



HAL
open science

Développement d'outils de caractérisation et de détection des champignons présentant des risques émergents sur fruitiers à pépins : *Alternaria* spp. et *Venturia* spp

Yohana Laloum, Jaime Aguayo, Benoit Barrès, Valérie Caffier, Manuela Crepet, Michel Giraud, Cécile Guinet, Renaud Ioos, Céline Jeandel-Fourrier, Bruno Le Cam, et al.

► To cite this version:

Yohana Laloum, Jaime Aguayo, Benoit Barrès, Valérie Caffier, Manuela Crepet, et al.. Développement d'outils de caractérisation et de détection des champignons présentant des risques émergents sur fruitiers à pépins : *Alternaria* spp. et *Venturia* spp. *Innovations Agronomiques*, 2024, 94, pp.387-400. 10.17180/ciag-2024-vol94-art26 . hal-04623921

HAL Id: hal-04623921

<https://hal.inrae.fr/hal-04623921>

Submitted on 25 Jun 2024

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



Développement d'outils de caractérisation et de détection des champignons présentant des risques émergents sur fruitiers à pépins : *Alternaria* spp. et *Venturia* spp.

Yohana LALOUM¹, Jaime AGUAYO², Benoit BARRÈS³, Valérie CAFFIER⁴, Manuela CREPET⁵, Michel GIRAUD¹, Cécile GUINET², Renaud IOOS², Céline JEANDEL-FOURRIER², Bruno LE CAM⁴, Christophe LEMAIRE⁴, Aude MORONVALLE¹, Isabelle PANDINI³, Mélanie SANNIER⁴, Jason SHILLER², Florent REMUSON³

¹–Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre opérationnel de Lanxade, 28 route des Nebouts, 24130 Prignonieux, France.

² Agence Nationale Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses), Laboratoire de la Santé des Végétaux - Unité de Mycologie, Unité Sous Contrat INRAE 1480, Domaine de Pixérécourt, 54220 Malzéville, France

³ Université de Lyon, Anses, INRAE, USC Caractérisation et suivi des phénomènes d'évolution des résistances, 69007 Lyon, France

⁴Université d'Angers, Institut Agro, INRAE Angers, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 42 Rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé, France

⁵ FREDON Auvergne-Rhône-Alpes, 2 Avenue du Lazio, Zone Industrielle Champ Dolin, 69800 Saint-Priest, France.

Correspondance : yohana.laloum@ctifl.fr

Résumé

Le projet CREATIVE avait pour objectif d'améliorer la lutte contre des bioagresseurs des arbres fruitiers à pépins par l'acquisition de connaissances sur deux genres majeurs de champignons ascomycètes : *Venturia* spp. et *Alternaria* spp. respectivement responsables de tavelure et de défoliation précoce. Les objectifs du projet CREATIVE visaient *in fine* à optimiser au verger la maîtrise de ces maladies qui attaquent feuilles et fruits et pour lesquelles plusieurs espèces sont impliquées. Ce projet a permis d'apporter des connaissances sur la génétique des champignons responsables de ces maladies, en lien avec leur pouvoir pathogène et leur capacité à résister aux fongicides. En complément, des outils de suivi épidémiologique de détection en verger ont été développés et pourront être utilisés en routine dans les laboratoires d'analyse.

Mots-clés : Tavelure pommier, défoliation, épidémiosurveillance, *Venturia* spp., *Alternaria* spp.

Abstract: Development of tools for characterizing and detecting fungi presenting emerging risks on pome fruit trees: *Alternaria* spp. and *Venturia* spp.

The aim of the CREATIVE project was to improve the control of apple tree pests by acquiring knowledge on two major genera of ascomycete fungi: *Venturia* spp. and *Alternaria* spp. respectively responsible for scab and apple leaf blotch. The project provided knowledge on the genetics of the fungi responsible for these diseases, in relation to their pathogenicity and their ability to resist to fungicides. In addition, epidemiological monitoring tools for their detection in orchards have been developed, which can be used routinely in analysis laboratories.

Keywords: Apple scab, apple leaf blotch, epidemiological surveillance, *Venturia* spp., *Alternaria* spp



1 Introduction

Les champignons du genre *Venturia* sont responsables de la tavelure, principale maladie des cultures fruitières à pépins. Les normes de commercialisation au niveau européen n'autorisent pas la présence de taches de tavelure dans les circuits de distribution (règlement UE n°543/2011), et cette maladie représente donc une menace permanente chez les producteurs pour la qualité de leur récolte, justifiant l'essentiel de la protection fongicide en verger : l'Indice de fréquence de traitement (IFT) fongicides sur pommier est estimé à 21,3 en France en vergers conventionnels et à 13,8 en vergers bio (rapport Ecophyto R&D, INRA, 2010) dont environ 2/3 pour lutter contre la tavelure (variable selon la région).

Le genre *Alternaria* comporte, quant à lui, de nombreuses espèces, dont plusieurs sont décrites sur pommier et poirier. La plupart des espèces d'*Alternaria* se comportent comme des agents pathogènes secondaires en verger et en conservation mais certaines peuvent agir comme des parasites majeurs. À ce titre, l'Union Européenne avait jusqu'en 2019 inclus sur ses listes de champignons de quarantaine "*Alternaria alternata* (F.) Keissler (isolats pathogènes non européens)" sur pommier. L'une d'elles, *Alternaria alternata* pathogène sur pommiers (*Alternaria alternata* : *apple pathotype* en anglais) était un organisme de quarantaine responsable de chutes précoces de feuilles sur pommier. Le champignon peut également infecter les fruits, provoquant des taches nécrotiques. En France, depuis plusieurs années, des défoliations importantes étaient observées dans des vergers de pommiers de la région Auvergne-Rhône-Alpes. Les premières analyses ont pu montrer que différents taxa du genre *Alternaria* étaient isolés de ces nécroses foliaires. Ces problèmes ne semblaient pas affecter les fruits. Des défoliations massives sur pommier ayant également été récemment observées dans d'autres pays européens voisins, l'émergence de cette maladie suscitait de fortes inquiétudes dans la profession.

Ainsi, les objectifs du projet CREATIVE concernant l'alternariose sur pommier peuvent se résumer en trois grands axes : 1/ Caractériser taxonomiquement les souches isolées en France à partir de gènes polymorphes, 2/ caractériser les souches françaises par leur capacité à produire des toxines impliquées dans la pathogénicité de l'*apple pathotype* et 3/ identifier, à partir d'une approche en génomique comparative, des régions candidates pour le développement d'un ou plusieurs tests spécifiques capables de détecter et de différencier les clades impliqués dans la maladie des pommiers directement sur végétal.

