



**HAL**  
open science

**Développement saprotrophe de fusarium graminearum :  
rôle respectif de différents habitats naturels du  
champignon dans le processus d'infection du blé en  
Bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque  
de fusariose**

Johann Leplat

► **To cite this version:**

Johann Leplat. Développement saprotrophe de fusarium graminearum : rôle respectif de différents habitats naturels du champignon dans le processus d'infection du blé en Bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque de fusariose. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS042 . tel-00843896

**HAL Id: tel-00843896**

**<https://theses.hal.science/tel-00843896>**

Submitted on 15 Jul 2013

**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.



# Université de Bourgogne

Unité Mixte de Recherche 1347 AGROECOLOGIE

## Thèse

Pour obtenir le grade de

**Docteur**

Discipline : Ecologie Microbienne

Présentée par

**Johann LEPLAT**

29 Octobre 2012

Développement saprotrophe de *Fusarium graminearum* : rôle respectif de différents habitats naturels du champignon dans le processus d'infection du blé en Bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque de fusariose

Sous la direction de Christian STEINBERG et Pierre MANGIN

### Devant le jury composé de :

Christian BARREAU,	INRA, Villenave d'Ornon, France	Rapporteur
Thierry LANGIN,	INRA, Clermont – Ferrand, France	Rapporteur
Jean-Philippe FASQUEL,	Welience, Dijon, France	Examineur
Emmanuelle GOURDAIN,	Arvalis, Boigneville, France	Examinatrice
Daniel WIPF,	Université de Bourgogne, Dijon, France	Président du jury
Pierre MANGIN,	INRA, Dijon, France	Co-encadrant
Christian STEINBERG,	INRA, Dijon, France	Directeur



*« La science consiste à passer  
d'un étonnement à un autre »*

*Aristote*

*« La science est une chose merveilleuse...  
tant qu'il ne faut pas en vivre ! »*

*Albert Einstein*



*Le monde du travail est un microcosme à l'image de la vie : on y rencontre beaucoup de gens différents. Ces remerciements sont dédiés à tous ceux qui m'ont soutenu au cours de ces quatre années...*

*Je commencerai par les remerciements « officiels » :*

Je voudrais remercier les financeurs de mon projet qui ont rendu possible sa réalisation à travers la structure *Farine+* soutenue par le pôle de compétitivité *Vitagora*<sup>®</sup> ; ainsi que l'ancienne UMR *MSE*, faisant aujourd'hui partie de l'UMR *Agroécologie*, qui m'a accueilli dans ses locaux.

J'ai une pensée reconnaissante pour les membres de mon jury de thèse qui ont réussi à digérer la lecture du chapitre 4 : les rapporteurs, *Christian Barreau* et *Thierry Langin*, mais aussi les examinateurs, *Jean-Philippe Fasquel*, *Emmanuelle Gourdain* et *Daniel Wipf*.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de pilotage, *Florence Forget* et *Christian Lannou*, et à travers eux tous les membres de réseau *Fusatox*, pour les réflexions scientifiques enrichissantes que nous avons pu avoir.

Je suis vraiment reconnaissant envers *Pierre Mangin* et *Laurent Falchetto* qui ont assuré le bon déroulement des essais menés sur le domaine expérimental d'Epoisses.

Je voudrais remercier mon Directeur de thèse, *Christian Steinberg*, dont la tête fourmille d'idées et qui m'a toujours permis de voir plus loin quand j'avais le nez un peu collé à mes résultats.

Un grand merci à *Cécile Heraud* qui m'a bien aidé sur plusieurs points clés de mon travail, notamment la qPCR et cette satanée tuyauterie infernale d'HPLC.

Merci aussi à *Elodie Gautheron* qui m'a épaulé (partagé ma souffrance ?) lors des notations au champ : épillets oranges, grains roses, conception de sachets de résidus... je compatie, elle, elle les enterre encore ses sachets... *yerk, yerk* (rire sadique) !

Je remercie tous les stagiaires de licence pro, de master, d'école d'ingénieur et autres thésards qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de mon travail. Ceux qui ont œuvré au champ, *Fanny Pichereau* et *Guillaume Delavault* ; sur la base de données, *Ludovic Henneron* ; pour mettre au point la qPCR, *Efren Remesal* ; ou encore pour caractériser le chemotype de la souche de *F. graminearum* MIAE00376, *Vitaliy Zehrya*. Et également ceux avec qui je n'ai pas travaillé mais que j'ai côtoyé avec plaisir, *Marion*, *Mario*, *Muhammad*... et j'en oublie certainement.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous les membres de l'équipe 3 que je n'ai pas encore cité, mais avec lesquels j'ai vécu pendant quatre ans et qui m'ont tous apporté leur aide et leurs conseils.

Et comment ne pas parler de mes éminents collègues de bureau ? *Abdel « le sécateur marocain » Echairi*, avec qui j'ai fait mes premiers pas à l'INRA, et surtout *Julie Laurent* qui a représenté la seconde moitié des *JL<sup>2</sup>* durant toutes ces années.

Je tiens enfin à remercier mes ex, ex-collègues de la « *Collec des Champi* », à Pasteur, qui m'ont lancé dans le métier : *Alain, Bernard, Karima, Marie-Ange et Martine*.

*Et maintenant, les remerciements tous azimuts :*

Je commencerai par remercier mes parents, il paraît que cela se fait ! Il m'ont toujours soutenu durant ces quatre années bien que la distance ne leurs ait pas facilité la tâche. Ma mère racontait même avec humour que j'habitais à Dijon... en Chine ! Je leurs associe tous les membres de ma famille, qui savent tous à quel point je les aime.

Je remercie ma sœur (et mon beau-frère) d'avoir fait la surprise de pondre durant ma thèse le petit sacripant dont le jeu préféré est devenu « monter sur mespaules (en un seul mot) de Tonton ! ». Il est excellent, il a déclaré récemment qu'il aimait sa mère autant que les pains aux raisins ; ça c'est de l'amour !

J'ai une grosse bouffée d'affection pour ma Grande-Sœur dijonnaise, *Najoi*, elle a tenté de me conserver autre chose que la peau sur les os et croyez moi, malgré ses talents de cuisinière, cela n'a pas été une mince affaire. Elle m'a également présenté une kyrielle d'amis que j'adore : *Zouzou, Thomas, Kawai, Assia...* et les autres.

J'ai une pensées pour mes potes dispatchés aux quatre coins de la France, toujours prêts pour une bonne chouille, même si l'on ne se voit pas assez souvent : *Jess, Clém, Lara, Toutoune*, les *Pierre*, leurs pièces rapportées et les autres...

Merci à l'architecte du bâtiment CMSE d'avoir inclus une terrasse dans les plans du centre, elle a bien servi.

Je remercie également l'INRA d'avoir installé une Nespresso<sup>®</sup> dans le bâtiment CMSE. Comme dit *Vincent*, j'ai dû la rentabiliser à moi tout seul !

Je pense à tous mes frères d'armes, dont les sacrifices nous ont permis de « sauver Carentan »... un bon paquet de fois.

Merci à tous les footeux qui m'ont permis de placer quelques bons tacles assassins : je ne comprends d'ailleurs toujours pas pourquoi ils sont interdits au foot en salle !

Je remercie *Chris, Flo* et bien sûr *Molten Globul* d'avoir inventer les croisettes, enroulettes et autres chiches. Il ne faudrait jamais oublier ce conseil : « Te jette pas !! ».

Qu'aurais-je fait sans mes deux QG, *le Comptoir* pour le café de l'après-midi et *le Flan* pour les bières et autres whisky-coca de soirées ? Quoique ce sont peut-être eux qui devraient me remercier d'être devenu un véritable pilier de leur économie !



Une petite pensée pour les membres de « *la Cour des Miracles* » qui ne sont, pour la plupart, pas de mauvais bougres, à l'exception de leur « *Roi des Gueux* », dont l'orthographe exacte serait d'ailleurs plutôt « *le Roi Dégueu* ».

Je tiens vraiment à remercier à nouveau *Najoi*, *Julie* et *Flo*. Je les ai déjà cités par ailleurs, mais ils le méritent vraiment tant ils ont été présents dans les moments de galère.

Enfin, un peu de nostalgie en songeant à *Adeline* qui m'a fait découvrir la pâte de grenade, en provenance directe du Moyen-Orient. Grâce à elle, pendant un été, j'ai cherché tous les prétextes possibles et imaginables pour avoir des gels de révélation PCR à faire, et grâce à elle, je ne suis jamais passé à la pipette multicanaux pour les déposer.





La fusariose est une des maladies les plus importantes altérant le blé en Bourgogne comme dans le monde. L'espèce fongique *Fusarium graminearum* est l'un des agents principaux de la maladie, bien que d'autres espèces fongiques soient aussi impliquées. De plus, l'interaction hôte-pathogène peut entraîner la production de mycotoxines toxiques pour l'homme et l'animal.

Dans ce travail de thèse, une revue bibliographique a révélé qu'outre la sélection de variétés résistantes, la seule alternative à ce jour pour prévenir le développement de la maladie est de contrôler l'inoculum primaire dans son habitat naturel : les adventices, le sol et les résidus de culture. En raison de la tendance actuelle à la réduction du travail du sol, une attention particulière doit être portée au rôle des résidus de culture dans la survie et le développement de *F. graminearum*.

Sur le plan expérimental, deux approches ont été choisies pour mieux comprendre le développement saprotrophe du champignon et ses conséquences. *i)* La première, à travers un essai en champ dans le contexte pédoclimatique Bourguignon, avait pour but de définir la part relative des différentes sources d'inoculum dans le développement de la fusariose du blé et l'accumulation des mycotoxines dans les grains. L'essai en champ devait en outre permettre de déterminer si des indicateurs précoces du développement ultérieur de la maladie sur épi et de l'accumulation de mycotoxines dans les grains pouvaient être identifiés. *ii)* La seconde, à travers un essai en microcosmes, avait pour but de suivre le développement de *F. graminearum* dans le sol et les résidus.

*i)* Les essais en champ (split plots expérimentaux) ont confirmé que les inoculums hébergés par les semences et/ou enfouis avec les résidus de culture dans la couche superficielle du sol n'avaient un effet que sur le développement hivernal de la fusariose. En revanche, la principale source d'inoculum provoquant la maladie sur épi et l'accumulation de mycotoxines dans les grains de blé provient des résidus laissés à la surface du sol. Les observations, suivi du développement des plantes depuis le semis jusqu'à la moisson, itinéraires techniques et conditions pédoclimatiques, ont permis de construire une base de données importante. Cependant, le rôle du climat est déterminant dans le développement de l'interaction *Fusarium*-plante hôte depuis la floraison du blé jusqu'à la récolte, ce qui ne permet pas d'utiliser les indicateurs précoces révélateurs de cette interaction pour prédire avec justesse les risques de pertes de rendements et d'accumulation des mycotoxines encourus.

*ii)* L'essai en microcosmes a montré que le développement de *F. graminearum* était contrôlé par la microflore du sol. Néanmoins, des résidus de cultures fournissent au champignon une niche spatiale et trophique compensatrice très favorable à son développement. L'exploitation de cette niche par *F. graminearum* dépend de la nature (précédent cultural et C/N) de ces résidus. Le maïs offre une capacité biotique supérieure à celle du blé et du colza pour le développement de *F. graminearum* alors que la moutarde, à l'inverse, aurait un effet suppressif pour le champignon.

Ce travail a permis de souligner l'importance de la gestion des résidus de culture dans le développement de la fusariose du blé et a apporté de nouvelles connaissances sur la survie du champignon sur ces résidus. Si le travail superficiel du sol devait rester une pratique durable, favoriser une décomposition biologique rapide des résidus de culture et/ou introduire des

cultures intermédiaires assainissantes telles que la moutarde constituent alors des perspectives de recherche sur lesquelles doivent porter nos efforts pour contrôler le potentiel infectieux que représente l'inoculum saprotrophe de *F. graminearum* lors d'une culture de céréales hôtes.

**Mots clés :** *Fusarium graminearum*, développement saprotrophe, résidus de culture, niche écologique, fusariose du blé, mycotoxines, Deoxynivalenol (DON), indicateurs précoces.

Fusarium Head Blight (FHB) is one of the most important disease altering wheat crops in Burgundy as well as in the world. It is mainly caused by *Fusarium graminearum* although other fungi might be involved. Moreover the plant-pathogen interaction leads to the production of mycotoxins potentially toxic for humans and animals.

In the frame of this thesis work, a literature review revealed that, besides the selection of resistant varieties, the only alternative to date to prevent the development of the disease is to control the saprotrophic development of *F. graminearum* in its natural habitat, *i.e.* weeds, soil and crops residues. Due to the current trend of reduced tillage, special attention should be paid to the role of crop residues in the survival and development of *F. graminearum*.

