



HAL
open science

SEPTODUR - Contribution à la durabilité de la lutte génétique et chimique contre la Septoriose du blé dur par la caractérisation des populations du complexe d'espèces responsable de cette maladie.

Romain Valade, Thomas Caparroy, Oriane Beaudouin, Cindy Vitry, Marie Massot, Julie Toussaint, Matthieu Killmayer, Michel Bonnefoy, Michaël Cochard, Philippe Lonnet, et al.

► **To cite this version:**

Romain Valade, Thomas Caparroy, Oriane Beaudouin, Cindy Vitry, Marie Massot, et al.. SEPTODUR - Contribution à la durabilité de la lutte génétique et chimique contre la Septoriose du blé dur par la caractérisation des populations du complexe d'espèces responsable de cette maladie.. Innovations Agronomiques, 2022, 84, pp.44-58. 10.15454/ncj0-em61 . hal-03576072

HAL Id: hal-03576072

<https://hal.inrae.fr/hal-03576072>

Submitted on 15 Feb 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

SEPTODUR - Contribution à la durabilité de la lutte génétique et chimique contre la Septoriose du blé dur par la caractérisation des populations du complexe d'espèces responsable de cette maladie

Valade R.¹, Caparroy T.¹, Beaudouin O.¹, Vitry C.¹, Massot M.¹, Toussaint J.¹, Killmayer M.², Bonnefoy M.³, Cochard M.⁴, Lonnet P.⁴, Lefevre T.⁵, Legoff J.-P.⁵, Lacoudre F.⁶, Duque C.⁶, Andre C.⁷, Gazeau G.⁸, Duplais C.⁸, Walker A.-S.⁸, Laval V.⁸, Marcel T.⁸, Confais J.⁸, Gout L.⁹

¹ ARVALIS- Institut du Végétal, Avenue Lucien Brétignières, Bâtiment INRA Bioger, F-78850 Thiverval-Grignon

² ARVALIS- Institut du Végétal, Station Inter-Instituts, 6, Chemin de la Cote Vieille, F-31450 Baziège

³ ARVALIS- Institut du Végétal, Ouzouer-Le-marché, F-41240 Beauce la Romaine

⁴ FLORIMOND DESPREZ Veuve & Fils, 3 rue Florimond Desprez, F-59242 Cappelle-en-Pévèle

⁵ RAGT 2n, Rue Emile Singla, Site de Bourran, BP3336, F-12033 Rodez Cedex 9

⁶ LIMAGRAIN Europe, Ferme de l'Etang, F-77390 Verneuil l'Etang

⁷ SYNGENTA, 12 chemin de l'Hobit, F-31790 Saint-Sauveur

⁸ INRAE, UMR1290 BIOGER, Université Paris-Saclay, Campus AgroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon

⁹ AGROPARISTECH, UMR1290 BIOGER, Université Paris-Saclay, Campus AgroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon

Correspondance : r.valade@arvalis.fr

Résumé

La septoriose, causée par *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonospora nodorum* est l'une des principales maladies des céréales à paille dans le monde. En France, cette maladie peut entraîner des pertes de rendements jusqu'à 50% pour le blé tendre. Ces pertes sont principalement causées par *Z. tritici*. Cependant, très peu d'informations sont disponibles pour les épidémies de septoriose sur blé dur qui ont augmenté en fréquence ces dernières années. Dans ce projet, une étude pluriannuelle a été menée pour caractériser le complexe d'espèces de la septoriose du blé dur, étudier la structuration génétique des populations selon l'hôte, évaluer la spécificité d'hôte, caractériser la sensibilité variétale et évaluer la résistance des populations aux fongicides, dans l'objectif d'apporter des solutions efficaces pour lutter contre cette maladie. Grâce à un large échantillonnage et différentes approches méthodologiques, la présence significative de *Z. tritici* et *P. nodorum* dans les feuilles symptomatiques de blé dur et donc l'importance de prendre en compte ces deux espèces dans la lutte contre la septoriose du blé dur ont été mises en évidence. Les variétés de blé dur sont plus sensibles à *P. nodorum* que les variétés de blé tendre. De même, ces variétés ont également montré, en conditions contrôlées, des niveaux de résistance assez faibles à *Z. tritici*. Les analyses de génomique et génétique des populations de *Z. tritici* ont montré une structuration génétique des populations en fonction de l'hôte mais également en fonction de la géographie pour les populations de blé dur. De plus, cette différenciation génétique est également associée à la pathogénicité des isolats. Enfin, nous avons confirmé la généralisation de la résistance aux Qols (Quinone outside Inhibitor) et benzimidazoles, et l'absence de résistance aux SDHI (Succinate DeHydrogenase Inhibitor) en 2013. La résistance aux IDM (Inhibiteurs de la DéMéthylation) est généralisée dans toutes les populations mais les phénotypes majoritaires diffèrent en fréquence dans le Nord et le Sud, ce qui confirme les efficacités contrastées de certains triazoles observées par ailleurs.

Mot-clés : *Zymoseptoria tritici*, *Parastagonospora nodorum*, Diversité génétique, Adaptation à l'hôte, Résistance, Protection intégrée

Abstract : Septodur: Towards a better understanding of leaf blotch on durum wheat for effective integrated management.

Leaf blotch, caused by *Zymoseptoria tritici* and *Parastagonospora nodorum* is a major disease complex of wheat worldwide. In France, these diseases have been reported to cause yield losses up to 50% in bread wheat fields. Yield losses are mainly caused by *Z. tritici* on bread wheat. However, only little information is available in France for epidemics on durum wheat that are increasing in prevalence in recent years. A 3 years survey of leaf blotch on durum wheat and neighbouring bread wheat fields was recently conducted in France, in order to characterize the species complex, study population genetic structure according to host, assess host specificity, characterize cultivar susceptibility and evaluate fungicide sensitivity. Since *Z. tritici* and *P. nodorum* cause relatively similar symptoms on wheat, the presence of these two fungal species in infected leaves were tested using microbiological isolation methods and qPCR detection. *Z. tritici* was detected in all French regions on both durum wheat and bread wheat. On durum wheat, *P. nodorum* was detected in most French regions. On bread wheat *P. nodorum* was only quantified at low levels by qPCR. Durum wheat cultivars are more susceptible to *P. nodorum* than bread wheat cultivars. Similarly, all the durum wheat cultivars were susceptible to *Z. tritici*. Genomic and genetic analysis of *Z. tritici* populations showed a genetic structure of populations by host but also by geography for isolated durum wheat populations. Moreover, this genetic differentiation is correlated with the pathogenicity of isolates. Finally, we confirmed the generalization of DMI (DeMethylation Inhibitor) and Qols (Quinone outside Inhibitors) in *Z. tritici* populations.