2 État des lieux de la répartition et de la fréquence des différentes espèces d'intérêts sur le territoire national : diversité, pathogénicité et sensibilité aux fongicides des *Alternaria* et *Venturia* émergents sur pommier

2.1 Prospection sanitaire des vergers échantillonnés : niveaux de défoliation et état sanitaire des arbres fruitiers

Dans les vergers de la région Auvergne-Rhône-Alpes (AURA), plusieurs parcelles de pommiers de différentes variétés présentaient depuis plusieurs années des taches foliaires provoquant des défoliations importantes. Le phénomène a pris des proportions particulièrement préoccupantes en 2016, notamment dans plusieurs vergers où 100 % des arbres étaient atteints avec une défoliation atteignant jusqu'à 50 % du feuillage. Les feuilles des parcelles concernées présentaient tout d'abord au printemps des tâches violacées (Figure 1, photo 1), qui évoluent en taches marrons concentriques (Figure 1, photo 2) qui convergent pour produire des plages entières desséchées (Figure 1, photo 3) avant que la feuille ne jaunisse et ne tombe (Figure 1, photos 4 et 5).

La FREDON AURA a réalisé durant 3 années la prospection en verger de pommiers, et l'échantillonnage pour la recherche des champignons appartenant au complexe *Alternaria* spp. Au total, ce travail a permis la collecte de 42 échantillons issus de 15 parcelles différentes dans les départements Rhône et Isère. Les échantillons ont été envoyés au laboratoire de la santé des Végétaux de l'ANSES de Malzéville en



2016 puis 2017. Les résultats d'analyses préliminaires ont confirmé qu'en France une maladie comprenant plusieurs lignées d'*Alternaria* pathogènes sur feuilles de pommier était en train d'émerger.

Au total, trois campagnes d'échantillonnage et de prospection sanitaire des vergers ont été organisées (saisons 2016-2017, 2017-2018 et 2018-2019). Ces campagnes, réalisées en collaboration avec la FREDON (AURA), ont combiné l'échantillonnage de feuilles et des fruits présentant des symptômes d'Alternariose et la notation de l'état sanitaire de ces parcelles. Huit parcelles correspondant à 7 variétés et provenant de différents itinéraires techniques (conventionnels et biologiques) ayant présenté des symptômes foliaires en 2016 et 2017 ont été sélectionnées comme des parcelles de référence. La sélection a été réalisée en fonction des informations fournies par la FREDON AURA, et avec l'accord des producteurs. Ces parcelles ont été visitées au moins une fois par saison. L'évaluation de l'état sanitaire a nécessité la mise en place d'une échelle de notation des symptômes à cinq niveaux. Les arbres ne comportant aucun symptôme caractéristique d'*Alternaria* ou présentant moins de 10 feuilles comportant des nécroses caractéristiques ont été considérés comme sains et une note de zéro leur a été attribuée.

La communication sur la maladie réalisée auprès des producteurs, et au sein du réseau de Surveillance Biologique du territoire (Rhône-Alpes), ont permis de centraliser 23 signalements de présence de la maladie, dans les départements Drôme, Ardèche, Haute-Savoie, Savoie, Loire et Rhône, sur 10 variétés différentes (Canada, Gala, Delbard Estivale, Breaburn, Fuji, Golden, Leratess, Bertanne, Juliet, Rosyglow/Pink Lady). Ces observations montrent que la maladie est bien présente sur l'ensemble du territoire Rhône-Alpes, et peut concerner les principales variétés cultivées.

La surveillance en parcelles de référence durant 3 années consécutives a permis de confirmer un début d'apparition de symptômes entre début mai et mi-mai suivant les conditions de températures et de pluviométrie du printemps. Des températures supérieures à 20 °C après un épisode pluvieux, favorisent la progression des symptômes, qui finissent par entraîner les premières chutes de feuilles entre mi-mai et fin mai.

Les conditions de l'année 2019 au printemps ont été favorables au développement de la maladie, puisque c'est l'année où des défoliations moyennes à fortes ont pu être constatées dans les départements du Rhône et de la Loire, pour les variétés Pinova, Bertanne, Canada, Breaburn, Royal Gala. Ces 3 dernières variétés correspondent à celles particulièrement touchées déjà en 2016 et 2017, également dans ces départements où la maladie semblait plus problématique.

Par ailleurs, les conditions météorologiques de l'été étaient déterminantes pour l'évolution de la maladie. Ainsi, les étés chauds et secs connus durant les 3 années du projet ont stoppé sa progression, diminuant son impact dans les parcelles déjà touchées par des défoliations au printemps. L'expérience des suivis poursuivis en 2021 au sein du réseau de Surveillance Biologique du Territoire a montré que le mois de juillet pluvieux aurait pu entraîner de fortes défoliations en août sur la variété Golden en particulier (signalements en Isère, et dans le Rhône).



Figure 1 : Symptômes de taches foliaires provoquant des défoliations importantes dans les vergers de la région Auvergne-Rhône-Alpes © photo FREDON AURA

2.2 Caractérisation des espèces d'*Alternaria* responsable des symptômes sur pommier et sur fruit

Le traitement des échantillons collectés sur le terrain en Auvergne-Rhône-Alpes entre 2016 et 2019 a permis l'obtention de 108 souches pures isolées à partir de feuilles ou de fruits présentant des symptômes. Celles-ci ont été monosporées (obtention d'une souche pure à partir d'une seule spore) et leur ADN génomique total a été extrait afin de permettre l'identification taxonomique précise des souches responsables des symptômes. Ces souches ont permis de compléter une collection de souches



d'*Alternaria* déjà constituée au sein de l'unité de mycologie, comportant 58 souches françaises collectées en 2016 et 2017 des régions Provence-Alpes-Côte d'Azur, Occitanie et Nouvelle-Aquitaine ainsi que de 43 souches étrangères de référence et/ou ayant causées des pathologies similaires (Australie, Israël, Italie et Nouvelle-Zélande)

L'identification taxonomique des souches françaises a nécessité l'amplification et le séquençage de deux marqueurs moléculaires polymorphes : Alta 1 et EndoPG pour chaque isolat. Ces marqueurs sont communément utilisés pour identifier les espèces d'*Alternaria* responsables des symptômes sur arbres fruitiers et sur fruits (Armitage *et al.*, 2015; Harteveld *et al.*, 2013; Rotondo *et al.*, 2012; Woudenberg *et al.*, 2015). L'analyse des séquences obtenues a tout d'abord été réalisée séparément pour chaque marqueur et nécessité la création d'un fichier pour chaque type de séquence. Ceux-ci ont regroupé l'ensemble des séquences associées aux souches d'*Alternaria* de la collection du Laboratoire de santé des végétaux ainsi que celles disponibles sur les bases de données internationales correspondant aux souches de références et celles ayant déjà causé des symptômes similaires à l'étranger.