Two approaches were chosen to better understand the saprotrophic development of *F. graminearum* and its consequences towards FHB. *i)* The first through a field experiment in the Burgundian pedoclimatic context aimed at defining the relative importance of the different sources of inoculum in the development of FHB and the accumulation of mycotoxins in grains. The field experiment was also to determine whether early indicators of future disease development on ears and accumulation of mycotoxins in grains could be identified. *ii)* The second, through test microcosms, was to follow the development of *F. graminearum* in the soil and crop residues.

*i)* Field trials (experimental split plots) confirmed that the inoculum hosted by seeds and/or buried with crop residues in the topsoil had only an effect on the winter development of the disease. In contrast, the main source of inoculum causing FHB disease on ears and accumulation of mycotoxins in wheat kernels came from residues left on the soil surface. Observations, *i.e.* monitoring of plant development from planting to harvest, crop management and soil and weather conditions, have helped to build a large database. However, the role of climate was decisive in the development of the *Fusarium*-host plant interaction, from wheat flowering until harvest. This prevented the use of the early indicators revealing that interaction to accurately predict the risks of yield losses and accumulation of mycotoxins involved.

*ii)* The experiment in microcosms showed that the development of *F. graminearum* was regulated by the soil microflora. However, crop residues provide the fungus spatial and trophic niche which are very favourable to its development. The exploitation of this niche by *F. graminearum* depends on the nature (previous crop and C/N) of these residues. The maize stubbles provide a carrying capacity greater than that of wheat straw and rapeseed residues in the development of *F. graminearum* while mustard, conversely, has a suppressive effect for the fungus.

This work highlighted the importance of crop residues management in the development of FHB and gave new understanding about the survival of the fungus on these residues. Considering that no tillage could be used even more widely leads us to conclude that improving the biological decomposition of crop residues at the soil surface or/and using suppressive intermediate crops such as mustard could be the next prospective to investigate to limit the soil inoculum potential of saprotrophic *F. graminearum*.

**Keywords:** *Fusarium graminearum*, saprotroph development, crop residues, ecological niche, Fusarium head blight (FHB), Mycotoxins, Deoxynivalenol (DON), early indicators.



3-ADON : 3-acetyl-4-deoxinivalenol  
15-ADON : 15-acetyl-4-deoxinivalenol  
ADN : Acide desoxyribonucleique  
ANOVA : Analyse of variance  
BASF : Badische Anilin und Soda-Fabrik  
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool  
CaC : Capacité au champ  
CETA : Centre d'étude technique agricole  
Cfu : Colony forming unit  
CLA : Carnation Leaf Agar  
CMCase : Carboxymethylcellulase  
DAD : Diode array detectors  
DON : Deoxynivalenol  
DS : Disease severity  
FDK : *Fusarium*-damaged kernels  
FHB : Fusarium head blight  
GEDA : Groupement d'étude et de développement agricole  
HPLC : High performance liquid chromatography  
ITS : Internal transcribed spacer  
LB : Luria Bertani  
MIAE : Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment  
NIV : Nivalenol  
PCR : Polymerase chain reaction  
PDA : Potato Dextrose Agar  
PGase : Polygalacturonase  
PMGase : Polymethylgalacturonase  
qPCR : PCR quantitative  
SAU : Surface agricole utile  
SDSCV : Semis direct sous couvert végétal  
TCT A : Trichothécènes de type A  
TCT B : Trichothécènes de type B  
TE : Tris-Edta  
*Tef-1 $\alpha$*  : Translation elongation factor-1 $\alpha$   
*Tri* : Gène impliqué dans la biosynthèse de trichothécènes  
ZEA : Zearalenone





# Sommaire



Introduction générale.....	35
Chapitre 1 Contexte bibliographique .....	47
Chapitre 2 Matériels et Méthodes .....	79
I Souche de <i>F. graminearum</i> .....	80
I.1 Caractérisation morphologique de la souche MIAE00376 .....	80
I.1.1 Caractérisation macroscopique .....	80
I.1.2 Caractérisation microscopique.....	80
I.2 Caractérisation moléculaire de la souche MIAE00376.....	81
I.2.1 Extraction et purification de l'ADN fongique .....	81
I.2.1.1 Extraction de l'ADN fongique.....	81
I.2.1.2 Purification de l'ADN fongique.....	81
I.2.2 Caractérisation des régions d'intérêt phylogénétique ITS et <i>tef-1<math>\alpha</math></i> de la souche	83
Une région génomique d'intérêt phylogénétique est une portion d'ADN informative,	
orthologue et universelle. ....	83
I.2.2.1 Région ITS .....	83
I.2.2.2 Région <i>tef-1<math>\alpha</math></i> .....	83
I.2.3 Caractérisation de la zone d'ADN spécifique à <i>F. graminearum</i> amplifiée par le	
couple d'amorces Fg16NF/Fg16NR .....	83
I.3 Caractérisation du chemotype de la souche MIAE00376.....	83
I.3.1 Caractérisation du chemotype de la souche MIAE00376 par croissance du	
champignon sur grains de blé.....	84
I.3.1.1 Inoculation des substrats .....	84
I.3.1.2 Dosage de la production de mycotoxines .....	84
I.3.1.3 Détermination de la quantité d'ADN fongique produite par qPCR.....	84
I.3.1.3.1 Extraction de l'ADN fongique.....	85
I.3.1.3.2 Primers.....	85
I.3.1.3.3 Obtention de la courbe standard .....	85
I.3.1.3.4 Réaction de qPCR.....	85
I.3.2 Détermination du chemotype de la souche par étude de la région d'ADN	
impliquée dans la production de mycotoxines .....	85
II Essais au champ.....	87
II.1 Domaine expérimental d'Epoisses .....	87
II.2 Mise en place des essais .....	87
II.2.1 Essai Fusa : test de la part relative des différentes sources d'inoculum dans le	
développement de la fusariose du blé.....	87

II.2.1.1 Mise en place de l'essai .....	87
II.2.1.2 Blés utilisés.....	88
II.2.1.3 Inoculation des parcelles.....	88
II.2.2 Essai ITK : test de l'effet de différents itinéraires techniques ; test servant de contrôle négatif à l'essai Fusa .....	89
II.2.2.1 Mise en place de l'essai .....	89
II.2.2.2 Blés utilisés.....	89
II.2.3 Utilisation de l'essai ITK comme situation contrôle de l'essai Fusa.....	90
II.3 Notations de la maladie aux différents stades de croissance du blé .....	90
II.3.1 Notations au stade levée du blé .....	90
II.3.1.1 Nombre de pieds levés.....	90
II.3.2 Notations au stade deux feuilles du blé .....	90
II.3.2.1 Estimation de la vigueur de parcelle de blé au stade deux feuilles par analyse d'image.....	90
II.3.2.2 Estimation du taux de fusariose au stade deux feuilles du blé .....	91
II.3.2.3 Isolements de souches fongiques responsables de la fusariose au stade deux feuilles du blé .....	91
II.3.3 Estimation de la quantité de vert des parcelles au stade épi 1 cm du blé .....	91
II.3.4 Notation de la maladie au stade deux nœuds du blé.....	91
II.3.4.1 Estimation du taux de fusariose au stade deux nœuds du blé.....	91
II.3.4.2 Isolements de souches fongiques responsables de la fusariose au stade deux nœuds du blé.....	92
II.3.5 Notation de la maladie au stade grain pâteux du blé .....	92
II.3.5.1 Estimation du taux de fusariose au stade grain pâteux du blé.....	92
II.3.5.3 Isolements de souches fongiques responsables de la fusariose au stade grain pâteux du blé .....	92
II.3.6 Notations au stade récolte.....	93
II.3.6.1 Détermination des composantes du rendement .....	93
II.3.6.2 Détermination du taux de grains de blé fusariés.....	93
II.3.7 Qualité sanitaire des grains de blé semés et récoltés dans les essais .....	93
II.3.7.1 Taux de contamination fongique des grains de blé .....	93
II.3.7.2 Taux de contamination des grains de blés par des mycotoxines .....	93
II. 4 Acquisition des données météorologiques.....	94
II.5 Analyse statistique des résultats .....	94
II. 6 Construction d'une base de données relative aux essais au champ .....	94

III.1	Identification morphologique des souches fongiques isolées .....	95
III.2	Identification moléculaire des souches isolées.....	95
III.2.1	Extraction et purification de l'ADN fongique.....	95
III.2.2	Identification des souches isolées par amplification d'une région génomique d'intérêt phylogénétique.....	95
III.2.3	Identification des souches isolées par amplification d'une région génomique spécifique .....	95
IV	Dynamique de population de <i>F. graminearum</i> en microcosmes .....	96
IV.1	Choix des conditions d'étude.....	96
IV.1.1	Souche fongique et sol .....	96
IV.1.2	Sol .....	97
IV.1.3	Résidus .....	97
IV.2	Inoculation des microcosmes .....	98
IV.2.1	Evaluation de la relation existant entre le dénombrement sur boîtes de Petri de la quantité de propagules de <i>F. graminearum</i> dans le sol et la quantification moléculaire du nombre de copies d'ADN de <i>F. graminearum</i> dans le sol.....	98
IV.2.2	Evaluation du rôle des facteurs biotique et trophique dans la dynamique de population de <i>F. graminearum</i> .....	98
IV.2.3	Evaluation du rôle de l'origine des résidus dans la dynamique de population de <i>F. graminearum</i> .....	98
IV.3	Quantification de <i>F. graminearum</i> .....	99
IV.3.1	Par une technique classique de dénombrement sur boîte de Petri .....	99
IV.3.2	Par qPCR.....	99
IV.3.2.1	Extraction de l'ADN .....	99
IV.3.2.2	Primers, courbe standard et réaction de qPCR.....	99
IV.4	Analyse chimique des résidus .....	99
IV.5	Analyse statistique des résultats.....	99
Chapitre 3	Caractérisation de la souche de <i>F. graminearum</i> MIAE00376 .....	101
I	Caractérisation morphologique de la souche de <i>F. graminearum</i> MIAE00376.....	102
I.1	Caractérisation macroscopique .....	102
I.2	Caractérisation microscopique.....	103
II	Caractérisation moléculaire de la souche de <i>F. graminearum</i> MIAE00376 .....	105
II.1	Etude la région ITS de la souche .....	105
II.2	Etude la région <i>tef-1<math>\alpha</math></i> de la souche.....	105
II.3	Caractérisation de la zone amplifiée par les amorces Fg16NF/Fg16NR.....	107

III	Caractérisation du chemotype de la souche de <i>F. graminearum</i> MIAE00376 .....	109
III.1	Détermination du chemotype de la souche MIAE00376 par croissance du champignon sur grains de blé .....	109
III.1.1	Détermination de la contamination post-autoclavage des substrats utilisés....	109
III.1.2	Dosage de la production de mycotoxines.....	109
III.1.3	Détermination de la quantité de matériel fongique produite.....	111
III.2	Détermination du chemotype par caractérisation moléculaire .....	111
IV	Conclusions à propos de la caractérisation de la souche de <i>F. graminearum</i> MIAE00376 .....	111
Chapitre 4 Suivi chronologique du processus d'infection au champ ; recherche d'indicateurs précoces du risque de fusariose .....		
	Avant propos .....	117
I	Etat sanitaire des grains semés dans les essais lors des deux campagnes de tests .....	119
I.1	Résultats .....	119
I.2	Discussion .....	121
II	Etude du développement hivernal de la maladie .....	123
II.1	Résultats des notations hivernales .....	123
II.1.1	Notations au stade levée du blé .....	123
II.1.1.1	Notations des essais Fusa et ITK.....	123
II.1.1.2	Comparaison des essais FUSA et ITK .....	123
II.1.1.3	Effet de l'année sur les notations au stade levée .....	125
II.1.2	Notations au stade deux feuilles du blé .....	125
II.1.2.1	Notations des essais Fusa et ITK.....	125
II.1.2.2	Comparaison des essais Fusa et ITK .....	127
II.1.2.3	Effet de l'année sur les notations au stade deux feuilles .....	127
II.1.2.4	Isolements au stade deux feuilles du blé.....	127
II.1.3	Notations au stade épi 1 cm.....	127
II.1.3.1	Notations des essais Fusa et ITK.....	127
II.1.3.2	Comparaison des essais Fusa et ITK .....	127
II.1.3.3	Effet de l'année sur les notations au stade épi 1 cm .....	129
II.2	Corrélations entre les variables notées durant le développement hivernal de la maladie dans les essais Fusa.....	129
II.3	Exploitation des données climatiques de la période hivernale .....	131
II.3.1	Du point de vue de la plante .....	131

