètes incluant des charbons, rouilles et rhizoctones (Von Schmeling and Kulka 1966). Cette dernière caractéristique a également été observée avec un grand nombre de carboxamides incluant des benzamides (ex : bénodanil, flutolanil, mépronil) ou comportant des hétérocycles (ex : fenfuram, furcarbanil, cyclofluramide, trifluzamide). Tous ces composés possèdent une structure de type « cis-crotonanilide » et donc dérivent d'un acide carboxylique comportant une double liaison $\alpha\beta$. Les nombreuses études structurales conduites dans les années 1960-1980 indiquent que la présence de l'amide est essentielle, mais que par contre, le cycle benzénique peut être remplacé par un cyclohexyl (ex : cyclofuramid) ou par des chaînes alkylées. Concernant le méthyl présent sur le carbone β , il peut être remplacé par un éthyl, un iode (ex : bénodanil), un chlore ou un trifluorométhyle (ex : flutolanil). En outre, la présence de certains groupements sur un des carbones du noyau benzénique peut élargir l'activité inhibitrice ou étendre le spectre d'action. Ainsi, cette dernière propriété a été décrite dès la fin des années 1960 avec le 2'-phényl analogue de la carboxine (F427). Mais finalement, il aura fallu attendre le début des années 2000 pour voir apparaître une « cis-crotonanilide » à large spectre et activité ; il s'agit du boscalid. Le fluopyram, une benzamide en cours d'expérimentation appartient également à cette classe de carboxamides.

En dehors de ces « cis-crotonanilides », plusieurs méthyl-pyrazole carboxamides ne comportant pas de double liaison entre le méthyl et le groupement carboxamide sont également des SDHIs. Il s'agit d'une part du flurametpyr, un anti-rhizoctone développé sur le riz au Japon et d'autre part de fongicides à large spectre utilisables sur semence ou en cours de végétation chez des mono ou des dicotylédones contre des Basidiomycètes, des Adelomycètes et des Ascomycètes (bixafen, isopyrazam, penthiopyrad, penflufen, sedaxane). A notre connaissance, à ce jour, aucun SDHI efficace contre les Oomycètes n'a été mis au point (Kuhn 1984; White and Georgopoulos 1992; Kulka and Von Schmeling 1995).

3.3 Mode d'action des SDHIs (notation des acides-aminés selon *B. cinerea*)

Les travaux conduits sur la carboxine indiquent que cette carboxamide est capable d'inhiber à faible concentration le complexe II de Basidiomycètes mais aussi d'autres champignons ainsi que de Mammifères ; elle est par contre peu active sur celui des plantes. Par ailleurs, cette inhibition ne s'observe pas sur la forme solubilisée du SDH qui compte uniquement les sous-unités SdhA et SdhB et qui par ailleurs ne peut pas réduire l'ubiquinone. Cette observation suggère que l'interaction du coenzyme Q ou des carboxamides implique les sous-unités SdhB, SdhC et SdhD. En fait, il s'avère que des acides aminés de chacune d'entre elles sont essentiels à l'activité catalytique. Il s'agit d'une part de la tyrosine SdhD Y151 et de la sérine SdhC S84 qui interagissent par liaison hydrogène avec les deux carbonyles de l'ubiquinone. La sous-unité SdhB possède deux motifs conservés [CPSYWW] et [RCHTI] qui comportent chacun respectivement les cluster fer-soufre S2 et S3. Dans le premier motif, la proline P225 et les deux tryptophanes W228 et W229 sont impliqués dans la fixation hydrophobe de la chaîne de l'ubiquinone tandis que dans le second motif, l'histidine H272 interagit avec un groupement méthoxy (Horsefield, Yankovskaya et al. 2006).

A partir des investigations menées principalement avec la carboxine, il s'avère que les carboxamides se fixent dans la même région que l'ubiquinone. Pour toutes, leur groupement carbonyle (C=O) peut interférer par liaison hydrogène avec la tyrosine SdhD Y151. Quant aux interactions avec la sérine SdhC S84 et l'histidine SdhB H272, elles feraient intervenir pour la carboxine respectivement les atomes de soufre et d'oxygène de cette oxathiine. Pour les carboxamides renfermant un hétérocycle sans oxygène, notamment un pyrazole, il est probable qu'un atome d'azote joue un rôle similaire à l'oxygène de l'oxathiine. Quant aux benzamides, des interactions par liaison hydrogène semblent improbables. Le phényl ou les autres structures associées à l'atome d'azote des carboxamides contribuent par des interactions hydrophobes (impliquant probablement la zone PSYWW du SdhB) à leur fixation sur le complexe II (Horsefield, Yankovskaya et al. 2006; Glättli, Stammler et al. 2009). Pour conclure, les fongicides SDHIs occupent une zone délimitée par les protéines SdhB, SdhC et SdhD, partiellement incluse dans la poche de fixation de l'ubiquinone.

3.4 Résistance aux fongicides SDHIs

Des mutants de laboratoire résistants aux carboxamides ont été obtenus chez plusieurs Basidiomycètes (dont *Ustilago maydis*) et quelques Ascomycètes (*Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Mycosphaerella graminicola*). La résistance au champ a été reportée pour les carboxamides anti-basidiomycètes chez le charbon de l'orge (*Ustilago nuda*), la rouille blanche du chrysanthème (*Puccinia horiana*) et la rouille de l'œillet (*Uromyces caryophyllinus*) (Leroux and Delorme 1997). Plus récemment, suite à l'utilisation du boscalid, des souches résistantes ont été décelées au champ chez onze champignons phytopathogènes (Stammler, Brix et al. 2008).

La résistance au champ est signalée pour 3 d'entre eux, *Alternaria alternata*, *Corynespora cassiicola* et *Podosphaera xanthii* (site internet du FRAC). A noter que chez *A. alternata* et *B. cinerea*, de nombreuses souches résistantes au boscalid cumulent également la résistance aux strobilurines. Dans le cas d'*A. alternata*, les souches doublement résistantes ont été collectées aux USA sur des pistachiers traités avec le mélange pyraclostrobine + boscalid et dont l'efficacité au champ était faible (Avenot, Morgan et al. 2008).

Concernant les mécanismes de résistance, tant chez les mutants de laboratoire que les souches collectées au champ, ils semblent essentiellement liés à des modifications qualitatives des sous-unités SdhB, SdhC et SdhD. L'altération la plus fréquemment rencontrée concerne l'histidine H272 présente dans un des motifs très conservés du SdhB (RCHTI). Cette histidine peut être remplacée par une leucine, une tyrosine, une arginine ou une asparagine. Ainsi, chez *B. cinerea*, la présence d'une leucine ou d'une tyrosine déterminent une résistance moyenne au boscalid alors que celle d'une arginine induit une forte résistance. Par ailleurs, si en présence de leucine ou d'arginine il y a résistance croisée positive entre les carboxamides, par contre, avec la tyrosine, on observe une sensibilité accrue vis-à-vis du groupe des benzamides. Ce phénomène avait d'ailleurs déjà été observé chez une classe de souches d'*U. nuda* résistante à la carboxine. Chez *B. cinerea*, des mutations ont également été observées au codon 225 du SdhB. Chez les souches sensibles, il y a une proline qui fait partie d'un motif très conservé (CPSYWW) et elle peut être remplacée par une thréonine, une leucine ou une phénylalanine. Des souches collectées au vignoble présentant les changements P225Y/L sont respectivement moyennement et fortement résistantes au boscalid. Il y a résistance croisée avec toutes les carboxamides, avec toutefois pour certaines (dont la carboxine) des niveaux de résistance faibles. Enfin, chez quelques souches collectées au champ ou induites en laboratoire, les changements portent sur les sous-unités SdhC et SdhD. Pour SdhC, chez des mutants de laboratoire obtenus chez *Coprinus cinereus* (en présence de flutolanil) ou chez *A. oryzae* (en présence de carboxine), les substitutions SdhC G87L et SdhC T90I ont été respectivement relevées. Ces changements n'ont jamais été observés chez des souches fongiques collectées au champ, mais récemment, chez *A. alternata*, de nombreux isolats résistants au boscalid comportent la substitution SdhC H146R. Enfin, pour la sous-unité SdhD chez *A. oryzae* un

mutant de laboratoire résistant à la carboxine comporte la substitution SdhD D151Q alors que chez *B. cinerea* et *S. sclerotiorum* des souches faiblement à moyennement résistantes aux carboxamides présentent le changement SdhD H132R. A noter que d'après les travaux de cristallographie réalisés sur la SDH d'*Escherichia coli*, ces deux histidines homologues présentent dans les sous-unités SdhC et SdhD fixent l'hème b au sein du complexe II et semblent essentielles à son bon fonctionnement (Stammler 2008; Stammler, Brix et al. 2008; Leroux, Gredt et al. 2009; Shima, Ito et al. 2009).

Actuellement, nous ne disposons pas d'information sur la fitness de ces divers génotypes trouvés au champ et résistants aux carboxamides. Il est possible que certaines mutations affectent la fixation de l'ubiquinone et plus généralement le fonctionnement du complexe II. Le suivi des populations fongiques ainsi que des études biochimiques sont nécessaires pour mieux appréhender cette résistance à la fois multigénique et multiallélique.

4. INHIBITEURS DU COMPLEXE MITOCHONDRIAL III

4.1 Structure et fonctionnement du complexe III

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, le complexe III ou bc1 catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c et ce processus est couplé avec la translocation transmembranaire des protons nécessaires au fonctionnement de l'ATP synthase. Chez les eucaryotes, le complexe III comporte 10 à 11 peptides et fonctionne sous forme d'un dimère. Le cytochrome b (seule sous-unité codée par un gène mitochondrial), la protéine fer-soufre Rieske (ISP) et le cytochrome c1 sont les 3 éléments majeurs du site actif de l'ubiquinol cytochrome c réductase. Au cours de cette réaction, les électrons sont transférés via des atomes de fer inclus dans 2 hèmes du cytochrome b (bc et bh), dans un cluster [2Fe-2S] de l'ISP et enfin 1 hème du cytochrome c1. Ces trois sous-unités sont incluses dans la membrane mitochondriale interne par l'intermédiaire d'hélices transmembranaires (TM) au nombre de huit pour le cytochrome b et de 1 pour chacune des deux autres. Concernant l'apoprotéine du cytochrome b, les huit TM (A à H) sont regroupées en 2 faisceaux et le premier (A-E) fixe par l'intermédiaire d'histidines les hèmes bc et bh situés respectivement vers les faces externes et internes de la membrane mitochondriale. Ces hélices sont reliées par des boucles dont une (boucle ef) localisée sur la face interne et trois (boucles ab, cd et ef) sur la face externe participent à la fixation du coenzyme Q ; à noter que la partie N terminale située dans la membrane (face interne) est également impliquée. En fait, deux sites de fixation existent, un proche de la matrice des mitochondries (Qi) contribue à la réduction de l'ubiquinone tandis que l'autre situé vers l'extérieur (Qo, ou pour out, le vocable anglais pour extérieur) où l'ubiquinol est oxydée. Il convient de signaler que la sous unité ISP est également impliquée dans ce second site de fixation du coenzyme Q (figure 2).

De nombreuses recherches consacrées à l'organisation et au fonctionnement de ce complexe III impliquent l'utilisation d'inhibiteurs d'origine naturelle ou synthétique. En fonction des mécanismes d'interactions moléculaires, ils ont été classés en plusieurs groupes (tableau I). Les plus nombreux interférant avec l'oxydation de l'ubiquinone sont les Qols (ou classe P car leur site de fixation est proche de la face externe de la membrane mitochondriale qui est chargée positivement). Tous ces Qols induisent un changement de conformation de la sous-unité ISP qui devient plus mobile (sous classe Pm) ou plus fixe (sous classe Pf). Une seconde classe d'inhibiteurs interfèrent spécifiquement avec la réduction de l'ubiquinone ; ce sont les Qils (ou classe N car leur site de fixation est proche de la face interne de la membrane mitochondriale qui est chargée négativement). Enfin, quelques molécules peuvent bloquer les deux réactions précédentes ; ils peuvent être dénommés Qoils ou classe PN (Esser, Quinn et al. 2004). A noter que beaucoup de ces substances ne sont pas des inhibiteurs compétitifs de l'ubiquinol cytochrome c reductase mais toutefois, elles occupent une partie du site de fixation du coenzyme Q.

4.2 Caractéristiques des fongicides inhibiteurs du complexe III

4.2.1 Les fongicides Qols

Dans le milieu des années 90, une nouvelle famille de fongicides polyvalents s'est implantée : il s'agit des strobilurines. Cette dénomination indique que ces molécules organiques de synthèse sont des analogues structuraux de substances naturelles comme la strobilurine A, produite par divers champignons lignicoles dont *Strobilurus tenacellus*. Les strobilurines naturelles ont été découvertes par des chercheurs tchèques à la fin des années 1960 et leur mode d'action au niveau du complexe III (ce sont des Qols) a été élucidé une dizaine d'années plus tard par des universitaires allemands. Ces strobilurines naturelles présentent de bonnes potentialités antifongiques mais leur volatilité et leur instabilité à la lumière ne permet pas leur utilisation au champ. Grâce à la synthèse de nombreux analogues et notamment avec le remplacement du pont (Z)-oléfinique par un cycle benzénique, des fongicides agricoles performants ont été élaborés. Ainsi, l'azoxystrobine et la picoxystrobine renferment le même toxophore que les strobilurines naturelles, c'est-à-dire un méthyl- β -methoxyacrylate. Toutefois, une flexibilité existe puisque parmi les strobilurines à usage agricole, avec des méthyl-methoxyiminoacétates (ex : krésoxim-méthyl, trifloxystrobine) et des méthyl méthoxyiminocétamides (ex : métominostrobine, dimoxystrobine) ; la fluoxastrobine qui comporte une dihydro-dioxazine est poche des méthyl-méthoxyiminoacétamides. Ces strobilurines sont efficaces sur de nombreux Ascomycètes, Basidiomycètes, Adelomycètes et Oomycètes. Cette polyvalence, ainsi que leur excellente action préventive les rapproche de certains fongicides multisites avec cependant des doses d'utilisation environ 10 fois plus faibles pour ces strobilurines (50 à 250 g/ha). De plus, la plupart présentent des transferts foliaires translaminaires et certains peuvent être véhiculés par le xylème ou être redistribués à l'extérieur en phase vapeur. A côté de ces strobilurines, deux autres Qols particulièrement efficaces contre les Oomycètes sont utilisés en France ; il s'agit d'une oxazolidinedione, la famoxadone, et d'une imidazolinone, la fénamidone (Leroux and Delorme 1997; Sauter, Steglich et al. 1999; Bartlett, Clough et al. 2002). Quant au pyribencarb dont le benzylcarbamate pourrait correspondre au toxophore des strobilurines, il est en cours de développement au Japon. L'absence de résistance croisée systématique avec les autres fongicides Qols suggère toutefois que l'interaction avec le cytochrome b pourrait être différente (Ishii 2008). Enfin, dans le domaine médical, l'atavaquone, une hydroxynaphtoquinone développée depuis les années 1990 notamment contre la malaria provoquée par *Plasmodium sp.* et des pneumonies à *Pneumocystis* , appartient également à la classe des Qols (Fisher and Meunier 2008).

4.2.1 Les fongicides Qils

Les inhibiteurs de type Qils connus à ce jour sont des antibiotiques comme l'antimycine A et l'ilicoline H et des molécules synthétiques dont le diuron développé comme herbicide et une famille d'antimildious ayant en commun une diméthylsulfonamide (tableau I). Le premier Qil utilisé en agriculture a été l'antimycine A, au Japon contre la pyriculariose du riz, mais son manque de sélectivité a entraîné son abandon. Quant au diuron, son activité phytotoxique ne résulte pas d'une inhibition de la respiration mais de celle de la photosynthèse. Cette urée substituée, comme beaucoup d'autres herbicides comme par exemple les triazines, se lie avec la protéine D1 du photosystème II impliquée dans la réduction de la plastoquinone (l'équivalent de l'ubiquinone dans les mitochondries). Quant aux fongicides sulfonamides (Figure 4), le premier représentant mis au point a été le diméfluazole mais il a été abandonné pour des raisons toxicologiques. La cyazofamide est par contre commercialisée en France contre le mildiou de la pomme de terre alors que l'amisulbron est en cours de développement. Ces trois fongicides qui affectent la libération des zoospores et leur mobilité présentent une forte activité préventive contre les mildious (Ishii 2008).

4.2 Modes d'action des fongicides inhibiteurs du complexe III

4.3.1 Les fongicides Qols

Dans leur grande majorité, les Qols (utilisés comme fongicides agricoles ou non) affectent fortement les complexes III issus des cellules fongiques ou animales. Toutefois, cis à vis des mammifères, les fongicides Qols présentent une faible toxicité aiguë liée à leur détoxification (notamment clivage du groupe ester méthylique qui constitue le toxophore des strobilurines). Quant à leur faible toxicité pour les mitochondries végétales, elle est liée à la présence d'acides aminés spécifiques dans le site de fixation des Qols au niveau du cytochrome b (par exemple en position 143 les plantes comportent une alanine qui est présente chez les souches de nombreux champignons phytopathogènes résistants aux Qols et chez quelques Basidiomycètes producteurs de strobilurines naturelles). L'étude des interactions des Qols avec le cytochrome b a été essentiellement conduite sur le complexe III issu des mitochondries du cœur de bœuf. Ces travaux montrent que plusieurs domaines du cytochrome b sont concernés et impliquent des acides aminés inclus dans la partie externe de l'hélice C (positions 120 à 135), les boucles externes cd (en particulier ca comprise entre les acides aminés 137 et 150) et ef (positions 270 à 285) et la zone externe de l'hélice (positions 288 à 300). Aucun de ces domaines n'est impliqué dans la fixation de l'hème bf, mais dans la boucle ef le motif PEWY (proline-acide glutamique-tryptophane-tyrosine, codons 271-274) très conservé et essentiel à l'activité catalytique.

Le coenzyme Q, comme la plupart des Qols, se lie par une liaison hydrogène avec l'acide glutamique 272 via un atome d'oxygène d'un carboxylate (C=O) inclus par exemple dans leur chaîne latérale pour les strobilurines ou dans leur hétérocycle pour la famoxadone ou la fénamidone. Dans la même zone, la proline P271 contribue à la fixation de tous les Qols et en particulier chez les fongicides agricoles, elles sont en contact d'un phényle proche du carboxylate mentionné précédemment ; quant aux tyrosines Y274 et Y279, elles interfèrent respectivement avec les inhibiteurs Pm et Pf. Au sein de l'hélice C, la tyrosine Y132 et la phénylalanine F129 sont proches du méthoxyacrylate des strobilurines et de l'amine secondaire incluse dans les hétérocycles de la famoxadone ou de la fénamidone. Concernant la boucle cd, la glycine G143 et l'isoleucine I147 interviennent dans la fixation de tous les Qol, ainsi la glycine G143 se positionne près du phényle du toxophore des strobilurines et de l'aminophényle de la famoxadone et de la fénamidone. Dans cette même zone, l'alanine A144 et la valine V146 interagissent respectivement avec les inhibiteurs de type Pm et Pf ; la famoxadone fait exception car elle interfère avec ces deux acides aminés. Enfin, dans l'hélice D, la leucine L295 qui se lie à la partie hydrophobique des strobilurines ne semble pas interférer avec la famoxadone. Un dernier aspect qui mérite d'être mentionné concerne l'impact de ces Qols sur la sous-unité ISP. En effet, certains comme les strobilurines (sous groupe Pm) entraînent une mobilité accrue de ce peptide alors que la famoxadone ou la stigmatelline A (sous groupe Pf) provoquent son immobilisation. Ce dernier phénomène pourrait résulter du fait que ces inhibiteurs Pf sont plus proches de l'ISP que les inhibiteurs Pm. D'ailleurs, la plupart des inhibiteurs Pf, à l'exception de la famoxadone, interagissent avec l'histidine H161 qui est un ligand d'un des atomes de fer du cluster 2Fe-2S (tableau I). Pour conclure sur les Qols, il s'avère qu'ils se lient avec le cytochrome b dans une région où se fixe l'ubiquinone et que probablement tous n'occupent pas exactement le même site mais que certains domaines sont communs (Gisi, Sierotzki et al. 2002; Esser, Quinn et al. 2004).

4.3.2 Les fongicides Qils

En dehors de l'antimycine A, nous ne disposons pas d'informations précises sur les interactions moléculaires du cytochrome b avec les Qils. Toutefois, il est probable que tous partagent une partie du site de fixation de l'ubiquinone. Les zones du cytochrome b impliquées se situent vers la matrice mitochondriale et incluent sa partie N-terminale et une partie de l'hélice A (positions 15 à 40). Au niveau de l'hélice D, la zone proche de l'hème bh et notamment l'histidine H202 et la sérine S206 sont essentielles pour l'activité catalytique (figure 2). Enfin, la boucle de et la partie de l'hélice E proche de la matrice sont également

impliquées dans la fixation des Qils et notamment l'antimycine A (ex : lysine L277 et aspartate D228) (Huang, Sun et al. 2006; Fisher and Meunier 2008). Concernant les fongicides anti-oomycètes, il semble que leur fongitoxicité résulte d'une fixation covalente de la sulfonamide dans la zone où l'ubiquinone est réduite (Leroux and Delorme 1997).

4.4 Résistance aux fongicides inhibiteurs du complexe III

Avant l'introduction de Qols ou Qils comme fongicides agricoles, de nombreux mutants de levures et d'autres microorganismes résistants à des inhibiteurs du complexe III avaient été produits et analysés au laboratoire. Ainsi, un inventaire de ces mutants ainsi que les bases génétiques déterminant la résistance (mutations dans le gène codant pour le cytochrome b) avait été dressé en 1996 juste au moment du lancement des strobilurines (Brasseur, Saribas et al. 1996). Ainsi, pour la résistance aux Qols, il apparaissait que les mutations portaient principalement sur les codons 125 à 150 et 256 à 295 et que pour bon nombre de mutants les facteurs de résistance étaient faibles et le fonctionnement du complexe III était affecté. Toutefois, cette règle ne s'appliquait pas pour les substitutions F129L et G143A, qui remettent en cause l'efficacité des strobilurines agricoles. Concernant les Qils, les changements affectent des acides aminés situés entre les positions 30 et 50 et 200 à 240. Globalement, les niveaux de résistance sont faibles (Gisi, Sierotzki et al. 2002; Fisher and Meunier 2008).

4.4.1 Résistance aux fongicides Qols

A ce jour, plus de 27 espèces de champignons phytopathogènes sont concernés par la résistance aux Qols. Il s'agit d'Ascomycètes (ex : *Venturia* sp., *Pyrenophora* sp., *Blumeria graminis*...), d'Adelomycètes (ex : *Alternaria* sp.) et de quelques Oomycètes dont *Plasmopara viticola* (mais pas *Phytophthora infestans*). Dans la majorité des cas, une résistance très forte à tous les fongicides Qols est déterminée par la substitution G143A au niveau du cytochrome b. Chez quelques pathogènes comme *A. solani* ou *P. teres*, seules des souches faiblement à moyennement résistantes ont été décelées ; elles comportent la substitution F129L, avec en pratique des réductions notables d'efficacité pour certaines strobilurines (ex : azoxystrobine) et pas d'incidence pour d'autres (ex : pyraclostrobine). Chez quelques pathogènes comme par exemple *P. viticola* et *P. tritici-repentis*, des isolats présentant les substitutions F129L ou G143A peuvent coexister dans une même parcelle ; à noter que le changement G137R conduisant à une résistance faible à moyenne n'a été observée à ce jour que pour *P. tritici-repentis*. Chez d'autres champignons dont *A. solani*, *P. teres* ainsi que les agents responsables des rouilles, l'absence de souches résistantes avec la substitution G143A s'explique par la présence d'un intron de type I entre les codons 143 et 144 du gène codant pour le cytochrome b. En effet, en présence de cet intron, la mutation empêche la formation d'un cytochrome b fonctionnel et est donc létale. A noter que chez *B. cinerea*, coexistent au sein d'une même population des souches avec ou sans intron (entre les codons 143 et 144) et que la résistance aux Qols ne s'observe que chez les individus dépourvus de l'intron (Gisi and Sierotzki 2008). Chez les champignons phytopathogènes, aucun changement d'acide aminé n'a été détecté au niveau de la boucle cf du cytochrome b chez les isolats collectés au champ et résistants aux fongicides Qols. Par contre, dans le domaine médical, chez des isolats de *Pneumocystis* sp. et *Plasmodium* sp ainsi que pour des mutants de laboratoire de levure, une résistance faible à forte a été observée. Ainsi, les substitutions Y279C/S induisent une forte résistance à l'atovaquone. Mais toutes les mutations du gène *cytb* portant sur des codons localisés dans la boucle ef entraînent une réduction de l'activité du cytochrome b (Fisher and Meunier 2008). Ce phénomène qui induit probablement une fitness moindre pourrait expliquer l'absence de telles mutations chez les champignons phytopathogènes. Une particularité de la résistance aux Qols, qui pourrait s'appliquer également aux Qils, réside dans le fait que comme le gène du cytochrome b est mitochondrial, son hérédité est maternelle, alors qu'elle est biparentale dans le cas d'une résistance déterminée par un gène chromosomique. Par ailleurs, lorsqu'une mutation apparaît dans l'ADN d'une mitochondrie, elle peut éventuellement envahir l'ensemble des mitochondries d'une cellule. On passe ainsi d'une situation hétéroplasmique à une

résistance homoplasmique. Les observations dans ce domaine sont fragmentaires (Gisi, Sierotzki et al. 2002) mais ce qui transparait au vu de l'évolution de la résistance aux Qols au champ, c'est que lorsque les individus résistants homoplasmiques émergent, leur sélection s'opère selon les mêmes modalités que celles observées pour des résistances nucléaires. Enfin, en dehors des changements qualitatifs du cytochrome b qui réduisent son affinité pour les Qols, il est possible que certaines souches fortement résistantes comportent des changements structuraux au niveau de la sous-unité ISP du complexe III. Ce phénomène est envisagé chez des souches d'un oïdium des cucurbitacées (*Podosphaera fusca*) détectées en Espagne, alors que dans un pays comme le Japon, le génotype G143A est dominant. Il pourrait également concerner certaines souches de *B. cinerea*, *M. majus* et *V. inaequalis* (Fernandez-Ortuno, Tores et al. 2008). Concernant la fitness des souches fongiques résistantes aux Qols et en particulier celles portant le changement G143A, il semble qu'elle diffère selon les espèces. Ainsi, chez *B. graminis* f. sp. *tritici*, la dissémination très rapide de la résistance suggère que les potentialités biotiques des souches n'est pas affectée. Cette hypothèse a été confirmée par des études biochimiques et des tests de compétition. Par contre, les expérimentations sur des Oomycètes (dont le mildiou de la vigne), l'oïdium des cucurbitacées ou la tavelure des pommes démontrent un léger effet délétère de la substitution G143A (Fisher and Meunier 2008). Concernant les agents responsables de l'oïdium, l'émergence plus lente de la résistance chez *B. graminis* f. sp. *hordei* et *Erysiphe necator* que chez *B. graminis* f. sp. *tritici* suggère également une moindre fitness pour les deux premiers. Par ailleurs, au Japon, sur cultures maraichères, l'arrêt des traitements à base de Qols conduit pour plusieurs espèces à une régression des souches résistantes qui pourrait résulter d'une réversion de la résistance homoplasmique vers une résistance hétéroplasmique conduisant à la sensibilité aux Qols (Ishii, Fontaine et al. 2009). Toutefois, dans la majorité des cultures, l'emploi des Qols est maintenu car certains champignons phytopathogènes demeurent sensibles (ex : rouilles des céréales) et donc une disparition rapide de la résistance chez les espèces fongiques concernées est peu probable.

4.4.2 Résistance aux fongicides Qils

Pour l'instant, à notre connaissance, aucune résistance aux dimethylsulfonamides anti-mildiou liée à une modification qualitative du cytochrome b n'a été décelée, et par ailleurs, les souches d'Oomycètes comportant les mutations F129L et G143A demeurent sensibles à ce groupe de Qils. A noter que des propriétés équivalentes, c'est-à-dire une très bonne activité préventive contre les mildious et une absence de résistance croisée avec des Qols, sont signalées pour une triazolopyrimidine, l'amétochloradine ou BAS 650F. Toutefois, cette nouvelle matière active, qui inhibe le complexe III et ne comporte pas le motif dimethylsulfonamide, a peut-être un site de fixation différent sur le cytochrome b (Gauthier, Aumont et al. 2009) ; Stammler, communication personnelle).

4.4.3 Résistance à tous les inhibiteurs du complexe III

Une résistance simultanée à tous les inhibiteurs du complexe III ainsi qu'à ceux du complexe IV (ex : cyanure) peut-être déterminée par le fonctionnement d'une alternative oxydase (AOX) ou ubiquinol oxydase. Si cette AOX permet le transfert des électrons transitant par la chaîne respiratoire mitochondriale, par contre, elle entraîne une carence énergétique (de l'ordre de 60%) du fait de la disparition de deux sites de translocation des protons nécessaires au fonctionnement de l'ATP synthase (figure 1). Cette respiration alternative existe chez les champignons et les plantes mais est absente chez les cellules animales. Chez *Candida albicans*, deux AOX ont été détectées ; l'une est présente en permanence à un faible niveau alors que la seconde est induite par des inhibiteurs mitochondriaux ; par contre, les champignons phytopathogènes ne semblent en posséder qu'une seule. L'AOX présente la particularité d'être inhibée spécifiquement par quelques molécules dont le propyl gallate et l'acide salicylhydroxamique (SHAM). Dans ces conditions, l'utilisation de ces inhibiteurs essentiellement dans des investigations conduites *in-vitro*, permet d'évaluer l'impact de l'AOX sur l'activité des inhibiteurs du complexe III. Tout d'abord, les essais conduits avec des strobilurines, sur des souches sensibles, montrent que chez certaines

espèces fongiques, l'AOX intervient peu ou pas (ex : *M. graminicola*, *Microdochium sp.*, *V. inaequalis*) alors que pour d'autres comme *B. cinerea* ou *Fusarium graminearum* elle limite fortement la fongitoxicité de ces Qols et aussi celle de l'antimycine A. Ce comportement pourrait expliquer pourquoi la pourriture grise ou les fusariums sont mal contrôlés par les strobilurines. Chez la plupart des mutants de laboratoire et des souches au champ pour lesquels l'AOX est impliquée, la résistance aux inhibiteurs du complexe III est faible à modérée. De plus, cette résistance est parfois instable et la fréquence des mutants, souvent faible, suggère une fitness réduite. Ceci concernerait certains isolats de *M. graminicola*, *M. majus* (Walker, Auclair et al. 2009) et *P. viticola*; à noter que chez ces espèces, la résistance spécifique aux Qols déterminée par le changement G143A du cytochrome b est très présente. La situation de *V. inaequalis* apparaît plus complexe pour des souches fortement résistantes aux Qols et à l'antimycine, dont le cytochrome b n'est pas modifié. En effet, chez ces souches, le SHAM synergise l'effet des strobilurines au niveau des spores mais pas du mycélium, indiquant que l'AOX ne serait impliquée que pendant la germination des spores et qu'un autre mécanisme détermine la résistance pendant la croissance mycélienne (Steinfeld, Sierotzki et al. 2001). En conclusion, l'AOX n'a peut-être pas un rôle prépondérant pour déterminer une forte résistance en pratique avec perte d'efficacité des traitements fongicides. Par contre, ce mécanisme peut permettre la survie des souches qui par la suite peuvent développer des résistances liées à des mutations du gène du cytochrome b (Wood and Hollomon 2003).

5. LA MULTIRÉSISTANCE DE TYPE MDR

La résistance simultanée à plusieurs classes de molécules toxiques de type MDR (multidrug resistance) est déterminée par la production accrue de transporteurs membranaires qui limitent la quantité intracellulaire des inhibiteurs concernés. Il existe des transporteurs soit à ABC (ATP-binding cassette) qui utilisent l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP ou soit de type MFS (major facilitator superfamily) fonctionnant grâce au gradient électrochimique existant au niveau de la membrane cytoplasmique. Pour les antifongiques, ce mécanisme est bien connu dans le domaine médical vis-à-vis des triazoles inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols (IDMs), mais il est par contre beaucoup moins fréquent chez des champignons phytopathogènes (de Waard, Andrade et al. 2006). En fait, les quelques cas que nous avons identifiés chez *B. cinerea*, *M. graminicola* et *Oculimacula yallundae* montrent que les facteurs de résistance liés à la MDR sont généralement faibles. Des résultats similaires sont observés pour des mutants de laboratoire présentant une production accrue de ces transporteurs. Concernant ces trois pathogènes, nous avons montré que chez les carboxamides, le boscalid était concerné mais pas la carboxine. Parmi les Qols, les plus lipophiles comme la pyraclostrobine et la trifloxystrobine sont plus affectées que l'azoxystrobine ou l'antimycine A. Enfin, le fluazinam peut être également concerné, alors que les multisites ne semblent pas l'être. Très récemment chez *B. cinerea*, deux transporteurs ont été identifiés chez des souches de MDR présentant des spectres de résistance croisée différents. Un transporteur à ABC intervient notamment vis-à-vis du fluazinam et de Qols et un transporteur de type MFS opère vis-à-vis du boscalid et des Qols (Leroux, Gredt et al. 2009). Dans le cas de *M. graminicola*, chez la plupart des souches résistantes aux Qols et comportant la substitution G143A, le gène *MgMfs1* codant pour un transporteur à MFS est surexprimé. Ce phénomène pourrait compenser la réduction de fitness liée à la modification du cytochrome b (Roohparvar, De Waard et al. 2007). Une autre hypothèse (également évoquée avec l'AOX) serait que les souches MDR peuvent survivre plus facilement aux traitements et ensuite développer des résistances fortes liées à des mutations dans le gène *cytb*.

6. CONCLUSION

Les fongicides agricoles actuellement disponibles et affectant les processus respiratoires représentent une part de marché importante et peuvent être subdivisés en deux grandes

catégories : les multisites et les unisites. Deux propriétés communes concernent la plupart d'entre eux : la polyvalence et une forte action préventive. Par contre, ils se différencient par leur dose d'utilisation - avantage aux unisites (environ 10 fois moins de matière active appliquée à l'hectare) – et pour la résistance : avantage aux multisites qui échappent à ce phénomène. A noter toutefois des différences notables entre les unisites :

- résistances mono (ou di) alléliques pour les Qols implantées pour de nombreux pathogènes majeurs
- résistances multigéniques et multialléliques vis-à-vis des SDHIs en émergence
- absence de résistance vis-à-vis des Qils dont l'utilisation est encore limitée.

En terme de mode d'action, les fongicides agricoles inhibant les complexes mitochondriaux II et III ont en commun d'empêcher la fixation de l'ubiquinol ou de l'ubiquinone au niveau des sites protéiques récepteurs de ce coenzyme. Un mode d'action similaire concerne les insecticides et acaricides inhibiteurs du complexe mitochondrial I (ex : roténone, fenazaquin, fenproximate, pyridabène, tebufenpyrad) (Leroux and Delorme 1997). Par ailleurs, dans le domaine agricole, les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse comme les triazines ou les urées substituées présentent des similitudes avec les inhibiteurs mitochondriaux précédents. En effet, ils se fixent sur la protéine D1 du photosystème II au niveau de laquelle la plastoquinone (une quinone similaire à l'ubiquinone) est réduite, avec ensuite pour conséquence un arrêt du transfert des électrons au niveau de la chaîne photosynthétique des membranes chloroplastiques (Rich 1996). Les connaissances récentes acquises sur ces récepteurs quinoniques chez les microorganismes, les champignons, les plantes et les animaux pourraient être mises à profit pour développer de nouveaux pesticides. Ainsi, des fongicides polyvalents inhibiteurs du complexe mitochondrial I ou de nouveaux Qils (par exemple des analogues structuraux de la funiculosine ou de l'ilicoline H) pourraient être recherchés. Toutefois, concernant les phénomènes de résistance, même une connaissance fine des interactions fongicides/cible ne permet pas d'évaluer *a priori* les risques encourus. Quant à la mise au point de molécules multisites utilisables à des doses faibles, elle apparaît problématique tant sous l'angle de la sélectivité que de l'efficacité et finalement doit on continuer à rechercher des fongicides et plus généralement des fongicides agricoles inhibant une fonction aussi générale et vitale pour tous les organismes qu'est la respiration cellulaire ?

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme Jocelyne Bach pour la réalisation des figures de synthèse et des tables de molécules chimiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Avenot, H., D. P. Morgan, et al. (2008). "Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine (R) (pyraclostrobin plus boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California." *Plant Pathology* 57(1): 135-140.
- Bartlett, D. W., J. M. Clough, et al. (2002). "The strobilurin fungicides." *Pest Management Science* 58(7): 649-662.
- Brasseur, G., A. S. Saribas, et al. (1996). "A compilation of mutations located in the cytochrome b subunit of the bacterial and mitochondrial bc(1) complex." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1275(1-2): 61-69.
- de Waard, M., A. C. Andrade, et al. (2006). "Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence." *Pest Management Science* 62(3): 195-207.
- Esser, L., B. Quinn, et al. (2004). "Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for the cytochrome bc(1) complex." *Journal of Molecular Biology* 341(1): 281-302.

Fernandez-Ortuno, D., J. A. Tores, et al. (2008). "Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene." *Pest Management Science* 64(7): 694-702.

Fisher, N. and B. Meunier (2008). "Molecular basis of resistance to cytochrome bc(1) inhibitors." *Fems Yeast Research* 8(2): 183-192.

Gauthier, C., C. Aumont, et al. (2009). BAS 650F : caractérisation d'une molécule issue d'une nouvelle famille chimique pour la lutte contre les Oomycètes. 9ème conférence internationale sur les maladies des plantes. AFPP. Tours, France.

Gisi, U. and H. Sierotzki (2008). "Fungicide modes of action and resistance in downy mildews." *European Journal of Plant Pathology* 122(1): 157-167.

Gisi, U., H. Sierotzki, et al. (2002). "Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides." *Pest Management Science* 58(9): 859-867.

Glättli, A., G. Stammler, et al. (2009). Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 α -demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity -structural insights from molecular modelling. 9ème conférence internationale sur les maladies des plantes. AFPP. Tours, France.

Hagerhall, C. (1997). "Succinate: Quinone oxidoreductases - Variations on a conserved theme." *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1320(2): 107-141.

Horsefield, R., V. Yankovskaya, et al. (2006). "Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) - A mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction." *Journal of Biological Chemistry* 281(11): 7309-7316.

Huang, L. S., G. Sun, et al. (2006). "3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by Complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 281(9): 5965-5972.

Ishii, H. (2008). "Fungicide research in Japan - An overview." In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*, ed. by Dehne DW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE and Lyr H. BCPC, Alton, Hants, UK.

Ishii, H., J. Fountaine, et al. (2009). "Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry." *Pest Management Science* 65(8): 916-922.

Kuhn, P. (1984). Mode of action of carboxamides. Mode of action of antifungal agents. A. Trinci and J. Ryley. Cambridge, England, Cambridge University Press: 155-183.

Kulka, M. and B. Von Schmeling (1995). Carboxin fungicides and related compounds. Modern selective fungicides, Jena, Germany, Gustav Fisher Verlag.

Leroux, P. and R. Delorme (1997). "Cellular respiration: always a topical target for different groups of pesticides." *Phytoma* 49(494): 17-23.

Leroux, P., M. Gredt, et al. (2009). "Resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold." Submitted.

Oyedotun, K. S. and B. D. Lemire (2004). "The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase - Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies." *Journal of Biological Chemistry* 279(10): 9424-9431.

Rich, P. R. (1996). "Quinone binding sites of membrane proteins as targets for inhibitors." *Pesticide Science* 47(3): 287-296.

Roohparvar, R., M. A. De Waard, et al. (2007). "MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides." *Fungal Genetics and Biology* 44(5): 378-388.

Sauter, H., W. Steglich, et al. (1999). "Strobilurins: Evolution of a new class of active substances." *Angewandte Chemie-International Edition* 38(10): 1329-1349.

Shima, Y., Y. Ito, et al. (2009). "Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*." *Fungal Genetics and Biology* 46(1): 67-76.

Stammler, G. (2008). "Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity." Abstracts of the 18th Symposium of Research Committee on Fungicide Resistance, April 29th 2008, Matsue, Japan: 30-43.

Stammler, G., B. Brix, et al. (2008). Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. 15th International Reinhardtsbrunn Symposium. Friedrichroda, Germany. Modern Fungicides and Antifungal Compounds V.

Steinfeld, U., H. Sierotzki, et al. (2001). "Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*." Pest Management Science 57(9): 787-796.

Von Schmeling, B. and M. Kulka (1966). "Systemic fungicidal activity of 1,4-oxathiin derivatives." Science 152: 628-632.

Walker, A. S., C. Auclair, et al. (2009). "First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains." Pest Management Science 65(8): 906-915.

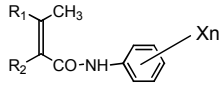
White, G. A. and S. G. Georgopoulos (1992). Target sites of carboxamides. Target sites of fungicides action. W. Kollen. Boca Raton, FL USA, CRC Press: 1-29.

Wood, P. M. and D. W. Hollomon (2003). "A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q(o) site of Complex III." Pest Management Science 59(5): 499-511.

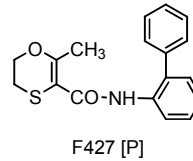
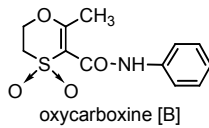
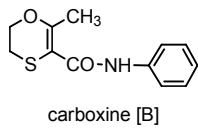
Yankovskaya, V., R. Horsefield, et al. (2003). "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation." Science 299(5607): 700-704.

Figure 3 : Structure d'inhibiteurs respiratoires du complexe mitochondrial II polyvalents [P] ou spécifiques de Basidiomycètes [B]
 Figure 3: Structure of respiration inhibitors of mitochondrial complex II

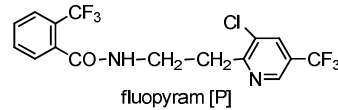
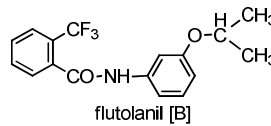
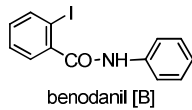
1 - Cis-crotonanilides



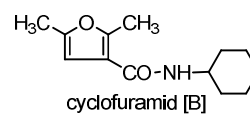
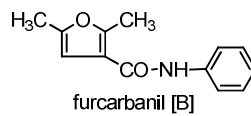
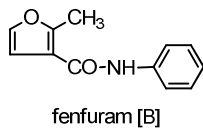
11 - oxathiin-carboxamides



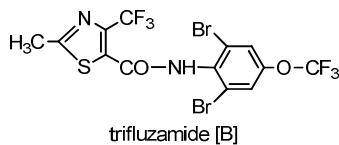
12 – benzamides



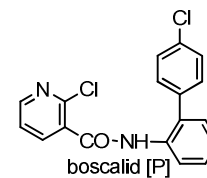
13 - furan-carboxamides



14 - thiazole-carboxamide



15 - pyridine-carboxamide



2 - N-methylpyrazole carboxamides

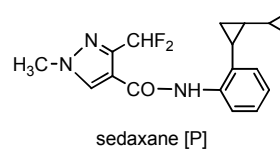
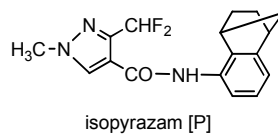
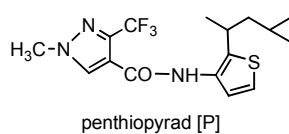
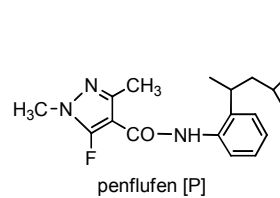
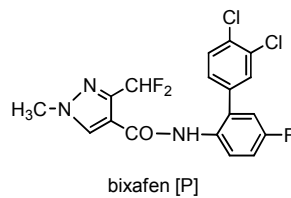
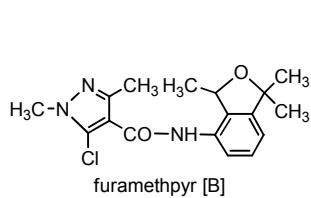
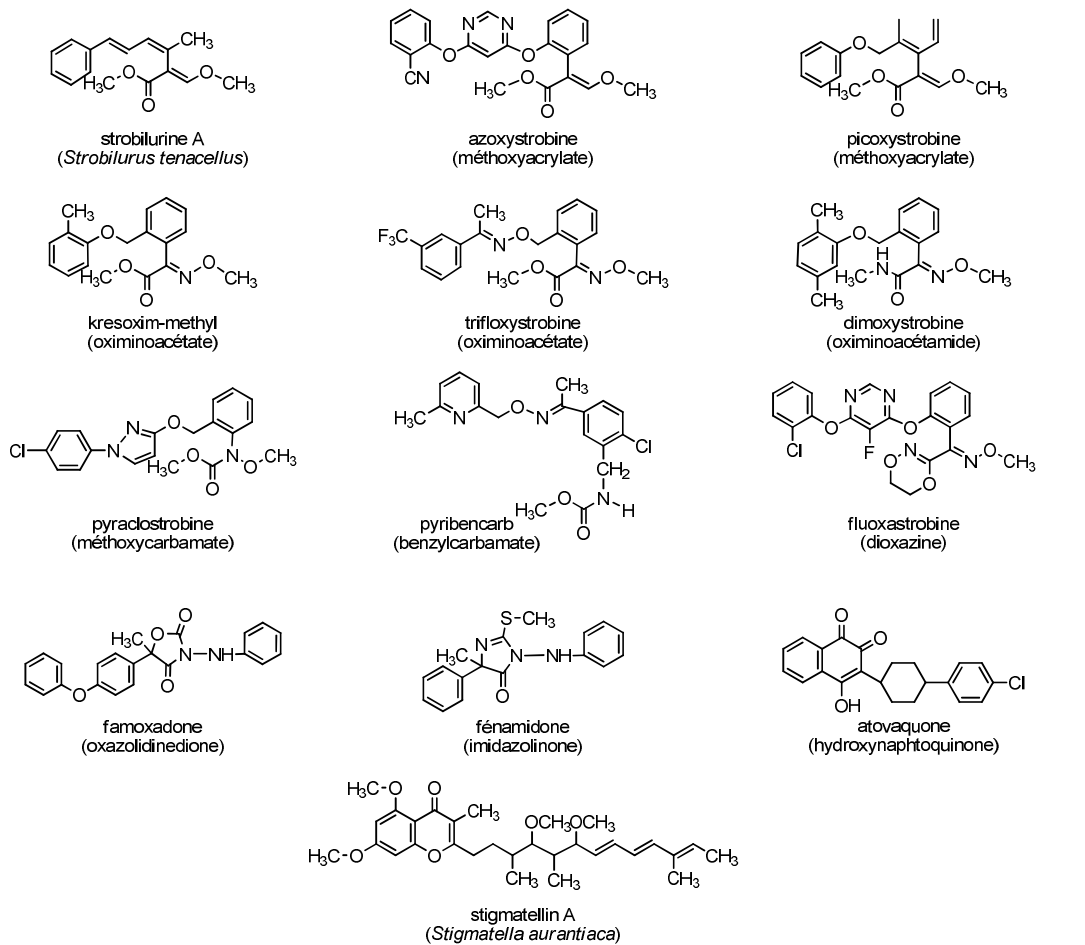


Figure 4 : Structures d'inhibiteurs du complexe mitochondrial III
 Figure 4: Structures of mitochondrial complex III inhibitors

1 - Qol ou P



2 - Autres inhibiteurs du complexe III

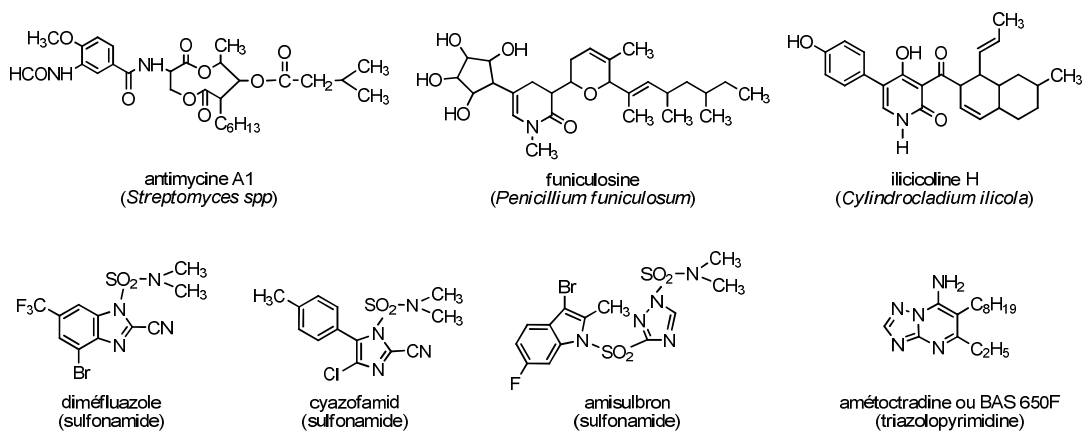


Figure 1 : Cibles des fongicides affectant les processus respiratoires
 Figure 1: Targets of fungicides affecting respiration

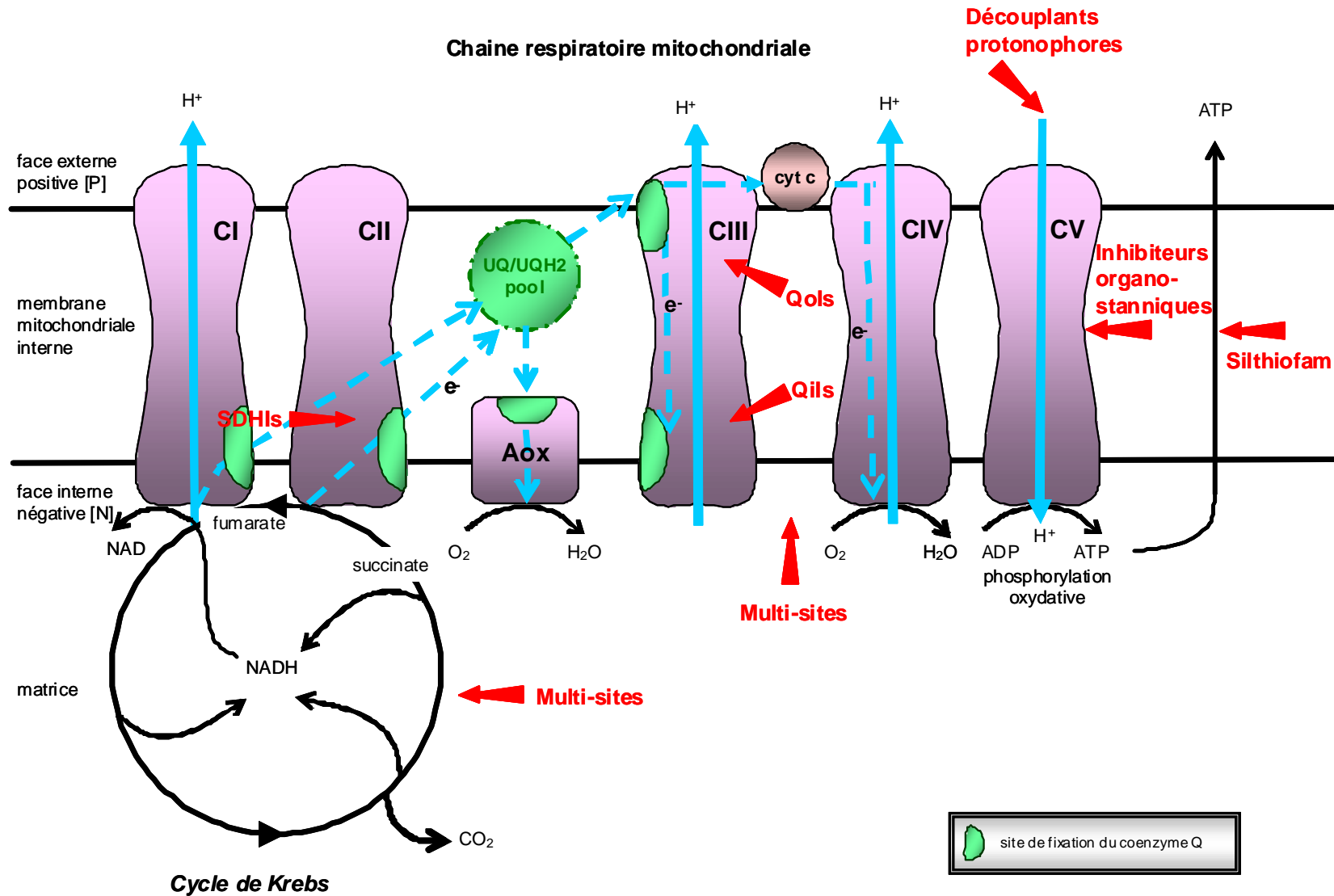


Figure 2 : Structure des complexes respiratoires mitochondriaux II et III
 Figure 2: Structures of mitochondrial respiration complexes II and III

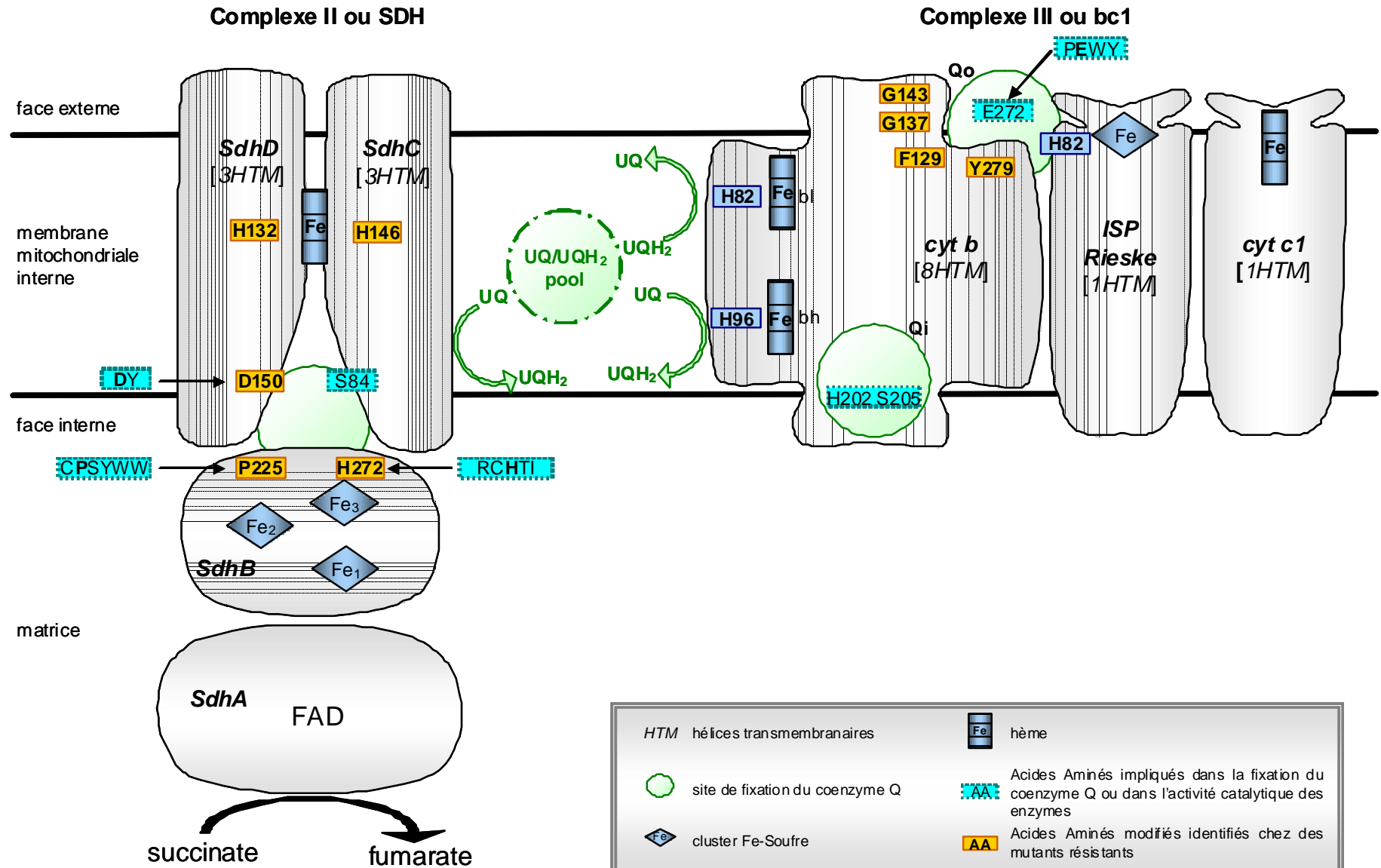


Tableau I : Classification des inhibiteurs du complexe mitochondrial III (Esser, Quinn et al. 2004)

Table I: Classification of respiration inhibitors of mitochondrial complex III

| Nomenclature ^a | | Famille chimique ou origine | Inhibiteurs du complexe III ^b | Interaction avec acides-aminés du cytochrome b | | | | | | | | ISP | |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
| Classe | Sous-classe | | | 1 2 9 | 1 3 3 | 1 3 9 | 1 4 3 | 1 4 4 | 1 4 6 | 1 4 7 | 2 7 1 | 2 7 9 | Confi- guration |
| Qol ou P (positif) | Pf (fixe) ou distal | Produits naturels | Stigmatelline A | + | | | | | | | | fixe | + |
| | | Duoxobenzothiazoles | HHDBT, UHDBT | - | - | + | + | - | + | + | + | | |
| | Naftaquinones | UHNQ, Atovaquone | | | | | | | | | | | |
| | Pm (mobile) ou proximal | Oxazolidinodione | Famoxadone | + | - | + | + | + | + | + | + | fixe | - |
| | | Imidazolines | Fenamidone | | | | | | | | | | |
| | | Produits naturels | Myxothiazol, oudemansine A | + | + | - | + | + | - | + | + | mobile | - |
| | | Strobilurines | Strobilurine A, azoxystrobine, krésoxim-méthyl, trifloxystrobine... | | | | | | | | | | |
| Qil ou N (négatif) | - | Produits naturels | Antimycine A, Ilicicoline H | - | - | - | - | - | - | - | - | normale | - |
| | | Urées substituées | Diuron | | | | | | | | | | |
| | | Sulfonamides | Dimefluazole, cyazofamide, amisulbron | | | | | | | | | | |
| Qoil ou PN | - | Produits naturels | Funiculosine | - | - | + | + | - | + | + | + | fixe | + |
| | | Hydroxyquinoléines | NQNO | | | | | | | | | | |

^a Qol / P : Inhibiteurs interagissant avec le site de fixation du coenzyme Q, localisé sur la face externe (o=out, terme anglais pour extérieur) de la membrane mitochondriale chargée positivement

Qil / N : Inhibiteurs interagissant avec le site de fixation du coenzyme Q localisé sur la face interne de la membrane mitochondriale chargée négativement

Pf : Inhibiteurs rendant la sous-unité ISP fixe et se fixant loin (« distal ») de l'hème bl

Pm : Inhibiteurs rendant la sous-unité ISP mobile et se fixant près (« proximal ») de l'hème bl

^b HHDBT : 5-hexyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazole ; UHDBT : 5-undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol ; UHNQ : 3-undecyl-2-hydroxynaphtoquinone ; NQNO : 2-nonyl-4-hydroxyquinoléine – La triazolepyrimidine ametoctradine (ou BASF 650F) développée comme anti-oomycete non indiquée dans le tableau pourrait être un Qil ou un Qoil

**LA RESISTANCE AUX FONGICIDES DE TYPE MDR (MULTIDRUG RESISTANCE) CHEZ
LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES : MYTHE OU REALITE ?**

P. LEROUX et A.-S. WALKER*

INRA UMR BIOGER-CPP, Avenue Lucien Bretignières, F78850 Thiverval-Grignon
*walker@versailles.inra.fr

RESUME

La plupart des cas de résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides résulte d'une modification qualitative de leurs cibles. Ce phénomène concerne généralement une classe de substance active de même mode d'action (ex : phénylamides, benzimidazoles, Qols). A coté de ces résistances « spécifiques », il existe également des résistances multiples de type MDR (**M**ulti**D**rug **R**esistance) qui résultent de la surproduction de transporteurs membranaires qui excrètent des molécules toxiques variées. Ce phénomène bien connu pour les antifongiques médicaux est moins fréquent chez les champignons phytopathogènes. Toutefois, il a été identifié en France chez la pourriture grise de la vigne ainsi que chez deux maladies des céréales : la septoriose et le piétin-verse.

Mots-clés : résistance, MDR, fongicides, champignon phytopathogène

SUMMARY

MULTIDRUG RESISTANCE TO FUNGICIDES IN PHYTOPATHOGENIC FUNGI

In phytopathogenic fungi, resistance to fungicides is often determined by a qualitative modification of their target sites. This specific resistance generally concerns a single class of active ingredients with a similar mode of action (eg: phenylamides, benzimidazoles, Qols). Another less frequent phenomenon is referred to as multidrug resistance (MDR) and concerns a wide range of toxicants. It is determined by the overexpression of membrane-spanning efflux pumps. The characteristics of MDR field strains and their distribution in France will be presented for *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mold on grapevine and two pathogens of wheat: *Oculimacula yallundae* and *Mycosphaerella graminicola*.

Keywords: resistance, MDR, fungicides, phytopathogenic fungus

1-INTRODUCTION

La lutte chimique contre les champignons phytopathogènes est pratiquée depuis deux siècles et elle s'est particulièrement développée après la seconde guerre mondiale avec l'avènement des fongicides organiques de synthèse. La première génération constituée de molécules multisites (ex : phtalimides, dithiocarbamates) a pris le relai de préparations minérales à base de cuivre et de soufre. A la fin des années 1960, de nouvelles matières actives performantes et systémiques sont apparues (ex : benzimidazoles, carboxamides). Cette nouvelle génération de fongicides agricoles, comme d'ailleurs tous ceux développés depuis (ex : phénylamides, IDMs, Qols) sont des molécules unisites qui ont la propriété de se lier à une protéine impliquée dans un processus métabolique majeur (ex : respiration, division cellulaire, biosynthèse des stérols). Avec un tel mode d'action, les champignons traités par un fongicide (ou une classe de fongicides) va pouvoir d'adapter par l'intermédiaire d'une ou plusieurs mutations du gène codant pour sa protéine cible. Ce phénomène entraînant le changement d'un (ex : G143A sur le cytochrome b, la cible des Qols) ou plusieurs acides aminés (ex : chez CYP51, la cible des IDMs) induit une réduction d'affinité du fongicide pour sa cible. Dans ces conditions, il y aura souvent résistance croisée entre toutes les molécules ayant le même mode d'action biochimique.

Parmi les autres mécanismes de résistance, il y a d'une part la détoxification accrue des fongicides, et d'autre part, une pénétration intracellulaire réduite. Le premier mécanisme, peu fréquent chez cette classe de pesticides, se rencontre par contre fréquemment pour les herbicides et surtout les insecticides. Parmi ces derniers, via notamment des monooxygénases à cytochrome P450, il peut y avoir résistance croisée entre des matières actives de mode d'action différents (ex : carpocapse du pommier). Le second mécanisme, qui est corrélé à une moindre concentration intracellulaire des fongicides, résulte notamment de la production accrue de transporteurs membranaires capables d'excréter une grande variété de molécules toxiques. Cette résistance simultanée à plusieurs inhibiteurs est généralement dénommée MDR (MultiDrug Resistance) et dans le cas de la levure, elle est qualifiée de PDR (Pleiotropic Drug Resistance). Ce phénomène a été décrit pour la première fois pour des antitumoraux chez les mammifères. Il est également observé dans le domaine médical, en conditions pratiques d'emploi pour des antibactériens et antifongiques. Deux types de transporteurs membranaires peuvent être impliqués : il s'agit de transporteurs à ABC (ATP-Binding Cassette) qui utilisent l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP, et des transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) fonctionnant grâce au gradient électrochimique existant au niveau de la membrane cytoplasmique (de Waard, Andrade et al. 2006; Gulshan and Moye-Rowley 2007). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, un pathogène fongique humain, la production des transporteurs est sous la dépendance de facteurs de transcription qui se lient à la partie promotrice des gènes codant ces transporteurs. Chez les souches résistantes, la surproduction résulte soit de mutations dans le facteur de transcription, soit de modifications des promoteurs des gènes codant les transporteurs. Par ailleurs, il a été montré récemment que les molécules fongitoxiques concernées par la MDR étaient capables de se fixer sur les facteurs de transcription (Thakur, Arthanari et al. 2008).

Sur un plan pratique, dans le domaine médical, la résistance MDR s'observe chez différents pathogènes fongiques appartenant aux genres *Candida* et *Aspergillus* et concerne particulièrement des triazoles de type IDMs (Gulshan and Moye-Rowley 2007). Dans le domaine agricole, de nombreux travaux menés par M. De Waard de l'université de Wageningen aux Pays Bas sur *Botrytis cinerea* et *Mycosphaerella graminicola*, chez des mutants de laboratoire ont montré que cette résistance MDR pouvait concerner les IDM mais aussi d'autres classes de fongicides (ex : phénylpyrroles, Qols)(de Waard, Andrade et al. 2006). Quant aux investigations au champ, elles n'ont pu démontrer l'existence de ce phénomène que dans un nombre limité de cas. Trois d'entre eux chez *B. cinerea*, *M. graminicola* et *Oculimacula yallundae* ont été détectés en France ; un dernier cas concernant

Penicillium italicum et impliquant un transporteur à ABC a été signalé au Japon. L'objectif de cet article est de faire le point sur la résistance de type MDR rencontrée en France chez la pourriture grise de la vigne, le piétin-verse et la septoriose du blé.

2-MATERIEL ET METHODE

2-1 Souches fongiques

Les souches d'*O. yallundae* isolées à partir de la base de tiges de blé et présentant des symptômes caractéristiques du piétin-verse sont issus d'essais conduits en France. Elles sont maintenues sur un milieu à base de farine de maïs, à 15°C ; la sporulation est induite sous-éclairage en lumière noire.

Les souches de *B. cinerea* ont été collectées principalement dans le vignoble champenois au moment des vendanges, à partir de baies atteintes de pourriture grise. Elles sont maintenues sur un milieu à base de malt et d'extrait de levure, à 19°C ; la sporulation est induite sous éclairage en lumière blanche.

Les souches de *M. graminicola* isolées à partir de feuilles de blé portant des pycnides sont issues d'essais conduits en France. Elles sont maintenues sur un milieu à base de malt et d'extrait de levure, à 19°C et à l'obscurité.

Pour *P. yallundae* et *M. graminicola*, la nomenclature et les caractéristiques des divers phénotypes TriR résistants aux IDMs sont précisés dans la littérature (Leroux, Gredt et al. 2006; Leroux, Albertini et al. 2007).