Plusieurs traitements spécifiques, dont un alignement de séquences, ont été réalisés afin de comparer les séquences des souches collectées avec celles correspondant aux souches de références. Le modèle évolutif des différents marqueurs utilisés a également été déterminé afin de permettre la construction d'un arbre phylogénétique pour chaque marqueur moléculaire. Cette étape intermédiaire est indispensable à la construction d'un arbre phylogénétique plus complexe regroupant les séquences des deux locus utilisés (analyse multilocus ou MLST) permettant une identification taxonomiquement précise des souches françaises.

L'arbre phylogénétique construit à partir des marqueurs Alta 1 et EndoPG a permis de discriminer plusieurs taxons génétiquement proches en utilisant des données obtenues à partir des études existantes : *Alternaria gaisen*, *Alternaria alstroemeriae*, *Alternaria longipes*, *Alternaria gossypina* et les complexes d'espèce *Alternaria alternata* et *Alternaria arborescens*. Il a également permis l'identification précise des souches françaises collectées et isolées lors du projet CREATIVE au sein du complexe d'espèce *Alternaria alternata* et *Alternaria arborescens*.

La recherche spécifique de deux gènes impliqués dans la synthèse de la toxine AM a été réalisée sur l'ensemble des souches isolées. Il s'agit en effet du seul moyen d'identifier le pathotype de pommier d'*Alternaria* ou *Alternaria mali* : organisme de quarantaine appartenant aux *Alternaria* à petites spores et très proche génétiquement des autres espèces d'*Alternaria* responsables des symptômes sur pommier. La détection de ces gènes a été réalisée par amplification spécifique des gènes (AMT-1 et AMT-2) à partir de l'ADN génomique total extrait et d'après la procédure décrite par Johnson *et al.* (2000) et Harimoto *et al.* (2008). Les résultats obtenus lors du projet CREATIVE montrent qu'aucune souche du pathotype de pommier n'a été détectée sur le territoire français que ce soit à partir des échantillons d'origine foliaire ou de fruits.

Finalement, des tests de pathogénicité en conditions contrôlées de température ont été réalisés sur 27 souches d'*Alternaria*. Les souches utilisées correspondaient à 10 *A. alternata* et 17 *A. arborescens* préalablement identifiées à partir des marqueurs Alta 1 et EndoPG. Ces tests ont été réalisés à partir de solutions de spores calibrées inoculées sur six points équidistants des feuilles détachées des cultivars Golden et Gala, deux types de pommier très répandus en France. Les tests ont été réalisés en duplicat pour chaque souche testée afin de prendre en compte la variabilité technique et biologique dans les résultats obtenus. L'analyse des tests de pathogénicité comprenait une notation des symptômes (nécroses) sur chaque feuille après 3, 7 et 10 jours post-infection. Un ré-isolément de certaines souches inoculées a été réalisé afin de valider le postulat de Koch en confirmant l'identification de l'espèce responsable des symptômes via le re-séquençage des deux marqueurs polymorphes précédemment décrits.

Les résultats des tests de pathogénicité ont montré que toutes les souches d'*Alternaria* testées généraient des nécroses sur feuilles détachées des variétés Golden et Gala après 10 jours post-infection. L'analyse



statistique des résultats obtenus a montré une différence significative de sensibilité entre les cultivars Golden et Gala. Golden est plus sensible à l'inoculation d'*Alternaria* sous les conditions des tests. La figure 2b montre néanmoins des différences significatives de pathogénicité entre les souches testées. Cependant aucune différence de pathogénicité n'a été observée après comparaison des deux taxons testés, *Alternaria arborescens* et *Alternaria alternata*. Les contrôles négatifs n'ont pas généré de lésions sur les feuilles détachées. Enfin, l'identité des souches a été confirmée par ré-isolément des souches et ré-identification avec les marqueurs Alta 1 et EndoPG.

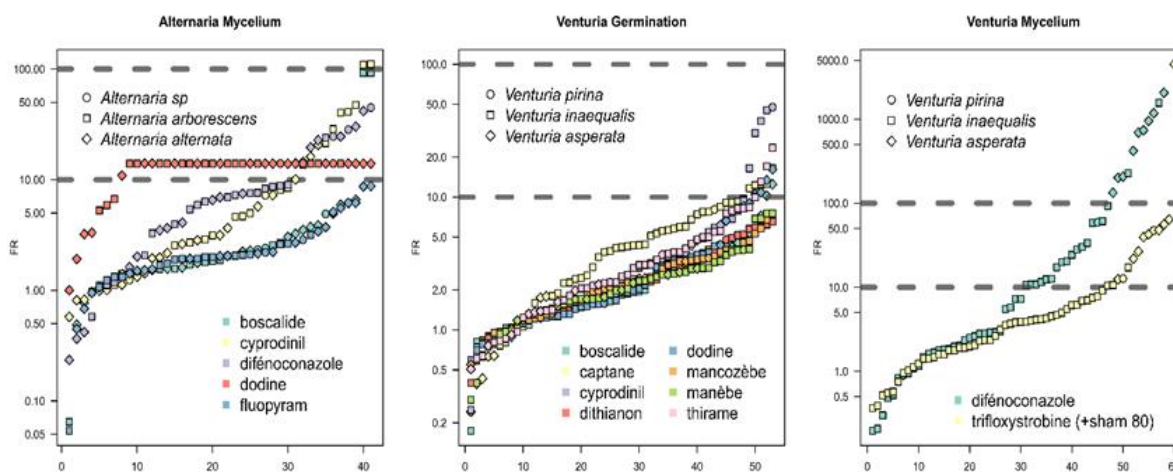


Figure 2 : Distribution des facteurs de résistances pour les différentes substances actives testées par croissance mycélienne pour *Alternaria* sp., par germination de spores et par croissance mycélienne pour *Venturia* sp.