II.3.2 Du point de vue des champignons phytopathogènes .....	132
II.4 Discussion des résultats collectés pendant la période hivernale durant les deux années d'essai .....	133
II.4.1 Effet de l'inoculum présent sur les résidus de culture .....	133
II.4.2 Effet de l'inoculum présent sur les semences .....	133
II.4.3 Effets du climat sur la croissance des plantes et sur la croissance de l'inoculum responsable de la maladie .....	134
III Etude du développement de la maladie au stade deux nœuds .....	137
III. 1 Résultats des notations au stade deux nœuds .....	137
III.1.1 Notations des essais Fusa et ITK en 2009 .....	137
III.1.2 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2009 .....	139
III.1.3 Notations des essais Fusa et ITK en 2010 .....	139
III.1.4 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2010 .....	143
III.1.5 Notation de la maladie en fonction de la partie de la plante considérée .....	143
III.1.6 Effet de l'année sur les notations au stade deux nœuds .....	145
III.1.7 Isolements au stade deux nœuds du blé .....	145
III.2 Corrélations entre les variables notées au stade deux nœuds .....	147
III.3 Exploitation des données climatiques au stade deux nœuds .....	147
III.3.1 Du point de vue de la plante .....	147
III.3.2 Du point de vue des champignons phytopathogènes .....	150
III.4 Discussion des résultats collectés au stade deux nœuds durant les deux années d'essai .....	151
III.4.1 Inoculum responsable des symptômes observés au stade deux nœuds .....	151
III.4.2 Mode de dispersion et de contamination de la plante par l'inoculum au stade deux nœuds .....	153
III.4.3 Information complémentaire sur la maladie apportée par l'essai ITK .....	153
III.4.4 Différence de développement de la maladie durant les deux campagnes .....	154
III.4.5 Conclusions sur le développement de la maladie au stade deux nœuds .....	154
IV Etude du développement de la maladie sur épi .....	157
IV.1 Résultats des notations sur épi .....	157
IV.1.1 Résultats des notations au stade grain pâteux du blé .....	157
IV.1.1.1 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2009 .....	157
IV.1.1.2 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2009 .....	159
IV.1.1.3 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2010 .....	159



IV.1.1.4 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2010.....	163
IV.1.1.5 Effet de l'année sur les notations au stade grain pâteux .....	163
IV.1.1.6 Isolements au stade grain pâteux du blé.....	163
IV.1.2 Résultats des notations à la récolte.....	167
IV.1.2.1 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2009 .....	167
IV.1.2.2 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2009.....	169
IV.1.2.3 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2010 .....	169
IV.1.2.4 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2010.....	171
IV.1.2.5 Effet de l'année sur les notations au stade récolte .....	171
IV.1.2.6 Part des grains fusariés retournant au champ lors de la récolte .....	173
IV.1.2.7 Etat sanitaire des grains à la récolte .....	175
IV.2 Corrélations entre les variables notées sur épi .....	177
IV.3 Exploitation des données climatiques au stade épi .....	179
IV.3.1 Du point de vue de la plante.....	179
IV.3.2 Du point de vue des champignons phytopathogènes .....	180
IV.4 Discussion des résultats collectés sur épis durant les deux années d'essai.....	181
IV.4.1 Implication des symptômes autres que S1 (épillet orange) notés au stade grain pâteux sur le rendement et l'état sanitaire des grains récoltés .....	181
IV.4.1.1 Cas du symptôme S3 (lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet) : lié à la fusariose du blé mais pas à <i>F. graminearum</i> .....	181
IV.4.1.2 Cas du symptôme S7 (épillet échaudé) : lié à <i>F. graminearum</i> .....	182
IV.4.2 Implication des symptômes autres que « grain rose » notés au stade récolte sur le rendement et l'état sanitaire des grains récoltés .....	182
IV.4.2.1 Cas du symptôme grain ridé : lié à <i>F. graminearum</i> .....	182
IV.4.2.2 Cas du symptôme grain moucheté : inversement lié à <i>F. graminearum</i> ..	183
IV.4.3 Part des grains de blé fusariés revenant au champ durant la récolte.....	184
IV.4.4 Information complémentaire sur la maladie apportée par l'essai ITK.....	185
IV.4.5 Effets du climat sur la croissance de l'inoculum responsable de la maladie sur épi.....	187
IV.4.6 Difficultés dans les notations liées au facteur humain et pertinence de l'utilisation de l'analyse d'image pour la notation des symptômes .....	188
IV.4.7 Conclusions sur le développement de la maladie sur épi.....	190
V Recherche d'indicateurs précoces du risque de développement de la maladie tout au long de la croissance de la plante .....	191
V.1 Corrélations entre les variables notées du semis à la récolte.....	191

V.2 Discussion générale sur la possibilité de prédiction des effets de la maladie sur le rendement et la production de mycotoxines.....	191
VI Synthèse des résultats obtenus par le suivi chronologique du processus d'infection au champ et la recherche d'indicateurs précoces du risque de fusariose ( <i>présentation de soutenance de thèse</i> ).....	197
Chapitre 5 Using Fusarium head blight field assessment to predict the mycotoxins accumulation in wheat grains in Burgundy, France .....	205
Avant propos .....	206
Chapitre 6 Dynamique de population saprotrophe de <i>F. graminearum</i> .....	229
Avant propos .....	230
II Quelle généralité donner aux résultats observés dans des microcosmes ?.....	259
II.1 Quantification d'une population fongique par PCR quantitative en milieu complexe .....	259
II.2 Habitat privilégié ou niche écologique ? .....	260
Chapitre 7 Discussion générale et perspectives .....	265
I Diversité des techniques et des échelles utilisées pour répondre à la problématique .....	267
II Points d'amélioration et perspectives ouvertes par l'essai au champ .....	269
III Perspectives ouvertes par les dynamiques de populations en microcosmes .....	274
Conclusion.....	277
Références bibliographiques .....	279



Figure 0.1 : Surfaces céréalières en Bourgogne entre 1990 et 2004 (Agreste Bourgogne, 2005)	38
Figure 0.2 : Evolution de la teneur en protéines des blés en Bourgogne Franche-Comté (ONIGC, 2008)	38
Figure 0.3 : Le blé du champ au produit fini (Photos J. Leplat et <a href="http://www.festivaldespains.com">www.festivaldespains.com</a> )	40
Figure 0.4 : Classes de risque agronomique pour le DON en blé	42
Figure 0.5 : Exemple de cartographie climatique du risque DON pour la zone du Chatillonnais en 2011	42
Figure 0.6 : Diagramme organisationnel de la thèse	44
Figure I.1: Macroscopic and microscopic pictures of <i>F. graminearum</i> , the causal agent of Fusarium head blight (Photograph: J. Leplat)	50
Figure I.2: Wheat ear infested by <i>Fusarium graminearum</i> (Photograph: J. Leplat)	50
Figure I.3: Disease cycle of <i>Fusarium graminearum</i> (Photograph: J. Leplat)	54
Figure I.4: Saprotrophic survival of <i>Fusarium graminearum</i>	66
Figure 2.1 : Organisation de la région des ITS de l'ADN d'après (Gardes and Bruns, 1993)	82
Figure 2.3 : Organisation du cluster de gènes régulant la production des TCT B (d'après Merhej et al., 2011)	86
Figure 3.1 : Croissance de <i>F. graminearum</i> sur milieu PDA	102
Figure 3.2 : Production de macroconidies par les monophialides	103
Figure 3.3 : Macroconidies produites par <i>F. graminearum</i>	103
Figure 3.4 : Alignement de la séquence ITS de la souche <i>F. graminearum</i> MIAE00376 par le logiciel BLAST sur les séquences répertoriées sur le site NCBI	104
Figure 3.5 : Alignement de la séquence <i>tef-1<math>\alpha</math></i> de la souche <i>F. graminearum</i> MIAE00376 par le logiciel BLAST sur les séquences répertoriées sur le site NCBI	106
Figure 3.6 : Production de DON par <i>F. graminearum</i> en fonction du temps et du substrat de culture	108
Figure 3.7 : Quantité d'ADN de <i>F. graminearum</i> détectée en fonction du temps et du substrat de culture	110
Figure 4.1 : Notations et observations faites sur les cultures de blé durant les deux années d'essai	116
Figure 4.2 : Etat sanitaire sur graines de Charger non enrobées	120
Figure 4.3 : Etat sanitaire sur graine de Charger enrobées	120
Figure 4.4 : Etat sanitaire sur graines de Charger enrobées puis lavées	120
Figure 4.5 : Notations et observations faites sur les cultures de blé pendant la période hivernale durant les deux années d'essai	122

Figure 4.6 : Isolements au stade deux feuilles effectués à partir de plantules des variétés Apache et Charger prélevées dans l'essai Fusa10.....	128
Figure 4.7 : Somme des degrés-jour et des précipitations du semis au stade épi 1 cm.....	131
Figure 4.8 : Somme des heures au-dessus de 10 et 15 °C et de 80% d'humidité du semis au stade épi 1 cm.....	132
Figure 4.9 : Notations et observations faites sur les cultures de blé au stade deux nœuds durant les deux années d'essai.....	136
Figure 4.10 : Isolements au stade deux nœuds effectués à partir d'une tige de la variété Charger et d'un nœud de la variété Maxwell prélevés dans l'essai Fusa09.....	145
Figure 4.11 : Somme des degrés-jour et des précipitations entre le stade épi 1 cm et la notation au stade deux nœuds.....	149
Figure 4.12 : Somme des heures au-dessus de 10 et 15 °C et de 80% d'humidité entre le stade épi 1 cm et la notation au stade deux nœuds.....	150
Figure 4.13 : Notations et observations faites sur les épis des cultures de blé au stade deux nœuds durant les deux années d'essai.....	156
Figure 4.14 : Isolement effectués au stade grain pâteux à partir d'un épi de la variété Charger prélevé dans l'essai Fusa09 (test du symptôme S1).....	163
Figure 4.15 : Isolement effectués au stade grain pâteux à partir d'un épi de la variété Maxwell prélevé dans l'essai Fusa09 (test su symptôme S3).....	165
Figure 4.16 : Isolement effectués au stade grain pâteux à partir d'un épi de la variété Charger prélevé dans l'essai Fusa10 (test su symptôme S3).....	165
Figure 4.17 : Somme des degrés-jour et des précipitations entre l'inoculation au stade deux nœuds et la récolte.....	179
Figure 4.18 : Somme des heures au-dessus de 15 et 20 °C et de 80% d'humidité entre l'inoculation au stade deux nœuds et la récolte.....	180
Figure V.1: Classes of agronomical hazard to DON accumulation in wheat grains.....	208
Figure V.2: <i>F. graminearum</i> isolated from orange spikelet (Photograph: courtesy of J. Leplat).....	216
Figure V.3: Sum of hours with humidity up to 80% and temperature up to 15°C and 20°C for 2009 and 2010 from the inoculation at soil surface to the harvest.....	218
Figure VI.1: Radial growth of <i>F. graminearum</i> on media amended with different residues.	240
Figure VI.2: Assessment of the relation between classical plate counts of <i>F. graminearum</i> and molecular quantification of <i>F. graminearum</i> DNA copies in disinfected soil and in natural soil.....	241
Figure VI.3: Role of biotic and trophic factors on the population dynamics of <i>F. graminearum</i> .....	242
Figure VI.4: Influence of crop residue origin on the population dynamics of <i>F. graminearum</i> .....	244

Figure 6.1 : Nombre de copies d'ADN détecté en fonction de la concentration initiale en spores de la suspension extraite.....	258
Figure 6.2 : Nombre de copies d'ADN détecté en fonction de la quantité de mycélium extraite .....	258
Figure 6.3 : Représentation de la niche écologique hypothétique que pourraient constituer les résidus de culture pour <i>Fusarium graminearum</i> .....	262
Figure 7.1 : Définition des variables intervenant dans la sévérité d'une maladie d'origine tellurique.....	268
Figure 7.2 : Modèle Conceptuel de Données (MCD) de la base de données constituée lors de cette étude (L. Henneron – stagiaire ingénieur ISA Lille, 2010) .....	272
Figure 7.3 : Perspectives ouvertes à l'issue du travail de thèse .....	276