Keywords : *Zymoseptoria tritici*, *Parastagonospora nodorum*, Genetic diversity, Host adaptation, Resistance, Integrated management

Introduction

Avec une surface emblavée variant de 300 000 à 400 000 ha et une production moyenne de 2Mt, le blé dur est une céréale d'importance économique majeure en France. La compétitivité du blé dur par rapport aux autres céréales est principalement affectée par des contraintes biotiques assez importantes (mosaïques, maladies foliaires, maladies de l'épi) qui impactent son rendement et sa qualité. Un moyen efficace de limiter l'impact des maladies est la lutte génétique. Néanmoins, avant de pouvoir utiliser efficacement ce levier, il est nécessaire de bien connaître les agents pathogènes en cause, notamment dans le cas de la septoriose. Cette maladie, qui peut occasionner des dégâts significatifs dans le Centre et l'Ouest, est également de plus en plus présente dans le sud de la France. Sa nuisibilité, auparavant faible, est aujourd'hui proche de celle associée au blé tendre, soit une vingtaine de quintaux par hectare sur variétés sensibles. Il est donc prudent de prendre en compte cette maladie dans le choix variétal afin de limiter le recours à la protection fongicide.

La septoriose est une maladie majeure sur les cultures de blé dur et de blé tendre dans le monde (Oliver *et al.*, 2012 ; Iori *et al.*, 2014). Elle est due à un complexe d'espèces de champignons phytopathogènes regroupant *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvlieg, Verkley et Crous (téléomorphe *Phaeosphaeria nodorum*), anciennement *Stagonospora nodorum* (Berk.) E. Castell et Germano (1977), *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg et Crous (2011), *Parastagonospora avenae* f. sp. *triticea* Bissett (1982) et *Zymoseptoria passerinii* Quaedvlieg et Crous (2011).

Z. passerinii et *P. avenae* sont capables d'attaquer plusieurs hôtes dont le blé mais sont plus souvent impliqués dans la septoriose de l'orge et du seigle. L'agent pathogène le plus souvent responsable de la maladie sur blé tendre est *Z. tritici*. Mais cela n'a pas toujours été le cas. Jusque dans les années 1970, *P. nodorum* était le principal agent pathogène causant la septoriose (Oliver *et al.*, 2012).

Les raisons de ce changement dans la composition du complexe d'espèces ne sont pas encore clairement identifiées, et plusieurs hypothèses sont proposées. Des études menées en Angleterre révèlent une corrélation significative entre le taux de SO₂ atmosphérique (la sévérité de la maladie étant fonction de ce facteur) (Shaw *et al.*, 2007) et l'abondance relative de *P. nodorum* et *Z. tritici* (Solomon *et al.*, 2006). Une autre hypothèse avancée est l'utilisation massive de fongicides contre *P. nodorum* qui aurait permis l'installation de *Z. tritici* (Solomon *et al.*, 2006). En effet, ce dernier aurait développé plus rapidement des résistances aux produits phytopharmaceutiques. *P. nodorum* reste néanmoins détecté régulièrement dans les zones de cultures du blé (notamment en Italie, Iori *et al.*, 2014) et la maladie fait partie de celles causant le plus de pertes économiques en Australie (Oliver *et al.*, 2012). Ces deux agents pathogènes ne s'excluent pas mutuellement et leurs épidémies peuvent apparaître de façon combinée.

Il est difficile de relier symptômes et présence de ces espèces car *P. nodorum* et *Z. tritici* génèrent des symptômes très similaires sur feuilles : lésions brunes et nécroses apparaissant 2 à 3 semaines après l'infection, pycnides se développant dans les tissus foliaires nécrosés, production de cirrhes. *P. nodorum* infecte aussi les épis et provoque la formation de taches brunes. Elles évolueront en nécroses sur la partie supérieure des glumes. Le mycélium peut rester dans l'enveloppe des grains infectés et les graines pourront transmettre la maladie une fois semée.

Cette difficulté dans le diagnostic rend évidemment difficile le raisonnement des traitements fongicides éventuels car les espèces n'ont pas les mêmes sensibilités aux fongicides. Seule une étude plus poussée (reconnaissance des spores notamment) permet d'être absolument certain de l'espèce en présence. En effet, bien que les symptômes soient similaires, *Z. tritici* et *P. nodorum* ne sont pas si proches d'un point de vue morphologique, phylogénétique et taxonomique (Solomon *et al.*, 2006).

Lutter efficacement contre une maladie implique de bien identifier l'agent pathogène responsable de cette maladie. Le projet SeptoDUR financé par le Ministère de l'Agriculture et mené par Arvalis-Institut du végétal en collaboration avec le GIE Blé dur et l'INRAE (UMR Bioger) a permis d'identifier et de caractériser pour la première fois le complexe d'espèces responsable de la septoriose sur le blé dur en France. L'étude a également permis d'évaluer la spécificité d'hôte de ces espèces, de caractériser la tolérance variétale du blé dur face à ces champignons et d'estimer les fréquences de résistance aux fongicides des populations de *Z. tritici*.

1. Matériels et méthodes

1.1 Caractérisation du complexe d'espèce de la septoriose en France

Afin de caractériser le complexe d'espèces causant la septoriose en France, des analyses microbiologiques et moléculaires (qPCR) ont été réalisées sur des échantillons prélevés en 2013, 2014 et 2015 par Arvalis et le réseau des obtenteurs partenaires du projet (GIE Blé Dur).

L'échantillonnage a concerné quatre bassins de production de blé : Hauts de France (blé tendre : BT), Centre (blé tendre, blé dur : BD), Sud-Ouest (blé tendre, blé dur) et Sud-Est (blé dur). L'échantillonnage a été réalisé selon le protocole suivant : 30 à 40 feuilles de blé tendre (variétés Apache, Arezzo) et blé dur (Miradoux, Sculptur) présentant des symptômes de septoriose ont été prélevées dans des parcelles traitées et non traitées.

1.1.1 Analyse microbiologique et isolement des souches

Quinze feuilles ont été placées 24h à 48h dans des chambres humides afin de provoquer l'exsudation de cirrhes contenant des pycnides. Ensuite, des isollements de souches ont été réalisés à partir des cirrhes (8 cirrhes par feuille). L'agent pathogène a été identifié lors de l'isolement notamment sur la base du phénotype des colonies se développant sur milieu gélosé (PDA, YPD). Dans le cas de *Z. tritici*, 2 isolats par feuille (issus de nécroses différentes) ont été monospores et mis en conservation à -80°C. Une

collection de plus de 2000 souches isolées dans 4 régions (Hauts de France, Centre, Sud-Ouest et Sud-Est) à partir de feuilles de blé dur et de blé tendre a été constituée.

1.1.2 Analyses moléculaires

Quinze feuilles ont été broyées au broyeur à bille Retsch® MM400 (2 minutes à 30 sec⁻¹) ou dans un broyeur à rotor Fritsch Pulverisette 14. Entre 42 et 50 mg de broyat ont été récupérés pour l'extraction d'ADN réalisée à l'aide d'un kit d'extraction Quiagen® (Ref Cat. N°69106). La qPCR a été faite soit sur un appareil ABI 1900HT™ ou un appareil BioRad CFX96™ en suivant la programmation suivante : 50 °C pendant 2 minutes, 95 °C pendant 10 minutes et 40 cycles à 95 °C pendant 15 secondes et 60 °C pendant 1 minute, avec les solutions d'ADN diluées à 30 ng.µl⁻¹. Pour *P. nodorum* et *Z. tritici*, la sonde et les amorces employées ont ciblé le gène de la mannitol-déshydrogénase (gène nucléaire monocopie). La limite de détection a été fixée à 35 Ct. Tout résultat dépassant ce seuil a été considéré comme nul. Les qPCR ont été développées et validées par ARVALIS (données non présentées).