2-2 Essais fongicides

L'effet des fongicides sur la croissance mycélienne de *B. cinerea* et *O. yallundae* est étudiée après dépôt d'implants mycéliens calibrés sur un milieu de culture gélosé à base de glucose, de sels minéraux et d'extrait de levure et comportant diverses concentrations des molécules testées. Des mesures journalières (*B. cinerea*) ou hebdomadaires (*O. yallundae*) des diamètres des colonies mycéliennes permettent d'estimer la vitesse de croissance pour chaque condition expérimentale puis la concentration inhibant de 50% la vitesse de croissance mycélienne (CI₅₀ « mycélium »).

L'effet des fongicides sur l'élongation des filaments des trois champignons est étudié après dépôt d'une suspension de spores à la surface d'une eau gélosée (*O. yallundae*) ou d'un milieu gélosé à base de sucre et de phosphates (*B. cinerea* et *M. graminicola*). Après incubation de 1 ou 2 jours (19°C, obscurité), la longueur moyenne des tubes germinatifs est évaluée sous microscope à l'aide d'un micromètre oculaire. Pour chaque matière active, les essais conduits sur une gamme de concentration permettent d'estimer la concentration inhibant de 50% l'élongation des tubes germinatifs (CI₅₀ « tubes germinatifs »).

Pour *B. cinerea* et *M. graminicola*, sur la base des essais sur spores, l'utilisation d'un milieu de culture à base de malt et d'extrait de levure et une incubation de 5 à 7 jours permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du développement fongique.

Pour tous les essais *in-vivo*, les niveaux de résistance sont obtenus en calculant les rapports CI₅₀ ou CMI « souches résistantes » / CI₅₀ ou CMI « souches sensibles ».

2-3 Analyses de populations fongiques

Au niveau populationnel, des prélèvements portant sur 15 à 30 organes végétaux malades par parcelle sont analysés après isolement (*O. yallundae*) ou non (*B. cinerea*, *M. graminicola*) des souches. Celles-ci sont caractérisées par des tests sur spores en utilisant des doses discriminantes de fongicides de modes d'action différents.

3-RESULTATS ET DISCUSSION

3-1 Pourriture grise de la vigne

Au moment de l'introduction des anilopyrimidines (ex : pyriméthanil, cyprodinil) et des phénylpyrroles (ex : fludioxonil) au début des années 1990s, nous avons constaté la présence de souches de *B. cinerea* faiblement résistantes à ces deux anti-*Botrytis* (Leroux, Chapeland et al. 1999). Ce phénomène concerne en fait la plupart des fongicides utilisés contre la pourriture grise, ainsi que des inhibiteurs stéroliques comme les IDM ou le tolnaftate (cette molécule à usage médical affecte la squalène-époxydase). En outre, cette multi-résistance exprimée lors d'essais conduits sur spores l'est peu ou pas du niveau du mycélium (tableau I)(Leroux, Chapeland et al. 1999). Dans une première phase, nous avons, en fonction de leurs spectres de résistance croisée, identifié deux phénotypes MDR1 (peu sensible au fluazinam et au fludioxonil) et MDR2 (peu sensible au fenhexamid, aux DMIs et au boscalid). Pour chacun d'entre eux, la résistance est déterminée par un gène chromosomique et les souches MDR3 récemment détectées au vignoble et présentant le spectre de résistance croisée le plus étendu sont des double mutants (tableau I).

Les recherches conduites en collaboration avec l'équipe de M. Hahn de l'université de Kaiserslautern en Allemagne ont permis de caractériser le mécanisme moléculaire de cette multirésistance de type MDR. Les souches MDR1 surexpriment l'ABC transporteur BcatrB, identifié antérieurement chez des mutants sélectionnés sur du fludioxonil (de Waard, Andrade et al. 2006; Kretschmer, Walker et al. 2008; Kretschmer, Leroch et al. 2009). En fait, ce phénomène résulterait de mutations dans un gène codant un facteur de transcription qui se lie au promoteur du gène *BcatrB*. Un mécanisme similaire est observé en milieu médical chez des souches de *C. albicans* résistantes aux IDMs (Gulshan and Moye-Rowley 2007). Concernant les souches MDR2, un transporteur à MFS est surexprimé suite à des changements dans le promoteur du gène codant ce transporteur. Les deux mécanismes décrits précédemment sont impliqués pour les isolats multirésistants MDR3 (Kretschmer, Leroch et al. 2009).

Cette multirésistance de type MDR est décelée dans de nombreux vignobles européens mais elle est très fortement implantée en Champagne depuis quelques années (Leroux, Gredt et al. 2006). Ainsi, globalement, elle concerne la moitié des populations champenoises de *B. cinerea* avec actuellement une répartition à peu près équivalente des trois phénotypes (figure 1). Ces souches MDR sont sélectionnées par les programmes anti-*Botrytis* et il semble qu'elles présentent une fitness un peu moindre que les souches non MDR. L'impact pratique sur l'efficacité de la lutte chimique dans le vignoble champenois apparaît réduit. Il convient enfin de noter que la plupart de ces souches MDR ne présentent pas de résistance spécifique vis-à-vis des anti-*Botrytis* récents (ex : anilopyrimidines, fenhexamid, carboxamides).

3-2 Piétin-verse des céréales

La lutte chimique contre le piétin-verse a été initiée dans les années 1970 avec l'utilisation des benzimidazoles et des thiophanates. Puis la généralisation de la résistance vis-à-vis de ces antimicrotubules a entraîné leur remplacement par des IDM du groupe des triazoles (ex : époxyconazole, flusilazole) ou des imidazoles (ex : prochloraze). Des résistances ont également touché ces inhibiteurs stéroliques et le cyprodinil (une anilopyrimidine affectant la biosynthèse d'acides aminés soufrés) a pu remplacer les IDMs dans les régions particulièrement concernées. Au début des années 2000, trois nouveaux fongicides anti piétin-verse ont vu le jour. Il s'agit de la métrafénone, du boscalid et du prothioconazole. Ces deux dernières molécules, du fait de leur forte fongitotoxicité *in vitro* ont retenu notre attention. Le boscalid est une carboxamide inhibitrice de la succinate deshydrogénase (SDHI) alors que le prothioconazole est un IDM proche des triazoles mais comportant un groupement triazolínethione. A noter que chez *Oculimacula sp.*, cet inhibiteur stérolique ne présente pas de résistance croisée avec les triazoles ou le prochloraze (Leroux, Gredt et al. 2006).

A partir du début des années 2000, la surveillance des populations françaises d'*Oculimacula* sp. nous a permis de détecter des souches présentant une résistance simultanée au boscalid et au prothioconazole. Ce phénomène est plus prononcé dans le cas d'essais conduits sur spores que sur mycélium et il concerne également d'autres inhibiteurs stéroïques comme le tolnaftate, le fenhexamid et probablement le prochloraze ainsi que le cyprodinil. Pour l'instant, cette résistance de type MDR n'a pas été observée chez *O. aciformis* et au vu de l'effet de certains triazoles (ex : triadiménol), elle s'est probablement développée chez *O. yallundae* au sein du type TriR1 (tableau II) (Leroux, Gredt et al. 2006). En fait, ces souches MDR d'*O. yallundae* présentent un spectre de résistance proche des souches MDR2 de *B. cinerea* qui, comme précisé plus haut, impliquent la surexpression d'un transporteur à MFS.

Ces souches MDR d'*O. yallundae* ont été détectées dans plusieurs régions françaises et dans la plupart des cas, à des fréquences faibles. Les quelques échantillons présentant plus de 25% de MDR venaient de sites d'essais pluriannuels traités au boscalid (nous ne disposons pas de telles modalités avec le prothioconazole). A noter que globalement, la situation est assez similaire pour la résistance spécifique aux anilinopyrimidines (AniR1) et, les quelques échantillons présentant plus de 25% de souches AniR1 étaient issues de parcelles traitées au cyprodinil (tableau III) (Leroux, Gredt et al. 2006).

3-3 Septoriose du blé

Pour la septoriose du blé, les investigations conduites en laboratoire montrent qu'au moins 5 ABC transporteurs (MgAtr1-MgAtr5) pourraient moduler la toxicité des IDMs. Toutefois, pour des isolats collectés au champ, aucune corrélation n'a été observée entre les réponses biologiques (niveaux de résistance), l'accumulation intracellulaire de fongicides et l'expression des ABC transporteurs (Stergiopoulos, van Nistelrooy et al. 2003; Cools, Fraaije et al. 2005). Très récemment, l'implication d'un transporteur à MFS (MgMFS1) susceptible de moduler l'activité des IDMs, des strobilurines et de molécules naturelles a également été démontrée en laboratoire. Les études réalisées sur des souches collectées au champ montrent que la plupart présentant une résistance spécifique aux strobilurines (avec changement G143A du cytochrome b) ont un niveau d'expression du MgMFS1 supérieur à celui des souches sensibles. Il convient de noter qu'aucune différence n'existe entre des souches fortement et très fortement résistantes aux strobilurines et que par ailleurs, certaines souches très fortement résistantes ont un profil d'expression identique à des souches sensibles (Roohparvar, De Waard et al. 2007). Au vu de l'ensemble de ces résultats, il n'y a aucune démonstration formelle indiquant que chez *M. graminicola* la résistance aux IDMs et/ou aux Qols serait polygénique chez des isolats collectés au champ.

Or, en 2008 puis en 2009, nous avons détecté dans plusieurs régions céréalières françaises des souches de *M. graminicola* présentant un profil de résistance MDR. A noter que tout d'abord elles possèdent des résistances spécifiques aux Qols et aux IDMs déterminées par des mutations dans les cibles respectives de ces deux fongicides. Une de leur première caractéristique, identique à celle observée chez *B. cinerea* et *O. yallundae*, est leur résistance au tolnaftate. Il convient de noter également pour ces trois parasites une sensibilité réduite vis-à-vis du boscalid mais pas de la carboxine (SDHIs). Concernant les strobilurines et les IDMs, la résistance est augmentée d'un facteur de 2 à 10 par rapport aux souches présentant une résistance de cible de type TriR6 (tableau IV) (Leroux, Albertini et al. 2007). Des travaux sont en cours pour déterminer les bases moléculaires de cette MDR. En 2008 et 2009, ces souches ont été décelées respectivement dans 3% et 13% des échantillons analysés dans notre laboratoire, indiquant une légère progression du phénomène. Toutefois, dans la majorité des cas, les fréquences de ces souches sont inférieures à 10% et en 2009, sur un total de 1065 échantillons analysables, 21 présentaient des fréquences supérieures ou égales à 10% et seul un échantillon dépassait 25%. Ces souches MDR ont été décelées principalement dans les régions du Nord de la Loire (région Centre incluse) (tableau V).

CONCLUSION

Grace à une caractérisation phénotypique adaptée, basée principalement sur l'effet de divers fongicides sur l'élongation des filaments germinatifs émis par les spores, nous avons démontré l'existence de résistances MDR en conditions naturelles chez l'agent de la pourriture grise de la vigne, ainsi que ceux responsables du piétin-verse et de la septoriose du blé. Chez *B. cinerea*, les bases moléculaires de cette MDR ont été caractérisées et impliquent la surexpression d'un transporteur de type ABC et/ou MFS ; ceux intervenant chez les pathogènes du blé ne sont pas connus. En pratique, au vu de la situation dans le vignoble champenois, il semble que ces résistances MDR seules aient un impact limité sur l'efficacité des fongicides anti-*Botrytis*. Par contre, dans le cas de *M. graminicola*, il conviendra de déterminer pour les IDMs (et peut-être un jour pour les SDHIs) l'impact d'une sélection de souches combinant une résistance spécifique de cible et d'une MDR (situation de résistance polygénique). Enfin, des essais préliminaires réalisés au laboratoire sur *B. cinerea* et *M. graminicola* ont montré que certaines substances rétablissaient l'activité des fongicides. De tels modulateurs, dont certains sont développés dans le domaine médical, pourraient également être associés à des fongicides agricoles (Roohparvar, Huser et al. 2007) et se comportent comme les synergistes utilisés dans la lutte insecticide et qui sont des inhibiteurs d'enzymes de détoxification à P450. Une autre approche pourrait consister à empêcher la fixation des fongicides sur les facteurs de transcription à l'origine de la surproduction des transporteurs. A noter que dans le domaine animal, cette approche pourrait également permettre de diminuer la pénétration intracellulaire et la détoxification des xénobiotiques car certains facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de gènes codant des transporteurs et des enzymes à P450 (Thakur, Arthanari et al. 2008).

BIBLIOGRAPHIE

- Cools, H. J., B. A. Fraaije, et al. (2005). Molecular examination of *Septoria tritici* isolates with reduced sensitivities to triazoles. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*. Rheinhardtbrunn, Germany: 103-113.
- de Waard, M., A. C. Andrade, et al. (2006). "Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence." *Pest Management Science* **62**(3): 195-207.
- Gulshan, K. and W. S. Moye-Rowley (2007). "Multidrug resistance in fungi." *Eukaryotic Cell* **6**(11): 1933-1942.
- Kretschmer, M., M. Leroux, et al. (2009). "Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mold fungus *Botrytis cinerea*." *Plos Pathogens*, Accepted.
- Kretschmer, M., A. Walker, et al. (2008). "Overexpression of efflux transporters leads to multidrug resistance in *Botrytis cinerea* field strains." *Journal of Plant Pathology* **90**(2, Supplement): 465.
- Leroux, P., C. Albertini, et al. (2007). "Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 alpha-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*." *Pest Management Science* **63**(7): 688-698.
- Leroux, P., F. Chapeland, et al. (1999). "Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards." *Crop Protection* **18**(10): 687-697.
- Leroux, P., M. Gredt, et al. (2006). Caractéristiques et distribution des souches résistantes aux fongicides chez les agents responsables du piétin-verse du blé en France. 8ème conférence internationale sur les maladies des plantes. AFPP. Tours, France.
- Leroux, P., M. Gredt, et al. (2006). "*Botrytis* de la vigne et neuf sortes de fongicides : distribution des souches résistantes en Champagne." *Phytoma - La Défense des Végétaux* **599**: 22-27.
- Roohparvar, R., M. A. De Waard, et al. (2007). "MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong

protectant against natural toxic compounds and fungicides." *Fungal Genetics and Biology* **44**(5): 378-388.

Roohparvar, R., A. Huser, et al. (2007). "Control of *Mycosphaerella graminicola* on wheat seedlings by medical drugs known to modulate the activity of ATP-binding cassette transporters." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(15): 5011-5019.

Stergiopoulos, I., J. G. M. van Nistelrooy, et al. (2003). "Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*." *Pest Management Science* **59**(12): 1333-1343.

Thakur, J. K., H. Arthanari, et al. (2008). "A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi." *Nature* **452**(7187): 604-U4.

Tableau I: Niveaux de résistance à divers fongicides chez des phénotypes MDR de *Botrytis cinerea*^a

Table I: Resistance factors towards various fungicides in MDR phenotypes of *Botrytis cinerea*

| Fongicides | Elongation des filaments germinatifs (24h) | | | Développement fongique (5jours) | | Croissance mycélienne (7 jours) | |
|------------------|--|------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|
| | MDR1 | MDR2 | MDR3 | MDR1 | MDR2 | MDR1 | MDR2 |
| Pyrifénox | 2 | 13 | 20 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Prochloraze | 2 | 10 | 16 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Epoxiconazole | 1 | 10 | 15 | - | - | 1 | 1 |
| Tebuconazole | 1.5 | 9 | 15 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Prothioconazole | 1 | 4 | 5 | - | - | - | - |
| Tolnaftate | >50 | >50 | >50 | - | - | 3 | 1.5 |
| Fenhexamid | 1.5 | 8 | 12 | 1 | 3 | 1 | 1.5 |
| Cyprodinil | 10 | 3 | 32 | 75 | 3 | 3 | 3 |
| Pyriméthanil | 6 | 5 | 15 | 15 | 4 | 1.5 | 2 |
| Carboxine | 1 | 2 | 3 | - | - | - | - |
| Boscalid | 1 | 6 | 13 | - | - | - | - |
| Chlorothalonil | 1 | 1 | 1.5 | - | - | - | - |
| Azoxystrobine | 1.5 | 2 | 7 | - | - | - | - |
| Pyraclostrobin | 7 | 14 | 15 | - | - | - | - |
| Trifloxystrobine | 3 | 2 | 16 | - | - | - | - |
| Fludioxonil | 14 | 2 | 25 | 13 | 3 | 3 | 1 |
| Iprodione | 3 | 4 | 6 | - | - | 1 | 1 |

^a niveaux de résistance : CI_{50} MDR / CI_{50} souches sensibles pour élongation des filaments germinatifs et croissance mycélienne ou CMI MDR / CMI souches sensibles pour développement fongique (voir matériels et méthodes)

Tableau II : Niveaux de résistance à divers fongicides chez des phénotypes résistants aux IDM (TriR) ou MDR de *Oculimacula yallundae*^a

Table II: Resistance factors towards various fungicides in DMI-resistant or MDR phenotypes of *Oculimacula yallundae*

| Fongicides | Elongation des filaments germinatifs (48h) | | | Croissance mycélienne (3 semaines) | | |
|-----------------|--|-------|------------------------|------------------------------------|-------|---------------------|
| | TriR1 | TriR2 | MDR | TriR1 | TriR2 | MDR |
| Prochloraze | 2 | 400 | 100 (x50) ^b | 1.5 | 38 | 3 (x2) ^b |
| Epoxiconazole | 30 | 50 | 150 (x5) | 3.5 | 3.5 | 7 (x2) |
| Tébuconazole | 100 | 100 | 270 (x2.7) | 20 | 30 | 25 (x1.2) |
| Triadiménil | >60 | >60 | >60 (x ?) | >25 | >25 | >25 (x ?) |
| Prothioconazole | 1.5 | 1.5 | 45 (x30) | 3 | 2 | 5 (x1.3) |
| Tolnaftate | 1 | 1 | >25 (x >25) | - | - | - |
| Fenhexamid | 1 | 1 | 30 (x30) | 1.5 | 1 | 3 (x2) |
| Cyprodinil | 1 | 1 | 4 (x4) | - | - | - |
| Carboxine | 1 | 1 | 1 (x1) | 1 | 1 | 1 (x1) |
| Boscalid | 1 | 1 | 15 (x15) | 1 | 1 | 8 (x8) |

^a niveaux de résistance : CI_{50} TriR ou MDR / CI_{50} souches sensibles

^b entre parenthèses : CI_{50} MDR / CI_{50} TriR1

Tableau III : Distribution de la multirésistance MDR dans les populations françaises d'*Oculimacula yallundae*

Table III : Distribution of multidrug resistance in French populations of *Oculimacula yallundae*

| Année | Nombre total d'échantillons | % échantillons avec MDR | Nombre d'échantillons avec | | Départements concernés |
|-------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|----------|----------------------------|
| | | | >10% MDR | >25% MDR | |
| 2001 | 25 | 8 | 0 | 0 | 27, 62 |
| 2002 | 52 | 8 | 1 | 0 | 08, 51, 62 |
| 2003 | 50 | 18 | 2 | 0 | 17, 21, 27, 62, 91 |
| 2004 | 54 | 6 | 0 | 0 | 51, 76, 78 |
| 2005 | 37 | 8 | 0 | 0 | 78, 80 |
| 2006 | 28 | 10 | 0 | 2 | 76, 62 |
| 2007 | 57 | 25 | 1 | 1 | 14, 62, 76, 77, 80 |
| 2008 | 73 | 18 | 4 | 2 | 21, 51, 62, 76, 78, 80, 91 |

Tableau IV : Niveaux de résistance à divers fongicides chez des phénotypes résistants aux IDM (TriR) ou MDR chez *Mycosphaerella graminicola*^a

Table IV: Resistance factors towards various fungicides in DMI-resistant or MDR phenotypes of *Mycosphaerella graminicola*^a

| Fongicides | Elongation des filaments germinatifs (24h) | | | | Développement fongique (5 jours) | | | |
|------------------|--|--------------------|----------|-----------------|----------------------------------|-------|----------|----------------------|
| | TriR4 | TriR6 | TriR7-R8 | MDR | TriR4 | TriR6 | TriR7-R8 | MDR |
| Pyrifénox | 27 | 36 | 37 | 180 (x5) | 25 | 25 | 25 | 50 (x2) ^c |
| Prochloraz | 4 | 7 | 1 | 70 (x10) | 3 | 13 | 3 | 66 (x5) |
| Époxiconazole | 6 | 26 | 20 | 200 (x8) | 15 | 100 | 100 | 500 (x5) |
| Metconazole | 10 | 15 | 16 | 100 (x7) | 10 | 15 | 20 | 50 (x3) |
| Tébuconazole | 21 | 75 | 82 | 330 (x4) | 40 | 80 | 80 | >200 (>x2.5) |
| Prothioconazole | 4 | 8 | 7 | 20 (x2.5) | 1 | 4 | 8 | 16 (x4) |
| Tolnaftate | 1 | 1 | 1 | 30 (x30) | 1 | 1 | 1 | >10 (>x10) |
| Cyprodinil | 1 | 1 | 1 | 1.5 (x1.5) | - | - | - | - |
| Carboxine | 1 | 1 | 1 | 1 (x1) | 1 | 1 | 1 | 1 (x1) |
| Boscalid | 1 | 1 | 1 | 6 (x6) | 1 | 1 | 1 | 4 (x4) |
| Chlorothalonil | 1 | 1 | 1 | 1 (x1) | 1 | 1 | 1 | 1.5 (x1.5) |
| Azoxystrobine | - | [250] ^b | - | [>1000] (>x4) | - | - | - | - |
| Pyraclostrobin | - | [2000] | - | [>8000] (>x4) | - | - | - | - |
| Trifloxystrobine | - | [2000] | - | [>20000] (>x10) | - | - | - | - |

^a niveau de résistance CI_{50} TriR ou MDR / CI_{50} souches sensibles pour élongation des filaments germinatifs ou CMI TriR ou MDR / CMI souches sensibles pour développement mycélien (voir Matériel et Méthodes).

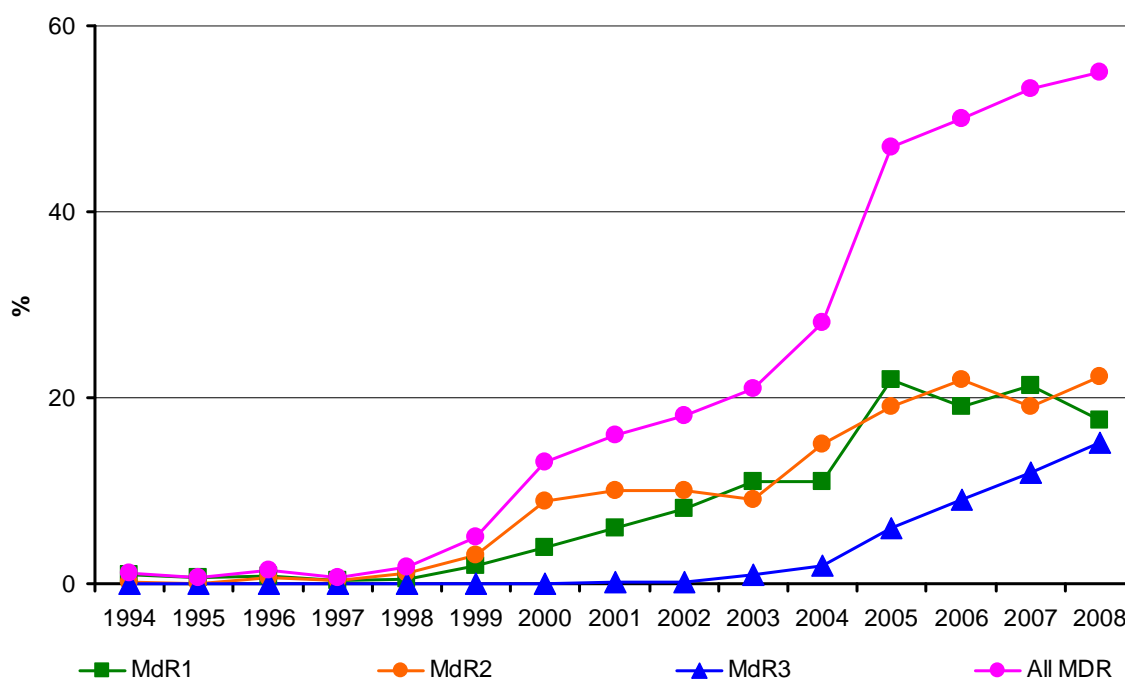
^b entre crochets, niveau de résistance CI_{50} souches résistantes aux strobilurines / CI_{50} souches sensibles

^c entre parenthèses, niveaux de résistance CI_{50} ou CMI MDR / CI_{50} ou CMI TriR6

Tableau V : Distribution de la multirésistance MDR dans les populations françaises de *Mycosphaerella graminicola*
 Table V: Distribution of multidrug resistance in French populations of *Mycosphaerella graminicola*

| Année | Nombre total d'échantillons | % échantillons avec MDR | Nombre d'isolats avec | | Départements concernés |
|-------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------|--|
| | | | > 10% MDR | > 25% MDR | |
| 2008 | 1260 | 3.4 | 0 | 0 | 02, 14, 18, 22, 35, 45, 51, 52, 54, 55, 59, 62, 76, 78, 80, 89, 95 |
| 2009 | 1065 | 13 | 21 | 1 | 01, 02, 08, 14, 18, 21, 22, 28, 35, 39, 41, 44, 45, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 59, 60, 62, 71, 76, 77, 78, 80, 89, 91 |

Figure 1 : Evolution de la multidrug resistance MDR chez *Botrytis cinerea* dans le vignoble champenois
 Figure 1: Evolution of multidrug resistance in *Botrytis cinerea* on grapevine in Champagne



**LA RESISTANCE DU MILDIU DE LA VIGNE AUX FONGICIDES :
RESULTATS DES PLANS DE SURVEILLANCE DE LA SOUS DIRECTION DE LA
QUALITE ET DE LA PROTECTION DES VEGETAUX DE 2005 A 2008**

C. MAGNIEN ⁽¹⁾ – A. MICOUD ⁽²⁾ – F. REMUSON ⁽²⁾ – J. GROSMAN ⁽³⁾

⁽¹⁾ DRAAF/SRAL BOURGOGNE – 8 Rue Jacques Germain – 21205 Beaune

⁽²⁾ AFSSA-URPP – 31 Avenue Tony Garnier – 69364 Lyon Cedex 07

⁽³⁾ DGAL-SDQPV-DRAAF/SRAL Rhône-Alpes – 165 Rue Garibaldi – 69401 Lyon Cedex 03

RESUME

Cette communication rapporte les résultats des plans de surveillance de la résistance du mildiou de la vigne à quatre familles chimiques : CAA, benzamides, phénylamides et QoI. Pour les CAA, il est confirmé une forte implantation de la résistance dans deux vignobles : l'Armagnac et la Provence. Dans les autres zones viticoles, il est souvent constaté une progression de la résistance qui s'est surtout produite en 2008 ; dorénavant, les populations sensibles ne se rencontrent plus que dans environ 50 % des situations.

Aucune dérive de sensibilité n'a été observée avec la zoxamide.

La résistance aux QoI reste généralisée et la fréquence des souches résistantes se maintient à un niveau élevé dans les populations testées. La résistance aux phénylamides demeure également bien implantée dans les vignobles, mais depuis les dernières analyses de 1999, les populations contenant peu de souches résistantes semblent progresser.

Mots-clés : mildiou, vigne, résistance, plan de surveillance

SUMMARY

GRAPE VINE DOWNY MILDEW RESISTANCE TO FUNGICIDES – RESULTS OF THE MONITORING DIRECTED BY THE SOUS DIRECTION DE LA QUALITE ET DE LA PROTECTION DES VEGETAUX BETWEEN 2005 AND 2008

This communication presents the results of the grapevine downy mildew resistance monitoring to four chemical families: CAA, benzamides, phenylamides and QoIs. Concerning the CAA, the resistance is strongly established in two French vineyard areas: Armagnac and Provence. In other winegrowing areas, resistance has been increasing, especially in 2008; from then on, sensitive populations are encountered only in half of the situations.

No sensitivity shift has been observed with the zoxamide.

The resistance to QoIs is still widespread and the resistant strains frequency remains high in the tested populations. The resistance to phenylamides remains also widespread in the vineyards; but since the last analyses in 1999, populations containing few resistant strains seem in progression.

Key-words: downy mildew, grapevine, resistance, monitoring

INTRODUCTION

Le plan national de surveillance des phénomènes de résistance, organisé par le Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche (Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux de la Direction Générale de l'Alimentation) est mis en œuvre dans le contexte des suivis de post-autorisation des produits phytosanitaires. Il a pour objet de recueillir des informations sur d'éventuelles dérives de sensibilité des champignons aux fongicides. En cas de réponse positive, des investigations complémentaires renseigneront sur les pertes d'efficacité susceptibles d'être engendrées par le développement de la résistance. La collecte de toutes ces données est primordiale pour redéfinir, si nécessaire, les conditions d'utilisation des produits phytosanitaires concernés, notamment par l'intermédiaire des notes nationales.

Dans cette communication, nous rapportons les résultats des plans de surveillance relatifs au mildiou de la vigne acquis sur la période 2005-2008. Ces plans ont concerné quatre familles de fongicides anti-mildiou : les CAA (Carboxylic Acid Amides), les benzamides, les QoI (Quinone outside inhibitors) et les phénylamides.

La sélection de la résistance au diméthomorphe (CAA) en France remonte à 1994. En 2003, une autre matière active (l'iprovalicarbe) appartenant à cette famille arrive sur le marché. L'importance de cette famille dans le marché des "anti-mildiou" et la présence de souches de mildiou résistantes ont justifié un suivi annuel du phénomène depuis 2004 pour apprécier son évolution.

Pour les benzamides dont le seul représentant est la zoxamide, l'intérêt de la surveillance est tout autre. Pour cette molécule dont le début de commercialisation date de 2003, aucun phénomène de résistance n'a encore été décelé. La surveillance vise donc à identifier précocement d'éventuelles dérives de sensibilité du mildiou à cette substance active. Elle a été organisée à partir de 2004.

Pour les deux autres familles, les phénylamides et les QoI, la problématique est encore différente puisque, pour chacune d'elles, la résistance du mildiou est très largement installée dans le vignoble français. Dans ces conditions, une surveillance annuelle ne s'impose pas mais un état des lieux doit être dressé à intervalle plus ou moins grand pour percevoir d'éventuelles évolutions de la situation. Une surveillance de ces deux familles a ainsi été programmée en 2008. Pour les phénylamides, les résultats obtenus sont comparés à ceux de 1999, pour le QoI à ceux de 2003.

Les plans de surveillance organisés au niveau national ont été mis en œuvre par les Services Régionaux de la Protection des Végétaux (SRPV) avec, dans certaines régions, la collaboration des Fédérations Régionales de Défense contre les Organismes Nuisibles (FREDON) et d'organismes professionnels. Les tests de résistance ont été réalisés par le laboratoire régional du SRPV Rhône-Alpes (1).

MATERIEL ET METHODE

NOMBRE, REPARTITION ET DATE DE PRELEVEMENTS

Sur la période 2005-2008, la priorité des plans de surveillance a porté sur la famille des CAA. Sur l'ensemble du vignoble français, ce sont environ 100 à 120 analyses qui ont été programmées chaque année. La répartition des prélèvements par région a pris en compte

(1) Avec la réorganisation des services de l'Etat, le laboratoire d'études des résistances du SRPV Rhône-Alpes, devenu SRAL (Service Régional de l'Alimentation) a été transféré à l'AFSSA (Unité Résistance aux Produits Phytosanitaires) depuis le 1^{er} janvier 2009. Les plans de surveillance décrits dans cet article étant antérieurs nous avons gardé les anciennes dénominations.

l'importance des surfaces viticoles ainsi que la situation résistance CAA constatée l'année précédente. Pour le choix des parcelles à prélever, aucune consigne particulière n'a été donnée quant à l'historique des traitements réalisés ; le choix ne devait pas être notamment orienté vers des parcelles à historique CAA important ; au contraire, tous les programmes de traitements devaient être représentés (0 à 3 applications voire plus). Le seul conseil était, dans la mesure du possible, de veiller à une bonne répartition géographique des prélèvements.

Pour la zoxamide, le nombre de tests annuels prévu était compris entre 30 et 60. Les échantillons analysés ont été choisis parmi ceux destinés à l'étude CAA. Compte-tenu de l'objectif visé, les populations de mildiou retenues ont été celles qui avaient subi une pression de sélection vis-à-vis de la zoxamide, c'est-à-dire des populations provenant de parcelles qui avaient reçu l'année du prélèvement (et/ou les précédentes) des applications de fongicides à base de cette substance active.

Pour le QoI et les phénylamides, ce sont respectivement 84 et 97 populations qui ont été testées en 2008. Ces populations ont été choisies au hasard parmi celles collectées pour l'étude CAA sans se préoccuper de l'historique des applications phytosanitaires des parcelles d'où provenaient les échantillons.

Une majorité des prélèvements a été effectuée sur la période 15 juin – 15 septembre, quelques uns furent plus tardifs (jusqu'à mi-octobre).

Par parcelle, l'échantillon est constitué d'une trentaine de feuilles prélevées sur 30 ceps différents qui portent des taches de mildiou récentes. L'échantillon est adressé dans les meilleurs délais au laboratoire du SRPV Rhône-Alpes. Il est accompagné par une fiche de renseignements sur laquelle figure notamment le programme "anti-mildiou" déjà appliqué sur l'année en cours. Le nombre d'applications pour chacune des familles chimiques travaillées sur les 5 campagnes précédentes est également demandé, mais ces informations sont rarement renseignées au moment de l'envoi et il fut parfois difficile de se les procurer même après la campagne.

METHODES D'ANALYSE ET PRESENTATION DES RESULTATS

Les analyses, par tests biologiques sur disques foliaires, ne sont jamais réalisées directement sur l'échantillon. Elles sont effectuées après deux étapes :

- lavage des feuilles, découpe des taches, mise en chambre humide et nouvelle sporulation des taches sous 24 heures,
- repiquage de l'inoculum obtenu sur feuilles saines avec nouvelle sporulation au bout de 8 jours.

C'est sur cette nouvelle sporulation que sont réalisés les tests. Si la quantité de spores est insuffisante, un nouveau repiquage est réalisé pour multiplier le champignon.

CAA : les tests sont réalisés sur iprovalicarbe et diméthomorphe avec une gamme de concentrations et une méthode adaptée pour chacun des produits.

Pour l'iprovalicarbe, la gamme utilisée de 2005 à 2007 est la suivante : 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 30 - 100 - 300 mg/L ; en 2008, la gamme est réduite aux doses 0 - 3 - 10 et 100 mg/L. Les solutions fongicides sont appliquées sur les disques foliaires par dépôt de gouttes de 15 µL en mélange volume à volume : 1 volume de fongicide + 1 volume de suspension de spores. Ces disques foliaires sont maintenus en survie en boîtes de Petri gélosées.

Pour le diméthomorphe, la gamme utilisée de 2005 à 2007 est la suivante : 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 30 - 100 mg/L ; en 2008, la gamme est réduite aux doses 0 - 10 - 30 et 100 mg/L. Les disques foliaires sont traités par pulvérisation à la Tour de Potter-Burgerjon puis déposés

en boîte de Petri sur papier filtre imbibé de solution fongicide. 24 heures après, les disques sont inoculés avec la suspension de spores par dépôt de gouttes de 15 µL.

Benzamides : La gamme de concentrations en zoxamide utilisée de 2005 à 2007 est la suivante : 0 - 0,01 - 0,03 - 0,1 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 30 - 100 - 300 mg/L ; en 2008, la gamme est réduite aux doses 0 - 0,01 - 1 - 10 - 100 mg/L. Les solutions fongicides sont appliquées sur les disques foliaires par dépôt de gouttes de 15 µl, en mélange volume à volume. Ces disques foliaires sont maintenus en survie en boîtes de Petri gélosées.

Qol : une dose discriminante de 10 mg/L est appliquée sur les disques foliaires par pulvérisation à la Tour de Potter-Burgerjon. Ces disques sont ensuite déposés en boîtes de Petri gélosées. Simultanément, un témoin (dose 0) est réalisé par pulvérisation d'eau, dans les mêmes conditions. 24 heures après, les disques sont inoculés avec la suspension de spores par dépôt de gouttes de 15 µL.

Nombre de répétitions : pour toutes ces substances actives, chaque boîte de Petri contient 10 disques de feuille de vigne, avec, sur chaque disque, dépôt de 3 gouttes de suspension de spores (à environ 100 000 spores/mL). Chacune de ces gouttes est notée selon une échelle de notation, soit 30 notes par dose.

Notation : les boîtes inoculées sont placées en enceinte climatique à l'obscurité à 22°C pendant 72 heures. Les gouttes sont alors aspirées et les boîtes remises à l'étuve à 22°C avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit pendant 4 jours. Une notation visuelle, à l'œil nu, de la sporulation est faite 7 jours après l'inoculation, selon une abaque de 0 (sporulation nulle) à 4 (sporulation intense). Une moyenne des 30 notes est calculée et transformée en pourcentage de sporulation par rapport au témoin. Le témoin doit avoir une note minimale de 2 pour valider le test.

Pour CAA et benzamides, testés avec une gamme de doses, ces notes permettent d'évaluer, par extrapolation, la CI50 (concentration qui inhibe 50% de la sporulation par rapport au témoin) et la CMI (concentration minimale d'inhibition ou concentration qui inhibe 100 % de la sporulation).

Chaque échantillon analysé est alors classé selon 3 catégories : *Résistant* (CI50 estimée supérieure à celle des sensibles), *dérive de sensibilité* (CI50 située dans la gamme des sensibles et CMI supérieure à celles des sensibles), et *Sensible* (CI50 et CMI correspondant à celles des sensibles).

Pour les Qol, analysés avec une seule dose discriminante, la comparaison des notes entre boîtes traitées et boîtes témoins permet d'évaluer approximativement la proportion de souches résistantes dans la population étudiée.

Phénylamides :

La matière active testée est le méfénoxam aux doses suivantes : 0 - 2,5 - 5 - et 50 mg/L. Les disques foliaires sont placés en boîtes de Petri, en contact avec du papier filtre imbibé de solution fongicide. Chaque disque foliaire est ensuite inoculé avec 3 gouttes de suspension de spores : 1 goutte avec la suspension de concentration C de départ, 1 goutte de concentration C/10 et 1 goutte de concentration C/100. Les boîtes ainsi inoculées sont placées en enceinte climatique dans les mêmes conditions que pour les autres substances actives.

Une notation visuelle, à l'œil nu, de la sporulation est faite 7 jours après l'inoculation, selon l'abaque précitée. Pour chaque échantillon analysé et pour chaque dose de méfénoxam, les notes obtenues sont cumulées pour chaque concentration en spores (C, C/10, C/100). La détermination de la fréquence des souches résistantes dans la population testée est faite à l'aide d'une abaque graphique (LEROUX, CLERJEAU, 1985).

RESULTATS ET COMMENTAIRES :

FAMILLE DES CAA

Le tableau I présente le nombre et la répartition des échantillons analysés. Pour une analyse "régionalisée", certains vignobles proches et révélant des résultats similaires ont été regroupés afin de disposer pour chacun des secteurs viticoles ainsi constitués d'un effectif de données suffisamment important.

Tableau I : Nombre et répartition des échantillons analysés
Analysed samples number and distribution

| | France | Midi-Pyrénées | Façade atlantique | Sud-Est France | Beaujolais Savoie | Champagne Bourgogne | Auvergne Centre | Jura Alsace |
|------|--------|---------------|-------------------|----------------|-------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| 2005 | 65 | 4 | 17 | 6 | 5 | 16 | 9 | 8 |
| 2006 | 99 | 8 | 21 | 9 | 8 | 33 | 11 | 9 |
| 2007 | 137 | 11 | 47 | 22 | 20 | 24 | 5 | 8 |
| 2008 | 127 | 17 | 39 | 15 | 26 | 26 | 4 | 0 |

Façade atlantique : vignobles d'Aquitaine + Charentes + Pays de Loire
Sud-Est France : vignobles de Provence, Languedoc + Drôme et Ardèche

Les résultats sont présentés graphiquement ; pour chaque année, ces résultats sont exprimés en pourcentage de parcelles appartenant à chacune des trois classes de sensibilité du mildiou aux CAA définies plus haut (résistants, dérive de sensibilité et sensibles). Le premier graphique décrit la situation globale du vignoble français, les graphiques suivants celles des zones viticoles telles qu'elles ont été définies dans le tableau I.

- France

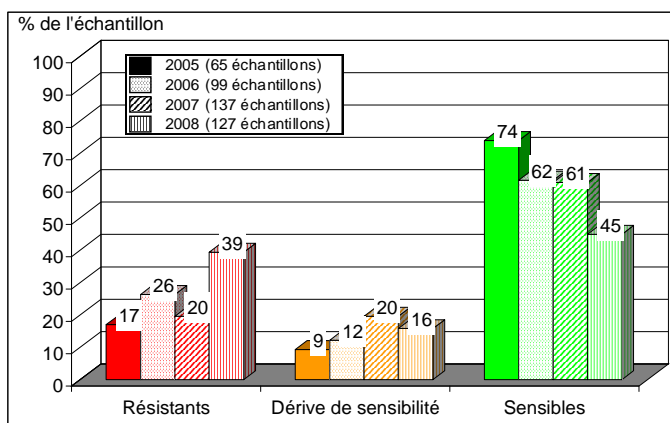
Globalement au niveau national, une certaine stabilité de la résistance aux CAA est constatée sur la période 2005-2007. En 2007, les populations sensibles sont identifiées dans un peu plus de 60 % des situations; les populations résistantes ou avec dérive de sensibilité se situent chacune aux alentours de 20 %. 2008 révèle une évolution assez marquée de la répartition des populations. Pour la première fois, la fréquence des populations sensibles passe sous la barre des 50 %. Cette baisse ne se traduit pas par une augmentation équivalente des deux autres classes, mais par une forte progression (+ 50 %) de la fréquence des sites résistants alors que la classe intermédiaire reste stable.

Cette dégradation de la situation de la résistance du mildiou aux CAA est sans doute à mettre en relation avec la forte pression du mildiou en 2008 (et 2007) qui s'est accompagné d'une utilisation plus importante des fongicides de cette famille souvent dans des conditions difficiles (présence du pathogène lors des traitements).

Cette approche globale masque des évolutions régionales particulières qui vont être décrites ci-après.

Figures 1 à 7 : Evolution de la résistance du mildiou aux CAA de 2005 à 2008
Evolution of downy mildew resistance to CAA between 2005 and 2008

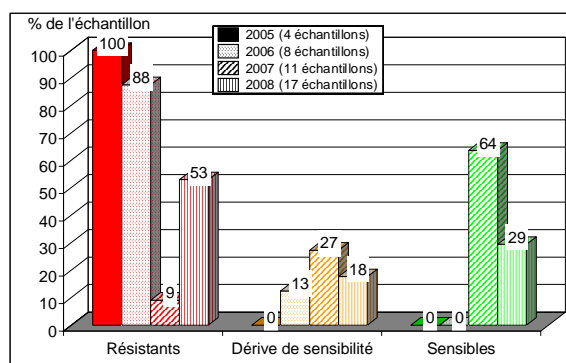
Figure 1 : France



- Midi-Pyrénées

En 2005 et 2006, les populations analysées en provenance quasi-exclusive du Gers (vignoble d'Armagnac) appartiennent presque toutes à la classe "résistants". Ce résultat révèle une forte implantation de la résistance aux CAA en Armagnac. En 2007, les prélèvements ont été orientés vers les autres vignobles de Midi-Pyrénées, aucun ne provenait d'Armagnac. Nous observons que, dans ces zones viticoles, la situation vis-à-vis de la résistance aux CAA est beaucoup moins dégradée qu'en Armagnac et, somme toute, conforme à la description nationale. La raison de cette différence très nette entre le vignoble d'Armagnac et ses voisins n'est pas clairement établie, même si nous soupçonnons qu'elle puisse être liée à des pratiques phytosanitaires et culturales différentes. En 2008, les échantillons résistants demeurent très majoritaires dans le Gers (> à 70 %), leur fréquence avoisine les 50 % dans les autres vignobles du Sud-Ouest soit une valeur un peu plus élevée que celle relevée au niveau national (39 %).

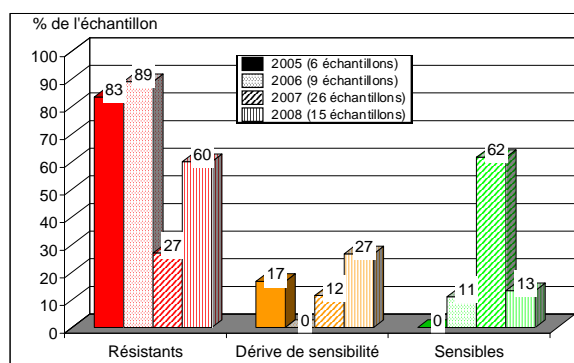
Figure 2 : Midi-Pyrénées



- Vignobles du pourtour méditerranéen (plus Drôme et Ardèche certaines années)

Dans cette zone, nous sommes dans une configuration similaire à celle décrite en Midi-Pyrénées. En 2005 et 2006, les échantillons provenaient uniquement des départements du Vaucluse et du Gard et les tests de résistance montraient une forte prédominance de la résistance. En 2007, si les résultats des tests confirment que la résistance est bien implantée en Vaucluse, ils montrent dans le même temps une meilleure situation vis-à-vis de la résistance dans les départements limitrophes (Bouches du Rhône, Hérault et Ardèche) pour lesquels 13 populations analysées sur 17 (soit 76 %) sont sensibles. En 2008, malgré une origine des échantillons aussi variée géographiquement qu'en 2007, la résistance apparaît fortement présente, bien sûr dans le Vaucluse mais également sur les vignobles de la Drôme et de l'Ardèche (7 cas résistants sur 11 soit 66 %). Ainsi, en 2008, ce secteur viticole avec des prélèvements issus des départements du Vaucluse, du Gard, de l'Ardèche et de la Drôme présente la situation française la plus dégradée vis-à-vis de la résistance aux CAA avec seulement 13 % de sites sensibles et 60 % de résistants.

Figure 3 : Vignobles du pourtour méditerranéen
Mediterranean areas vineyards

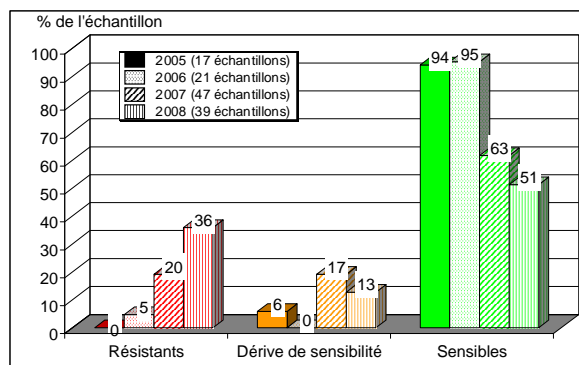


- Vignobles de la façade atlantique

Dans ces vignobles en 2005 et 2006, la résistance aux CAA était très peu présente avec 95 % de sites sensibles. En 2007, la situation s'est détériorée avec une détection de la résistance dans près de 40 % des situations (classes résistantes + dérive). Cette évolution s'est poursuivie en 2008, la fréquence des populations sensibles n'est plus que de 51 % et la diminution de la fréquence des populations sensibles observée entre 2006 et 2008 s'est principalement traduite par l'augmentation de la classe "résistants" ce qui confère un caractère un peu plus inquiétant à cette évolution.

Plus que dans les autres vignobles, la très forte pression exercée par le mildiou en 2007 et 2008 et une utilisation plus fréquente des CAA dans des conditions de mildiou déclaré expliquent très probablement cette progression de la résistance. Précisons qu'en 2008, nous constatons que la résistance est surtout présente en Charentes et dans une moindre mesure en Pays de Loire, par contre en Aquitaine, les populations sensibles dominent encore largement (76 % en fréquence).

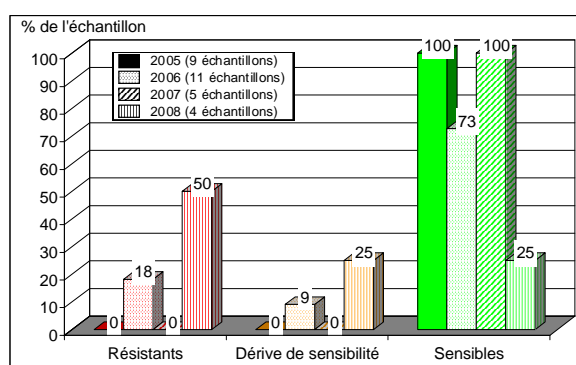
Figure 4 : Vignobles de la façade atlantique
Atlantic areas vineyards



- Auvergne - Centre

De 2005 à 2007, ces vignobles étaient peu concernés par la résistance aux CAA. Le faible nombre d'échantillons en 2008 n'autorise pas à conclure en termes de fréquence ; nous nous bornerons à constater l'existence de populations résistantes dans ces vignobles.

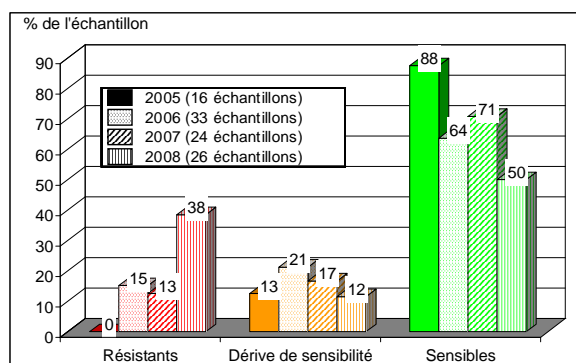
Figure 5 : Auvergne – Centre



- Bourgogne - Champagne

Dans ces vignobles septentrionaux, la situation est conforme à celle décrite au niveau national. En 2008, une progression de la résistance est notée. Les populations sensibles ne représentent plus que la moitié des situations analysées et la diminution de la fréquence des populations sensibles entre 2007 et 2008 s'est totalement répercutée sur les populations résistantes qui approchent les 40 %.

Figure 6 : Bourgogne - Champagne



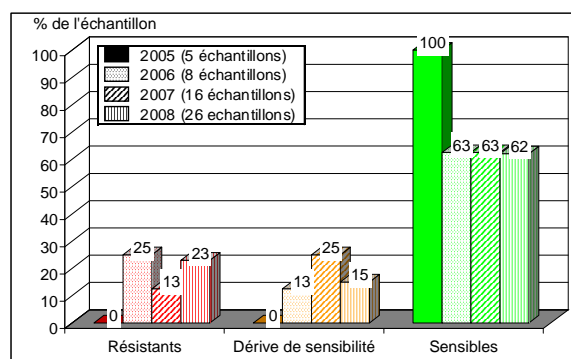
- Jura - Alsace

Les données disponibles concernent principalement le Jura (22 résultats sur le total des 27 figurant dans le tableau I). Le faible nombre d'analyses oblige à une certaine prudence dans l'interprétation des chiffres. Cependant il apparaît que ce vignoble est assez fortement concerné par la résistance aux CAA depuis 2005 et que la situation s'est encore détériorée en 2007. A la fin de cette dernière campagne, 50 % des échantillons analysés étaient résistants.

- Beaujolais (+ quelques échantillons de Savoie)

Ce vignoble se singularise par le fait que sur les trois dernières années, la fréquence des souches sensibles est restée stable autour des 63 %. De petites fluctuations sont observées entre les classes "dérive de sensibilité" et "résistants". En 2008, près d'un quart des sites sont résistants.

Figure 7 : Beaujolais



FAMILLE DES BENZAMIDES

Chaque population analysée est caractérisée par sa CI50 et sa CMI.

L'ensemble des résultats est rapporté dans les figures 8 et 9. Par année, les répartitions par classe de CI50 (figure 8) et de CMI (figure 9) des populations de mildiou vis-à-vis de la zoxamide sont présentées.

Figure 8 : Répartition par classe de CI50
Distribution by EC50 groups

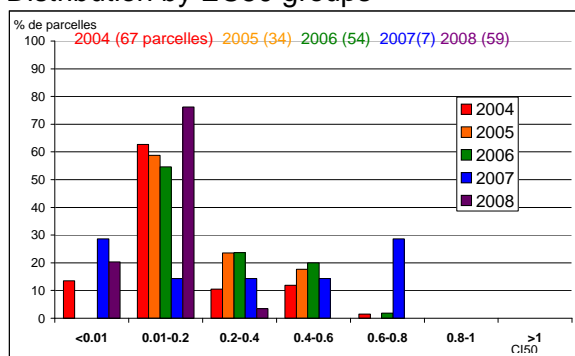
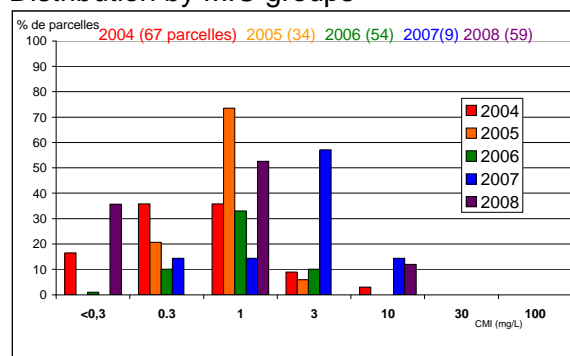


Figure 9 : Répartition par classe de CMI
Distribution by MIC groups



Pour chacune des trois premières années d'étude (2004 à 2006), les résultats annuels ont été jugés homogènes. Ces 155 résultats acquis sur trois ans ont permis de définir les caractéristiques d'une population sensible (ligne de base). Elles sont présentées dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques d'une population sensible vis-à-vis de la zoxamide
Characteristics of a population sensitive to zoxamide

| CI 50 | Moyenne CI50 | Ecart type CI50 | Mini | Maxi |
|-------|--------------|-----------------|------|------|
| | 0,20 | 0,17 | 0,01 | 0,75 |

| CMI | Médiane | Maxi |
|-----|---------|------|
| | 1,0 | 10 |

A compter de 2007, ces données relatives à une population sensible constituent la référence pour évaluer les résultats des années suivantes.

En 2007, le faible nombre d'analyses exploitables (7) n'autorise pas à porter un jugement national pertinent, nous nous bornerons à noter que les valeurs obtenues rentrent dans les bornes définies pour la ligne de base.

En 2008, nous disposons d'un ensemble de 59 résultats dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Sensibilité des populations de mildiou vis-à-vis de la zoxamide en 2008
Sensitivity of downy mildew populations to zoxamide in 2008

| | | | | |
|-------|--------------|-----------------|------|------|
| CI 50 | Moyenne CI50 | Ecart type CI50 | Mini | Maxi |
| | 0,05 | 0,06 | 0,01 | 0,33 |

| | | |
|-----|---------|------|
| CMI | Médiane | Maxi |
| | 1,0 | 10 |

Les résultats 2008 sont très homogènes et conformes à la ligne de base.

FAMILLE DES QOI

Les résultats des tests de résistance Qoi sont présentés dans le tableau IV ; ils sont confrontés à ceux obtenus en 2003. Les données exprimées en fréquence de souches résistantes dans les populations ont été réparties dans cinq classes. En 2003 et 2008, nous disposons respectivement de 61 et 84 résultats.

Tableau IV : Résultats des tests de résistance Qoi en 2003 et 2008
Qoi resistance tests results in 2003 and 2008

| Classe de fréquence | 2003 | | 2008 | |
|---------------------|----------|-------------|----------|-------------|
| | Effectif | Pourcentage | Effectif | Pourcentage |
| $R \leq 1 \%$ | 7 | 11 | 0 | 0 |
| $1 < R \leq 10 \%$ | 3 | 5 | 2 | 2 |
| $10 < R \leq 50 \%$ | 6 | 20 | 8 | 10 |
| $50 < R \leq 80 \%$ | 8 | 13 | 10 | 17 |
| $R > 80 \%$ | 37 | 61 | 64 | 76 |
| Total | 61 | 100 | 84 | 100 |

Les résultats 2008 montrent que la résistance du mildiou aux Qoi est généralisée et que dans la majorité des situations, la fréquence des souches résistantes est élevée (supérieure à 80 % dans plus de 3 cas sur 4). La comparaison avec 2003 révèle une situation 2008 tout aussi voire plus dégradée alors que l'emploi des Qoi sur mildiou s'est fortement réduite.

FAMILLE DES PHENYLAMIDES

Les résultats de 2008 sont comparés à ceux de 1999. Pour les deux années, les échantillons proviennent des différents vignobles français. Le nombre d'échantillons analysés a été de 89 en 1999 et de 97 en 2008.

Les résultats ont été répartis en trois classes selon la fréquence des souches résistantes aux phénylamides contenues dans les populations :

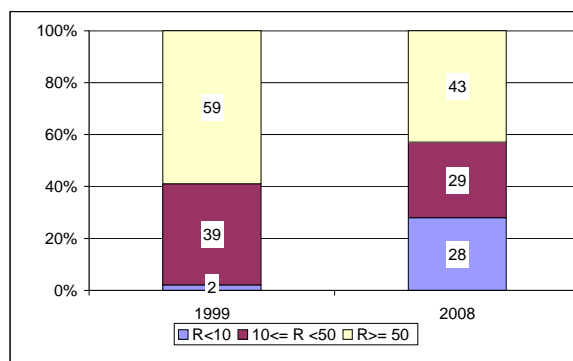
- classe 1 = moins de 10 % de souches résistantes,
- classe 2 = de 10 à moins de 50 % de souches résistantes
- classe 3 = plus de 50 % de souches résistantes.

Les résultats des plans de surveillance de 1999 et 2008 sont présentés dans la figure 10.

En 1999, la résistance aux phénylamides était généralisée et quasiment toutes les populations contenaient plus de 10 % de souches résistantes.

En 2008, la résistance demeure fortement installée dans le vignoble français. Cependant, une légère amélioration de la situation est constatée par rapport à 1999 avec une progression notable (de 2 à 28 %) des cas où la fréquence des souches résistantes est inférieure à 10 %. Sans que nous puissions établir un lien de cause à effet entre les deux phénomènes, cette évolution plutôt favorable se manifeste alors que l'emploi des phénylamides reste relativement faible.

Figure 10 : Distribution de la résistance du mildiou aux phénylamides en 1999 et 2008
Distribution of the downy mildew resistance to phenylamides in 1999 and 2008



CONCLUSION

La surveillance de la résistance du mildiou conduite par la Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux entre 2005 et 2008 a principalement concerné la famille des CAA (diméthomorphe et iprovalicarbe) ; elle a également permis de recueillir des données sur les benzamides (zoxamide), les QoI (azoxystrobine, famoxadone, fénamidone, pyraclostrobine) et les phénylamides (bénalaxyl, bénalaxyl M, méfénoxam).

Pour les CAA, le nombre de résultats disponibles chaque année se situe entre 65 et 137 avec des échantillons provenant de tous les vignobles français.

En 2005 et 2006, une forte présence de la résistance aux CAA est confirmée dans les vignobles d'Armagnac et de Provence. En 2007, des prélèvements réalisés dans les vignobles voisins ont révélé une situation beaucoup moins dégradée vis-à-vis de la résistance, comparable à celle des autres vignobles français. Même si nous n'avons pas pu l'établir clairement, cette forte disparité entre ces zones viticoles relativement proches pourrait s'expliquer par des différences de pratiques phytosanitaires et culturales.

Dans les autres vignobles français, en 2006 et 2007, les populations sensibles étaient dominantes et représentaient, en fréquence, le plus souvent entre 60 et 70 % des échantillons analysés. En 2008, une dégradation assez généralisée de la situation (excepté Beaujolais et Bordelais) a été observée. La fréquence des populations résistantes a progressé au détriment des sensibles alors que les populations intermédiaires (dérive de sensibilité) sont restées stables. Suite à cette évolution, la proportion des populations sensibles frôle les 50 % voire passe sous cette barre. Dans les vignobles de la façade atlantique, une progression de la résistance avait déjà été observée en 2007.

L'utilisation fréquente des fongicides à base de CAA en 2007 et 2008 dans des conditions difficiles (forte pression et mildiou déclaré) peut avoir contribué à cette évolution de la résistance. Cette progression est assez inquiétante alors que trois nouvelles substances actives appartenant aux CAA ont été depuis lors autorisées sur le mildiou de la vigne (benthiavali-carbe, mandipropamid et valiphénal). Elle doit inciter à respecter strictement la limitation annuelle à trois traitements de l'ensemble des spécialités contenant ces substances actives (note nationale 2009). Les résultats obtenus à partir de 2009 permettront de préciser si cette progression est conjoncturelle suite aux fortes pressions exercées par le mildiou en 2007 et 2008 ou s'il s'agit d'une évolution irréversible.

Pour la zoxamide, les résultats obtenus de 2004 à 2006 sont homogènes. Ils ont permis, à partir de 155 données, de définir les caractéristiques d'une population sensible à la zoxamide. Les deux années suivantes, les populations testées ont présenté des structures équivalentes. Ainsi, après six années d'emploi modéré de la zoxamide, aucune dérive de

sensibilité du mildiou vis-à-vis de cette substance n'est constatée. La notification d'autorisation de mise sur le marché intègre une limitation à trois applications par an.

En 2008, l'état des lieux de la résistance dressé *pour les Qol* a confirmé que la résistance du mildiou à cette famille est généralisée et que dans la grande majorité des parcelles testées, la fréquence des souches résistantes est forte (supérieure à 80 %). La comparaison avec 2003 montre une situation tout aussi voire plus dégradée alors que, sur cette période, l'emploi des Qol comme anti-mildiou a fortement diminué. La persistance d'une présence forte et généralisée de la résistance rend sans intérêt l'emploi des substances actives de cette famille dans une lutte dirigée uniquement contre le mildiou (note nationale 2009).

Enfin *pour les phénylamides*, l'étude 2008 montre que la résistance demeure largement et assez intensément implantée dans le vignoble français. Cependant, une légère amélioration de la situation est constatée par rapport à 1999. Ainsi en 2008, 28 % des populations de mildiou analysées contenaient moins de 10 % de souches résistantes alors que de telles populations étaient quasiment absentes en 1999. Dans ce contexte, l'emploi des spécialités à base de phénylamides doit rester limité (1 à 2 traitements par an) et préventif (note nationale 2009).

REMERCIEMENTS

Nous remercions les collègues des SRPV, des FREDON et des organismes professionnels qui ont participé à ces plans de surveillance en réalisant les prélèvements d'échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

LEROUX P., CLERJEAU M., 1985 - Resistance of *Botrytis cinerea* Pers and *Plasmopara viticola* (Berk & Curt) Berl and de Toni to fungicides in French vineyards – Crop Protection , 4 (2), 137-160.

Groupe national résistance aux fongicides de la vigne (DGAL-SDQPV, INRA, IFV, APCA, CIVC), 2009 – Note nationale résistance du mildiou de la vigne.

« RÉSEAU PERFORMANCE ORGES » : ÉTAT DE LA RÉSISTANCE
DE L'HELMINTHOSPORIOSE DE L'ORGE AUX STROBILURINES
ET IMPACT SUR L'EFFICACITÉ EN PRATIQUE

C. MAUMENE ⁽¹⁾, G. COULEAUD ⁽¹⁾, J.-Y. MAUFRAS ⁽²⁾

(1) c.maumene@arvalisinstitutduvegetal.fr; g.couleaud@arvalisinstitutduvegetal.fr

ARVALIS - Institut du végétal, 91720 BOIGNEVILLE

(2) jy.maufras@arvalisinstitutduvegetal.fr

ARVALIS - Institut du végétal, Station Inter-Instituts, 6, Chemin de la Côte Vieille
31450 BAZIEGE

RÉSUMÉ

Les premiers cas de résistance de l'helminthosporiose de l'orge, *Pyrenophora teres* (*Dreschlera*) aux strobilurines (remplacement de l'acide aminé phénylalanine par l'acide aminé leucine en position 129 du cytochrome b, conduisant à la substitution F129L) ont été détectés en France en 2004. Un état de la résistance a été établi de 2006 à 2009, grâce à la mise en place d'un réseau d'essai multilocal. La fréquence de la substitution est relativement stable, sur 4 ans (31 % en moyenne) et répartie de façon hétérogène sur les zones de production. Malgré des fréquences de la résistance relativement faibles, l'efficacité en pratique de l'ensemble des strobilurines testées dans le réseau (azoxystrobine, pyraclostrobine, picoxystrobine, trifloxystrobine) est affectée, mais à des degrés variables en fonction des molécules.

Mots-clés : helminthosporiose de l'orge, état de lieux, résistance F129L, strobilurines, efficacité au champ.

SUMMARY

The first observation of net blotch resistance to strobilurins (F129L: change of an amino acid in position 129 of the cytochrome b) was first detected in France in 2004. The status of the resistance has been established from 2006 to 2009, with the help of a multilocal trial network. The frequency of the substitution is relatively stable (31% on average) and distributed heterogeneously between the different production areas. In spite of relatively low frequency of the resistance, the efficacy in practice of all strobilurins tested in the network (azoxystrobin, pyraclostrobin, picoxystrobin, trifloxystrobin) is reduced, but at various degrees dependant of each molecule.

Key words: net blotch, survey, resistance F129L, strobilurins, field efficacy.

INTRODUCTION

Des isolats d'helminthosporiose (*Dreschlera teres*) résistants aux strobilurines ont été détectés dès 2004 dans le Nord de la France. La substitution concernée F129L sur le cytochrome b, a déjà été rencontrée auparavant chez l'helminthosporiose du blé dans le Nord de l'Europe. Les niveaux de résistance observés sont généralement inférieurs à ceux constatés dans le cas de la substitution G143A détectée sur la même protéine (Stammler & al, 2006 ; Frac, 2009). Dès 2006, à l'image du « Réseau Performance blé », un « Réseau Performance orge » a été mis en place, grâce au concours de 17 partenaires, pour établir un état des lieux de la résistance de l'helminthosporiose de l'orge aux strobilurines, et évaluer ses conséquences pratiques au champ.

MATERIEL ET MÉTHODE

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

L'objectif du réseau consiste à associer une analyse de la résistance aux strobilurines des populations d'helminthosporiose (*Dreschlera teres*) à des résultats d'efficacité au champ, dans le but d'évaluer l'impact de la résistance sur l'efficacité en pratique des molécules concernées. 22 essais ont été réalisés en 2006, 30 en 2007, 29 en 2008 et 22 en 2009, soit 103 essais au total. Les essais ont été répartis géographiquement sur les principales régions de production d'orge. Les essais ont été réalisés exclusivement sur orge d'hiver ou escurgeon en privilégiant le choix de variétés sensibles à l'helminthosporiose. Pour éviter toute confusion, seules les expérimentations où l'helminthosporiose était la principale maladie présente ont été regroupées.

Le protocole expérimental inclut un tronc commun à toutes les expérimentations. Ce tronc commun a évolué dans le temps. Les applications de produits sont répétées 2 fois à l'identique au stade Z31 et Z45. Les essais sont réalisés en bloc de Fischer avec 3 ou 4 répétitions. Les observations sont réalisées après la deuxième application de T2+20 jours à T2+45 jours.

La mesure du rendement n'est mesurée que sur certains essais.