Une autre hypothèse évaluée au cours de ce projet était un manque de sensibilité des champignons phytopathogènes concernés aux produits de protection des plantes. Pour cela, les souches étudiées ont été fournies par l'INRAE d'Angers pour *Venturia* sp. (51 isolats : 42 *V. inaequalis* et 9 *V. asperata*) et par l'Anses de Nancy pour *Alternaria* sp. (40 isolats : 20 *A. alternata*, 18 *A. arborescens* et 2 *Alternaria* sp.). L'objectif étant de caractériser de la manière la plus complète possible les souches, douze substances actives (y compris des substances pas ou plus autorisées dans la lutte contre la tavelure ou l'alternaria) ont été utilisées sous forme de produit technique à environ 99 % de pureté pour réaliser les tests : captane (multisites), dodine (multisites), dithianon (multisites), difénoconazole (IBS), trifloxystrobine (Qol), cyprodinil (AP), boscalide (SDHI), fluopyram (SDHI), carbendazime (BMC), thirame (multisites), manèbe (multisites) et mancozèbe (multisites). Pour les *Alternaria* sp. les tests ont été réalisés par test en germination de spores par mesure de la croissance mycélienne sur milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) pour 7 (dodine, difénoconazole, carbendazime, trifloxystrobine, boscalide, fluopyram et cyprodinil) des 12 substances actives. Pour les *Venturia* sp., les tests ont été réalisés soit par la mesure de la croissance moyenne du tube germinatif (captane, dodine, dithianon, thirame, manèbe, mancozèbe, boscalide et cyprodinil) soit par la mesure de la croissance mycélienne (difénoconazole et trifloxystrobine).

Cette étude a permis de mesurer pour la première fois le niveau de résistance vis-à-vis de multiples substances actives de souches d'*Alternaria* sp. et de *V. asperata* échantillonnées sur pommier et d'évaluer les CI50 (Concentration Inhibitrice 50 %) de substances actives de contact sur des souches isolées de *Venturia* sp. grâce à une méthode de sporulation de souches en culture. Les tests de résistance des souches du genre *Alternaria* ont mis en évidence de nombreuses souches résistantes vis-à-vis de deux substances actives ancienne (la trifloxystrobine et la carbendazime) ainsi qu'un nombre non négligeable de souches avec une résistance à la dodine. En ce qui concerne le genre *Venturia*, les tests ont montré la présence importante de souches résistantes vis-à-vis du difénoconazole avec un niveau assez fort, moins importante vis-à-vis de la trifloxystrobine avec un niveau assez bas. Quelques souches ont été mises en évidence comme résistantes vis-à-vis du boscalide, du captane, du cyprodinil, de la



dodine et du thirame. Toutes les souches analysées sont sensibles au dithianon, au manèbe et au mancozèbe.

Au vu de ces résultats, les efficacités en verger des substances actives concernées par ces résistances des deux genres *Alternaria* et *Venturia* pourraient être affectées. Mais il n'est pas possible de conclure que les défoliations importantes observées au cours des dernières années dans les vergers français ont été causées par une évolution importante et récente des phénomènes de résistances de ces champignons phytopathogènes.

3 Développer des outils de détection et d'épidémiologie ciblant les *Alternaria* spp et *Venturia* spp

3.1 Développement et validation de tests de détection des *Venturia* spp

Au cours des dernières décennies, l'amplification de plusieurs marqueurs génétiques a été utilisée notamment pour la détection spécifique de *Venturia nashicola*, organisme de quarantaine. D'après la littérature scientifique internationale, un seul marqueur présente un polymorphisme de séquences inter spécifique suffisant pour être un marqueur de choix en tant que région cible d'un test PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel ciblant spécifiquement *Venturia nashicola*. Ce marqueur, le facteur d'élongation 1 (appelé par la suite marqueur Tef) a été validé pour la détection spécifique de *V. nashicola*. Peu de données étaient disponibles dans la littérature pour la détection des trois autres espèces de *Venturia* (*V. asperata*, *V. inaequalis* et *V. pirina*). Les outils de génomique comparative ont donc été utilisés par l'équipe EcoFun de l'INRAE d'Angers afin de rechercher des loci potentiellement discriminants, à cibler pour l'amplification sélective des différentes espèces.

Deux types de loci ont été recherchés :

- Des loci présents chez une espèce mais absents chez les autres espèces, appelés par la suite marqueurs uniques
- Des loci présents chez toutes les espèces, mais avec des régions présentant un polymorphisme inter espèces suffisant pour pouvoir discriminer les espèces entre elles. Ces loci seront appelés par la suite marqueurs polymorphes.

En parallèle, le locus codant pour l'espace intergénique de transcription (ITS), commun à toutes les espèces de *Venturia*, a été identifié afin de définir des couples d'amorces/sondes spécifiques au genre *Venturia*. Ce marqueur permettra la détection d'espèces émergentes appartenant au genre *Venturia*.

Ainsi, 17 couples d'amorces/sondes et 4 couples d'amorces/sondes ont été dessinés *in silico* à partir des marqueurs uniques pour l'amplification spécifique respectivement de *V. asperata* et de *V. pirina*. A partir des marqueurs polymorphes, 3 couples d'amorces/sondes ont été dessinés *in silico* pour l'amplification de *V. asperata*, *V. pirina*, *V. inaequalis* et *V. nashicola*. Par ailleurs, un seul couple d'amorces/sonde a pu être dessiné à partir du marqueur ITS.

Les différents couples d'amorces ont été testés *in vivo* sur un mini panel de *Venturia* en utilisant la technologie de marquage SYBR Green, afin de sélectionner les couples potentiellement espèce-spécifiques et genre-spécifiques.