Tableau 0.1 : Nomenclature des blés actuels et de leurs espèces apparentées les plus directes, d'après (Slageren, 1994).....	36
Tableau 0.2 : Part des céréales et oléagineux dans la surface agricole utilisée et le chiffre d'affaire agricole (Agreste Bourgogne, 2005) .....	36
Tableau 2.1 : Historique de rotation des parcelles utilisées pour les essais au champ.....	87
Tableau 2.2 : Dates de mise en place et de fin de l'essai Fusa.....	88
Tableau 2.3 : Sensibilité des trois variétés de blé à la fusariose de l'épi (source : Arvalis) ....	88
Tableau 2.4 : Dates de mise en place et de fin de l'essai ITK .....	89
Tableau 2.5 : Sensibilité des trois variétés de blé à la fusariose de l'épi (source Arvalis) .....	89
Tableau 4.1 : Etat sanitaire des semences utilisées lors des essais Fusa et ITK .....	118
Tableau 4.2 : Pourcentage de plantes levées (par rapport à la densité semée) et quantification visuelle de la vigueur des plantules à la levée selon les traitements en 2009 et 2010 dans les essais Fusa .....	124
Tableau 4.3 : Comparaison des pourcentages de levée des semences dans les deux itinéraires techniques Fusa et ITK, en 2009 et en 2010, indépendamment de la variété de blé.....	124
Tableau 4.4 : Notations au stade deux feuilles dans l'essai Fusa.....	125
Tableau 4.5 : Comparaison des essais Fusa09 et Fusa10 pour le pourcentage de plantules malades en considérant l'ensemble des trois variétés de blé, ou en considérant uniquement la variété Charger ou la variété Apache .....	126
Tableau 4.6 : Souches isolées à partir de symptômes sur plantules au stade deux feuilles en 2010.....	126
Tableau 4.7 : Vigueur des plantules au stade épi 1 cm estimée par analyse d'image pour l'essai Fusa .....	128
Tableau 4.8 : Matrice de corrélation visant à révéler les variables informatives quant au développement de la maladie durant sa phase hivernale en 2009.....	129
Tableau 4.9 : Matrice de corrélation visant à révéler les variables informatives quant au développement de la maladie durant sa phase hivernale en 2010.....	130
Tableau 4.10 : Notation du taux de maladie au stade deux nœuds pour les essais Fusa et ITK en 2009 .....	138
Tableau 4.11 : Comparaison des essais Fusa09 et ITK09 pour le taux de maladie au stade deux nœuds.....	140
Tableau 4.12 : Notation du taux de maladie au stade deux nœuds pour les essais Fusa et ITK en 2010 .....	141
Tableau 4.13 : Comparaison des essais Fusa10 et ITK10 pour le taux de maladie au stade nœuds .....	142
Tableau 4.14 : Comparaison du nombre de symptômes observés en fonction de la partie de la plante considérée quelles que soient l'année et la conduite de l'essai (Fusa ou ITK) .....	142



Tableau 4.15 : Effet de l'année sur les taux de symptômes relevés dans les essais Fusa et ITK .....	144
Tableau 4.16 : Souches isolées à partir de symptômes sur plante au stade deux nœuds .....	146
Tableau 4.17 : Matrice de corrélation pour les variables notées au stade deux nœuds en 2009 .....	148
Tableau 4.18 : Matrice de corrélation pour les variables notées au stade deux nœuds en 2010 .....	148
Tableau 4.19 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai Fusa09.....	158
Tableau 4.20 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai ITK09.....	158
Tableau 4.21 : Comparaison des essais Fusa09 et ITK09 pour l'apparition des symptômes sur épis au stade grain pâteux.....	159
Tableau 4.22 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai Fusa10.....	160
Tableau 4.23 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai ITK10.....	161
Tableau 4.24 : Comparaison des essais Fusa10 et ITK10 pour l'apparition des symptômes sur épis au stade grain pâteux.....	162
Tableau 4.25 : Effet de l'année sur les taux de symptômes relevés dans les essais Fusa et ITK au stade grain pâteux .....	162
Tableau 4.26 : Souches isolées à partir de symptômes sur plante au stade grain pâteux.....	164
Tableau 4.27 : Notation du taux de maladie au stade récolte et détermination des composantes du rendement pour les essais Fusa09 et ITK09 .....	166
Tableau 4.28 : Comparaison du taux de maladie au stade récolte et des composantes du rendement pour les essais Fusa09 et ITK09 .....	168
Tableau 4.29 : Notation du taux de maladie au stade récolte et détermination des composantes du rendement pour l'essai Fusa10 .....	170
Tableau 4.30 : Comparaison du taux de maladie au stade récolte et des composantes du rendement pour les essais Fusa10 et ITK10 .....	172
Tableau 4.31 : Effet de l'année sur les notations à la récolte et les composantes du rendement dans les essais Fusa et ITK.....	172
Tableau 4.32 : Etude de la morphologie des grains récoltés dans l'essai Fusa10 .....	173
Tableau 4.33 : Etat sanitaire des grains récoltés dans les essais Fusa et ITK en 2009 et 2010 .....	174
Tableau 4.34 : Effet des différentes variables sur l'état sanitaire des grains récoltés .....	174
Tableau 4.35 : Matrice de corrélation pour les variables notées sur épi en 2009 .....	176
Tableau 4.36 : Matrice de corrélation pour les variables notées sur épi en 2010 .....	178
Tableau 4.37 : Corrélations entre les variables notées du semis à la récolte en 2009.....	192
Tableau 4.38 : Corrélations entre les variables notées du semis à la récolte en 2010.....	193

Table V.1: Effect of the year on disease development, grain yield and DON accumulation in grains .....	214
Table V.2: Effect of the single parameters inoculations in the first layer of soil, at soil surface and variety on disease development, grain yield and DON accumulation in grains.....	214
Table V.3: Analysis of variance for the influence of the different tested modalities on the different studied traits in 2009 and 2010.....	215
Table V.4: Proportion (%) of infected harvested grains and of each species recovered.....	216
Table V.5: Correlation coefficients between visual disease assessment, yield and DON accumulation in harvested grains (2009+2010) .....	218
Table V.6: Comparison of the correlations between the two different notation techniques of disease severity at soft dough wheat stage and the other notations (2010).....	218
Table VI.1: Analysis of variance for the radial growth of <i>F. graminearum</i> on media amended with different residues. ....	239
Table VI.2: Analysis of variance for the role of biotic and trophic factors on the population dynamics of <i>F. graminearum</i> . ....	243
Table VI.3: Analysis of variance for the influence of crop residue origin on the population dynamics of <i>F. graminearum</i> . ....	244
Table VI.4: C:N ratios of the residues.....	246



# **Introduction générale**

Espèces et sous-espèces	Noms communs
<i>Triticum monococcum</i> L. ssp. <i>aegilopoides</i> (Link) Thell. ssp. <i>monococcum</i>	Engrain sauvage Engrain cultivé ou Petit épeautre
<i>Triticum urartu</i> Tum ex. Gand.	Pas de nom commun
<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuck.) Zhuck. ssp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.) van Slageren ssp. <i>timopheevii</i>	<i>T. timopheevii</i> sauvage <i>T. timopheevii</i> cultivé
<i>Triticum turgidum</i> L. (Thell.) ssp. <i>dicoccoides</i> (Körn ex. asch. & Graebn.) Thell. ssp. <i>dicoccon</i> (Schrank) Thell. ssp. <i>paleocolchicum</i> (Men.) A. Löve & D. Löve ssp. <i>parvicoccum</i> Kislev ssp. <i>durum</i> (Desf.) Husn. ssp. <i>turgidum</i> ssp. <i>polonicum</i> (L.) Thell. ssp. <i>turanicum</i> (Jakubz.) A. Löve & D. Löve ssp. <i>carthilicum</i> (Nevski.) A. Löve & D. Löve	Amidonnier sauvage Amidonnier cultivé Blé de Géorgie Pas de nom commun Blé dur Blé poulard Blé de Pologne Blé Khorasan Blé de Perse
<i>Triticum zhukovskyi</i> Men. & Er.	Pas de nom commun
<i>Triticum aestivum</i> L. ssp. <i>spelta</i> (L.) Thell. ssp. <i>macha</i> (Dek. & Men.) MK ssp. <i>aestivum</i> ssp. <i>compactum</i> (Host) MK ssp. <i>sphaerococcum</i> (Percival) MK	Grand épeautre Pas de nom commun Blé tendre ou Froment Blé compact ou Blé hérisson Blé sphérique ou Blé indien

Tableau 0.1 : Nomenclature des blés actuels et de leurs espèces apparentées les plus directes, d'après (Slageren, 1994)

	SAU		Chiffre d'affaires agricole	
	% céréales	% oléagineux	% céréales	% oléagineux
France	34%	7%	16%	3%
Bourgogne	34%	10%	19%	6%
21	44%	14%	21%	7%
58	26%	7%	19%	5%
71	17%	3%	9%	1%
89	54%	18%	28%	10%

note de lecture : 54% de la SAU icaunaise est en céréales, cette production contribue pour 28 % au chiffre d'affaires agricole départemental

Sources : Agreste - Statistique agricole annuelle 2004 et comptes de l'agriculture 2004

Tableau 0.2 : Part des céréales et oléagineux dans la surface agricole utilisée et le chiffre d'affaire agricole (Agreste Bourgogne, 2005)

Le blé (genre *Triticum*, famille des Poacées) est une céréale originaire du croissant fertile. Cette ressource a d'abord été utilisée par l'homme, il y a plus de 10000 ans, grâce à la cueillette dans les espaces sauvages. Entre -8900 et -7500, la culture du blé a été instituée passant d'un usage sauvage de la plante à un usage domestique. Cette culture s'est étendue à l'Asie centrale, à l'Europe du sud et à l'Égypte entre -7500 et -6200 (Feldman and Millet, 2001). Le blé est aujourd'hui une céréale primordiale à travers le monde, aussi bien sur le plan économique que sur celui de l'alimentation. On parle souvent du blé tendre (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) et du blé dur (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Desf.) Husn.) qui sont les deux espèces les plus communément cultivées du fait de leur exigences pédoclimatiques et de leur qualités biochimiques et techniques répondant à des besoins alimentaires complémentaires (farine panifiable pour le premier, pâtes alimentaires pour le second). Il existe néanmoins une large diversité d'espèces, plus rustiques, cultivées localement et historiquement dans différentes régions du monde et représentant un réservoir de ressources génétiques intéressant les sélectionneurs (Tableau 0.1).

Le blé est la deuxième plante cultivée au monde en termes de quantités (653 millions de tonnes en 2010), derrière le maïs (826 millions de tonnes), et la première en termes d'échanges commerciaux (125 millions de tonnes échangées en 2010 ; FAO, 2011). En France, le blé est la plante la plus importante à la fois en termes de surfaces cultivées (4935 milliers d'hectares de blé tendre cultivés en 2010) et d'échanges commerciaux (18,13 millions de tonnes exportées pour la campagne 2009 - 2010). Ses produits dérivés sont omniprésents dans l'alimentation humaine notamment à travers l'utilisation de la farine, la consommation de pâtes alimentaires, ... (source : [www.agpb.fr](http://www.agpb.fr)).

Réputée pour sa moutarde de Dijon (dont les graines viennent essentiellement du Canada), son élevage Charollais, son cassis et surtout ses vins d'appellation, la Bourgogne est également une grande région céréalière, productrice de blé tendre et d'orges notamment. Même si les rendements observés en Bourgogne se situent au niveau de ceux de la moyenne française, la qualité des grains produits, notamment leur teneur en protéines permet un développement important des activités de minoterie et de transformation dans la région.

La région et ses quatre départements totalisent 1,7 million d'ha de Surface Agricole Utile (SAU), soit 6 % de la SAU nationale. Implantées plus particulièrement dans la partie Nord de la région, les grandes cultures occupent environ 45 % de la SAU, soit autant que les prairies permanentes et temporaires, majoritairement situées au Sud de la région. Les céréales sont cultivées sur un tiers de la SAU (Tableau 0.2). La production céréalière se compose principalement de blé tendre (environ 57%), devant les orges et escourgeons (environ 35%) et le maïs (environ 8% ; Figure 0.1). Les rendements des blés tendres et des orges respectivement de 65 qx.ha<sup>-1</sup> et de 60 qx.ha<sup>-1</sup>, se situent dans la moyenne des performances nationales, générant une production annuelle d'environ 3 à 4 millions de tonnes. Les sols, peu profonds sinon caillouteux, constituent le principal frein à l'expression du potentiel des cultures.