En 2006, il était postulé initialement que le suivi d'une seule des molécules de la famille des strobilurines suffirait à percevoir d'éventuelles dérives de performance de la famille. Le choix s'est arrêté initialement sur la picoxystrobine, très largement utilisée sur les orges. Autour de la picoxystrobine différentes associations, incluant ou non cette molécule, ont été incluses dans le dispositif expérimental.

Protocole 2006 : Spécialités et associations mises en comparaison dans le « réseau performance orge »

| | |
|--|--|
| UNIX 0.3 kg/ha + OPUS 0.3 l/ha | Cyprodinil 225 g/ha + Epoxiconazole 37.5 g/ha |
| ACANTO 0.3 l/ha + OPUS 0.3 l/ha | Picoxystrobine 75 g/ha + Epoxiconazole 37.5 g/ha |
| UNIX 0.3 kg/ha + ACANTO 0.3 l/ha | Cyprodinil 225 g/ha + Picoxystrobine 75 g/ha |
| ACANTO 1 l/ha | Picoxystrobine 250 g/ha |
| UNIX 0.3 kg/ha+ACANTO 0.3 l/ha+OPUS 0.3 l/ha | Cyprodinil 225 g/ha+Picoxystrobine 75 g/ha+Epoxiconazole 37.5 g/ha |

En 2007, le protocole a été étendu à la plupart des strobilurines présentes sur le marché soit seules lorsqu'elles sont disponibles commercialement, soit associées dans le cas de Madisonpack (ou FANDANGO S). Pour les besoins de la comparaison, une parcelle apportant du prothioconazole seul, ou éventuellement associé à de la spiroxamine a été ajouté au dispositif.

Protocole 2007 : Spécialités et associations mises en comparaison dans le « Réseau Performance orge »

| | |
|-----------------------------------|---|
| ACANTO 1 L/ha | Picoxystrobine 250 g/ha |
| AMISTAR 1 L/ha | Azoxystrobine 250 g/ha |
| COMET 1 L/ha | Pyraclostrobin 250 g/ha |
| JOAO* 0.4 L/ha | Prothioconazole 100 g/ha |
| MADISONPACK** 0.4 L/ha + 0.1 L/ha | Prothioconazole 100 g/ha + Trifloxystrobine 50 g/ha |
| ACANTO + UNIX 0.3 L/ha + 0.3 kg | Picoxystrobine 75 g/ha + Cyprodinil 225 g/ha |

* JOAO ou INPUTPACK (JOAO+VIRTUOSE)

** MADISONPACK (JOAO+TWIST 500 SC) ou FANDANGO S

En 2008, le protocole a été à nouveau ajusté. Toutes les strobilurines ont été testées seules, comme en 2007. Seule la fluoxastrobine, disponible exclusivement en association dans la spécialité Fandango S, a été testée associée avec pour terme de comparaison le prothioconazole seul. Les doses retenues sont généralement des pleines doses, ou dans le cas de l'association une dose permettant d'évaluer l'apport de la strobilurine dans le cadre du mélange (cas du Fandango S). Le protocole est resté stable en 2009 à l'exception du MADISON pack qui n'apparaît pas cette année.

Protocole 2008 et 2009 : Spécialités et associations mises en comparaison dans le « Réseau Performance orge »

| | |
|-----------------------------------|---|
| ACANTO 1 L/ha | Picoxystrobine 250 g/ha |
| AMISTAR 1 L/ha | Azoxystrobine 250 g/ha |
| COMET 1 L/ha | Pyraclostrobin 250 g/ha |
| TWIST 500 SC 0.5 L/ha | Trifloxystrobine 250 g/ha |
| JOAO 0.4 L/ha | Prothioconazole 100 g/ha |
| FANDANGO S 1L/ha | Prothioconazole 100 g/ha + fluoxastrobine 50 g/ha |
| MADISONPACK** 0.4 L/ha + 0.1 L/ha | Prothioconazole 100 g/ha + Trifloxystrobine 50 g/ha |

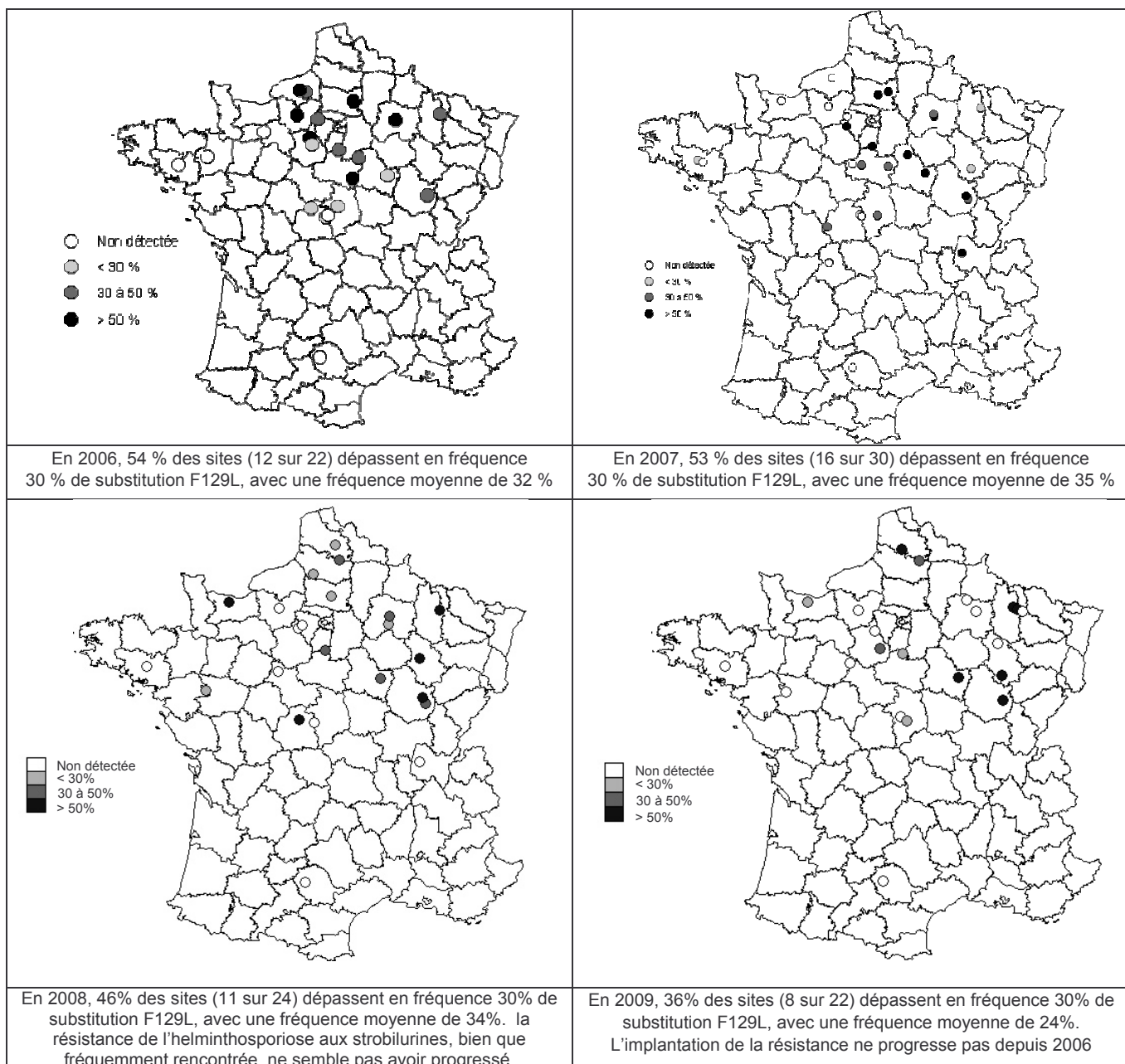
** MADISONPACK (JOAO+TWIST 500 SC) en 2008 uniquement

La société BASF, partenaire du réseau a produit l'ensemble des analyses permettant de quantifier la fréquence de l'allèle muté F129L dans les populations par méthode qPCR. Les échantillons sont prélevés dans les parcelles témoin au moment de l'application du T1. Ils sont constitués de 30 feuilles présentant des symptômes. En l'absence de symptômes, les prélèvements peuvent avoir été différés dans le temps. Ils sont, dans tous les cas, prélevés dans des parcelles non traitées.

RESULTATS

Etat de la résistance

Figure 1 : État de la résistance (F129L) de *D. teres* aux strobilurines sur le « Réseau Performance Orge » de 2006 à 2009. Analyses par méthode moléculaire qPCR (BASF).



Dès 2006, les résultats d'analyses montrent que la résistance aux QoI semble généralisée sauf en régions Centre, Bretagne et Sud-Ouest. En effet, la substitution F129L est détectée dans plus de $\frac{3}{4}$ (17 sites sur 22) des échantillons prélevés sur les témoins non traités. 12 sites sur 22 dépassent une fréquence de 30 % de substitution F129L, avec une fréquence moyenne égale à 32 %.

En 2007, les résultats d'analyses montrent que la résistance aux QoI semble stabilisée dans le quart Nord-est de la France. Seules les régions Centre et Bourgogne pourraient faire l'objet d'une certaine extension géographique de la résistance par rapport à 2006. La situation est inchangée pour le Sud-Ouest et la Bretagne. La résistance est présente dans le Nord de Rhône-Alpes. La substitution F129L est détectée dans les deux tiers des échantillons prélevés. La fréquence moyenne de la substitution est de 35 % à l'échelle nationale et passe à 52 % si l'on exclue les sites où la résistance est non détectée.

Dans les essais où la substitution est détectée, la fréquence la plus basse est de 8 % en Bretagne et 99 % en Picardie, pour la plus haute.

En 2008, la résistance de l'helminthosporiose aux strobilurines, bien que fréquemment rencontrée, ne semble pas avoir progressé. Dans près d'un site sur deux, la substitution F129L est détectée à une fréquence supérieure à 30 %. Comme en 2007, tous lieux confondus, la fréquence moyenne de la substitution est d'environ 35 %.

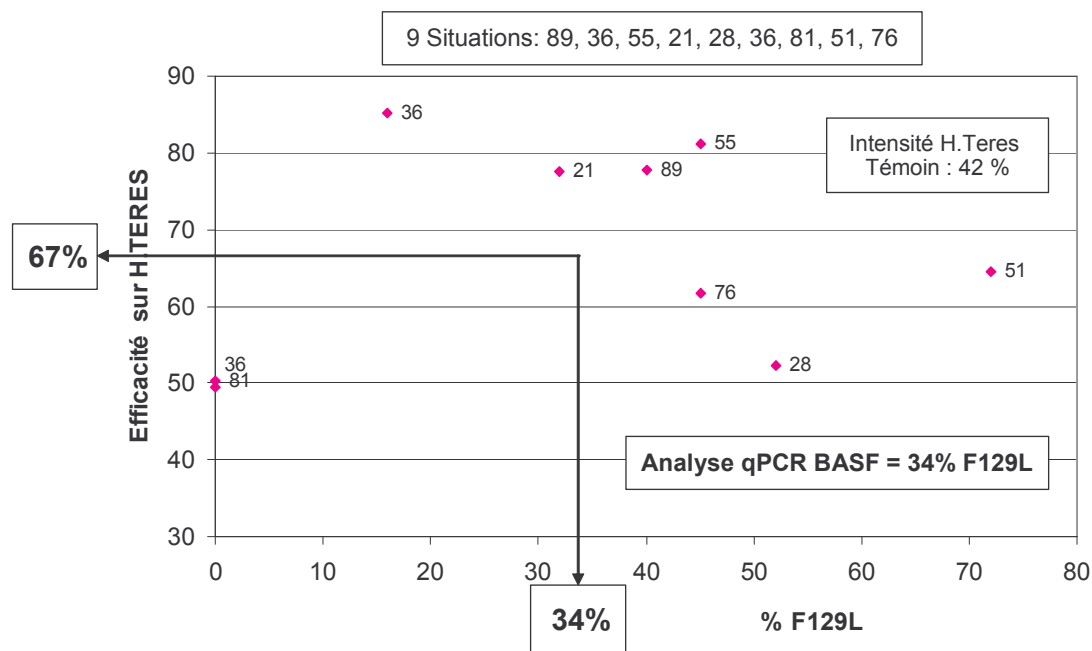
En 2009, la résistance de l'helminthosporiose aux strobilurines est rencontrée dans la moitié des sites prélevés, et semble ne plus progresser. 8 sites sur 22 dépassent une fréquence de 30 % de substitution F129L, avec une fréquence moyenne égale à 24 % à l'échelle nationale. Elle passe à 48 % sur les 11 sites où la résistance est détectée. Dans ces derniers, la fréquence de la substitution la plus basse est de 10 % dans le Centre et la plus élevée est observée en Bourgogne avec 75 %.

Efficacité en pratique

En 2006, sur 9 situations du réseau, nous avons pu mettre en relation les efficacités helminthosporiose avec les résultats d'analyse qPCR de résistance.

Pour ces situations, on constate qu'il n'existe pas de lien direct entre l'efficacité de la strobilurine utilisée seule (ici ACANTO 1 l/ha) et la fréquence de substitution F129L sur les échantillons prélevés dans les témoins non traités (Figure 2). 67% et 34% représentent respectivement l'efficacité moyenne observée pour Acanto et la fréquence moyenne de la substitution F129L.

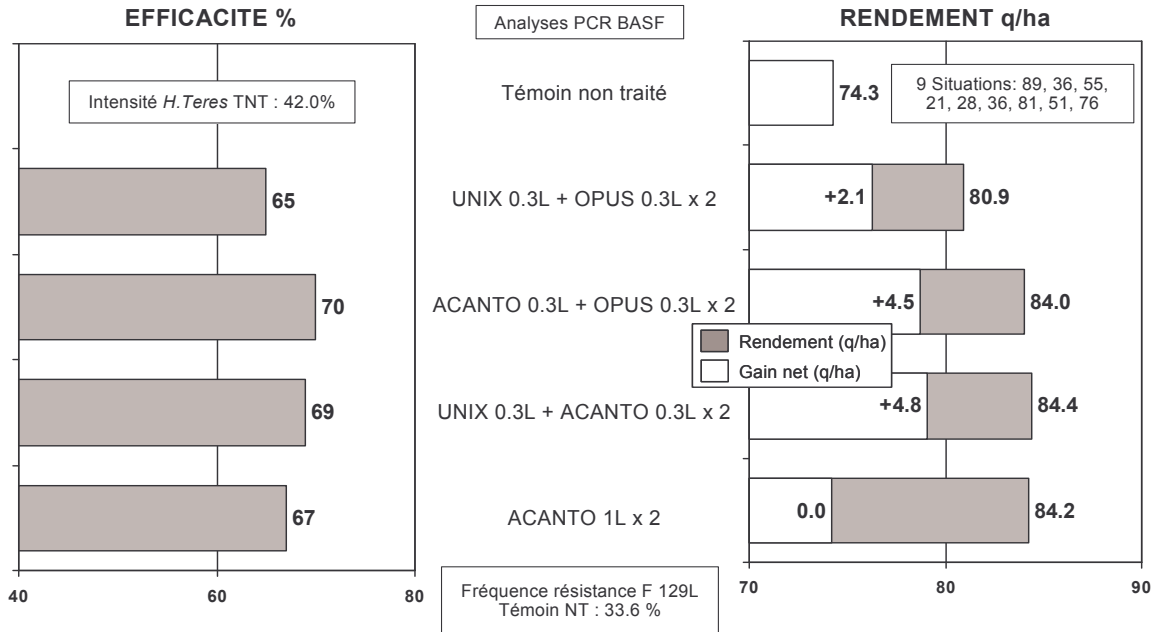
Figure 2 : Efficacité helminthosporiose pour ACANTO 1 l/ha en relation avec la fréquence de résistance strobilurine F129L.



En terme d'efficacité et de rendement dans ces mêmes situations, les associations sur une base ACANTO 0.3 l/ha sont comparables entre elles et nettement supérieures à l'association UNIX 0.3 + OPUS 0.3 (Figure 3) sans strobilurines. Elles soulignent l'intérêt de la famille sur cette maladie, malgré la présence de la résistance.

L'efficacité de la double application ACANTO 1l/ha présente ici une efficacité bonne à moyenne de 67 % (qui ne correspond cependant plus tout à fait aux résultats obtenus antérieurement avec ce type de produit).

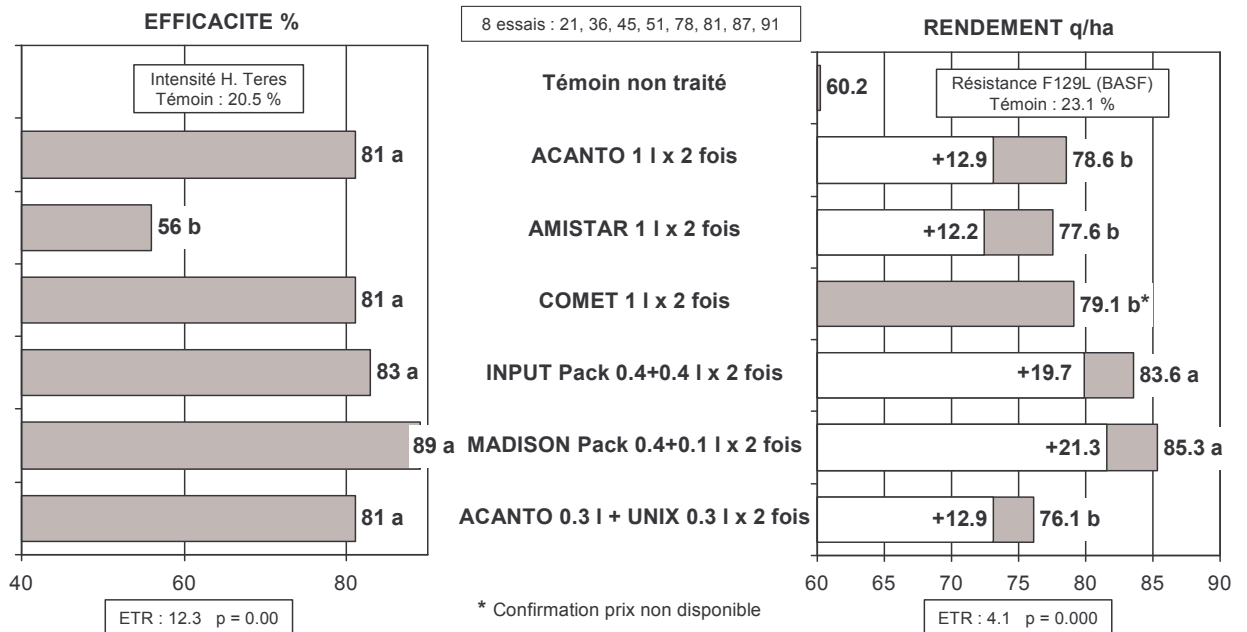
Figure 3 : Efficacité et rendements en situations d'helminthosporiose dominante. 9 essais « réseau Performance Orge » 2006



Les lettres a,b,c...représentent les groupes homogènes du test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5%

En 2007, si l'on regroupe les 8 essais qui permettent d'associer efficacité et rendement, toutes situations de résistance confondues, on constate la faible efficacité de la spécialité Amistar, le très bon résultat des autres strobilurines, Acanto et Comet, ainsi que l'excellent résultat de Madison pack, tant sur le plan des efficacités sur *D. teres* comme sur le plan des rendements bruts et nets. L'utilisation de la trifloxystrobine en mélange avec du prothioconazole, intrinsèquement très efficace contre *D.teres*, rend difficile le diagnostic de la résistance pour cette molécule.

Figure 4 : Efficacités sur *D. teres* et rendements toutes situations de résistance aux Qol confondues. 8 essais « Réseau Performance Orge » 2007



Les lettres a,b,c...représentent les groupes homogènes du test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5%

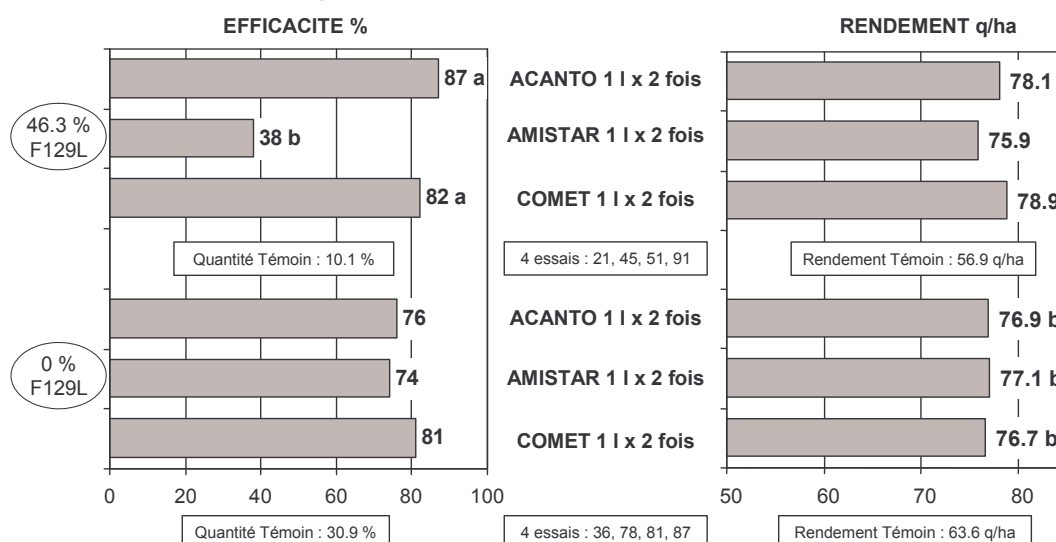
Dans le détail il est possible de regrouper les différents essais réalisés selon la fréquence de la résistance (Figure 5), en se concentrant sur l'activité des strobilurines utilisées solo.

Le premier regroupement (partie supérieure de la figure 5) est composé de 4 essais où la fréquence de substitution F129L est supérieure à 30 %, dans les témoins non traités (moyenne de 46 %). Le deuxième regroupement (partie inférieure) comprend 4 essais non concernés par la résistance (0 % F129L).

Dans le premier cas, on constate qu'en présence de la résistance F129L, l'efficacité de l'azoxystrobine est très affectée. Amistar 1l/ha "décroche" significativement par rapport aux deux autres strobilurines testées.

Si la substitution F129L entraîne en théorie une résistance croisée à l'ensemble des strobilurines, en pratique la résistance affecte en 2007 prioritairement l'azoxystrobine.

Figure 5 : Efficacités et rendements des parcelles traitées strobilurines en présence ou non de la résistance (F129L) de *D. teres* « Réseau Performance Orge 2007 ».
(Analyses par méthode moléculaire qPCR-BASF).



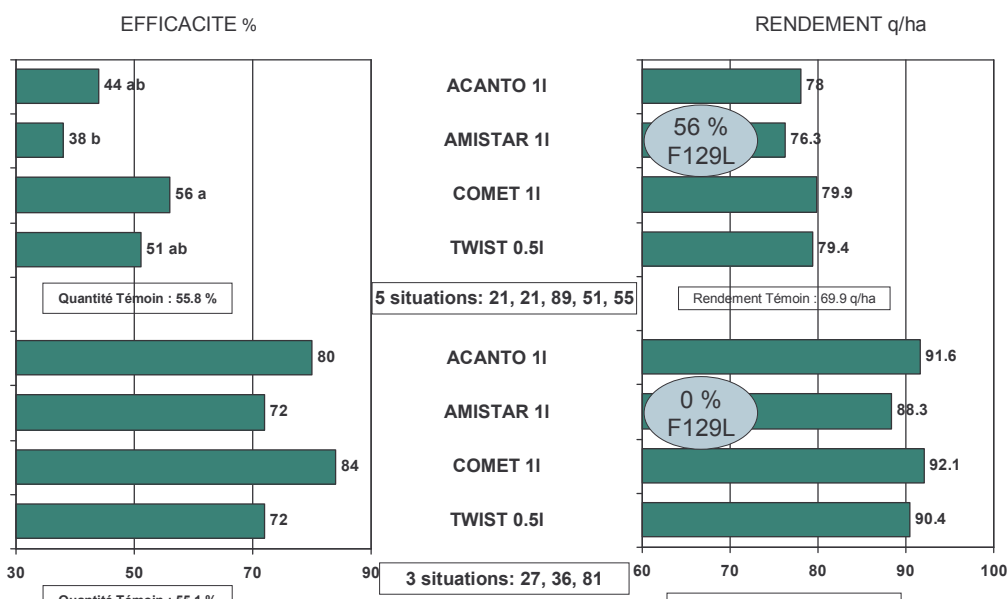
Les lettres a,b,c...représentent les groupes homogènes du test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5%

En 2008, en présence de la substitution, l'efficacité de toutes les strobilurines testées est affectée. (Fig.6). Les différences d'activité intrinsèque entre les strobilurines sont plus ou moins conservées.

L'azoxystrobine reste la molécule la plus concernée, alors que la pyraclostrobine et la trifloxystrobine semblent un peu moins touchées. Les rendements confirment parfaitement les efficacités observées.

En l'absence de souches résistantes l'efficacité des strobilurines reste d'un très bon niveau.

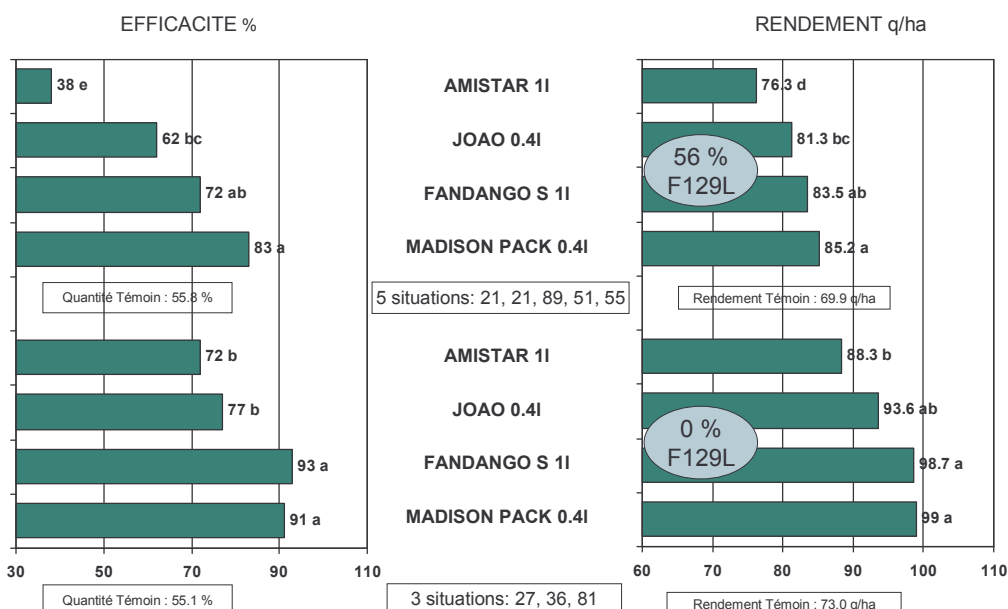
Figure 6 : Efficacités et rendements des strobilurines en fonction de la fréquence de la résistance (F129L) de *D. teres* « Réseau Performance Orge » 2008.



Les lettres a,b,c...représentent les groupes homogènes du test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5%

L'apport de la trifloxystrobine comme de la fluoxastrobine sur une base prothioconazole en présence, comme en l'absence de souches résistantes conduit à des résultats d'un excellent niveau. Il reste difficile de conclure sur l'activité intrinsèque de la fluoxastrobine, au vu de ces seuls résultats. L'apport de la trifloxystrobine reste néanmoins significatif (Fig. 7).

Figure 7 : Intérêt de la fluoxastrobine et de la trifloxystrobine en association avec le prothioconazole sur helmintosporiose (*D. teres*) en fonction de la fréquence de la substitution F129L : « Réseau Performance Orge » 2008 (double application).



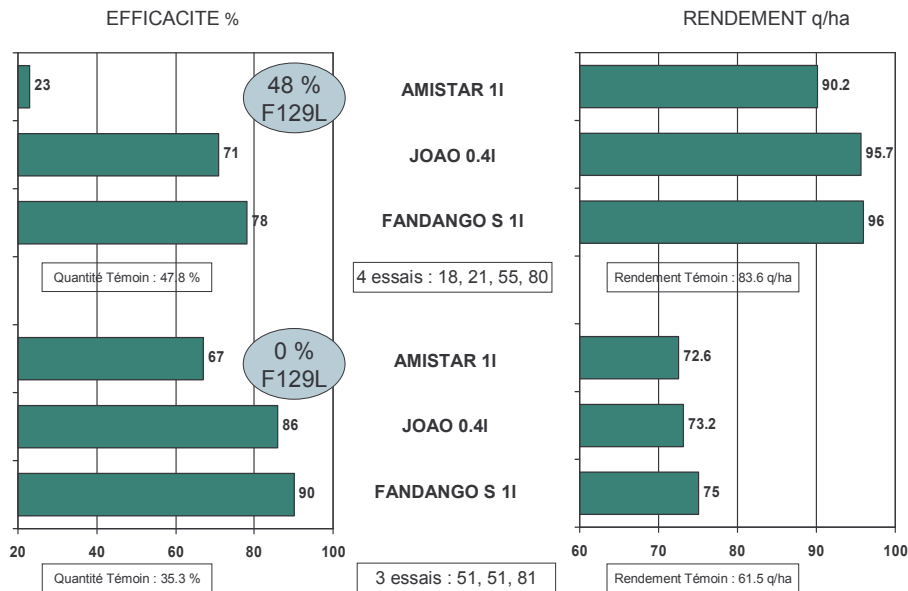
Les lettres a,b,c...représentent les groupes homogènes du test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5%

En 2009, en présence de la substitution, l'efficacité de toutes les strobilurines testées est affectée. Les différences d'activité intrinsèque entre les strobilurines sont conservées et à l'image de 2008. L'azoxystrobine reste la molécule la plus concernée, alors que la pyraclostrobine confirme qu'elle est la moins touchée. La picoxystrobine et la trifloxystrobine

sont affectées de la même façon. Les rendements confirment parfaitement la hiérarchie des efficacités observées. (Fig.8)

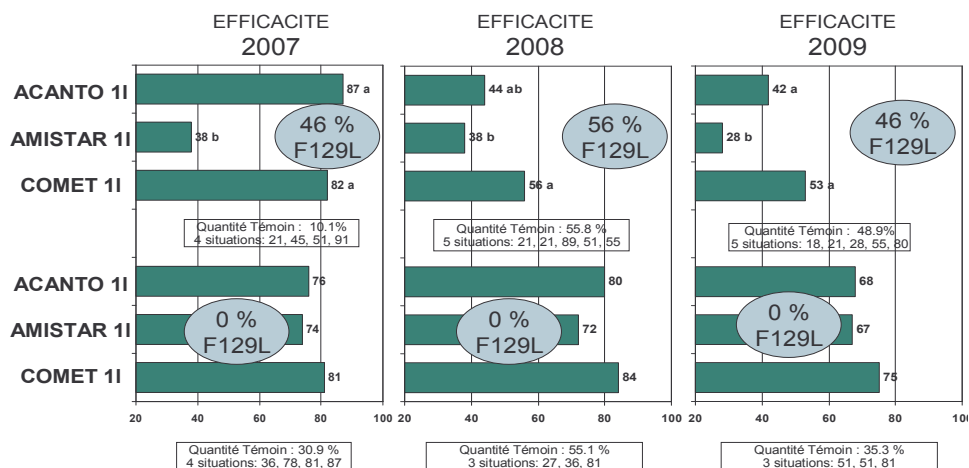
En l'absence de souches résistantes l'efficacité des strobilurines reste d'un bon niveau mais toutefois inférieure aux efficacités observées en 2008.

Figure 8 : Efficacités et rendements des strobilurines en fonction de la fréquence de la résistance (F129L) de *D. teres* « Réseau Performance Orge » 2009



Les performances relatives des strobilurines de 2007 à 2009 sont résumées à la figure 9. Elles soulignent la stabilité des résultats obtenus sur les 3 ans.

Figure 9 : Impact de la résistance (F129L) de *D. teres* aux strobilurines sur le « Réseau Performance Orge » de 2007 à 2009. Analyses par méthode moléculaire qPCR (BASf)



Les lettres a,b,c...représentent les groupes homogènes du test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5%

DISCUSSION

En France, la résistance d'*Helminthosporium teres* aux strobilurines est bien implantée et ne semble pas avoir progressé significativement depuis 2006 et reste distribuée de façon hétérogène. Les régions de l'ouest semblent moins concernées. La résistance n'est jamais généralisée. La substitution (F129L) se situe en position 129 du cytochrome b et induit des niveaux de résistance faibles à modérés (Stammler & al, 2006 ; FRAC, 2009). Si en 2006, seule l'azoxystrobine semblait concernée par une perte d'efficacité en pratique, en 2007, 2008, et en 2009, toutes les strobilurines testées sont concernées. Des nuances entre les molécules sont clairement identifiées. Les résultats indiquent que l'activité de la pyraclostrobine et de la trifloxystrobine est en effet moins pénalisée. Contrairement à toute attente, des niveaux de résistances faibles à modérés sont ainsi associés à des baisses de performance au champ significatives. Sur le plan des recommandations pratiques, il est conseillé de toujours associer les strobilurines avec d'autres fongicides efficaces et présentant d'autres modes d'action (en particulier prothioconazole ou cyprodinil). Eviter également les doubles applications de strobilurines ou de prothioconazole sur une même saison.

CONCLUSION

L'organisation en réseau de la surveillance des populations pathogènes a permis de détecter très tôt des changements dans les populations de *D.teres*, et d'en évaluer immédiatement les conséquences pratiques. Il en a découlé des recommandations pratiques plus ciblées concernant l'utilisation des strobilurines dans les programmes de traitement conseillés, et une communication plus argumentée sur la nécessité de diversifier les modes d'actions des produits utilisés en culture.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Agence du Développement Agricole et Rural (ADAR) qui assure le financement de programmes portant sur la recherche appliquée et sur la diffusion des innovations techniques auprès des exploitants agricoles et en particulier dans le cadre du projet CASDAR 6128 : «Gestion des fongicides et insecticides sur blé et colza : suivi des phénomènes de résistances, et développement d'outils d'aide au raisonnement des traitements fongicides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives », qu'ils en soient remerciés.

BIBLIOGRAPHIE

FRAC: Fungicide resistance action Committee: <http://www.frac.info/frac/index.htm> : [Minutes of 2008 Meeting Recommendations for 2009](#)

Collectif, 2009. Note Commune INRA, SPV, ARVALIS - Institut du végétal. Résistances aux fongicides : maladies des céréales à paille - 2009.

<http://www.afpp.net/commande/commissions/maladie.htm#Résistances%20aux%20fongicides>

Stammler G., Strobel D., Semar M., KLAPPACH K., 2006. Diagnostics of fungicide resistance and relevance of laboratory data. In Fungicide resistance are we winning the battle but losing the war ? *Aspects of Applied Biology*, 178 :29-36.

Sierotzki H., Frey R., Wullschlegler J., Palermo S., Karli S., Godwin J. and Gisi U. (2006, accepted for publication) Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. *Pest Management Science* 63:225–233 (2007)

Semar M., Strobel D., Koch A. Klappach K. and Stammler G. (2007): Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L substitution in the cytochrome b gene. *Journal of Plant Diseases and Protection*: 114: 117-119

**RÉSISTANCE DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AUX FONGICIDES UTILISÉS
SUR COLZA : BILAN DE LA SURVEILLANCE DU TERRITOIRE DE 2000 À 2008**

J. MOINARD ⁽¹⁾, P. LEROUX ⁽²⁾, A. PENAUD ⁽³⁾, F. REMUSON ⁽⁴⁾,
A.-S. WALKER ⁽²⁾, A. MICOUD ⁽⁴⁾ et B. HUGUET ⁽⁵⁾

- ⁽¹⁾ DRAAF-SRAL Midi-Pyrénées, Bd Armand Duportal, 31074 Toulouse Cedex, France
jacques.moinard@agriculture.gouv.fr
- ⁽²⁾ INRA-BIOGER-CPP, UMR 1290, avenue L. Brétignières, BP01, 78850 Thiverval-Grignon,
France
lerouxp@versailles.inra.fr ; walker@versailles.inra.fr
- ⁽³⁾ CETIOM, Centre de Grignon, avenue L. Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon, France
penaud@cetiom.fr
- ⁽⁴⁾ AFSSA-URPP, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France
a.micoud@afssa.fr ; f.remuson@afssa.fr
- ⁽⁵⁾ DRIAAF-SRAL Ile de France, 18 avenue Carnot, 94234 Cachan Cedex, France
bertrand.huguet@agriculture.gouv.fr

RÉSUMÉ

Depuis la mise en évidence sur colza à la fin des années 90 des premiers cas avérés de résistance aux benzimidazoles, la surveillance de *Sclerotinia sclerotiorum* s'est organisée au sein d'un réseau national multi-partenaires. Ce réseau est animé par le SPV en collaboration avec le CETIOM et avec l'appui scientifique et méthodologique de l'INRA, auquel contribuent les sociétés phytosanitaires. Depuis 2007, les priorités et les modalités de mise en œuvre des monitorings sont discutées au sein d'un groupe de travail. Ce dispositif est complété par un réseau d'essais spécifiques mis en place par le SPV, le CETIOM et les sociétés phytosanitaires. Les données issues de cette surveillance sont annuellement mises à disposition des professionnels au travers d'une « Note commune » SPV-CETIOM-INRA. Un bilan de ces actions de 2000 à 2008 est présenté.

Mots-clés : colza, *Sclerotinia sclerotiorum*, monitoring, résistance, fongicide

SUMMARY

***SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* RESISTANCE TO FUNGICIDES USED ON OILSEED RAPE – A NATIONAL SURVEY ASSESSMENT (2000–2008)**

A national *Sclerotinia sclerotiorum* survey network including several partners has been set up in 2000, after detecting resistant strains to fungicides-treated oilseed rape in the late 90s. This network is led by the SPV in collaboration with CETIOM. The scientific and methodological support is brought by INRA, with a contribution of the agrochemical companies. Since 2007, monitoring priorities and technical processes are discussed within a specific working group. This device is completed by a specific trial network set up by three partners: SPV, CETIOM and agrochemical companies. Annual survey results are at professionals disposal, through a SPV-CETIOM-INRA "Note commune". Hereafter is presented an assessment of these actions (2000-2008).

Key words: oilseed rape, *Sclerotinia sclerotiorum*, monitoring, resistance, fungicide

INTRODUCTION

Le colza est le premier oléagineux cultivé en France, situation accentuée par la politique de développement des biocarburants dont le programme a été lancé en septembre 2004.

Les attaques sur tiges dues à *Sclerotinia sclerotiorum* peuvent provoquer des pertes de rendement importantes : jusqu'à 20 q/ha, voire la perte de récolte, ce qui en fait une maladie majeure du colza. L'agent pathogène est un champignon polyphage (plus de 400 plantes hôtes dénombrées), qui se conserve dans le sol sous forme de sclérotés pendant de nombreuses années (6-10 ans).

Aucune variété de colza n'étant tolérante au *Sclerotinia*, la lutte repose donc essentiellement sur l'utilisation de fongicides. Principale maladie sur colza visée par la protection fongicide qui la contrôle sans l'éradiquer, cette protection préventive utilisait traditionnellement des spécialités à base de carbendazime, de triazoles (seuls ou associés au carbendazime) et de dicarboximides.

L'identification de souches de *S. sclerotiorum* résistantes aux benzimidazoles dans les principales régions de production dès la fin des années 90 a incité à diversifier les solutions de lutte et à suivre leur comportement, notamment en situation de résistance, au travers de l'organisation d'un réseau de surveillance national multi-partenaires SPV-INRA-CETIOM. Animé par le SPV en collaboration avec le CETIOM et avec l'appui scientifique et méthodologique de l'INRA, les sociétés phytosanitaires contribuent également à cette surveillance en réalisant des suivis "résistance", dans le cadre du suivi post-AMM des substances actives.

Depuis 2007, les priorités (en terme de substances actives à surveiller) et les modalités de mise en œuvre des monitorings sont discutées au sein d'un groupe de travail "Résistance *Sclerotinia* du colza". Les choix sont faits sur la base d'une synthèse partagée des suivis réalisés au cours de la campagne précédente, des dernières connaissances scientifiques acquises au niveau national et international, et enfin, de l'évolution des moyens chimiques disponibles sur le territoire. Chaque année, ce sont plusieurs centaines de parcelles réparties sur l'hexagone qui font l'objet de prélèvements de sclérotés en vue d'analyses au laboratoire.

Ce dispositif est complété par un réseau d'essais spécifiques - "Observatoire de l'érosion de l'efficacité des fongicides" - mis en place par le SPV depuis 2000, et complété par des essais CETIOM et sociétés phytosanitaires depuis 2007 pour atteindre une quinzaine de sites par an. Ce réseau national d'essais permet de confronter les résultats de laboratoire avec d'éventuelles dérives d'efficacité au champ.

Les données issues de cette surveillance sont annuellement mises à disposition des professionnels, au travers d'une "Note Commune" SPV-CETIOM-INRA. Cette Note technique prend en compte l'ensemble des moyens de lutte disponibles (agronomiques, biologiques et chimiques). Elle constitue une base de raisonnement pour une gestion durable des moyens de lutte, en tenant compte de l'état des dernières connaissances concernant les phénomènes de résistance.

Cette surveillance s'inscrit également dans le projet CASDAR (2007-2009) " *Améliorer et développer les outils de raisonnement des traitements fongicides et insecticides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives utilisées contre les bioagresseurs*".

Le travail présenté dresse un bilan national de près de 10 années de suivi de l'efficacité des traitements fongicides sur la sclérotiniose du colza (2000-2008), de la sensibilité de *Sclerotinia* à ces fongicides et de l'évolution des outils de gestion du risque.

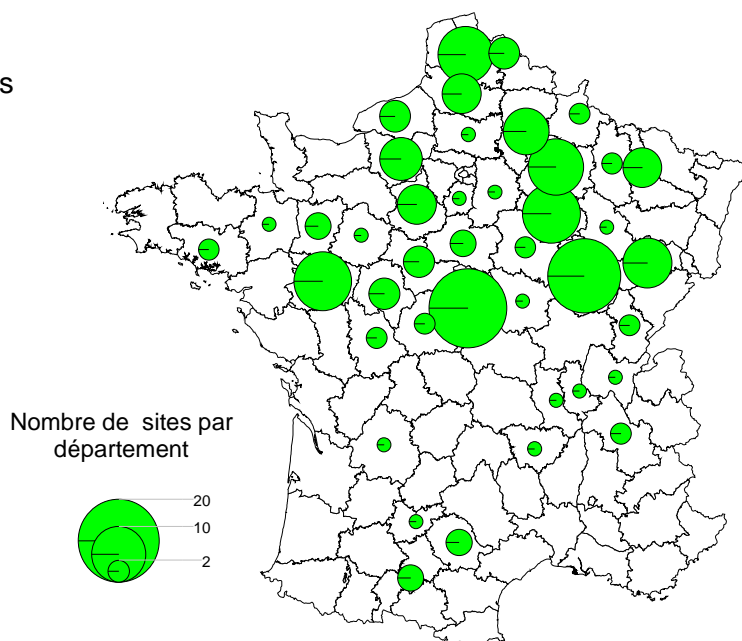
MATÉRIEL ET MÉTHODE

PROSPECTION

Au début de la mise en place du réseau de surveillance (2000 et 2001), les prélèvements de sclérotés se sont effectués le plus souvent sur des sites où des baisses d'efficacité, voire des échecs complets de la protection fongicide ont été constatés. A partir de 2002 et 2003, années à faible pression *Sclerotinia*, l'échantillonnage devient plus aléatoire au niveau des parcelles, et plus représentatif également au niveau national par l'élargissement du suivi à d'autres régions de culture (**fig. 1**). Ainsi proportionnellement, dès 2002, plus d'analyses ont été réalisées dans les régions de l'ouest de la France, moins touchées par la résistance.

Figure 1 :

Suivi de la résistance en 2008 :
répartition des 183 sites prospectés
Resistance monitoring (2008) :
national distribution of the 183
prospected sites



ESSAIS « ÉROSION »

Des essais spécifiques complémentaires sont mis en place dans le cadre du réseau multipartenaires au sein des principales régions productrices de colza (**fig. 1**). Ils permettent de suivre une éventuelle baisse d'efficacité et d'établir un classement des fongicides sur cette base pour adapter le conseil auprès des professionnels.

Le traitement des parcelles d'essais se fait par pulvérisation unique, au stade F2-G1, de la spécialité commerciale ou du mélange (**tableau II**). Une modalité dite "référence haute" ou « 3 voies » associe 3 modes d'action différents et permet de valider les essais. L'efficacité des traitements est rapportée en % de celle de la parcelle témoin non traitée.

La gamme fongicide utilisée pour la lutte contre la sclérotiniose du colza a subi une grande évolution ces dernières années : sur 5 familles utilisées entre 2000 et 2008, les substances actives (s.a.) appartenant à deux d'entre elles ont fait l'objet d'un retrait d'AMM pour cet usage (benzimidazoles et dicarboximides) ; les solutions fongicides qui se maintiennent au-delà de 2009 concernent les carboxamides, les IDM et les strobilurines (**tableau I**).

Tableau I :

Familles fongicides utilisées pour la lutte contre la sclérotiniose du colza sur la période 2000-2008

Fungicides families used to protect oilseed rape against S. sclerotiorum (2000-2008)

| | Benzimidazoles (BMC) | | Dicarboximides (Imides cycliques) | | Carboxamides | Strobilurines (QoI) | | Triazoles (IDM) | |
|---|----------------------|--|---|-----------------------------------|---|---|---|--|---|
| | s.a. seule | Association | s.a. seule | Association | s.a. seule | s.a. seule | Association | s.a. seule | Association |
| substance active (s.a.) | carbendazime | +iprodione* +vinchlozoline** +flusilazole*** | vinchlozoline* iprodione** procymidone*** | *+carbendazime **+carbendazime | boscalid | azoxystrobine | +cyproconazole | tébuconazole* metconazole** prothioconazole*** | cyproconazole (IDM) + azoxystrobine (QoI) |
| Spécialité commerciale (SC) | BAVISTINE | CALIDAN* DYNIT** PUNCH*** | RONILAN* KIDAN** KIMONO*** | DYNIT* CALIDAN** | PICTOR PRO | AMISTAR | PRIORI XTRA | HORIZON* SUNORG** JOAO*** | PRIORI XTRA |
| Fin d'utilisation pour l'usage sclérotiniose du colza | 30/06/2008 | * 30/06/2008 ** 31/12/2007 *** 31/12/2009 | * 31/12/2007 ** 30/10/2007 *** 30/06/2008 | * 31/12/2007 ** 30/06/2008 | | | | | |
| Observations | | | | | Utilisée sur sclérotiniose du colza depuis 2006 | Utilisée sur sclérotiniose du colza depuis 2005 | Utilisée sur sclérotiniose du colza depuis 2007 | Tébuco. et metco. autorisés sur colza comme régulateurs et comme fongicides. Prothio. utilisé sur sclérotiniose du colza depuis 2008 | Utilisée sur sclérotiniose du colza depuis 2007 |

Tableau II :

Protocole d'essais « érosion de l'efficacité des fongicides » : substances actives utilisées (x) sur la période 2000-2008

Active substances used (x) from 2000 till 2008 in the trial protocol « erosion of fungicides effectiveness »

| Année | carbendazime | carbendazime + iprodione | tébuconazole | azoxystrobine | procymidone | boscalid | prothioconazole | boscalid + prothioconazole + azoxystrobine (modalité 3 voies) |
|-------|--------------|--------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|-----------------|---|
| 2000 | X | X | | | | | | |
| 2001 | X | X | X | | | | | |
| 2002 | X | X | X | | | | | |
| 2003 | X | X | X | | X | X | | |
| 2004 | X | X | X | X | X | X | | |
| 2005 | X | X | X | X | X | X | | X |
| 2006 | | | X | X | X | X | | X |
| 2007 | | | X | X | X | X | X | X |
| 2008 | | | X | X | | X | X | X |

PRÉLÈVEMENTS ET ANALYSES

Pour le suivi de la résistance aux fongicides, et pour chaque site (parcelle), entre 20 et 25 sclérotés sont prélevés juste avant la récolte, issus chacun d'une plante différente (tige infectée de colza et non pas à partir du sol).

Les prélèvements sont systématiquement réalisés sur chaque modalité des essais "érosion" et, lors de prospections aléatoires, sur des parcelles de colza réparties en priorité sur les principaux bassins de production.

A partir de chaque échantillon prélevé, 20 isolats de *S. sclerotiorum* sont obtenus par mise en culture de 10 sclérotés partagés en deux sur milieu nutritif gélosé supplémenté en streptomycine pour inhiber le développement bactérien. Dix sclérotés sont gardés en réserve pour d'éventuels tests complémentaires.

Après 5 jours d'incubation, des disques de 6 mm de diamètre prélevés sur le front de croissance des colonies mycéliennes sont déposés sur des milieux gélosés contenant une dose discriminante de fongicide, à l'exception du témoin.

Les cultures sont alors incubées à 20°C à l'obscurité pendant 3 jours, et le diamètre moyen des colonies est mesuré à cette date.

Pour les tests de sensibilité aux BMC et dicarboximides, le milieu (malt extract agar) est supplémenté avec 1 et 10 mg/l de carbendazime, et 1 et 2 mg/l d'iprodione à partir des spécialités commerciales correspondantes.

Les isolats sont considérés hautement résistants lorsqu'une croissance mycélienne significative a lieu pour les deux concentrations et faiblement résistants lorsqu'elle n'intervient que pour la plus faible.

Les isolats sensibles ne présentent aucun développement mycélien quelle que soit la concentration en fongicide (inhibition du développement).

Pour les tests de sensibilité au boscalid et aux IDM, un milieu de base au succinate de sodium pour seule source de carbone est supplémenté avec 2 mg/l de boscalid, metconazole et prothioconazole. Chaque substance active est solubilisée dans l'éthanol. La concentration finale en éthanol des essais et témoin n'excède pas 0,5%.

Quand il n'y a pas de croissance radiale ou qu'elle ne dépasse pas deux fois le diamètre de l'implant, la souche est déclarée sensible.

Quand la souche a donné une culture dont le diamètre est supérieur à 50% de celui du témoin, la souche est déclarée résistante.

Une croissance intermédiaire entre 25% et 50% du témoin, ou supérieure à 50% nécessite une répétition du test de sensibilité utilisant une gamme de concentrations de 0,5 - 2 et 5 mg/l.

Si la croissance est encore forte, les souches sont re-testées à l'INRA de Versailles pour un diagnostic définitif.

RÉSULTATS

Le **tableau III** récapitule depuis l'année 2000 le nombre de parcelles échantillonnées dans les différents départements et régions de l'hexagone par les partenaires du réseau de surveillance. Il présente également les familles fongicides testées et les cas de résistances observés au cours de cette période.

A noter que le suivi de l'efficacité du carbendazime était déjà effectif bien avant 2000, un cas de résistance ayant déjà été suspecté en Côte d'Or dès 1994 (Souliac, *et al*, 1995). De 1995 à 1998 une enquête portant sur 155 parcelles n'a mis en évidence que deux autres cas (1998 - Ile de France).

Dès l'automne **1999**, le SPV et le CETIOM mettent en place 9 essais avec un tronc commun de modalités représentant les grandes familles de produits autorisés à cette date pour l'usage *Sclerotinia* du colza.

L'échantillonnage réalisé par le SPV (prospection + essais) révèle la présence de souches de *Sclerotinia* résistantes au carbendazime dans 18 des 85 parcelles prélevées (régions Ile de France, Centre, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Auvergne, Lorraine, Franche-Comté) (Kaczmar *et al*, 2000).. Dans une majorité des cas, la résistance diagnostiquée au laboratoire s'accompagne d'une baisse de l'efficacité au champ.

Tableau III :

Suivi de la résistance de *Sclerotinia* aux fongicides dans les différents essais et parcelles de colza en production de 2000 à 2008

Assessment of Sclerotinia resistance to fungicides in the trials and prospected sites from 2000 till 2008

| Année | Nb Régions | Nb Départ. | Parcelles échantillonnées (prélèvements sclérotés) | | | Familles fongicides testées | s.a. testées | Cas de résistance (analyses sclérotés) Sites présentant des isolats résistants | | | | |
|-------|------------|------------|--|--------|---|-----------------------------|---|---|---------------------------|-------------------------|----------------|----------------|
| | | | Total | Détail | Tests laboratoire | | | BMC (% de sites) | Dicarboximides (Nb sites) | Carboxamides (Nb sites) | Qol (Nb sites) | IDM (Nb sites) |
| 2000 | 11 | 31 | 270 | 247 | SPV-CETIOM 23 Firmes | BMC Dicarboximides | carbendazime iprodione | 72 | 0 | | | |
| 2001 | 11 | 27 | 213 | 213 | SPV-CETIOM | BMC Dicarboximides | carbendazime iprodione procymidone | 69 | 3 | | | |
| 2002 | 13 | 35 | 340 | 329 | SPV-CETIOM 11 Firmes | BMC Dicarboximides | carbendazime iprodione procymidone | 57 | 1 | | | |
| 2003 | 11 | 28 | 162 | 148 | SPV-CETIOM 14 Firmes | BMC Dicarboximides | carbendazime iprodione procymidone | 50 | 0 | | | |
| 2004 | 13 | 33 | 234 | 232 | SPV-CETIOM 2 Firmes | BMC Dicarboximides | carbendazime iprodione procymidone | 69 | 0 | | | |
| 2005 | 10 | 24 | 174 | 119 | SPV-CETIOM 55 Firmes | BMC Dicarboximides | carbendazime iprodione procymidone | 70 | 4 | | | |
| 2006 | 16 | 46 | 431 | 202 | SPV-CETIOM 229 Firmes ⁽¹⁾ | Dicarboximides | iprodione, procymidone | | 1 | | | |
| 2007 | 12 | 29 | 298 | 114 | SPV-CETIOM 184 Firmes ⁽²⁾ | Carboxamides IDM | boscalid prothio., metco. | | | 0 | | 0 |
| 2008 | 13 | 24 | 183 | 62 | SPV CETIOM 121 Firmes ⁽²⁾ | Carboxamides IDM Qol | boscalid prothio., metco. azoxystrobine | | | 0 | 0 | 0 |

(1) SPV et CETIOM ont effectué les tests sur iprodione et procymidone, les firmes (Philagro) uniquement sur procymidone

(2) SPV et CETIOM ont effectué les tests sur toutes les familles mentionnées, les firmes (BASF-Philagro) uniquement sur carboxamides

En 2000, sur l'ensemble de l'échantillonnage national, 72% des sites ayant fait l'objet d'une analyse montrent la présence de souches résistantes au carbendazime. Les résultats des tests de sensibilité du *Sclerotinia* au carbendazime confirment, en les amplifiant, ceux de 1999.

En situation de résistance généralisée (3 essais), le carbendazime utilisé seul est inefficace. Les spécialités à base de dicarboximides (iprodione seule ou en association avec le carbendazime) conservent une efficacité satisfaisante (**fig. 3**).

En 2002-2003, la baisse apparente des cas de résistance aux BMC est à corréliser avec une meilleure représentativité de l'échantillonnage.

En 2003, les fréquences de détection les plus importantes de résistance au carbendazime se situent toujours en Lorraine, Bourgogne, Centre, Auvergne, Ile de France et Champagne-Ardenne. Une détection accrue des cas de résistance s'observe en Poitou-Charentes et Picardie. Le carbendazime présente toutefois cette année-là une bonne efficacité (>70%), mais elle est liée à une faible pression de maladie ; le taux d'attaque du témoin est inférieur à 5% (**fig. 3**).

En 2004 la résistance aux BMC est détectée dans près de 70% des situations analysées, certaines régions étant particulièrement touchées (Lorraine, Bourgogne, Nord, Centre, Normandie). La proportion de parcelles présentant des souches résistantes aux BMC progresse en 2004, malgré une moindre pression de sélection liée à la diminution des applications de BMC.

En 2005 le nombre de parcelles échantillonnées est en baisse par rapport à 2004, en raison d'une faible pression *Sclerotinia* sur l'ensemble de l'hexagone. Toutefois, dans les principales régions productrices de colza, le nombre d'analyses reste important et permet de déterminer de façon significative le taux de parcelles concernées par la résistance.

Des sclérotés résistants aux dicarboximides ont été mis en évidence sur 4 des 174 sites prospectés. Mais dans ces 4 sites, la proportion de sclérotés résistants ne dépasse pas 20% du nombre de sclérotés analysés, et l'on ne constate pas d'échec de traitement.

Vis à vis des BMC (carbendazime), le taux de parcelles présentant au moins un isolat résistant, atteint 40% en Champagne-Ardenne et jusqu'à 90% en Lorraine. Il est en moyenne de 70% sur les 5 principales régions suivies. Si ce taux moyen est équivalent à celui constaté pour les mêmes régions en 2000 et 2001, deux remarques importantes s'imposent :

- Les parcelles analysées sont plus représentatives de la diversité des situations (cf. « Matériel et méthode / Essais »).
- Le recours au carbendazime sur colza est en net recul depuis 2001, au profit des imides cycliques et des triazoles.

Pour ces deux raisons, il apparaît donc que la proportion de parcelles résistantes ne baisse pas, voire progresse, malgré une moindre pression de sélection liée à la diminution des applications de carbendazime, et malgré la régression apparente des cas de résistance à cette substance active entre 2002 - 2003 (57% et 50% respectivement) et les années précédentes (environ 70%).

Le suivi du **carbendazime** s'est arrêté en 2005 pour deux raisons essentielles :

- La première est la conséquence d'une généralisation de la résistance de *Sclerotinia* à ce fongicide et de son impact en culture (échecs de traitements), qui a débuté après une quinzaine années d'utilisation (**fig. 2**) ;
- La deuxième est directement liée à la décision de retrait d'AMM du carbendazime (fin d'utilisation : décembre 2009 - **tableau I**).

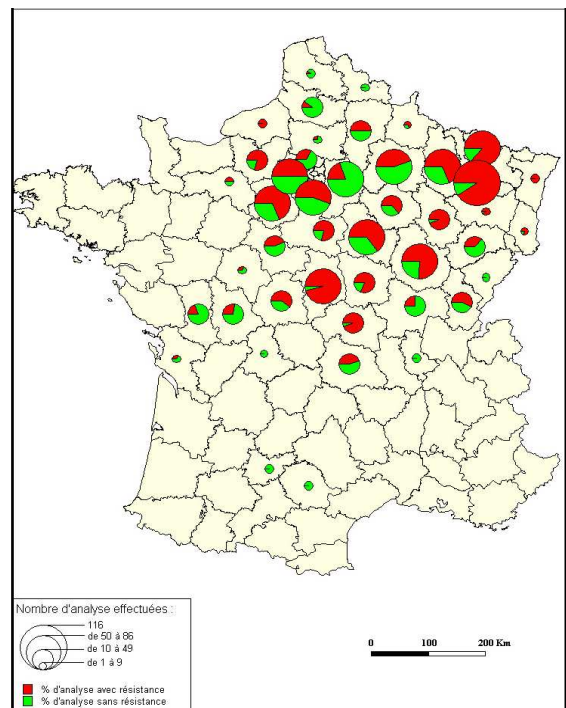
Figure 2 :

État de la résistance *Sclerotinia* au carbendazime en France de 2000 à 2004

Sclerotinia resistance to carbendazim in France from 2000 till 2004

Malgré une utilisation en progression des **dicarboximides** entre 2001 et 2006, il n'y a pas eu d'évolution du nombre de cas de résistance ; les détections sont restées ponctuelles et aléatoires, sans relation avec l'utilisation de cette famille. Les rares isolats détectés correspondent vraisemblablement à des mutations spontanées, avec une fitness défavorable pour ces souches mutantes, (SPV-CETIOM-INRA, 2007).

En 2007, seuls les **carboxamides** (boscalid) et les **IDM** (triazoles dont metconazole et prothioconazole), qui resteront autorisés pour lutter contre le *Sclerotinia* au-delà de 2009, ont fait l'objet de tests de résistance. Aucun des 298 sites prospectés répartis dans les principales régions productrices de colza n'a présenté



de souches résistantes aux carboxamides ; aucun des 114 sites testés vis-à-vis des triazoles n'a montré la présence de résistance avérée.

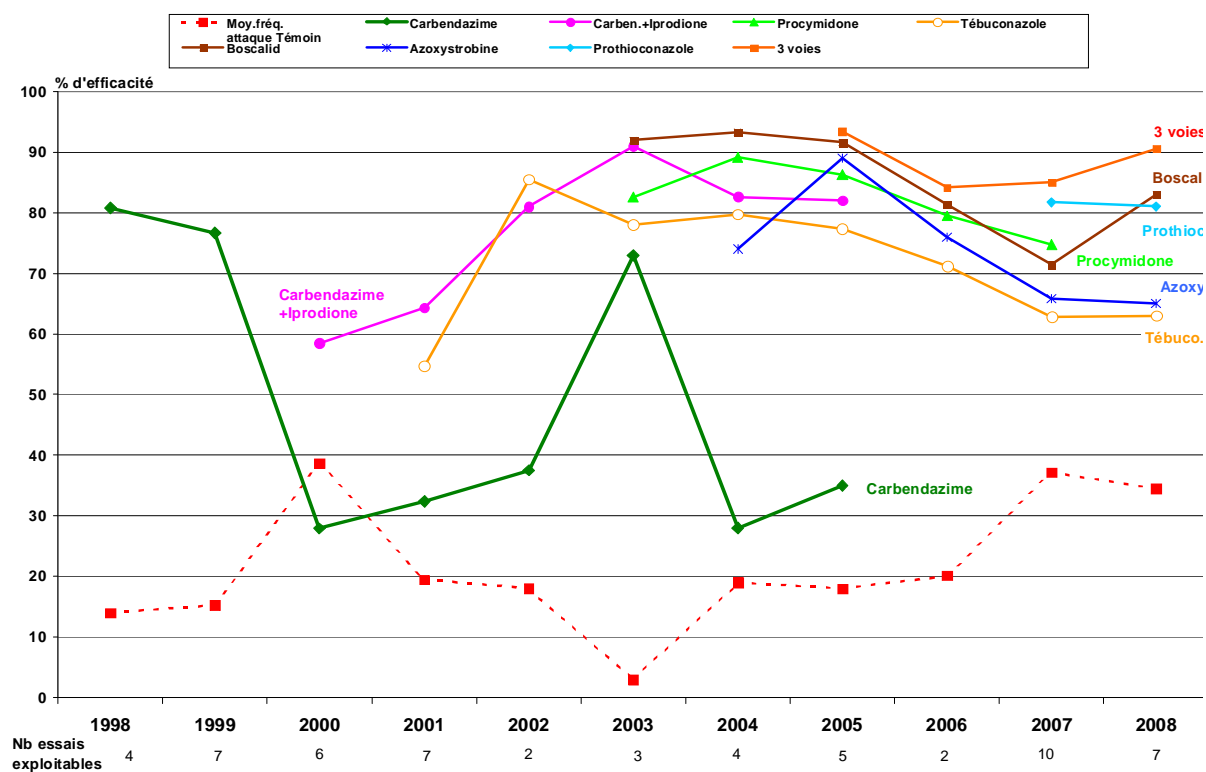
Les essais réalisés dans le cadre du suivi de l'érosion de l'efficacité des fongicides montrent que le **prothioconazole** et le **boscalid** procurent la meilleure efficacité moyenne, d'un niveau au moins équivalent à la **procymidone**. L'**azoxystrobine** et le **tébuconazole** atteignent des niveaux d'efficacité inférieurs aux 3 meilleures substances actives (**fig. 3**).

Aucun des 183 sites prospectés en **2008** n'a montré la présence de résistance avérée, sur plus de 2000 souches (sclérotés ou parties de sclérote) testées vis-à-vis des carboxamides et plus de 1000 souches testées vis-à-vis des IDM et des strobilurines. Aucune dérive d'efficacité au champ n'a été constatée.

Les essais 2008 confirment que deux substances actives se détachent en procurant une efficacité moyenne supérieure à 80% : le **boscalid** et le **prothioconazole** pour un taux d'attaque moyenne du témoin de 34%. Le **tébuconazole** et l'**azoxystrobine** donnent une efficacité moyenne proche de 65% (**fig. 3**).

Figure 3 : Suivi de l'efficacité des fongicides utilisés sur sclérotiniose du colza :
réseau d'essais « érosion »

*Fungicides effectiveness monitoring on oilseed rape sclerotinia stem rot :
"Erosion" specific trial network*



DISCUSSION

Le monitoring résistance vis-à-vis des traitements réalisés sur les parcelles prospectées et les essais répond à 3 objectifs :

- suivre dans le temps l'évolution de la résistance de *S. sclerotiorum* aux fongicides (évaluation de l'efficacité des familles chimiques présentant des modes d'actions différents) ;

- identifier des pratiques phytosanitaires favorables au développement de souches résistantes et *a contrario*, vérifier l'incidence d'un développement de souches résistantes sur l'efficacité au champ ;
- classer les différentes substances actives en fonction de leur efficacité pour adapter le conseil et proposer des stratégies de traitement propres à gérer le risque *Sclerotinia* tout en préservant leur efficacité dans le temps.

Les résultats du suivi effectué par le réseau de surveillance ont permis de mettre en évidence l'évolution de la résistance de *S. sclerotiorum* aux BMC au niveau du territoire, mais aussi l'aspect ponctuel et aléatoire de la résistance de *Sclerotinia* aux dicarboximides, sans relation avec l'utilisation de cette famille, malgré une utilisation intensive au champ.

Ils démontrent également qu'en situation de risque d'attaque fort, les carboxamides (boscalid) et les IDM (prothioconazole) apparaissent actuellement comme les familles fongicides à l'efficacité la plus élevée pour lutter contre la sclérotiniose du colza.

Aucune résistance avérée à leur encontre n'a été mise en évidence, aucune dérive d'efficacité au champ n'a été constatée.

En situation de risque modéré, ou si le *Sclerotinia* n'est pas la cible principale du traitement, les triazoles classiques (tébuconazole, metconazole) et l'azoxystrobine, seuls ou associés, présentent un niveau d'efficacité satisfaisant.

Les carboxamides et IDM sont les fongicides actuellement les plus utilisés. Avec les strobilurines, ils ont un mode d'action uni-site (cible unique) et présentent un risque moyen à élevé pour le développement de la résistance : ainsi les carboxamides et IDM sont classés en risque moyen par le FRAC, les strobilurines en risque fort.

Ce classement doit toutefois être relativisé dans le cas du *Sclerotinia* qui est un champignon à moindre risque (1 cycle/an) par rapport à d'autres pathogènes comme *Septoria tritici* sur blé. De plus, la dispersion des spores s'effectue sur des distances réduites (quelques dizaines de mètres).