Un seul marqueur suffisamment spécifique de chacune des deux espèces *V. asperata* et *V. pirina* a pu être sélectionné, ainsi qu'un seul marqueur polymorphe. Le marqueur ITS a également été sélectionné comme étant genre spécifique. A ces différents couples d'amorces ont été ajoutées les sondes Taqman correspondantes. Au final, 8 couples d'amorces/sondes ont été validées à l'aide de la technologie SYBR Green :

- Deux combinaisons spécifiques de *V. nashicola* (VnG8359 et VnTef)
- Deux combinaisons spécifiques de *V. pirina* (VpG8359 et Vpir)



- Deux combinaisons spécifiques de *V. asperata* (VaG8359 et Vasp)
- Une combinaison spécifique de *V. inaequalis* (ViG8359)
- Une combinaison spécifique du genre *Venturia* (Ventspp)

Ces couples d'amorces/sonde ont été testés en monoplex sur l'ensemble des isolats de *Venturia* disponibles au sein du laboratoire, ainsi que sur des isolats retrouvés fréquemment sur *Malus* et *Pyrus*, soit une collection de 52 isolats fongiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Résultat des tests de spécificité par PCR en temps réel avec, entre parenthèses, le nombre d'isolats testés par espèce. Un signe "+" correspond à la présence de valeur de Ct, et donc à la détection de la cible, un signe "-" correspond à l'absence de valeur de Ct et donc à la non détection de la cible

	VGp83 59	VnG83 59	VaG83 59	ViG83 59	Vas p	Vp ir	Vents pp	VnT ef
<i>Venturia pirina</i> (5)	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Venturia nashicola</i> (20)	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Venturia asperata</i> (4)	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Venturia inaequalis</i> f. sp. <i>pomi</i> (3)	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Venturia inaequalis</i> f. sp. <i>pyracanthae</i> (3)	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Venturia cerasi</i>	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Venturia carpophila</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Venturia eriobotryae</i>	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Venturia saliciperda</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Monilinia fructicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Monilinia laxa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. fructigena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i> sp. (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phlyctema vagabunda</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp. (4)	-	-	-	-	-	-	-	-

Les résultats de spécificité obtenus sont ceux attendus, sauf pour la combinaison d'amorces/sondes VaG8359 qui amplifie l'ADN de *V. cerasi*, agent pathogène de la cerise. Par ailleurs, la combinaison ViG8359 amplifie l'ADN des deux formes spéciales de *V. inaequalis* (*V. inaequalis* fsp. *pomi* et *V. inaequalis* fsp. *pyracanthae*) tous les deux pathogène du pommier et du pyracantha ainsi que *Venturia eriobotryae* pathogène du néflier du Japon (*Eriobotrya japonica*). Ces trois lignées étant très proches phylogénétiquement, aucun locus suffisamment polymorphe n'a pu être identifié pour dessiner une combinaison d'amorces/sonde spécifique de *V. inaequalis* fsp. *pomi*, forme spéciale qui sévit sur pommier.

Les différents tests ont également été validés sur 46 échantillons de pommes et de poires naturellement contaminés provenant de plusieurs vergers en France. Selon la matrice et les symptômes observés, les résultats obtenus ont été ceux attendus (tableau 2).

Différents kits enzymatiques et différentes plateformes ont été testés afin de vérifier la transférabilité des tests (utilisation dans d'autres laboratoires, avec d'autres marques de réactifs). Des différences ont été observées, mais celles-ci ne sont pas significatives, ce qui suggère une bonne robustesse des tests, sauf pour VnG8359. En effet, quand la cible est présente en très faible quantité, proche de la limite de détection



(LOD), certains kits enzymatiques de réaction PCR étaient insuffisamment sensibles. Ces kits ne devraient donc pas être utilisés pour des échantillons issus de capteurs (faiblement contaminés) ou des échantillons avec très peu, voire aucun symptôme.

La répétabilité et la reproductibilité des tests ont également été vérifiées avec succès.

Tableau 2 : Échantillons naturellement contaminés en France analysés en triplicat par PCR en temps réel

Sample	Host	Cultivar	Organ	Origin in France	Assay (target)					
					18S Uni (Host plant species)	Ventspp (<i>Venturia</i> spp)	VnG8359 (<i>V.</i> <i>nashicola</i>)	ViG8359 (<i>V.</i> <i>inaequalis</i>)	Vasp (<i>V.</i> <i>asperata</i>)	Vpir (<i>V.</i> <i>pirina</i>)
PomFe19 06d	Apple	Rosy Glow	Leaves	Alpes de Haute-Provence	13.84 ± 0.04 ^a	20.01 ± 0.23	>40 ^b	24.90 ± 0.15	>40	>40
PomFe19 06g	Apple	Reinders	Leaves	Bouches-du-Rhône	12.06 ± 0.13	18.13 ± 0.40	>40	23.13 ± 0.18	>40	>40
PLmix ^c	Apple	Pink Lady Rosy Glow	Leaves	Dordogne	14.10 ± 0.23	18.80 ± 0.12	>40	23.52 ± 0.23	>40	>40
CEFEL1	Apple	Pink Lady Rosy Glow	Leaves	Tarn-et-Garonne	15.05 ± 0.03	21.18 ± 0.16	>40	26.82 ± 0.17	>40	>40
CEFEL2	Apple	Pink Lady Rosy Glow	Leave	Tarn-et-Garonne	15.08 ± 0.05	20.73 ± 0.26	>40	26.63 ± 0.06	>40	>40
CEFEL3	Apple	Pink Lady Rosy Glow	Leaves	Tarn-et-Garonne	12.57 ± 0.09	17.83 ± 0.14	>40	23.56 ± 0.12	>40	>40
CEFEL4	Apple	Pink Lady Rosy Glow	Leaves	Tarn-et-Garonne	14.95 ± 0.13	20.70 ± 0.49	>40	26.66 ± 0.18	>40	>40
PomFe07 06b ^c	Apple	Pink Lady	Leaves	Indre-et-Loire	9.15 ± 0.16	16.37 ± 0.30	>40	20.34 ± 0.37	>40	>40
PomFe04 07c	Apple	Pink	Leaves	Indre-et-Loire	14.83 ± 0.08	21.14 ± 0.25	>40	25.84 ± 0.21	>40	>40
PomFe25 06a	Apple	Judaine	Leaves	Moselle	10.89 ± 0.35	17.79 ± 0.46	>40	22.01 ± 0.04	>40	>40
PomFe14 06b	Apple	Jonagored	Leaves	Bas-Rhin	11.30 ± 0.12	18.31 ± 0.29	>40	22.61 ± 0.08	>40	>40
PomFe19 06e	Apple	Golden Smoothee	Leaves	Bouches-du-Rhône	13.02 ± 0.12	19.70 ± 0.85	>40	24.72 ± 0.10	>40	>40
PomFe06 06	Apple	Golden	Leaves	Loiret	11.41 ± 0.09	17.35 ± 0.52	>40	21.81 ± 0.06	>40	>40
PomFe07 06a ^c	Apple	Golden	Leaves	Indre-et-Loire	8.91 ± 0.10	15.34 ± 0.19	>40	19.94 ± 0.09	>40	>40
PomFe07 06c	Apple	Golden	Leaves	Indre-et-Loire	12.14 ± 0.02	17.98 ± 0.17	>40	22.66 ± 0.12	>40	>40
PomFe14 06c	Apple	Golden	Leaves	Haut-Rhin	13.19 ± 0.57	19.93 ± 0.68	>40	24.99 ± 0.23	>40	>40
PomFe19 06a ^c	Apple	Golden	Leaves	Vaucluse	16.01 ± 0.09	25.28 ± 0.67	>40	28.97 ± 0.34	>40	>40
PomFe19 06f	Apple	Golden	Leaves	Vaucluse	12.29 ± 0.04	19.32 ± 0.03	>40	24.03 ± 0.12	>40	>40
PomFe19 06h	Apple	Golden	Leaves	Bouches-du-Rhône	11.33 ± 0.06	19.18 ± 0.57	>40	23.29 ± 0.14	>40	>40
PomFe07 06d	Apple	Galaval	Leaves	Hérault	9.53 ± 0.11	17.35 ± 0.10	>40	21.30 ± 0.20	>40	>40
PomFe19 06b	Apple	Gala or Granny	Leaves	Vaucluse	11.56 ± 0.20	23.73 ± 2.44	>40	24.25 ± 0.20	>40	>40
PomFe19 06i	Apple	Gala	Leaves	Bouches-du-Rhône	10.56 ± 0.13	18.00 ± 0.47	>40	22.56 ± 0.11	>40	>40
PomFe04 07b ^c	Apple	Gala	Leaves	Indre-et-Loire	16.08 ± 0.10	22.08 ± 0.43	>40	27.11 ± 0.33	>40	>40
PomFe25 06b	Apple	Florina	Leaves	Moselle	10.45 ± 0.12	27.44 ± 4.33	>40	23.50 ± 0.21	>40	>40
PomFe14 06a	Apple	Crimson Crisp	Leaves	Haute-Saône	11.73 ± 0.22	19.11 ± 0.70	>40	23.03 ± 0.08	>40	>40
PomFe24 06	Apple	Chantecler	Leaves	Hérault	13.97 ± 0.14	20.17 ± 0.10	>40	24.91 ± 0.13	>40	>40
PomFe19 06c	Apple	Braeburn	Leaves	Bouches-du-Rhône	10.53 ± 0.15	21.90 ± 2.38	>40	23.12 ± 0.09	>40	>40
PomFe04 07a	Apple	Belchard	Leaves	Indre-et-Loire	13.96 ± 0.17	23.63 ± 2.72	>40	26.00 ± 0.16	>40	>40
INRA 24/05	Apple	unknown	Leaves	Maine-et-Loire	14.77 ± 0.09	21.18 ± 0.46	>40	25.60 ± 0.06	>40	>40