Afin de confirmer l'identification morphologique des souches de *Parastagonospora*, les isolats ont été monospores et l'ADN a été extrait. Des amplifications PCR de 6 gènes codant pour la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADNr, l'actine (ACT), la β -tubulin (β Tub), la β -glucosidase (bgl1), l'ARN polymérase beta II (RPB2) et la mannitol-déshydrogénase (MDh) ont été réalisées. Afin d'avoir des données fiables, un séquençage dans les 2 sens a été réalisé. Plus de 150 séquences ont été obtenues, minutieusement nettoyées et analysées pour identifier l'espèce.

1.2 Structuration génétique des populations de Z. tritici vis-à-vis de l'espèce hôte

1.2.1 Génétique des populations (marqueurs neutres)

L'ADN de 810 souches de *Z. tritici* a été extrait. Les souches ont ensuite été génotypées pour 12 marqueurs microsatellites situés sur 11 chromosomes différents (Gautier *et al.*, 2014).

1.2.2 Approche de génomique des populations

Sur la base des résultats obtenus, le génome de 66 souches a été reséquéncé par technologie Illumina. Ces souches ont été sélectionnées en croisant les critères « hôte d'origine » (34 souches « BD » et 32 souches « BT »), « origine géographique » (20 souches de la région Centre, 7 souches de la région Nord, 18 souches du Sud-Est et 21 souches du Sud-Ouest) et « niveau de spécialisation » sur BT et/ou BD. Des données de séquences ont été obtenues pour l'ensemble des 66 souches. Elles ont été analysées en première approche par comparaison avec la souche de référence IPO323 dont le génome est intégralement séquéncé et assemblé en 21 chromosomes.

1.3 Spécificité d'hôte des populations collectées

1.3.1 Spécificité d'hôte des souches de Z. tritici

Les tests pathologiques ont été réalisés en chambre de culture sur 5 variétés de blé tendre et 4 variétés de blé dur, soit 9 variétés au total. Il s'agit des variétés Arezzo, Apache, Prémio, CapHorn (BT) Sculptur, Isildur, Fabulis (BD) ainsi que Taichung 29 (BT) et Pharaon (BD) référencés comme des témoins sensibles.

Les plantules ont été inoculées 15 jours après le semis. La feuille inoculée est la première vraie feuille. Cinq feuilles par cultivars ont été inoculées, avec 3 répétitions indépendantes correspondant à 3 inoculations différentes. La lecture des symptômes a été faite à 21 jours (pourcentage de la surface inoculée nécrosée / pourcentage de la surface inoculée portant des pycnides). La mesure de la surface chlorotique n'a pas été jugée pertinente.

Un ensemble de 105 souches génétiquement différentes et issues des différents bassins de production et des variétés Apache (BT) et Sculptur (BD) ont été inoculées sur les 9 cultivars. Chaque interaction souche x cultivar a été évaluée au cours de 3 à 4 répétitions indépendantes.

1.3.2 Spécificité d'hôte des souches de *P. nodorum* et sensibilité variétale des espèces hôtes

Les tests pathologiques ont été réalisés en chambre de culture sur 6 variétés de blé dur, 5 variétés de blé tendre, 4 variétés de triticales, 1 variété d'avoine, 4 variétés de seigle et 4 variétés d'orge. Il a été choisi d'étudier la spécificité de *P. nodorum* pour plusieurs espèces de céréales à paille car peu de données étaient disponibles dans la bibliographie pour ce critère.

Les plantules ont été inoculées 15 jours après le semis. La feuille inoculée est la première vraie feuille. Cinq feuilles par cultivars ont été inoculées, avec 3 répétitions indépendantes correspondant à 3 inoculations différentes. 9 souches isolées de blé dur (6), blé tendre (1) et triticales (2) ont été inoculées (Tableau 1). Le développement de la septoriose a été noté en fonction du pourcentage de feuille verte visible sur les 7 cm inoculés. Par conséquent 0 % correspond au maximum de la maladie, 100 % au minimum. L'ensemble des données a été traité sous R avec une Anova de type III.

Tableau 1 : Détail des souches de *P. nodorum* étudiées

Code souche	Année d'isolement	Origine (département)	Espèce (hôte)	Variété (hôte)
BD-13001	2013	04	Blé dur	Isildur
BD-15001	2013	36	Blé dur	Miradoux
BD-15008	2015	36	Blé dur	Miradoux
BD-15011	2015	36	Blé dur	Sculptur
BD-15015	2015	28	Blé dur	Miradoux
BD-15022	2015	28	Blé dur	Sculptur
BT-13004	2013	58	Blé tendre	Euclide
T-13024	2013	03	Triticale	Tribeca
T-14005	2014	46	Triticale	Non renseignée

Le dispositif expérimental a imposé le modèle mixte suivant :

$$Y_{ijkm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{k|j} + \delta_{ik|j} + \epsilon_{ij} + T_m + S_{im} + E_{jm} + I_{mij} + \epsilon_{ijkm}$$

Y_{ijkm} est la variable réponse, ici ϵ_{ij} est l'interaction souche : espèce

$$\arcsin\left(\sqrt{\frac{\text{surface verte}}{100}}\right)$$

μ est l'effet général du modèle

T_m est la variable test ($1 < m < 5$)

α_i est l'effet de la variable souche ($1 < i < 9$)

S_{im} est son interaction avec la variable souche

β_j est l'effet de la variable espèce ($1 < j < 6$)

E_{jm} est son interaction avec la variable espèce

$\gamma_{k|j}$ est l'effet de la variable variété subordonné à l'effet de la variable espèce ($1 < k < 24$)

I_{mij} est son interaction avec les variables souches et espèces

$\delta_{ik|j}$ est l'interaction souche x variété subordonné à l'effet de l'espèce

ϵ_{ijkm} la variance résiduelle

Les notes des cinq feuilles ont été moyennées pour chaque combinaison variété x souche x test. Les moyennes de chaque variété ont été ajustées de l'effet souche.

1.4 Adaptation aux fongicides des populations de *Z. tritici*

La diversité phénotypique (résistance aux fongicides) a été mesurée pour 4 modes d'action (benzimidazoles, strobilurines, triazoles et SDHI), en utilisant la méthode sur milieu solide (distinction des phénotypes résistants par doses discriminantes) et la nomenclature décrites dans Leroux et Walker (2011). Deux types de tests ont été menés :

- De tests en « bulk » réalisés sur 60 populations,
- Des tests sur 1493 souches isolées et monosporees.