Pour limiter la pression de sélection et ainsi permettre de retarder l'apparition et le développement d'une résistance généralisée, c'est à dire, en d'autres termes, d'assurer une gestion durable du risque et des moyens de lutte (« faire durer » l'efficacité du traitement chimique), 2 grands types d'actions doivent être mis en oeuvre :

➤ **Actions sur l'inoculum de la parcelle pour limiter le risque d'attaque :**

- Rotations allongées et alternance des cultures afin d'éviter l'utilisation d'une même substance active (ou famille de fongicides) sur une même parcelle.
- Maîtrise des adventices dicotylédones sensibles au *Sclerotinia* à conduire dans les cultures non hôtes, (essentiellement des céréales) : ces adventices peuvent constituer des hôtes secondaires du champignon qui est polyphage.
- Réduction du potentiel infectieux de la parcelle par utilisation d'un agent fongique de lutte biologique performant vis-à-vis du *Sclerotinia* : *Conothyrium minitans* (Contans WG) ; les essais menés depuis 2001 au sein du réseau d'expérimentation SPV-FREDON, montrent une réduction significative des attaques, dès la première application, en pré-semis incorporé à la dose de 2 kg/ha (expérimentation).

➤ **Raisonnement de la lutte fongicide :**

- Application d'un traitement fongicide seulement en fonction d'un risque *Sclerotinia* avéré : **la lutte ne doit pas être systématique**, la rentabilité d'un fongicide n'étant pas assurée tous les ans. La prise de décision doit s'effectuer en fonction du climat à la floraison, du risque agronomique et du milieu. Le kit pétales CETIOM et le modèle climatique SPV donnent des informations pertinentes sur le risque *Sclerotinia* de l'année ; mais ces outils présentent cependant des limites lors d'années climatiques très atypiques comme 2007 (sécheresse en avril, suivie de conditions très pluvieuses à partir de fin floraison).

- Si nécessaire, positionnement du traitement fongicide contre le *Sclerotinia* à partir de la chute des premiers pétales, période d'apparition des premières siliques sur plus de 50% des plantes (stade F1-G1).
- Alternance des familles chimiques dans la rotation sur une même parcelle afin d'éviter de favoriser la résistance.

CONCLUSION

L'apparition de souches résistantes au carbendazime utilisé dans la lutte contre la sclérotiniose du colza, survenue dès le milieu des années 90, a justifié la création d'un réseau de surveillance multi-partenaires, parallèlement à la mise en place d'essais spécifiques pour suivre, notamment, l'évolution de l'efficacité des traitements dans le temps ainsi que leur régularité.

La polyphagie du champignon, le mode d'action unisite des substances actives actuellement utilisées et le resserrement de leur nombre disponible pour cette lutte imposent une vigilance accrue et la poursuite des efforts de partenariat pour une gestion à moyen terme de l'efficacité du traitement fongicide.

Les outils d'aide à la décision et de gestion du risque mis à disposition des professionnels chaque année par le réseau SPV-CETIOM-INRA (« Note commune ») sont indispensables pour assurer une protection maximale des cultures et prévenir la sélection et le développement de résistances, en raisonnant la lutte et en privilégiant aussi son approche intégrée par l'utilisation de solutions alternatives aux traitements chimiques.

REMERCIEMENTS

Une part de ce travail (2007 - 2009) a été soutenue par le CASDAR (Compte d'affectation Spéciale pour le développement Agricole et Rural) dans le cadre du projet n°128 « *Améliorer et développer les outils de raisonnement des traitements fongicides et insecticides en grandes cultures, afin de limiter le recours à la lutte chimique et de préserver l'efficacité des substances actives utilisées contre les bioagresseurs* ».

Nous remercions les collègues des SRPV, des FREDON et des organismes professionnels qui ont participé à ces plans de surveillance en réalisant les prélèvements d'échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

Kaczmar M J., Wilson V. and P. Leroux, 2000 - Sclérotiniose du colza : le carbendazime en sursis ? *Phytoma-LDV* 529, 31-33.

Penaud A., Micoud A., Moinard J., Remuson F., Walker A.-S., Leroux P., 2009 - Monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to fungicides. IOBC (à paraître)

SPV-CETIOM-INRA, 2000 - Résistance du *Sclerotinia* au carbendazime., *Note commune 2000*

SPV-CETIOM-INRA, 2001 Résistance du *Sclerotinia* au carbendazime : bilan 2000 et préconisations pour 2001. *Note commune*

SPV-CETIOM-INRA, 2003. Bilan résistance du *Sclerotinia* et préconisations pour 2003. *Note commune*

SPV-CETIOM-INRA, 2005 - Résistance *Sclerotinia*. *Note commune*

SPV-CETIOM-INRA, 2006 - *Sclerotinia* du colza : Suivi des résistances et recommandations. *Note commune*

SPV-CETIOM-INRA, 2007 - *Sclerotinia* du colza : Suivi des résistances et recommandations, *Note commune*

SPV-CETIOM-INRA, 2008 - *Sclerotinia* du colza : Suivi des résistances et recommandations. *Note commune*

SPV-CETIOM-INRA, 2009 - *Sclerotinia* du colza : Gestion durable du risque et des moyens de lutte – Etat des résistances. *Note commune*

Souliac L. and P. Leroux, 1995 - Sclérotiniose du colza : Faut-il revoir la stratégie de lutte ? *Phytoma-LDV* 474, 29-31.

**DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ PRÉVENTIVE ET CURATIVE DU
PROTHIOCONAZOLE SUR DES GENOTYPES DE *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA*
RÉSISTANTS AUX INHIBITEURS DE LA 14 α -DEMETHYLATION DES STÉROLS**

J. SANSSENE, C. ROISIN-FICHTER, L. DJERROUD, S. SELIM*
Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, 19 rue Pierre Wagué, BP 30313, 60026 Beauvais
Cedex, France

GIS PhyNoPi: Groupement d'Intérêt Scientifique «Phytopathologie Nord-Picardie», France

*Auteur correspondant : Tél: +33-3 4406 3825. E-mail: sameh.selim@lasalle-beauvais.fr

RÉSUMÉ

Contre la septoriose du blé, la lutte fongicide avec les inhibiteurs de la 14 α -déméthylase (IDMs) est très développée depuis plus d'une vingtaine d'années. Mais des souches moins sensibles de *Mycosphaerella graminicola* sont sélectionnées depuis quelques années. Leur impact sur l'efficacité préventive et curative du prothioconazole a été évalué en conditions contrôlées sur plante entière, en mesurant les niveaux de symptômes et en quantifiant le pathogène dans les feuilles par PCR en temps réel. L'efficacité préventive est très bonne avec les trois souches testées. Par contre, l'efficacité curative diminue fortement et devient négligeable à partir du 7^{ème} jour après inoculation pour les deux souches les plus résistantes de type TriR4 et TriR7. L'efficacité curative sur la souche la moins sensible Tri R3 est moins affectée. La résistance de *M. graminicola* semble donc s'accompagner d'une baisse d'efficacité curative.

Mots-clés : Efficacité fongicide, résistance aux fongicides, *Mycosphaerella graminicola*, prothioconazole, PCR en temps réel

SUMMARY

**DETERMINATION OF PREVENTIVE AND CURATIVE EFFICACY OF
PROTHIOCONAZOLE AGAINST STEROL 14 α -DEMETHYLATION-INHIBITORS-
RESISTANT GENOTYPES OF *MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA***

To control *Septoria tritici* blotch, fungicides of the 14 α -demethylase inhibitors (DMIs) have been used for more than twenty years. But less sensitive strains of *Mycosphaerella graminicola* are more frequently observed. We have studied on plants in control conditions the effects on preventive and curative efficacy of prothioconazole. The level of symptoms was compared and the pathogen in wheat leaves was quantified by real-time PCR. The preventive efficacy has got a good level for the three strains. But the curative efficacy was strongly reduced since 7 days post-inoculation for the two most resistant strains Tri R4 and Tri R7. The curative efficacy was less reduced for the less susceptible Tri R3 strain. Thus the resistance of *M. graminicola* seems to induce a reduction in curative efficacy.

Key-words: Fungicide efficacy, fungicide resistance, *Mycosphaerella graminicola*, prothioconazole, real-time PCR

INTRODUCTION

La septoriose causée par *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (anamorph *Septoria tritici* Roberge in Demaz) est la principale maladie du blé en France, pour son omniprésence et sa nuisibilité (Eyal, 1999). Les pertes occasionnées sont dans les cas extrêmes de l'ordre de 30 à 40 % (Eyal *et al.*, 1987).

Comme la plupart des variétés de blé sont sensibles ou partiellement résistantes à la septoriose, la lutte contre cette maladie repose essentiellement sur l'utilisation de produits fongicides depuis les années 1970.

Les inhibiteurs de la 14 α -déméthylation des stérols (IDMs), dont font partie les triazoles, sont les fongicides les plus couramment utilisés depuis une vingtaine d'années (Palmer et Skinner, 2002 ; Leroux *et al.*, 2006). Entre la fin des années 1990 et le début des années 2000, la famille des strobilurines, inhibiteurs du site Qo du cytochrome b des mitochondries (Qols), a aussi été massivement utilisée.

Mais la plupart des fongicides subissent en l'espace de quelques années des pertes d'efficacité, en raison de l'accroissement de la fréquence des souches résistantes dans la population pathogène. L'apparition de la résistance aux strobilurines est survenue dès leur introduction sur le marché, et les rend maintenant totalement inefficaces contre la septoriose dans les principales zones de production de blé en Europe (McCarthy *et al.*, 2006 ; Heaney *et al.*, 2000 ; Fraaije *et al.*, 2003). La résistance aux strobilurines, dite qualitative, est déterminée par une mutation sur le gène du cytochrome b, qui est monogénique et monoallélique (Leroux *et al.* 2006). Les strobilurines restent toutefois actives sur les rouilles et quelques autres parasites, ce qui justifie encore leur emploi, en association avec d'autres molécules, et notamment avec les IDMs (McCarthy *et al.*, 2006). Pour les IDMs, employés depuis plus de vingt ans, les résistances progressent plus lentement sans remettre en cause pour le moment en conditions naturelles l'emploi de cette famille fongicide car certaines molécules restent efficaces. Les résistances, de nature quantitative, sont dues à différents mécanismes impliquant un accroissement du rejet des molécules hors de la cellule, une diminution de la fixation du fongicide sur la protéine cible, par modification de la séquence du gène *cyp51*, ou une surexpression de ce gène (Fraaije *et al.*, 2007). Huit phénotypes se caractérisent par leur niveau de résistance aux IDMs et sont classés en trois catégories principales : TriS (sensible), TriLR (faiblement résistant) et TriMR (moyennement résistant) (Leroux *et al.*, 2006). Depuis 2005 en Europe, les mutants moyennement résistants sont devenus dominants dans les principales zones de production de blé (Cousin et Moronval, 2008). Lors des campagnes 2008 et 2009, une nouvelle catégorie de souches fortement résistantes (Tri HR) a été mise en évidence en France (Leroux et Walker, 2009).

Dans ce contexte, le prothioconazole, fongicide IDM de la nouvelle famille des triazolinethiones, est développé par la firme Bayer CropScience contre les maladies des céréales. Au champ, son efficacité sur septoriose est proche de celle de l'époxiconazole (Moreau, 2006). Or l'efficacité mesurée en conditions naturelles est la résultante de l'interaction de trois composantes : (i) l'efficacité curative sur les feuilles contaminées avant le traitement ; (ii) l'efficacité préventive sur les feuilles qui ne sont pas encore contaminées au moment du traitement ; (iii) la persistance d'action du produit lié à sa disparition progressive des feuilles traitées par métabolisation et par effet de systémie ascendante, qui concentre la molécule à la périphérie des feuilles.

Pour évaluer séparément les efficacités préventives et curatives de fongicides IDM sur des souches ayant des niveaux différents de sensibilité aux triazoles, nous avons conduit une expérimentation sur plantes entières en conditions contrôlées. En complément d'une notation visuelle de symptômes effectuée 21 jours après inoculation, nous effectuons le suivi de la colonisation du parasite dans les feuilles de blé par PCR quantitative en temps réel, au cours des trois semaines qui suivent l'inoculation.

MATERIEL ET METHODES / MATERIALS AND METHODS

CULTURES DU BLE EN POTS / WHEAT CULTURE IN POTS

Les expérimentations sont conduites sur la variété de blé Scorpion 25 (Obtenteur Unisigma), très sensible à *M. graminicola*, cultivée en pot de 750 mL à raison de 2 graines par pot. Les graines sont préalablement triées et désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 10 minutes, puis rincées trois fois à l'eau stérile. Les pots contiennent un mélange terreux (1/3 de terre limono-sablo-argileuse, 1/3 de terreau et 1/3 de vermiculite moyenne) préalablement stérilisé pendant 20 minutes à 121°C. La première phase de la culture est effectuée en serre entre 15 et 20°C. Au stade 13 (échelle BBCH (Witzenberger *et al.*, 1989 ; Lancashire *et al.*, 1991), une seule des deux plantules est conservée et les pots sont alors placés dans une chambre climatique à 15°C avec une photopériode de 16h et un rayonnement lumineux de 150 μmol de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Trois arrosages par semaine sont pratiqués en remplissant les coupelles situées sous les pots avec de l'eau osmosée, enrichie une fois sur trois avec 25 % de solution nutritive de Murashige et Skoog (SIGMA Ref. M5519).

INOCULATION DES PLANTS DE BLE / INOCULATION OF WHEAT PLANTS

Trois souches de *M. graminicola* sont comparées dans les expérimentations : ST38, TO249 et TO252. Elles ont chacune été isolées en France en 2005 de la variété de blé Orvantis à partir d'un cirrhe sporifère. Elles ont été caractérisées selon leur niveau de résistance aux fongicides. Les trois souches sont résistantes aux strobilurines et diffèrent par leur niveau de résistance aux triazoles. Leur phénotype de résistance a été établi par Pierre Leroux (INRA Bioger-CPP, Grignon, France). ST38, TO249 et TO252 sont respectivement Tri R3, Tri R4 et Tri R7, phénotypes décrits dans Leroux *et al.* (2006 et 2007). Cette typologie a été confirmée par analyse moléculaire du gène *cyp51* (Selim, 2009). Ces souches, conservés à -80°C, ont été revitalisées par culture sur un milieu Potato Dextrose Agar (SIGMA Ref. P2182) à 18°C avec une photopériode de 12h. Au bout de 10 jours, nous ensemençons des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu liquide Yeast Extract Sucrose (SIGMA Ref. S7903 et Y0500) (Chungu, 2001), à raison d'une œse de spores levures par erlenmeyer. Les cultures sont incubées à 18°C dans un incubateur INNOVA 4230 sous agitation permanente (150 tours. min^{-1}) et lumière permanente (100 μmol de photons. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Les milieux sont décantés à 5°C durant la nuit précédant le jour de l'inoculation. Le culot de spores levuriformes obtenu est dilué dans de l'eau stérile afin de parvenir à une suspension de 10^7 spores/mL. Les plantes sont inoculées au stade 39 sur les feuilles F2 à une concentration de 10^5 spores. $\text{mL}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ à la date dite « J », à l'aide d'un aérographe (0,5 bars). Les plantes en pot sont placées dans des sachets zippés pendant 6 jours afin de conserver une hygrométrie élevée (proche de 100 %).

TRAITEMENTS FONGICIDES / FUNGICIDE APPLICATIONS

Les applications fongicides sont réalisés avec du prothioconazole (JAU 6476, 250 g L^{-1} et 0,8 L ha^{-1}) fournit par Bayer CropScience, en comparant 4 doses différentes (25, 50, 75 et 100 %) et 5 dates de traitement : un jour avant l'inoculation (J-1) et 3, 7, 10 et 14 jours après l'inoculation (soit J+3, J+7, J+10 et J+14). Les applications sont réalisées sur feuilles F2 à l'aide d'un aérographe (2 bars). Au cours de chaque expérimentation, nous disposons de trois plantes de témoin sain (ni inoculées ni traitées) et six plantes de témoin malade pour chaque souche (inoculées et non protégées).

NOTATION DES SYMPTÔMES VISUELS / VISUAL SCORING OF SYMPTOMS

La notation de maladie, par estimation du pourcentage de surface nécrosée, est réalisée sur un fragment identique de feuille 21 jours après inoculation et entre le 21^{ème} et le 30^{ème} jour pour l'étude cinétique en absence de fongicide.

PCR EN TEMPS REEL / REAL-TIME PCR

Deux expériences ont eu lieu. Pour la première, sans fongicide, la colonisation fongique est suivie pendant 1 mois, sur 3 plantes tous les 2-3 jours pour chaque isolat.

Pour la deuxième, avec fongicide, les prélèvements d'échantillons destinés à la quantification du parasite par analyse de PCR en temps réel sont effectués à chaque date de traitement fongicide (J+3, J+7, J+10 et J+14) et juste avant l'application.

L'analyse PCR est pratiquée sur un fragment de feuille de 12 cm infecté de façon homogène, obtenu après avoir éliminé les deux extrémités. Ce fragment est lyophilisé pendant 48 heures et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse par PCR quantitative. Après lyophilisation, chaque feuille prélevée est broyée à l'aide d'un broyeur à billes (TISSUELYSER QIAGEN) en plaques de 2 x 24 puits à une fréquence de 30 Hz pendant une minute. Une fois les échantillons broyés, 9 mg de poudre sont prélevés pour l'extraction de l'ADN, à partir d'un kit DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN). La concentration d'ADN total extrait est évaluée par mesure d'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à plaque (VARIAN 50 MRP).

La technologie de la PCR quantitative en temps réel par sonde Taqman ciblant le gène de la β -tubuline de *M. graminicola* est reprise de (Bearechell et al., 2005). Ce gène est très variable entre les espèces et cela lui offre une grande spécificité entre les différents parasites fongiques, comme l'ont montré Bearechell et al., 2005) et sans aucune interaction avec la β -tubuline du blé (Guo et al., 2005). D'après Fraaije et al., 1999), le nombre de copies du gène de la β -tubuline est équivalent au nombre de cellules du parasite. Pour détecter *M. graminicola*, nous employons 0,2 μ M de sonde fluorescente Taqman MGB 6-FAM (5'-TTACGCCAAGACATTC-3') (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et 0,3 μ M d'amorces sens 5'-GCCTTCCTACCCACCAT-3' et antisens 5'-CCTGAATCGCGCATCGTTA-3' pour obtenir un fragment de 63 pb. Le volume réactionnel de la PCR était de 25 μ L contenant 100 ng d'ADN extrait des feuilles de blé. L'analyse par PCR en temps réel est réalisée en plaque de 96 puits avec l'appareil ABI Prism 7300 d'Applied Biosystems. Le programme de la PCR comprend 10 min à 95°C suivi de 40 cycles avec 15 s secondes à 95°C et d'1 min à 60°C. La quantité d'ADN obtenue est calculée à l'aide d'une gamme étalon et exprimée pour 100 ng d'ADN total (végétal et fongique) dans l'échantillon, ce qui correspond à un même nombre de cellules de *M. graminicola*.

Une courbe étalon est calibrée à partir d'une série de dilutions (10² à 10¹⁰) de clones du gène de β -tubuline, linéarisé dans le plasmide pGEM –T easy Vectors (Promega).

ANALYSE STATISTIQUE / STATISTICAL ANALYSIS

Trois répétitions biologiques sont réalisées successivement. Le pot représente l'unité expérimentale. Les traitements statistiques sont réalisés avec le logiciel XLSTAT, version 2009.2.03, par ANOVA ou tests non paramétriques, au seuil $\alpha=5$ %.

RESULTATS / RESULTS

PREMIÈRE EXPÉRIENCE SANS FONGICIDE / FIRST EXPERIMENT WITHOUT FUNGICIDE

Evolution de la maladie

L'intensité de septoriose a été notée entre le 23^{ème} et le 30^{ème} jour (Figure 1). La souche TO249 est la plus agressive et nécrose totalement les feuilles dès le 26^{ème} jour. L'intensité de maladie progresse jusqu'au 30^{ème} jour avec les deux autres souches. La souche ST38 est la moins agressive des trois.

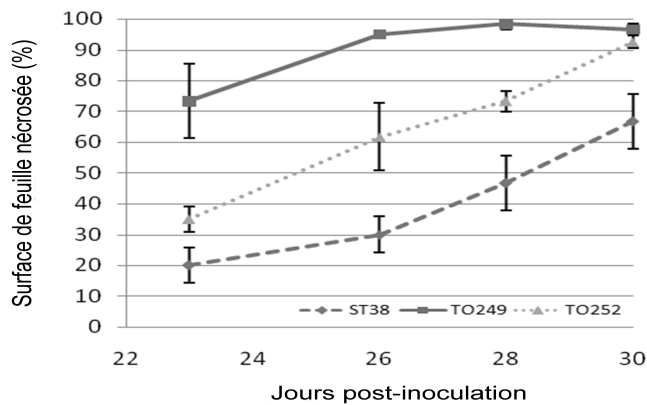


Figure 1 : Evolution de l'indice du pourcentage de surface de feuille de la variété Scorpion 25 pour 3 souches de *M. graminicola* (---◆---) ST38, (—■—) TO249 et (··▲··) TO252. Les barres représentent l'erreur standard pour 3 répétitions. (p souche \times date < 0.0001).

(Evolution of the percentage of diseased surface of leaves of the wheat cultivar Scorpion 25 for three strains of *M. graminicola* (-◆-) ST38, (—■—) TO249 et (··▲··) TO252. The bars represent the standard deviation for the three replicates ($p_{\text{strain} \times \text{date}} < 0.0001$)).

Evolution de la colonisation de *M. graminicola*

La colonisation fongique des feuilles est observée pour les trois isolats (ST38, TO249 et TO252) pendant le mois qui suit l'inoculation (Figure 2). La biomasse fongique exprimée en nombre de copies d'ADN pour 100 ng d'ADN total est nettement plus élevée le jour de l'inoculation pour ST38 comparée à TO249 et TO252 avec des valeurs respectives de 190 contre 2,5 et 2,2. Le test de Kolmogorov-Smirnov confirme une différence de distribution très hautement significative entre ST38 et les deux autres souches. Ceci matérialise un meilleur taux de réussite de la contamination pour ST38, puisque la quantité d'inoculum était commune aux trois isolats (environ 10^6 spores par feuille).

La biomasse fongique de chacun reste relativement stable pendant les deux premières semaines, puis s'accroît à partir du 14^{ème} jour. La croissance est maximale au 26^{ème} jour pour TO249 et TO252, et décroît ensuite. Pour ST38, la croissance se poursuit jusqu'au 30^{ème} jour, tout en subissant un fort ralentissement entre le 28^{ème} et le 30^{ème} jour.

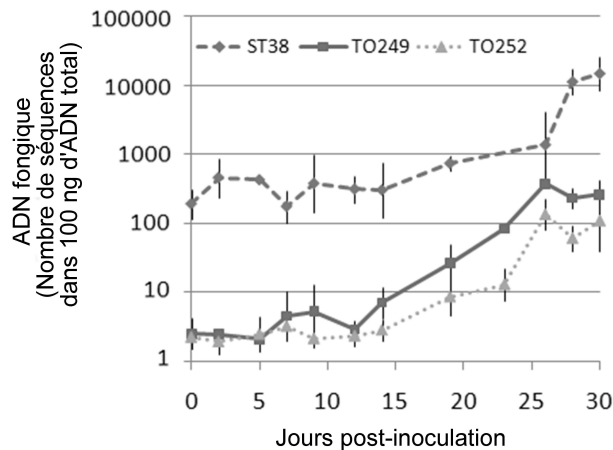


Figure 2 : Evolution de la quantité d'ADN fongique mesurée par PCR quantitative en temps réel pour 3 souches de *M. graminicola* (---◆---) ST38, (—■—) TO249 et (··▲··) TO252 dans des feuilles de blé de la variété Scorpion 25. La quantité d'ADN est exprimée selon le logarithme décimal du nombre de copies d'ADN dans 100 ng d'ADN total. Les barres représentent les erreurs standards pour 3 répétitions.

(Evolution of fungal DNA quantified by real-time PCR for three strains of *M. graminicola* (---◆---) ST38, (—■—) TO249 and (·▲·) TO252, in wheat leaves of the cultivar Scorpion. The bars represent the standard deviation for three replications).

DEUXIEME EXPERIENCE AVEC FONGICIDE / SECOND EXPERIMENT WITH FUNGICIDE

Nous avons comparé quatre doses d'emploi (25, 50, 75 et 100 %) sur les trois souches de *M. graminicola* : ST38, TO249 et TO252.

Comme l'effet dose n'est pas significatif dans nos conditions d'expérience sur plantes en conditions contrôlées (Tableau 1), les quatre doses ont été considérées par la suite comme étant des répétitions de mesure, afin d'améliorer la robustesse statistique. L'efficacité fongicide est calculée pour chaque isolat par comparaison au témoin non protégé.

Tableau 1 : Efficacité de 4 doses de prothioconazole (25, 50, 75 et 100%) sur 3 souches de *M. graminicola* (ST38, TO249 et TO252) par test sur plantes en pots. Effet des facteurs analysés par ANOVA (Test de type III).

(Efficacy of 4 doses of prothioconazole (25, 50, 75 et 100%) on 3 strains of *M. graminicola* (ST38, TO249 et TO252), tested on plants in pots. Effect of factors by ANOVA (Type III test)).

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|--------------------------|-----|------------------|--------------------|--------|----------|
| Souche | 2 | 29824,900 | 14912,450 | 41,307 | < 0,0001 |
| Date traitement | 4 | 89686,947 | 22421,737 | 62,107 | < 0,0001 |
| Dose | 3 | 313,549 | 104,516 | 0,290 | 0,833 |
| Souche x Date traitement | 8 | 17602,358 | 2200,295 | 6,095 | < 0,0001 |
| Souche x Dose | 6 | 705,619 | 117,603 | 0,326 | 0,922 |
| Date traitement x Dose | 12 | 7882,441 | 656,870 | 1,819 | 0,052 |

Evolution de la maladie

21 jours après inoculation, le pourcentage de surface nécrosée des témoins était de 76,7% avec la souche ST38 et de 85% avec les deux isolats TO249 et TO252. Cette différence n'est pas significative au seuil alpha de 5%. En situation d'application préventive à J-1 (application la veille de l'inoculation), l'efficacité fongicide est comprise entre 87 et 95% sans différence significative entre les souches (Figure 3). Avec un traitement curatif (application post-inoculation), l'efficacité fongicide est d'autant plus faible que le traitement est tardif. Elle reste élevée à J+3, au même niveau qu'à J-1. Entre J+7 et J+14, l'efficacité est globalement plus élevée avec la souche ST38 (toujours au dessus de 50%), tandis qu'avec les souches TO249 et TO252, l'efficacité décroît graduellement et ne dépasse pas 20% pour une application à J+14.

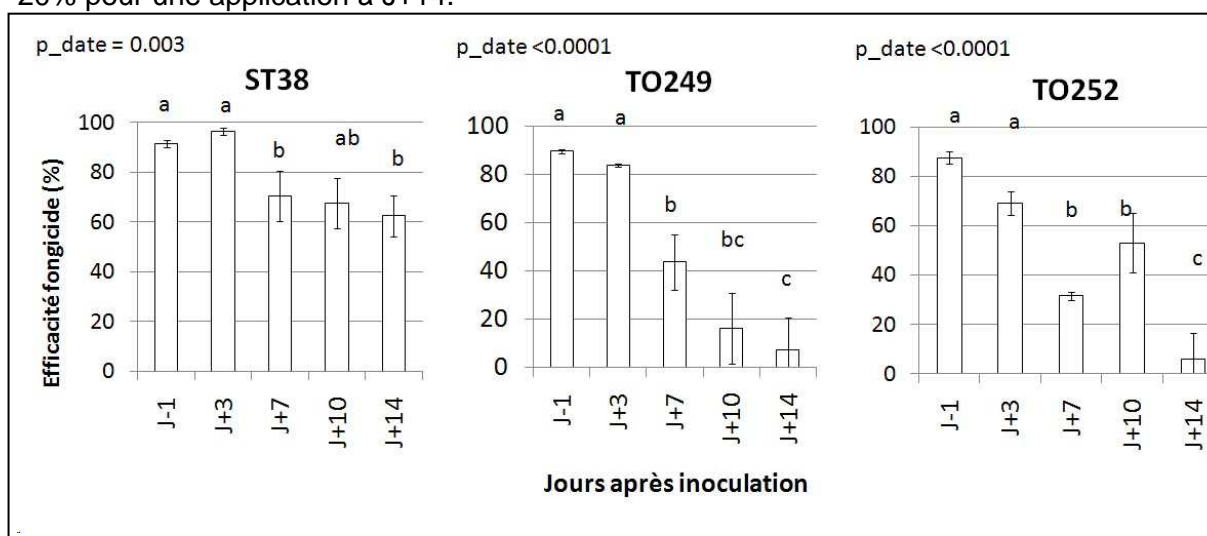


Figure 3 : Efficacité fongicide calculée selon le pourcentage de surface de feuille nécrosée de la variété Scorpion, 21 jours après l'inoculation, pour 3 souches de *M. graminicola* (ST38, TO249 et TO252), en fonction de la date d'application du prothioconazole depuis l'inoculation (J-1, J+3, J+7, J+10, J+14). (ANOVA et comparaison par test Tukey).

(Fungicide efficacy calculated in regards to the percentage of necrotized surface of the wheat leaves of the cultivar Scorpion 25, 21 days post-inoculation, for 3 strains of *M. graminicola* (ST38, TO249 and TO252), according to the date of prothioconazole application since inoculation (J-1, J+3, J+7, J+10, J+14). (ANOVA and comparisons with Tukey test)).

Les témoins non protégés ont des % de surface nécrosés de 76,6% pour ST38 et de 85% pour TO249 et TO252. Cette différence n'est pas significative au seuil de 5%.

Figure 3: Fungicide efficacy calculated in regards to the percentage of the necrotized surface of the leaves of the wheat cultivar Scorpion, 21 days post-inoculation for the three strains of *M. graminicola* (ST38, TO249 and TO252). (ANOVA and Tukey test).

The percentage of necrotized surface of the leaves of the non-protected control is 76.6% for ST38 and 85% for TO249 and TO252. That is a non significant difference by ANOVA at the threshold of 5%.

Effet du prothioconazole sur la colonisation fongique

Pour les applications fongicides à J-1, J+3 et J+7, la colonisation fongique a été suivie par analyse de PCR quantitative en temps réel, à chacune des dates de prélèvement post-inoculation (J+3, J+7, J+10 et J+14). Les valeurs ont été intégrées dans un calcul d'aire sous la courbe de progression de la colonisation (AUDPC) entre J+7 et J+21 (Figure 4).

L'AUDPC est plus élevée pour ST38. Elle varie de 50 à 65, contre des valeurs de 20 à 45 pour TO249 et de 30 à 60 pour TO252.

Pour ST38, aucune différence significative n'est observée entre les dates d'applications. Pour TO249 et TO252, les AUDPC à J+3 sont significativement inférieures au témoin non protégé. Ces résultats confirment une bonne efficacité fongicide pour une application à J+3.

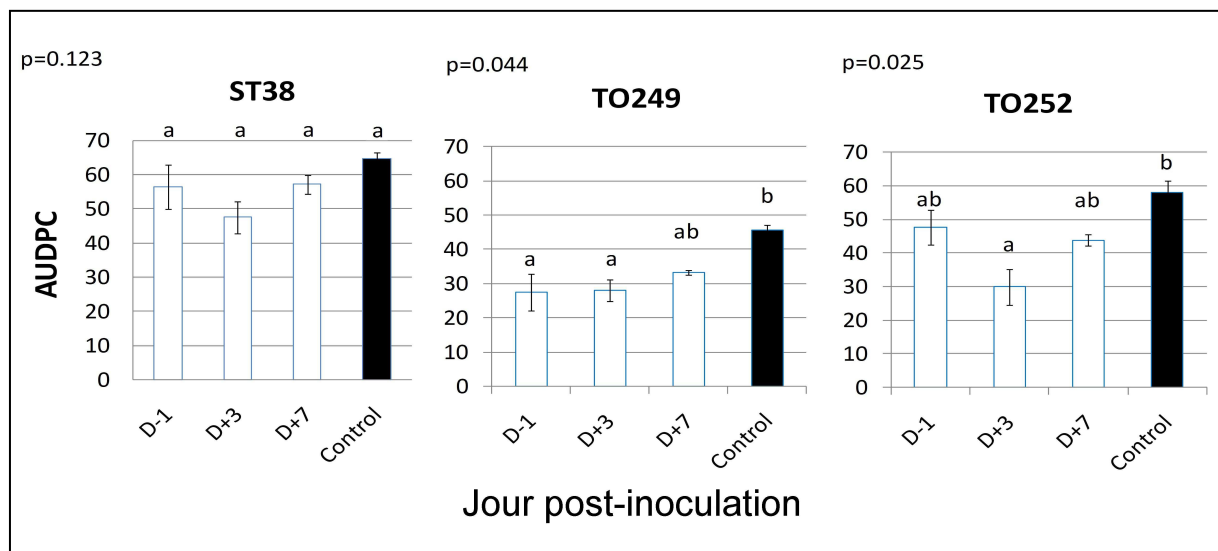


Figure 4 : Aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) calculée sur le log₁₀ de la quantité d'ADN de *M. graminicola* pour 100 ng d'ADN total quantifié par PCR en temps réel, entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour après inoculation pour 3 souches (ST38, TO249 or TO252), selon la date d'application du prothioconazole depuis l'inoculation. (Test Kruskal & Wallis, et comparaison par procédure Dun).

(Area under disease progress curve (AUDPC) calculated with the log₁₀ of the fungal DNA per 100 ng of total DNA quantified by real-time PCR, from the 7th to the 21th day post-inoculation for 3 strains of *M. graminicola* (ST38, TO249 and TO252), according to the date of the fungicide application since inoculation of the DMI fungicide prothioconazole.)

DISCUSSION

La réduction de sensibilité de *M. graminicola* aux triazoles a été continue en Europe depuis 2003 (Fraaije *et al.*, 2007), et se trouve associée à des mutations du gène cible *cyp51* (Leroux *et al.*, 2007; Fraaije *et al.*, 2007). Pour le Nord de l'Europe, Brunner *et al.* (2008) ont montré que ces mutations étaient récentes et probablement originaires du Danemark ou d'UK, avant qu'elles ne soient dispersées par voie aérienne aux autres pays. Un travail analogue serait à faire pour la France et les autres pays du Sud de l'Europe.

Notre étude porte sur trois souches résistantes aux IDMs appartenant respectivement aux phénotypes Tri R3 (ST38), Tri R4 (TO249) et Tri R7 (TO252) (Leroux *et al.*, 2007).

Nous avons cherché à évaluer l'efficacité préventive ou curative d'un fongicide IDM, le prothioconazole, confronté à ces souches. Cette approche nécessitait un travail sur plante entière, que nous avons conduit en conditions contrôlées pour maîtriser le type de souche et les dates de contamination. La maladie a été parfaitement reproduite après inoculation avec un aérographe sur l'avant dernière feuille (F2) du blé.

La PCR quantitative en temps réel a été décrite par plusieurs auteurs sur *M. graminicola* (Rohel *et al.*, 2002 ; Bearchell *et al.*, 2005, Guo *et al.*, 2005, Guo *et al.*, 2007 ; Fraaije *et al.*, 2007) comme une technique précise et fiable pour quantifier le parasite pendant la phase d'incubation. En absence de protection fongicide, nos résultats sont conformes à ceux de Fraaije *et al.*, 1999), avec une forte augmentation de la quantité d'ADN à partir du 14^{ème} jour. Nos résultats montrent aussi que la relation entre le niveau de symptôme (Figure 1) et la quantité d'ADN (Figure 2) dépend de la souche utilisée : la souche ST38 présente la plus forte quantité d'ADN et les plus faibles symptômes. Le niveau de nécrose étant relié à la production d'enzymes de dégradation des parois végétales, en particulier la xylanase, il est possible que cet isolat produise moins d'enzymes que les deux autres (Douaiher *et al.*, 2007 ; Douaiher *et al.*, 2007 ; Siah *et al.*, 2007).

Nous notons aussi qu'en phase terminale de la maladie, entre le 26^{ème} et le 30^{ème} jour, la quantité d'ADN régresse alors que la surface de nécrose augmente pour les deux souches TO249 et TO252. A ces dates, le pourcentage de surface nécrosée est déjà supérieur à 60%. Il est donc possible que l'ADN de *M. graminicola* se dégrade dans les zones très nécrosées des feuilles. Le manque de relation entre la quantité d'ADN du pathogène et le niveau de symptôme sur des feuilles très nécrosées a déjà été observé (Rohel *et al.*, 2002 ; Guo *et al.*, 2007). Ce phénomène conduit à conseiller l'usage de la technique de PCR en temps réel pour suivre l'évolution du parasite pendant la phase d'incubation et au cours des tout premiers stades de la maladie.

Dans les conditions de notre expérience, nous n'avons pas observé de différence significative d'efficacité fongicide entre toutes les doses utilisées mais ce résultat ne correspond probablement pas à la réalité du terrain. En fait, notre dispositif ne visait pas à évaluer la persistance des fongicides, qui est classiquement très influencée par la dose, et qui interagit au champ avec l'efficacité intrinsèque pour expliquer le niveau de protection.

L'efficacité fongicide calculée sur les niveaux de symptômes est très bonne sur toutes les souches avec une application préventive, ainsi qu'avec une application 3 jours après inoculation. Par contre, le niveau de résistance des isolats influe fortement sur l'efficacité curative des fongicides IDM, pour les applications tardives entre 7 et 14 jours après inoculation. L'efficacité est très faible et décroissante dans le temps pour les deux souches TO249 et TO252 (respectivement Tri R4 et Tri R7), alors qu'elle reste d'un bon niveau de 60 à 70% pour ST38 (Tri R3).

La perte d'efficacité curative à partir du 7^{ème} jour après inoculation peut s'expliquer par la progression du champignon dans la plante, étudiée par Kema *et al.*, 1996). Après une pénétration des tubes germinatifs par les stomates au bout de 24h, les hyphes colonisent le mésophylle de façon intercellulaire jusqu'au 7^{ème} jour. A partir du 8^{ème} jour, le champignon pénètre à l'intérieur des cellules, phénomène considérablement accru à partir du 10^{ème} jour. C'est alors que les tout premiers symptômes apparaissent. Au travers de cette description de la colonisation du champignon, il semble logique que le traitement curatif à J+3 soit

significativement plus efficace que les traitements curatifs à J+7 ou à J+14. En effet, la colonisation du mésophylle par le parasite à J+3 reste intercellulaire et sa croissance n'a pas encore augmenté considérablement. La chute des efficacités entre J+7 et J+14 peut s'expliquer par une colonisation abondante devenue intracellulaire.

Notre suivi de la biomasse fongique par PCR quantitative en temps réel confirme les bons résultats d'efficacité fongicide à J+3. Cependant, nous observons avec le traitement préventif des valeurs élevées d'ADN, même lorsque l'application fongicide s'est avérée active, au vu des notes de symptômes visuels. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'analyse PCR ne distingue pas l'ADN de cellules vivantes de celui des cellules mortes tant qu'il n'est pas dégradé. Et il est possible que l'ADN des spores déposées à la surface des feuilles, puis tuées par le fongicide, se dégrade peu pendant le mois qu'a duré notre expérience. Ce problème pourrait d'ailleurs avoir été renforcé avec la souche ST38, dont le taux de réussite de l'inoculum était particulièrement élevé. Le remplacement de la PCR en temps réel par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel représente une solution à ce problème, car elle vise un ARNm qui se dégrade en quelques minutes (Guo *et al.*, 2005). Ceci étant, en conditions naturelles où les quantités d'inoculum sont plus faibles, la technique de PCR quantitative en temps réel est à expérimenter pour juger de l'efficacité fongicide en évaluant le niveau de contamination des feuilles pendant la période d'incubation de la septoriose.

CONCLUSION

L'efficacité préventive du prothioconazole est d'un très bon niveau avec les trois souches testées. Par contre, l'efficacité curative diminue fortement et devient négligeable à partir du 7^{ème} jour après inoculation vis-à-vis des 2 souches moins sensibles de type TriR4 (faiblement résistantes) et TriR7 (moyennement résistantes). L'efficacité curative sur la souche Tri R3 est moins affectée, laissant supposer que la résistance des souches s'accompagne d'une baisse d'efficacité curative.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Bayer CropScience, Lyon, France pour l'appui à cette recherche et Pierre Leroux pour l'identification des phénotypes résistance aux IDMs des trois souches de *M. graminicola* utilisées.

BIBLIOGRAPHIE

- Bearchell S., Fraaije B., Shaw M., Flitt D., 2005 - Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. *PNAS*, 102, 5438-5442.
- Brunner P., Stefanato F., McDonald B., 2008 - Evolution of the *cyp51* gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Mol Plant Pathol*, 9, 305-316.
- Chungu C., 2001 - *Septoria tritici* blotch development as affected by temperature duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. *Plant Dis*, 85, 430-435.
- Cousin A., Moronval M., 2008 - Septoriose et triazoles du laboratoire au champ. *Phytoma - La défense des végétaux*, 611, 33-35.
- Douaiher M., Nowak E., Dumortier V., Durand R., Reignault P., Halama P., 2007 - *Mycosphaerella graminicola* produces a range of cell wall-degrading enzyme activities in vitro that vary with the carbon source. *Eur J Plant Pathol*, 117, 71-79.
- Douaiher M., Nowak E., Durand R., halama P., Reignault P., 2007 - Correlation analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall-degrading enzymes produced in vitro: the importance of xylanase and polygalacturonase. *Plant Pathol*, 56, 79-86.
- Eyal Z., 1999 - The *Septoria tritici* and *Stagnospora nodorum* blotch diseases of wheat. *Eur J Plant Pathol*, 105, 629-641.
- Eyal Z., Scharen A., Prescott J., Van Ginkel M., 1987 - *The septoria diseases of wheat : Concepts and methods of disease management*, CIMMYT, Mexico D.F., 46pp.

Fraaije B., Cools H., Kim S., Motterram J., Clark W., Lucas J., 2007 - A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (cyp51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol Plant Pathol*, 8, 245-254.

Fraaije B., Lovell D., Rohel E., Hollomon D., 1999 - Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *J App Microb*, 86, 701-708.

Fraaije B., Lucas J., Clark W., Burnett F., 2003 - QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK, The BCPC International Congress, *Crop Sci Technol*, 689-694.

Guo J., Schnieder F., Beyer M., Vereet J., 2005 - Rapid detection of *Mycosphaerella graminicola* in wheat using reverse transcription-PCR assay. *J Phytopathol*, 153, 674-679.

Guo J., Schnieder F., Vereet J., 2007 - A real time PCR assay for quantitative and accurate assessment of fungicide effects on *Mycosphaerella graminicola* leaf blotch. *J Phytopathol*, 155, 482-487.

Heaney S., Hall A., Davies S., Olaya G., 2000 - Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group : current perspectives. Proceedings Brighton Crop Protection Conference - *Pests Dis*, 2, 755-762.

Kema G., Yu D., Rijkenberg F., Shaw M., Baayen R., 1996 - Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Bioch and Cell Bio*, 86, 777-786.

Lancashire P., Beilholder D., Langeluddercke P., Strauss R., Van Den Boom T., Weber E., Witzgen-Berger A., 1991 - An uniform decimal code for growth stages of crops and weeks. *Ann Appl Biol*, 119, 561-601.

Leroux P., Albertini C., Gautier A., Gredt M., Walker A., 2007 - Mutations in the Cyp51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci*, 63, 688-698.

Leroux P., Walker A., 2009 - La septoriose du blé continue d'évoluer. Communiqué INRA Bioger - CPP, 2 juin, 1.

Leroux P., Walker A., Albertini C., Gredt M., 2006 - Resistance to fungicides in French populations of *Septoria tritici*, the causal agent of wheat leaf blotch. *Aspect App Biol*, 78, 153-162.

McCarthy H., Mercer P., Cooke L., Fraaije B., 2006 - Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. *Crop Prot*, 26, 1272-1280.

Moreau J., 2006 - *Le prothioconazole, un nouveau fongicide contre les maladies en céréales*. Livre blanc "céréales". F.U.S.A et CRA-W, 10 pp.

Palmer C., Skinner W., 2002 - *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Mol Plant Pathol*, 3, 63-70.

Rohel E., Laurent P., Fraaije B., Cavelier N., Hollomon D., 2002 - Quantitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field. *Pest Manag Sci*, 58, 248-254.

Siah A., Deweer C., Reignault P., Halama P., 2007 - Two *Mycosphaerella graminicola* French isolates differ in symptoms, in planta sporulation and cell wall degrading enzymes in vitro production. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 72, 867-874.

Witzgenberger A., Hack H., Van Den Boom T., 1989 - Eriauterungen zum BBCH-Dezimalcode für die Entwicklungsstadien des Getreides mit Abbildungen. *Gesunde Pflanzen*, 41, 384-388.

**CYFLUFENAMID, A NEW COMPOUND
FOR CONTROL OF POWDERY MILDEW IN GRAPE**

L. HULIN ⁽¹⁾, G. ROUAS ⁽¹⁾, H. BUSCHHAUS ⁽²⁾

⁽¹⁾ Certis Europe B.V, 5 rue Galilée, 78280 – Guyancourt, France

⁽²⁾ Nisso Chemical Europe GmbH, Steinstrasse 27, 40210 – Düsseldorf, Germany

RESUME

Le cyflufenamid est une nouvelle substance active de la famille des amidoximes. D'origine Nippon Soda Co., Ltd, ce fongicide anti-oïdium est actif sur les oïdiums à très faible dose, de façon préventive et curative. Le cyflufenamid présente également des propriétés translaminaires et un effet par vapeur. Dans les essais menés sur vigne, il montre une bonne efficacité, équivalente à celle de la référence. Le cyflufenamid est une solution nouvelle pour lutter contre l'oïdium de la vigne tant au cours de la saison qu'à plus long terme

Mots-clés : cyflufenamid – amidoximes - oïdium –vigne

SUMMARY

Cyflufenamid is a new active ingredient that belongs to a novel and a chemically unique class of fungicides : amidoximes. It is developed by Nippon Soda Co., Ltd. This fungicide acts on powdery mildews, both preventively and curatively. Cyflufenamid is translaminar and also acts by vapour. In trials in grape, cyflufenamid demonstrates good performances in controlling powdery mildew at a very low dose rate. Its effectiveness is equivalent to the reference standard. All of this should lead cyflufenamid to make a significant contribution to protection of powdery mildew in grape during the season and over a long term strategy.

Key words: cyflufenamid – amidoximes - powdery mildew - grape

INTRODUCTION

Cyflufenamid is a new active ingredient developed by Nippon Soda Co., Ltd for control of powdery mildew. It is already registered in most western european countries for use in cereals and it is under development for use in grape, top fruits and vegetables.

It belongs to a novel and a chemically unique class of fungicides : amidoximes. Cyflufenamid as a formulated product has been developed in France in grape by Certis since 2005.

Cyflufenamid is highly active on a large range of powdery mildews, with preventative, residual and curative activity. On the plant, it has got contact, translaminar and vapour properties (Haramoto *et al.*, 2006).

This compound will be available for use in grape as a liquid formulation (EW) coded NF149 5%EW. Main toxicological and biological characteristics of cyflufenamid were presented at CIMA in December 2006 (Hulin *et al.*, 2006). The aim of this paper is to present its performances and biological properties when used in grape.

EFFECTIVENESS IN FIELD TRIALS

MATERIALS AND METHODS

The targeted registered dose rate is 0.5L/ha of NF149 5%EW, meaning 25 g a.i/ha. Eleven trials for evaluation of the efficacy at this rate are available. Eight trials were carried out in Southern France from 1997 to 2008 following CEB method n°22.

In these efficacy trials, 6-8 treatments were conducted between BBCH stage 11-13 (leaf development) to 83 (ripening of berries). All trials were conducted with tebuconazole as reference standard (100 g/ha). The trials were performed with four replicates and plot sizes of 24 to 54 m² or 3 to 6 plants. All trials were designed in typical red vine variety Carignan, except one with Cabernet Sauvignon.

Assessments of disease incidence and severity were regularly done on 100 leaves and 50 bunches per plot. Data are summarized first for recording at blossom stage (called "early rating" – Table I) and second for at ripening stage (called "late rating" – Table II).

RESULTS

Table I : Summary of efficacy of NF149 5%EW at early rating
(Synthèse de l'efficacité de NF149 5%EW lors des observations précoces)

| | <i>Efficacy [%] according to Abbott</i> | | | | | |
|---------------------------|--|-------------------|---------------------------|--|-------------------|---------------------------|
| | Leaves | | | Bunches | | |
| | <i>Untreated control (% pest severity)</i> | <i>NF149 5%EW</i> | <i>Reference standard</i> | <i>Untreated control (% pest severity)</i> | <i>NF149 5%EW</i> | <i>Reference standard</i> |
| <i>Mean value</i> | 13.1 | 96.1 | 97.0 | 36.4 | 98.1 | 97.8 |
| <i>Median value</i> | 7.1 | 96.1 | 98.5 | 17.9 | 99.8 | 99.7 |
| <i>Standard deviation</i> | 11.6 | 3.7 | 4.2 | 33.3 | 3.0 | 3.4 |
| <i>Number of results</i> | 11 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 |

Table II : Summary of efficacy of NF149 5%EW at late rating
(Synthèse de l'efficacité de NF149 5%EW lors des observations tardives)

| | <i>Efficacy [%] according to Abbott</i> | | | | | |
|---------------------------|--|-------------------|---------------------------|--|-------------------|---------------------------|
| | Leaves | | | Bunches | | |
| | <i>Untreated control (% pest severity)</i> | <i>NF149 5%EW</i> | <i>Reference standard</i> | <i>Untreated control (% pest severity)</i> | <i>NF149 5%EW</i> | <i>Reference standard</i> |
| <i>Mean value</i> | 10.9 | 96.5 | 95.6 | 78.5 | 81.0 | 78.7 |
| <i>Median value</i> | 10.9 | 96.5 | 95.6 | 92.7 | 88.5 | 85.4 |
| <i>Standard deviation</i> | 13.0 | 3.0 | 5.0 | 29.2 | 19.8 | 20.2 |
| <i>Number of results</i> | 2 | 2 | 2 | 11 | 11 | 11 |

DISCUSSION

The evaluation produced a very good median efficacy of 96.1% for 0.5 L/ha of NF149 5%EW on leaves of the early rating dates. The median efficacy value of the reference standard was slightly more efficient (98.5%). NF149 5%EW achieved a median efficacy of 99.8% on bunches and is absolutely comparable to the effect of reference standard (99.7%). Facing the evaluation of later rating, the mean efficacy of NF 149 EW is still lasted 96.5% on leaves, however, only from 2 trials, and 88.5% median efficacy on bunches (n=11). The efficacy of the reference standard achieved a median efficacy of 95.6% on leaves and 85.4% on bunches.

We can therefore conclude that performances of cyflufenamid at the very low rate of 25 g/ha are good and equivalent to the reference standard.

CROP SAFETY

From efficacy trials done with NF149 5%EW in grape in both northern and southern Europe, we can say the product is safe to crop.

In addition, special crop safety trials were carried out in France in 2007 : one trial on wine grape (14 varieties : Cabernet franc, Cabernet sauvignon, Carignan, Chardonnay, Chenin, Cinsault, Gamay, Grenache, Mourvèdre, Pinot noir, Sauvignon blanc, Syrah, Ugni blanc and Merlot) and a second trial on table grape (7 varieties : Alphonse Lavallée, Cardinal, Chasselas, Danlas, Italia, Muscat de Hambourg, Ribol).

NF149 5%EW was applied twice, at BBCH stages 57 and 77 and dose rates of 0.5 and 1 L/ha. After each application, 4 assessments were done on both leaves and bunches, every 4 to 7 days. No phytotoxicity was observed.

Therefore we can conclude that NF149 5%EW is safe to grape, whatever are the climactic conditions and the grape variety.

UNINTENDED EFFECTS

IMPACT ON THE QUALITY OF GRAPE AND EFFECTS ON THE TRANSFORMATION PROCESSES

Seven vinification and taint taste trials were conducted in France, over two years (2006 and 2007), in northern and southern areas on both red and white vine grapes. One of these trials was done in Cognac area to take into account the specific case of brandy production process. All studies were performed according to CEB method n° 143. NF149 5%EW was applied twice, at 0.5 L/ha, at BBCH stages 71-75 and 77-79.

With regards to these 2 years results, it is reasonable to conclude that two applications of NF149 5%EW would have no depressive effect on transformation processes and would not affect taste of wine or brandy.

ADVERSE EFFECTS ON BENEFICIAL ORGANISMS

A laboratory study was performed to evaluate the effect of NF149 5%EW on the predatory mites *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari : Phytoseiidae). Mortality by contact and fecundity were recorded.

At the rate of 0.5L/ha targeted for registration, NF149 5%EW had no effect on *T. pyri*. At twice this rate, the product showed slight adverse effects and can be marked as Class 2 of IOBC classification.

We can conclude that use of NF149 5%EW in grape at 0.5L/ha will respect predatory mites.

RESISTANCE

Cyflufenamid is a new active ingredient that belongs to a novel and a chemically unique class of fungicides : amidoximes. Mode of action of cyflufenamid is to be determined but it is considered different from that of other existing fungicides. This has been proved in a range of cross resistant tests with powdery mildew isolates resistant to fungicides like strobilurines, quinoxifen, triazoles or morpholines.

Cyflufenamid is active on powdery mildew only therefore it must be used in mixture with another fungicide in order to control diseases like downy mildew.

RISK OF RESISTANCE

Evaluation of inherent and agronomic risks has been made and it was concluded that the risk of resistant can be regarded as acceptable.

MANAGEMENT OF THE RISK OF RESISTANCE

Even if risk of resistance is acceptable, cyflufenamid may be subject to resistance. As a precautionary measure, recommendations below should be followed :

- Cyflufenamid based products must be integrated in a spray program containing fungicides having a different site of action and effective on the target pest.
- Maximum number of applications is 2 per year ; in case of a curative use, application number should be limited to 1.
- Apply NF149 5%EW at the registered rate (do not reduce rate)

CONCLUSION

Cyflufenamid is a new active ingredient that belongs to a novel and a chemically unique class of fungicides : amidoximes. This fungicide acts on powdery mildews both preventively and curatively. Cyflufenamid is translaminar and also acts by vapour. In trials on grape in France, cyflufenamid demonstrates good performances at a very low dose rate (25 g a.i/ha), equivalent to the reference standard. The product is safe to crop and beneficial insects and does not show any influence on the quality and taste of harvested and processed products. All of this should lead cyflufenamid to make a significant contribution to protection of powdery mildew in grape during the season and over a long term strategy.

REFERENCES

Haramoto M., Yamakana H., Hosokawa H., Sano H., Sano S., Otani H., 2006 - Control efficacy of cyflufenamid in the field and its fungicidal properties. *J. Pestic. Sci.*, 31(2), 116–122.

Hulin L., Rouas G., Buschhaus H., Haramoto M., 2006 - Cyflufenamid, a new compound for control of powdery mildew in cereals. *8^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des plantes.*

Méthode d'étude de l'efficacité au champ des fongicides destinées à la lutte contre l'oïdium de la vigne, *Uncinula necator* (Schw.) Burr. CEB method n°22 (2nd Revision 1993).

Méthode d'étude des effets non intentionnels des produits phytopharmaceutiques sur l'élaboration et la qualité des vins et eaux de vie. CEB method n°143 (2nd Revision 2000).

**AFPP - 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**BAS 650F : CARACTERISATION D'UNE MOLECULE ISSUE D'UNE NOUVELLE
FAMILLE CHIMIQUE POUR LA LUTTE CONTRE LES OOMYCETES.**

C. AUMONT, C. GAUTHIER, A. COUSIN, S. FRITZ-PIOU, P.-A. LARDIER et Y. MORVAN

BASF Agro - 21 Chemin de la Sauvegarde, 69134 Ecully Cedex - France

christophe.aumont@basf.com

catherine.gauthier@basf.com

arnaud.cousin@basf.com

stephanie.fritz-piou@basf.com

pierre-antoine.lardier@basf.com

yves.morvan@basf.com

RÉSUMÉ

Les oomycètes, organismes responsables des mildious, forment un embranchement unique parmi les agents pathogènes des plantes. Ainsi, bien que les oomycètes aient développé des stratégies d'infection très semblables à celle des champignons pathogènes, leur évolution indépendante fait que la majorité des fongicides couramment utilisés dans la lutte contre les maladies cryptogamiques des plantes se trouve très souvent inefficace contre ces organismes.

Dans l'objectif de construire des programmes de lutte performants et pérennes contre les mildious, BASF propose avec BAS 650 F, une nouvelle famille chimique : les pyrimidylamines. Ainsi, outre la caractérisation de la famille chimique et de la molécule, cette communication mettra en avant les profils toxicologiques et écotoxicologiques des pyrimidylamines ainsi que la première déclinaison développée contre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*). Les caractéristiques techniques seront ensuite présentées et discutées.

Mots-clés : Oomycètes, mildiou, fongicide, pyrimidylamines, *Plasmopara viticola*.

SUMMARY

BAS 650 F: CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF A NEW CHEMICAL FAMILY TO CONTROL DOWNY MILDEW

Oomycetes, the causal agents of downy mildews, form a particular kingdom among the plant pathogenic microorganisms. Even though oomycetes developed infection strategies very similar to that of the true pathogenic fungi, their independent evolution makes that the majority of fungicides usually used in the fight against the cryptogamic diseases of plants are very often ineffective against these organisms.

In the objective to build successful and long-lasting programs of treatment against mildews, BASF proposes, with BAS 650 F, a new chemical family: pyrimidylamines. So, besides the chemical family and the molecule characterizations, this communication will present the toxicological and ecotoxicological profiles of pyrimidylamines as well as the first product developed against the downy mildew of grape (*Plasmopara viticola*). The technical characteristics will then be exposed and discussed.

Keywords: Oomycete, grape downy mildew, fungicide, pyrimidylamines, *Plasmopara viticola*.

INTRODUCTION

BAS 650 F est une molécule antifongique appartenant à une nouvelle famille chimique, les pyrimidylamines, développée par BASF pour la lutte contre les agents responsables des mildious, au sens large. C'est dans un état d'esprit d'innovation et d'anticipation, que la recherche BASF a mis au point une série de projets dont la première déclinaison est BAS 65200 F. Cette spécialité à base de BAS 650 F et de métirame (120 g/kg et 440 g/kg, respectivement) est travaillée contre *Plasmopara viticola* à la dose de 2,5 kg/ha, soit 300 g de BAS 650 F et 1100 g de métirame par hectare.

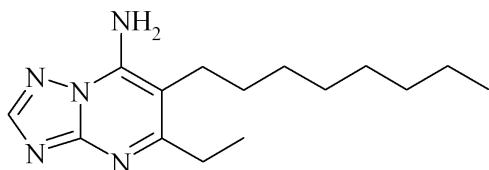
Cet article se propose de présenter les résultats d'efficacité obtenus avec ce projet après avoir brièvement envisagé les aspects toxicologiques et écotoxicologiques. BAS 65200 F, à ce jour en cours d'homologation, a été évalué dès 2006 dans les principales régions viticoles françaises. L'ensemble des essais a été mené selon les directives des méthodes définies par la Commission des Essais Biologiques (CEB) en vigueur et ce, en accord avec les règles de bonnes pratiques agricoles.

CARACTERISTIQUES DU PRODUIT

Propriétés physico-chimiques

Nom commun : BAS 650 F
Nom chimique : 5-ethyl-6-octyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amine

Figure 1 : Formule moléculaire développée du BAS 650 F.
Molecular representation of BAS 650 F.



| | |
|-----------------------------------|--|
| Formule moléculaire brute | : C ₁₅ H ₂₅ N ₅ |
| Poids moléculaire | : 275,4 |
| Densité en vrac | : 607 g/l non tassé et 672 g/l tassé |
| Point éclair | : N/A |
| Viscosité | : N/A |
| pH d'une dispersion aqueuse à 1 % | : 6,5 (1 % dans eau CIPAC D) |

En vigne, comme nous l'avons préalablement précisé, BAS 650 F est développé au travers d'une association. Le produit est formulé en granulés dispersables de couleur marron ; il n'est ni explosif, ni oxydant. Ses propriétés toxicologiques et écotoxicologiques sont présentées dans les Tableaux I et II.

Propriétés toxicologiques et écotoxicologiques

Tableau I : Propriétés toxicologiques de BAS 65200 F.
Toxicological properties of BAS 65200 F.

| Type d'étude | Résultats |
|---|----------------------------|
| DL ₅₀ orale aiguë rat | > 2 000 mg/kg p.c. |
| DL ₅₀ dermique aiguë rat | > 2 000 mg/kg p.c. |
| CL ₅₀ inhalation aiguë rat (4 h) | > 5,5 mg/L, 4h |
| Irritation cutanée lapin | Non irritant pour la peau |
| Irritation oculaire lapin | Non irritant pour les yeux |
| Sensibilisation cutanée Murine (Local Lymph Node Assay) | Non sensibilisant |

En conclusion, BAS 65200 F présente une faible toxicité aiguë par voie orale, par voie cutanée et par inhalation. De plus, la spécialité est non-irritante pour la peau et les yeux chez le lapin et ne montre aucun effet de sensibilisation cutanée dans le test 'Local Lymph Node Assay'. De part ses propriétés toxicologiques, la préparation BAS 652 00 F ne nécessite pas de classement toxicologique particulier. Il est proposé un délai de rentrée dans la parcelle traitée de 6 heures après application de la formulation BAS 652 00 F.

Tableau II : Propriétés écotoxicologiques du BAS 65200 F.
Ecotoxicological properties of BAS 65200 F.

| Organismes | BAS 65200 F |
|-------------------------------|--|
| Oiseaux | DL ₅₀ > 2000 mg s.a./kg d'aliment (tests réalisés avec les substances actives) : risque négligeable |
| Organismes aquatiques | |
| Truite | CL ₅₀ = 2,0 mg/L (96heures) |
| Daphnia magna | CE ₅₀ = 2,6 mg/L (48 heures) |
| Algues vertes | C _r E ₅₀ = 0,269 mg/L (72 heures) |
| Abeilles | DL _{50- oral} > 192.5 µg/abeille DL _{50 - cutanée} > 178.6 µg/abeille |
| Vers de terre | DL ₅₀ > 1000 mg/kg Sol sec (14 jours) |
| Arthropodes non cibles | Sans risque pour la faune auxiliaire |

En conclusion, d'après l'ensemble des études réalisées, l'utilisation de BAS 65200 F selon les bonnes pratiques agricoles n'entraîne aucun risque inacceptable que ce soit pour l'utilisateur, le consommateur ou encore pour l'environnement, la faune et la flore.

Modes d'action

BAS 65200 F est une spécialité composée de BAS 650 F, nouvelle substance active unisite, appartenant à la famille des pyrimidilamines, et de métirame, substance active de la famille des dithiocarbamates.

La cible des pyrimidylamines, se situe au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Bien qu'à ce jour la cible exacte des pyrimidylamines n'ait pas été identifiée, plusieurs études montrent qu'elle se situe au niveau du complexe III mitochondrial encore appelé cytochrome *bc1*. Trois sous-unités forment le cœur catalytique du cytochrome *bc1*, à savoir, le cytochrome *c1*, la protéine de Rieske (protéine Fer-Soufre) et le cytochrome *b*. Des mutations au niveau du cytochrome *b* (mutations G143A, F129L ou encore, plus rare, G137R), la sous-unité principale de l'enzyme, ont été rapportées comme étant à l'origine de cas de moindre sensibilité voire de résistance aux molécules de la famille des Qol (ubiquinone outer inhibitor) chez plusieurs microorganismes pathogènes (Sierotzki *et al.*, 2007). Toutefois, des expériences - non décrites dans cet article - ont démontré que ces

mutations ne génèrent aucun problème de contrôle des isolats de *P. viticola* par BAS 650 F. Par conséquent, nous sommes en mesure d'affirmer que le site de liaison de la quinone (Qo-site) n'est pas la cible de BAS 650 F et que, par déduction, le BAS 650 F n'est pas un QoI.

Le métirame, quant à lui, est un fongicide qui appartient à la famille chimique des dithiocarbamates. Il s'agit de fongicides multi-cibles et leurs effets premiers sur les cellules fongiques résultent principalement du blocage d'un processus cellulaire unique : la respiration (Leroux, 1993 ; Leroux et Moncomble, 1993 ; Ragsdal et Sisler 1991).

Propriétés biologiques

BAS 650 F est un fongicide dont le spectre se limite aux Oomycètes. Au niveau du cycle de vie de *P. viticola*, BAS 650 F inhibe (i) la différenciation ainsi que (ii) la libération des zoospores par les sporanges, (iii) la mobilité des zoospores relarguées et (iv) la germination des zoospores enkystées. L'ensemble de ces observations ont de plus été vérifiées chez un autre Oomycète, *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou de la pomme de terre, qui lui voit en plus la germination directe de ses sporanges altérée.

Les dithiocarbamates présentent un large spectre d'activité antifongique incluant Oomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes (Leroux et Gardan., 2003) et, le métirame possède une bonne persistance d'action (7 à 10 jours). Son pouvoir adhésif est très élevé mais il ne pénètre pratiquement pas dans la plante, ce qui contribue à expliquer sa bonne sélectivité. Le métirame est actif sur les agents responsables du mildiou, du black-rot, du rougeot parasitaire et de l'excoriose. De plus, au delà de son apport direct d'efficacité complémentaire à celle de BAS 650 F, le métirame présente un intérêt majeur dans le cadre de la prévention des résistances potentielles.

MATERIELS ET METHODES RELATIFS A LA MISE EN PLACE DES ESSAIS

Les essais d'efficacité réalisés en France ont été conduits suivant les recommandations des méthodes d'essais publiées par la Commission des Essais Biologiques (CEB) :

Méthode Générale n°2 : Principes généraux d'étude en plein champ de l'efficacité pratique des substances antifongiques.

Méthode n° 7 (2000) : Méthode d'étude de l'efficacité au champ de fongicides destinés à la lutte contre le mildiou de la vigne *Plasmopara viticola*.

Les essais étrangers, quant à eux, ont été réalisés en suivant les lignes directrices de l'OEPP.

Les essais d'efficacité sont implantés selon un dispositif de FISHER avec 4 blocs, les parcelles témoins non traitées étant incluses dans le dispositif. Chaque parcelle élémentaire est constituée de un à trois rangs selon l'écartement des lignes, sur une longueur permettant l'observation de 100 grappes sur le rang central, ceps d'extrémité exclus.

Le début des traitements est fixé selon les avis des Avertissements Agricoles. Il se situe généralement autour du stade grappes visibles (BBCH 51-53). Les traitements suivants sont pratiqués à une cadence de 12 jours, jusqu'à la véraison. La cadence peut être réduite à 10 jours en situation de pression importante, en station brumisée.

Dans les essais, BAS 65200 F a été appliqué à 2,5 kg/ha et comparé à REMILTINE S PEPITE à 3 kg/ha (cymoxanil + mancozèbe) qui est la référence recommandée par la CEB pour des applications à une cadence de 10-12 jours.

Dans chaque parcelle, 100 feuilles ou grappes sont observées afin de déterminer le pourcentage d'organes atteints (fréquence d'attaque) et le pourcentage moyen de surface attaquée (intensité d'attaque). Les observations sont effectuées à partir de l'apparition de la maladie dans les témoins et à chaque évolution.