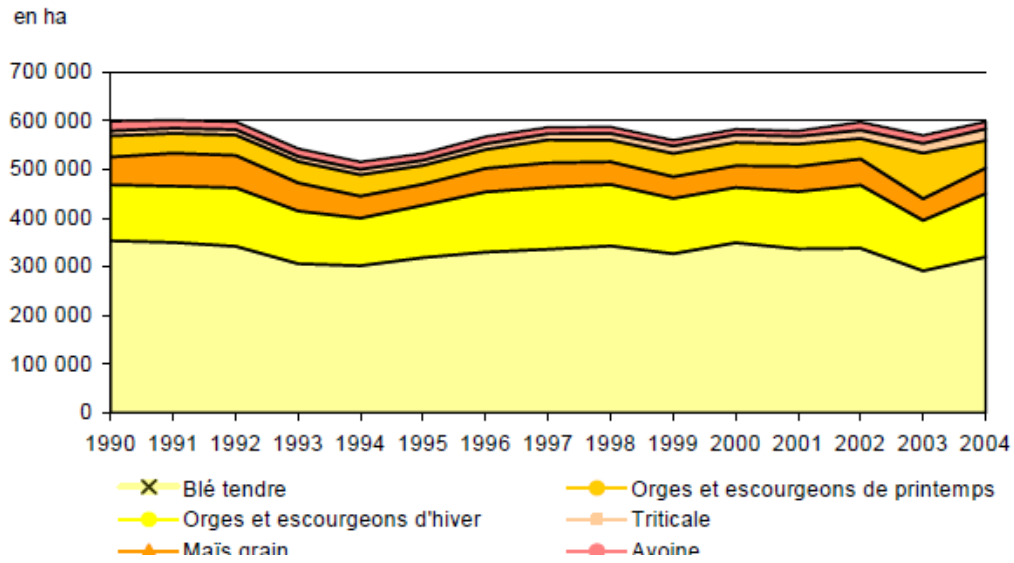


Figure 0.1 : Surfaces céréalières en Bourgogne entre 1990 et 2004 (Agreste Bourgogne, 2005)

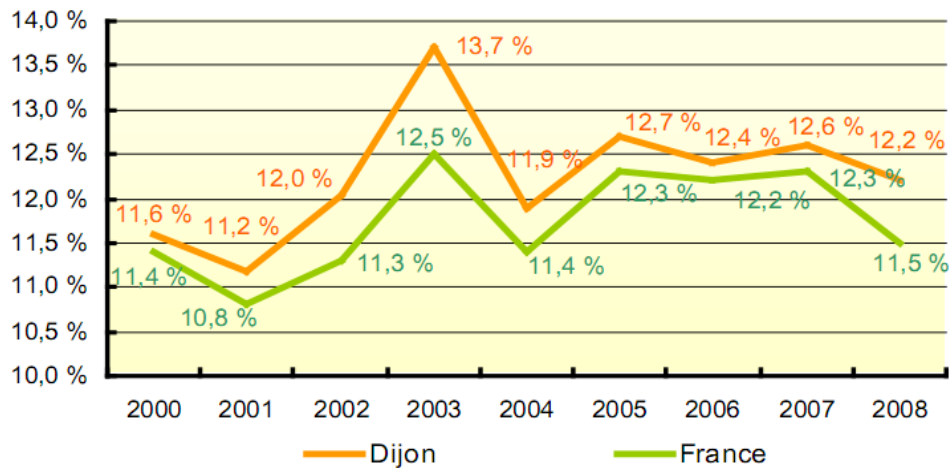


Figure 0.2 : Evolution de la teneur en protéines des blés en Bourgogne Franche-Comté (ONIGC, 2008)

La collecte des céréales auprès des agriculteurs puis leur stockage en silos sont assurés par des organismes stockeurs. Parmi ceux-ci, la Société Coopérative Agricole Dijon Céréales, partie prenante du présent projet, est la première coopérative agricole de Bourgogne Franche-Comté. Elle collecte en moyenne 1 million de tonnes de céréales par an (<http://www.dijon-cereales.fr>). Des dispositifs d'identification des lots, de certification et de traçabilité doivent donner toutes les garanties d'origine et de qualité aux différents transformateurs et utilisateurs. En particulier, ces dispositifs doivent assurer à la fois la qualité biotechnique permettant de répondre aux cahiers des charges définis par les transformateurs, mais aussi et surtout, la qualité phytosanitaire et notamment l'absence de mycotoxines dans les grains. Nous aurons l'occasion de revenir sur les moyens à développer pour détecter et quantifier les mycotoxines qui peuvent être présentes dans les lots collectés, non seulement en Bourgogne, mais partout dans le monde (Desjardins and Proctor, 2007). Les conditions pédoclimatiques, le choix des variétés, les conseils agronomiques sont sans doute les garants de la qualité qui caractérise les blés Bourguignons, avec notamment un taux de protéines supérieur à la moyenne nationale (Figure 0.2).

Les céréales alimentent meuniers, malteurs, fabricants d'aliment et de multiples entreprises agroalimentaires, à la fois en Bourgogne et à l'extérieur de la région. En effet, 40 à 50% des blés Bourguignons et 40% des orges sont exportés. Les céréales, subissent des transformations destinées à fabriquer de la farine, de la semoule, des pâtes alimentaires, du malt ou encore des aliments pour le bétail et les animaux domestiques. La Bourgogne est caractérisée par une forte implantation de meuneries. Plus de vingt moulins sont répertoriés sur les quatre départements, et travaillent environ 230 000 t de blé tendre chaque année (<http://bourgogne.passioncereales.fr/>). A Aiserey (21110), un moulin de transformation biologique vient d'être implanté à la place de l'ancienne sucrerie, démantelée suite à l'arrêt de la culture de betteraves en Bourgogne (Chambre d'Agriculture de Bourgogne, 2010). Le moulin s'appuiera sur un bassin de production de blé et céréales bio se développant en Bourgogne Franche-Comté. Sa mise en œuvre s'intègre dans le cadre d'un partenariat avec Agronov (Technopole Agro-Environnement animé par un consortium d'acteurs institutionnels, dont l'INRA, le Conseil Régional de Bourgogne, Welience Agro-Environnement, AgroSup Dijon, GIS Agrale, l'Institut Buffon,...), Vitagora® (pôle de compétitivité de la région Bourgogne), l'Université de Bourgogne et les Chambres d'Agriculture. Ainsi, les céréales répondant au cahier des charges de l'agriculture biologique cultivées dans la région sont aussi transformées dans la région. Les boulangeries artisanales ainsi que les industries agroalimentaires spécialisées dans la boulangerie, la biscuiterie, la pâtisserie ou encore la viennoiserie composent la gamme de débouchés de seconde transformation offerts à la farine de blé tendre (Figure 0.3).

Au cours de sa croissance, le blé peut-être soumis à un certain nombre d'agressions de natures diverses. Il peut subir la pression de plantes adventices : des graminées, comme le vulpin (*Alopecurus*), le ray-grass (*Lolium*), le paturin (*Poa*),..., ou des dicotylédones, comme le coquelicot (*Papaver rhoeas* L.), la stellaire (*Stellaria*),... ; il peut être victime d'attaques dues à des ravageurs, comme les limaces, les nématodes, les cécidomyies (*Sitodisplosis mosellana* Gehin)... ; ou encore être touché par des maladies fongiques. Celles-ci sont





Figure 0.3 : Le blé du champ au produit fini (Photos J. Leplat et [www.festivaldespains.com](http://www.festivaldespains.com))

nombreuses et variées et touchent le blé au cours de toute sa croissance. Les symptômes dûs à ces maladies peuvent apparaître sur les tiges de blé, comme dans les cas du piétin-verse (*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton), du piétin-échaudage (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* J. Walker) et du rhizoctone (*Rhizoctonia cerealis* E.P. Hoeven) ; ils peuvent apparaître sur les feuilles, comme pour les rouilles, jaune (*Puccinia striiformis* Erikss.) ou brune (*Puccinia recondita* Roberge ex Desm.), la septoriose des feuilles (*Septoria tritici* Desm.) et l'helminthosporiose (*Helminthosporium tritici-repentis* Died.) ; ils peuvent aussi apparaître sur les épis, comme dans le cas du charbon couvert (*Tilletia laevis* J.G. Kühn), du charbon nu (*Ustilago nuda* (C.N. Jensen) Rostr.) et de la carie (*Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul.) ; ou encore sur plusieurs parties de la plante, comme dans le cas de la septoriose de l'épi (*Septoria nodorum* (Berk.) Berk.), de l'oïdium (*Erysiphe graminis* DC.) et de la fusariose qui attaque à la fois les semences, les tiges et les épis de blé.

L'agent principal responsable de la fusariose du blé est *Fusarium graminearum* Schwabe, mais environ une vingtaine d'espèces appartenant au genre *Fusarium* et une appartenant au genre *Microdochium* peuvent être impliquées dans le complexe provoquant cette maladie (Arseniuk et al., 1999). Les principales espèces responsables de la maladie en Europe, outre *F. graminearum*, sont *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw. et *M. nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallet (Bottalico and Perrone, 2002; Ioos et al., 2004; Parry et al., 1995). La fusariose a été décrite pour la première fois en Angleterre en 1884, mais de récentes épidémies ont été décrites en Asie, en Amérique et en Europe (Goswami and Kistler, 2004). Les conséquences économiques dues à cette maladie sont considérables. Par exemple, les pertes causées par la fusariose dans les états du Nord et du Centre des Etats-Unis entre 1998 et 2000 ont été évaluées à 2,7 milliards de dollars (Nganje et al., 2002). Le développement de la maladie peut occasionner des pertes de rendement par une diminution du poids de 1000 grains, mais aussi par une réduction du nombre de grains par épis et par une diminution du poids des épis (Arseniuk et al., 1993). De plus la qualité des grains affectés par la fusariose peut-être altérée (Pirgozliev et al., 2003).

Outre les pertes quantitatives qu'ils occasionnent, les champignons responsables de la maladie produisent de mycotoxines dans les grains et les rendent impropres à la consommation (Jouany, 2007; Keller, 2011). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par les champignons filamenteux. Parmi les quelques 3000 métabolites secondaires fongiques connus et les 432 molécules toxiques répertoriées en 1985, plus de 100 étaient expérimentalement toxiques pour les mammifères (Scott, 1988). Celles produites par les *Fusarium* spp. sont diverses : trichothécènes A et B (TCT A et B), zéaralénone (ZEA) et fumonisines et peuvent avoir un niveau d'apparition et de prévalence élevé dans les céréales aussi bien à la récolte qu'en conservation post récolte (Champeil et al., 2004a). La présence et la quantité de ces mycotoxines dans les céréales à la récolte constituent des critères déterminants de la qualité des grains. La communauté européenne a d'ailleurs baissé de nouveau les limites de tolérance en mycotoxines dans les céréales grâce à l'entrée en application en 2007 de la réglementation CE N° 1881/2006.

Certaines espèces de *Fusarium* ne produisent pas de mycotoxine alors que d'autres, telle que *F. graminearum*, sont susceptibles de produire une ou plusieurs mycotoxines, ce qui amène a

Précédent cultural	Travail du sol	Sensibilité variétale au DON			
		Peu Sensible	Peu Sensible à Moy. Sensible	Moy. Sensible à Sensible	Sensible
Réducteur (1)	Tous	I a	I a	I b	II a
	Labour	I a	I b	II a	II b
Neutre (2)	Non labour	I a	I b	II a	II b
	Labour	I b	II a	II b	III a
Maïs	Fourrage	I b	II a	II b	III a
	Grain (3)	II a	II b	III a	III b
	Fourrage	III a	III a	III b	IV
	Grain (3)	III a	III b	IV	IV

Réducteur (1) = Colza, pois, lin, cèlette, féverole, luzerne, chou, orge, pomme de terre  
 Neutre (2) = Avoine, betterave, blé, chicorée, endive, haricot, jachère, lupin, oignon, ray grass, soja, tournesol  
 Maïs Grain (3) = Maïs grain, sorgho

Figure 0.4 : Classes de risque agronomique pour le DON en blé

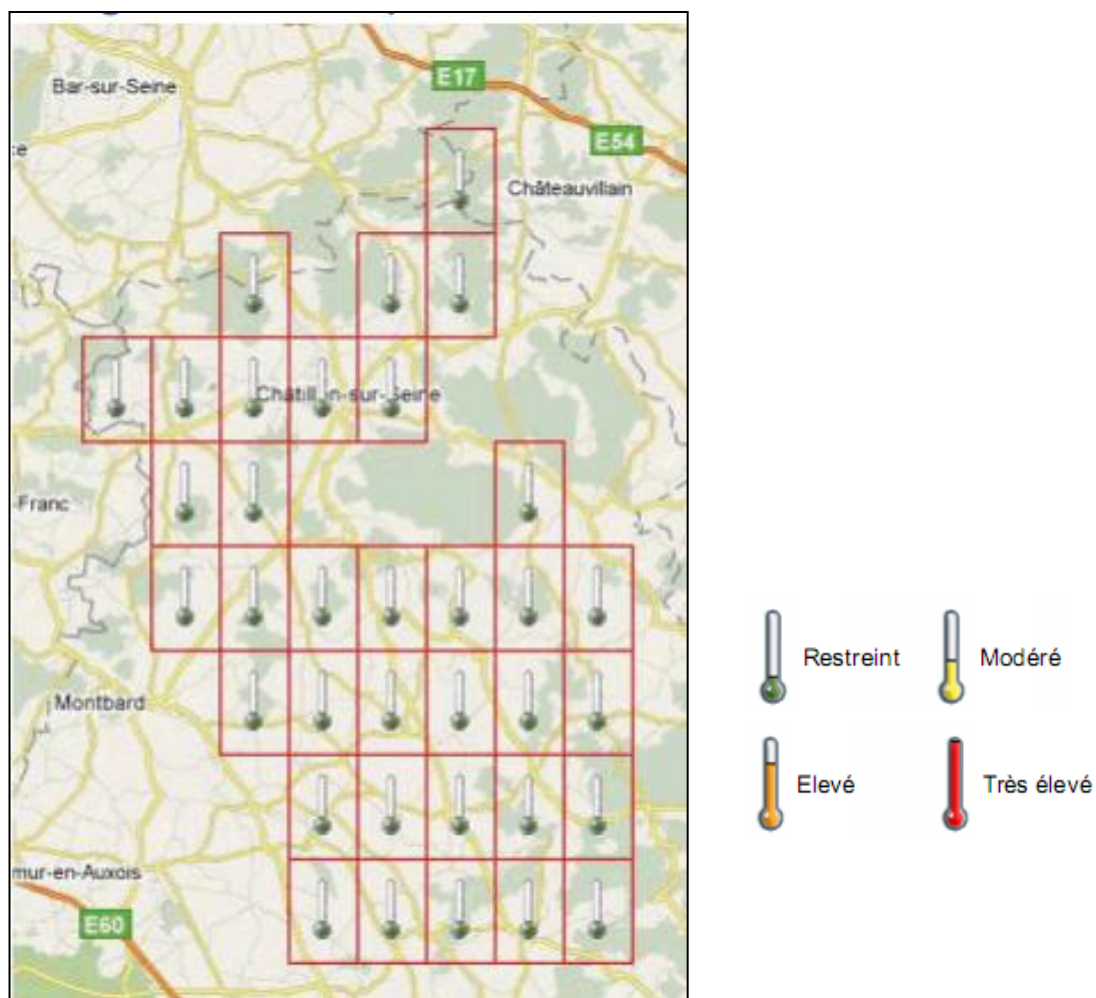


Figure 0.5 : Exemple de cartographie climatique du risque DON pour la zone du Chatillonnais en 2011

définir des chémotypes au sein de cette espèce (Desjardins and Proctor, 2007; Quarta et al., 2006). Les contaminations des céréales sont très préoccupantes car l'intensité de la mycotoxinogénèse varie fortement dans le temps et l'espace, dépendant d'interactions multiples entre différents facteurs dont les principaux sont *i*) la génétique et la physiologie de la plante interférant avec l'expression des gènes participant à la biosynthèse des toxines (Ponts et al., 2006), *ii*) le potentiel génétique des populations de *Fusarium* parvenant à s'implanter sur l'épi (Leslie et al., 2005), *iii*) les conditions agronomiques et les événements pédo-climatiques, déterminants pour le développement saprotrophe mal connu des champignons, l'épidémiologie et la toxinogénèse (Doohan et al., 2003; Hope et al., 2005).