PomFr040 7b ^c	Apple	Pink	Fruit	Indre-et-Loire	17.71 ± 0.18	20.94 ± 0.16	>40	26.06 ± 0.18	>40	>40
PomFr190 6a ^c	Apple	Golden	Fruit	Vaucluse	17.12 ± 0.09	21.63 ± 0.41	>40	27.19 ± 0.19	>40	>40
PomFr040 7a ^c	Apple	Gala	Fruit	Indre-et-Loire	12.24 ± 0.05	15.72 ± 0.14	>40	20.58 ± 0.13	>40	>40
EM PomFe	Apple	unknown	Leaves	Haute-Saône	12.35 ± 0.08	25.67 ± 0.12	>40	30.39 ± 0.54	>40	>40
PomFr190 6b	Apple	Gala or Granny	Fruit	Vaucluse	14.04 ± 0.07	32.11 ± 0.57	>40	>40	>40	>40
PoiFr2506 c	Pear	unknown	Fruit	Vosges	14.14 ± 0.05	17.88 ± 0.13	>40	>40	>40	21.78 ± 0.10
Pfr0506 ^c	Pear	unknown	Fruit	Maine-et-Loire	15.09 ± 0.21	18.82 ± 0.09	>40	>40	>40	23.84 ± 0.14
PoiFe190 6a ^c	Pear	Williams	Leaves	Vaucluse	11.74 ± 0.02	28.61 ± 10.6	>40	>40	>40	21.76 ± 0.08
PoiFe040 7a ^c	Pear	Williams	Leaves	Indre-et-Loire	12.50 ± 0.09	18.89 ± 0.13	>40	>40	>40	22.16 ± 0.15
PoiFe190 6b ^c	Pear	Williams	Leaves	Bouches-du- Rhône	14.49 ± 0.11	19.68 ± 0.16	>40	>40	>40	24.06 ± 0.09
F0506	Pear	St-Jean	Leaves	Dordogne	12.11 ± 0.12	18.07 ± 0.07	>40	>40		20.85 ± 0.09
PoiFe040 7b	Pear	unknown	Leaves	Indre-et-Loire	17.46 ± 0.88	21.75 ± 0.31	>40	>40	>40	22.80 ± 0.14
1051-F1	Apple	Ariane	Fruit	Lot-et-Garonne	16.33 ± 0.07	27.53 ± 0.10	>40	>40	29.50 ± 0.51	>40
1089-F1	Apple	Ariane	Fruit	Tarn-et-Garonne	18.55 ± 0.05	26.13 ± 0.07	>40	>40	28.73 ± 0.59	>40
Pomme ^d	Apple	Ontario	Leaves	Meurthe-et- Moselle	10.37 ± 0.09	neg	>40	>40	>40	>40
Rouille 06/06 ^e	Pear	Charles De Gaulle	Leaves	Meurthe-et- Moselle	17.15 ± 0.15	neg	>40	>40	>40	>40
CG1 ^d	Pear	Charles De Gaulle	Fruit	Meurthe-et- Moselle	16.17 ± 0.21	neg	>40	>40	>40	>40

^a Mean Ct values ± standard deviation (n=3) yielded by the different real time assays developed in this study.

^b not detected

^c PCR product was sequenced

^d healthy sample

^e sample with rust symptoms

>40 : cible non détectée

NA : non analysé

Le multiplexage de ces différentes combinaisons d'amorces/sondes a été testé. Il a été retenu trois multiplex possibles selon la matrice végétale, à savoir ViG8359-Vasp-Ventspp pour des échantillons de *Pyrus malus*, VnG8359-Ventspp pour des échantillons de *Pyrus pyrifolia* et VpG8359-Ventspp pour des échantillons de *Pyrus communis*. Les combinaisons d'amorces/sonde non multiplexées peuvent servir comme test de confirmation en cas de détection d'une des cibles pour lever tout doute (Muller *et al*, 2024).