Sur grappes, les observations sont effectuées de préférence à 3 époques : sur les inflorescences, à la nouaison (rot gris) et avant le début de la véraison (rot brun).

Les variables observées sont soumises à une analyse de variance avec transformation en Arcsinus et témoins inclus ; lorsque l'analyse est significative, on procède à la comparaison multiple des moyennes des facteurs traités entre eux par le test de Newmann & Keuls classant les facteurs en différents groupes homogènes (a, b, c...).

La même analyse statistique est également réalisée sur le regroupement des essais.

43 essais d'efficacité ont été réalisés par BASF Agro (13 essais), ainsi que par d'autres organismes français et étrangers, de 2006 à 2008. Seuls les essais réalisés par BASF Agro seront présentés dans cet article ; ces derniers ont été mis en place principalement en Haute-Garonne, sur la station d'expérimentation de BASF Agro à Merville (9 essais), mais également dans le Tarn (1 essai), en Charente-Maritime (1 essai), dans la Marne (1 essai) et le Vaucluse (1 essai).

RESULTATS DES ESSAIS

Pour chacun des critères définis, à savoir les fréquences et intensités d'attaque sur feuilles et sur grappes, a été retenue l'observation pour laquelle l'infestation dans les témoins était la plus élevée et ce, dans chaque essai. Notons que le plus souvent il s'agit de l'observation la plus tardive. Précisons également que la très grande majorité des essais a été mise en place en 2007 et 2008, années durant lesquelles les épidémies de mildiou furent explosives et de très grande intensité. Les 13 essais ont été, de la même façon, fortement attaqués et tout particulièrement sur grappes (Tableau III).

Tableau III : Niveaux d'attaque de mildiou dans les témoins non traités.
Downy mildew incidence and severity in untreated plots.

| Essai n° | Feuilles | | Grappes | |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Fréquence d'attaque (%) | Intensité d'attaque (%) | Fréquence d'attaque (%) | Intensité d'attaque (%) |
| BASF Agro | | | | |
| 06-C25 | - | 50,0 | 100 | 98,7 |
| 07-301 | 100 | 70,8 | 100 | 94,0 |
| 07-754 | 100 | 44,5 | 99,3 | 81,3 |
| 07-835 | 100 | 10,0 | 100 | 95,7 |
| 07-C03 | - | 42,5 | 100 | 79,0 |
| 07-C22 | - | 85,0 | 100 | 100 |
| 07-C25 | - | 73,8 | 100 | 98,8 |
| 07-C29 | - | 62,0 | 100 | 96,5 |
| 08-824 | 99,3 | 64,0 | 98,0 | 42,3 |
| 08-915 | 91,0 | 32,7 | 98,0 | 75,1 |
| 08-C05 | - | 62,5 | 92,0 | 100 |
| 08-C20 | - | 77,5 | - | 100 |
| 08-C23 | - | 26,3 | 100 | 99,0 |

Efficacité sur feuilles

Les résultats de fréquence et intensité d'attaque obtenus sur feuilles sont présentés dans le Tableau IV.

En moyenne des essais, BAS 65200 F à 2,5 kg/ha montre une efficacité supérieure à celle obtenue avec la référence (respectivement 80 et 66% d'efficacité, calculée sur l'intensité d'attaque).

La différence est significative en moyenne des 13 essais, ainsi que dans 7 essais analysés individuellement.

Tableau IV : Mildiou sur feuilles - Fréquence, intensité d'attaque et efficacités (%).
Downy mildew on leaves - Disease incidence, severity and efficacy (%).

| Essai n° | Date | Stade | TEMOIN | | BAS 65200 F 2,5 kg/ha | | | Cymoxanil + Mancozèbe | | | Analyse de variance | | | | |
|---|----------|-------|-------------|----------|--------------------------|----------|-----------|-----------------------|----------|-----------|------------------------|-------------|------------|--|--|
| | | | % att. | N&K | % att. | N&K | % Eff. | % att. | N&K | % Eff. | Proba | CV | ETR | | |
| Fréquence d'attaque sur feuilles (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 07-301 | 06/07/07 | 77-79 | 100,0 | a | 45,3 | b | 55 | 47,3 | b | 53 | 100 | 8,9 | 4,1 | | |
| 07-754 | 10/07/07 | 77 | 100,0 | a | 41,8 | b | 58 | 53,5 | b | 47 | 100 | 12,2 | 6,1 | | |
| 07-835 | 11/07/07 | 79 | 99,3 | a | 78,8 | c | 21 | 93,8 | b | 6 | 100 | 7,6 | 5,4 | | |
| 08-824 | 22/08/08 | 83 | 99,3 | a | 18,3 | b | 82 | 21,5 | b | 78 | 100 | 9,6 | 3,1 | | |
| 08-915 | 24/07/08 | 77 | 91,0 | a | 7,8 | e | 91 | 31,3 | c | 66 | 100 | 11,2 | 2,9 | | |
| Moyenne (5 essais) | | | 97,9 | a | 38,4 | b | 58 | 49,5 | b | 50 | 100 | 17,7 | 9,9 | | |
| Intensité d'attaque sur feuilles (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 06-C25 | 30/06/06 | 77-79 | 50,0 | a | 28,3 | e | 44 | 33,0 | bcde | 34 | 100 | 5,2 | 1,8 | | |
| 07-301 | 06/07/07 | 77-79 | 70,8 | a | 13,2 | bc | 81 | 12,7 | bc | 82 | 100 | 18,0 | 4,2 | | |
| 07-754 | 10/07/07 | 77 | 44,5 | a | 1,8 | b | 96 | 3,5 | b | 92 | 100 | 13,2 | 1,8 | | |
| 07-835 | 10/09/07 | 89 | 10,0 | a | 0,5 | c | 95 | 6,3 | ab | 38 | 100 | 43,7 | 4,2 | | |
| 07-C03 | 26/06/07 | 75-77 | 42,5 | a | 5,8 | bc | 86 | 4,8 | cd | 89 | 100 | 9,8 | 1,4 | | |
| 07-C22 | 11/07/07 | 79 | 85,0 | a | 17,5 | c | 79 | 32,5 | b | 62 | 100 | 9,9 | 3,1 | | |
| 07-C25 | 18/07/07 | 79 | 73,8 | a | 28,8 | c | 61 | 42,5 | b | 42 | 100 | 8,2 | 2,9 | | |
| 07-C29 | 25/06/07 | 77 | 62,0 | a | 17,5 | b | 72 | 22,5 | b | 64 | 100 | 7,4 | 2,2 | | |
| 08-824 | 22/08/08 | 83 | 64,0 | a | 2,2 | b | 97 | 2,6 | b | 96 | 100 | 15,1 | 2,0 | | |
| 08-915 | 24/07/08 | 77 | 32,7 | a | 0,5 | ef | 99 | 3,1 | c | 91 | 100 | 12,1 | 1,1 | | |
| 08-C05 | 01/07/08 | 75-77 | 62,5 | a | 6,1 | def | 90 | 11,6 | c | 81 | 100 | 11,0 | 2,3 | | |
| 08-C20 | 02/07/08 | 75-77 | 77,5 | a | 17,8 | cd | 77 | 41,8 | b | 46 | 100 | 12,4 | 3,8 | | |
| 08-C23 | 02/07/08 | 75-77 | 26,3 | a | 8,8 | c | 66 | 14,6 | b | 44 | 100 | 11,5 | 1,9 | | |
| Moyenne (13 essais) | | | 54,0 | a | 11,4 | c | 80 | 17,8 | b | 66 | 100 | 22,7 | 6,6 | | |

Efficacité sur grappes

Les résultats de fréquence et intensité d'attaque obtenus sur grappes dans les 13 essais sont présentés dans le Tableau V.

Les résultats confirment les excellentes performances de BAS 65200 F sur grappes et la supériorité par rapport à la référence. En moyenne des essais, BAS 65200 F montre sur grappes une efficacité de 90% contre 57% pour la référence. La différence est significative en moyenne des 13 essais, ainsi que dans 12 essais sur 13.

Il est à noter que tous les essais pour lesquels l'efficacité sur grappes est inférieure à 90% correspondent à des essais mis en place sur la station d'expérimentation BASF de Merville (Haute Garonne) et pour lesquels la pression parasitaire a été extrême.

Tableau V : Mildiou sur grappes - Fréquence, intensité d'attaque et efficacités (%).
Downy mildew on bunches - Disease incidence, severity and efficacy (%).

| Essai n° | Date | Stade | TEMOIN | | BAS 65200 F 2,5 kg/ha | | | Cymoxanil + Mancozèbe | | | Analyse de variance | | |
|--|----------|-------|-------------|----------|--------------------------|----------|------------|-----------------------|----------|------------|---------------------|-------------|-------------|
| | | | % att. | N&K | % att. | N&K | % Eff. | % att. | N&K | % Eff. | Proba | CV | ETR |
| Fréquence d'attaque sur grappes (%) | | | | | | | | | | | | | |
| 06-C25 | 25/07/06 | 79-81 | 100,0 | a | 39,5 | bc | 61 | 99,5 | a | 1 | 100 | 9,8 | 5,8 |
| 07-301 | 25/07/07 | 83 | 100,0 | a | 10,0 | d | 90 | 81,0 | b | 19 | 100 | 15,9 | 7,0 |
| 07-754 | 06/08/07 | 81-85 | 99,3 | a | 7,0 | d | 93 | 58,5 | b | 41 | 100 | 20,9 | 7,3 |
| 07-835 | 02/08/07 | 81 | 100,0 | a | 30,8 | d | 69 | 97,5 | ab | 3 | 100 | 12,7 | 7,3 |
| 07-C03 | 31/07/07 | 79-81 | 100,0 | a | 15,0 | c | 85 | 66,5 | b | 34 | 100 | 24,9 | 10,8 |
| 07-C22 | 11/07/07 | 79 | 100,0 | a | 41,8 | b | 58 | 100,0 | a | 0 | 100 | 13,9 | 7,8 |
| 07-C25 | 30/07/07 | 79-80 | 100,0 | a | 36,5 | bc | 64 | 99,0 | a | 1 | 100 | 15,8 | 9,0 |
| 07-C29 | 24/07/07 | 79-81 | 100,0 | a | 7,5 | d | 93 | 91,0 | b | 9 | 100 | 11,0 | 5,5 |
| 08-824 | 26/08/08 | 85 | 98,0 | a | 1,3 | b | 99 | 1,8 | b | 98 | 100 | 34,5 | 4,7 |
| 08-915 | 24/07/08 | 77 | 98,0 | a | 1,3 | d | 99 | 28,0 | b | 71 | 100 | 24,7 | 6,1 |
| 08-C05 | 18/06/08 | 70-73 | 92,0 | a | 0,5 | f | 99 | 17,5 | bcde | 81 | 100 | 37,7 | 8,7 |
| 08-C23 | 31/07/08 | 79 | 100,0 | a | 66,0 | bcd | 34 | 88,0 | b | 12 | 100 | 13,9 | 7,8 |
| Moyenne (12 essais) | | | 98,9 | a | 21,4 | c | 79 | 69,0 | b | 31 | 100 | 21,0 | 11,8 |
| Intensité d'attaque sur grappes (%) | | | | | | | | | | | | | |
| 06-C25 | 25/07/06 | 79-81 | 98,7 | a | 3,7 | e | 96 | 69,1 | bc | 30 | 100 | 14,2 | 4,3 |
| 07-301 | 25/07/07 | 83 | 94,0 | a | 0,5 | d | 100 | 28,1 | b | 70 | 100 | 18,4 | 4,0 |
| 07-754 | 06/08/07 | 81-85 | 81,3 | a | 0,5 | c | 99 | 9,8 | b | 88 | 100 | 25,8 | 4,1 |
| 07-835 | 02/08/07 | 81 | 95,7 | a | 3,3 | d | 97 | 41,2 | b | 57 | 100 | 22,6 | 5,9 |
| 07-C03 | 31/07/07 | 79-81 | 79,0 | a | 1,4 | c | 98 | 18,5 | b | 77 | 100 | 32,4 | 6,1 |
| 07-C22 | 11/07/07 | 79 | 100,0 | a | 19,0 | c | 81 | 74,0 | b | 26 | 100 | 23,3 | 8,8 |
| 07-C25 | 30/07/07 | 79-80 | 98,8 | a | 3,7 | de | 96 | 56,2 | c | 43 | 100 | 11,2 | 3,2 |
| 07-C29 | 24/07/07 | 79-81 | 96,5 | a | 0,7 | d | 99 | 32,8 | b | 66 | 100 | 17,8 | 4,3 |
| 08-824 | 26/08/08 | 85 | 42,3 | a | 0,1 | b | 100 | 0,1 | b | 100 | 100 | 33,8 | 1,9 |
| 08-915 | 24/07/08 | 77 | 75,1 | a | 0,1 | e | 100 | 8,4 | c | 89 | 100 | 22,7 | 3,3 |
| 08-C05 | 31/07/08 | 79 | 100,0 | a | 20,3 | gh | 80 | 66,3 | cde | 34 | 100 | 14,1 | 7,0 |
| 08-C20 | 02/07/08 | 75-77 | 100,0 | a | 46,3 | de | 54 | 90,5 | abc | 10 | 100 | 23,1 | 13,5 |
| 08-C23 | 31/07/08 | 79 | 99,0 | a | 25,7 | cd | 74 | 48,5 | b | 51 | 100 | 15,3 | 5,3 |
| Moyenne (13 essais) | | | 89,2 | a | 9,6 | c | 90 | 41,8 | b | 57 | 100 | 17,0 | 7,2 |

Les résultats obtenus sur l'ensemble de ces essais montrent le haut niveau de performance de BAS 65200 F contre le mildiou de la vigne, notamment sur grappes. Ceux-ci sont systématiquement supérieurs à ceux observés avec la référence.

Ces résultats sont confirmés aussi bien dans des essais menés par le SPV que dans ceux conduits dans plusieurs pays de la Communauté Européenne.

RESISTANCE AU LESSIVAGE

Une étude sur la résistance au lessivage a été conduite sur de jeunes plantes en pots (cépage Cabernet Sauvignon), traitées en conditions contrôlées au laboratoire dans une cabine de pulvérisation automatisée. Le dispositif est constitué de 6 plantes par parcelle élémentaire avec 6 répétitions pour chaque traitement, soit 36 plantes par modalité.

BAS 65200 F est appliqué à 2,5 kg/ha et comparé à une spécialité à base de folpel à 80% à 1,9 kg/ha et une spécialité systémique (50% fosétyl-Al + 25% folpel) à 4 kg/ha.

Deux types de régime de pluie ont été simulés :

- une pluie de 20 mm en une heure,
- deux pluies de 20 mm par heure, espacées de 3 heures.

La pluie est déclenchée une heure après le traitement. La contamination artificielle est faite 18 heures après la pluie.

Après 8 jours d'incubation, des observations d'intensité d'attaque sur feuilles sont réalisées.

Après un lessivage de 20 mm, l'efficacité diminue pour l'ensemble des spécialités mais dans des proportions différentes : BAS 65200 F présente la meilleure efficacité (95%).

Après deux lessivages de 20 mm, BAS 65200 F montre une différence significative d'efficacité par rapport aux références (92% contre 79 et 77% pour les deux références - Figure 2 et Tableau VI).

Figure 2 : Effet de la pluie sur l'efficacité (% d'intensité d'attaque des feuilles).
Effect of the rain on the efficiency (Disease severity on leaves (%)).

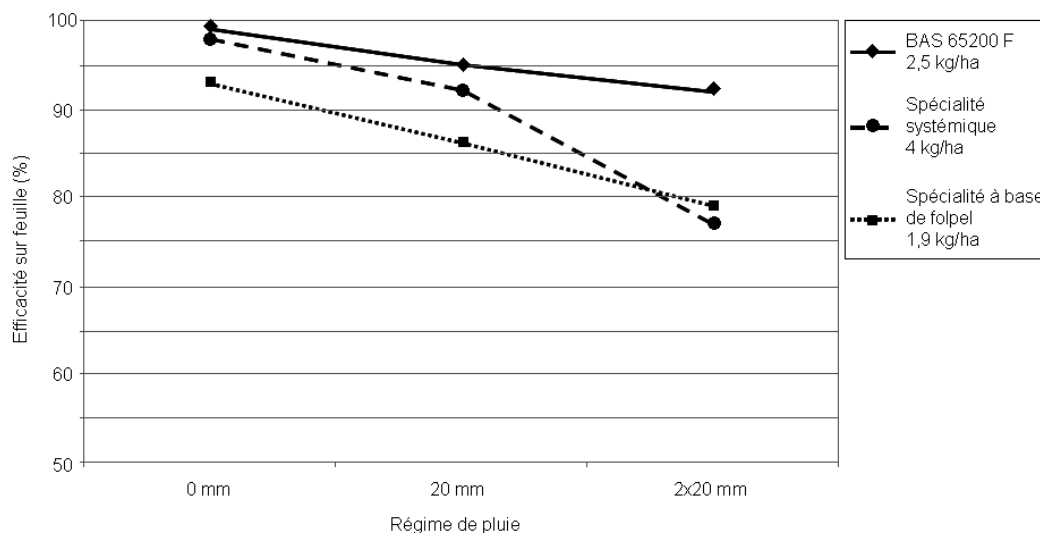


Tableau VI : Effet du régime de pluie - Intensité d'attaque de mildiou sur feuilles et efficacité (en %).

Effect of the rain intensity - (Disease severity and Efficiency on leaves (%)).

| Pluie - délai après la pluie | TEMOIN | | BAS 65200 F 2,5 kg/ha | | | Spécialité à base de folpel 1,9 kg/ha | | | Spécialité systémique 4 kg/ha | | |
|------------------------------|--------|-----|-----------------------|-----|-----------|---------------------------------------|-----|-----------|-------------------------------|-----|-----------|
| | int. % | N&K | int. % | N&K | % Eff. | int. % | N&K | % Eff. | int. % | N&K | % Eff. |
| 0 | 88,0 | a | 0,5 | e | 99 | 6,5 | de | 93 | 1,5 | de | 98 |
| 20 mm - 1h | 87,3 | a | 4,5 | de | 95 | 12,0 | cd | 86 | 6,7 | de | 92 |
| 20 mm - 1h x 2* | 88,7 | a | 6,9 | de | 92 | 18,7 | c | 79 | 20,3 | c | 77 |

* 2 fois une heure de précipitation, séparés de 3 heures

GESTION DE LA PERENNITE DE BAS 65200 F

Ainsi, afin de limiter le risque de sélection de souches de *P. viticola* moins sensibles à BAS 650 F au sein des vignobles français, cette molécule est développée en association avec un produit de contact, le métirame. De plus, en considérant que le nombre d'applications de fongicides ayant pour cible le mildiou est susceptible de varier de 4 à 10 selon, entre autres choses, la localisation géographique et le climat, le nombre maximal d'applications de BAS 652 00 F sur vigne sera limité à 3 par saison, avec un maximum de 2 applications consécutives en alternance avec des fongicides appartenant à des groupes de résistance croisée différents ; ces applications devant être positionnées impérativement en situation préventive. Cette préconisation prend en compte le nombre de familles chimiques disponible pour l'usage concerné dans le cadre de l'alternance potentielle des modes d'action.

CONCLUSIONS

L'intérêt de BAS 65200 F réside dans l'apport d'une nouvelle substance active au mode d'action original très efficace sur *P. viticola*, BAS 650 F (famille des pyrimidilamines). Cette molécule originale est proposée en association avec le métirame, substance active présentant un autre mode d'action qui vient renforcer l'efficacité de BAS 650 F sur *P. viticola*. Les résultats obtenus dans les essais de BASF Agro montrent le haut niveau de performance de BAS 65200 F contre le mildiou de la vigne, sur feuilles et tout particulièrement sur grappes ; ces derniers étant systématiquement supérieurs à ceux observés avec la référence et ce, aussi bien au niveau des essais BASF Agro présentés dans cet article qu'au niveau des essais SPV ou des essais mis en place dans d'autres pays européens.

BAS 652F proposera aux acteurs de la protection phytosanitaire des vignobles une nouvelle molécule issue d'une nouvelle famille chimique associée au métirame, molécule à mode d'action multisite et outil majeur pour la gestion pérenne des maladies. Cette stratégie de gestion de la molécule BAS 650F est d'autant plus pertinente lorsqu'elle est mise en place dès le lancement des spécialités.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Leroux P., 1993 - Fongicides : prévoir, une résistance peut en cacher une autre. *Perspective Agricole* (185), 95-98.

Leroux P., Moncomble D., 1993 - Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. Passé, présent, futur (1re partie). *Phytoma* (450), 27-30.

Leroux P., Gardan L., 2003 - Phytopathologie, Philippe Lepoivre, Chapitre 15 : la lutte chimique en Phytopathologie. *Les presses agronomiques de Gembloux*. 319-342.

Ragsdal N.N., Sisler H.D., 1991 - The nature, modes of action and toxicity of fungicides. In : Pimental (D.) (Ed.) *Handbook of pest management in agriculture*, Vol. 2. Boca Raton: CRC Press, 461-496.

Sierotzki H., Frey R., Wullschleger J., Palermo S., Karlin S., Godwin J., Gisi U. 2007 - Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. *Pest Management Science*. 63, 225-233.

**AFPP – 9^{ème} CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DÉCEMBRE 2009**

**INTERET D'UNE NOUVELLE ASSOCIATION CODEE BCSV 750 F DANS LE
RAISONNEMENT DES STRATEGIES DE LUTTE ANTI-OÏDIUM VIGNE**

O. LE MOINE, F. LHEUREUX, P. LAGOUARDE, C. BARREAU, G. BLANC, S. SAUZAY

Bayer CropScience France, 16 rue Jean-Marie Leclair CP 310 69337 LYON Cedex09

RESUME

BCSV 750 F est l'association de deux substances actives reconnues dans la lutte anti-oïdium en vigne : la trifloxystrobine et le tébuconazole. Ce fongicide présente plusieurs intérêts : l'avantage de combiner deux modes d'action biochimiques différents, la sécurité d'apporter des modes d'action biologiques complémentaires. Ces caractéristiques originales lui permettent d'être actif sur tous les stades de développement de l'oïdium avec régulièrement un très haut niveau d'efficacité à la fois sur feuilles et sur grappes. Grâce à sa souplesse de positionnement, BCSV 750 F s'intègre facilement dans les différents programmes de traitements anti-oïdium. De plus, son efficacité sur black-rot et rougeot parasitaire en fait un outil privilégié dans tous les vignobles pour lutter contre les différents complexes de pathogènes. BCSV 750 F, utilisé à la dose de 0,16 Kg/ha, cumule performance et flexibilité d'emploi, pour répondre aux nouvelles attentes des viticulteurs, particulièrement en termes de préventivité et curativité en début de saison.

Mots-clés : oïdium, tébuconazole, trifloxystrobine, vigne, NATIVO®

SUMMARY

BCSV 750 F is a combination of two actives wellknown for their powdery mildew efficacy on vine: trifloxystrobine and tebuconazole. This fungicide shows some interests: the advantage to combine two different biochemical modes of action and the security to bring some complementary biological modes of action. These original characteristics allow the activity on all stages of powdery mildew development with a regular and very high level of efficacy on leaves and bunches too. Thanks to its positioning adaptability, BCSV 750 F is a very usefull tool in the building of the powdery mildew programs. Moreover, it shows a very good efficacy on *Pseudopeziza tracheiphila* and *Guignardia bidwellii* and can be used with success against all the fungi complexes met in vines. BCSV 750 F, at 0,16 Kg/ha, adds up performance and flexibility to come up to growers new expectations at the beginning of the season.

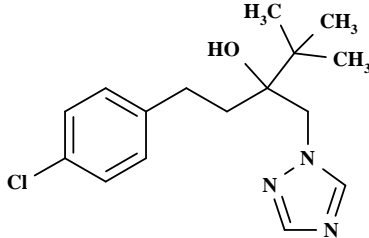
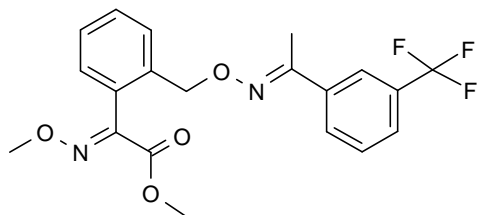
Key words: powdery mildew, tebuconazole, trifloxystrobine, vine, NATIVO®

INTRODUCTION

Une association à base de trifloxystrobine (strobilurine) et de tébuconazole (triazole) a été conçue dans l'optique d'apporter aux viticulteurs une solution technique de haut niveau pour lutter contre l'oïdium de la vigne, seul ou en complexe avec black rot et/ou brenner.

L'expérimentation a été conduite dans plusieurs pays européens et en France de 2003 à 2006. Ce nouveau fongicide, initialement codé BCSV 750 F a reçu en août 2009 ses autorisations de mise en marché sous le nom de NATIVO®. Il est formulé sous forme WG (Granulés dispersibles) et est composé de 25% de trifloxystrobine et de 50% de tébuconazole. Il est autorisé sur vigne pour lutter contre l'oïdium et le rougeot parasitaire à la dose de 0,16 Kg/ha ainsi que contre le black-rot à la dose de 0,12 Kg/ha. Il est également en cours de développement sur de nombreuses cultures légumières (ce qui fait l'objet d'une communication parallèle).

CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

| Nom commun | tébuconazole | trifloxystrobine |
|--------------------------------|---|---|
| Nom chimique (IUPAC) | (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-diméthyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)- pentan-3-ol | Méthyl (E)-méthoxyimino-{(E)-a-[1-a-(a,a,a-trifluoro-mtolyl) ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate |
| N° CAS | 107534-96-3 | 141517-21-7 |
| Classe chimique | triazole | strobilurine |
| Formule moléculaire développée |  |  |
| Formule brute | C16H22ClN3O | C20H19F3N2O4 |
| Masse moléculaire | 307.8 g/mol | 408.4 |
| Solubilité dans l'eau (20°C) | (20°C) 38 mg/L à pH 5.3 36 mg/L à pH 7.2 et 9.4 | (25°C) 0.61 mg / L |
| Tension de vapeur (25°C) | 3.1 × 10 ⁻⁶ Pa | 3.4 · 10 ⁻⁶ Pa |
| Mobilité dans le sol | Koc = 128.4 - 1249 mL/g, moy 769 mL/g | Koc = 1642-3745 (6 sols) moy 2377 |

CARACTERISTIQUES TOXICOLOGIQUES

| BCSV 750 F | | |
|-----------------------------------|---------------------|--|
| Toxicité aiguë sur les mammifères | Propriétés | Classification (selon directive CEE/99/45) |
| Toxicité orale aiguë, rat : | DL50> 5000 mg/Kg pc | Non requise |
| Toxicité cutanée aiguë, rat : | DL50> 2000 mg/Kg pc | Non requise |
| Irritation cutanée, lapin : | Non irritant | Non requise |
| Irritation oculaire, lapin : | Légèrement irritant | Non requise |
| Sensibilisation cutanée, cobaye : | Non sensibilisant | Non requise |

CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

L'association a été réfléchi afin de faire bénéficier aux utilisateurs de la parfaite complémentarité de la trifloxystrobine et du tébuconazole et ainsi assurer un excellent contrôle de l'oïdium en toutes situations.

Complémentarité des modes d'action biologiques

En associant ces 2 substances actives, BCSV 750 F cumule ainsi 2 modes d'action biologiques différents.

Le tébuconazole, en plus de ses propriétés préventives, démontre une excellente activité curative sur mycélium qui empêche et bloque le développement de l'oïdium.

La trifloxystrobine allie à la fois une bonne action préventive et curative grâce à sa très forte activité anti-sporulante. Elle perturbe et inhibe ainsi le développement des spores traitées garantissant un très bon contrôle des cycles secondaires de l'oïdium.

BCSV 750F cumule de ce fait les bénéfices de ces 2 substances actives fongicides, apportant souplesse et sécurité dans la lutte contre l'oïdium en associant la bonne efficacité curative du tébuconazole à l'activité anti-sporulante de la trifloxystrobine.

Complémentarité des modes d'action biochimiques

Le tébuconazole inhibe la C14 déméthylase et appartient de ce fait au groupe I des IBS (inhibiteur de la biosynthèse des stérols), désigné le plus souvent comme le groupe des IDM (inhibiteurs de la déméthylation).

La trifloxystrobine appartient à la famille des strobilurines. Elle agit sur la respiration cellulaire en bloquant le transfert d'électrons au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale.

NATIVO® associe les deux modes d'action biochimiques pour optimiser l'efficacité et limiter les risques d'apparition de résistance.

Complémentarité des propriétés de biodisponibilité

Le tébuconazole déposé en surface de la feuille, pénètre dans les tissus de la plante. Par un mouvement translaminaire, il pénètre dans les différentes couches cellulaires jusqu'à atteindre le système vasculaire. Rapidement absorbé par le végétal, le tébuconazole est doté de propriétés systémiques : il migre lentement dans la plante. Il en résulte une répartition très régulière de la substance active dans les organes végétaux traités.

La trifloxystrobine est dotée de 3 propriétés essentielles - forte affinité avec la cuticule des feuilles et baies, redistribution en phase gazeuse dans le couvert végétal, activité translaminaire - qui décrivent sa distribution comme mésostémique.

L'ensemble des caractéristiques des substances actives confère à BCSV 750 F :

- une efficacité contre l'oïdium de très haut niveau, régulière, préventive et curative,
- une excellente persistance d'action,
- une grande flexibilité de positionnement.

Les propriétés de distribution et de transport du tébuconazole et de la trifloxystrobine dans la vigne mettent BCSV 750 F à l'abri du lessivage en une heure.

MATERIELS ET METHODES OÏDIUM

Les essais ont tous été conduits selon la méthode CEB en vigueur (CEB n°22 – Méthode d'étude de l'efficacité aux champs de fongicides destinés à la lutte contre l'oïdium de la vigne).

Dispositif expérimental

Le dispositif est de type Fisher à 4 blocs minimum et le témoin non traité est inclus dans le dispositif.

Les produits ont été appliqués en visant une cadence de 14 jours. Cela se traduit par un nombre de traitements sur la saison variant de 5 à 9 selon les sites et les années. Le positionnement des traitements a été réalisé de manière à couvrir toute la phase de sensibilité de la culture à la maladie. Le premier traitement est effectué au stade « boutons floraux séparés » généralement en préventif, en fonction des recommandations de la Station d'Avertissements Agricoles du Service de Protection des Végétaux. Les derniers traitements sont appliqués au stade « fermeture de la grappe », correspondant à la fin de la sensibilité des grappes à l'oïdium.

Modalités étudiées

BCSV 750 F est testé à la dose de 0,16 Kg/ha (40 g trifloxystrobine + 80 g tébuconazole). Il est comparé à la référence CEB (CORAIL®) appliqué à sa dose homologuée, soit 0,4 L/ha (100 g tébuconazole. / ha).

Tableau I : Produit de référence et dose expérimentée
(Reference product and tested dose rate)

| Maladie | Produit | Formulation | Composition | Doses d'application | |
|---------|---------|-------------|-------------------------|---------------------|----------|
| | | | | P.F. /ha | s.a. /ha |
| Oïdium | CORAIL® | EW | 250 g/L tébuconazole | 0,4 L | 100 g |

Tableau II : Essais réalisés
(Trials year by year)

| Maladie | Produit | Année | | | | |
|------------------------|---------------|-------|------|------|------|------|
| | | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 |
| Oïdium | BCSV 750 F | 3 | 3 | 3 | 2 | |
| Black Rot | BCSV 750 F | | | | | 3 |
| Rougeot parasitaire | BCSV 750 F | | 1 | 1 | | 1 |

Contrôles

Les échantillons contrôlés varient de 50 à 100 feuilles par parcelle élémentaire pour les notations sur feuilles et de 50 à 100 grappes pour les notations sur grappes.

Les contrôles sur feuilles ont été effectués entre les stades BBCH 69 et 77 (soit entre les stades « fin floraison » et « fermeture de la grappe ») et les stades 75 et 83 (soit les stades « petits pois » et « début véraison ») pour les contrôles sur grappes.

Tableau III : Notations effectuées
List of notations

| Organe | Contrôle |
|----------|---|
| Feuilles | Fréquence attaque (% feuilles attaquées) |
| | Infestation (% surface foliaire attaquée / feuille) |
| Grappes | Fréquence attaque (% grappes attaquées) |
| | Infestation (% volume grappe malade par grappe) |

RESULTATS OÏDIUM

Résultats sur feuilles

Dans 1 série de 6 essais fortement infestés sur feuilles, BCSV 750F a toujours assuré un excellent contrôle de l'oïdium sur feuilles, comparable à celui obtenu avec la référence CEB. Dans ces conditions, les différences statistiques ne sont pas significatives.

Tableau IV : Efficacité de BCSV 750 F - Fréquence et intensité d'attaque sur feuilles – Cadence 14 jours

Efficacy of BCSV 750 F – Frequency and intensity on leaves – 14 days interval

| Année | Essai | Témoin | Référence CEB - CORAIL® 0,4 L/ha | BCSV 750 F 0,16 Kg/ha | Témoin | Référence CEB - CORAIL® 0,4 L/ha | BCSV 750 F 0,16 Kg/ha |
|-------|--------------------------------------|---------------------------|--|--------------------------------|-------------------------|--|--------------------------------|
| | | (% feuilles attaquées) | Fréquence d'attaque sur feuilles (% efficacité par rapport au témoin) | | (% surface attaquée) | Intensité d'attaque sur feuilles (% efficacité par rapport au témoin) | |
| 2003 | Montpellier (34) | 99.9 | 90.7 b | 88.2 b | 22.4 | 99.4 b | 99.2 b |
| | Bourg Saint Andéol (07) | 99.5 | 84.7 b | 73.5 b | 59.1 | 97.9 b | 96.4 b |
| 2004 | Montpellier (34) | 88.5 | 94.4 a | 90.4 a | 5 | 98.6 a | 97.5 a |
| 2005 | Jonquières Saint- Vincent (30) | 100 | 92 a | 94.8 a | 37.4 | 99.4 a | 99.6 a |
| | Montpellier (34) | 97.3 | 92.5 a | 92.5 a | 14 | 98.7 a | 98.9 a |
| 2006 | Montfrin (30) | 83.3 | 86.5 a | 91 ab | 6.1 | 93.1 a | 96.7 ab |

Pour chaque essai, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Résultats sur grappes

Les essais ont permis de tester les produits dans des contextes d'attaque extrêmement sévères dans 5 essais sur 6 (jusqu'à 100% de grappes attaquées et 99 % de dégâts par grappe dans le témoin)

Tableau V : Efficacité de BCSV 750 F - Fréquence et intensité d'attaque sur grappes –
Cadence 14 jours
Efficacy of BCSV 750 F – Frequency and intensity on bunches – 14 days interval

| Année | Essai | Témoin | Référence CEB - CORAIL® 0,4 L/ha | BCSV 750 F 0,16 Kg/ha | Témoin | Référence CEB - CORAIL® 0,4 L/ha | BCSV 750 F 0,16 Kg/ha |
|-------|---|--------------------------|--|-----------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|
| | | (% grappes attaquées) | Fréquence d'attaque sur grappes (% efficacité par rapport au témoin) | | (% surface attaquée) | Intensité d'attaque sur grappes (% efficacité par rapport au témoin) | |
| 2003 | Montpellier (34) | 100 | 0 a | 74.5 c | 99 | 45.9 b | 99.6 d |
| | Bourg Saint Andéol (07) | 97.6 | 95 b | 100 b | 63.4 | 99.4 b | 100 b |
| 2004 | Montpellier (34) | 100 | 7 a | 67.5 b | 99 | 61.5 a | 98.9 b |
| 2005 | Jonquières Saint- Vincent (30) | 100 | 91 a | 93.5 a | 54.2 | 99.5 a | 99.8 a |
| | Montpellier (34) | 100 | 44 a | 81.5 b | 96.1 | 91 a | 99.6 b |
| 2006 | Montfrin (30) | 40 | 100 a | 100 a | 5.2 | 100 a | 100 a |

Pour chaque essai, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

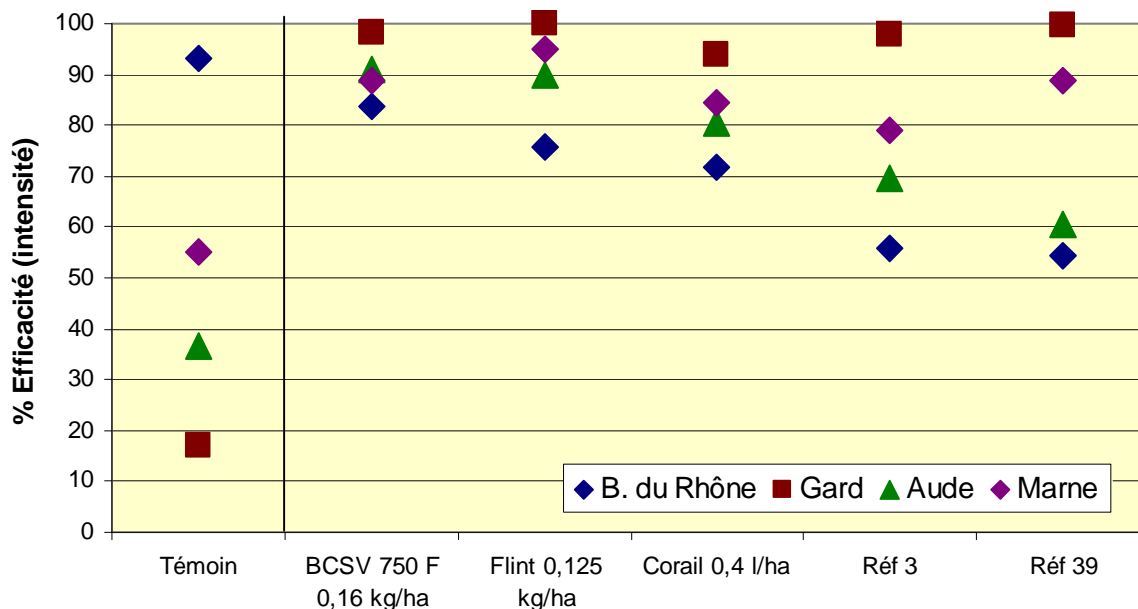
Sur l'ensemble des essais, les efficacités moyennes en fréquence d'attaque traduisent un niveau de performance de BCSV 750 F très supérieur à celui apporté par la référence CEB dans 3 essais sur 6 et une protection identique à la référence CEB dans les autres essais.

L'analyse des résultats obtenus sur les intensités d'attaque confirment ces tendances. Dans ces situations de très fortes attaques, BCSV 750 F est supérieur à la référence CEB sur l'ensemble des essais conduits.

Résultats d'essais régionaux

Bayer CropScience France a conduit en 2008 des essais dans des conditions standards d'exploitation d'un vignoble. 2 applications ont été réalisées à 14 jours à partir du stade « boutons floraux séparés » puis les couvertures assurées avec du soufre. La synthèse de ces essais présentée ci-dessous illustre parfaitement la complémentarité des 2 molécules et tout l'intérêt de l'utilisation du BCSV 750 F contre l'oïdium de la vigne.

4 essais Bayer CSF 2008
*[2 traitements en démarrage de protection
à boutons floraux séparés]*



En conditions difficiles, ces résultats obtenus montrent à l'évidence la meilleure protection obtenue avec BCSV 750 F par rapport aux références techniques et commerciales présentes dans l'essai.

RESULTATS BLACK ROT ET ROUGEOT PARASITAIRE

En parallèle de l'oïdium, BCSV 750 F présente un fort intérêt dans la lutte contre le black-rot et le rougeot parasitaire. Les 3 tableaux ci-dessous résument les essais conduits entre 2004 et 2007 sur ces 2 maladies.

Les essais ont tous été conduits selon la méthode CEB en vigueur (CEB n°53 – Méthode d'étude de l'efficacité pratique de fongicides destinés à la lutte contre le Black-rot de la vigne, CEB n°108 – Méthode d'étude de l'efficacité pratique de fongicides destinés à la lutte contre le rougeot parasitaire).

Tableau VI : Efficacité de BCSV 750 F - rougeot parasitaire - Intensité d'attaque sur feuilles – Cadence 14 jours
 Efficacy of BCSV 750 F - *Pseudopeziza tracheiphila* - Intensity on leaves – Rythm of 14 days

| Année | Essai | Témoin (Nombre taches moyen par parcelle) | Référence CEB | BCSV 750 F 0,16 Kg/ha |
|-------|---------------|--|---|--------------------------|
| | | | % efficacité par rapport au témoin | |
| 2004 | Chaux (21) | 21 | 95.2 b | 97.6 b |
| 2005 | Chaux (21) | 10 | 35 a | 77.5 a |
| 2007 | Chacenay (10) | 10 | 85 b | 85 b |

Pour chaque essai, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Dans ces 3 essais, BCSV 750 F assure une protection contre *Pseudopeziza tracheiphila* du même niveau que la référence CEB dès la dose de 0,12 Kg/ha (dose homologuée).

Tableau VII : Efficacité de BCSV 750 F - black-rot – Comptage sur feuilles - Cadence 14 j.
 Efficacy of BCSV 750 F - *Guignardia bidwellii* - Account on leaves – 14 days interval

| Année | Essai | Témoin (Nombre de feuilles attaquées par parcelle) | Référence CEB (% efficacité) | BCSV 750 F 0,12 Kg/ha (% efficacité) | Témoin (Nombre de taches par parcelle) | Référence CEB (% efficacité) | BCSV 750 F 0,12 Kg/ha (% efficacité) |
|-------|----------------------------|---|---------------------------------|--|---|---------------------------------|--|
| 2007 | Saint Vincent de Paul (33) | 654 | 99.7 a | 99 c | | | |
| | Nazelles Negrón (37) | 59 | 100 c | 100 c | 191 | 100 c | 100 c |
| | Boe (47) | 183 | 99 c | 99.5 c | | | |

Pour chaque essai, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Tableau VIII : Efficacité de BCSV 750 F - black-rot – Fréquence et intensité d'attaque - Cadence 14 jours
 Efficacy of BCSV 750 F - *Guignardia bidwellii* - Frequency and Intensity - 14 days interval

| Année | Essai | Témoin (% grappes attaquées) | Référence CEB – OLYMP 10 EW 0,3 L/ha (% efficacité) | BCSV 750 F 0,12 Kg/ha (% efficacité) | Témoin (% volume grappe attaquées) | Référence CEB – OLYMP 10 EW 0,3 L/ha (% efficacité) | BCSV 750 F 0,12 Kg/ha (% efficacité) |
|-------|-------------------------------------|------------------------------------|---|---|---|---|---|
| 2007 | Saint Vincent de Paul (33) | 100 | 77.3 b | 73.8 b | 50.1 | 96.9 b | 95.5 b |
| | Nazelles Negron (37) | 80.5 | 99.4 c | 100 c | 14 | 100 b | 100 b |
| | Boe (47) | 96 | 99.7 d | 99.5 d | 40.4 | 100 d | 100 d |

Pour chaque essai, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%

Sur feuilles comme sur grappes, en fréquence ou en intensité, BCSV 750 F permet une très bonne protection contre *Guignardia bidwellii* comparable à celle de la référence avec de plus, une très grande régularité d'action.

CONCLUSION

Grâce à des modes d'action différents et des modes d'action biologiques complémentaires, BCSV 750 F permet un excellent contrôle à tous les stades de développement de l'oïdium, ainsi que des efficacités régulières et de haut niveau en toutes situations avec un effet démontré sur les cycles ultérieurs du champignon.

BCSV 750 F présente un intérêt certain pendant toute la période de sensibilité de la vigne à l'oïdium, du stade boutons floraux séparés à la fermeture de la grappe.

Toutes ces caractéristiques originales apportent au viticulteur une très grande souplesse d'emploi, particulièrement en début de programme grâce à son action curative démontrée sur l'oïdium en cours d'installation.

Les résultats des différents essais mis en place par Bayer CropScience depuis plusieurs années permettent de tirer des conclusions fiables ainsi que déterminer le meilleur positionnement du produit dans le cadre d'une lutte conjointe contre l'oïdium de la vigne, le black-rot et le rougeot parasitaire.

Sur oïdium, afin d'optimiser son efficacité et sa souplesse d'utilisation, BCSV 750 F sera recommandé à 0,16 Kg/ha sur la base de 2 applications avec une cadence de 14 jours. De par sa souplesse d'emploi, BCSV 750 F pourra être utilisé du stade « boutons floraux séparés » au stade « fermeture de la grappe ».

Sur rougeot parasitaire, BCSV 750 F, sera préconisé à la dose de 0,16 Kg/ha, apportant ainsi une efficacité de haut niveau, équivalente à la référence CEB.

Sur black-rot, BCSV 750 F sera préconisé à la dose de 0,12 Kg/ha permettant ainsi un très bon contrôle sur feuilles comme sur grappes.

BCSV 750 F est une nouvelle offre anti-oïdium, black-rot et rougeot parasitaire fiable, performante et souple d'emploi qui trouve naturellement sa place dans tous les programmes de lutte des viticulteurs.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les équipes d'expérimentation de Bayer CropScience France qui ont permis, à travers les essais conduits et les résultats apportés, l'homologation de cette nouvelle spécialité.

BIBLIOGRAPHIE

Commission des essais biologiques 1993 n°22 – MÉTHODE D'ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ AU CHAMP DES FONGICIDES DESTINÉS À LA LUTTE CONTRE L'OÏDIUM DE LA VIGNE, *Uncinula necator* (Schw.) Burr.

Commission des essais biologiques 1999 n°53 – MÉTHODE D'ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ PRATIQUE DE FONGICIDES DESTINÉS À LA LUTTE CONTRE LE BLACK-ROT DE LA VIGNE, *GUIGNARDIA BIDWELLII*, ELL.

Commission des essais biologiques 2001 n°108 – MÉTHODE D'ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ PRATIQUE DE FONGICIDES DESTINÉS À LA LUTTE CONTRE LE ROUGEOT PARASITAIRE (BRENNER) (*PSEUDOPEZIZA TRACHEIPHILA*, MÜLLER-THURGAU)

**AFPP – 9^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

PHF0707 : UN NOUVEAU FONGICIDE POLYVALENT EN CULTURES LÉGUMIÈRES

S. ROUMANILLE (1), INTERLOCUTEUR BCS (2)

(1) Philagro France - Parc d'affaires de Crécy – 2 rue Claude Chappe - 69771 St Didier Au
Mt D'Or

(2) Bayer CropScience - 16 r Jean-Marie Leclair - 69009 LYON

RESUME

PHF 0707 est un fongicide présenté en granulés dispersables contenant 50% de tébuconazole et 25% de trifloxystrobine. La trifloxystrobine appartient à la famille chimique des strobilurines, groupe des QoI. Le tébuconazole appartient au groupe chimique des triazoles, une des familles d'IBS de classe 1. Ces deux substances actives, aux modes d'action différents et complémentaires, confèrent au produit un large spectre d'activité fongicide. PHF 0707 est notamment efficace sur de nombreuses maladies du feuillage de l'asperge, de la carotte, du chou, de l'endive, du melon et du poireau.

Outre sa polyvalence, PHF 0707 est un nouveau fongicide qui élargit la gamme des solutions existantes. Il constitue ainsi une alternative aux fongicides couramment utilisés.

PHF 0707 est un fongicide issu de la recherche de BAYER CropScience, qui est développé et sera distribué en France en cultures légumières par PHILAGRO.

Mots-clés : PHF0707, cultures légumières, asperge, carotte, chou, endive, melon, poireau, maladies du feuillage, tébuconazole, trifloxystrobine, fongicide

SUMMARY

PHF 0707 is a WG formulation which contains 50% of tebuconazole and 25% of trifloxystrobine. Trifloxystrobine belongs to the strobilurine chemical family, QoI group. Tebuconazole belongs to the triazole chemical group, among the SBIs. These two active substances have different and complementary mode of action. This characteristic provides a wide fungicide activity spectrum to the product. PHF 0707 is effective against several foliar diseases and on several crops such as: asparagus, cabbage, carrot, melon, leek, Witloof chicory

Beyond its multi crop and multi disease profile, PHF 0707 is a new fungicide which completes existing solutions. It is an opportunity to alternate with other commonly used fungicides.

PHF 0707 is a fungicide from BAYER CropScience research. It is developed and marketed in France on vegetables by PHILAGRO.

Key words: PHF0707, vegetables, asparagus, cabbage, carrot, melon, leek, Witloof chicory, foliar diseases, tebuconazole, trifloxystrobine, fungicide

INTRODUCTION

En maraîchage comme dans de nombreux domaines de l'agriculture, le maintien de l'efficacité des programmes de traitement passe par le renouvellement des produits disponibles. Cette arrivée de nouvelles solutions dans les programmes de traitements contribue à limiter les risques de baisse de sensibilité des champignons pathogènes suite à l'application répétée d'un faible nombre de substances actives.

PHF 0707 est une solution alternative à base de tébuconazole et de trifloxystrobine pour des cultures maraîchères dont certaines sont mineures. Cette association nouvelle de deux substances actives complémentaires lutte efficacement contre plusieurs maladies du feuillage des cultures d'asperge, de carotte, de chou, d'endive, de poireau et de melon.

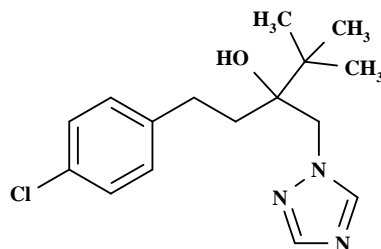
Répondant à une attente des producteurs, PHF 0707 s'intègre dans les programmes de traitement pour le maintien du bon état sanitaire des feuilles.

Issu de la recherche BAYER CropScience, ce nouveau fongicide polyvalent est développé et sera commercialisé par PHILAGRO sur les cultures maraîchères concernées.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

PHF 0707 est l'association d'une triazole, le tébuconazole et d'une strobilurine, la trifloxystrobine. PHF 0707 est une formulation WG (granulés dispersables dans l'eau).

| | |
|------------------------|---|
| Nom commun : | tébuconazole |
| Nom chimique (IUPAC) : | (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)- pentan-3-ol |
| N°CAS : | 107534-96-3 |
| Classe chimique : | triazole |



Formule moléculaire développée :

Formule brute : C₁₆H₂₂ClN₃O

Masse moléculaire : 307.8 g/mol

Solubilité dans l'eau (20°C) 38 mg/L à pH 5.3
36 mg/L à pH 7.2 et 9.4

Tension de vapeur (25°C) 3.1 × 10⁻⁶ Pa

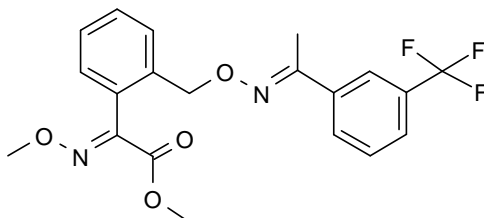
Mobilité dans le sol K_{oc} = 128.4 - 1249 mL/g, moy 769 mL/g

Nom commun : trifloxystrobine
Nom chimique (IUPAC) : Methyl (E)-methoxyimino-((E)-a-[1-a-(a,a,a-trifluoro-mtoly) ethylideneaminoxy]-o-tolyl)acetate

N° CAS : 141517-21-7

Classe chimique : strobilurine

Formule moléculaire développée :



Formule brute : C₂₀H₁₉F₃N₂O₄

Masse moléculaire : 408.4

Solubilité dans l'eau (25°C) 0.61 mg / l

Tension de vapeur (25°C) 3.4 · 10⁻⁶ Pa

Mobilité dans le sol Koc = 1642-3745 (6 sols) moy 2377

CARACTERISTIQUES TOXICOLOGIQUES

| PHF 0707 (produit formulé) | | |
|-----------------------------------|----------------------|--|
| Toxicité aiguë sur les mammifères | Propriétés | Classification (selon directive CEE/99/45) |
| Toxicité orale aiguë, rat : | DL50 > 5000 mg/kg pc | Non requise |
| Toxicité cutanée aiguë, rat : | DL50 > 2000 mg/kg pc | Non requise |
| Irritation cutanée, lapin : | Non irritant | Non requise |
| Irritation oculaire, lapin : | légèrement irritant | Non requise |
| Sensibilisation cutanée, cobaye : | Non sensibilisant | Non requise |

FORMULATION

PHF 0707 est une formulation de type granulés dispersables (WG) contenant 500 g/kg de tébuconazole et 250 g/kg de trifloxystrobine.

PROPRIETES BIOLOGIQUES

Le tébuconazole appartient au groupe chimique des triazoles, une des familles d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires de classe 1 (IBS). Les triazoles agissent en inhibant l'étape de C14-déméthylation de la biosynthèse des stérols des membranes. Cette inhibition conduit à une forte accumulation de stérols précurseurs contenant encore le groupement méthyle en C14 comme le 24-méthylène dihydrolanestérol ou obtusifoliol. Ces précurseurs sont introduits dans les membranes cellulaires des champignons à la place de l'ergostérol, ce qui entraîne des modifications de la fluidité et des perturbations des fonctions

membranaires vitales pour la cellule et provoque en définitive l'inhibition de la croissance des mycéliums. Par cette action, le tébuconazole est un fongicide DMI (DeMethylation Inhibitor).

Le tébuconazole bénéficie de propriétés systémiques originales :

- pénétration rapide dans les feuilles et migration lente à l'intérieur de la plante traitée,
- haut niveau d'efficacité sur de nombreuses maladies,

Ces propriétés procurent à la substance un large spectre d'activité ainsi qu'une grande résistance au lessivage.

La trifloxystrobine est une substance active inscrite à l'annexe I de la directive 91/414 en 2003 et qui avait fait l'objet d'une première présentation lors de la Conférence de Brighton en 1998. La trifloxystrobine est un dérivé synthétique des strobilurines naturelles présentes chez plusieurs genres de champignons (notamment chez *Strobilurus tenacellus*). Elle appartient à la famille chimique des strobilurines, groupe des QoI (Quinone outside inhibitors) et au groupe chimique des oximinoacétates. La trifloxystrobine est active sur un grand nombre de champignons de la famille des Ascomycètes, des Deutéromycètes, des Basidiomycètes et des Oomycètes.

La trifloxystrobine inhibe fortement la germination des spores, le développement du tube germinatif et la formation de l'appressorium à la surface de la plante, empêchant ainsi l'infection. Elle agit donc essentiellement de manière préventive et sera par conséquent utilisée avant ou en début d'apparition des pathogènes.

La trifloxystrobine, grâce à sa forte affinité pour la cuticule cireuse, possède une grande résistance au lessivage, ce qui lui procure également une bonne persistance d'action.

La trifloxystrobine n'est pas volatile, mais la fraction libre peut se redistribuer très localement dans le couvert végétal par voie gazeuse, et contribuer ainsi à protéger des organes ou parties d'organes non traités.

MATERIELS ET METHODES

PHF 0707 a été expérimenté en France depuis 2004. Les essais ont été conduits selon les méthodes CEB adaptées aux maladies.

| Maladie | Culture | N°méthode CEB | Dose (kg/ha) |
|------------------------------------|---------|---------------|--------------|
| Rouille | Asperge | 139 | 0,4 |
| <i>Stemphylium vesicarium</i> | | | |
| Alternariose | Carotte | 199 | 0,4 |
| Alternariose | Chou | 211 | 0,4 |
| <i>Mycosphaerella brassicicola</i> | | | |
| Alternariose | Endive | MG02 | 0,4 |
| Oïdium | | | |
| Rouille | | | |
| Oïdium | Melon | 98 | 0,3 |
| Alternariose | Poireau | MG02 | 0,4 |
| Rouille | | | |

| | Asperge | Carotte | Chou | Endive |
|-------------------------|--|------------------------|--|-----------------------------------|
| | Rouille <i>Stemphylium vesicarium</i> | Alternariose | Alternariose <i>Mycosphaerella brassicicola</i> | Alternariose Oïdium Rouille |
| Dispositif expérimental | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs |
| Disposition des témoins | inclus randomisés | inclus randomisés | inclus randomisés | imbriqués |
| Dimension des parcelles | 20 m ² | 10 à 25 m ² | 20 à 40 m ² | 14 à 32 m ² |

| | Melon | Poireau |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | Oïdium | Alternariose Rouille |
| Dispositif expérimental | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs |
| Disposition des témoins | inclus randomisés | inclus randomisés |
| Dimension des parcelles | 9 à 10 m ² | 15 à 20 m ² |

| | Asperge | Carotte | Chou | Endive |
|----------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| | Rouille <i>Stemphylium vesicarium</i> | Alternariose | Alternariose <i>Mycosphaerella brassicicola</i> | Alternariose Oïdium Rouille |
| Variables observées | Intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque |
| Taille échantillon | 25 plantes | 30 à 50 feuilles | 20 plantes | Feuilles ou plantes |
| Epoque d'observation | 14 et 21 jours | 7, 14, 21 jours après application | 21, 30 et 45 jours après application | 14 et 28 jours après application |
| Type d'observation | Estimation | Mesure et estimation | Mesure et estimation | Classement, mesure et estimation |

| | Melon | Poireau |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Oïdium | Alternariose Rouille |
| Variables observées | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque |
| Taille échantillon | 50 feuilles | 25 à 50 feuilles |
| Epoque d'observation | 7, 14, 21 jours après application | 7, 14, 21 jours après application |
| Type d'observation | Mesure et estimation | Mesure et estimation |

RESULTATS ET DISCUSSION

PHF 0707 est un produit polyvalent applicable sur une culture pour lutter contre plusieurs maladies du feuillage. Par exemple, sur endive, PHF 0707 s'applique contre l'alternariose (*Alternaria cichorii*), l'oïdium (*Erysiphe cichoracearum*) et la rouille (*Puccinia cichorii*). Une notation sur le pourcentage d'attaque est présentée dans le tableau I :

Les plantes ont été réparties par classe selon l'échelle suivante :

- Classe 0 : absence de symptômes visibles
- Classe 1 : traces
- Classe 2 : limbe atteint à moins de 10% de sa surface
- Classe 3 : limbe atteint sur 10 à 20% de sa surface
- Classe 4 : limbe atteint sur 20 à 50% de sa surface
- Classe 5 : limbe atteint sur plus de 50% de sa surface

Tableau I : Pourcentage d'attaque par classe de l'alternariose, l'oïdium et la rouille
Incidence of *Alternaria*, powdery mildew and rust per classes

| Maladie | Nombre d'essais | Date d'observation | Traitement | Dose (kg ou l/ha) | Classes | | | | | |
|--------------|-----------------|--------------------|---------------|-------------------|---------|---|-----------|------|------|-------------|
| | | | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Alternariose | 1 | 26 DAC | <i>Témoin</i> | | | | 0 | 0 | 32,5 | 67,5 |
| | | | PHF 0707 | 0,4 | | | 15 | 50 | 35 | 0 |
| | | | Réf. CEB | 0,5 | | | 15 | 48,8 | 38,8 | 0 |
| | | | Réf. marché | 1 | | | 30 | 50 | 20 | 0 |

| Maladie | Nombre d'essais | Date d'observation | Traitement | Dose (kg ou l/ha) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------|-----------------|--------------------|---------------|-------------------|---|---|-------------|------|-------------|------|
| Oïdium | 1 | 26 DAC | <i>Témoin</i> | | | | 0 | 10 | 52,5 | 37,5 |
| | | | PHF 0707 | 0,4 | | | 63,8 | 36,3 | 0 | 0 |
| | | | Réf. CEB | 0,5 | | | 56,3 | 38,8 | 5 | 0 |
| | | | Réf. marché | 1 | | | 73,8 | 26,3 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | |
|---------|---|-----------|---------------|-----|-------------|------|------|-----|------------|------|
| Rouille | 5 | 14-26 DAC | <i>Témoin</i> | | 0,9 | 16,9 | 31,3 | 1,6 | 23 | 26,4 |
| | | | PHF 0707 | 0,4 | 77,1 | 16,5 | 5 | 1 | 0,4 | 0 |
| | | | Réf. CEB | 0,5 | 62,1 | 19,3 | 12,3 | 5,4 | 1 | 0 |
| | | | Réf. marché | 1 | 90,2 | 9,8 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Avec 15 % de feuilles ou plantes de classe 2, PHF 0707 est aussi performant que la référence CEB et supérieur à la référence « marché » contre l'alternariose. Lorsque l'on traite contre l'oïdium et la rouille, PHF 0707 affiche un niveau de performance intermédiaire (63,8 % de classe 2 et 77,1 % de classe 0), entre la référence CEB et la référence « marché ».

Contre ces trois maladies foliaires de l'endive, PHF 0707 permet une nette diminution du nombre de feuilles atteintes et affiche un haut niveau de performance. Ainsi, il propose des efficacités au niveau de celles des références testées et constitue une alternative à ces produits.

D'autre part, PHF 0707 illustre aussi sa polyvalence en étant efficace contre des maladies identifiées sous la même dénomination sur des cultures différentes. Par exemple, PHF 0707 est utilisable pour combattre l'alternariose de la carotte, du chou, de l'endive et du poireau. Une notation d'efficacité sur la fréquence et l'intensité d'attaque sont présentées dans les tableaux II et III :

Tableau II : Efficacité contre l'alternariose de la carotte, du chou, de l'endive et du poireau sur la fréquence d'attaque

Efficacy on incidence of Alternaria on carrot, cabbage, Witloof and leek crops

| | | % d'efficacité sur la fréquence d'attaque | | | |
|-----------------|-------------------|---|---|------|-------------------------|
| Culture | | Carotte | Chou | | Poireau |
| Maladie | | <i>Alternaria dauci</i> | <i>A. brassicola</i> et <i>A. brassicae</i> | | <i>Alternaria porri</i> |
| Nombre d'essais | | 3 | 3 | | 1 |
| Date de lecture | | 7-14 DAE | 21 DAA | | 11 DAD |
| Traitement | Dose (kg ou l/ha) | | | | |
| <i>Témoin</i> | | 87,4 | | 53,9 | 24 |
| PHF 0707 | 0,4 | 38,1 | a | 74 | a |
| Réf. CEB 1 | 2 | 50,8 | a | | |
| Réf. marché 1 | 1 | 56,9 | a | | |
| Réf. marché 2 | 2 | | | | 52,1 |
| Réf. CEB 2 | 0,5 | | | 79,6 | a |

Témoin exprimé en nombre de feuilles atteintes

Dans des conditions d'infestation importante (87,4 % de feuilles atteintes), l'efficacité du PHF 0707 n'est pas significativement différente de celle des références testées contre l'alternariose de la carotte. Pour lutter contre l'alternariose sur chou, PHF 0707 se révèle efficace et équivalent à la référence CEB 2. Et avec 97,9 % d'efficacité, PHF 0707 est supérieur à la référence « marché 2 » contre l'alternariose du poireau.

Pour chacune des maladies où le nombre d'essais était suffisant pour une analyse statistique, PHF 0707 est équivalent aux autres préparations testées.

Sur la fréquence d'attaque de l'alternariose sur carotte, chou et poireau, PHF 0707 est équivalent ou supérieur aux références.

Tableau II : Efficacité contre l'alternariose de la carotte, du chou, de l'endive et du poireau sur l'intensité d'attaque
 Efficacy on severity of Alternaria on carrot, cabbage, Witloof chicory and leek crops

| Culture | % d'efficacité sur l'intensité d'attaque | | |
|-----------------|--|----------------------------|-------------------------|
| | Carotte | Endive | Poireau |
| Maladie | <i>Alternaria dauci</i> | <i>Alternaria cichorii</i> | <i>Alternaria porri</i> |
| Nombre d'essais | 2 | 1 | 1 |
| Date de lecture | 14-21 DAE | 17 DAB | 11 DAD |
| Traitement | Dose (kg ou l/ha) | | |
| <i>Témoin</i> | 71,1 | 57 | 1,3 |
| PHF 0707 | 0,4 | 65,8 a | 42,5 |
| Réf. CEB 1 | 2 | | |
| Réf. marché 1 | 1 | 56,6 a | 37,7 |
| Réf. marché 2 | 2 | | 33,2 |
| Réf. CEB 2 | 0,5 | | 24,6 |
| Réf. marché 3 | 0,8 | 46,1 a | |

Témoin exprimé en pourcentage de surface foliaire atteinte

Sur l'intensité d'attaque de l'alternariose de la carotte, PHF 0707 affiche une efficacité supérieure aux références testées. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les préparations. Contre l'alternariose de l'endive, PHF 0707 se trouve ici plus efficace que les références CEB 2 et « marché 1 ». Sur poireau, le bon état sanitaire des feuilles est un critère de commercialisation. Le niveau d'exigence est donc très haut. Contre l'alternariose de cette culture, PHF 0707 est supérieur à la référence testée.

PHF 0707 propose une efficacité au niveau de celles des références, voire supérieure sur l'intensité d'attaque de l'alternariose sur carotte, endive et poireau.

Sur carotte, chou, endive et poireau, PHF 0707 lutte efficacement contre l'alternariose.

COMMENTAIRES

Ces exemples sur plusieurs maladies foliaires de l'endive et plusieurs cultures atteintes par l'alternariose illustrent les performances de PHF 0707. De la même façon, cette préparation est efficace sur d'autres maladies telles que la rouille et l'oïdium ainsi que d'autres cultures. Le tableau III indique les usages concernés :

Tableau III : Usages revendiqués avec PHF 0707
Requested uses for PHF 0707

| Culture | Maladies | Dose |
|----------------|--|-------------|
| Asperge | Rouille, <i>Stemphylium vesicarium</i> | 0,4 kg/ha |
| Carotte | Alternariose | 0,4 kg/ha |
| Chou | Alternariose, <i>Mycosphaerella brassicicola</i> | 0,4 kg/ha |
| Endive | Alternariose | 0,4 kg/ha |
| | Oïdium | |
| | Rouille | |
| Melon | Oïdium | 0,3 kg/ha |
| Poireau | Alternariose | 0,4 kg/ha |
| | Rouille | |

CONCLUSION

PHF 0707 est un nouveau fongicide polyvalent pour les cultures d'asperge, de carotte, de chou, d'endive, de poireau et de melon. Avec des performances du niveau de celles des préparations disponibles sur ces cultures, il est notamment efficace contre l'alternariose, l'oïdium et la rouille ainsi que d'autres maladies touchant ces cultures.

Il s'inscrit comme un moyen de lutte efficace contre le risque de dérive de sensibilité des champignons pathogènes notamment dans le cadre de programmes de traitements.

PHF 0707 est une solution nouvelle et alternative à base de tébuconazole et de trifloxystrobine.

**AFPP – 9^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

PHF 0708 : UN NOUVEAU FONGICIDE ANTI-MILDIU EN CULTURES LÉGUMIÈRES

S. ROUMANILLE (1), INTERLOCUTEUR BCS (2)

(1) Philagro France - Parc d'affaires de Crécy – 2 rue Claude Chappe - 69771 St Didier Au Mt D'Or

(2) Bayer CropScience - 16 rue Jean-Marie Leclair - 69009 LYON

RESUME

PHF 0708 est une suspension concentrée composée de 62,5 g/l de fluopicolide et de 625 g/l de propamocarbe hydrochloride. Le fluopicolide appartient à une nouvelle famille chimique, les acylpicolides, et possède un mode d'action original, sans résistance croisée connue avec les autres fongicides actifs sur les oomycètes. Le propamocarbe hydrochloride est un fongicide systémique à action multisite appartenant à la famille des carbamates. Au niveau biochimique, le propamocarbe hydrochloride agit sur différents stades de la synthèse des phospho-lipides et des acides gras, perturbant ainsi la formation de la membrane cellulaire des champignons.