L'absence de corrélation entre l'intensité des symptômes et l'accumulation de mycotoxines a, en outre, souvent été évoquée dans les publications scientifiques et de vulgarisation. A travers son activité de coopérative, l'un des enjeux pour Dijon Céréales est d'identifier de potentiels lots de grains à risque en termes de teneur en mycotoxines. Quelques 1000 adhérents adressent leur récolte au groupe. Ils sont répartis sur quatre zones géographiques aux contextes pédo-climatiques différents : le Chatillonnais, l'Auxois, la région de la plaine dijonnaise et la région de la plaine délimitée par la Tille, la Vingeanne et la Bèze. Il est matériellement impossible de vérifier la teneur en mycotoxines de toutes les bennes apportant les récoltes. Des aides à la gestion du risque existent par l'intermédiaire d'outils comme Qualimètre<sup>®</sup> (Syngenta<sup>®</sup>). Ce dispositif est basé sur une analyse agronomique des risques (Figure 0.4) couplée à une analyse climatique (Figure 0.5). Cet outil est d'une haute fiabilité, mais les résultats ne sont disponibles que peu de temps avant la récolte, ne laissant qu'une marge de manœuvre restreinte pour opérer les contrôles nécessaires sur les parcelles identifiées. Pour améliorer la qualité sanitaire de la récolte en réduisant le nombre d'infections et les teneurs en mycotoxines dans les grains, une approche systémique des interactions entre les facteurs soulignés précédemment est nécessaire. Le contexte actuel de réduction du travail du sol et de l'utilisation des pesticides amène à porter une attention particulière au contrôle de l'inoculum primaire dans son habitat naturel, le sol et les résidus de culture (Pereyra and Dill-Macky, 2008).

Le travail de thèse présenté dans ce document s'inscrit dans le volet 1 du tryptic "Matières premières-Transformation-Consommation" que constitue le projet de Recherche et Développement **Farine +**. Ce projet était soutenu par le pôle de compétitivité **Vitagora<sup>®</sup>** développé en Bourgogne et Franche-Comté autour de la thématique « Goût-Nutrition-Santé » et financé par le **Fond Unique Interministériel (FUI)**. Farine+ a été mis en œuvre en 2007. C'est un projet visant à développer une méthode de caractérisation des variétés de blés en fonction de leur potentiel nutritionnel et sensoriel. Son originalité est de prendre en compte l'ensemble de la filière, « de la fourche à la fourchette », depuis la production de semences jusqu'au consommateur final. Le projet avait pour but de déterminer comment se construit, évolue et se préserve le potentiel nutritionnel et sensoriel des produits de panification tout au long de la filière Blé/Farine/Pain en Bourgogne. Ce projet s'est clôturé le 30 avril 2012.

Farine + était à l'origine un projet collaboratif entre trois entreprises (EUROGERM, le Groupe DIJON CEREALES, et le Groupe ELANCIA) qui sont associées autour d'une structure de Recherche et Développement commune : la Sarl Bourgogne Terre de Culture (BTC). Au

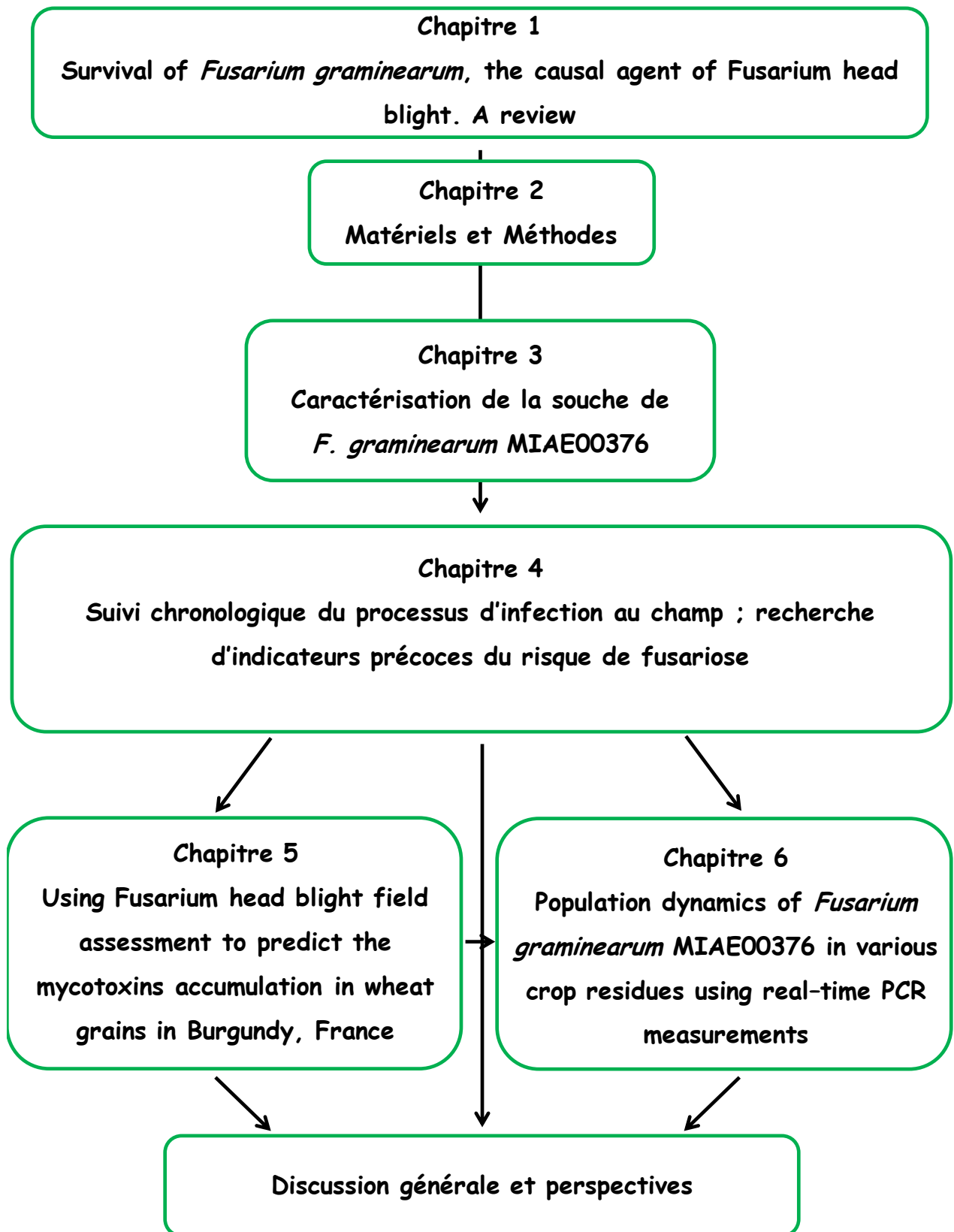


Figure 0.6 : Diagramme organisationnel de la thèse

cours du projet, des réorganisations entre ces partenaires ont abouti à la constitution d'une nouvelle structure porteuse : Cérélab-GUSTALIS. Les partenaires engagés auprès des entreprises sont :

- INRA Dijon :

UMR Flavic et CSG (Sciences du Goût) devenue UMR CSGA (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation) au 1<sup>er</sup> janvier 2010 ;

UMR MGS (Microbiologie et Géochimie des Sols) devenue l'UMR Agroécologie au 1<sup>er</sup> janvier 2012 ;

UMR Ingénierie des Agro polymères et Technologies Emergentes (IATE).

- ARVALIS – Institut du Végétal ;

- CRITT 2ABI ;

- CREABio® ;

- Gérontopôle®/CHU/Fac de Médecine.

Dans ce cadre, le but de cette thèse est *i)* de déterminer, dans le contexte pédoclimatique Bourguignon, les parts relatives des différentes sources d'inoculum dans le développement de la fusariose du blé entraînant les pertes de rendement et la production de mycotoxines dans les grains à travers un essai au champ ; *ii)* de suivre l'épidémiologie de la maladie et de façon concomitante, de détecter et d'identifier les souches de *Fusarium* spp. présentes sur la plante et dans les grains afin de déterminer les facteurs qui peuvent influencer l'absence de corrélation entre quantité de symptômes et accumulation de mycotoxines ou/et permettre d'identifier des indicateurs fiables de la qualité phytosanitaire de la culture ; *iii)* d'identifier les facteurs affectant la conservation et le développement saprotrophe d'une population de *F. graminearum* dans le sol et les résidus à travers des essais en microcosmes.

Avant de présenter les résultats, le contexte bibliographique de l'étude sera expliqué à travers une revue portant sur le développement saprotrophe de *F. graminearum*. La démarche expérimentale suivie sera ensuite présentée. Les chapitres suivants exposent les résultats obtenus. Une discussion générale et des perspectives concluent le manuscrit (Figure 0.6).



# **Chapitre 1 Contexte bibliographique**



**Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review.** (Published online in *Agronomy for Sustainable Development* DOI 10.1007/s13593-012-0098-5)

Johann Leplat<sup>1,2,3</sup>, Hanna Friberg<sup>4</sup>, Muhammad Abid<sup>1,2,3</sup>, Christian Steinberg<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1347 Agroécologie, Interactions Plante-Microorganismes (IPM), F.21065 Dijon, France

<sup>2</sup>Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, Interactions Plante-Microorganismes (IPM), F.21065 Dijon, France

<sup>3</sup>Agrosup, UMR1347 Agroécologie, Interactions Plante-Microorganismes (IPM), F.21065 Dijon, France

<sup>4</sup>Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Department of Forest Mycology and Pathology, Box 7026, SE- 750 07 Uppsala, Sweden;

\* Corresponding author: Christian Steinberg, <sup>1</sup>INRA, UMR1347 Agroécologie, Interactions Plante-Microorganismes (IPM), F.21065 Dijon, France, Tel.: +33 380 693 050; fax: +33 380 693 224.

E-mail addresses:

[johann.leplat@dijon.inra.fr](mailto:johann.leplat@dijon.inra.fr) (Johann Leplat)

[hanna.friberg@slu.se](mailto:hanna.friberg@slu.se) (Hanna Friberg)

[muhammad.abid@dijon.inra.fr](mailto:muhammad.abid@dijon.inra.fr) (Muhammad Abid)

[christian.steinberg@dijon.inra.fr](mailto:christian.steinberg@dijon.inra.fr) (Christian Steinberg)

## Abstract

Wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) is one of the most cultivated crop in the world. In 2010, 20 % of wheat and durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Desf.) Husn) were cultivated in Europe. During its development, wheat can be subjected to many stresses that can impact on the yield. *Fusarium graminearum* Schwabe, the causal agent of Fusarium head blight, root and stem-base rot of cereals, is a worldwide important fungal pest impacting wheat production. The losses caused by Fusarium head blight in Northern and Central America from 1998 to 2002 were evaluated to 2.7 billions of dollars. Moreover, *F. graminearum* produces mycotoxins which affect human and animal health. The threshold of these mycotoxins in foodstuffs is regulated in Europe since 2007 (CE N°1881/2006). *Fusarium graminearum* can survive saprotrophically in the soil for several years, i.e. on dead organic matter, particularly on crop residues. It can adapt to a wide range of environmental variations, and it produces extracellular enzymes allowing exploitation of different types of

crop residues. However, *F. graminearum* competes with other decomposers, among them other *Fusarium* spp. belonging to the same complex of species. Up to now, it is not clearly stated whether the mycotoxins that *F. graminearum* produces confer a competitive advantage to it during its saprotrophic period or not. Anthropogenic factors including preceding crops, tillage system and weed management can alter the development of the soil biota, which in turn can affect the saprotrophic development of *F. graminearum* and disease risk.