3.2 Collecte de spores en verger de pommier

Trois exemplaires de pièges à spore rotatifs de type GRIPS-99M ont été sélectionnés puis acquis, ainsi que trois batteries d'alimentation portatives. Le Rotorod est un capteur de spores aéroporté. Le modèle GRIPS-99M est l'outil utilisé pour la projection des spores de *Venturia inaequalis*. C'est une nouvelle méthode de captage des spores, utilisée pour la première fois pour *Venturia inaequalis* en verger de pommier. Ce système est composé d'un moteur électrique portant et mettant en rotation 2 baguettes positionnées verticalement. Ces baguettes sont enrubannées de scotch double face permettant la capture des spores se trouvant dans l'air ambiant. Les capteurs de spores ont été envoyés au CTIFL de Lanxade pour des expériences de captage de spores en vergers.

Les trois Rotorods ont été positionnés en verger au sein de la parcelle non traitée de pommier Rosy Glow–Pink Lady. Ils sont positionnés au sein des rangées de pommiers sur un pic en métal d'une hauteur d'environ 1 m 65 avec une alimentation électrique par une batterie. Les Rotorods sont activés sur une période de 24 h dès qu'un épisode de pluie est prévu et/ou observé dans la journée. En fonction des



délais de ré-entrée en parcelle et/ou de l'agenda (week-end, jours férié), les Rotorods ont été activés sur une période comprise entre 24 h et 63 h. Entre le 18 février 2022 et le 22 avril 2022, 21 prélèvements de bâtonnets issus de 3 capteurs de spores ont été réalisés. Les baguettes prélevées ont été envoyées à l'unité de mycologie de l'ANSES Nancy pour analyses.

Les isolats de référence LSVM604 (*V. inaequalis*), LSVM602 (*V. pirina*) et LSVM596 (*V. asperata*) ont été cultivés en conditions contrôlées sur milieu gélosé. Une fois les cultures suffisamment développées, celles-ci ont été frottées individuellement sur des boîtes contenant un milieu de culture gélosé sur lequel un film de cellophane avait été déposé. Au bout de 10 jours d'incubation en conditions contrôlées, pour chacune des trois espèces, les spores de chaque boîte ont été décrochées à l'aide d'un racloir en verre et d'eau additionnée de Tween 20.

Entre le 18 février 2022 et le 22 avril 2022, 21 prélèvements de bâtonnets issus de 3 capteurs de spores ont été réalisés dans un verger du CTIFL de Lanxade. Sur ces 21 prélèvements, 8 se sont révélés positifs pour la cible *V. inaequalis*, avec un maximum de 5 700 spores détectées, et un seul pour les cibles *V. asperata* et *V. pirina*. Certaines espèces ont été potentiellement détectées sur d'autres bâtonnets mais à des valeurs trop faibles pour être considérées positives avec certitude

4 Détermination de l'origine géographique des souches émergentes de *Alternaria* et identification des gènes putatifs impliqués dans le pouvoir pathogène de *Alternaria* par génomique comparative.

Nous avons séquencé le génome de 60 souches d'*Alternaria* sp. isolées en France (27 souches), en Italie (7 souches), Israël (4 souches), Afrique du Sud (9 souches), Australie (9 souches), Nouvelle-Zélande (3 souches) et États-Unis (1 souche). Nous avons inclus des isolats de référence caractérisés dans la littérature comme pathogènes. Après assemblage des génomes, un arbre phylogénétique a été créé sur la base de 484 gènes du core génome. Cet arbre montre clairement que la distribution de la toxine AM est polyphylétique. L'analyse génomique montre que les souches sont réparties dans les deux clades (complexe d'espèces arborescents et complexe d'espèces *Alternata*) d'une part et que les souches isolées de feuilles ou de fruits ne constituent pas des populations différentes d'autre part.

Afin d'identifier des gènes impliqués dans la pathogénie de ce champignon nécrotrophe nous nous sommes concentrés sur la recherche de gènes impliqués dans la production de toxines. La présence de clusters de gènes impliqués dans la production de toxine AMT a donc été recherchée sur l'ensemble des génomes. Le cluster AMT n'a été détecté dans aucune des souches françaises analysées écartant ainsi l'hypothèse de la présence en France de souches faisant partie de la liste de quarantaine jusqu'à 2019 sous le nom d'*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Ce résultat constitue une conclusion majeure de notre étude. Une analyse approfondie visant à analyser d'autres clusters impliqués dans la production de toxines a été réalisée. Nous avons mis en évidence que les clusters de métabolites secondaires diffèrent entre populations : les souches du complexe arborescens ont plus de polykétide synthases (PKS) que les souches du complexe *Alternata* alors que les souches *Alternata* ont un nombre plus élevé de gènes de terpène synthase.

Par ailleurs, nous avons pu identifier jusqu'à 6 chromosomes supplémentaires chez certaines souches d'*Alternaria alternata* (CDCs pour conditionally dispensable chromosomes). Si les chromosomes supplémentaires sont décrits dans la littérature comme pouvant porter des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène des champignons, aucun de ces chromosomes n'a été détecté au sein des souches d'*Alternaria* isolées en France au cours de notre étude.

Il était initialement prévu de se servir des génomes pour identifier l'origine géographique des souches de quarantaine que nous aurions pu potentiellement identifiées. Cette partie est devenue sans objet dans la mesure où ce type de souches n'a pas été identifié dans notre collection.



5 Conclusion

Les connaissances sur la maladie de chutes des feuilles due à *Alternaria* ont beaucoup progressé grâce à ce projet et aux résultats qu'il a apportés. On sait maintenant que l'*apple pathotype*, ancien parasite de quarantaine, n'a jamais été détecté dans le cadre de nos prospections, et que les symptômes proviennent d'un complexe d'espèces dont la caractérisation a pu être précisée, comme la constitution d'arbres phylogénétiques l'a illustré (Fontaine *et al*, 2021). Un test multiplex de dépistage des *Alternaria* défoliateurs, et de l'*apple pathotype* est en cours de développement et sera mis à disposition de tous les acteurs de la filière.

Des outils de détection des différentes espèces de *Venturia* basés sur du polymorphisme nucléotidique, ont été développés en partie grâce à l'étude des séquences de nombreux génomes de chaque espèce de *Venturia* obtenus dans le cadre de ce projet. Les tests développés sont actuellement évalués dans le cadre d'une étude de cas au terrain avec un système innovant de capture de spores en verger. Ils seront ensuite mis à disposition de tous les acteurs de la filière par le biais de publications scientifiques accessibles librement.