2. Résultats

2.1 Caractérisation du complexe d'espèce de la septoriose en France

2.1.1 Analyse microbiologique et isolement des souches

Les analyses microbiologiques effectuées pour caractériser les souches isolées de symptômes de type septoriose sur BT et BD et présentes dans les bassins de culture Nord, Sud-Ouest et Sud-Est ont permis d'isoler seulement l'espèce *Zymoseptoria tritici*. Dans la région Centre, l'isolement de souches sur des symptômes de Septoriose a conduit à l'identification de deux des espèces du complexe septoriose, *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonospora nodorum*. *P. nodorum* a été isolé sur l'ensemble des sites échantillonnés de la région centre mais uniquement sur des variétés de BD. Sur les variétés de BT, seules des souches de *Z. tritici* ont été isolées et cela même lorsque des parcelles de BD proches étaient infectées par *P. nodorum*. Si des souches des deux espèces ont pu être isolées d'une même variété de BD sur un site du Centre (Binas), la présence exclusive de l'une ou l'autre des 2 espèces a été observée sur les 2 variétés de BD sur tous les autres sites échantillonnés (Louville la Chenard, Thizay et Fresnaye).

Dans la durée du projet, plus de 2000 souches de *Z. tritici* collectées dans les quatre bassins de production sur les variétés Apache et Arezzo (BT) et Miradoux et Sculptur (BD) ont été isolées et constituent la collection du projet « Septodur ». Un sous-échantillon de 1460 souches (810 en « non traité » et 650 « en traité ») ont été purifiées sous forme de monospores et mises en collection.

De même, 37 souches de *P. nodorum* ont pu être isolées et monosporees lors du projet. Les observations visuelles et les isolements n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de l'espèce *P. avenae* f. sp. *triticea* dans les échantillons prélevés en se basant sur l'observation microbiologique.

2.1.2 Analyses moléculaires

164 échantillons de blé dur et de blé tendre (89 en 2013, 31 en 2014 et 56 en 2015) ont été reçus et analysés par qPCR pour *Z. tritici* et *P. nodorum* (Figure 1).

Les résultats moléculaires confirment les principales observations visuelles effectuées lors des analyses microbiologiques. *P. nodorum* a été détecté sur 95 des 164 échantillons analysés par qPCR. Près de 70% de ces échantillons positifs sont des feuilles de blé dur. *P. nodorum* est significativement plus présent sur blé dur que sur blé tendre. De plus, les valeurs de biomasse fongique estimées par qPCR pour *P. nodorum* sont très faibles sur blé tendre, ce qui explique probablement l'absence d'isolement de cette espèce à partir des feuilles de blé tendre présentant des symptômes de type septoriose. A l'inverse, *Z. tritici* a été quantifiée fréquemment à la fois sur blé dur (90%) et blé tendre (96%).

Lorsque la biomasse fongique totale (quantité d'ADN) est considérée sur l'ensemble des échantillons analysés, *P. nodorum* est autant présent que *Z. tritici* sur blé dur. Les analyses qPCR détaillées montrent que *P. nodorum* et *Z. tritici* sont présents dans tous les bassins de production du blé dur. Ce résultat est différent des premiers isolements réalisés en 2013 pour lesquels *P. nodorum* n'avait été isolé que dans la région centre. Cependant des observations visuelles ultérieures ont confirmé les résultats moléculaires obtenus dans les autres régions. La différence entre les isolements et les données moléculaires provient

probablement du fait que les pycnides de *P. nodorum* sont moins visibles (plus insérées dans le limbe de la feuille) et moins nombreuses que celles produites par *Z. tritici*. Par conséquent, en cas d'infestation concomitante, *Z. tritici* est isolé plus facilement.

Quand *P. nodorum* est présent, il est très souvent détecté en association avec *Z. tritici*. Ainsi, les deux agents pathogènes sont potentiellement présents sur la même parcelle au même moment. Enfin, l'analyse des données montre des différences dans la fréquence des espèces entre les années, suggérant que les conditions climatiques ont un impact différent sur le développement épidémique des deux espèces.

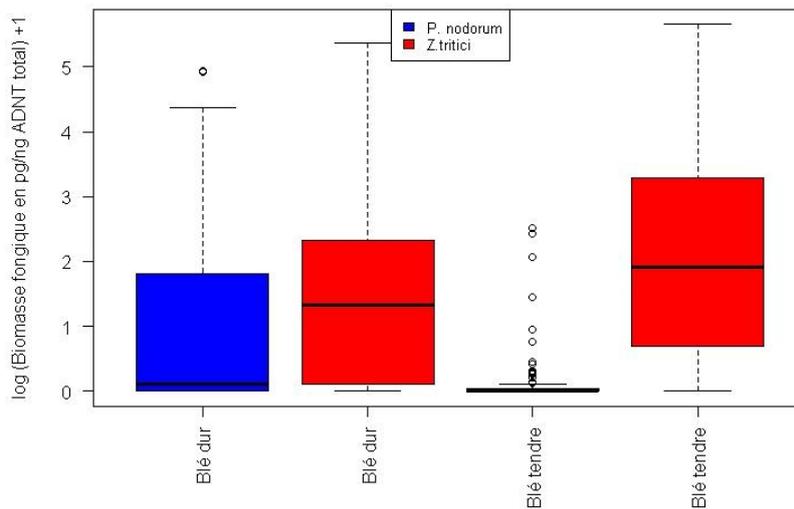


Figure 1 : Quantité de biomasse de *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonospora nodorum* en log (pg/ng d'ADN total) + 1 pour les 164 échantillons reçus selon la plante hôte (BD vs BT). En bleu, la biomasse de *P. nodorum* et en rouge la biomasse de *Z. tritici*.

2.2 Structuration génétique des populations de *Z. tritici*

2.2.1 Approche de génétique des populations : 810 souches et 12 marqueurs microsatellites

Un total de 27 populations composées de 30 individus (pop) de Septoriose ont été analysées avec la répartition suivante :

- Pour le Sud-Ouest : 6 pop BT / 4 pop BD.
- Pour le Sud-Est : 3 pop BD
- Pour le Nord : 2 pop BT
- Pour le Centre : 4 pop BT / 8 pop BD

Dans chacune des populations échantillonnées, le niveau de diversité génétique révélé par les marqueurs microsatellites est élevé et le nombre de génotypes différents identifiés est proche du nombre de souches isolées. La distribution 50:50 des types de compatibilité sexuelle de ce champignon (Mat1-1 et Mat1-2) ainsi que l'absence de déséquilibre de liaison entre les marqueurs microsatellites soulignent l'importance de la recombinaison sexuée dans l'épidémiologie de *Z. tritici* en France, comme observé dans la majorité des régions du monde pour cette espèce.

Aucune différenciation génétique significative n'a été observée entre les populations isolées sur un même site géographique mais sur des variétés différentes d'une même espèce de blé. Les populations de *Z. tritici* ont ainsi été regroupées pour la suite des analyses par espèce hôte, indépendamment de la variété sur laquelle les souches ont été prélevées.

Une analyse des distances génétique de Nei montre que toutes les populations « blé tendre » (isolées des régions Nord, Centre, Sud-Ouest et Sud-Est) forment un groupe génétique homogène. Cette structuration génétique des populations isolées de blé tendre est semblable aux résultats obtenus dans la majorité des études précédentes réalisées dans différentes régions du monde (Figure 2).