Here we review the ecological requirements of *F. graminearum* saprotrophic persistence. The major conclusions are that 1) temperature, water, light and O<sub>2</sub> availabilities are key conditions for *F. graminearum* growth and the development of its sexual reproduction structures on crop residues, although the fungus can resist for a long time under extreme conditions, 2) *F. graminearum* survival is enhanced by important quantities of available crop residues and by rich residues, while sexual reproduction structures appear on poor residues, 3) *F. graminearum* seems to be a poor competitor over time for residues decomposition. *Fusarium graminearum* survival could be controlled by the enhancement of the decomposition processes by other organisms. In addition, the development of *F. graminearum* on crop residues could be limited thanks to antagonistic fungi or thanks to soil animals growing at the expense of *F. graminearum*-infested residues, and 4) agricultural practices are key factors for the control of *F. graminearum* survival. A suitable crop rotation and an inversive tillage can limit the risk of Fusarium head blight development.

## Keywords

Crop residues; ecological requirements; habitat; mycotoxins; preceding crop; saprotrophic development; soil microbial ecology; tillage; wheat diseases

## Contents

### 1. Introduction

### 2. *Fusarium graminearum*

#### 2.1 *Fusarium* diseases on wheat

#### 2.2 Saprotrophic growth

#### 2.3 Environmental factors controlling saprotrophic survival

### 3. Effect of crop residues as *F. graminearum* growth substrates in the soil

#### 3.1 Effect of crop residues quantities

#### 3.2 Effect of plant species

### 4. Competition and antagonism

#### 4.1 Organisms succession during residue decomposition

#### 4.2 Interactions with soil microorganisms

#### 4.3 *Fusarium* species displacement on residues

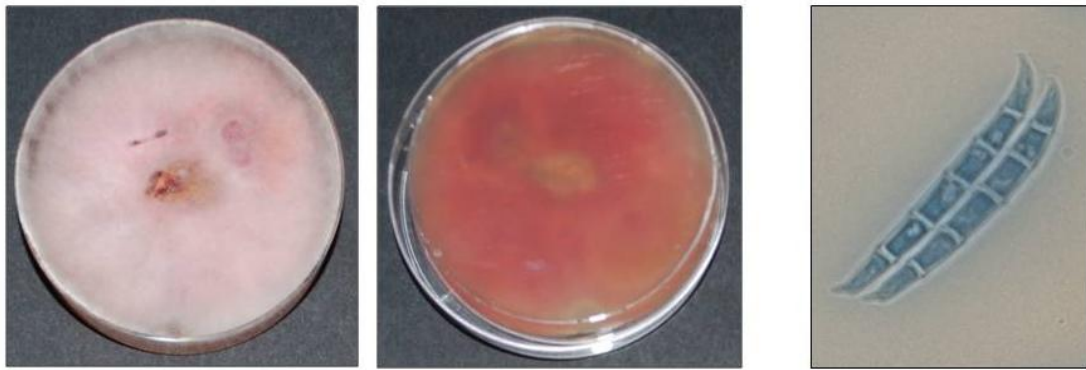


Figure I.1: Macroscopic and microscopic pictures of *F. graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight (Photograph: J. Leplat).

Macroscopic pictures were taken after growth on Potato Dextrose Agar. The undersurface shows the typical carmine red color of *F. graminearum* species. The microscopic picture shows macroconidia with the typical spindle shape which gives its name to the *Fusarium* genus. The cylindrical shape of the macroconidia, *i.e.* dorsal and ventral surfaces parallel, and the foot shape of the basal cell are typical of *F. graminearum* species.



Figure I.2: Wheat ear infested by *Fusarium graminearum* (Photograph: J. Leplat).

The ear shriveling suggests a low grains filling inferring yield losses. The orange spikelet is due to *F. graminearum* growth suggesting mycotoxins production.

#### 4.4 Interactions with the soil fauna

### 5. Importance of agricultural practices for the disease development

#### 5.1 Preceding crop

#### 5.2 Soil tillage

#### 5.3 Fertilization and pesticides

### 6. Conclusion

## 1. Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) is the second most cultivated crop in the world after maize (*Zea mays* L.). In 2010, 653 millions of tons of wheat and durum wheat were produced in the world, among which 140.7 were produced in Europe (FAO, 2011). Moreover, the wheat is one of the most traded crop in the world, with 125.9 millions of tons in 2010 (AGPB, 2012). The cultural practices trends due to economical and environmental reasons, *i.e.* reduction of soil tillage and pesticides use, raise the issue of re-emerging wheat diseases, such as fungal diseases (McMullen et al., 1997; Millenium Ecosystem Assasment 2005).

Studies of plant pathogenic fungi generally focus on infection processes, disease development and other concerns in plant-microorganism interactions, but the saprotrophic period of these pathogens' life cycle is not so well-known. Most soil fungi are decomposers or saprotrophs that feed on decaying organic material. Actually they play a key role in the decomposition of organic polymers that takes place in the soil. Fungi are considered as the primary decomposers in forests, where litter contains high concentrations of complex polymers. Fungi have a unique role in the degradation of plant-derived woody substrates containing lignocellulose, *i.e.* cellulose complexed with lignin (Finlay, 2007; Sinsabaugh, 2005). They also play an important role in arable soils by breaking down and recycling plant residues, primarily cellulose and hemicellulose (Stromberg, 2005). Among them, some plant pathogenic fungi take place and their role should be considered. Indeed, plant pathogenic fungi are categorised as either biotrophs or necrotrophs, and as either obligate pathogens or facultative saprotrophs. For example, the disease cycle of the deleterious fungus *Fusarium graminearum* (Figure I.1), the anamorph stage of *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, is well-studied (Trail, 2009). In a previous review, Goswami and Kistler (2004) provided an update on the pathogenesis, genetics, evolution and genomics of *F. graminearum* but the ecological requirements of its saprotrophic stage are less well-understood.

*Fusarium* head blight, root rot and foot rot (crown rot) are diseases that cause significant yield loss in several crops worldwide such as wheat (Figure I.2), maize, oat (*Avena sativa* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.) and rice (Parry et al., 1995; Pereyra and Dill-Macky, 2008; Trail et al., 2003). Yield losses caused by *Fusarium* head blight in Northern and Central America from 1998 to 2002 were evaluated to 2.7 billions of dollars (Nganje et al., 2002). Several species are involved in the fungal complex that causes these diseases. Many of them also produce mycotoxins, such as deoxynivalenol, commonly known as DON, and its acetylated forms 3-acetyl-4-deoxynivalenol and 15-acetyl-4-deoxynivalenol, nivalenol and

zearalenone, these mycotoxins being commonly known as 3-ADON, 15-ADON, NIV and ZEA respectively (Desjardins and Proctor 2007). These mycotoxins are of major concern because of their effect on human and animal health and because they persist during storage and are heat resistant (JEFCA, 2001). The threshold of these mycotoxins in foodstuffs is regulated in Europe since 2007 (CE N°1881/2006). Among the species involved in the complex causing Fusarium disease on wheat, *F. graminearum* predominates in many parts of the world (Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002; Parry et al., 1995).

Like the other *Fusarium* species in the complex, *F. graminearum* survives saprotrophically on crop residues in the absence of its hosts (Sutton, 1982). Fusarium head blight severity and deoxynivalenol contamination significantly increase with the density of residues left from the preceding crop (Blandino et al., 2010). Moreover, surface residues provide a substrate for active growth of *F. graminearum* for a longer period of time than buried residues (Pereyra et al., 2004). Burying *F. graminearum*-infested crop residues deeper in the soil can efficiently reduce *F. graminearum* populations; however, the pathogen may survive for several years. During the decomposition process, the chemical composition and the availability of the plant material changes as some resources are used up while others are made available for saprotrophic growth. For *F. graminearum* to survive over time, it has to be able to use available resources and to compete with the different organisms that are invading the material, each of them being specific for each of the decomposition stages. To develop control strategies of *F. graminearum* primary inoculum, a better understanding of the complex interactions that determine its ability to grow and compete for crop residues is needed.

This review focuses on the saprotrophic phase of the life cycle of *F. graminearum*. Discussion includes, 1) how environmental factors affect its saprotrophic survival, 2) in which ways crop residues provide a habitat for it and impact on its survival depending on their quantity and on plant species they come from, 3) whether crop residue colonization by it is a matter of competition and antagonism, and 4) what is the incidence of agricultural practices on its survival.

## 2. *Fusarium graminearum*

### 2.1 Fusarium diseases on wheat

On wheat, *Fusarium* fungi cause several distinct diseases (Colbach et al., 1996; Kohl et al., 2007). First, seedling diseases, which cause damping-off, seedling blight, and foot rot. In Europe and North America, these symptoms are mainly due to *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallet, but *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *F. graminearum* and *F. pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki are also frequently associated depending on the geographical conditions and climatic conditions (Bateman, 1993; Smiley et al., 2005). Second, Fusarium head blight, which is the mature plant disease caused by a complex of species. The *Fusarium* species predominantly found in Europe are *F. graminearum*, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. and *F. culmorum* (Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002; Nielsen et al., 2011). A

survey conducted in France between 2000 and 2002 showed that in addition to *F. graminearum*, *F. avenaceum* and *F. poae* (Peck) Wollenw. were also found regularly whereas *M. nivale* and *F. culmorum* were less frequent than previously recorded. Other species, such as *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. sambucinum* Fuckel, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. acuminatum* Ellis & Everh. and *F. sporotrichioides* Sherb., were found in lower quantities (Ioos et al., 2004). The composition, the development and the structure of the *Fusarium* community depend on a combination of factors, among which climate plays a major role (Muller et al., 2010). *Fusarium graminearum*, together with several other encountered species, can produce toxicogenic compounds (Bottalico, 1998). Like the other *Fusarium* species associated with Fusarium head blight, *F. graminearum* overwinters in soil and on infested crop residues (Fernandez et al., 2008; Pereyra and Dill-Macky, 2008; Sutton, 1982). The mycelium on crop residues allows the production of both macroconidia (asexual spores) and ascospores (sexual spores produced in perithecia), which constitute the primary inoculum that causes primary infection of wheat heads (Parry et al., 1995; Shaner, 2003; Yuen and Schoneweis, 2007; Figure I.3).

*Fusarium graminearum* is one of the predominant species involved in Fusarium diseases. *Fusarium graminearum* overwinters on crop residues which provide the primary inoculum for Fusarium head blight development. Therefore, a better knowledge of *F. graminearum* survival on crop residues is important to control this disease development.

## 2.2 Saprotrophic growth

Cell-wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi are considered important during the pathogenic part of the life cycle and may also be relevant during the saprotrophic part (Belien et al., 2006; Van den Brink and de Vries, 2011). In the case of *F. graminearum*, scanning electron micrographs and immuno-labelling showed that the fungus penetrates and invades its hosts by secreting cell-wall-degrading enzymes (Kikot et al., 2009). The plant cell-wall components cellulose, xylan, and pectin are damaged when they are in direct contact with the pathogen growing inter- and intracellularly in the tissues of wheat spikelets (Wanjiru et al., 2002). Kikot et al. (2010) examined *F. graminearum* isolates for their production of different extracellular enzymes with activities of potential biotechnological interest: pectinases (polygalacturonase and polymethylgalacturonase), cellulase (carboxymethylcellulase) and hemicellulase (xylanase). Although enzymatic activities varied among the different isolates, polygalacturonase activity was evidenced early (after two days' incubation in the presence of oat bran) and was the highest for all isolates. Only some of the isolates showed a high level of polymethylgalacturonase activity; carboxymethylcellulase and endoxylanase activities were particularly high at late stages, *i.e.* after four and seven days' incubation, respectively, and their maximum values were lower than pectinase values (Kikot et al. 2010). The production of these enzymes requires inducers that are likely to be present in the substrate and regulated by various mitogen-activated proteins (MAP) kinases, some of which have already been identified (Jenczmionka and Schafer, 2005). Besides being factors involved during infection, these polysaccharide-degrading enzymes are also important for the colonisation of crop residues.