Le projet a permis d'obtenir les premiers résultats de sensibilité/résistances vis-à-vis d'une large gamme de fongicides pour de nouvelles espèces jamais étudiées en France sur pommier : *V. asperata* et *A. alternata*. Le transfert d'une méthode de production de spores à partir de mycélium entre deux laboratoires participant à ce projet a permis de mettre au point des tests biologiques en germination pour *V. inaequalis* vis-à-vis de substances actives largement utilisées dites « de contact ». Ce protocole est dorénavant utilisé dans le cadre du plan de surveillance des résistances. Le suivi de l'émergence et de la diffusion des résistances des *Venturia* et des *Alternaria* aux produits de protection des plantes ont été et seront poursuivis dans les années à venir dans le cadre du plan de surveillance des résistances, en particulier pour *V. inaequalis*.

Les suivis en verger ont permis de mettre en évidence que les symptômes d'Alternariose étaient présents sur feuilles sur l'ensemble du territoire Rhône-Alpes. La maladie peut concerner les principales variétés cultivées, avec des intensités variables à partir du mois de mai. Les producteurs et techniciens sont désormais formés à la reconnaissance des symptômes, et pourront identifier la maladie plus facilement. Certaines variétés (Pinova, Canada, Bertanne, Breaburn, Royal Gala) feront l'objet d'une attention particulière, notamment dans les départements du Rhône et de la Loire.

Ethique

Les auteurs déclarent que les expérimentations ont été réalisées en conformité avec les réglementations nationales applicables.

Déclaration sur la disponibilité des données et des modèles

Les données qui étayaient les résultats évoqués dans cet article sont accessibles sur demande auprès de l'auteur de correspondance de l'article.

Déclaration relative à l'Intelligence artificielle générative et aux technologies assistées par l'Intelligence artificielle dans le processus de rédaction.

Les auteurs n'ont pas utilisé de technologies assistées par intelligence artificielle dans le processus de rédaction.



ORCIDs des auteurs

Benoit Barrès : 0000-0002-6777-0275
Renaud loos: 0000-0001-9359-5098
Yohana Laloum : 0000-0002-1631-0789
Bruno Le Cam : 0000-0001-9884-011X
Cécile Guinet : 0009-0003-9522-1032
Jaime Aguayo : 0000-0002-7552-0655

Contributions des auteurs

RI et BLC ont participé à la préparation du projet, à la construction des actions, à la supervision des expérimentations ainsi qu'à l'écriture et relecture du présent article. BB a participé à la rédaction projet, à l'analyse des données de résistances aux PPP, ainsi qu'à la rédaction et relecture du présent article. FR a conduit les biotests de résistances aux PPP et participé à la relecture du présent article. JA a réalisé les études sur la caractérisation des espèces d'*Alternaria* et mis au point de test d'identification. CG et CJ ont réalisé la mise au point de la détection des espèces de *Venturia* par biologie moléculaire et ont participé à relecture du présent article. MC a réalisé la prospection en verger de pommiers, et l'échantillonnage pour la recherche des champignons appartenant au complexe *Alternaria* sp. MG et YL ont assuré le portage du projet et participé à la rédaction du présent article. AM et YL ont géré la gestion de la collecte des spores en verger. M. Fichespoil est remercié pour avoir représenté le LEGTA Valence.

Déclaration d'intérêt

Les auteurs déclarent ne pas travailler, ne conseiller, ne pas posséder de parts, ne pas recevoir pas de fonds d'une organisation qui pourrait tirer profit de cet article, et ne déclarent aucune autre affiliation que celles citées en début d'article

Remerciements

Les membres du projet CASDAR RT CREATIVE remercie le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire ainsi que l'Office français de la Biodiversité pour avoir financé le projet.

Références bibliographiques

- Armitage A. D., Barbara D. J., Harrison R. J., Lane C. R., Sreenivasaprasad S., Woodhall J. W., Clarkson J.P., 2015. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support from morphological characters. *Fungal Biology* 119(11): 994-1006.
- Butault J-P., Dedryver C-A., Gary C., Guichard L., Jacquet F., et al. Écophyto R&D : quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? Synthèse du rapport de l'étude. [Rapport Technique] Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer. 2010, 90 p. (hal-01172967)
- Fontaine K., Fourrier-Jeandel C., Armitage, A.D., Boutigny A.-L., Crépet M., Caffier V., Gnide D.C., Shiller, J., Le Cam B., Giraud, M., loos, R., & Aguayo, J., 2021. Identification and pathogenicity of *Alternaria* species associated with leaf blotch disease and premature defoliation in French apple orchards. *PeerJ*, 9, e12496, doi:10.7717/peerj.12496.
- Harimoto Y., Tanaka T., Kodama M., Yamamoto M., Otani H., Tsuge T., 2008. Multiple copies of AMT2 are prerequisite for the apple pathotype of *Alternaria alternata* to produce enough AM-toxin for expressing pathogenicity. *Journal of General Plant Pathology* 74:222229 DOI 10.1007/s10327-008-0089-1.
- Harteveld D.O.C., Akinsanmi O.A., Drenth A., 2013. Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology* 62(2): 289-297.



Johnson R.D., Johnson L., Kohmoto K., Otani H., Lane C.R., Kodama M., 2000. A Polymerase Chain Reaction-Based Method to Specifically Detect *Alternaria alternata* Apple Pathotype (*A. mali*), the Causal Agent of *Alternaria* Blotch of Apple. *Phytopathology* 90: 973-976.

Muller E., Shiller J., Cam B.L., Laloum Y., Girault M., loos R., & Guinet C., 2024. Species-specific real-time PCR assays for the detection of *Venturia* spp. on apple and pear, including the quarantine species *V. nashicola*. *Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s42161-024-01615-1.

Rotondo F., Collina M., Brunelli A., Pryor B.M., 2012. Comparison of *Alternaria* spp. Collected in Italy from Apple with *A. mali* and Other AM-Toxin Producing Strains. *Phytopathology* 102(12): 1130-1142.

Woudenberg J.H., Seidl M.F., Groenewald J.Z., de Vries M., Stielow J.B., Thomma B.P., Crous P.W., 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Stud Mycol.* 2015 Sep;82:1-21. doi: 10.1016/j.simyco.2015.07.001. Epub 2015 Aug 25. PMID: 26951037; PMCID: PMC4774270.

Delegated regulation - 2021/1890 - EN - EUR-Lex (europa.eu)



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

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* et son DOI, la date de publication.