De manière plus originale, l'analyse de la structuration génétique des populations « blé dur » a révélé que ces populations sont significativement différenciées les unes des autres. De plus, les populations « blé dur » isolées des régions Sud-Est et Sud-Ouest sont également génétiquement différenciées de l'ensemble des populations « blé tendre », contrairement à la population « blé dur » isolée de la région Centre.

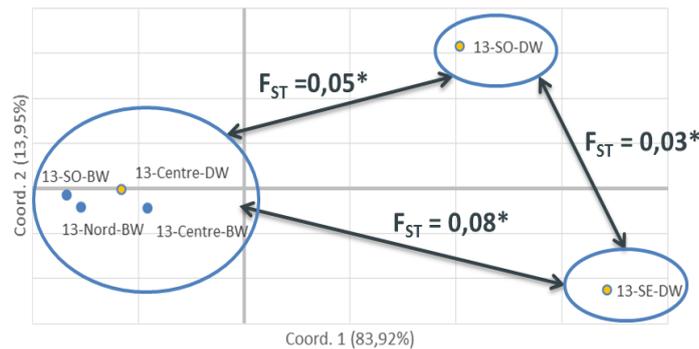


Figure 2 : Structuration génétique des populations de *Zymoseptoria tritici* échantillonnées sur BT et BD dans 4 régions françaises. Analyse en coordonnées principales (PCoA) d'une matrice de distances de Nei entre paires de populations. La différenciation génétique (F_{ST}) entre groupes de populations est significativement différente de 0. DW= blé dur, BW= blé tendre.

Une analyse bayésienne de la structuration de la diversité génétique réalisée avec le logiciel Structure a montré l'existence probable de deux groupes génétiques distincts d'individus dans les populations françaises de *Z. tritici* (Figure 3). Un groupe contient toutes les souches 'blé tendre' et les souches 'blé dur' isolées dans la région Centre. L'autre groupe contient toutes les souches prélevées sur blé dur dans le sud-est. Les souches prélevées sur blé dur dans le sud-ouest correspondraient à des individus hybrides de ces deux groupes génétiques. Ces observations sont validées par l'analyse des indices de différenciation génétique (F_{st}) qui sont significativement différents de zéro entre les 3 groupes génétiques (BT + BD centre, SO BD et SE BD) mais non significatifs intra-groupe.

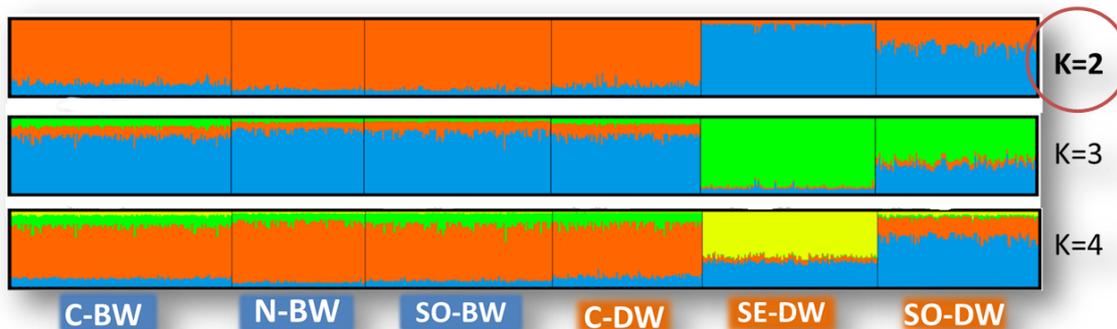


Figure 3 : Analyse bayésienne de la structuration génétique des populations de *Zymoseptoria tritici* échantillonnées sur BT et BD dans 4 régions françaises réalisée avec le logiciel Structure (30 répétitions). Les populations sont classées selon le bassin de production (C= centre, N=nord, SO=Sud-Ouest, SE=Sud-Est) et la plante hôte (BW=BT ; DW=BD). L'existence de 2 groupes génétiques distincts est le plus probable (K=2).

2.2.2 Approche de génomique des populations

Sur la base des résultats de génotypage et de phénotypage obtenus, le génome de 66 souches a été reséquéncé par technologie Illumina. Ces souches ont été sélectionnées en croisant les critères « espèces hôtes d'origine » (34 souches « BD » et 32 souches « BT »), « origine géographique » (20 souches de la région Centre, 7 souches de la région Nord, 18 souches du Sud-Est et 21 souches du Sud-Ouest) et « niveau de spécialisation » sur BT et/ou BD. Des données de séquences ont été obtenues pour l'ensemble des 66 souches. Elles ont été analysées en première approche par comparaison avec la souche de référence IPO323 dont le génome est intégralement séquencé et assemblé en 21 chromosomes (Goodwin et al., 2011). Ces analyses bioinformatiques ont permis de révéler un niveau de variabilité génétique très élevé chez *Z. tritici*. Cette forte variabilité génétique est observée chez les souches isolées de BD et chez les souches isolées de BT et se traduit par l'identification de plus de 4 millions de sites polymorphes entre ces souches et la souche IPO323.

L'application de filtres de sélection sur ce catalogue de polymorphismes a permis d'obtenir un set de 523 000 SNP (Single Nucleotid Polymorphism) possédant 2 allèles et sans donnée manquante pour les 66 souches. Ces SNP sont en moyenne à l'échelle du génome séparés de 75 nucléotides, ce qui traduit une forte densité de marqueurs répartis tout le long des 21 chromosomes.

L'analyse de la structuration de la variabilité génétique révélée par ce set de SNP a permis de confirmer et de préciser la structure des populations inférées à partir des données de génotypage pour les 12 microsatellites. Une analyse en composante principale de la matrice de polymorphisme indique ainsi une structuration en 3 groupes des 66 souches (Figure 4). Un groupe est composé de l'ensemble des souches isolées de BT (quelle que soit la région d'origine) et des souches BD isolées du Centre de la France, un 2^{ème} groupe est composé des souches BD isolées dans le Sud-Ouest et le 3^{ème} groupe est composé des souches BD isolées du Sud-Est. Cette analyse révèle également des niveaux de variabilité différents entre les souches des 3 groupes. Alors que les souches isolées de BT ou de BD dans le Centre sont très proches génétiquement les unes des autres, les souches isolées de BD dans le Sud-Ouest et le Sud-Est présentent un plus grand niveau de variabilité génétique. Le plus haut niveau de variabilité génétique est observé pour les souches isolées de BD dans la région Sud-Est.