PHF 0708 montre une efficacité de haut niveau contre les mildious du chou, de l'épinard, de la laitue, de l'oignon, du melon, du poireau et de la tomate. Ce fongicide sera développé dans les programmes de protection contre les mildious, tout au long de la saison, avec pour objectif d'en renforcer l'efficacité globale.

PHF 0708 est un fongicide issu de la recherche de BAYER CropScience, qui est développé et sera distribué en France en cultures légumières par PHILAGRO.

Mots-clés : PHF0708, fongicide, fluopicolide, propamocarbe hydrochloride, cultures légumières, chou, épinard, laitue, oignon, melon, poireau, tomate, mildiou

SUMMARY

PHF 0708 is a SC formulation which contains 62.5 g/l of fluopicolid and 625 g/l of propamocarbe-HCL. Fluopicolid belongs to a novel chemical family: acylpicolids which provides a new mode of action without any known cross resistance with other fungicides active against oomycetes. Propamocarbe-HCL is a systemic fungicide with a multisite action and belongs to the carbamates chemical family. From biochemical point of view, propamocarbe-HCL has an effect on different stages of phospho-lipids and fat acids synthesis: fungi cell membrane formation is perturbed.

PHF 0708 has a high efficacy level against downy mildew of cabbage, spinach, lettuce, onion, melon, leek and tomato. This fungicide will be part of protection programs against downy mildew along the season in order to increase the overall program efficacy.

PHF 0708 is a fungicide from BAYER CropScience research. It is developed and marketed in France on vegetables by PHILAGRO.

Key words: PHF0708, fungicide, fluopicolide, propamocarbe, vegetables, cabbage, spinach, lettuce, onion, melon, leek, tomato, downy mildew

INTRODUCTION

En maraîchage comme dans de nombreux domaines de l'agriculture, le maintien de l'efficacité des programmes de traitement passe par le renouvellement des produits disponibles. Cette arrivée de nouvelles solutions dans les programmes de traitements contribue à limiter les risques de baisse de sensibilité des champignons pathogènes suite à l'application répétée d'un faible nombre de substances actives.

PHF 0708 est une solution alternative à base de fluopicolide et de propamocarbe pour certaines cultures maraîchères. Cette association complémentaire inclut une nouvelle substance active, le fluopicolide et lutte efficacement contre le mildiou des cultures de chou, d'épinard, de laitue, d'oignon, de melon, de poireau et de tomate.

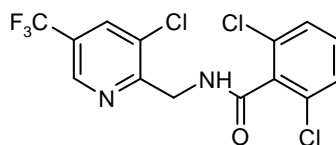
Répondant à une attente des producteurs, PHF 0708 s'intègre dans les programmes de traitement pour le maintien du bon état sanitaire des feuilles.

Issu de la recherche BAYER CropScience, ce nouveau fongicide polyvalent est développé et sera distribué par PHILAGRO sur les cultures maraîchères concernées.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

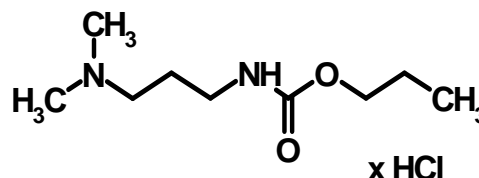
PHF 0708 est l'association d'une acylpicolide, le fluopicolide et d'un carbamate, le propamocarbe-HCL. PHF 0708 est une formulation SC (Suspension concentrée).

| | |
|----------------------|--|
| Nom commun | Fluopicolide |
| Nom chimique (UIPAC) | (2,6-dichloro-N-[[3-chloro-5-(trifluorométhyl)-2-pyridinyl]méthyl]benzamide CA : benzamide, 2,6-dichloro-N-[[3-chloro-5-(trifluorométhyl)-2-pyridinyl]méthyl] |
| Nom chimique (CAS) | Benzamide, 2,6-dichloro-N-[[3-chloro-5-(trifluoro-méthyl)-2-pyridinyl]méthyl] |
| N°CAS | 3239110-15-7 |
| N°CEE | Non attribué |
| N°CIPAC | Non attribué |
| N°ELINCS | Non attribué |
| Formule empirique | C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O ₅ |
| Formule structurale | |



| | |
|-------------------|--------------|
| Masse moléculaire | 383,59 g/mol |
|-------------------|--------------|

| | |
|----------------------|--|
| Nom commun | Propamocarbe Hcl |
| Nom chimique (UIPAC) | Propyl 3-(diméthylamino) propylcarbamate hydrochloride |
| Nom chimique (CAS) | Propyl [3-(diméthylamino)propyl]carbamate hydrochloride |
| N°CAS | 25606-41-1 |
| N°CEE | 245-125 |
| N°CIPAC | 399 |
| Formule empirique | C ₉ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ |
| Formule structurale | |



| | |
|-------------------|-------------|
| Masse moléculaire | 224,7 g/mol |
|-------------------|-------------|

CARACTERISTIQUES TOXICOLOGIQUES

| PHF 0708 (produit formulé) | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Toxicité sur les mammifères | Propriétés | Classification proposée |
| Toxicité orale aiguë, rat : | DL50> 2500 mg/kg | - |
| Toxicité cutanée aiguë, rat : | DL50> 4000 mg/kg | - |
| Toxicité inhalation aiguë, rat : | CL50> 3,195 mg/m ³ | - |
| Irritation cutanée, lapin : | Non irritant | - |
| Irritation oculaire, lapin : | Non irritant | - |
| Sensibilisation cutanée, cobaye : | Non sensibilisant | |
| méthode Buehler 9 applications | Sensibilisant | R43 |
| méthode LLNA | | |

FORMULATION

PHF 0708 est une formulation de type suspension concentrée (SC) contenant 62,5 g/l de fluopicolide + 625 g/l de propamocarbe-Hcl.

PROPRIETES BIOLOGIQUES

Le fluopicolide appartient à une nouvelle classe chimique, les acylpicolides, et possède un mode d'action original, sans résistance croisée connue avec les autres fongicides actifs sur les oomycètes. Il est efficace à de faibles doses contre un large spectre de champignons appartenant à la famille des Oomycètes, comme les mildious (*Plasmopora*, *Pseudoperonospora*, *Peronospora*, *Bremia*, *Phytophthora*), et contre certains *Pythium*. Son mode d'action biologique est caractérisé par un haut niveau de protection et de persistance. De plus, il fait preuve d'une activité anti-sporulante et de propriétés curatives. Le fluopicolide est distribué dans la plante pas le xylème (système ascendante) et s'avère donc efficace en protection foliaire, ainsi qu'en traitement du sol et des semences.

Le fluopicolide agit sur différents stades du cycle biologique des champignons. Il agit sévèrement sur la libération des zoospores en conditions froides, et inhibe fortement leur mobilité. De plus, le fluopicolide affecte notamment la germination des zoospores (ils gonflent et sont lysés rapidement sous l'action du traitement). Il agit donc sur la sporulation et inhibe la croissance mycélienne.

Le propamocarbe hydrochloride (aussi appelé propamocarbe-HCL dans ce document) est un fongicide systémique à action multisite appartenant à la famille des carbamates. Il est utilisé en traitement foliaire contre les mildioux, les espèces appartenant aux genres *Phytophthora* et *Pythium*, sur un large spectre de cultures (grandes cultures, cultures ornementales et légumières). Lorsqu'il est appliqué en traitement foliaire, le propamocarbe hydrochloride est distribué à l'intérieur des feuilles. Moins d'une heure après l'application, le produit est disponible en quantité suffisante dans la plante afin de la protéger. Ce produit dispose donc d'une bonne résistance au lessivage.

Au niveau biochimique, le propamocarbe hydrochloride agit sur différents stades de la synthèse des phospho-lipides et des acides gras, perturbant ainsi la formation de la membrane cellulaire des champignons. Au niveau cellulaire, le propamocarbe affecte la croissance mycélienne, la production de spores, ainsi que la germination des spores.

MATERIELS ET METHODES

PHF 0708 a été expérimenté en France depuis 2002. Les essais ont été conduits selon les méthodes CEB adaptées aux maladies.

| Culture | Maladie | N° méthode CEB | Dose (l/ha) |
|---------|---------|----------------|-------------|
| Chou | Mildiou | M197 | 1,6 |
| Epinard | | | |
| Laitue | | | |
| Melon | | | |
| Oignon | | | |
| Poireau | | | |
| Tomate | | | |

| | Chou | Epinard | Laitue | Melon |
|-------------------------|---|-------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Peronospora parasitica</i> | <i>Peronospora spiniacées</i> | <i>Bremia lactucae</i> | <i>Pseudoperonospora cubensis</i> |
| Dispositif expérimental | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs |
| Disposition des témoins | imbriqués : plein champ inclus : pépinière | imbriqués | imbriqués | exclus |
| Dimension des parcelles | 21 m ² ou 500 plants | 17,5 m ² | 6 à 10 m ² | 6 à 8 m ² |

| | | | |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Oignon | Poireau | Tomate |
| | <i>Peronospora destructor</i> | <i>Phytophthora porri</i> | <i>Phytophthora infestans</i> |
| Dispositif expérimental | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs | Fisher à 4 blocs |
| Disposition des témoins | imbriqués | imbriqués | exclus |
| Dimension des parcelles | 10 à 30 m ² | 10 à 26 m ² | 5 à 21 m ² |

| | | | | |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Chou | Epinard | Laitue | Melon |
| | <i>Peronospora parasitica</i> | <i>Peronospora spiniacées</i> | <i>Bremia lactucae</i> | <i>Pseudoperonospora cubensis</i> |
| Variables observées | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque |
| Taille échantillon | 25 à 50 plantes | 25 plantes | 20 plantes | 50 feuilles |
| Epoque d'observation | 7, 14, 21 jours après application | 7, 14, 21 jours après application | 7, 14, 21 jours après application | 7, 14, 21 jours après application |
| Type d'observation | Mesure et estimation | Mesure et estimation | Mesure et estimation | Mesure et estimation |

| | | | |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Oignon | Poireau | Tomate |
| | <i>Peronospora destructor</i> | <i>Phytophthora porri</i> | <i>Phytophthora infestans</i> |
| Variables observées | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque | Fréquence et intensité d'attaque |
| Taille échantillon | 50 feuilles | 50 feuilles | 50 feuilles |
| Epoque d'observation | 7, 14, 21 jours après application | 7, 14, 21 jours après application | 7, 14, 21 jours après application |
| Type d'observation | Mesure et estimation | Mesure et estimation | Mesure et estimation |

RESULTATS ET DISCUSSION

PHF 0707 est un anti-mildiou applicable sur cultures de chou, d'épinard, de laitue, de melon, d'oignon, de poireau et de tomate. Les tableaux I, II et III illustrent les efficacités de PHF 0708 et des préparations de référence. Les cultures ont été regroupées selon les références utilisées et / ou leur dose d'utilisation.

Tableau I : Efficacité sur fréquence et intensité d'attaque du mildiou du chou et de l'épinard
 Efficacy on incidence and severity against downy mildew on cabbage and spinach

| | Culture | Chou | | | | Epinard | | | |
|---------------|-------------------|------|---|------|---|---------|---|------|---|
| | Observation | F | I | F | I | F | I | F | I |
| | Nombre d'essais | 3 | | | | 2 | | | |
| Traitement | Dose (kg ou l/ha) | | | | | | | | |
| <i>Témoin</i> | | 62,3 | | 55,5 | | 98,7 | | 4 | |
| PHF 0708 | 1,6 | 89,5 | a | 84,2 | a | 68,5 | a | 88,9 | a |
| Réf. CEB 1 | 3 | 76,8 | a | 71,8 | a | | | | |
| Réf. marché 1 | 2,1 | 89,8 | a | 78,9 | a | | | | |
| Réf. marché 2 | 0,25 | | | | | 54,3 | a | 80,4 | a |
| Réf. marché 3 | 1,5 | | | | | 27,5 | b | 67,2 | a |

* : fréquence d'attaque (F), intensité d'attaque (I)

Sur chou, PHF 0708 présente une efficacité supérieure à celle de la référence CEB 1 et est aussi efficace que la référence « marché 1 ». Ces observations sont valables à la fois pour l'efficacité sur la fréquence et l'intensité d'attaque. Les différences entre les préparations ne sont pas significatives.

Sur épinard, PHF 0708 présente les meilleures efficacités parmi les produits testés. Sur le nombre de plantes atteintes, PHF 0708 n'est pas significativement différent de la référence « marché 2 » et est significativement supérieure à la référence « marché 3 ». Sur le pourcentage de surface atteinte, PHF 0708 n'est pas significativement différent des références mais présente une meilleure performance.

Sur cette culture, PHF 0708 protège un plus grand nombre de feuilles que les références.

Tableau II : Efficacité sur fréquence et intensité d'attaque du mildiou de la laitue et du melon
Efficacy on incidence and severity against downy mildew on lettuce and melon

| | Culture | Laitue | | Melon | | | |
|---------------|-------------------|--------|---|-------|----|------|---|
| | Observation | F | | F | | I | |
| | Nombre d'essais | 3 | | 3 | | 4 | |
| Traitement | Dose (kg ou l/ha) | | | | | | |
| <i>Témoin</i> | | 99,7 | | 96,3 | | 69,2 | |
| PHF 0708 | 1,6 | 75,4 | a | 66,3 | ab | 98,7 | a |
| Réf. CEB 2 | 2 | 38,9 | a | | | | |
| Réf. marché 4 | 2,5 ou 3,5 | 81,2 | a | 73,2 | a | 98,2 | a |
| Réf. CEB 3 | 0,8 | | | 39,7 | b | 87,8 | b |

* : fréquence d'attaque (F), intensité d'attaque (I)

Dans des conditions de forte infestation sur laitue, PHF 0708 présente une efficacité intermédiaire aux deux références.

Sur melon, PHF 0708 procure 66,3 % d'efficacité sur la fréquence d'attaque. Sur ce critère, PHF 0708 fournit une performance intermédiaire aux deux autres préparations testées. Concernant l'intensité d'attaque, PHF 0708 est aussi performant que la référence « marché 4 » et significativement supérieur à la référence CEB 3.

Tableau III : Efficacité sur fréquence et intensité d'attaque du mildiou de l'oignon, du poireau et de la tomate
Efficacy on incidence and severity against downy mildew on onion, leek and tomato

| | Culture | Oignon | | | | Poireau | | | | Tomate | | | |
|---------------|-------------------|--------|---|------|---|---------|---|------|---|--------|---|------|---|
| | Observation | F | | I | | F | | I | | F | | I | |
| | Nombre d'essais | 3 | | | | 1 | | | | 2 | | 4 | |
| Traitement | Dose (kg ou l/ha) | | | | | | | | | | | | |
| <i>Témoin</i> | | 74,2 | | 24,9 | | 37 | | 22 | | 100 | | 68,7 | |
| PHF 0708 | 1,6 | 34,5 | a | 64,3 | a | 74,0 | a | 92,9 | a | 49,3 | a | 56,6 | a |
| Réf. CEB 4 | 2,1 | 31,9 | a | 66,1 | a | 49,3 | a | 87,3 | a | 18,5 | a | 45,8 | a |
| Réf. marché 5 | 2,5 | | | | | | | | | 40,5 | a | 48,0 | a |
| Réf. marché 6 | 1 | 23,7 | a | 57,9 | a | 67,1 | a | 90,7 | a | | | | |

* : fréquence d'attaque (F), intensité d'attaque (I)

PHF 0708 possède une bonne action contre le mildiou de l'oignon. Sur les deux critères observés, PHF 0708 fournit une efficacité égale ou supérieure à celle de la référence CEB 4 et la référence « marché 6 ». Cependant, les différences ne sont pas significatives.

Sur poireau, PHF 0708 est plus efficace que la référence CEB 4 et la référence « marché 6 ». Sur la fréquence et l'intensité d'attaque, les différences entre les trois préparations ne sont pas significatives.

En conditions de forte infestation de mildiou de la tomate, PHF 0708 fournit 49,3 % et 56,6 % d'efficacité. Ces indicateurs de performance sont plus élevés que pour la référence CEB 4 et la référence « marché 5 » mais les différences ne sont pas significatives.

COMMENTAIRES

En se référant aux deux principaux critères d'évaluation des fongicides : le nombre d'individus atteint par la maladie (fréquence d'attaque) et le pourcentage de surface atteinte par la maladie (intensité d'attaque), PHF 0708 fait preuve de performances techniques équivalentes à supérieures à celles des fongicides de référence contre les mildious du chou, de l'épinard, de la laitue, de l'oignon, du melon, du poireau et de la tomate.

CONCLUSION

PHF 0708 est un nouveau fongicide anti-mildiou pour les cultures de chou, de laitue, d'oignon, de melon, de poireau et de tomate. Avec des performances équivalentes à supérieures à celles des préparations disponibles sur ces cultures, il permet un bon maintien de l'état sanitaire des feuilles.

Il s'inscrit comme un moyen de lutte efficace contre le risque de dérive de sensibilité des champignons pathogènes notamment dans le cadre des programmes de traitements.

PHF 0708 constitue une alternative à base d'une nouvelle substance active : le fluopicolide associée au propamocarbe hydrochloride.

**AFPP – 9^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

NC 224, NOUVEAU FONGICIDE ANTI-MILDIU DE LA POMME DE TERRE

P. ARMENGAUD (1), Y. BESNARD (1)

(1) Philagro France-Parc d'affaires de Crecy – 2 rue Claude Chappe
69771 St Didier Au Mt D'Or

RESUME

NC 224, nouveau fongicide anti-mildiou de la pomme de terre. NC 224 est une suspension concentrée à 200 g/L d'amisulbrom. L'amisulbrom est une nouvelle substance active de la famille des sulfonamides.

Son activité s'exerce principalement sur les champignons oomycètes responsables de nombreuses maladies dont le mildiou de la pomme de terre. Elle perturbe l'émission, la mobilité et la germination des zoospores, ainsi que la germination et la formation des sporanges. NC 224 est préconisé pour lutter contre *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou de la pomme de terre.

NC 224 agit préventivement sur feuilles et sur tiges et assure une bonne protection des tubercules s'il est utilisé dans la seconde moitié du cycle de la culture. Il montre une bonne persistance d'action et une bonne résistance au lessivage. Il est parfaitement sélectif des cultures et présente un profil toxicologique et écotoxicologique favorable.

NC 224 peut être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 7 jours entre applications.

Ce nouveau fongicide issu de la recherche de Nissan Chemical Industries sera commercialisé par PHILAGRO France.

INTRODUCTION

Le mildiou (*Phytophthora infestans*) est la maladie la plus dommageable sur pomme de terre. Elle peut se développer très rapidement sur la culture et provoquer des pertes de rendement de l'ordre de 40 à 60%, voire une destruction totale dans certains cas. Sa nuisibilité oblige les producteurs à une surveillance constante et à une lutte particulièrement exigeante, dont la réussite conditionne fortement la rentabilité économique de l'exploitation, comme pendant les années 2007 et 2008.

L'amisulbrom, une nouvelle substance active fongicide, est issue de la recherche de Nissan Chemical Industries. Découverte en 1999, elle s'est révélée très active contre les champignons oomycètes responsables de très nombreux mildioux. Elle a été largement développée dès 2002 dans de nombreux pays, seule ou au travers d'associations avec d'autres fongicides. Cette communication résume les principales caractéristiques de la molécule et quelques informations sur ses performances biologiques contre le mildiou de la pomme de terre.

PROPRIETES BIOLOGIQUES

Spectre d'activité

L'activité de l'amisulbrom est très ciblée sur les oomycètes

| Pathogène | CI ₉₀ (ppm) |
|------------------------|------------------------|
| Phytophthora infestans | 0.1 – 1.0 |
| Botrytis cinerea | > 100 |
| Rhizoctonia solani | > 100 |
| Septoria nodorum | > 100 |
| Alternaria solani | > 100 |

Tableau 1 : Spectre in vitro de l'amisulbrom (inhibition de la croissance mycélienne)

MODE D'ACTION

Mode d'action biochimique

Amisulbrom inhibe la respiration mitochondriale du champignon à 1 µM, il est spécifique de la respiration mitochondriale des oomycètes. Il agit par inhibition de la respiration mitochondriale en intervenant sur le transport d'électrons au niveau du complexe III. Amisulbrom appartient à la famille des Qil : il se fixe sur la face interne du cytochrome B.

Selon le groupe de surveillance de la résistance aux fongicides (FRAC), l'amisulbrom correspond à un mode d'action de type 21 avec pour code du site d'action « C. respiration, avec le code C4 : complex III of fungal respiration : cytochrome b1 (ubiquinone reductase) at Qi site » et appartient aux fongicides Qil (Quinone inside inhibitors). Ces fongicides inhibent la respiration et la production d'énergie au niveau du site Qi. Ce sont des fongicides à site d'action unique. Ils présentent une systémie limitée.

Des tests de grande ampleur dans les pays de l'Europe du Nord (France, Royaume-Uni, Pays-Bas) sur *P. infestans* n'ont pas mis en évidence de développement de résistance ni de résistance croisée du NC-224 à ce jour.

Mode d'action biologique

L'activité de l'amisulbrom est particulièrement marquée sur les champignons oomycètes car elle s'exprime en différents points du cycle du parasite :

- émission des zoospores
- mobilité des zoospores
- germination des sporanges et zoospores
- formation des sporanges

On observe également une très nette diminution du nombre et de la viabilité des oospores de *Phytophthora infestans* après une exposition à l'amisulbrom.

| CI50 (µg/ml) | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Traitement | Emission des zoospores | Mobilité des zoospores | Germination des zoosporanges | Formation des zoosporanges | Germination des cystospores | Croissance mycélienne |
| amisulbrom | 0.1 | - 0.1 | - 0.1 | 0.01 - 0.1 | - 0.1 | 0.1 - 1 |
| diméthomorphe | >10 | >10 | 0.1 - 1 | NT | NT | 0.1 - 1 |
| fluazinam | 1 - 10 | 0.1 - 1 | - 0.1 | NT | 0.1 - 1 | 10 - 100 |
| cymoxanil | 1 - 10 | 0.1 - 1 | 0.01 - 0.1 | NT | NT | 0.1 - 1 |

NT : non testé

Tableau 2 : Activité de l'amisulbrom sur le cycle de *Phytophthora infestans*

FORMULATION

Substance active

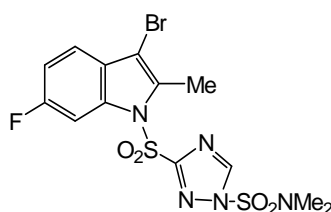
Nom commun : amisulbrom (proposé à l'ISO)

N°CAS : 348635-87-0

Nom chimique (IUPAC) : 3-(3-bromo-6-fluoro-2-méthylindol-1-yl)sulfonyl-N,N-diméthyl-1,2,4-triazole-1-sulfonamide

Classe chimique : sulfonamide

Formule moléculaire développée :



Formule brute :



Formulation

NC-224 est une suspension concentrée à 200 g/L d'amisulbrom. La dose d'homologation demandée est de 0,5 L/ha, soit 100 grammes de substance active par hectare. NC-224 est préconisé pour lutter contre *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou de la pomme de terre. Il peut être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 7 jours entre applications.

Classement toxicologique proposé :

N Dangereux pour l'environnement

R50/53 : Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

Efficacité biologique ?

RESULTATS EN SERRE

Méthodologies mises en œuvre

Les études de laboratoire (in vitro) sont basées sur l'observation de la croissance mycélienne du pathogène sur un milieu d'Agar imprégné de substance active.

Les propriétés préventives, curatives ou de résistance au lessivage, ont été mises en évidence sur plantes en pots sous serre, par application de différentes concentrations d'amisulbrom et inoculation artificielle à des périodes précises. L'activité des fongicides a été caractérisée par des valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀ ou CI₉₀) ou par un

pourcentage de réduction de l'intensité des lésions provoquées sur les feuilles par les pathogènes par rapport à un témoin sans fongicide.

| Jours après inoculation | 5j | 10j | 15j | 21j |
|-------------------------|--------|-------|-------|-------|
| amisulbrom – 50ppm | 90-100 | 70-90 | 70-90 | 70-90 |
| fluazinam – 250 ppm | 70-90 | 70-90 | < 70 | < 70 |
| mancozèbe – 1500 ppm | 70-90 | 70-90 | < 70 | < 70 |

Tableau 3 : Persistance d'action de l'amisulbrom sur pomme de terre – *Phytophthora infestans* sur plantes en pots inoculées 5 à 21 jours après traitement - % efficacité

RESULTATS EN ESSAIS DE PLEIN CHAMP

Ces études ont été réalisées selon les recommandations des méthodes CEB (mildiou de la pomme de terre ou mildiou de la vigne). Le dispositif est en général celui de Fisher à 4 répétitions, avec des parcelles moyennes de 4m². Les observations ont porté sur l'intensité et la fréquence de la maladie; un pourcentage d'efficacité est calculé par rapport au témoin non traité.

Parmi tous les contrôles effectués sur feuilles, le contrôle le plus fréquemment discriminant a été sélectionné ; le contrôle 15 jours après la dernière application, qui permet d'évaluer la persistance des produits.

Selon les essais les références commerciales diffèrent. Les deux types d'essai seront donc présentés séparément. Les essais sont généralement contaminés et brumisés. Contre le mildiou de la pomme de terre, en situation de contamination artificielle, les fongicides ont été appliqués à une cadence de 7 jours durant toute la période d'essai.

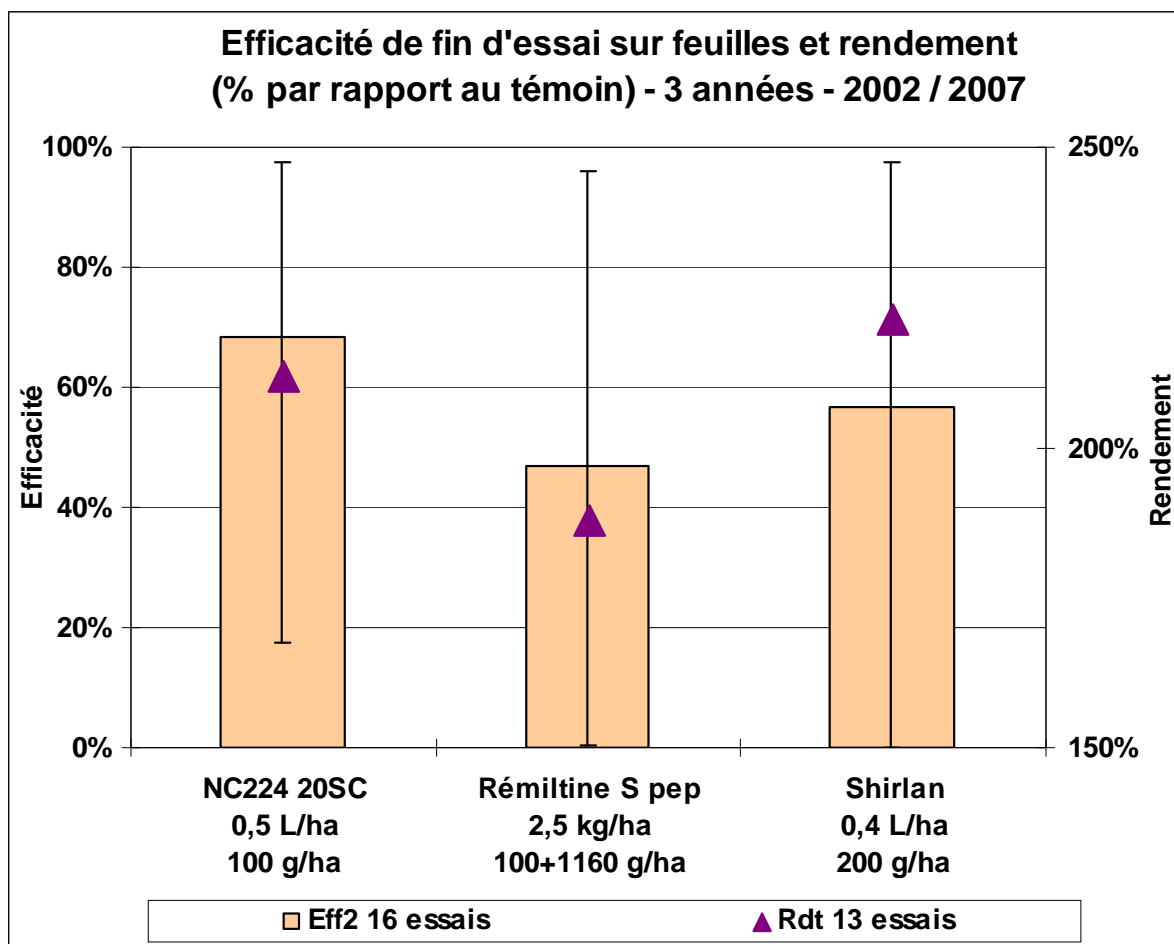
Efficacité sur feuilles et rendement

Récapitulatif pluriannuel (3 années 2002, 2005, 2007)

| Facteurs | en g s.a | % efficacité 2 ^{ème} observation | | | Rendement % relatif / témoin | | |
|-----------------------|----------|---|-----|-----|------------------------------|-----|-----|
| | | 16 essais | min | max | 13 essais | min | max |
| NC224 (amisulbrom) | 100 | 68,4 a | 17 | 97 | 211,9 a | 91 | 422 |
| Cymoxanil + mancozèbe | 100+1160 | 47,10 b | 0 | 96 | 187,8 a | 103 | 242 |
| Fluazinam | 200 | 56,6 ab | 0 | 97 | 221,3 a | 105 | 429 |

Tableau 4 : Efficacité sur feuilles et rendement à la récolte - série 2002-2007 – contamination naturelle ou artificielle - intensité (% attaque) sur témoin: 83 à 100 %

NC-224 montre de nouveau qu'il a un meilleur niveau de protection contre le mildiou que la référence CEB. Comparé au fluazinam, il se trouve au même niveau lors de la 1^{ère} observation mais par contre il assure une meilleure persistance (2^{ème} observation), statistiquement différente. En rendement, NC-224 et fluazinam sont comparables. Ces résultats sont illustrés sur le graphique suivant :

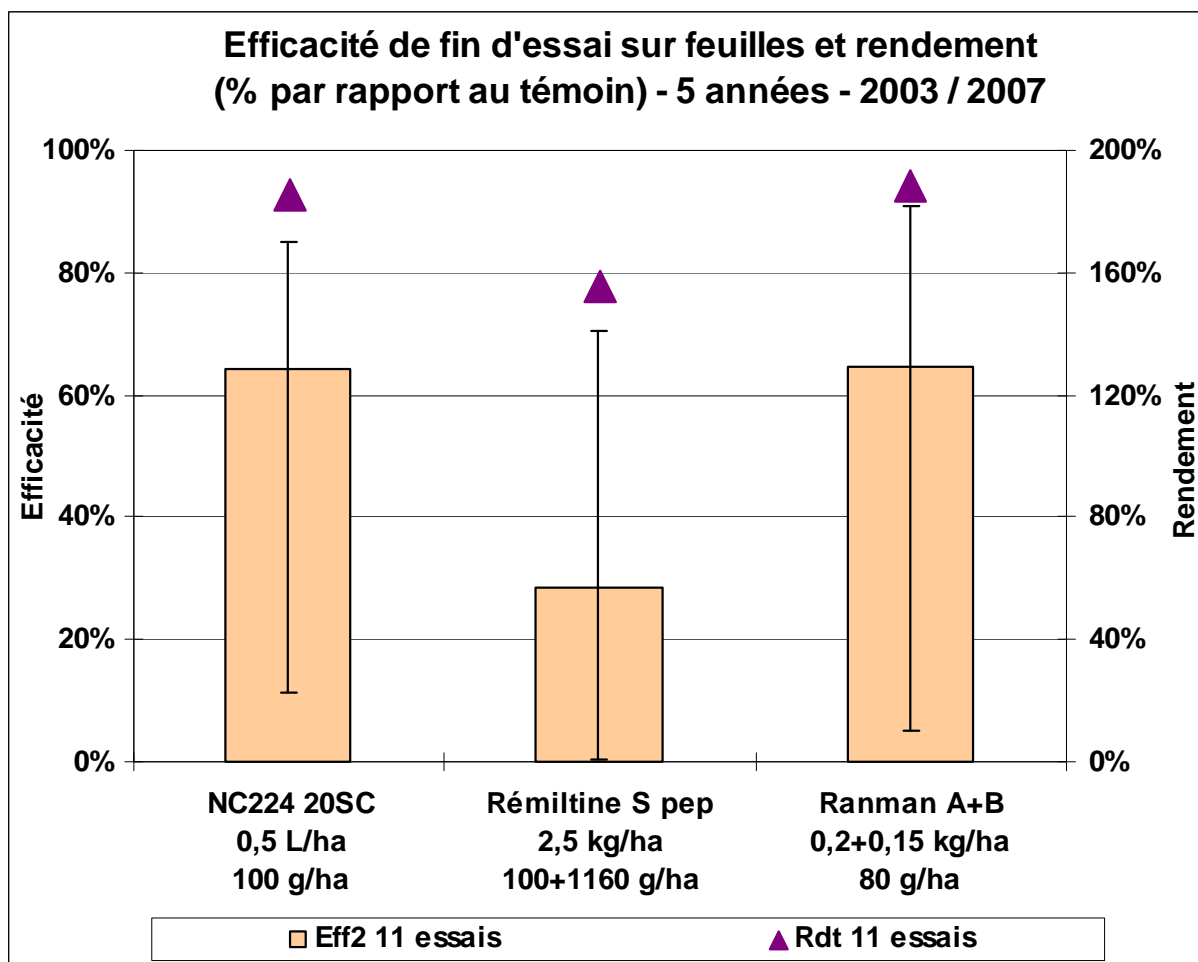


Récapitulatif pluriannuel (5 années)

| Facteurs | en g s.a. /ha | % efficacité 2 ^{ème} observation | | | Rendement % relatif / témoin | | |
|--------------------------|----------------|---|-----|-----|------------------------------|-----|-----|
| | | 11 essais | min | max | 11 essais | min | max |
| NC224 (amisulbrom) | 100 | 64,2 a | 11 | 85 | 185,2 a | 108 | 303 |
| Cymoxanil + mancozèbe | 100 + 1160 | 28,3 b | 0 | 71 | 155,2 a | 87 | 279 |
| Cyazofamide + surfactant | 80 + 0,15 l/ha | 64,7 a | 5 | 91 | 188,2 a | 81 | 413 |

Tableau 5 : Efficacité sur feuilles et rendement à la récolte - série 2003-2007 – contamination artificielle - intensité (% attaque) sur témoin : 37 à 100 %

NC-224 se montre statistiquement différent de la référence et donne des résultats équivalents à cyazofamide + surfactant en efficacité sur feuilles et en rendement. Ces résultats sont illustrés sur le graphique suivant



Efficacité en programme

Programmes testés - 2004

Deux modalités sont testées : NC-224 à 100 g/ha et la référence CEB (cymoxanil + mancozèbe) à la dose de 100 + 1160 g/ha sont comparés l'un à l'autre à raison de 4 applications consécutives et sont inclus dans un programme standard de 10 traitements. Le détail des programmes est donné dans le tableau suivant :

| Produit | en g s.a. /ha | Code application |
|--------------------------|---------------|------------------|
| Mancozèbe | 1575 g | AB |
| Dimétomorphe + mancozèbe | 180 + 1200 | CD |
| Amisulbrom | 100 | EFGH |
| ou cymoxanil + mancozèbe | ou 100 + 1160 | EFGH |
| Fluazinam | 200 | IJ |

Tableau 6 : protocole des programmes testés en 2004

Effacité sur feuilles - 2004

| | | Essai 1 | Essai 2 | Essai 3 | Moyenne |
|-------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Délai après T | | J+2 | H+4 | J+4 | |
| Intensité sur témoin (%) | | 95,3 | 100 | 98,8 | |
| Facteurs | g ma/ha | | | | |
| Programme à 4 x NC224 | 100 | 97,9 c | 97,1 b | 72,2 a | 89,0 a |
| Programme à 4 x référence CEB | 100+1160 | 48,8 b | 82,0 a | 70,9 a | 67,2 a |

Tableau 7 : Effacité de l'amisulbrom en programme, résultat sur feuilles à complète destruction du témoin (% d'efficacité / témoin)

Les analyses de variance effectuées sur le regroupement d'essai n'ont pas révélé de différence significative entre les modalités. Dans deux essais sur trois, le programme à base de NC224 donne des résultats statistiquement différents de celui incluant la référence CEB. La référence CEB décroche en fin de campagne.

Programmes testés - 2005

Deux modalités sont testés : 3 applications consécutives de NC-224 et la référence CEB (cymoxanil + mancozèbe) à la dose de 100 + 1160 g/ha sont comparés l'un à l'autre incluses dans un programme standard de 10 traitements à la cadence de 7 jours. Le détail des programmes figure dans le tableau ci-dessous :

| Produit | en g s.a. /ha | Code application |
|--------------------------|---------------|------------------|
| Mancozèbe | 1575 g | ABCD |
| Amisulbrom | 100 | EFG |
| ou cymoxanil + mancozèbe | ou 100 + 1160 | EFG |
| Fluazinam | 0.4 | HIJ |

Tableau 8 : protocole des programmes testés en 2005

Effacité sur feuilles - 2005

| | | | Essai 1 | Essai 2 | Essai 3 | Moyenne |
|-----------------------------------|------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Délai après T | | | T9+4 | T9+5 | T9+6 | |
| Intensité sur témoin (%) | | | 100 | 99,5 | 37,3 | |
| Dose | L ou kg/ha | g ma/ha | | | | |
| Progr.à 3 x NC224 | 0,5 | 100 | 83,0 a | 92,0 c | 75,1 a | 83,4 a |
| Progr.à 3 x cymoxanil + mancozèbe | 2,5 | 100+1160 | 85,2 a | 43,5 a | 71,3 a | 66,7 a |

Tableau 9 : Effacité de l'amisulbrom en programme, résultat sur feuilles à complète destruction du témoin (% d'efficacité / témoin)

| | | | Essai 1 | Essai 2 | Essai 3 | Moyenne |
|-----------------------------------|------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Délai après T | | | T10+7 | T10+30 | T10+12 | |
| Intensité sur témoin (%) | | | 100 | 99,5 | 96,3 | |
| Dose | L ou kg/ha | g ma/ha | | | | |
| Progr.à 3 x NC224 | 0,5 | 100 | 64,5 a | 68,7 c | 64,1 a | 65,8 a |
| Progr.à 3 x cymoxanil + mancozèbe | 2,5 | 100+1160 | 67,5 a | 1,0 a | 53,3 a | 40,6 a |

Tableau 10 : Effacité de l'amisulbrom en programme, résultat sur feuilles 15 jours après dernière application (% d'efficacité / témoin)

Les analyses de variance effectuées sur le regroupement d'essai n'ont pas révélé de différence significative entre les modalités. Dans l'essai 2, NC-224 est significativement différent de la référence CEB lors des deux observations. La référence CEB se trouve d'ailleurs en grande difficulté en fin de campagne.

Protection des tubercules

Protection des tubercules - 2003

Protection des tubercules après stockage (% de tubercules atteints par rapport au poids total)

| Témoin (% du poids) | | 4,0 | 5,0 | 46,0 |
|--------------------------|-------------------|---------|---------|---------|
| Facteurs | en g s.a. /ha | Essai 1 | Essai 2 | Essai 3 |
| NC224 (amisulbrom) | 80 | 1,7 | 2,9 | 1,2 |
| NC224 (amisulbrom) | 100 | 1,6 | 1,7 | 0,4 |
| Fluazinam | 200 | 2,4 | 1,2 | 0,4 |
| Cyazofamide + surfactant | 80 + 0,15 l/ha | 1,6 | 2,2 | 0,5 |

Tableau 11 : essai de protection des tubercules à la récolte vis-à-vis des références fluazinam et cyazofamide+surfactant (année 2003)

Au moment de la récolte, les essais 1 et 2 ne présentent pas de différence de taux de contamination des tubercules entre le témoin et les modalités traitées. Les produits montrent par contre leur efficacité sur la protection des tubercules en conservation. NC-224 assure une protection équivalente aux références fluazinam et cyazofamide.

Dans l'essai 3, toutes les modalités présentent de très bons résultats de protection des tubercules à la récolte et après stockage.

NC-224 semble montrer un effet dose entre 80 et 100 g/ha.

Protection des tubercules - 2004

Le taux de contamination des tubercules est exprimé en nombre de tubercules atteints par tonne.

Protection des tubercules à la récolte

| Témoin | | Récolte T/ha | Tub. atteints Nb/tonne | Tub. atteints % eff / Témoin |
|--------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------------|
| Témoin | | 33,2 b | 307,6 b | |
| Facteurs | en g s.a. /ha | | | |
| NC224 (amisulbrom) | 60 | 64,3 a | 38,7 a | 87,4 |
| NC224 (amisulbrom) | 100 | 64,0 a | 42,7 a | 86,1 |
| Cymoxanil + mancozèbe | 100 + 1160 | 55,2 a | 25,5 a | 91,7 |
| Cyazofamide + surfactant | 80 + 0,15 l/ha | 58,3 a | 52,2 a | 83,0 |

Tableau 12 : essai de protection des tubercules à la récolte vis-à-vis des références cymoxanil+mancozèbe et cyazofamide+surfactant (année 2004)

Il y a une différence significative au niveau des tubercules atteints entre le témoin et les modalités traitées. Par contre toutes les modalités sont statistiquement équivalentes : NC-224 fournit un niveau de protection des tubercules équivalent à cymoxanil + mancozèbe et à cyazofamide + surfactant.

Protection des tubercules à la récolte - 2005

La protection des tubercules a été étudiée sur 2 essais en 2005. Les résultats de ces deux essais sont présentés séparément.

| | | Récolte T/ha 39,7 a | Tub. atteints % poids 1,2 a |
|--------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Facteurs | | Témoin | |
| | | en g s.a. /ha | |
| NC224 (amisulbrom) | 60 | 48,3 a | 0,9 a |
| NC224 (amisulbrom) | 100 | 44,6 a | 1,2 a |
| Cymoxanil + mancozèbe | 100 + 1160 | 59,2 a | 2,8 a |
| Cyazofamide + surfactant | 80 + 0,15 l/ha | 40,5 a | 1,6 a |

Tableau 13 : essai de protection des tubercules à la récolte vis-à-vis des références cymoxanil+mancozèbe et cyazofamide+surfactant (année 2005)

Il n'y a pas de différence significative au niveau des tubercules atteints entre le témoin et les modalités traitées. Mais les résultats obtenus en témoin sont biaisés du fait du manque de récolte : un nombre important de tubercules contaminés a disparu sans pouvoir être comptabilisé.

Résistance au lessivage

Test 1 :

Deux heures après application, une pluie de 40 mm/h a été simulée pendant 1 heure ou pendant 3 heures. L'inoculation a été effectuée le lendemain.

| g ma/ha | | % efficacité | | |
|--------------------------|------|--------------|------------|-----------|
| | | Sans pluie | 40 mm | 120 mm |
| Non traité (% intensité) | | 100 | 96 | 83 |
| NC-224 (amisulbrom) | 100 | 90,6 - bc | 94,2 - abc | 91,3 - bc |
| Mancozèbe | 2250 | 94,4 - bc | 89,2 - bc | 75,5 - d |
| Cyazofamide | 80 | 93,8 - abc | 95,6 - ab | 91,8 - bc |

Tableau 14 : essai de résistance au lessivage de l'amisulbrom – Japon – source Nissan (2005)

Les produits se différencient pour la chute de pluie la plus importante, 120 mm : le mancozèbe montre sa faiblesse au niveau de la résistance au lessivage alors que NC-224 et cyazofamide présentent encore d'excellentes efficacités.

Test 2 :

La pluie a été simulée à raison de 10 mm/h pendant 1 heure selon 4 délais entre l'application et la pluie : 1, 2, 3 ou 6 heures. 24 heures après la pluie, des feuilles sont prélevées et inoculées en laboratoire, et conservées en boîtes de Pétri afin de permettre le développement du mildiou.

| g ma/ha | | % intensité (témoin : 24,7%) | | | |
|-------------|--------|------------------------------|------------|------------|-----------|
| | | 1h | 2h | 3h | 6h |
| NC-224 20SC | 80 | 15,2 – ab | 17,1 – ab | 2,65 – def | 0,4 - ef |
| NC-224 20SC | 100 | 17,9 – ab | 10,4 – a-d | 3,51 – def | 1,7 - def |
| Cyazofamide | 80+150 | 14 abc | 13,9 – abc | 15 – ab | 0,26 - ef |
| fluaziname | 150 | 1,66 - def | | | |

Tableau 15 : essai de résistance au lessivage de l'amisulbrom – Japon – source Nissan (2005)

Fluazinam est résistant au lessivage dès 1 heure après application. Pour NC-224 à 80 et 100 g/ha un délai de 3 heures est nécessaire entre l'application et la pluie pour arriver au niveau de fluazinam, alors que pour cyazofamide il faut attendre 6 heures

Les résultats de ces études montrent que NC-224 se situe au niveau de cyazofamide, connu pour ses propriétés de résistance au lessivage.

CONCLUSION

L'amisulbrom se présente comme une solution nouvelle pour la lutte contre les oomycètes, dont le mildiou de la pomme de terre. Ses principaux atouts sont une excellente efficacité préventive et une forte persistance d'action consolidées par sa bonne résistance au lessivage. Ce profil intéressant est confirmé par les bons résultats observés dans les essais au champ. Contre le mildiou de la pomme de terre, la dose de 100 g m.a./ha permet en effet une parfaite protection des cultures sur une longue durée ainsi que celle des tubercules au stockage.

Doté d'un mode d'action différent de celui de la plupart des fongicides, il peut s'intégrer dans les programmes de lutte les plus performants contre le mildiou de la pomme de terre.

Ces caractéristiques alliées à un profil toxicologique et écotoxicologique favorable ouvrent à l'amisulbrom une place de choix dans les futurs programmes de lutte anti-mildiou de la pomme de terre.

BIBLIOGRAPHIE

R. Hugues, N.Hasunuma : AFPP – 8^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes - Tours - 5 et 6 décembre 2006 - Amisulbrom : nouveau fongicide contre les oomycètes.

Nishioka M.,Hasunuma N., 2004-NC224, a novel fungicide- Effect on life cycle of *P. infestans* and biochemical mode of action.

Nishioka M.,Hasunuma N., 2005. Rainfastness of NC224 20SC and NC226 WG against *P. infestans* in potato.

FRAC : http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_CODE_LIST.pdf

P. Haudrechy: Amisulbrom (NC224) – Biological data summary for Table 2 (Provisionnal rating) at 11th Euroblight Workshop – Nissan Chemical Industries, Ltd. March 21, 2008.

**THE DEVELOPMENT OF SEED TREATMENT PRODUCTS BASED ON THE NEW
FUNGICIDE IPCONAZOLE**

M.-J.TOMKINS¹, T.ARCHER, S.-J.MAUDE AND K.LITTLEWOOD

Chemtura Europe Ltd, Evesham, UK.

¹ malcolm.tomkins@chemtura.com

RESUMÉ

Ipconazole est un nouveau fongicide à large spectre appartenant au groupe des fongicides à base de triazole SBI. Il est actif contre les champignons pathogènes dans les grands groupes de Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et Deuteromycètes, et est actif en tant que traitement des semences contre majeur des pathogènes rencontrer sur grain et dans le sol. Ipconazole 15 ME a été développé sur des petites céréales en Europe, et les résultats présentés illustrent son activité élevée contre le charbon nu (*Ustilago nuda*) dans l'orge, la carie du blé (*Tilletia caries*) dans le blé, la rayure des feuilles (*Pyrenophora graminea*) dans l'orge et la fonte des semis (*Fusarium spp / Microdochium nivale*) dans le blé. Ipconazole 15 ME démontre également un très haut niveau de sélectivité des cultures.

Mots-clés : ipconazole, traitement de semences, cereales, sélectivité, maladie tranmise par les semences.

SUMMARY

Ipconazole is a new broad spectrum fungicide belonging to the triazole group of SBI fungicides. It has activity against pathogenic fungi in the major groups of Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes and Deuteromycetes, and is active as a seed treatment against major seed-borne and early soil-borne pathogens. Ipconazole 15 ME has been developed on small grain cereals in Europe. It is highly active against loose smut (*Ustilago nuda*) in barley, bunt (*Tilletia caries*) in wheat, leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in barley and seedling blights (*Fusarium spp/Microdochium nivale*) in wheat. Ipconazole 15 ME also demonstrates a very high level of crop selectivity.

Key words: ipconazole, seed treatment, cereal, seed-borne disease, selectivity

INTRODUCTION

Seed treatment continues to increase in importance as a first step in sustainable crop protection in global agriculture. Whilst this market is in many ways driven by the use of insecticides, there is also a need for the development of new and effective fungicides to partner the seed treatment insecticides on a wide range of crops. It is against this background that the fungicide ipconazole was discovered and developed. Ipconazole was first patented by Kureha Chemical Corporation, and the seed treatment uses have since been licensed for global development to Chemtura Corporation. It is one of the more recent additions to the triazole group of fungicides, with an SBI demethylation (DMI) mode of action at the cytochrome P450 site. Ipconazole controls target pathogens by both protectant and curative activity as it is both a contact and systemic fungicide. It has a broad spectrum of activity relative to some earlier triazoles and controls fungal pathogens in all classes except Oomycetes. Ipconazole is very selective, being safe to seed of both monocot and dicot crops. The selectivity and efficacy profiles of ipconazole fit it for use as a seed treatment on a wide range of crops; it is already registered in Japan, Latin America and USA, and has recently received provisional or full approval in several European countries, with the UK being the RMS for the EU.

This paper describes the development of the 15 ME (microemulsion) formulation of ipconazole on wheat and barley in Europe and illustrates its activity against the major seed-borne pathogens of wheat and barley.

METHODS AND MATERIALS

Ipconazole (1RS,2SR,5RS;1RS,2SR,5SR)-2-(4-chlorobenzyl)-5-isopropyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-5-ylmethyl) cyclopentanol (IUPAC) was discovered and developed as a rice and wheat seed treatment in Japan by Kureha Chemical Corporation (Tateishi et al, 1998). Chemtura Corporation have since undertaken extensive formulation evaluation work in USA and Europe, culminating in the development of a range of stable commercial products, one of which is ipconazole 15g/l ME (microemulsion). This product is being targeted at the cereal seed treatment market in Europe. The ME technology gives a very low viscosity product which can be easily and accurately delivered to seed through existing commercial treatment equipment. (CLAPPERTON & LITTLEWOOD, 2009). Ipconazole 15 ME has a favourable toxicology profile, and is not classified.

The ipconazole ME product was applied to seed using a laboratory-scale batch treater such as the Rotogard R300, mostly pre-diluted with water. In most of the trials described, the rate of use was the label rate: 100ml/100kg on wheat (delivering 1.5g a.s.) and 133ml/100kg on barley (delivering 2g a.s.). Commercial seed treatment formulations of standard fungicides were applied in the same equipment for use as references in the trials.

Efficacy evaluations were done in small plot field trials, mostly with a plot size of 1.4-2 x 6-12 m and 4 replications, using seed infected with the relevant pathogen. All carried natural infections except for common bunt, where spores of *Tilletia caries* were mixed with the wheat seed (2g/kg seed) prior to chemical treatment. Control of soil-borne common bunt was assessed in trials where the plots were inoculated with a spore/sand mix prior to sowing the wheat seed. Efficacy against *Fusarium* spp and *M. nivale* was assessed soon after emergence (crop stage BBCH 12-13) by counting numbers of emerged plants per square meter to give a measure of seedling blight damage. Loose smut symptoms were assessed in barley by counting infected ears at BBCH 60-69. Bunt symptoms were assessed by sampling mature ears of wheat (BBCH 73-92) and counting the number of healthy and infected ears to calculate the percent infection.

Selectivity and seed safety was evaluated in field trials and in laboratory tests using healthy seed. Speed of emergence was assessed visually at BBCH 10, and then final plant emergence was assessed by counting seedlings in pairs of 0.5 or 1.0m row lengths at 5

locations per plot at BBCH 12-13. Laboratory tests were conducted according to ISTA Rules in rolled paper towels, with germination being assessed after 4 and 7 days incubation at 20°C with an 8h photoperiod. This period was preceded by a pre-chill incubation at 5°C to break dormancy in winter cereals.

RESULTS

Control of bunt of wheat

a) Seed-borne bunt

Trials were conducted over several seasons in Europe against soil-borne bunt, and data from six trials in the UK are shown in Table I. Ipconazole 15 ME at the UK label rate gave 99.9-100% control and was comparable to the prothioconazole standards, and this robust level of control has been repeated across the EU.

Table I –Efficacité d'ipconazole sur le carie transmisé par la semence.
Control of seed-borne bunt by seed treatment with ipconazole

| Treatment | Rate g a.s. per 100kg | E06/ 13-3 | EC06- SAC | XAC 1475 | E06/ 33-1 | E06/ 33-2 | E06/ 33-3 |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Untreated infection | % - | 17.6 | 12.4 | 16.8 | 3.3 | 10.1 | 16.7 |
| Ipconazole | 1.5 | 99.9 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99.6 |
| Prothioconazole | 10 | 99.0 | 100 | 100 | - | - | - |
| Prothioconazole + fluoxastrobin | 5.625/ 5.625 | - | - | - | 100 | 99.4 | 100 |

b) Soil-borne bunt

Infection from soil-borne spores of common bunt can be relatively important in dry autumns in France and the eastern part of the UK, and a summary of five trials carried out with ipconazole in these countries in 2005 and 2006 is given in table II. Infection was very successful, with symptom expression ranging from 13.3 to 61%. Ipconazole at 2g a.s. per 100kg seed gave excellent control of this disease: control ranged from 99.4 to 100%, and was equivalent to prothioconazole and fludioxonil/difenoconazole standards and more effective in one trial than tebuconazole/triazoxide/imidacloprid.

Table II: Efficacité d'ipconazole sur le carie transmisé par le sol.
Control of soil-borne bunt by seed treatment with ipconazole

| Treatment | Rate g a.s. per 100kg | UK 06/1 | UK 06/2 | France 05/1 | France 05/2 | France 05/3 |
|------------------------|--------------------------------|------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| Untreated infection | % - | 26.6 | 15.2 | 61.0 | 49.7 | 13.3 |
| Ipconazole | 2 | 99.4 | 99.9 | 99.7 | 99.8 | 100 |
| Prothioconazole | 10 | 99.2 | 99.5 | - | - | - |
| Product A | 5/5/50 | - | - | 100 | 100 | - |
| Product B | 3/2/70 | - | - | - | - | 88.6 |

Product A = Fludioxonil + difenoconazole + anthraquinone

Product B = Tebuconazole + triazoxide + imidacloprid

c) Control of seedling blight of wheat

The effect of *Fusarium* spp and *M. nivale* on wheat plants and suppression of attack by seed treatments is a complex subject. The trials reported here are limited to the effects of seed-borne inocula on seedling emergence, and to the improvement in that emergence by the use of seed treatments.

Trials were conducted in the UK in 2006, 2007 and 2008 with a range of seed stocks infected with either pure *M. nivale* or a mixed infection of several species of *Fusarium* plus *M. nivale* as shown in Table III. Ipconazole at 1.5g gave good improvements in numbers of emerged plants, but its effect was less uniform than that of the best standard carboxin/thiram. There is some evidence that the activity of ipconazole is stronger against seed-borne *Fusarium* spp than against *M. nivale*, and this is borne out by the use of ipconazole on maize where its activity against *F. moniliforme* is very good.

Table III: Efficacité sur *M.nivale/Fusarium roseum*. Plantes levées (m/rang)
Field plot emergence counts (plants per m row) for *Fusarium*
infected (*M. nivale* and *Fusarium* spp) winter wheat

| Treatment | Rate g a.s. per 100kg | E06/ 05 -3R | E07/ 15 -2H | E07/ 25 -2R | E08/ 27-2 | E08/ 28-2 |
|---|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| % seed infection: <i>M. nivale</i> | - | 39 | 25 | 21.5 | 31 | 76 |
| % seed infection: <i>Fusarium</i> spp | - | 0 | 65.1 | 70.5 | 24 | 0 |
| Untreated | - | 8.8 | 7.6 | 6.8 | 9.5 | 2.6 |
| Ipconazole | 1.5 | 14.9 | 11.1 | 9.5 | 13.8 | 8.1 |
| Carboxin/thiram | 60/60 | 19.6 | - | - | 15.6 | 10.8 |
| Prothioconazole + fluoxastrobin | 5.63/ 5.63 | - | 12.9 | 11.3 | - | - |
| LSD (P=0.05) | - | - | 1.38 | 1.48 | 1.88 | 1.88 |

d) Control of loose smut of barley

Many trials have been carried out to prove the efficacy of ipconazole against loose smut, and data from five trials from the UK and France in 2005 and 2006 are summarised in Table IV.

Table IV: Efficacité d'ipconazole sur le charbon nu de l'orge.
Control of loose smut in barley with ipconazole

| Treatment | Rate g a.s. per 100kg | E05/ 18 -3 UK | XAC 1475 UK | A10193 /CT 2 UK | AF/8396 /CT2 FR | D27 ITS BS FR |
|------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Untreated infection | - | 2.4% | 20.8/ m ² | 2.6% | 2.9% | 8.5% |
| Ipconazole | 2 | 100 | 99.8 | 98.6 | 100 | 100 |
| Tebuconazole | 3 | 100 | - | - | - | - |
| Carboxin/thiram | 60/60 | - | 93.1 | 91.6 | - | - |
| Prothioconazole | 10 | - | 97.7 | 95.8 | - | - |
| Fludioxonil | 2.5/ Tebuconazole | - | - | - | 100 | 100 |
| cyproconazole | 3/ 5/ Anthraquinone | - | - | - | - | - |
| | 50 | - | - | - | - | - |

Ipconazole at 2g a.s. per 100kg seed gave a very high and uniform level of control of this important disease, which requires systemic activity to limit the growth of mycelium from the inoculum carried inside the embryo of the seed. Ipconazole was equal to the fludioxonil/tebuconazole/cyproconazole standard and superior to prothioconazole and carboxin/thiram.

f) Seed safety and crop selectivity

These parameters are vital when considering the development of any new seed treatment, and are particularly important for a triazole fungicide as this class of chemistry can also have plant growth regulation effects on emerging seedlings, particularly under adverse field conditions.

Ipconazole 15 ME has shown excellent crop safety on a range of cultivars of winter wheat and winter barley, and evaluation of this new fungicide at the label rate and twice the label rate in many field trials with healthy as well as infected seed has not indicated any reduction in speed of emergence nor final stand. Those field trials have included late drilling in difficult seed beds, and it seems that is evident that ipconazole has good crop safety under a wide range of conditions.

The excellent selectivity of ipconazole has been confirmed in laboratory seed safety tests, and typical data from rolled paper towel tests is presented in Table V. This shows that the germination of seed treated at 2N rates and stored for up to 12 months was not adversely affected by ipconazole: the germination of untreated seed had decreased slightly over this period, as is usual, but the germination of seed treated with ipconazole is often higher than that of the untreated.

Table V: Germes normaux (%) sur blé et orge d'hiver avant et après le stockage de les semences traité. Etude en laboratoire papier, moyenne de 12 lots.

Percent of normal germination of winter wheat and barley at the final assessment in paper towel tests before and after storage of seed, mean of 12 tests

| Treatment | Wheat | | | Barley | | |
|-----------------------|-------|------|------|--------|------|------|
| | 0 | 180 | 360 | 0 | 180 | 360 |
| Storage period | days | days | days | days | days | days |
| Untreated | 95.8 | 90.4 | 89.8 | 91.2 | 85.2 | 84.0 |
| Ipconazole label rate | 96.0 | 91.4 | 93.8 | 91.2 | 84.8 | 86.8 |
| Ipconazole 2N label | 95.2 | 91.8 | 94.2 | 90.6 | 83.8 | 87.6 |

DISCUSSION

The broad spectrum, systemic fungicidal activity of ipconazole linked to its excellent seed safety which were evident in early-stage evaluations have proved to be key benefits of the products developed in Europe for cereal seed treatment.

Ipconazole 15 ME is the first in a range of products being developed by Chemtura based on ipconazole, and is being registered and introduced across Europe as Rancona®. Dose-response trials defined the use rate on wheat to be 1.5g a.s. per 100kg seed, and the data presented in this paper demonstrate the full control of seed-borne common bunt given by ipconazole 15 ME at this rate. This rate, equivalent to 100ml of formulated product per 100kg seed, has also been shown to improve crop establishment of winter wheat by giving protection against seedling blight caused by seed-borne *Fusarium spp* and *M. nivale*. The same product but at the slightly higher rate of 2g a.s. (133ml of formulated product) also gives full control of soil-borne common bunt, even at high infection levels.

The use rate of ipconazole at 2g a.s. on winter barley has given complete or almost complete control of loose smut.

The ipconazole 15 ME product has been shown to be very safe to wheat and barley seed even at high rates and after storage of treated seed, and it is very selective on crops in the field.

CONCLUSION

Ipconazole 15 ME will therefore be a valuable addition to the range of seed treatment fungicides for small grain cereals in Europe.

This will be followed by the further introductions of other solo formulations and mixtures of ipconazole with other active ingredients for seed treatment use on cereals and other crops.

Other solo ipconazole products are registered in USA, Canada and Latin America. Mixtures with co-fungicides, including metalaxyl, which expand the spectrum of ipconazole to suit crops such as maize, peanuts and soybeans, are now registered in the USA and Argentina.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank colleagues in Chemtura Europe Ltd and CRO companies for their help in providing the formulated products and generating the trials data presented in this paper.

REFERENCES

Tateishi H; Saishoji T; Suzuki T; Chida T (1998). Antifungal properties of the seed disinfectant ipconazole and its protection against "Bakanae" and other diseases of rice. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **64**, 443-450.

Clapperton R., Littlewood K.M., 2009 -The development of an ipconazole microemulsion formulation for seed treatment. British Crop Production Council Symposium Proceedings No 83.

**IMPACT D'UN ADJUVANT A BASE D'ALCOOLS TERPÉNIQUES ISSUS DU PIN
ASSOCIÉ À UNE TRIAZOLE SUR LA PRODUCTION DE FUSARIOTOXINES**

F. GIRAUD ⁽¹⁾, A. QUERRIOUX ⁽¹⁾ et M. RAMOS

⁽¹⁾ Action Pin, ZI de Cazalieu, BP30, 40260 CASTETS, FRANCE
francois.giraud@action-pin.fr

RÉSUMÉ

Le risque mycotoxines en productions céréalières est lié à de multiples facteurs agro-climatiques. Afin d'étudier l'impact potentiel des alcools terpéniques associés à une triazole, un essai en conditions contrôlées est réalisé. La triazole choisie pour modèle est le tébuconazole appliqué à 250 g/ha. Les plants de blé sont traités au stade floraison, 24 heures avant contamination artificielle avec une souche de *Fusarium graminearum* connue pour son potentiel toxigène élevé. L'adjuvant améliore l'efficacité et la régularité du tébuconazole sur le développement de *F. graminearum* au niveau des épis et des grains de blé. La quantité de DON dans les témoins est environ 8400 ppb. La triazole réduit la production de DON en moyenne de 95,7% mais avec une forte variabilité. L'ajout de l'adjuvant à 0,75 l/ha permet de réduire la production de DON de 99,6% et réduit cette variabilité.

Mots-clés : Mycotoxines, Désoxynivalénol, Fusariose, Blé, Alcools terpéniques, Triazole, Tébuconazole, Adjuvant

SUMMARY

EFFECT OF TERPENIC ALCOHOL ADJUVANT MIXED WITH TRIAZOLE FUNGICIDE ON FUSARIUM MYCOTOXINE BIOSYNTHESIS

Mycotoxin contamination of cereal crops in the field is dependant on numerous agro-climatic factors. To study the effect of terpenic alcohols mixed with a triazole, a trial is made under controlled conditions. The triazole chosen as model is tebuconazole applied at 250 g/ha. Wheat plants are treated at the flowering stage, 24 hours before artificial contamination with a strain of *Fusarium graminearum* known for its high toxinogenic potential. Fungal biomass measure shows that the adjuvant improves fungicide efficacy and regularity. In untreated plants, the DON content is around 8400 ppb. The triazole reduces DON production 95,7% (as an average) but a high variability is observed. Adjuvant added at 0,75 l/ha allows to decrease DON production to 99,6% and reduce this variability.

Key words: Mycotoxin, Deoxynivalenol, Fusarioses, Wheat, Terpenic alcohols, Triazole, Tebuconazole, Adjuvant

INTRODUCTION

Issues du métabolisme secondaire des champignons, les mycotoxines constituent une des principales préoccupations de la filière des céréales à paille. D'autant plus que leur teneur maximale dans les denrées alimentaires est déterminée au niveau européen par le règlement actuellement en vigueur, CE/1126/2007 modifiant le règlement CE/1881/2006.

La contamination peut avoir lieu en cours de stockage avec le développement de moisissures du genre *Penicillium* sp. ou *Aspergillus* sp. susceptibles de produire des ochratoxines (AFSSA 2006). Elle a lieu surtout au champ, lors d'attaque par des champignons du genre *Fusarium* sp. susceptibles de produire des fumonisines, de la zearalénone et des trichothécènes. Le désoxynivalénol (DON), surtout produit par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, est l'un des trichothécènes les plus répandus (AFSSA, 2009).

Le précédent cultural, le travail du sol et la sensibilité variétale sont les principaux facteurs de prédisposition d'une culture au risque fusariotoxines. La prise en compte de l'interaction entre ces trois facteurs permet une évaluation de ce risque. Ainsi un précédent maïs grain suivi d'un travail simplifié du sol avec implantation d'un cultivar sensible multiplie par soixante le risque désoxynivalénol dans les récoltes par rapport à un précédent colza suivi d'un labour avec implantation d'un cultivar moins sensible (Gautier *et al.*, 2006 ; Dubournet *et al.*, 2005).

Des conditions pluvieuses au stade floraison favorisent la contamination des épis par les fusarioses. Pour lutter contre le champignon et tenter de prévenir le risque mycotoxine, l'application fongicide est positionnée en début floraison. Les matières actives efficaces, sur *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, appartiennent la famille des triazoles, les plus performantes étant le tébuconazole et le prothioconazole (Dubournet *et al.*, 2005). Le niveau d'efficacité généralement obtenu, de l'ordre de 50 à 60%, est dû à la difficulté de traiter correctement les épis. La qualité de pulvérisation est déterminante pour l'efficacité. Ainsi l'emploi d'une buse double fente permet d'améliorer les performances au prix d'un volume de bouillie plus élevé et d'un risque plus élevé de dérive (Gripon et Saidi, 2004).