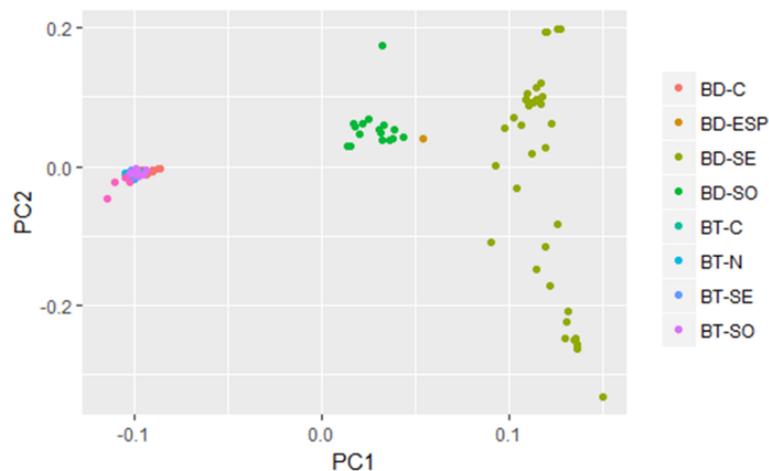


Figure 4 : ACP basée sur le polymorphisme de 523 189 SNP de souches de *Zymoseptoria tritici* isolées de BT et BD dans différentes régions françaises. PC1 et PC2 représentent 23% de la variabilité génétique totale

Des analyses de génomique comparative et de génétique d'association ont été initiées afin de caractériser la base génétique de la spécialisation d'hôte mise en évidence. Une première analyse de génétique d'association a permis de procéder à une validation des données de variation génétique (SNPs) et de variation phénotypique (agressivité de souches vis-à-vis de cultivars de BD et BT). Une association très significative a ainsi pu être mise en évidence dans un groupe de souches isolées de la

région Centre entre le polymorphisme observé à un locus et la variation d'agressivité sur le cultivar CapHorn (BT). Ce locus correspond au gène *AvrStb6* qui a été identifié récemment par la même approche à partir d'un jeu de données indépendant de variation génétique et phénotypique (Zhong *et al.*, 2017). Ce gène détermine l'avirulence de souches de *Z. tritici* vis-à-vis de cultivars de blé portant la résistance *Stb6*. Les prochaines analyses porteront sur la caractérisation de la base génétique de la spécificité d'interaction de *Z. tritici* avec d'autres variétés de BT et de BD ainsi que des déterminants génétiques impliqués dans la spécialisation d'hôte BD vs BT.

2.3 Spécificité d'hôte des populations collectées

2.3.1 Spécificité d'hôte des populations de *Z. tritici* collectées

Les souches de *Z. tritici* du Sud-Est testées (BD) ne sont sporulantes que sur les variétés de BD. Les souches du nord (BT) ne sont sporulantes que sur les variétés de BT. Ces résultats sont, à ce stade, en cohérence avec les données moléculaires.

Les souches du Sud-Ouest isolées de BT sont sporulantes sur les variétés de BT. Certaines souches sont également capables de développer quelques pycnides sur des variétés de BD (>5%). A l'inverse, les souches isolées de BD sont sporulantes sur BD mais également sur la variété BT sensible Taichung 29, avec des différences d'agressivité importantes entre les souches.

Les souches du centre (BT) sont sporulantes sur BT avec quelques pycnides observées sur BD (>5%). Les souches BD sont très peu agressives sur le BD même sur la variété Sculptur alors qu'elles ont été isolées de cette variété. Elles sont, par contre, sporulantes sur la variété BT sensible. Ces résultats suggèrent une « maladaptation » des populations de *Z. tritici* du Centre de la France au BD et traduiraient peut-être un saut d'hôte ancestral depuis le BT vers le BD qui se serait ensuite accompagné d'une incapacité de ces souches à infecter les variétés récentes de BT (Figure 5).

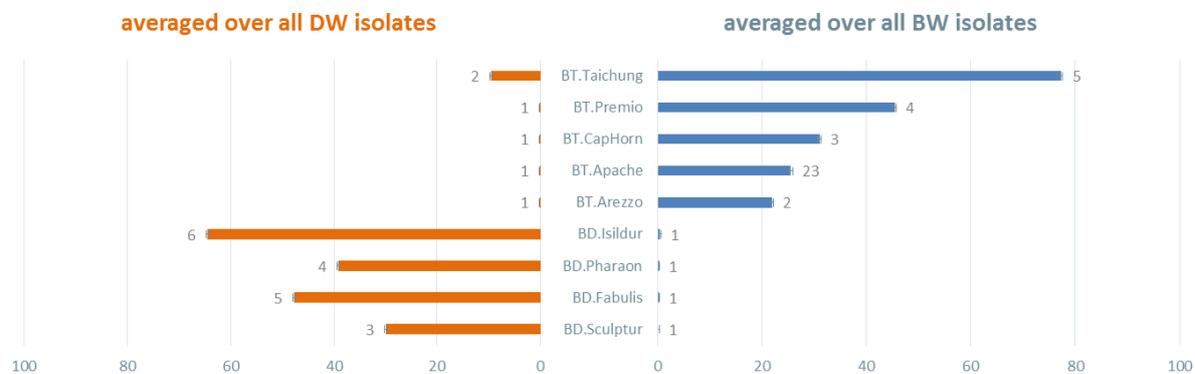


Figure 5 : Agressivité moyenne de souches isolées de BT ou de BD vis-à-vis d'un panel de variétés de BT et BD. L'agressivité d'une souche est évaluée 21 jours après inoculation d'une variété de BT ou BD par la mesure de la surface foliaire nécrosée portant des pycnides.

2.3.2 Spécificité d'hôte des souches de *P. nodorum* collectées et sensibilité variétale

Les interactions souche x variété, souche x espèce et espèce x variété sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$. Les moyennes ajustées ont permis de classer les espèces selon leurs sensibilités respectives. Si l'on considère les moyennes transformées ajustées toutes souches confondues (Tableau 2), l'avoine et le seigle apparaissent comme les espèces les moins sensibles aux souches étudiées. Les moyennes sont plus significativement différentes une fois l'avoine et le seigle retirés du jeu de données : le blé dur et le triticale deviennent significativement plus sensibles que le blé tendre. Le blé dur est significativement plus sensible que le triticale et le blé tendre à la souche T-14005, le triticale devient l'espèce la plus

sensible à la souche BT-13024, et le blé dur et le triticale sont significativement plus sensibles à la souche BD-15015 que l'orge et le blé tendre (données par souche non présentées).

Des valeurs seuils de surface verte ont été définies pour analyser qualitativement les interactions souche x variété. Elles ont été déterminées sur la base des observations faites pendant les notations. Les feuilles ayant une note supérieure ou égale à 95 % de surface verte présentaient généralement un début de chlorose ou des zones nécrosées très limitées et localisées. Ces feuilles ont été classées comme correspondant à des interactions de type « résistance ». En dessous de 95 % les feuilles avaient toutes des surfaces nécrosées plus importantes et plus proches des symptômes de la maladie. Les interactions correspondantes ont été classées comme « sensibles » (surface verte entre 50 et 95 %) ou « très sensibles » (surface verte inférieure à 50 %).

Tableau 2 : Moyennes ajustées de $\arcsin\left(\sqrt{\frac{\text{surface verte}}{100}}\right)$ toutes souches confondues

espèce	Blé dur	Blé tendre	Triticale	Orge	Seigle	Avoine
moy. ajustée*	0,996	1,210	1,054	1,361	1,461	1,511
groupe**	a	abc	ab	bc	c	c
groupe***	a	b	a	ab		

* Moyennes de $\arcsin(\text{racine}(\text{note}/100))$ par espèce ajustée de l'effet souche

** Des lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes au seuil $\alpha = 0,05$

*** Groupes recalculés sur la base des données sans l'avoine et le seigle

Le Tableau 3 présente les interactions souche-variété (basée sur les seuils définis à 95 % de surface verte et 50 % de surface verte). Au sein d'une espèce et pour une souche donnée, des sensibilités différentes entre variétés sont observées. Par exemple pour le blé tendre, Apache est résistant à la souche T-14005 et Taichung 29 y est sensible. De même, une variété peut présenter des sensibilités différentes selon la souche : Apache est sensible à BD-15015 et résistant à BD-13001.

L'avoine et l'ensemble des variétés de seigle étudiées sont résistants à toutes les souches étudiées. La sensibilité de l'orge et du blé tendre est plus dépendante de la variété. Apache présente quatre interactions résistantes, Soissons aucune. De la même façon, KWS Irina est sensible à plus de souches qu'Odyssey. Le blé dur et le triticale sont les espèces ayant les variétés les plus sensibles aux souches étudiées. Les souches BD-15008 et BD-5015 sont particulièrement agressives sur les variétés de ces espèces.

Les espèces peuvent être classées en deux groupes : d'un côté l'avoine, le seigle et l'orge présentent des sensibilités à *P. nodorum* faibles (voire nulles) et peu variables d'une variété à une autre. D'un autre côté, le blé tendre, le blé dur et le triticale présentent des sensibilités plus élevées et plus variables selon les variétés et les souches.

Tableau 3 : Sensibilité des variétés aux 9 souches de *P. nodorum* testées

Espèce	Variété	Souche								
		BD-13001	BD-15001	BD-15008	BD-15011	BD-15015	BD-15022	BT-13004	T-13024	T-14005
Blé dur	Miradoux	S	S	S+	S	S+	S	S	S	R
	Sculptur	S	S	S+	S	S+	S	S	S	S
	Pharaon	S	S	S+	S	S+	S	S	S	S
	Fabulis	S	S	S+	S	S+	S	S	S	R
	Lloyd	R	S	S	S	S+	S	S	S	S
	Cando	S	S	S	S	S+	S	S	S	R
Blé tendre	Apache	R	R	S	R	S	S	S	S	R
	Arezzo	R	R	S	S	S	S	S	S	S
	Premio	R	R	R	R	S	R	S	S	S
	Taichung 29	R	S	S	R	S	S	S	S	S
	Soisson	S	S	S	S	S	S	S+	S	S
	Triticale	Tribecca	R	S	S+	S	S+	S	S	S+
Orge	Triskell	S	S	S+	S	S	S	S	S	S
	Vuka	R	R	S+	S	S	S	S	S	S
	Orval	R	R	S+	S	S	S	S	S	S
	KWS Irina	R	S	S	S	S	R	R	S	R
Seigle	Odyssey	R	R	R	R	S	R	R	R	R
	RGT Planet	R	S	R	R	S	R	R	R	R
	Explorer	R	S	S	R	S	R	R	S	R
Avoine	Palazzo	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Brasetto	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Drubin	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Guttino	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Charmoise	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

R : Résistant ($\geq 95\%$ de feuille verte) -- S : Sensible (entre 50 et 95% de feuille verte) -- S+ : Très sensible ($< 50\%$ de feuille verte)

2.4 Adaptation aux fongicides des populations de *Z. tritici*

Les analyses sur les bulks populationnels ont été réalisées principalement à partir des prélèvements de 2013. La résistance aux Qols et aux benzimidazoles est largement distribuée (fréquence supérieure à 90%) dans toutes les populations testées, de manière homogène sur le territoire. Aucune résistance spécifique aux SDHI n'a été détectée dans cet échantillonnage. Cette situation a pu par contre évoluer pour les années récentes.

Les résultats confirment cependant une certaine hétérogénéité spatiale de la répartition des souches résistantes aux IDM, coïncidant partiellement avec la distribution blé dur/blé tendre sur le territoire (Figure 6). Ils mettent également en évidence, même si non systématiquement, la sélection opérée entre les parcelles traitées et non traitées (augmentation de la fréquence des souches les plus résistantes) : sélection significative des phénotypes les plus résistants dans les modalités traitées pour le blé dur ($p=0.035$) et quasi-significative pour le blé tendre ($p=0.061$). Des différences significatives sont observées entre les phénotypes des populations issues de blé dur et les populations issues de blé tendre. Cette différence est principalement liée la proportion respective des phénotypes TriR6 par rapport aux phénotypes TriR7-R8. Néanmoins, cette différence peut aussi être liée à la variabilité géographique et non exclusivement à la plante hôte.

Enfin, aucun phénotype nouveau n'a été observé en comparaison des souches de référence avec résistance émergente.

L'ensemble de ces résultats suggère que les Qol (strobilurines) et benzimidazoles devraient avoir une efficacité limitée sur toutes les populations, alors que les SDHI devraient montrer de bonnes performances sur tout le territoire. La généralisation de la résistance aux IDM, et en particulier l'augmentation en fréquence des souches MDR et TriMR évoluées dans le Nord de la France confirment les efficacités plus réduites de l'ensemble des molécules. L'hétérogénéité de la structure des populations (en particulier, pour les souches de phénotype TriR7-R8 et TriR5) confirment la variabilité des performances de certains triazoles selon les régions, en particulier pour le tébuconazole.