Pour ajouter à la difficulté, le taux de désoxynivalénol dans le grain n'est pas systématiquement corrélé avec les symptômes observés. Le potentiel toxigène diffère selon les souches. L'expression de ce potentiel par la production de mycotoxines varie selon l'agressivité des souches. L'exposition du champignon à un stress peut aussi favoriser la production de mycotoxines. (AFSSA 2009)

L'emploi d'un adjuvant à base d'alcools terpéniques issus du pin est envisageable dans le but d'améliorer son action anti-rebond et mouillante favorables à la rétention du produit à la surface de la plante et à une répartition plus homogène de la bouillie sur l'épi. L'objectif de l'étude est d'évaluer l'impact de cet adjuvant associé à une triazole sur le risque mycotoxine. L'étude a été réalisée en conditions contrôlées afin de s'affranchir des perturbations dues aux multiples facteurs intervenant en situation de plein champ.

MATERIEL ET MÉTHODE

MATERIEL VEGETAL ET FONGIQUE

Matériel végétal

L'essai est réalisé sur blé de la variété Inoui choisie en raison de sa sensibilité à la fusariose des épis. Les graines sont semées dans des pots contenant un mélange de terreau et de vermiculite (75 :25) le 25 mars 2008. Les plants de blé sont cultivés dans les serres de l'Université Paris XI à Orsay.

Matériel fongique

L'inoculation est réalisée avec la souche Fg1 de *Fusarium graminearum*, isolée par BIOtransfer à partir d'épis de blé tendre d'hiver. Cette souche a été choisie en raison de son agressivité et de sa capacité élevée à produire des trichothécènes dont le désoxynivalénol (DON).

MODALITES ET POSITIONNEMENT DE L'APPLICATION

Le fongicide modèle choisi est le tébuconazole contenu dans la spécialité HORIZON EW de la société Bayer CropScience, titrant à 250 g/l de matière active. Ce fongicide est choisi en raison de son efficacité à l'encontre des Fusarioses des épis et de son utilisation répandue.

L'adjuvant à base d'alcools terpéniques issus du pin est la spécialité HELIOSOL de la société Action Pin, l'adjuvant contient 665 g/l d'alcools terpéniques.

Quatre modalités sont comparées : témoin non traité, tébuconazole à 250 g/ha, tébuconazole à 250 g/ha + alcools terpéniques 498,75 g/ha, tébuconazole à 250 g/ha + alcools terpéniques 997,5 g/ha. L'application est réalisée de manière à apporter l'équivalent de 150 l/ha de bouillie. Le traitement est réalisé au stade BBCH65 (mi-floraison), le 21 août 2008. C'est à dire 24 heures avant l'inoculation par le champignon. L'étude comporte trois répétitions randomisées.

INOCULATION DU CHAMPIGNON

L'inoculation est réalisée par pulvérisation d'une suspension de macroconidies de la souche Fg1 titrant à 10^6 spores/ml, sur les épis. Après inoculation, les épis sont ensachés pendant 48 heures afin de maintenir une humidité élevée favorable au développement du pathogène.

NOTATIONS ET MESURES REALISEES

Une première notation visuelle des symptômes sur épis est réalisée 21 jours après inoculation. La contamination par *Fusarium graminearum* des épis de blé a également été évaluée par PCR®.

A maturité, l'observation visuelle des épis est de nouveau réalisée. Les épis sont battus et les symptômes sur grain sont notés visuellement. Le niveau d'infection des grains récoltés par *F. graminearum* est mesuré par PCR®. Le taux de désoxynivalénol des grains est déterminé par ELISA, grâce au kit Fast DON Ridascreen (Diffchamb, Germany).

Mesure par PCR®

Après broyage de l'échantillon (épis entiers ou grains) puis extraction de l'ADN, l'amplification génique par PCR® est réalisée grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques à l'espèce *Fusarium graminearum*. Les produits l'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% contenant du bromure d'éthidium. Les bandes sont observées sous lumière ultra-violette, longueur d'onde de 312 nm. Le gel est scanné grâce au logiciel BioCapt (Vilber Lourmat, France). L'intensité de chaque bande est mesurée à l'aide du logiciel Bio1D⁺⁺ (Vilber Lourmat, France). Dans le cas où le signal atteint le niveau de saturation, des dilutions de l'ADN des échantillons sont pratiquées avant PCR®.

Dosage du désoxynivalénol par ELISA

Les échantillons de grains de blé sont broyés. Les broyats sont placés dans des tubes de 50 ml contenant de l'eau bidistillée stérile. Ce mélange est agité afin d'extraire le DON. L'extrait est ensuite purifié par centrifugation. Les dosages de DON ont ensuite été réalisés en suivant le protocole décrit dans le Kit sérologique Fast DON Ridascreen (Diffchamb, Germany). Les résultats sont exprimés en µg DON/Kg (ppb).

ANALYSES STATISTIQUE

Tous les résultats quantitatifs sont comparés par analyse de variance, avec un risque alpha de 5 %. Si l'analyse de variance est significative, un test de Newman-Keuls au seuil de 5% est réalisé.

RESULTATS

SYMPTOMES VISUELS

Du mycélium blanc violacé est visible sur les épis mais uniquement dans les témoins non traités, 21 jours après inoculation et à maturité.

Sur grains mûrs, un feutrage blanc est également visible uniquement dans les témoins. Dans les modalités traitées aucun symptôme sur grain n'est observé.

Les observations visuelles montrent que les trois modalités traitées sont visiblement efficaces, sans pour autant pouvoir les distinguer.

MESURE DU NIVEAU D'INFECTION PAR PCR®

Lorsque le signal est à saturation, une dilution de l'ADN des échantillons est nécessaire pour évaluer la biomasse fongique. Les résultats sont indiqués dans le Tableau I.

Tableau I : Niveau de contamination des épis et des grains de blé par *Fusarium graminearum* respectivement 21 jours après traitement et à maturité des grains.

Fusarium graminearum contamination level in wheat ears and in grains, 21 days after treatment and at grain maturity, respectively.

| Modalité de traitement | Intensité moyenne des produits de PCR® | | | |
|---|---|----------------|---|-----------------|
| | 1 ^{er} prélèvement : 21 jours après inoculation | | 2 ^e prélèvement : grains à maturité | |
| | Non dilué | Dilution 1/400 | Dilution 1/10 | Dilution 1/1000 |
| Témoin | Saturation | 18079 ± 2895 | Saturation | 47659 ± 1616 |
| Tebuconazole 250 g/ha | 2657 ± 1890 | 6,6 * | 29857 ± 21883 | 299 * |
| Tebuconazole 250 g/ha + alcools terpéniques 498,75 g/ha | 3198 ± 689 | 8 * | 20821 ± 14663 | 208 * |
| Tebuconazole 250 g/ha + alcools terpéniques 997,5 g/ha | 10081 ± 7954 | 25,2 * | 18104 ± 4823 | 181 * |

* valeurs extrapolées pour comparaison avec le témoin

Chaque valeur mesurée correspond à la moyenne des trois répétitions ± écart type

Le tébuconazole réduit la contamination de près de 99,9 % au niveau de l'épi (21 jours après inoculation) et de 99,6 % au niveau des grains (maturité). Bien que les différences entre modalités traitées ne soient pas significatives, l'ajout de l'adjuvant au tébuconazole tend à réduire un peu plus le niveau de contamination par *F. graminearum* observé à la maturité des grains. A maturité des grains, un léger effet dose de l'adjuvant semble apparaître. D'autre part, l'ajout de l'adjuvant réduit l'écart type du niveau de contamination dans les grains. Il apparaît qu'il améliore la régularité d'action du fongicide.

MESURE DU TAUX DE DEOXYNIVALENOL DANS LES GRAINS

Les résultats des analyses de DON par ELISA sont reportés dans le Tableau II.

Tableau II : Quantification du désoxynivalénol dans les grains de blé inoculés avec *Fusarium graminearum*.

Deoxynivalenol quantification in wheat grains inoculated by *Fusarium graminearum*.

| Modalité | Taux de DON dans les grains (ppb) | Réduction du taux de DON (%) |
|--|-----------------------------------|------------------------------|
| Témoin | 8375 ± 221 a | - |
| Tebuconazole 250 g/ha | 361 ± 328 b | 95,7 |
| Tebuconazole 250 g/ha + alcools terpéniques 498,75 g/ha | 35 ± 3 b | 99,6 |
| Tebuconazole 250 g/ha + alcools terpéniques 997,5 g/ha | 32 ± 5 b | 99,6 |

Chaque valeur mesurée correspond à la moyenne des trois répétitions ± écart type

Le tébuconazole réduit de près de 95,7 % en moyenne le taux de DON présent dans les grains récoltés. Cependant une très forte variabilité est observée.

L'ajout de l'adjuvant réduit de 99,6 % en moyenne le taux de DON dans les grains par rapport au témoin. Cette réduction est supérieure à celle obtenue avec le fongicide seul. De plus, l'adjuvant réduit la variabilité du taux de DON mesuré. En revanche, l'effet dose de l'adjuvant n'est pas mis en évidence.

CORRELATION ENTRE NIVEAU D'INFECTION ET TAUX DE DESOXYNIVALENOL

Il est intéressant de comparer l'effet des différents traitements sur l'infection par *Fusarium graminearum* et sur la production de désoxynivalénol dans les grains de blé. En effet, il est bien connu que l'efficacité d'un fongicide sur l'infection du champignon n'est pas systématiquement corrélée avec celle sur la production de mycotoxines.

Tableau III : Comparaison du niveau d'infection par *Fusarium graminearum* et de la concentration en désoxynivalénol dans les grains de blé.

Comparison between *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentration in wheat grains.

| Modalité | Intensité des produits de PCR® (dilution 1/1000) | Taux de DON dans les grains (ppb) |
|--|---|--------------------------------------|
| Témoin | 47659 ± 1616 | 8375 ± 221 |
| Tebuconazole 250 g/ha | 299 * | 361 ± 328 |
| Tebuconazole 250 g/ha + alcools terpéniques 498,75 g/ha | 208 * | 35 ± 3 |
| Tebuconazole 250 g/ha + alcools terpéniques 997,5 g/ha | 181 * | 32 ± 5 |

* valeurs extrapolées

Chaque valeur mesurée correspond à la moyenne des trois répétitions ± écart type

Les résultats semblent indiquer que l'efficacité du traitement fongicide sur le développement de *F. graminearum* va dans le même sens que la réduction du taux de mycotoxines dans les grains.

DISCUSSION

Le positionnement de l'application du tébuconazole au stade floraison correspond à l'optimum technique pour lutter contre la fusariose des épis. L'étude réalisée en conditions contrôlée, montre d'ailleurs son niveau d'efficacité élevé. Dans ces conditions optimales, l'ajout d'alcools terpéniques améliore légèrement l'efficacité du traitement mais régularise l'activité du fongicide. Appliqué seul, le tébuconazole présente une grande variabilité d'efficacité dans les trois répétitions.

En situation de plein champ, les conditions d'applications sont éloignées de la situation optimale du laboratoire. L'efficacité du tébuconazole au champ est de l'ordre de 50 à 75 % (Gripon et Saidi, 2004). Des essais préliminaires d'Action Pin, indiquent que les alcools terpéniques appliqués à 498,75 g/ha ou à 997,5 g/ha amélioreraient l'efficacité visuelle, assurant un niveau d'efficacité de 70 à 75 % (moyenne de 3 essais, données internes Action Pin, non publiées). Ces essais montrent également une amélioration de la régularité d'action du fongicide, comme observé dans l'étude en conditions contrôlées. Par leurs fonctions rétention et amélioration de l'étalement (Cabanne *et al.*, 2001 ; Gauvrit et Cabanne, 2008), les alcools terpéniques permettent un meilleur « accrochage » des gouttelettes sur l'organe cible et améliorent la répartition de la matière active sur l'épi. Ainsi, ils permettent de sécuriser le traitement en situation réelle.

Tout en ayant un impact réduit sur l'efficacité du fongicide dans les conditions de l'étude, l'ajout d'alcools terpéniques divise par dix le taux de DON par rapport à la modalité sans adjuvant. Les résultats montrent aussi une réduction de la variabilité de ce taux de DON. Quelques essais préliminaires en conditions de plein champ, semblent montrer que l'adjuvant ajouté au fongicide permet de réduire la production de DON de 30 à 40% par rapport à la modalité fongicide sans adjuvant. (2 essais, données internes Action Pin, non publiées). Ces résultats encourageants demandent à être confirmés par la mise en place de nouveaux essais de plein champ en microparcelles et en macroparcelles avec matériel agriculteur.

Les résultats prometteurs de l'étude permettent d'envisager des études complémentaires. Ainsi il serait intéressant, d'étudier comment se comporte le mélange extemporané de l'adjuvant à base d'alcools terpéniques avec une triazole, à d'autres positionnements par rapport à la date de contamination. De même, des études de cette association sur des *Fusarium sp.* produisant des trichothécènes du groupe A permettront de vérifier si son comportement est similaire à celui observé chez *Fusarium graminearum* au niveau de la biomasse et de la production de désoxynivalénol.

CONCLUSION

En conditions contrôlées, l'adjuvant à base d'alcools terpéniques accroît légèrement l'efficacité de la triazole et améliore sa régularité d'action. En conditions de plein champ, par ses fonctions rétention et étalement de la gouttelette apportant une plus grande quantité de bouillie sur la cible et une meilleure répartition sur l'épi, l'adjuvant devrait sécuriser l'application fongicide en améliorant la régularité d'action de ce dernier.

L'adjuvant à base d'alcools terpéniques associé à une triazole permet une réduction de production de désoxynivalénol plus forte par rapport au fongicide seul. Le programme important d'essais de plein champ permettra de confirmer les potentialités observées en conditions contrôlées.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier la société BIOtransfer et plus particulièrement Anne LeDouarec, Ingénieur de Recherche et le Docteur Thierry Barchietto pour leurs conseils avisés, la réalisation de l'étude en conditions contrôlées et la relecture du présent article.

BIBLIOGRAPHIE

- AFSSA, 2006 – Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, décembre 2006. 80 pages
- AFSSA, 2009 – Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final, mars 2009. 308 pages
- Cabanne F, Lucotte T, Dufau G, Querrioux A, 2001 – Rétention et alcools monoterpéniques utilisés en tank-mix – *Dix-huitième Conférence du COLUMA Journées Internationales sur la Lutte contre les Mauvaises Herbes*, 353-360
- Dubournet P, Brasselet N, Saidi B, 2005 – Les fusarioses des épis des blés, mieux connaître pour mieux les combattre. *Phytoma La Défense des Végétaux*, 580 : 9-12
- Gautier P, Froment A, Charon X, 2006 – Mycotoxines et qualité des blés Le désoxynivalénol, prévision et gestion dans les blés en France. *Phytoma La Défense des Végétaux*, 599 : 4-6
- Gauvrit C, Cabanne F, 2008 – Huiles végétales et monoterpènes en formulation phytosanitaire. *In Biopesticides d'origine végétale*, 2^e édition. Editions Lavoisier, France, 433-449
- Gripon L, Saidi B, 2004 – Incidence de la pulvérisation sur l'efficacité du tébuconazole dans la lutte contre la fusariose des épis de blé – *Colloque Mieux Traiter, Orléans, 10 et 11 mars 2004*.

**ACTION D'UNE FORMULATION ASSOCIANT SOUFRE ET COMPOSES TERPENIQUES
SUR L'OÏDIUM DE LA VIGNE (*ERYSIPHE NECATOR*) A DIFFERENTS STADES DE SON
DEVELOPPEMENT**

F. GIRAUD ⁽¹⁾, A. QUERRIOUX et M. RAMOS ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Action Pin, ZI de Cazalieu, BP30, 40260 Castets, FRANCE
francois.giraud@action-pin.fr

RÉSUMÉ

La microscopie à épifluorescence repose sur l'emploi de fluorochromes, molécules fluorescentes sous ultra-violet, capables de se fixer sur des structures cellulaires. Cette technique permet de visualiser les hyphes et leur activité métabolique. Avec cette technique il est possible d'évaluer l'action d'une formulation associant le soufre aux terpènes sur le développement et l'activité métabolique d'*Erysiphe necator* à différents stades. Appliquée 24 heures avant contamination, la formulation soufre avec terpènes inhibe la germination des conidies comme attendu. Contrairement au soufre classique, la formulation soufre avec terpènes montre une forte activité antisporelante, détruisant les hyphes et bloquant le développement des conidiophores. Cette activité originale contribue à l'excellent niveau d'efficacité de cette formulation et à sa grande souplesse d'action.

Mots-clés : soufre, terpènes, *Erysiphe necator*, antisporelation, microscopie à épifluorescence

SUMMARY

**ACTIVITY OF A FORMULATION CONTAINING SULPHUR AND TERPENES AGAINST
GRAPEVINE POWDERY MILDEW (*ERYSIPHE NECATOR*), AT DIFFERENT
DEVELOPMENT STAGES**

Epifluorescent microscopy is based on the use of fluorochromes which are fluorescent molecules under UV light, able to bind to cell structures. This technology allows to observe the fungus mycelium and related metabolic activity. By the mean of this technology, we can observe the effect of a formulation containing sulphur and terpenes on *Erysiphe necator* development and metabolic activity at different stages. Applied 24 hours before contamination, the sulphur plus terpenes formulation inhibit conidia germination, as expected. Unlike other sulphur products, the sulphur plus terpenes formulation shows a significant anti-sporulation activity, with mycelium death and most conidiophores inhibition. This unusual activity may explain the excellent efficacy level of the sulphur plus terpenes formulation and its high use flexibility.

Key words: sulphur, terpenes, *Erysiphe necator*, anti-sporulation, epifluorescent microscopy

INTRODUCTION

Le soufre est un fongicide minéral efficace sur les oïdiums, utilisé sur vigne depuis les années 1850. (Bru, 1997) Il a un mode d'action de type multisite. En effet, après absorption par les cellules fongiques il est réduit en sulfure d'hydrogène qui perturbe de nombreux mécanismes métaboliques de façon irréversible. Le soufre présente une action préventive en agissant sur la germination des spores. Il a également une activité curative, limitant le développement des filaments mycéliens (PHM, 1991)

Depuis 1990, la société Action Pin développe une formulation de type suspension concentrée associant 700 g/l de soufre à des composés terpéniques issus du pin. Le produit formulé, autorisé à 7,5 l/ha (5250 g/ha de matière active) sur l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*), possède une excellente efficacité dès 5 l/ha (3500 g/ha de matière active) dans la plupart des conditions agro-climatiques. Avec un apport plus faible de soufre, la formulation assure un excellent niveau d'efficacité.

Ces données conduisent à s'interroger sur l'action de la formulation associant le soufre à des composés terpéniques, sur le pathogène à différentes phases clés de son développement. Dans le but de répondre à cette question, une étude en conditions contrôlées a été menée, en comparant la formulation associant le soufre avec des composés terpéniques à un soufre de référence de type granulés dispersables (WG).

MATERIELS ET METHODES

PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE

Les fluorochromes sont déposés sur un disque foliaire colonisé par le champignon. Ils se fixent sur le champignon. L'excès est éliminé par rinçage. Eclairé par les ultra-violets les fluorochromes émettent par fluorescence en lumière visible. Un choix judicieux des fluorochromes permettent de visualiser les structures cellulaires ainsi que leur activité métabolique.

Trois fluorochromes sont mis en œuvre :

- Fluorochrome vert : naturellement non fluorescent, la Fluoresceine diacetate (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) est captée par toutes les cellules et relarguée par les cellules non viables. Les estérases des cellules vivantes l'hydrolysent en molécules fluorescentes. Ce fluorochrome sert de marqueur d'activité biologique des cellules, l'intensité de la fluorescence est corrélée avec l'activité métabolique.
- Fluorochrome rouge : L'iodure de propidium (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) se fixe sur les acides nucléiques du noyau et du cytoplasme. Il ne pénètre que si les membranes cellulaires sont devenues perméables, signifiant la mort de la cellule. Dans l'étude, il indique les cellules mortes.
- Fluorochrome bleu : Le Fluorescent Brightener (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) se fixe sur la chitine et la cellulose, par conséquent il marque les parois cellulaires et les septa. Il marque les structures du champignon.

MATERIEL VEGETAL ET FORMULATIONS EMPLOYEES

Le test est réalisé sur disques foliaires de vigne, du cépage Chardonnay. *Erysiphe necator* souche PV1 isolée en 2007 en champagne est issu de la collection fongique de BIOtransfer.

La formulation associant le soufre à des composés terpéniques, HELIOSOUFRE S (soufre : 700 g/l) de la société Action Pin, sera ensuite dénommée « formulation soufre + terpènes ».

Le soufre de référence est une formulation de type granulés dispersables (WG) titrant à 800g/kg de matière active.

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

L'évaluation de l'activité des formulations testées porte sur trois stades de développement de *Erysiphe necator*: positionnement préventif, positionnement curatif et positionnement anti-sporulant. La figure 1 représentant le cycle de développement, permet de situer ces différents positionnements. Pour chaque positionnement, trois modalités sont comparées : témoin non traité, la formulation soufre + terpènes et le soufre de référence. Les doses utilisées sont très inférieures aux doses d'autorisation de mise sur le marché afin de pouvoir discriminer les différentes modalités, en conditions contrôlées. Une gamme de dose a, dans un premier temps, été testée pour les deux formulations de soufre et pour chacun des trois positionnements. Des observations en microscopie à épifluorescence ont permis de choisir les doses les plus discriminantes pour la réalisation de l'étude proprement dite. Les dilutions sont calculées de manière à être équivalentes à une pulvérisation de 150 l/ha de bouillie.

Positionnement préventif

L'application sur disques foliaires est réalisée 24 heures avant contamination par saupoudrage avec une feuille servant à la culture du pathogène. Les disques foliaires sont cultivés sur un milieu d'eau gélosé en boîte de Pétri 100mm et incubés en chambre climatique. La régularité de la contamination est vérifiée sous microscope. Trois boîtes de Pétri contenant environ 10 disques foliaires de 1.5cm de diamètre sont réalisées pour chaque modalité. Les doses utilisées sont équivalentes à 52,5 g/ha de matière active pour la formule soufre + terpènes, et à 96 g/ha de matière active pour le produit de référence. Les solutions sont appliquées à raison de 2000 µl par boîte de Pétri à l'aide d'un pulvérisateur manuel réglé à 1,5 bar de pression. La microscopie à épifluorescence permet d'observer le développement et la viabilité/mortalité du pathogène, après une incubation en chambre climatique (alternance jour/nuit de respectivement 16h à 22°C et 10h à 18°C) de 2 ou de 9 jours.

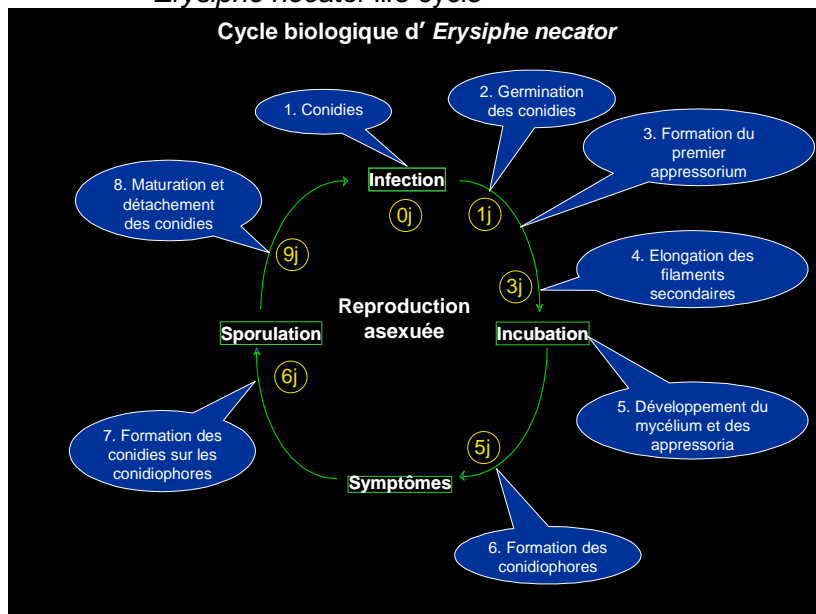
Positionnement curatif

Les disques foliaires sont contaminés par saupoudrage avec une feuille servant la culture du pathogène. La régularité de la contamination est vérifiée sous microscope. Trois boîtes de Pétri contenant environ 10 disques foliaires de 1.5cm de diamètre sont réalisées pour chaque modalité. Les feuilles contaminées sont cultivées comme précédemment. L'application sur disques foliaire est réalisée 48 heures après contaminations, c'est-à-dire au début du développement du pathogène avec l'apparition du tube germinatif et du premier appressorium. Les doses utilisées sont équivalentes à 105 g/ha de matière active pour la formulation soufre + terpènes, et à 192 g/ha de matière active pour le soufre de référence. Les solutions sont appliquées comme précédemment. Les disques foliaires sont mis à nouveau en incubation dans les mêmes conditions de température et d'humidité. La microscopie à épifluorescence permet d'observer le développement et la viabilité/mortalité du pathogène, 2 et 7 jours après application

Positionnement anti-sporulant

Les disques foliaires sont contaminés par saupoudrage avec une feuille servant la culture du pathogène. La régularité de la contamination est vérifiée sous microscope. Trois boîtes de Pétri contenant environ 10 disques foliaires de 1.5cm de diamètre sont réalisées pour chaque modalité. Les feuilles contaminées sont cultivées comme précédemment. L'application sur disques foliaire est réalisée 6 jours après contamination, c'est-à-dire pendant la formation des conidies sur les conidiophores lorsque les symptômes deviennent visibles. Les doses utilisées sont équivalentes à 52,5 g/ha de matière active pour la formulation soufre + terpènes, et à 96 g/ha de matière active pour le soufre de référence. Les solutions sont appliquées comme précédemment.. Les disques foliaires sont mis de nouveau en incubation dans les mêmes conditions d'humidité et de température. La microscopie à épifluorescence permet d'observer le développement et la viabilité/mortalité du pathogène, 3 jours après application.

Figure 1 : Cycle biologique d'*Erysiphe necator*
Erysiphe necator life cycle

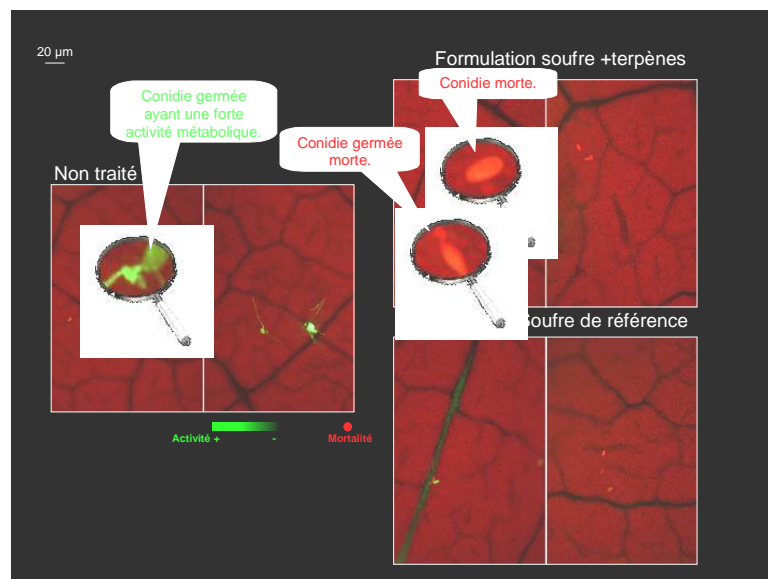


RESULTATS

POSITIONNEMENT PREVENTIF : APPLICATION 24 HEURES AVANT CONTAMINATION

Dans les témoins, 2 jours après contamination des conidies ont germé et ont émis leur premier appressorium. L'activité métabolique est intense. Pour les deux modalités traitées, toutes les conidies sont mortes. L'examen macroscopique et au microscope à épifluorescence, 9 jours après incubation, confirment ces observations. Comme attendu, la formulation soufre + terpènes et le soufre de référence ont une action préventive.

Figure 2 : Observation en microscopie à épifluorescence 2 jours après contamination
 - Epifluorescent microscopy observation, 2 days after inoculation



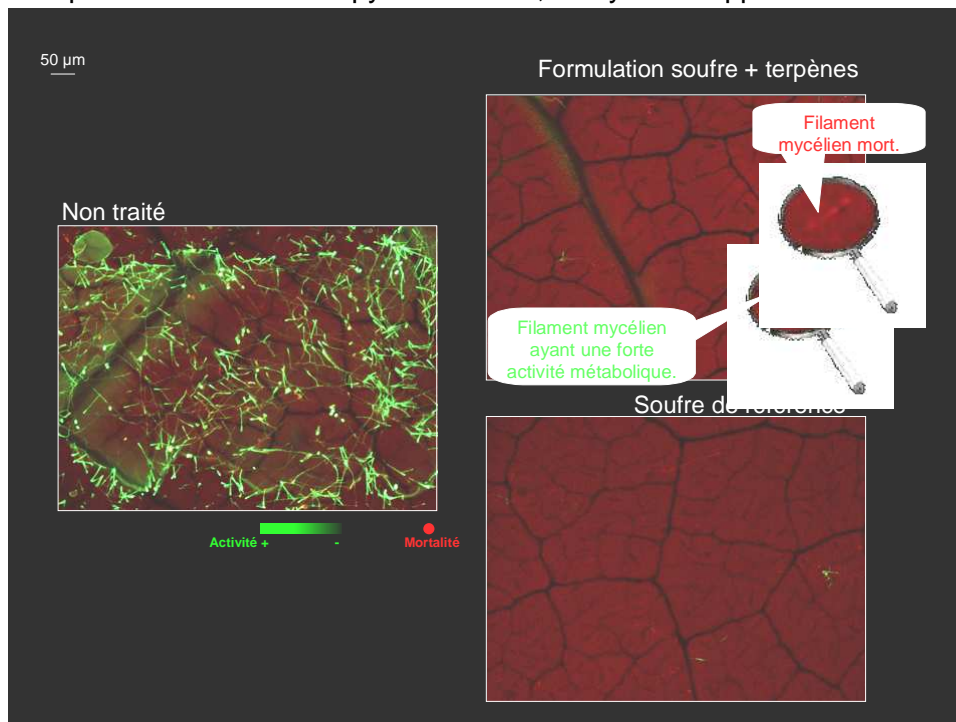
POSITIONNEMENT CURATIF : APPLICATION 48 HEURES APRES CONTAMINATION

L'observation microscopique réalisée 2 jours après traitement, montre la croissance des filaments secondaires du mycélium et la forte activité métabolique dans les témoins. Dans les modalités traitées, l'activité métabolique est plus faible, le développement des filaments secondaires est faible et quelques filaments sont déjà morts.

L'observation microscopique montre la formation de nombreux conidiophores et des conidies très actives, dans les témoins. Dans les modalités traitées, seuls quelques rares filaments encore actifs et des filaments morts sont visibles. Le développement du pathogène reste bloqué au stade filaments secondaires.

La formulation soufre + terpènes et le soufre de référence se montrent équivalents. Ils bloquent le développement d'*Erysiphe necator* au début de son cycle, réduisent la viabilité des filaments formés et ne permettent pas la sporulation.

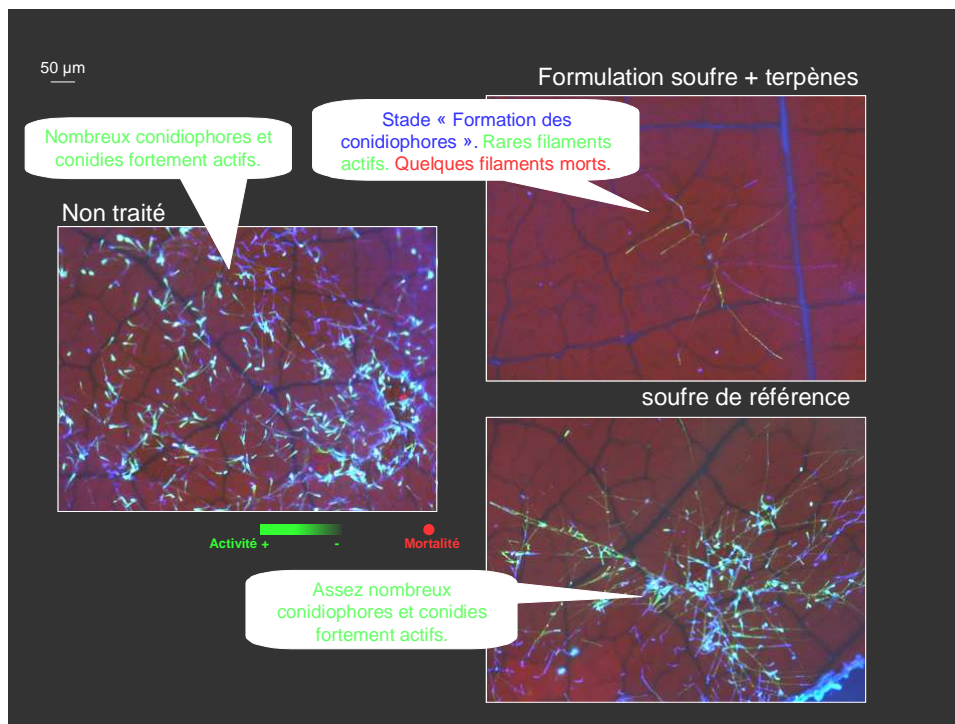
Figure 3 : Observation en microscopie à épifluorescence 7 jours après application
- Epifluorescent microscopy observation, 7 days after application



POSITIONNEMENT ANTI-SPORULANT : APPLICATION 6 JOURS APRES CONTAMINATION

Les observations au microscope réalisées 3 jours après application montrent que le soufre de référence se montre équivalent au témoin. Que le soufre de référence n'ait pas d'activité anti-sporulante était attendu. La formulation soufre + terpènes se comporte différemment. Elle tue les filaments mycéliens et inhibe la formation de conidiophores et des conidies.

Figure 4 : Observation en microscopie par épifluorescence 3 jours après application
 - Epifluorescent microscopy observation, 3 days after application



DISCUSSION

Comme attendu la formulation soufre + terpènes possède une activité préventive et curative, à l'instar d'un soufre classique. En positionnement anti-sporulant, le comportement de la formule soufre + terpènes et du soufre de référence divergent. Alors que le soufre de référence n'a pas d'impact sur le nombre de conidiophores formés et sur la viabilité des conidies, la formulation soufre + terpènes montre une action anti-sporulante dans le sens où elle inhibe la formation des conidiophores.

L'oïdium étant un champignon réalisant tout son cycle en surface (ectoparasite), les coformulants présents dans une formulation à base de soufre sont susceptibles d'avoir un impact significatif sur l'efficacité de la matière active. Les terpènes entrant dans la composition de la formulation développée par Action Pin sont pour l'essentiel des alcools terpéniques.

Apportés sous forme d'adjuvant extemporané, les alcools terpéniques peuvent multiplier la rétention par 4 ou 5. La rétention correspond à la proportion de bouillie pulvérisée qui reste sur le végétal, lors de la pulvérisation. (Cabanne et al., 2001 ; Gauvrit et Cabanne, 2008). Les alcools terpéniques provoquent la chute très rapide de la tension superficielle dynamique, elle descend autour de 40 mN/m en moins de 10 ms. Pour rappel, la tension superficielle de l'eau est de 72,8 mN/m. (Cabanne et al., 2001; Gauvrit et Cabanne, 2008) Ce phénomène physique se traduit par un effet anti-rebond conduisant à une meilleure rétention. Ainsi, il est raisonnable de penser que les alcools terpéniques présents dans la formulation soufre + terpène, accroissent la quantité de soufre présent sur la feuille ou en contact avec le champignon. Ceci explique l'excellent niveau d'efficacité de la formulation qui apporte cependant une dose réduite de soufre.

Les alcools terpéniques par leur propriété tensio-actives ont des propriétés mouillantes. La gouttelette s'étalerait mieux au contact du support végétal plutôt de nature hydrophobe. L'angle de goutte d'une bouillie contenant la formulation soufre + terpènes serait de l'ordre de 60°, tandis qu'il serait de l'ordre de 100° pour un soufre formulé sous forme de granulés dispersables (WG). Ces propriétés mouillantes concourraient à une répartition plus homogène du soufre sur le support traité. (études internes Action Pin, non publiées)

D'avantage de matière active restant sur le support végétal couvert ou non de mycélium et une répartition plus homogène, facilitent la mise en contact du champignon avec le soufre. Une éventuelle amélioration de la pénétration du soufre dans le mycélium est aussi à envisager. La combinaison de ces propriétés suffit-elle à expliquer l'activité de la formulation soufre + terpène lors de la phase sporulante ? La question demeure ouverte.

La formulation contenant du soufre et des composés terpéniques issus du pin perturbe le développement de l'oïdium, aux trois phases clé de son développement. Sur le terrain, au moment de l'application en pleine période à risque, l'oïdium est présent à tous les stades de son développement. Agir sur pratiquement tous les stades permet de garantir l'efficacité du traitement sous la plupart des conditions agro-climatiques. Avec les propriétés des alcools terpéniques sur la rétention et la mouillabilité, cette capacité explique les performances de la formulation développée par Action Pin et lui confère une grande souplesse d'utilisation.

CONCLUSION

En plus de son action préventive et curative, la formulation associant le soufre à des composés terpéniques issus du pin présente une activité de type anti-sporulant. Appliquée en fin de cycle de développement du pathogène, elle inhibe la formation des conidiophores. Cette activité explique, en plus des propriétés physico-chimiques des alcools terpéniques, les excellentes performances techniques de cette formulation avec un apport réduit de soufre. De même son action de type anti-sporulant, lui permet une grande souplesse d'utilisation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier les chercheurs de la société BIOtransfer et en particulier le Dr Viviane Calaora, pour la réalisation de certaines expériences et la maîtrise de la microscopie à épifluorescence.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme , 1991 – Le soufre, un fongicide moderne, *PHM - Revue Horticole*, 321, 27-31
Bru, 1997 - Le soufre centenaire, *Fruits et Légumes*, 136
Cabanne F, Lucotte T, Dufau G, Querrioux A, 2001 – Rétention et alcools monoterpéniques utilisés en tank-mix – *Dix-huitième Conférence du COLUMA Journée Internationale sur la Lutte contre les Mauvaises Herbes*, 353-360
Gauvrit C, Cabanne F, 2008 – Huiles végétales et monoterpènes en formulation phytosanitaire – *In Biopesticides d'origine végétale, 2^e édition*. Editions Lavoisier, France, 433-449.

**PHF 0714, UN NOUVEAU FONGICIDE POUR LE TRAITEMENT DES PLANTS DE
POMME DE TERRE**

S. ROUMANILLE (1)

(1) Philagro France - Parc d'affaires de Crécy – 2 rue Claude Chappe
69771 St Didier Au Mt D'Or

RESUME

PHF 0714 est une suspension concentrée contenant 500 g/l de tolclofos-méthyl. Le tolclofos-méthyl est un fongicide organophosphoré, non systémique, efficace contre les champignons basidiomycètes.

Il inhibe la synthèse d'acides nucléiques au niveau des noyaux des cellules des champignons tels que *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Typhula*, perturbant ainsi la division cellulaire. Le tolclofos-méthyl agit également en inhibant le bourgeonnement des spores du champignon. Son activité est très marquée sur les spores et les sclérotés et, à un degré moindre, sur le mycélium.

PHF 0714 présente ainsi une bonne action préventive et curative. Il assure une haute protection contre les attaques de rhizoctone brun en végétation et sur les tubercules fils. Le tolclofos-méthyl est une substance active issue de la recherche de SUMITOMO Chemical Company qui a été inscrite à l'annexe 1 en 2006.

PHF 0714 sera utilisé pour le traitement des plants de pomme de terre contre le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*), en pulvérisation à ultra bas volume.

Mots-clés : PHF0714, fongicide, tolclofos-méthyl, pomme de terre, traitement de plants

SUMMARY

PHF 0714 is a SC formulation which contains 500 g/l of tolclofos-methyl. Tolclofos-methyl belongs to the OPs chemical family. It is not systemic and efficient against basidiomycete fungi.

This active substance inhibits nucleic acids synthesis at cell nucleus level of fungi such as *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, and *Typhula* and disrupts cell division.

Tolclofos-methyl also inhibits fungi spore budding. Its activity is remarkable on spore and sclerotia and also on mycelium but at a lower level.

PHF 0714 shows a good preventive and curative efficacy. A high protection against the attacks of black scurf on stem and the tubers produced. Tolclofos-methyl is a fungicide from SUMITOMO Chemical Company research which is AnI registered since 2006.

PHF 0714 will be used for potato tuber treatment against black scurf (*Rhizoctonia solani*) applied by ULV.

Key words: PHF0714, fungicide, tolclofos-methyl, potato, tuber treatment

INTRODUCTION

Le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*) est un champignon pathogène fréquent en culture de pomme de terre. Il se propage dans la plante et dans les tubercules fils et entraîne une diminution de la valeur marchande des productions. La source de contamination par ce pathogène provient du sol et des tubercules plantés.

Une lutte efficace commence avant la plantation par une protection fongicide en traitement UBV (ultra bas volume). Grâce à la bonne activité du tolclofos-méthyl contre le rhizoctone brun, PHF 0714 assure une haute protection contre les attaques en végétation et sur les tubercules fils.

Cette substance active est issue de la recherche de SUMITOMO Chemical Company et a été inscrite à l'annexe 1 en 2006.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

PHF 0714 est un fongicide contenant du tolclofos-méthyl. Cette substance active fait partie de la famille des organophosphorés.

FORMULATION

PHF 0714 est une formulation de type suspension concentrée (SC) contenant 500 g/l de tolclofos-méthyl.

PROPRIETES BIOLOGIQUES

Le tolclofos-méthyl est un fongicide de la famille des organophosphorés. Il est non systémique et efficace contre les champignons basidiomycètes tels que *R. solani*.

Le tolclofos-méthyl inhibe la synthèse d'acides nucléiques au niveau des noyaux des cellules des champignons tels que *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Typhula*. La division cellulaire est par conséquent inhibée par le fongicide. Le tolclofos-méthyl agit également en inhibant le bourgeonnement des spores du champignon : la spore se dilate puis se vide de son cytoplasme, elle éclate.

Le tolclofos-méthyl est plus efficace sur spores et sclérotés que sur mycélium, ce qui lui confère une bonne action préventive et curative. Il assure une haute protection contre les attaques de rhizoctone brun en végétation et sur les tubercules fils.

MATERIELS ET METHODES

PHF 0714 a été expérimenté en France depuis 2007. Les essais ont été conduits selon la méthode CEB adaptée : M236 Méthode d'étude de l'efficacité au champ de fongicides destinés à la lutte contre les maladies superficielles des tubercules de la pomme de terre.

| | |
|-------------------------|--|
| | Pomme de terre |
| | <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Dispositif expérimental | Fisher à 4 blocs |
| Disposition des témoins | Inclus Présence d'un témoin sain et d'un témoin contaminé |
| Dimension des parcelles | Au moins 60 plants |

| | |
|----------------------|---|
| | Pomme de terre |
| | <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Variables observées | % de volume foliaire par rapport au témoin sain Nombre total de tiges observées et fréquence de tiges infectées % de surface infectée par tubercule |
| Taille échantillon | 20 plantes Totalité des plantes 100 tubercules |
| Epoque d'observation | 100% des plants du témoin ont une taille d'au moins 10 cm Fermeture des rangs Récolte |
| Type d'observation | Mesure et estimation |

RESULTATS ET DISCUSSION

PHF 0714 est un fongicide contre le rhizoctone brun de la pomme de terre. Le tableau I présente les résultats en végétation sur le pourcentage de tiges présentant des symptômes de rhizoctone brun. Les tableaux II et III illustrent sa performance et celle de la préparation de référence à la récolte.

Tableau I : Pourcentage de tiges présentant des symptômes de rhizoctone brun
Percentage of stem with black scurf symptoms

| Essai | Témoin sain | Témoin contaminé | PHF0714 0,25 l/t | Réf. CEB 0,75 l/t |
|---------|-------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 15,88 | 40,34 | 13,65 | 18,11 |
| 2 | 19,12 | 51,24 | 28,46 | 18,18 |
| 3 | 1,1 | 35,6 | 2,1 | 0,7 |
| 4 | 22,33 | 59,92 | 12,06 | 17,37 |
| 5 | 23,5 | 5,1 | 2,2 | 0,4 |
| Moyenne | 16,4 | 38,4 | 11,7 | 11 |
| N&K 5% | b | a | b | b |
| | - | a | b | b |
| | - | - | a | a |

Dans ces essais d'efficacité, le niveau d'attaque sur tiges est de 16,4% dans les parcelles du témoin sain et de 38,4 % dans les parcelles du témoin contaminé. La contamination en rhizoctone brun vient principalement des tubercules.

Dans la modalité PHF 0714, la proportion de tiges attaquées est de 11,7 % et est significativement inférieure à celle du témoin contaminé. De plus, PHF 0714 assure une protection équivalente à celle de la référence CEB car le pourcentage de tiges présentant des symptômes de rhizoctone brun est très proche dans les deux modalités et la différence n'est pas significative.

En végétation, PHF 0714 protège un grand nombre de plants des attaques de rhizoctone brun.

Tableau II : Fréquence d'attaque du rhizoctone brun sur tubercule de pomme de terre (résultats exprimés en % de tubercules sains)
Incidence against brown patch on potato tuber (Notation in percentage of safe tubers)

| Essai | Témoin sain | Témoin contaminé | PHF0714 0,25 l/t | Réf. CEB 0,75 l/t |
|---------|-------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 97,5 | 60,8 | 92,3 | 98,8 |
| 2 | 82,5 | 43,3 | 77 | 85,3 |
| 3 | 87,92 | 20,75 | 88 | 96,25 |
| 4 | 85 | 28,3 | 95,25 | 89,8 |
| 5 | 95,7 | 71 | 96,7 | 98 |
| Moyenne | 89,7 | 44,8 | 89,9 | 93,6 |
| N&K 5% | a | b | a | a |
| | - | b | a | a |
| | - | - | a | a |

A la récolte, le pourcentage de tubercules sains est de 89,7 % dans le témoin sain et 44,8 % dans le témoin contaminé.

Sur la fréquence d'attaque sur tubercules, PHF 0714 protège de façon significative les tubercules contre les attaques de rhizoctone brun. Un traitement avec 0,25 l/t de PHF 0714 permet de récolter 89,9 % de tubercules sains. Comme il n'y a pas de différence significative entre les préparations, PHF 0714 assure une protection équivalente à celle de la référence CEB.

PHF 0714 assure une récolte d'un grand nombre de tubercules sains de pomme de terre.

Tableau III : Intensité d'attaque du rhizoctone brun sur tubercule de pomme de terre
Severity against brown patch on potato tuber

| Essai | Témoin sain | Témoin contaminé | PHF0714 0,25 l/t | Réf. CEB 0,75 l/t |
|---------|-------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 0,2 | 4,7 | 0,3 | 0 |
| 2 | 0,6 | 6,3 | 1,1 | 0,9 |
| 3 | 0,4 | 9 | 0,6 | 0,1 |
| 4 | 0,5 | 6,8 | 0,1 | 0,3 |
| 5 | 0,7 | 2,4 | 2 | 0,8 |
| Moyenne | 0,5 | 5,8 | 0,8 | 0,4 |
| N&K 5% | b | a | b | b |
| | - | a | b | b |
| | - | - | a | a |

Pour juger l'intensité de l'attaque, le pourcentage de surface attaquée en rhizoctone est estimé sur 100 tubercules.

PHF 0714 diminue significativement la surface atteinte par rapport au témoin contaminé. Avec 0,25 l/t de PHF 0714, l'intensité d'attaque passe de 5,8 % à 0,8 % de surface contaminée. Comme précédemment, la protection procurée par PHF 0714 est équivalente à celle apportée par la référence CEB.

PHF 0714 limite efficacement la propagation du rhizoctone brun à la surface des tubercules de pomme de terre.

COMMENTAIRES

En se référant aux principaux critères d'évaluation des fongicides en traitement de plants de pomme de terre : le nombre d'organes atteints par la maladie (fréquence d'attaque) et le pourcentage de surface atteinte par la maladie (intensité d'attaque), PHF 0714 fait preuve de performances techniques équivalentes à celles du fongicide de référence contre le rhizoctone brun de la pomme de terre.

CONCLUSION

PHF 0714 est un nouveau fongicide contre le rhizoctone brun de la pomme de terre. Il s'applique par traitement UBV à la dose de 0,25 l/t.

Avec des performances équivalentes à celles de la préparation de référence, il permet un bon maintien de l'état sanitaire en végétation ainsi qu'une récolte de bonne qualité. PHF 0714 lutte efficacement contre le rhizoctone brun provenant à la fois du sol et des tubercules.

PHF 0714 protège les tubercules car il contient du tolclofos-méthyl. Cette substance active est issue de la recherche de SUMITOMO Chemical Company et est inscrite à l'annexe 1 depuis 2006.

**AFPP – 9^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

PHF0810, NOUVEAU FONGICIDE ANTI-MILDIU DE LA VIGNE

P. ARMENGAUD (1)

(1) Philagro France-Parc d'affaires de Crecy – 2 rue Claude Chappe - 69771 St Didier Au Mt D'Or

RESUME

PHF0810 est un nouveau fongicide anti-mildiou de la vigne également efficace contre le Brenner (rougeot parasitaire) et l'excoriose. Ce fongicide est une association d'amisulbrom et de folpel.

L'amisulbrom est une nouvelle substance active de la famille des sulfonamides. Il représente un nouveau mode d'action pour lutter contre le mildiou de la vigne, mode d'action non partagé avec les produits actuellement sur le marché. L'activité de ce composé s'exerce principalement sur les champignons oomycètes responsables de nombreuses maladies dont le mildiou de la vigne. Il perturbe l'émission, la mobilité et la germination des zoospores, ainsi que la germination et la formation des sporanges. Il est très actif sur grappes et sur feuilles. Produit translaminaire, il a une excellente persistance d'action et une grande résistance au lessivage.

PHF0810 est parfaitement sélectif de la vigne et présente un profil toxicologique et écotoxicologique favorable.

Dans les essais, PHF0810 a montré qu'il pouvait être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 12 jours entre applications, quel que soit le stade de la vigne.

Ce nouveau fongicide issue de la recherche de Nissan Chemical Industries Ltd sera commercialisé par PHILAGRO France.

Mots-clés : PHF0810, fongicide, amisulbrom, folpel, vigne, mildiou, Brenner, excoriose, composition, cadence, programme de traitement.

SUMMARY

PHF0810, A NEW FUNGICIDE AGAINST DOWNY MILDEW ON VINE

PHF0810 is a new fungicide against downy mildew on vine. It is based on a mixture of amisulbrom and folpet, and it's also effective against rot Brenner and dead arm disease (*Phomopsis*).

Amisulbrom is a new active substance belonging to the chemical class of sulfonamides. It has a new mode of action, and it's effective against the oomycetes fungus, responsible for a large number of diseases like downy mildew on vine. It's active against the germination, the mobility and liberation of the zoospores, but also against germination and formation of the sporanges. It's very active on grapes and leaves. This product, with a translaminar action, offers a long lasting protection as well as good rain fastness.

PHF0810 is perfectly selective of the crops and has a toxicological and environmental profile very favourable.

Our trials, PHF0810 performs very well in all types of fungicide programs, within 3 treatments maximum per season and 12 days of spray interval.

This new fungicide, discovered by the research of Nissan Chemical Industries Ltd, will be introduced on the market by PHILAGRO France.

Key words: PHF0810, fungicide, amisulbrom, folpet, vine, downy mildew, rot Brenner, dead arm disease, composition, spray interval, program of crop protection.

Introduction :

Le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) est l'une des deux maladies les plus dommageables à la culture de la vigne. Son potentiel infectieux est très dépendant des conditions climatiques, et, dans les conditions les plus favorables à son développement, le mildiou de la vigne est capable d'entraîner des pertes de 50 % de la vendange, voire la totalité dans les cas extrêmes. Cette menace majeure demande une vigilance de tous les instants aux viticulteurs, et la maîtrise de son développement est le facteur clé de la qualité du vin produit au cours de millésimes comme 2007 ou 2008.

PHF0810 est un nouveau fongicide à base d'amisulbrom et de folpel. L'amisulbrom, une nouvelle substance active fongicide, est issue de la recherche de Nissan Chemical Industries. Découverte en 1999, elle s'est révélée très active contre les champignons oomycètes responsables de très nombreux mildious. Elle a été largement développée dès 2002 dans de nombreux pays, seule ou au travers d'associations avec d'autres fongicides. Cette communication résume les principales caractéristiques de PHF0810 et quelques informations sur ses performances biologiques contre le mildiou de la vigne.

Propriétés biologiques

Spectre d'activité

L'activité de l'amisulbrom est très ciblée sur les oomycètes

Tableau I : Activité préventive de l'amisulbrom sur feuilles
Preventive activity of amisulbrom on leaves

| Pathogène | <i>Phytophthora infestans</i> | | <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | <i>Plasmopara viticola</i> |
|---------------|-------------------------------|----------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Pomme de terre | Tomate | Concombre | Vigne |
| Culture | EC90 ppm | EC90 ppm | EC90 ppm | EC90 ppm |
| Amisulbrom | 1 | 1-5 | 1 | 1-5 |
| Azoxystrobine | 5 | 5 | 1-5 | 5 |
| Cyazofamide | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Fluazinam | 10-50 | - | - | - |

Le folpel est actif sur un large spectre de maladies fongiques comme *Plasmopara viticola*, responsable du mildiou de la vigne.

Mode d'action

Mode d'action biochimique

Amisulbrom inhibe la respiration mitochondriale du champignon à 1 μ M, il est spécifique de la respiration mitochondriale des oomycètes. Il agit par inhibition de la respiration mitochondriale en intervenant sur le transport d'électrons au niveau du complexe III. Amisulbrom appartient à la famille des Qil : il se fixe sur la face interne du cytochrome B (d'après R Hugues, Hasunuma N – 2006).

Selon le groupe de surveillance de la résistance aux fongicides (FRAC), l'amisulbrom correspond à un mode d'action de type 21 avec pour code du site d'action « C. respiration, avec le code C4 : complex III of fungal respiration : cytochrome b1 (ubiquinone reductase) at Qi site » et appartient aux fongicides Qil (Quinone inside inhibitors). Ces fongicides inhibent la respiration et la production d'énergie au niveau du site Qi. Ce sont des fongicides à site d'action unique. Ils présentent une systémie limitée.

Des tests de grande ampleur dans les pays de l'Europe du Nord (France, Royaume-Uni, Pays-Bas) sur *P. infestans* n'ont pas mis en évidence de développement de résistance ni de résistance croisée du NC-224 à ce jour (d'après P. Haudrechy – 2008).

Le folpel est un fongicide appartenant à la famille des dicarboximides. Il présente l'avantage d'être un fongicide de type multisite et donc non soumis au risque d'apparition de résistance.

Les deux matières actives sont complémentaires dans le cadre de leur association à travers le PHF0810.

Mode d'action biologique

L'activité de l'amisulbrom est particulièrement marquée sur les champignons oomycètes car elle s'exprime en différents points du cycle du parasite :

- émission des zoospores
- mobilité des zoospores
- germination des sporanges et zoospores
- formation des sporanges

On observe également une très nette diminution du nombre et de la viabilité des oospores de *Phytophthora infestans* après une exposition à l'amisulbrom (d'après Nishioka M, Hasunuma N – 2004).

Tableau II : Activité de l'amisulbrom sur le cycle de *Phytophthora infestans*
Activity of amisulbrom on the biological cycle of *Phytophthora infestans*

| CI50 (µg/ml) | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Traitement | Emission des zoospores | Mobilité des zoospores | Germination des zoosporanges | Formation des zoosporanges | Germination des cystospores | Croissance mycélienne |
| amisulbrom | 0.1 | – 0.1 | – 0.1 | 0.01 – 0.1 | – 0.1 | 0.1– 1 |
| diméthomorphe | >10 | >10 | 0.1 – 1 | NT | NT | 0.1 - 1 |
| fluazinam | 1 – 10 | 0.1 – 1 | – 0.1 | NT | 0.1 – 1 | 10 – 100 |
| cymoxanil | 1 – 10 | 0.1 - 1 | 0.01 – 0.1 | NT | NT | 0.1- 1 |

NT : non testé

Formulation

Substance active

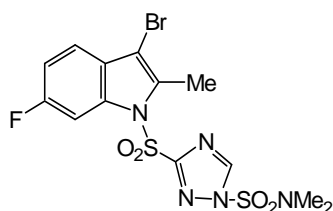
Nom commun : amisulbrom (proposé à l'ISO)

N°CAS : 348635-87-0

Nom chimique (IUPAC) : 3-(3-bromo-6-fluoro-2méthylindol-1-ylsulfonyl-N,N-diméthyl-1,2,4-triazole-1-sulfonamide

Classe chimique : sulfonamide

Formule moléculaire développée :



Formule brute :

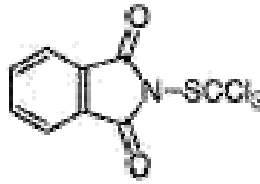


Nom commun (ISO) : folpel

N°CAS : 133-07-3

Nom chimique (IUPAC) : N-[(trichlorométhyl)thio]phthalimide

Formule moléculaire développée :



Formule brute :

C₉ H₄ Cl₃ N O₂ S

Formulation

PHF0810 est un granulé dispersable (WG) contenant 50 g/kg d'amisulbrom et 500 g/kg de folpel. La dose d'homologation demandée est de 1,5 kg/ha, soit 75 grammes d'amisulbrom et 750 g de folpel par hectare. PHF0810 est préconisé pour lutter contre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*), l'excoriose (*Phomopsis viticola*) et le Brenner (*Pseudopeziza tracheiphila*). Il peut être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 12 jours entre applications.

Classement toxicologique proposé :

Xn Nocif

N Dangereux pour l'environnement

R36 Irritant pour les yeux.

R 40 Effet cancérogène suspecté : preuves insuffisantes

R 43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

R 50 Très toxique pour les organismes aquatiques.

R 63 Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.

Résultats en essais de plein champ

Ces essais ont été conduits en accord avec la méthode CEB n°7 pour les essais français : «Méthode d'étude de l'efficacité au champ de fongicides destinés à la lutte contre le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B.C.) Berl. Et de Toni)». Les essais ont été conduits avec une cadence de traitement de 12 jours, cette cadence pouvant osciller ponctuellement entre 10 et 15 jours en fonction de contraintes matérielles, la plupart du temps liées à la pluie. Le nombre d'application est de 6 applications consécutives au minimum, sauf dans les essais programmes.

Le dispositif retenu est un dispositif en bloc, avec 4 répétitions, avec témoins inclus. Les notations sont effectuées sur feuilles et sur grappes, les échantillons étant de 100 feuilles et de 50 grappes au minimum par parcelle. Les efficacités sont calculées sur les intensités d'attaque, généralement sur l'observation finale ou la plus représentative de l'essai.

Les essais sont analysés à l'aide d'une analyse de variance, les comparaisons de moyennes étant effectués à l'aide d'un test de Newman-keuls, tant sur les essais que les regroupements d'essais.

Selon les essais les références commerciales diffèrent. Les deux types d'essai seront donc présentés séparément. Les essais sont généralement contaminés et brumisés.

Efficacité sur mildiou

Efficacité sur feuilles

Récapitulatif pluriannuel (3 années 2003 à 2005)

Tableau III : Efficacité sur feuilles - série 2003-2005 – contamination artificielle - intensité (% attaque) sur témoin: 23 à 87 % - 7 essais

Efficacy on leaves – trials from 2003 to 2005 – artificial contamination - intensity (% of attack) on the untreated check: 23 to 87 % - 7 trials

| | 7 essais en g s.a | % efficacité moyenne | Observation finale | |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|-------|
| | | | maxi | mini |
| PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 75+750 | 82,96 a | 92,30 | 69,29 |
| Cymoxanil + mancozèbe | 120+1395 | 71,47 b | 92,50 | 42,57 |

PHF0810 montre qu'il a un meilleur niveau de protection contre le mildiou que la référence CEB en fin d'essai.

Efficacité sur grappes : rot brun

Récapitulatif pluriannuel (2 années 2004 et 2005)

Tableau IV : Efficacité sur grappes - série 2004 et 2005 – rot brun - intensité (% attaque) sur témoin: 1,5 à 70 % - 9 essais

Efficacy on grapes – trials 2004 and 2005 – brown rot – intensity (% of attack) on the untreated check: 1,5 to 70 % - 9 Trials

| Dose | g ma/ha | % efficacité 9 essais | Rot brun | |
|-------------------------------|----------|--------------------------|----------|-----|
| | | | min | max |
| PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 75+750 | 96,2 a | 73 | 100 |
| Diméthomorphe + folpel | 226+1200 | 97,2 a | 83 | 100 |

PHF0810 montre qu'il a un niveau de protection contre le mildiou équivalent à la référence commerciale que la référence diméthomorphe + folpel en fin d'essai.

Essai 2006

Tableau V : Efficacité sur grappes – 2006 – rot brun - intensité (% attaque) sur témoin: 70,1 %
Efficacy on grapes – 2006 – brown rot – intensity (% of attack) on the untreated check: 70,1 %

| Dose | g ma/ha | % efficacité | |
|-------------------------------|----------|--------------|---|
| Amisulbrom | 75 | 92,5 | b |
| PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 75+750 | 96,4 | b |
| Folpel | 750 | 68,0 | a |
| Cymoxanil + mancozèbe | 120+1395 | 91,1 | b |
| Pyraclostrobin + folpel | 100+1000 | 96,9 | b |
| Diméthomorphe + folpel | 226+1200 | 92,2 | b |

L'efficacité de PHF0810 est la combinaison de l'action de deux substances actives efficaces contre le mildiou. Si individuellement elles ne peuvent pas nécessairement amener une performance du niveau des meilleures références, comme le folpel dans cet essai, leur association dans PHF0810 apporte une efficacité équivalente aux meilleures références.

Efficacité en programme

Programmes testés

| N° | Produit | Dose (g ma/ha) | Code application |
|----------------------------|---|-------------------------|------------------|
| 1 - témoin | Témoin | / | / |
| 2 PHF0810 en Pré-fleur | PHF0810 (amisulbrom + folpel) Diméthomorphe + folpel | 75+750 226+1200 | ABC DEF |
| 3 PHF0810 en Post-fleur | Fosétyl-AI + folpel PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 2000 + 1000 75+750 | ABC DEF |
| 4 Programme référence | Fosétyl-AI + folpel Diméthomorphe + folpel | 2000 + 1000 226+1200 | ABC DEF |

Tableau VI : Mildiou, % efficacité sur rot brun par rapport au témoin - 2008 – 3 essais - intensité (% attaque) sur témoin: 34 à 60 % - observation finale

Downy mildew, efficacy on brown rot in % calculated on the untreated check – 2008 – 3 trials- intensity (% of attack) on the untreated check: 34 to 60 % - last assessment

| | Essai 1 | Essai 2 | Essai 3 | Moyenne |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 2 PHF0810 en Pré-fleur | 100 b | 100 b | 98.78 b | 99.59 a |
| 3 PHF0810 en Post-fleur | 99.96 b | 99.57 b | 94.6 b | 98.04 a |
| 4 Programme référence | 99.97 b | 100 b | 98.69 b | 99.45 a |

Intégré dans un programme à raison de trois traitements consécutifs, PHF0810 assure une protection équivalente aux meilleures références que ce soit en traitement de début de saison ou dans les traitements suivants.

PHF0810 a montré qu'il pouvait être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 12 jours entre applications, quel que soit le stade de la vigne. En cas de pousse exceptionnellement rapide ou de pression exceptionnellement forte, la cadence doit être réduite à 10 jours environ.

Efficacité sur excoriose

Les essais ont été réalisés avec des programmes de traitement à deux applications, le premier traitement est réalisé au stade pointe verte, le second au stade extrémité de la pousse bien visible.

Récapitulatif pluriannuel (4 années 2004 à 2007)

Tableau VII : Excoriose, % efficacité sur rameau par rapport au témoin - série 2004-2007 – 8 essais - intensité (% attaque) sur témoin: 4 à 38 %

Dead arm disease (Phomopsis) - efficacy on stems in % calculated on the untreated check – trails 2004-2007 – 8 trials- intensity (% of attack) on the untreated check: 4 to 38 %

| Dose g ma/hl | Floraison | | | Repos végétatif | | |
|--------------------------------------|-----------|------|------|-----------------|------|------|
| | Moyenne | Min | Max | Moyenne | Min | Max |
| PHF0810 (amisulbrom + folpel) 7,5+75 | 75,7 a | 49,6 | 98,6 | 69,3 a | 0,0 | 96,9 |
| mancozèbe 240 | 78,5 a | 23,6 | 97,3 | 71,4 a | 18,5 | 95,6 |

PHF0810 montre dans le cadre d'une double application destinée à lutter contre l'excoriose une efficacité équivalente à la référence mancozèbe appliquée elle aussi deux fois.

Efficacité sur Brenner

Se reporter à la méthode des essais mildiou.

Récapitulatif pluriannuel (2 années 2004 et 2006)

Tableau 7 : Brenner, % efficacité sur feuilles par rapport au témoin – observation du nombre de tâches

Rot Brenner - efficacy on leaves in % calculated on the untreated check – Assessment on the number of spot.

| | | 2004 | | 2006 | |
|-------------------------------|---------|---------|---|---------|---|
| Date observation | | 28-juil | | 02-août | |
| Dose | g ma/ha | | | | |
| PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 75+750 | 94,0 | b | 63,2 | a |
| Mancozèbe | 2813 | 98,8 | b | 68,4 | a |

Tableau 7 : Brenner, % efficacité sur feuilles par rapport au témoin – observation du nombre de tâches

Dans ces essais conduits selon la méthode CEB, PHF0810 montre qu'il a un niveau d'efficacité comparable à la référence mancozèbe.

Sélectivité et impact sur les fermentations

PHF0810 a eu un comportement identique aux références sur les cépages testés, qu'ils soient de cuves ou de table. Les cépages testés sont :

- ✓ Italia, Alphonse Lavallée, Muscat de Hambourg, Chasselas
- ✓ Aligoté, Cabernet sauvignon, Carignan, Chardonnay, Chenin, Gamay, Grenache, Gros Mansen, Mauzac, Merlot, Pinot auxerrois, Pinot noir, Sauvignon, Syrah, Ugni blanc, Folla rodonda, Hybrido n°3, Moscato, Verduzzo

Impact sur les auxiliaires

PHF0810 a montré un bon comportement à travers les 6 essais menés entre 2004 et 2005.

Sur *Typhlodromus pyri*, PHF0810 a été considéré comme non toxique à modérément toxique.

Sur *Kampimodromus aberrans*, PHF0810 a été considéré comme non toxique à modérément toxique.

Conclusion

PHF0810 est une nouvelle solution pour lutter contre le mildiou de la vigne. Il a une excellente efficacité préventive et une forte persistance d'action, que ce soit sur feuilles ou sur grappes. Cette excellente efficacité est complétée par sa parfaite sélectivité vis-à-vis des raisins de tables ou de cuve et son absence d'impact sur les fermentations. Cet excellent comportement, équivalent ou supérieur aux références, lui permet de s'intégrer dans l'ensemble des programmes de lutte contre le mildiou, que ce soit en début ou au cours des traitements suivants. PHF0810 est également efficace contre l'excoriose et le Brenner. Placé judicieusement dans un programme il contrôle également ces deux maladies.