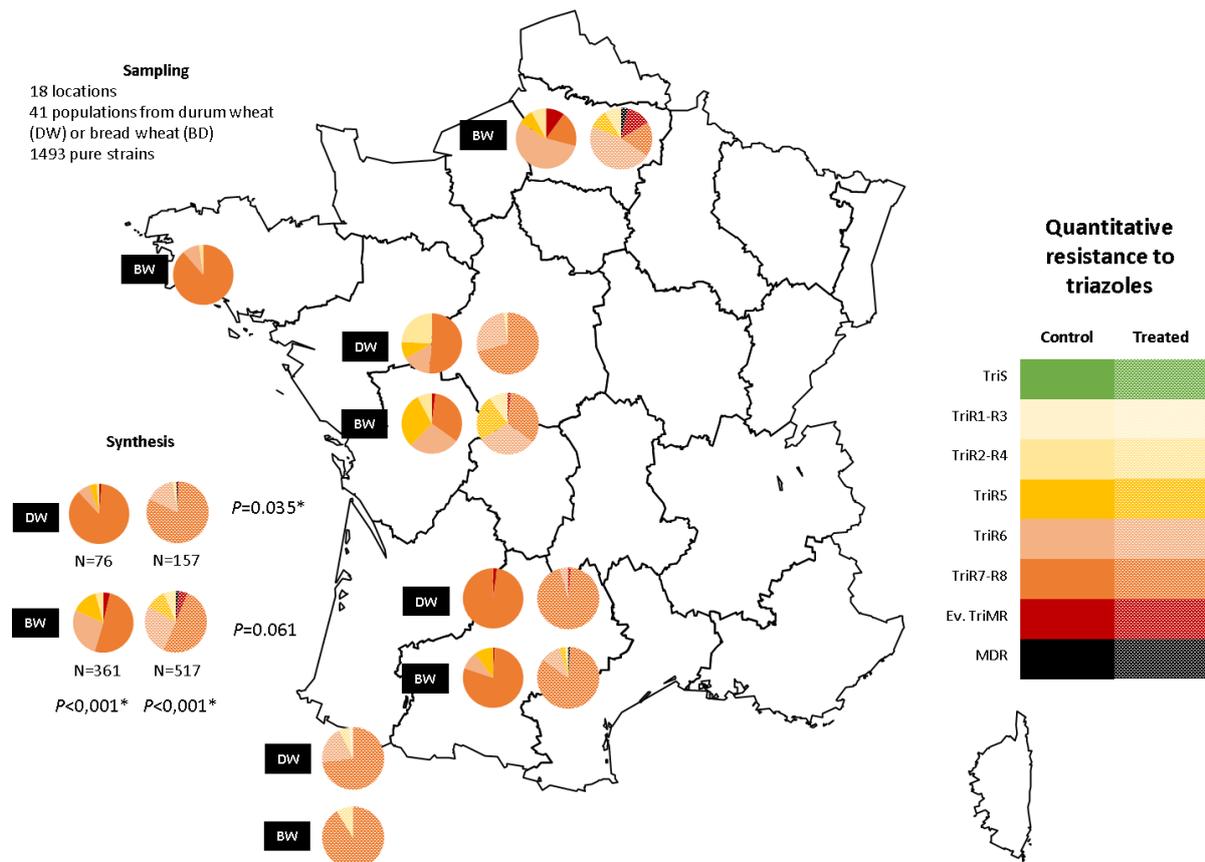


Figure 6 : Fréquence des différents phénotypes des isolats pour la résistance aux triazoles dans les modalités traitées et non traitées. Une couleur représente un phénotype.

3. Discussion et conclusion

La septoriose est une maladie des céréales majeure en France et dans le monde. Il y a de multiples espèces d'agents pathogènes en cause, et parmi eux, *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonospora nodorum*. Ces deux champignons causent des symptômes très similaires mais sont différents d'un point de vue morphologique, taxonomique et phylogénétique. Lutter efficacement contre une maladie nécessite de bien caractériser et de connaître le complexe d'espèces en cause. Or, aucune donnée n'était disponible sur le complexe d'espèces causant la septoriose du blé dur en France. Le projet SEPTODUR a permis des avancées très significatives sur cette problématique grâce à un partenariat constructif et complémentaire entre Arvalis, le GIE blé dur et INRAE BIOGER. Les résultats acquis sont originaux, nombreux et très utiles pour la filière.

En France, *Z. tritici* est actuellement le principal agent pathogène responsable de la septoriose sur blé tendre mais *P. nodorum* n'a pas complètement disparu. Cette étude montre qu'il peut être présent fréquemment sur blé dur et plus rarement sur blé tendre. Entre 2013 et 2015, les données moléculaires montrent que *P. nodorum* et *Z. tritici* sont présents dans tous les bassins de production du blé dur, associés ou non dans les symptômes de septoriose. Les variétés de cette céréale ont montré une plus grande sensibilité aux souches de *P. nodorum* étudiées par rapport aux variétés de blé tendre, ce qui pourrait expliquer pourquoi *P. nodorum* se retrouve principalement sur cette espèce. Par conséquent, les moyens de lutte à mettre en place doivent considérer les deux espèces.

Les analyses génomiques et génétiques des populations de *Z. tritici* ont montré pour la première fois en France une structuration génétique des populations vis-à-vis de l'hôte mais également géographique pour les populations de blé dur. De plus, cette différenciation génétique est également liée à la pathogénicité des isolats. Ces résultats suggèrent une adaptation récente et différente selon les régions des populations de *Z. tritici* pouvant être la conséquence d'un saut d'hôte du blé tendre vers le blé dur. D'un point de vue pratique, cela implique de caractériser les variétés de blé dur dans les différents bassins de production afin de pouvoir soumettre le matériel végétal à la diversité des populations.

Pour les fongicides, nous n'avons pas identifié de différences marquées entre les populations isolées de blé tendre et les populations isolées de blé dur, ce qui implique que les fongicides devraient avoir sensiblement la même efficacité pour *Z. tritici*.

Ce projet a donc permis de montrer l'importance en premier lieu de bien connaître les espèces en cause pour lutter efficacement contre une maladie. Il a permis d'informer et former les expérimentateurs pour différencier les espèces et va également permettre aux obtenteurs de mieux caractériser leur matériel afin de proposer à moyen terme des variétés plus résistantes aux 2 champignons qui sont responsables de la septoriose du blé dur en France.

Remerciements

Nous remercions l'ensemble des personnes et partenaires impliqués dans le projet SeptoDUR (GIE Blé dur, INRAE UMR BIOGER, Arvalis-Institut du végétal). Nous remercions également le ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt pour le financement de ce projet par l'intermédiaire du fond CASDAR (Projet N°C-2012-03).

Références bibliographiques

- Gautier A., Marcel T.C., Confais J., Crane C., Kema G., Suffert F., Walker A-S., 2014. Development of a rapid multiplex SSR genotyping method to study populations of the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Research Notes* 7(1): 373
- Goodwin S.B., Ben M'barek S., Dhillon B., Wittenberg A.H.J., Crane C., Hane J.K., Kema G.H.J., 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensable structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genetics*, 7(6), e1002070.
- Iori A., Scala V., Cesare D., Pinzari F., D'Egidio M.G., Fanelli C., Fabbri A.A., Reverberi M., Serranti S., 2014. Hyperspectral and molecular analysis of *Stagonospora nodorum* blotch disease in durum wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 689–702.
- Leroux P., Walker A., 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67(1): 44-59.
- Oliver R.P., Friesen T.L., Faris J.D., Solomon P.S., 2012. *Stagonospora nodorum*: From pathology to genomics and host resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 23–43.
- Quaedvlieg W., Kema G.H.J., Groenewald J.Z., Verkley G.J.M., Seifbarghi S., Razavi M., Mirzadi Gohari A., Mehrabi R., Crous P., 2011 - *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26, 57–69.
- Shaw M.W., Bearchell S.J., Fitt B.D.L., Fraaije B.A., 2007. Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytologist* 0, 229-238.
- Solomon P.S., Lowe R.G.T., Tan K.-C., Waters O.D.C., Oliver R.P., 2006. *Stagonospora nodorum*: cause of *Stagonospora nodorum* blotch of wheat. *Molecular Plant Pathology* 7, 147–156

Zhong Z., Marcel T.C., Hartmann F.E., Ma X., Plissonneau C., Zala M., Ducasse A., Confais J., Compain J., Lapalu N., Amselem J., McDonald B.A, Croll D., Palma-Guerrero J., 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytol.* 214, 619–631.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).