Doté d'un mode d'action différent de celui des autres fongicides, il peut s'intégrer dans les programmes de lutte les plus performants contre le mildiou de la vigne avec un intervalle entre traitement de 12 jours en conditions normales, ou à intervalle réduit en cas de conditions exceptionnelles de pression de maladie, due aux conditions climatiques et/ou à la vitesse de pousse de la vigne.

Ces caractéristiques alliées à un profil toxicologique et écotoxicologique favorable ouvrent à PHF0810 une place de choix dans les futurs programmes de lutte anti-mildiou de la vigne.

Bibliographie

R. Hugues, N. Hasunuma : AFPP – 8^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes - Tours - 5 et 6 décembre 2006 - Amisulbrom : nouveau fongicide contre les oomycètes.

Nishioka M., Hasunuma N., 2004-NC224, a novel fungicide- Effect on life cycle of *P. infestans* and biochemical mode of action.

FRAC : http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_CODE_LIST.pdf

P. Haudrechy: Amisulbrom (NC224) – Biological data summary for Table 2 (Provisionnal rating) at 11th Euroblight Workshop – Nissan Chemical Industries, Ltd. March 21, 2008.

**AFPP – 9^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 8 ET 9 DECEMBRE 2009**

PHF0811, NOUVEAU FONGICIDE ANTI-MILDIU DE LA VIGNE

P. ARMENGAUD (1)

(1) Philagro France-Parc d'affaires de Crecy – 2 rue Claude Chappe - 69771 St Didier Au Mt D'Or

RESUME

PHF0811 est un nouveau fongicide anti-mildiou de la vigne également efficace contre le black-rot, le Brenner (rougeot parasitaire) et l'excoriose. Ce fongicide est une association d'amisulbrom et de mancozèbe.

L'amisulbrom est une nouvelle substance active de la famille des sulfonamides. Il représente un nouveau mode d'action pour lutter contre le mildiou de la vigne, mode d'action non partagé avec les produits actuellement sur le marché. L'activité de ce composé s'exerce principalement sur les champignons oomycètes responsables de nombreuses maladies dont le mildiou de la vigne. Il perturbe l'émission, la mobilité et la germination des zoospores, ainsi que la germination et la formation des sporanges. Il est très actif sur grappes et sur feuilles. Produit translaminaire, il a une excellente persistance d'action et une grande résistance au lessivage.

PHF0811 est parfaitement sélectif de la vigne et présente un profil toxicologique et écotoxicologique favorable.

Dans les essais, PHF0811 a montré qu'il pouvait être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 12 jours entre applications, quel que soit le stade de la vigne.

Ce nouveau fongicide issu de la recherche de Nissan Chemical Industries Ltd sera commercialisé par PHILAGRO France.

Mots-clés : PHF0811, fongicide, amisulbrom, mancozèbe, vigne, mildiou, Brenner, excoriose, black-rot, composition, cadence, programme de traitement.

SUMMARY

PHF0811, A NEW FUNGICIDE AGAINST DOWNY MILDEW ON VINE

PHF0811 is a new fungicide against downy mildew on vine. It is based on a mixture of amisulbrom and mancozèbe, and it's also effective against black-rot, rot Brenner and dead arm disease (*Phomopsis*).

Amisulbrom is a new active substance belonging to the chemical class of sulfonamides. It has a new mode of action, and it's effective against the oomycetes fungus, responsible for a large number of diseases like downy mildew on vine. It's active against the germination, the mobility and liberation of the zoospores, but also against germination and formation of the sporanges. It's very active on grapes and leaves. This product, with a translaminar action, offers a long lasting protection as well as good rain fastness.

PHF0811 is perfectly selective of the crops and has a toxicological and environmental profile very favourable.

Our trials, PHF0811 performs very well in all types of fungicide programs, within 3 treatments maximum per season and 12 days of spray interval.

This new fungicide, discovered by the research of Nissan Chemical Industries Ltd, will be introduced on the market by PHILAGRO France.

Key words: PHF0811, fungicide, amisulbrom, mancozeb, vine, downy mildew, rot Brenner, dead arm disease, black-rot, composition, spray interval, program of crop protection.

Introduction :

Le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) est l'une des deux maladies les plus dommageables à la culture de la vigne. Son potentiel infectieux est très dépendant des conditions climatiques, et, dans les conditions les plus favorables à son développement, le mildiou de la vigne est capable d'entraîner des pertes de 50 % de la vendange, voire la totalité dans les cas extrêmes. Cette menace majeure demande une vigilance de tous les instants aux viticulteurs, et la maîtrise de son développement est le facteur clé de la qualité du vin produit au cours de millésimes comme 2007 ou 2008.

PHF0811 est un nouveau fongicide à base d'amisulbrom et de mancozèbe. L'amisulbrom, une nouvelle substance active fongicide, est issue de la recherche de Nissan Chemical Industries. Découverte en 1999, elle s'est révélée très active contre les champignons oomycètes responsables de très nombreux mildioux. Elle a été largement développée dès 2002 dans de nombreux pays, seule ou au travers d'associations avec d'autres fongicides. Cette communication résume les principales caractéristiques de PHF0811 et quelques informations sur ses performances biologiques contre le mildiou de la vigne.

Propriétés biologiques

Spectre d'activité

L'activité de l'amisulbrom est très ciblée sur les oomycètes

Tableau I : Activité préventive de l'amisulbrom sur feuilles
Preventive activity of amisulbrom on leaves

| Pathogène Culture | <i>Phytophthora infestans</i> | | <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | <i>Plasmopara viticola</i> |
|----------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Pomme de terre EC90 ppm | Tomate EC90 ppm | Concombre EC90 ppm | Vigne EC90 ppm |
| Amisulbrom | 1 | 1-5 | 1 | 1-5 |
| Azoxystrobine | 5 | 5 | 1-5 | 5 |
| Cyazofamide | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Fluazinam | 10-50 | - | - | - |

Le mancozèbe est actif sur un large spectre de maladies fongiques comme *Plasmopara viticola*, responsable du mildiou de la vigne, mais aussi le black-rot (*Guignardia bidwellii*), le Brenner (*Pseudopeziza tracheiphila*), l'excoriose (*Phomopsis viticola*). Ce fongicide est également actif contre de nombreux autres champignons dommageables à un grand nombre d'autres cultures.

Mode d'action

Mode d'action biochimique

Amisulbrom inhibe la respiration mitochondriale du champignon à 1 µM, il est spécifique de la respiration mitochondriale des oomycètes. Il agit par inhibition de la respiration mitochondriale en intervenant sur le transport d'électrons au niveau du complexe III. Amisulbrom appartient à la famille des Qil : il se fixe sur la face interne du cytochrome B (d'après R Hugues, Hasunuma N – 2006).

Selon le groupe de surveillance de la résistance aux fongicides (FRAC), l'amisulbrom correspond à un mode d'action de type 21 avec pour code du site d'action « C. respiration, avec le code C4 : complexe III of fungal respiration : cytochrome b1 (ubiquinone reductase) at

Qi site » et appartient aux fongicides Qil (Quinone inside inhibitors). Ces fongicides inhibent la respiration et la production d'énergie au niveau du site Qi. Ce sont des fongicides à site d'action unique. Ils présentent une systémie limitée.

Des tests de grande ampleur dans les pays de l'Europe du Nord (France, Royaume-Uni, Pays-Bas) sur *P. infestans* n'ont pas mis en évidence de développement de résistance ni de résistance croisée du NC-224 (amisulbrom) à ce jour (d'après P. Haudrechy – 2008).

Le mancozèbe est un fongicide appartenant à la famille des dithiocarbamates, actif sur un large spectre de maladies fongiques comme *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou de la pomme de terre ou *Plasmopora viticola*, responsable du mildiou de la vigne. Il présente l'avantage d'être un fongicide de type multisite et donc non soumis au risque d'apparition de résistance.

Les deux matières actives sont complémentaires dans le cadre de leur association à travers le PHF0811.

Mode d'action biologique

L'activité de l'amisulbrom est particulièrement marquée sur les champignons oomycètes car elle s'exprime en différents points du cycle du parasite :

- émission des zoospores
- mobilité des zoospores
- germination des sporanges et zoospores
- formation des sporanges

On observe également une très nette diminution du nombre et de la viabilité des oospores de *Phytophthora infestans* après une exposition à l'amisulbrom (d'après Nishioka M, Hasunuma N – 2004).

Tableau II : Activité de l'amisulbrom sur le cycle de *Phytophthora infestans*
Activity of amisulbrom on the biological cycle of *Phytophthora infestans*

| CI50 (µg/ml) | | | | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Traitement | Emission des zoospores | Mobilité des zoospores | Germination des zoosporanges | Formation des zoosporanges | Germination des cystospores | Croissance mycélienne |
| amisulbrom | 0.1 | – 0.1 | – 0.1 | 0.01 – 0.1 | – 0.1 | 0.1 – 1 |
| diméthomorphe | >10 | >10 | 0.1 – 1 | NT | NT | 0.1 - 1 |
| fluazinam | 1 – 10 | 0.1 – 1 | – 0.1 | NT | 0.1 – 1 | 10 – 100 |
| cymoxanil | 1 – 10 | 0.1 - 1 | 0.01 – 0.1 | NT | NT | 0.1- 1 |

NT : non testé

Formulation

Substance active

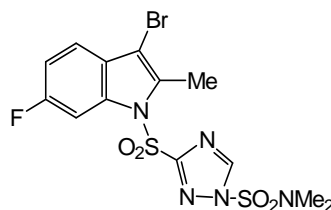
Nom commun : amisulbrom (proposé à l'ISO)

N°CAS : 348635-87-0

Nom chimique (IUPAC) : 3-(3-bromo-6-fluoro-2méthylindol-1-ylsulfonyl-N,N-diméthyl-1,2,4-triazole-1-sulfonamide

Classe chimique : sulfonamide

Formule moléculaire développée :

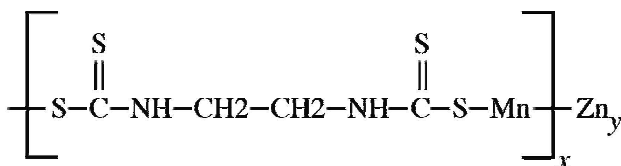


Formule brute :



Nom commun (ISO) : mancozèbe
 N°CAS : 8018-01-7 (formerly 8065-67-5)
 Nom chimique (IUPAC) : manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt

Formule moléculaire développée :



Formule brute : $(\text{C}_4\text{H}_6\text{MnN}_2\text{S}_4)_x(\text{Zn})_y$

Formulation

PHF0811 est le mélange formulé de deux substances actives que sont l'amisulbrom (NC-224) et le mancozèbe. Il se présente sous forme de granulés dispersibles dans l'eau. Sa composition et les doses d'emploi proposées à l'autorisation sont les suivantes :

Composition de PHF0811

| | Amisulbrom | Mancozèbe |
|---------|------------|-----------|
| PHF0811 | 3% | 60% |

Usages et doses proposés pour l'autorisation de PHF0811

| Usage | Dose (kg/ha) | Dose (g/ha) | |
|------------------------------|--------------|-------------|-----------|
| | | NC-224 | Mancozèbe |
| Mildiou de la pomme de terre | 2 | 60 | 1200 |
| Mildiou de la vigne | 2,5 | 75 | 1500 |
| Black-rot de la vigne | | | |
| Brenner de la vigne | | | |
| Excoriose de la vigne | 0,25 kg/hl | 7,5 g/hl | 150 g/hl |

PHF0811 s'utilise en pulvérisation sur le feuillage et de manière préventive. Les applications sont conseillées à une cadence de 12 jours sur mildiou de la vigne. Le nombre d'applications maximum est de 3 par saison.

Classement toxicologique proposé :

Xn Nocif

N Dangereux pour l'environnement

R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.

R63 : Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.

R50/53 : Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

Résultats en essais de plein champ

Ces essais ont été conduits en accord avec la méthode CEB n°7 pour les essais français : «Méthode d'étude de l'efficacité au champ de fongicides destinés à la lutte contre le mildiou de la vigne (*Plasmopora viticola* (B.C.) Berl. Et de Toni)». Les essais ont été conduits avec une cadence de traitement de 12 jours, cette cadence pouvant osciller ponctuellement entre 10 et 15 jours en fonction de contraintes matérielles, la plupart du temps liées à la pluie. Le nombre d'application est de 6 applications consécutives au minimum, sauf dans les essais programmes.

Le dispositif retenu est un dispositif en bloc, avec 4 répétitions, avec témoins inclus. Les notations sont effectuées sur feuilles et sur grappes, les échantillons étant de 100 feuilles et de 50 grappes au minimum par parcelle. Les efficacités sont calculées sur les intensités d'attaque, généralement sur l'observation finale ou la plus représentative de l'essai.

Les essais sont analysés à l'aide d'une analyse de variance, les comparaisons de moyennes étant effectués à l'aide d'un test de Newman-keuls, tant sur les essais que les regroupements d'essais.

Selon les essais les références commerciales diffèrent. Les deux types d'essai seront donc présentés séparément. Les essais sont généralement contaminés et brumisés.

Efficacité sur mildiou

Efficacité sur feuilles

Récapitulatif pluriannuel (3 années 2003 à 2005)

Tableau III : Efficacité sur feuilles - série 2003-2005 – contamination artificielle - intensité (% attaque) sur témoin: 33 à 65 % - 10 essais

Efficacy on leaves – trials from 2003 to 2005 – artificial contamination - intensity (% of attack) on the untreated check: 33 to 65 % - 10 trials

| | 10 essais | % efficacité moyenne | Observation finale | |
|----------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|-----|
| | <i>g ma/ha</i> | | min | max |
| PHF0811 (amisulbrom + mancozèbe) | 75+1500 | 90,4 a | 61 | 100 |
| Cymoxanil + mancozèbe | 120+1395 | 86,3 a | 50 | 100 |

PHF0811 montre qu'il a un niveau de protection contre le mildiou au moins équivalent à celui de la référence CEB en fin d'essai.

Efficacité sur grappes : rot brun

Récapitulatif pluriannuel (2 années 2004 et 2005)

Tableau IV : Efficacité sur grappes - série 2004 et 2005 – rot brun - intensité (% attaque) sur témoin: 1,5 à 70 % - 8 essais

Efficacy on grapes – trials 2004 and 2005 – brown rot – intensity (% of attack) on the untreated check: 1,5 to 70 % - 8 Trials

| <i>Dose</i> | 8 essais | % eff moyenne | Observation finale | |
|----------------------------------|----------------|------------------|--------------------|-----|
| | <i>g ma/ha</i> | | min | max |
| PHF0811 (amisulbrom + mancozèbe) | 75+1500 | 97,3 a | 82 | 100 |
| Cymoxanil + mancozèbe | 120+1395 | 91,2 a | 76 | 100 |
| Diméthomorphe + folpel | 226+1200 | 97,2 a | 83 | 100 |

PHF0811 montre qu'il a un niveau de protection contre le mildiou au moins équivalent à celui de la référence CEB en fin d'essai ainsi que celui de la référence commerciale.

Efficacité sur grappes : rot gris

Récapitulatif pluriannuel (2 années 2004 et 2005)

Tableau V : Efficacité sur grappes - série 2004 et 2005 – rot gris - intensité (% attaque) sur témoin: 18 à 44 % - 3 trials

Efficacy on grapes – trials 2004 and 2005 – grey rot – intensity (% of attack) on the untreated check: 18 to 44 % - 3 Trials

| Dose | g ma/ha | % eff Rot gris | | |
|----------------------------------|----------|----------------|-----|-----|
| | | 3 essais | min | max |
| PHF0811 (amisulbrom + mancozèbe) | 75+1500 | 99,3 a | 98 | 100 |
| Diméthomorphe + folpel | 226+1200 | 99,9 a | 100 | 100 |

PHF0811 montre qu'il a un niveau de protection contre le mildiou équivalent à celui de la référence commerciale.

Efficacité en programme

Programmes testés

| N° | Produit | Dose (g ma/ha) | Code application |
|----------------------------|------------------------------------|----------------|------------------|
| 1 - témoin | Témoin | / | / |
| 2 PHF0811 en Pré-fleur | PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 75+750 | ABC |
| | Diméthomorphe + folpel | 226+1200 | DEF |
| 3 PHF0811 en Post-fleur | Fosétyl-Al + folpel | 2000 + 1000 | ABC |
| | PHF0810 (amisulbrom + folpel) | 75+750 | DEF |
| 4 Programme référence | Diméthomorphe + folpel | 226+1200 | ABC |
| | Pyraclostrobine + métirame de Zinc | 100+1100 | DEF |

Tableau VI : Mildiou, % efficacité sur feuilles par rapport au témoin - 2007 – 3 essais - intensité (% attaque) sur témoin: 46 à 83 % - observation finale

Downy mildew, efficacy on leaves in % calculated on the untreated check – 2007 – 3 trials - intensity (% of attack) on the untreated check: 46 to 83 % - last assessment

| Code essai | Essai 1 | | Essai 2 | | Essai 3 | | Moyenne | |
|----------------------------|---------|---|---------|----|---------|---|---------|---|
| 2 PHF0811 en Pré-fleur | 96,6 | c | 81 | bc | 89,7 | c | 89,1 | a |
| 3 PHF0811 en Post-fleur | 92,6 | B | 77,2 | b | 63,5 | b | 77,8 | a |
| 4 Programme référence | 97,1 | C | 82,8 | bc | 65,7 | b | 81,9 | a |

Tableau VII : Mildiou, % efficacité sur grappes par rapport au témoin - 2007 – 2 essais - intensité (% attaque) sur témoin: 96 à 99 % - observation finale (essai 1 grêlé).

Downy mildew, efficacy on grapes in % calculated on the untreated check – 2007 – 2 trials - intensity (% of attack) on the untreated check: 96 to 98 % - last assessment

| Code essai | Essai 3 | | Essai 2 | | Moyenne | |
|----------------------------|---------|---|---------|---|---------|---|
| 2 PHF0811 en Pré-fleur | 95,3 | b | 96 | b | 95,65 | a |
| 3 PHF0811 en Post-fleur | 94,9 | b | 96,7 | b | 95,8 | a |
| 4 Programme référence | 90,8 | b | 95,1 | b | 92,95 | a |

Intégré dans un programme à raison de trois traitements consécutifs, PHF0811 assure une protection équivalente aux meilleures références que ce soit en traitement de début de saison ou dans les traitements suivants, sur grappes ou sur feuilles.

PHF0811 a montré qu'il pouvait être intégré dans un programme de traitements fongicides à raison de 3 applications maximum par saison en respectant une cadence de 12 jours entre applications, quel que soit le stade de la vigne. En cas de pousse exceptionnellement rapide ou de pression exceptionnellement forte, la cadence doit être réduite à 10 jours environ.

Efficacité sur black-rot

Le matériel et les méthodes ont été identiques à celle du mildiou, la cadence de traitement ayant oscillé entre 10 et 12 jours en général

Récapitulatif pluriannuel (3 années 2003 à 2005)

Tableau VIII : Black-rot, % efficacité sur grappes par rapport au témoin - série 2003-2005 – 7 essais - intensité (% attaque) sur témoin: 4 à 99 %

Black-rot, efficacy on grapes in % calculated on the untreated check – trails 2003-2005 – 7 trials- intensity (% of attack) on the untreated check: 4 to 99 %

| témoin: 4 à 99 % | | Moyenne 7 essais | |
|----------------------------------|---------|---------------------|----|
| PHF0811 (amisulbrom + mancozèbe) | 75+1500 | 84,6 | ab |
| Mancozèbe | 1500 | 82,3 | b |
| Mancozèbe | 2813 | 89,9 | a |

PHF0811 montre qu'il apporte une bonne protection contre le black-rot, statistiquement non différente de la référence CEB. Intégré dans un programme, PHF0811 convient pour maîtriser les deux maladies quand elles constituent une menace conjointe, comme cela est souvent le cas dans de nombreux vignobles.

Efficacité sur excoriose

Les essais ont été réalisés avec des programmes de traitement à deux applications, le premier traitement est réalisé au stade pointe verte, le second au stade extrémité de la pousse bien visible.

Récapitulatif pluriannuel (4 années 2004 à 2007)

Tableau IX : Excoriose, % efficacité sur rameau par rapport au témoin - série 2004-2007 – 8 essais - intensité (% attaque) sur témoin: 4 à 38 %

Dead arm disease (Phomopsis) - efficacy on stems in % calculated on the untreated check – trails 2004-2007 – 8 trials- intensity (% of attack) on the untreated check: 4 to 38 %

| témoin: 4 à 38 % | | Floraison | | | Repos végétatif | | |
|----------------------------------|----------------|-----------|------|------|-----------------|------|------|
| | | Moyenne | Min | Max | Moyenne | Min | Max |
| <i>Dose</i> | <i>g ma/hl</i> | | | | | | |
| PHF0811 (amisulbrom + mancozèbe) | 7,5+150 | 72,7 a | 34,4 | 98,1 | 64,1 a | 24,5 | 95,6 |
| mancozèbe | 240 | 78,5 a | 23,6 | 97,3 | 71,4 a | 18,5 | 95,6 |

PHF0811 montre dans le cadre d'une double application destinée à lutter contre l'excoriose une efficacité équivalente à la référence mancozèbe appliquée elle aussi deux fois.

Efficacité sur Brenner

Se reporter à la méthode des essais mildiou

Récapitulatif pluriannuel (3 années 2004 à 2007)

Tableau X : Brenner, % efficacité sur feuilles par rapport au témoin – observation du nombre de tâches

Rot Brenner - efficacy on leaves in % calculated on the untreated check – Assessment on the number of spot.

| | | 2004 | 2005 | 2007 |
|----------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Unité témoin | | nb de taches / parcelle | nb de feuilles attaquées / parcelle | nb de taches / parcelle |
| Valeur témoin | | 21 a | 72,3 a | 59,5 c |
| <i>Dose</i> | <i>g ma/ha</i> | | | |
| PHF0811 (amisulbrom + mancozèbe) | 75+1500 | 95,2 b | 73,7 b | 63,2 a |
| mancozèbe | 2813 | 98,8 b | 84,2 b | 68,4 a |

Dans ces essais conduits selon la méthode CEB, PHF0811 montre qu'il a un niveau d'efficacité statistiquement comparable à la référence mancozèbe.

Sélectivité et impact sur les fermentations

PHF0811 a eu un comportement identique aux références sur les cépages testés, qu'ils soient de cuves ou de table. Les cépages testés sont :

- ✓ Italia, Alphonse Lavallée, Muscat de Hambourg, Chasselas
- ✓ Aligoté, Cabernet sauvignon, Carignan, Chardonnay, Chenin, Gamay, Grenache, Gros Mansen, Mauzac, Merlot, Pinot auxerrois, Pinot noir, Sauvignon, Syrah, Ugni blanc, Folla rodonda, Hybrido n°3, Moscato, Verduzz o

Impact sur les auxiliaires

PHF0811 a montré un bon comportement à travers les 6 essais menés entre 2004 et 2005.

Sur *Typhlodromus pyri*, PHF0811 a été considéré comme modérément toxique à toxique et une fois neutre. Sur *Kampimodromus aberrans*, PHF0811 a été considéré 2 fois comme neutre à faiblement toxique et un fois toxique.

Conclusion

PHF0811 est une nouvelle solution pour lutter contre le mildiou de la vigne. Il a une excellente efficacité préventive et une forte persistance d'action, que ce soit sur feuilles ou sur grappes. Cette excellente efficacité est complétée par sa parfaite sélectivité vis-à-vis des raisins de tables ou de cuve et son absence d'impact sur les fermentations. Cet excellent comportement, équivalent ou supérieur aux références, lui permet de s'intégrer dans l'ensemble des programmes de lutte contre le mildiou, que ce soit en début ou au cours des traitements suivants.

PHF0811 est également efficace contre le black-rot, l'excoriose et le Brenner. Placé judicieusement dans un programme il contrôle également ces trois maladies, qui ne peuvent ainsi devenir majeure pour le viticulteur.

Doté d'un mode d'action différent de celui des autres fongicides, il peut s'intégrer dans les programmes de lutte les plus performants contre le mildiou de la vigne avec un intervalle entre traitement de 12 jours en conditions normales, ou à intervalle réduit en cas de

conditions exceptionnelles de pression de maladie, due aux conditions climatiques et/ou à la vitesse de pousse de la vigne.

Ces caractéristiques alliées à un profil toxicologique et écotoxicologique favorable ouvrent à PHF0811 une place de choix dans les futurs programmes de lutte anti-mildiou de la vigne.

Bibliographie

R. Hugues, N.Hasunuma : AFPP – 8^{ème} Conférence Internationale sur les maladies des plantes - Tours - 5 et 6 décembre 2006 - Amisulbrom : nouveau fongicide contre les oomycètes.

Nishioka M.,Hasunuma N., 2004-NC224, a novel fungicide- Effect on life cycle of *P. infestans* and biochemical mode of action.

FRAC : http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_CODE_LIST.pdf

P. Haudrechy: Amisulbrom (NC224) – Biological data summary for Table 2 (Provisionnal rating) at 11th Euroblight Workshop – Nissan Chemical Industries, Ltd. March 21, 2008.

**AFPP - 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT DISEASES
TOURS – FRANCE – 8 AND 9 DECEMBER 2009**

**RESULTS OF TWO-YEARS EXPERIMENTAL TRIALS WITH NATURAL PRODUCTS
AGAINST *PLASMOPARA VITICOLA* IN ORGANIC VITICULTURE**

A. LA TORRE, S. TALOCCI and L. PINTO

CRA – plant pathology research center
via carlo giuseppe bertero,22 00156 rome, italy
anna.latorre@entecra.it

SUMMARY

In organic farming the copper compounds are the only substances that can be used against downy mildew. As the copper causes problems of environmental impact, the Regulation EC n. 473/2002 fixed a ceiling on its use. Two-years experimental trials (2007-2008) were carried out in organic vineyard in order to evaluate anti-downy mildew effectiveness of natural products. Homeopathic products, resistance promoters, plant extracts and potassium bicarbonate have been tested. In 2007, a year of limited infection pressure, these products were able to control the disease, whereas in 2008, a year of high risk of disease, the natural products were scarcely effective. In conclusion, the natural products can be used in alternative to copper in condition of low or medium risk of infection, while, in conditions of high infection pressure, it is possible to use the natural products in combination with copper just to reduce the copper input.

Key words: Organic farming, copper, fungicide, natural product, *Plasmopara viticola*

RÉSUMÉ

**RÉSULTATS DE DEUX ANNÉES D'ÉPREUVES AVEC DES PRODUITS NATURELS
CONTRE *PLASMOPARA VITICOLA* EN VITICULTURE BIOLOGIQUE**

En agriculture biologique les composés de cuivre sont les seules substances qui peuvent être utilisées contre le mildiou de la vigne. En consideration des problèmes pour l'environnement que le cuivre cause, l'Union Européenne, avec le Règlement CE n. 473/2002, a limité les apports de cuivre. Pour rechercher de nouvelles voies de lutte contre le mildiou, nous avons conduit, pour deux années (2007-2008), des expérimentations en viticulture biologique pour évaluer l'efficacité de produits naturels contre le mildiou. Produits homéopathiques, promoteur de résistance, extraits de plantes et bicarbonate de potassium ont été testés. En 2007, année de réduite pression de mildiou, ces produits se montrèrent capables de contrôler la maladie pendant qu'en 2008, année de forte pression de mildiou, les produits naturels se révélèrent insuffisamment efficaces.

Mots-clés : Agriculture biologique, cuivre, fongicide, produit naturel, *Plasmopara viticola*

INTRODUCTION

Grape vine downy mildew, caused by the fungal parasite *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni, constitutes a threat for the vineyards. In organic farming only a few fungicides can be used and the copper is the only active substance able to control downy mildew. Since this heavy metal causes problems of environmental impact (Brandolini *et al.*, 1995), the European Community, by the Regulation EC n. 473/2002, fixed a ceiling on use of copper compounds in organic farming. In order to test the effectiveness, against grape downy mildew, of natural products for copper replacement or for copper reduction, two-years experimental trials were carried out in organic vineyards.

MATERIALS AND METHODS

The trials were carried out according to the Guidelines EPPO/OEPP PP 1/31 (3). Data related to the farm, located near Rome (central Italy), are reported in Table I. The theses treated with the natural products have been compared with 1 untreated control, in order to follow the course of infection, and with 1 standard farm reference thesis (standard), where the treatments were carried out according to the usual farm procedures. For each year of trial we tested anti-downy mildew effectiveness of homeopathic products (Biplantol), resistance promoters (Brotomax), plant extracts (Croplife) and potassium bicarbonate (Armicarb). The characteristics of fungicides used in the first year of activity (2007) are reported in Table II. The characteristics of anti-downy mildew tested in the second year of activity (2008) can be found in Table III. The products were used by themselves or in combination with copper treatments. The assessments to evaluate the effectiveness of treatments on leaves and bunches were carried out periodically on 100 leaves and 100 bunches for each replicate. We determined the percentage of leaves and bunches infected (Diffusion), the infection percentage index (I.% I.), calculated according to the Townsend-Heuberger formula and the efficacy index according to Abbott's formula. The obtained data, after arc sin transformation, was evaluated by the Duncan test.

Table I - Layout of the trials
Conditions expérimentales

| | |
|--|---|
| <i>Years of activity</i> | 2007 - 2008 |
| <i>Location</i> | Pavona (Rome) |
| <i>Farm</i> | Due Antichi Casali |
| <i>Grapevine</i> | Malvasia di Candia |
| <i>Rootstock</i> | <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i> Kober 5BB |
| <i>Year of planting</i> | 1966 |
| <i>Training system</i> | Tendone |
| <i>Planting space (m)</i> | 2,50 X 2,50 |
| <i>Experimental design</i> | Randomized blocks |
| <i>Number of replicates</i> | 4 |
| <i>N° plants/plot</i> | 12 |
| <i>Type of equipment</i> | Electrostatic atomizer Martignani KWH |
| <i>Year of conversion to organic farming</i> | 1989 |
| <i>Control body</i> | Suolo e Salute |

Table II - Characteristics of the anti-downy mildew products (1 year of activity)
 Caractéristiques des produits anti-mildiou (1 année d'activité)

| <i>These s</i> | <i>Product</i> | <i>Active ingredient</i> | <i>Formulat ion</i> | <i>a.i. proporti ons (% or g/L or mg/Kg)</i> | <i>Dose of produ ct (mL - g/hL or L/ha)</i> | <i>Dos e of Cu⁺⁺ (g/h L)</i> | <i>Dates of treatme nts</i> |
|----------------------|-------------------------|--|-----------------------------|--|---|---|--|
| Standar d | Cuproxa t liquido | Copper (from tribasic copper sulphate) | Suspensi on concentr ate | 195 | 250 | 48,7 5 | 8/05 |
| | Cuprobe nton blu | Copper (from tetracopper oxychloride & copper sulfate hydrated) | Wettable powder | 14 | 300 600 400 | 42 84 56 | 25/05- 31/05- 6/06- 26/06- 24/08- 9/07- 13/07- 20/07- 30/07- 8/08- 16/08 |
| Biplant ol + Coppe r | Biplantol agrar | Complex of active agents in homeopathic dynamized form (D6 - D200) | Liquid | | 1 | | 6/04- 7/05- 6/06- 6/07- 6/08- 4/09 |
| | Biplantol mycos V forte | Minerals in homeopathic and dynamic form (D6 - D200) | Liquid | | 1 | | 21/04- 22/05- 21/06- 20/07- 21/08 |
| | Cupravit idro WG | Copper (from copper hydroxide) | Water dispersibl e granules | 25 | 500 | 125 | 9/05- 6/06- 28/06 |
| Broto max + copper | Broto max x | Copper (Cu) 1,75% Zinc (Zn) 0,50% Manganese (Mn) 0,75% Nitrogen (urea) 8% | Liquid | 22,69 | 2,75 3,2 4,3 2 | | 08/05- 30/05- 31/07- 16/10 |
| | Cupravit idro WG | Copper (from copper hydroxide) | Water dispersibl e granules | 25 | 400 500 | 100 125 | 08/05- 30/05- 31/07 |
| Croplif e | Croplife | Citrofresh (orange extract) | Liquid | | 0,135 | | 15/02- 30/03- |

| | | | | | | | |
|--------|------------------------|--|--------|--|------------|-------|---|
| | | Ethyl alcohol Octanoic acid | | | | | |
| | Invigorator | Total nitrogen (N) Phosphorus (P) Phosphorus as P ₂ O ₅ Potassium (K) Potassium as K ₂ O Calcium (Ca) Magnesium (Mg) Sodium (Na) Sulphur (S) Boron (B) Iron (Fe) Manganese (Mn) Copper (Cu ⁺⁺) Zinc (Zn) Molybdenum (Mo) Cobalt (Co) | Liquid | 9,83 8,38 20,33 8,03 9,67 200 200 650 3500 150 850 370 350 140 10 5 | 7 | 1,568 | 12/04-31/05-8/06-12/09 |
| | Calcium carbonate | Calcium carbonate | Powder | 100 | 125 250 | | |
| Armibr | Eco Mate Armibr "O" | Potassium bicarbonate | Powder | 85 | 450 600 | | 22/05-30/05-6/06-13/06-21/06-28/06-6/07-20/07 |

For each thesis, except Brotomax and Croplife, the volume of water varied from 4 to 10 hl/ha according to the vegetative development of the plants.

In the Croplife thesis, according to details provided by the marketing Company, it was always distributed a fixed volume of water equal to 200 l/ha.

In the Brotomax thesis, according to details provided by the marketing Company, have been treated both trunks that the branches of plants. Therefore the volume of water varied from 10.5 to 16 hl/ha.

Table III - Characteristics of the anti-downy mildew products (II year of activity)
 Caractéristiques des produits anti-mildiou (II année d'activité)

| <i>These s</i> | <i>Product</i> | <i>Active ingredient</i> | <i>Formulat ion</i> | <i>a.i. proporti ons (% or g/L or mg/Kg)</i> | <i>Dose of produ ct (mL - g/hL or L/ha)</i> | <i>Dose of Cu⁺⁺ (g/hL)</i> | <i>Dates of treatmen ts</i> |
|---------------------|-------------------------|--|--------------------------|--|---|--|--------------------------------|
| Standar d | Cuproben ton blu | Copper (from tetracopper oxychloride & copper sulfate hydrated) | Wettable powder | 14 | 400 | 56 | 07/05-15/05-26/05-04/06-10/06 |
| | | | | | 600 | 84 | 16/06-20/06-28/07 |
| | | | | | 500 | 70 | 06/08 |
| | Zetaram 20L | Copper (from tetracopper chloride hydroxide) | Suspensi on concentr ate | 300 | 400 | 120 | 02/07 |
| | | | | | 350 | 105 | 10/07 |
| 300 | 90 | 22/08 | | | | | |
| Biplant ol + Copper | Biplantol agrar | Complex of active agents in homeopathic dynamized form (D6 - D200) | Liquid | - | 1 | 0 | 10/04-15/05-19/06-19/07-19/08 |
| | Biplantol mycos V forte | Minerals in homeopathic and dynamic form (D6 - D200) | Liquid | - | 1 | 0 | 26/04-04/06-04/07-04/08 |
| | Tepan 55 Cu | Copper (from copper sulfate pentahydrate) | Liquid concentr ate | 60 | 75 | 4,5 | 26/04 |
| 100 | | | | | 6 | 26/05-06/06-02/07 | |
| Brotom ax + copper | Brotomax | Copper (Cu) 1,75% Zinc (Zn) 0,50% Manganese (Mn) 0,75% Nitrogen (urea) 8% | Liquid | 22,69 | 1,75 | 39,7 | 26/04 |
| | | | | | 2,25 | 51 | 26/05 |
| | | | | | 3 | 68,1 | 14/07 |
| | Bordoflow | Copper (from copper sulfate neutralized with lime) | Suspensi on concentr ate | 124 | 400 | 49,6 | 26/04-26/05 |
| | | | | | 600 | 74,4 | 14/07 |
| Croplif e | Croplife | Citrofresh (orange extract) Ethyl alcohole Octanoid acid | Liquid | - | 0,135 0,270 0,405 | 0 | 01/04-10/04-06/06-10/06-03/09- |
| | Invigorato | Total nitrogen | Liquid | 9,83 | * 5 | | |

| | | | | | | | |
|--------------|-----------------------------|--|--------|--|-----|-------|---|
| | | (N) Phosphorus (P) Phosphorus as P ₂ O ₅ Potassium (K) Potassium as K ₂ O Calcium (Ca) Magnesium (Mg) Sodium (Na) Sulphur (S) Boron (B) Iron (Fe) Manganese (Mn) Copper (Cu ⁺⁺) Zinc (Zn) Molybdenum (Mo) Cobalt (Co) | | 8,38 20,33 8,03 9,67 200 200 650 3500 150 850 370 350 140 10 5 | | | 28/10 |
| | r | | | | 7 | 2,2-3 | |
| | Calcium carbonate | Calcium carbonate | Powder | 100 | 250 | 0 | |
| | Orange extract | Citrofresh | Liquid | 100 | 2 | 0 | 04/06- 17/06- 24/06- 02/07- 08/07- 11/07- 18/07 |
| Armica rb | Eco Mate Armicarb "O" | Potassium bicarbonate | Powder | 85 | 600 | 0 | 26/05- 04/06- 16/06-24- 06-02/07- 08/07- 14/07- 21/07- 28/07- 08/08 |

The volume of water varied From 2,4 to 10 hl/ha according to the vegetative development of the plants. In the Brotomax thesis, according to details provided by the marketing Company, we treated both trunks and vine-branches, so the volume of water varied from 10,96 to 16,7 hl/ha.

** According to details provided by the marketing Company, we used 7 liters of Invigorator instead of 5 when we distributed a volume of water of 10 hl / ha. For each thesis, except Brotomax thesis*

RESULTS

The results of the field trials are reported in Table IV. The climatic conditions registered during the trials are reported in figures 1 and 2. In condition of medium-low infection pressure (2007) all the formulations tested showed a good protective effect. The thesis

treated with potassium bicarbonate (Armicarb) provided the best protection on bunches and the thesis treated with Croplife showed the best protection on leaves. On the contrary, in conditions of high infection pressure (2008), the products were scarcely effective in controlling the disease. The best results were obtained with the copper compounds applied in the standard treatments, but even in this case the infection level has been significantly high.

Phytotoxic symptoms have never been detected on the plants.

Table IV - Assessment on leaves and bunches at the harvest
Notations sur feuilles et sur grappes à la récolte

| Theses | I year (2007) | | | | | | II year (2008) | | | | | |
|-------------------|----------------------|-------|-------|----------------|--------|-------|-----------------------|--------|-------|----------------|--------|-------|
| | Leaves | | | Bunches | | | Leaves | | | Bunches | | |
| | Dif. % | I.%I. | Eff.% | Dif. % | I.%I. | Eff.% | Dif. % | I.%I. | Eff.% | Dif. % | I.%I. | Eff.% |
| Untreated control | 21,5b | 3,9b | - | 5,3b | 0,67b | - | 77,8c | 34,0b | - | 91,3b | 35,3b | - |
| Standard | 18,8ab | 3,2ab | 12,8 | 2,3b | 0,31b | 57,1 | 58,8a | 24,3a | 24,4 | 73,5a | 20,5a | 19,4 |
| Biplantol+copper | 16,5ab | 2,6a | 23,3 | 2,0ab | 0,31b | 61,9 | 65,5ab | 28,0ab | 15,8 | 81,0ab | 28,0ab | 11,2 |
| Brotomax+copper | 18,8ab | 3,3ab | 12,8 | 2,0ab | 0,25ab | 61,9 | 69,5b | 30,0b | 10,6 | 76,5ab | 20,8a | 16,2 |
| Croplife | 15,3a | 2,5a | 29,1 | 2,5ab | 0,34b | 52,4 | 67,5ab | 30,3b | 13,2 | 87,0ab | 33,5b | 4,7 |
| Armicarb | 19,0ab | 3,3ab | 11,6 | 0,3a | 0,03a | 95,2 | 69,5b | 30,8b | 10,6 | 88,5ab | 34,8b | 3,0 |

Figure 1 - Climatic conditions registered during the trial (I year)
 Conditions climatiques enregistrées pendant l'expérimentation (I année)

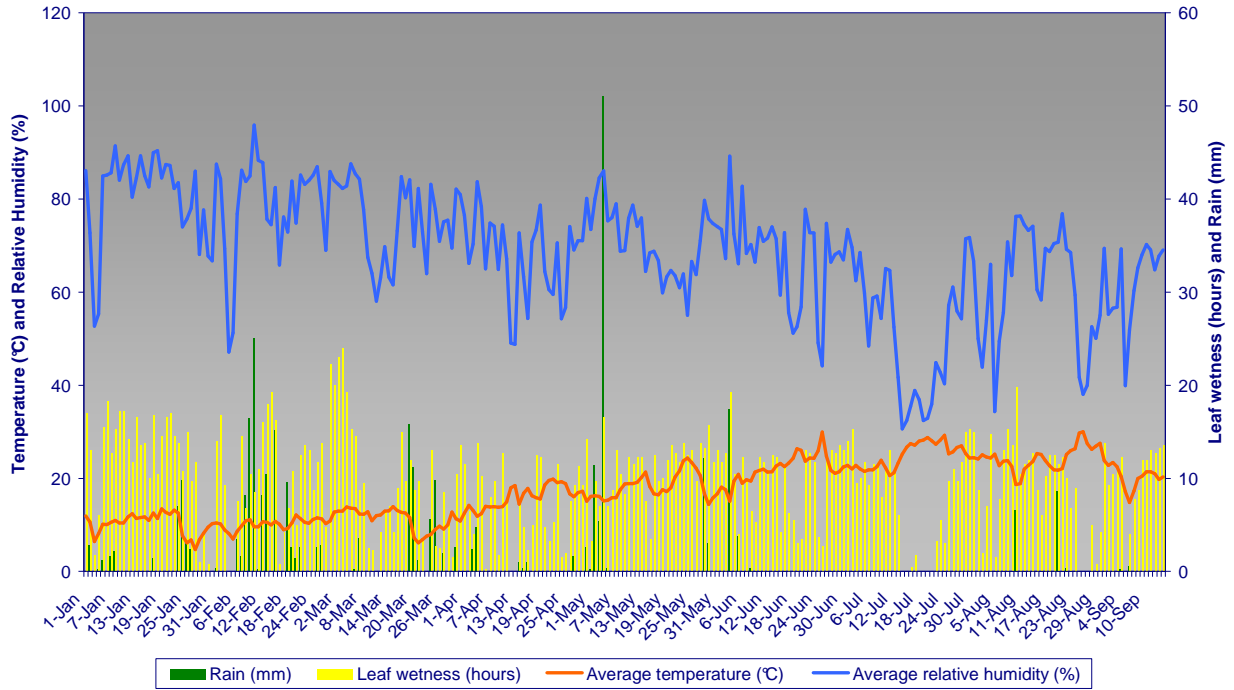
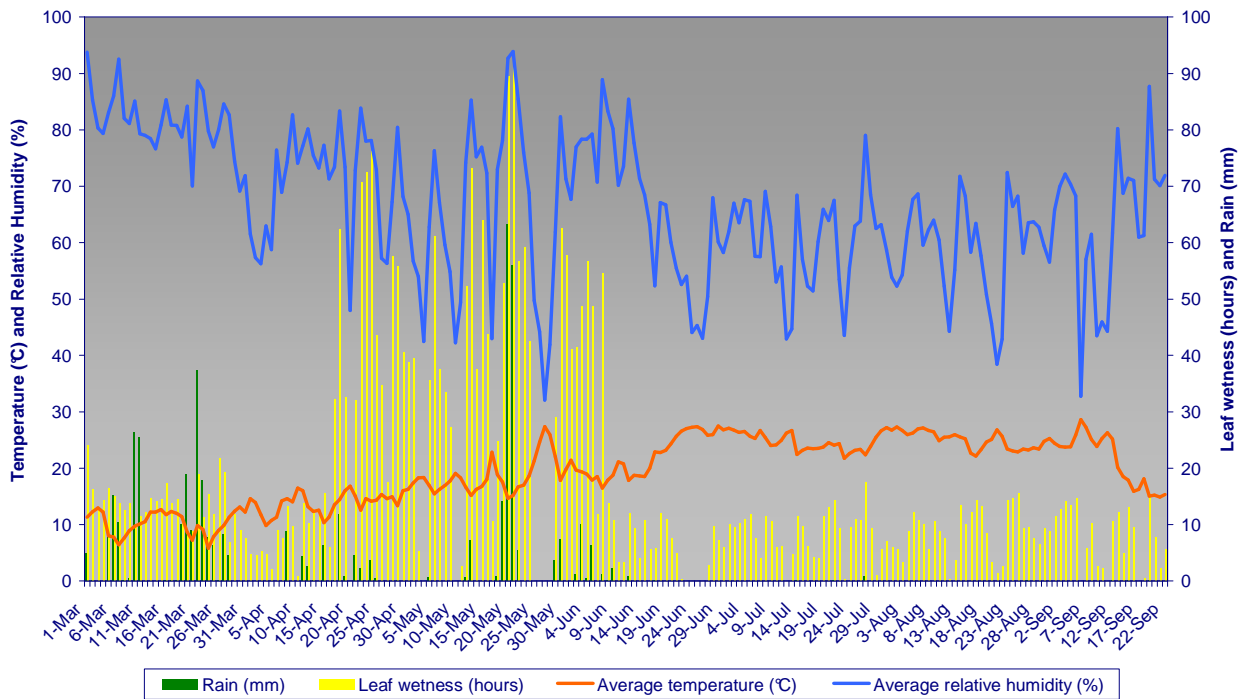


Figure 2 - Climatic conditions registered during the trial (II year)
 Conditions climatiques enregistrées pendant l'expérimentation (II année)

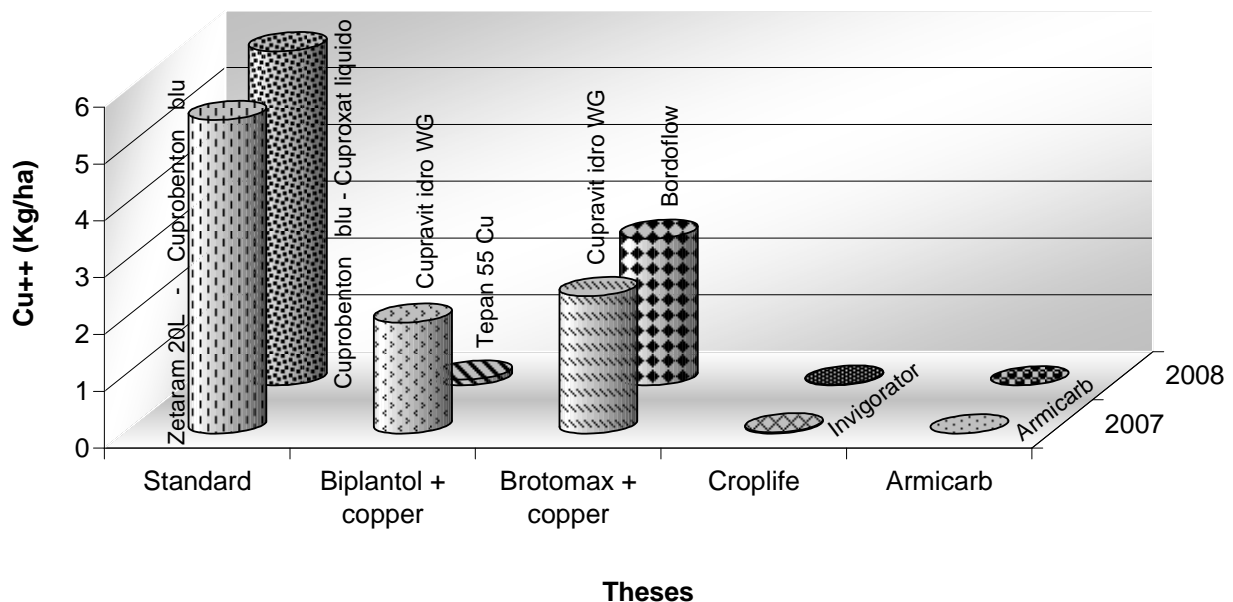


DISCUSSION

During the two years of activity it was possible to test the anti-downy mildew effectiveness of natural products under medium-low and high pressure of disease. The investigated natural products have guaranteed a satisfying protection only in a year of medium-low downy mildew risk. According to the indications given by the distributor firm, some natural products (Croplife and Armicarb) were tested by themselves and the other ones (Biplantol and Brotomax) were tested in combination with copper.

All the tested formulations always guaranteed a copper quantity (Cu⁺⁺/ha/year) under 6 Kg/ha that is the maximum ceiling of use/year imposed by Regulation EC n. 473/2002 (Figure 3).

Figure 3 - Quantity of copper (Kg/ha) provided with treatments
Quantités de cuivre (Kg/ha) appliquées avec le traitements



CONCLUSIONS

Experimentations showed that the tested natural products may be used in dependency of the infection and climatic conditions. During years characterized by limited infection pressure as 2007, the natural products can be used by themselves or in combination with copper treatments for reduce or replace the copper. On the contrary, in case of high infection pressure as 2008, the plant protection agents tested were not efficient to control downy mildew and they can just be used as synergistic effect to reduce the copper input.

REFERENCES

Abbott W. S., 1925 - A method for computing the effectiveness of the insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 18, 265-267.

Brandolini V., Menziani E., Mazzotta D., Vecchiati G., Ponti I., 1995 - Impatto ambientale dell'impiego del rame in viticoltura. *Atti del Convegno "Luci ed ombre nella difesa biologica della vite"*, Faenza, 21 aprile 1995.

Duncan D.B., 1955 - Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1-42.

OEPP/EPPO, 2004 - *Efficacy Evaluation of Fungicides & Bactericides*, 2, 47-52.

Towsend G. R., Heuberger J. W., 1943 - Methods for estimating losses caused by disease in fungicide experiments. *Plant Disease Rep.*, 27, 340-343.

**MILDICUT : UNE INNOVATION DANS LA PROTECTION DE LA VIGNE CONTRE LE
MILDIU**

É. CHANTELOT

Belchim Crop Protection - Parc Tertiaire du Bois Dieu
3 allée des Chevreuils - 69380 LISSIEU – France – eric.chantelot@belchim.com

Thierry BERNARD -ISK Biosciences Europe - 5 ch du Jubin –
69570 Dardilly -France - thierry.bernard.isk@wanadoo.fr

RESUME

MILDICUT est un nouvel anti-mildiou de la vigne. A base de cyazofamide et de di sodium phosphonate, cette spécialité est une innovation pour le marché de la vigne : la cyazofamide est, à ce jour, le seul représentant en usage sur vigne du groupe C4 (classification site d'action FRAC). Agissant sur les différentes phases du cycle du mildiou et résistante au lessivage cette spécialité assure une très bonne protection des grappes. C'est une spécialité à positionner en préventif en encadrement de la floraison.

Mots-clés : *plasmopora viticola*, cyazofamide, di sodium phosphonate.

SUMMARY

MILDICUT: AN INNOVATION FOR THE PROTECTION OF VINE AGAINST DOWNY MILDEW

MILDICUT is a new fungicide for the control of *Plasmopora viticola* on Grape vine. Containing two active ingredients, cyazofamide and di sodium phosphonate (Na₂HPO₃), this speciality is an innovation; cyazofamide is, for the moment, the only representative of C4 group (target site classification from FRAC) used in vine crop.. Acting on the different stages of *Plasmopora viticola* development with an excellent rainfastness, this speciality insures a good bunch protection.. It has to be applied in preventive around the flowering stage.

Key-words : *plasmopora viticola*, cyazofamide, di sodium phosphonate.

INTRODUCTION

L'objet de cette communication est de présenter un nouveau fongicide destiné à lutter contre le mildiou de la vigne. Cette spécialité découverte et mise au point par ISK Biosciences Europe apporte une innovation sur ce segment de marché.

Nous présentons les principes actifs et les effets biologiques de cette spécialité, ainsi que les caractéristiques de cette spécialité en situation de protection au champ et les bases de recommandation d'emploi afférentes.

I- PRESENTATION DE MILDICUT

I-1- Composition de la spécialité

MILDICUT est composé de 2 matières actives : la cyazofamide et le di sodium phosphonate.

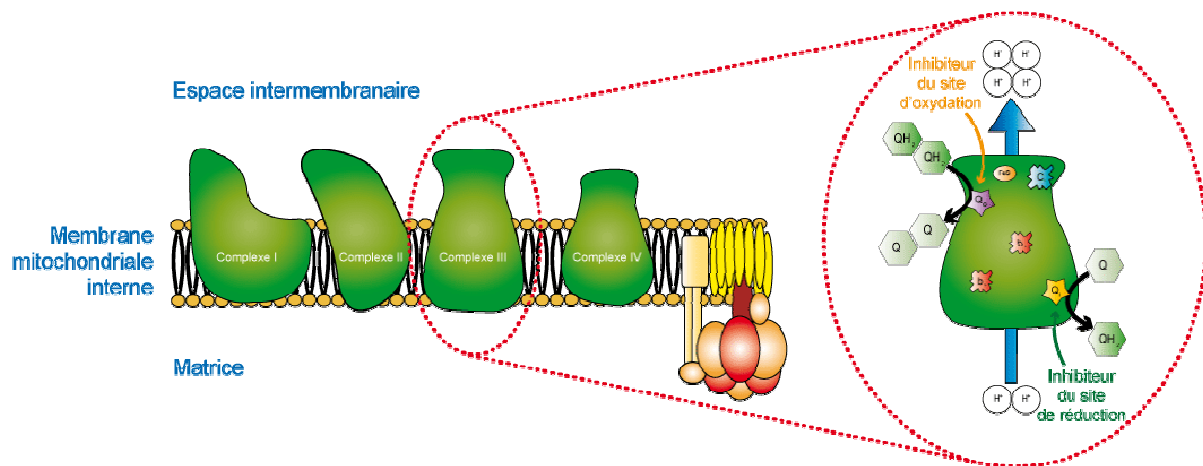
La cyazofamide est une molécule à action de contact qui fait partie de la famille des cyanoimidazole. Cette substance active est déjà homologuée contre le mildiou de la pomme de terre et fait partie des références du marché.

Les cyanoimidazole agissent sur la paroi interne de la mitochondrie sur le site de réduction du complexe III du cytochrome bc_1 . Ces molécules font partie du groupe des Qil (Cf. figure 1).

Ce site d'action diffère de celui des Qol : action sur la paroi externe de la mitochondrie au niveau du site d'oxydation.

A ce jour aucune résistance croisée n'a été relevée entre le groupe des Qil et des Qol.

Figure 1 : Schéma comparatif du site d'action du groupe des Qil et des Qol
Comparative scheme of the action site of the Qil and Qol group



Le di sodium phosphonate (Na_2HPO_3) est une molécule à action translaminaire et systémique dans la plante. Elle fait partie du groupe des phosphonates dont le représentant le plus connu est le fosétyl-AI. Cette molécule est en cours d'inscription à l'annexe I et fait partie du dossier d'homologation du MILDICUT (étude toxicologique et écotoxicologique).

Le mode d'action de ce groupe de molécules est complexe et encore mal identifié. Ces molécules agissent indirectement sur le champignon en stimulant les défenses naturelles de la plante. De plus, il est admis que les phosphonates ont une action directe sur le pathogène en réduisant sa croissance et en inhibant la sporulation.

En conclusion, MILDICUT est un produit commercial original et innovant qui associe un fongicide de contact et un stimulateur de défense naturelle.

I-2- Mode d'action du MILDICUT

Différents tests conduits en laboratoire par ISK BIOSCIENCES Europe ont permis d'identifier les différents niveaux d'action du MILDICUT sur le cycle de *plasmopora viticola*.

Effet du MILDICUT sur la libération, l'éclatement des zoospores et la germination des cystospores.

Dans ce test, des zoosporanges sont collectés sur des feuilles infestées puis utilisés pour les tests in vitro.

Une solution de MILDICUT est ajoutée à la suspension de zoosporanges (concentration de $5 \cdot 10^4$ zoosporanges/ml) à T et T+120min afin de mesurer l'effet sur les sporocystes (T) et sur les zoospores et cystospores (T+120 min c'est-à-dire après la libération des zoospores).

Une centaine de zoosporanges, zoospores et cystospores (zoospores enkystés) sont observés au microscope. Cette étude a été conduite à deux reprises avec deux répétitions.

Les résultats (moyennes des tests effectués) sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Effet du MILDICUT sur la libération, l'éclatement des zoospores et la germination des sporocystes (% inhibition)

Effect of MILDICUT on zoospore release, zoospore rupture and cystospores germination (% of inhibition)

| MILDICUT ($\mu\text{g/ml}$) | Inhibition de la libération des zoospores (%) | Eclatement des zoospores (%) | Inhibition de la germination des cystospores (%) |
|-------------------------------|---|------------------------------|--|
| 0,1 | 100 | 92 | 98 |
| 0,05 | 100 | 92 | 98 |
| Valeur témoin (*) | 81 | 10 | 87 |

(*) Les valeurs indiquent le pourcentage de zoospores libérés, de zoospores éclatés ou de cystospores germés pour le témoin.

Effet du MILDICUT sur l'activité de sporulation

Des feuilles contaminés par *Plasmopora viticola* (inoculation d'une suspension de zoosporanges) sont traitées avec des dilutions soit de mancozebe, soit de MILDICUT soit de l'eau. Après séchage, les feuilles sont mises en incubation dans une chambre climatique pendant 48 heures à 20°C. Les zoosporanges situés à la surface des feuilles sont brossés et mises en suspension dans un volume d'eau déminéralisé connu. Le nombre de zoosporanges est alors compté (microscope) et la surface des feuilles atteintes par la maladie est évaluée. Il est ainsi possible de calculer le nombre de zoosporanges par centimètre carré.

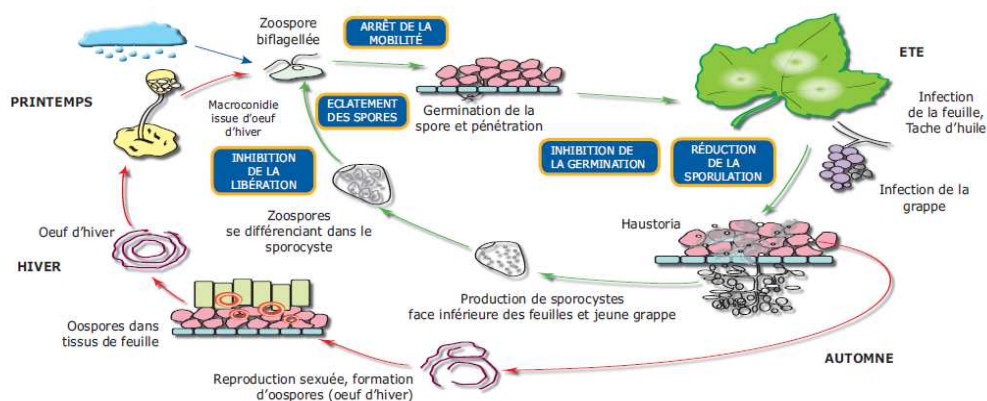
Les résultats de ce test sont rapportés dans le Tableau II.

Tableau II : Effet du MILDICUT sur l'activité de sporulation de *Plasmopora viticola*
Effect of MILDICUT on the sporulation activity of *Plasmopora viticola*

| ($\mu\text{g/ml}$) | Inhibition de l'activité de sporulation (%) |
|---------------------------|---|
| MILDICUT 0,1 | 33 |
| MILDICUT 0,4 | 100 |
| Mancozeb 100 | 0 |
| Sporanges/cm ² | 9 |

En résumé, la figure 2 présente le cycle de *plasmopora viticola* et précise l'action du MILDICUT en fonction des différentes phases de développement de la maladie.

Figure 2 : Cycle de *plasmopora viticola* et action du MILDICUT
plasmopora viticola cycle and action of MILDICUT



II- CARACTERISTIQUES DE LA SPECIALITE EN CONDITION D'EMPLOI

II-1 Mise à l'abri du lessivage

Une étude au champ a été conduite par ISK BIOSCIENCES Europe en 2004 afin d'évaluer en situation d'emploi la robustesse du MILDICUT en condition de pluie après application.

Ce test est conduit sur des vignes de deux ans. Le test est conduit sur 4 répétitions (4 plants de vignes). L'application de MILDICUT est réalisée sur l'ensemble de la plante. Une pluie artificielle de 30mm pendant une heure est déclenchée 24 heures après application. La contamination artificielle est réalisée 2 heures après la pluie (contamination de 6 rameaux par répétition). Cette procédure est répétée après chacune des 3 applications réalisées à 14 jours d'intervalle.

Les résultats montrent (Cf. Tableau III) un très bon contrôle de la maladie du MILDICUT sur feuilles dans ces conditions.

Tableau III : Evaluation de l'intensité d'attaque sur feuille après une pluie artificielle de 30mm

Evaluation of the disease severity on leaves after an artificial rain of 30mm.

| | | % surface feuille avec Mildiou après | | |
|---------------------|------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|
| | | Application 1 | Application 2 | Application 3 |
| Témoin | | 11,8 | 73 | 72,8 |
| MILDICUT | 4,5l/ha | 1,4 (b) | 4,1 (b) | 0,5 (b) |
| folpel + fosétyl-AI | 1000g + 2000g/ha | 7,8 (a) | 47,1 (a) | 11,6 (a) |

(X) : Classe statistique – Test de Newman Keuls.

II-2 Protection des nouvelles pousses

Un test sur des plantes en pot a été conduit par ISK BIOSCIENCES Europe. Les tests est conduit sur 10 plantes par modalité.

Une application de MILDICUT est réalisée sur les feuilles de la base. Les feuilles du haut sont elles protégées par un sachet plastique. Une contamination des feuilles du haut (protégées lors du traitement) est effectuée 4 jours après le traitement.

L'évaluation du niveau d'infestation et du niveau de sporulation est alors observé sur les feuilles protégées lors du traitement (13 jours après traitement).
Les résultats sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Evaluation de l'infestation et de la sporulation sur les feuilles somitales non traitées.

Evaluation of infestation and sporulation on upper leaves non treated.

| | Infestation (%) | Sporulation (%) |
|---|-----------------|-----------------|
| Témoin | 85,6 | 52 |
| MILDICUT 4,5l/ha | 18,3 | 0,01 |
| folpel + fosétyl-Al 1000g + 2000g/ha | 53,2 | 15,3 |

La cyazofamide est un produit de contact. Toutefois on constate que son association avec un di-sodium phosphonate confère à la spécialité MILDICUT une systémie dans la plante assurant une protection des nouvelles pousses.

II-3 Persistance et régularité d'action

En 2009, un essai en parcelle brumisée a été conduit par BELCHIM CROP PROTECTION dans le vignoble champenois. Cet essai comporte 3 répétitions (blocs randomisés).

Dans cet essai 3 traitements de MILDICUT en encadrement de floraison ont été évalués. Les traitements sont insérés dans un programme comprenant 2 DITHANE NEOTEC 3,5 kg/ha (mancozèbe) en préfloraison puis une couverture à base REMILTINE C 3 kg/ha (cymoxanuil + mancozèbe + cuivre) en fin de cycle.

Les trois traitements ont été réalisés sur une cadence de 14 jours. Le premier traitement de MILDICUT est réalisé 15 jours après la contamination.

Les conditions climatiques de la saison se caractérisent par :

- 70 mm de pluie entre le 1^{er} et le 2^{ème} traitement de MILDICUT (dont 40mm 8 jours après la première application)
- 102 mm de pluie entre le 2^{ème} et le 3^{ème} traitement de MILDICUT (dont 30mm 3 jours avant la 3^{ème} application).

Ces conditions climatiques sont donc favorables pour évaluer la robustesse du MILDICUT : pluie importante et intervenant en partie en fin de protection du traitement.

En raison de cette climatologie favorable au développement du mildiou, la fréquence sur feuilles et sur grappes est de 100% dans les témoins 3 semaines après la 3^{ème} application de MILDICUT. L'intensité quant à elle est de 18% sur feuilles et de 39% sur grappes.

Les résultats à la véraison sont présentés dans le tableau V.

Tableau V : Evaluation de la persistance d'action du MILDICUT en conditions très favorables au mildiou

Evaluation of the persistence of action of MILDICUT under very favourable conditions for powdery mildew.

| | Fréquence sur feuille (%) | Intensité sur feuille (%) | Fréquence sur grappe (%) | Intensité sur grappe (%) |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Témoin | 100 | 46 | 100 | 82,7 |
| MILDICUT 4,5l/ha | 28 (18-40) | 2,7 (1,9-3,5) | 16,7 (10-20) | 1,5 (1-2) |
| folpel + fosétyl-Al + cymoxanil 750g + 1500g/ha + 120g/ha | 63 (57-71) | 6,1 (5-7,2) | 84,7 (77-95) | 21 (18-23) |

(X-Y) : note minimale et note maximale

Cet essai permet de mettre en évidence que même en situation à forte pression mildiou (présence de maladie et pluviométrie importante), le MILDICUT appliqué à une cadence de 14 jours assure une protection des feuilles du niveau des références du marché et une protection des grappes de très grande qualité.

Par ailleurs, sur la période 2006 à 2009, 18 essais en situation de parcelles brumisées ont été conduits. Durant cette période, les conditions climatiques ont été très diverses : 2006 et 2009 plutôt peu favorable à l'expression de la maladie, 2007 et 2008 quant à elles ont été deux années favorables au développement du mildiou.

Dans ce contexte, il est intéressant de constater que le contrôle de la maladie sur grappe a été très bonne et très régulière (Cf. Tableau VI).

En conclusion, en situation au champ en parcelles brumisées, le MILDICUT, à cadence de 14 jours, se caractérise par une efficacité remarquable et une très grande régularité.

Tableau VI : Intensité d'attaque sur grappe(%) – moyenne des essais annuels
Disease severity on bunches (%) – mean of the annuals trials.

| | 2006 5 essais | 2007 4 essais | 2008 3 essais | 2009 6 essais |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Témoin | 37,8 (10-72) | 53,2 (24-80) | 93,2 (87-98) | 45,5 (7,7-84) |
| MILDICUT 4,5l/ha | 0,6 (0-1,2) | 3 (0-10) | 3,6 (1,5-4,8) | 0,9 (0-1,5) |

(X-Y) : note minimale et note maximale

CONCLUSION

Au cours de cette communication nous avons mis en avant le caractère innovant de la spécialité MILDICUT. Composée de deux substances actives nouvelles pour le contrôle du mildiou de la vigne, dont la Cyazofamide au mode d'action différent des molécules actuellement utilisées elle agit sur les différentes phases de développement de *Plasmopora viticola*.

Son comportement dans les études conduites au champ révèle une très grande régularité d'action sous diverses pressions de la maladie. MILDICUT est un fongicide qui permet une protection contre le mildiou de la vigne avec des applications répétées à intervalles maximum de 14 jours.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les sociétés Ishihara Sangyo Kaisha et ISK Biosciences Europe pour la mise à disposition des études de laboratoire conduites en vue de caractériser les modes d'action de la spécialité MILDICUT.