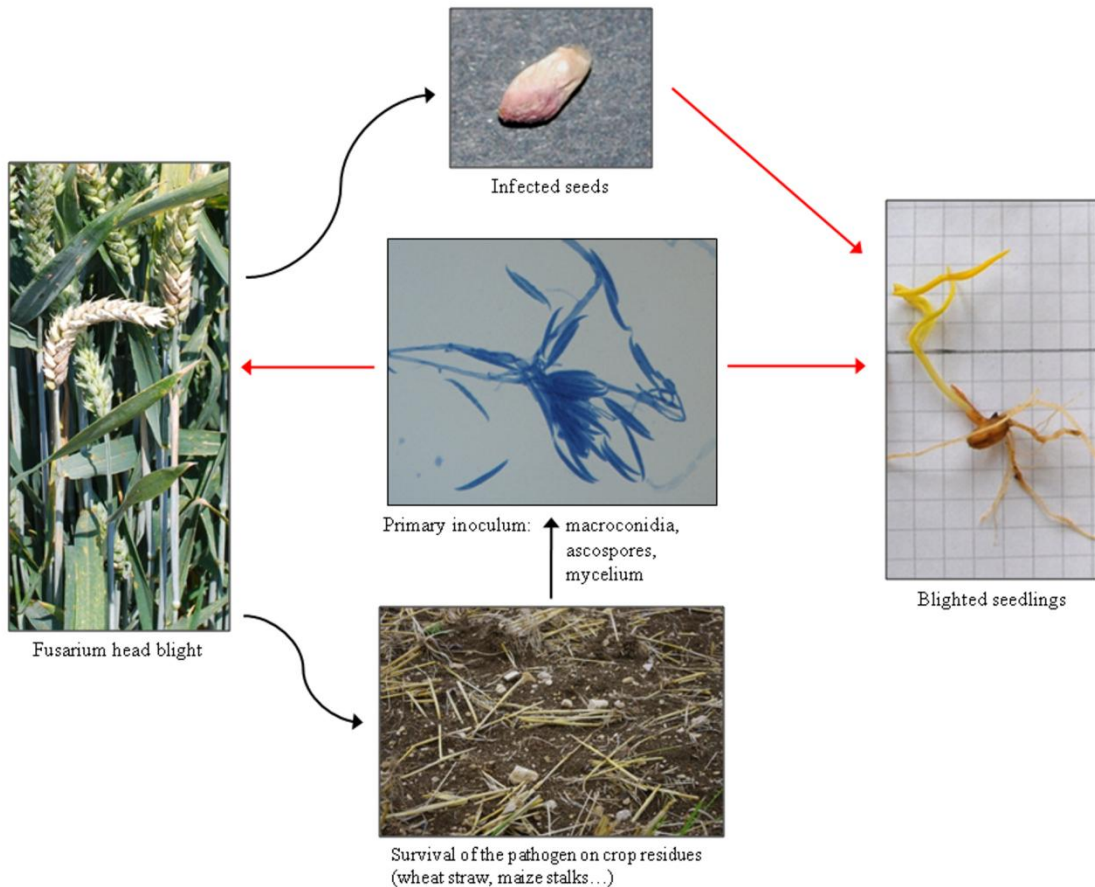


Figure I.3: Disease cycle of *Fusarium graminearum* (Photograph: J. Leplat).

Black, sigmoid-like arrows indicate habitats provided by the crop and red arrows indicate infectious activity kept up by habitats.

Crop residues allow the production of *F. graminearum* primary inoculum. The primary inoculum can provoke seedling blight as well as Fusarium head blight by splash dispersal. *Fusarium graminearum*-infested wheat ears can cause the production of infected seeds which lead to seedling blight.



The chemical composition of crop biomass differs from one plant species to another and from one plant part to another. This may influence the decomposition of the crop residues by microbial colonisers, and thereby the saprotrophic survival of pathogens such as *F. graminearum* (Khonga and Sutton, 1988; Nicolardot et al., 2007). There are also consequences on soil organic C inputs, which have been discussed elsewhere (Johnson et al., 2007). A comparative screening of *F. graminearum* exoproteome on culture media containing glucose or hop (*Humulus lupulus* L.) showed that the number of enzymes secreted by the fungus was higher in the presence of plant material (Phalip et al., 2005). Eighty-four proteins were identified on medium containing hops whereas only twenty-three were identified on medium containing glucose. Among them, eleven degraded cellulose, nineteen degraded pectin and twenty-five degraded hemicellulose. Two amylases and two chitinases were also identified. Obviously *F. graminearum* has the enzymatic ability to degrade compounds of the primary cell wall. Moreover, thirty xylanase-related genes were transcribed in the presence of different carbon sources, *i.e.* hop cell wall, xylan, xylose or carboxymethylcellulose, with different expression patterns for a specific enzyme, which suggests that *F. graminearum* can also adapt to a range of variations in its environment (Hatsch et al., 2006).

Briefly, *F. graminearum* can overwinter on crop residues thanks to its enzymatic ability to degrade and use these residues as nutrients.

### 2.3 Environmental factors controlling saprotrophic survival

Temperature, water activity and other physico-chemical factors can influence the different aspects of residues colonisation by *F. graminearum*. Its growth and the germination of conidia and ascospores are favoured by warm, humid conditions. Ramirez et al. (2006) found that the mycelial growth of two strains of *F. graminearum* reached an optimum at 25°C at water activities ranging between 0.950 and 0.995, and that no growth was observed below 5°C. Both strains were able to grow in drier conditions, at a minimum water activity of 0.900. By contrast, when the water activity was maintained at high levels, overall microbial activity was stimulated, resulting in a rapid decrease in the quantity of *F. graminearum* on wheat and maize residues buried in the soil (Burgess and Griffin, 1968). Soil characteristics such as soil compaction affect water availability. *Microdochium nivale* caused more foot rot in a non-compacted soil than in a compacted soil, probably due to reduced water availability leading to poor fungal development and mobility (Toyota et al., 1996).

Inch and Gilbert (2003a) studied the maturation of *F. graminearum* sexual structures on damaged kernels of wheat at three different temperatures. Even if the fungus survives at –10°C, perithecia are only formed between 2°C and 20°C and ascospores only appear at 20°C. The optimal temperature range for the maturation of perithecia is between 15.0°C and 28.5°C, whereas the optimum for the production of ascospores is between 25°C and 28°C at high water activity (Dufault et al., 2006; Sutton, 1982; Tschanz et al., 1976).

The optimal temperature for the production of compounds such as mycotoxins is different. For two strains of *F. graminearum*, mycotoxin production was highest at a temperature of 30°C at a water activity of 0.995 (Ramirez et al., 2006). Deoxynivalenol was only produced at



water activities between 0.950 and 0.995 even though growth was possible between 0.900 and 0.995, which indicates that mycotoxin production requires more specific conditions than growth.

Although *F. graminearum* can survive on residues buried 20– to 25–cm deep for more than four years, it can only develop on plant debris in the upper centimetres of the soil (Champeil et al., 2004a). In addition to favourable temperature and water availability, its development depends on soil aeration (Cassini, 1970). Furthermore, some stages of its life cycle require light. For example, perithecia initiation and ascospore production are light-dependent (Gilbert and Tekauz, 2000; Sutton, 1982; Tschanz et al., 1976). A *F. graminearum* survival test on damaged kernels left on the soil surface or buried in the first layer of the soil at 5– and 10–cm depths for 24 months showed that perithecia were produced at all depths but ascospores were only formed at the soil surface (Inch and Gilbert, 2003a).

Soil characteristics such as pH could also have an effect on *F. graminearum* survival. A negative correlation between soil pHs ranging between 4.4 and 6.4 and the amount of crown rot on wheat has been found, but it was not clear whether this is because *F. graminearum* has a better saprotrophic capacity in acidic soils or because it is more aggressive under these conditions (Smiley et al., 1996). Although mycelial growth and conidial germination were limited under acidic and alkaline conditions, *F. graminearum* could grow on media whose pHs range between 4 and 10 (Thompson et al., 1993). Macroconidia germination on solid media reached almost 100% after 18 hrs at pHs ranging between 3 and 7 (Beyer et al., 2004). The time needed for freshly discharged ascospores to germinate and the rate of ascospore germination were both affected by the pH. The time required for 50% of the viable ascospores to germinate was shortest at pH 3.5, and ascospore germination was highest at pH 3.7. Changing the pH from 3.7 to 2.5 and from 3.7 to 6.5 decreased the germination of ascospores by 66% and 56%, respectively (Beyer and Verreet, 2005). This might explain the better saprotrophic capacity of the fungus in soil at pH 4.4 than in soil at pH 6.4.

Despite *F. graminearum* can survive when exposed to unfavourable environmental conditions, its growth and the development of its sexual reproduction structures require sufficient temperature, water, light and O<sub>2</sub> availabilities.

### 3. Effect of crop residues as *F. graminearum* growth substrates in the soil

#### 3.1 Effect of crop residues quantities

There is a general relationship between the yield of a given crop and the amount of residues left on the ground after harvesting. In most cases, the residues:yield ratio is between 1 and 2 (Kumar et al., 2003; Scarlat et al., 2011). The amount of residue may vary from 2 to 9 tons per hectare, depending on the type of crop: rape (*Brassica napus* L.), barley and wheat leave 2.0, 2.5 and 3.5 tons of residues.ha<sup>-1</sup>, respectively; whereas alfalfa (*Medicago sativa* L.) and maize leave 8.5 and 9.0 tons of residues.ha<sup>-1</sup>, respectively (Morel, 1996; Vilain, 1989). Part of

the residues is exported for further transformation (e.g., animal bedding, animal feed and biofuel production; Berndes et al., 2003); however, a large part of them is left in and on the soil (Malhi et al., 2011). The residues are either ploughed down (inversion tillage) or left at the surface when conservation tillage is being practiced, as in zero-tillage or other types of non-inversion tillage. Non-inversion tillage may increase wheat grain infection by *F. graminearum* as compared to inversion tillage whereby residues are buried in the soil. The effects vary to a great extent with climatic conditions and preceding crop type (Blandino et al., 2010; Fernandez et al., 2008). In conservation tillage, more than 30% of the soil surface is covered by crop residues (Bockus and Shroyer, 1998). Steinkellner and Langer (2004) found up to  $9.10^3$  colony-forming units of *F. graminearum* and of *F. culmorum*.g<sup>-1</sup> of soil when non-inversion tillage was used, whereas 10 times as few colony-forming units were found after 20-cm deep inversion tillage. *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* survival is favoured by high quantities of available residues (Bateman et al., 1998). For example, maize production results in large amounts of residues which promote the production of inoculum (Champeil et al., 2004a). Comparing four different densities of maize residues left on the soil surface showed that disease severity and deoxynivalenol occurrence in wheat grains both increased with residue quantity (Blandino et al., 2010; Maiorano et al., 2008).

To abridge, *F. graminearum* survival is enhanced by important quantities of available crop residues, which depends on the production capacity of the preceding crop and on the crop residues management.

### 3.2 Effect of plant species

Not only can climatic conditions and residue quantities influence *F. graminearum* development, but the nature of crop residues can also affect its biology. For example, wheat and durum wheat produce similar amounts of residues, but wheat infection is more severe after durum wheat than after wheat (Champeil et al., 2004a). The production of reproductive structures also varies with the plant species. Pereyra and Dill-Macky (2008) found the induction of a higher ascospore production on wheat and barley than on maize or on some selected weed species (i.e. *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Setaria* spp., *Lolium multiflorum* Lam. and *Cynodon dactylon* (L.) Pers.), while no ascospore production was found on sunflower (*Helianthus annuus* L.) residues. Similarly, inoculum production varies over time, and depends on the plant part. *Fusarium graminearum* survival on maize stems and ears on the one hand and on wheat stems, spikelets and grains on the other hand, was compared over three years. The length of macroconidia and perithecia production varied according to the type of residue. For example, perithecia were produced on all types of residues during the first year, while only wheat spikelets and grains allowed the perithecia production during the third year. (Khonga and Sutton, 1988). Similarly, the amount of *Fusarium* was found to decrease faster on wheat internodes than on stem bases, and faster on nodes than on internodes (Kohl et al., 2007; Pereyra et al., 2004). Finally, *F. graminearum* ascospore production was higher on kernels than on nodes and floral bracts (Pereyra and Dill-Macky, 2005). These observations can be partly explained by the chemical composition of the residues and particularly by their C/N ratio: the C/N ratio varies over time depending on the decomposition stage of the

residues, and influences growth and the production of macroconidia and sexual structures. For example, the C/N value of wheat straw is high (134), whereas the C/N value of wheat leaves is ten times as low (13.4; Nicolardot et al., 2001). Macroconidia are produced on residues that are in the early stage of decomposition whereas perithecia production occurs later, when decomposition is much more advanced and growth conditions are less favourable. Rich residues with a low C/N ratio (such as maize stems, maize kernels, wheat spikelets and lowly-infested wheat grains) provide a favourable habitat, allowing longer saprotrophic development before perithecia production, as compared to poor residues with a high C/N ratio, such as wheat stems and severely infested wheat grains (Khonga and Sutton, 1988).

Briefly, *F. graminearum* survival depends on the C/N ratio of the residues, and consequently on the plant species, on the plant part and on the degradation rate of the residues. *Fusarium graminearum* survival is enhanced by rich residues, with a low C/N ratio. *Fusarium graminearum* sexual reproductive structures appear on residues with high C/N, when growth conditions are less favourable to fungal development.

#### 4. Competition and antagonism

##### 4.1 Organisms succession during residue decomposition

Organisms of different species and from different trophic groups are involved at different stages of the decomposition process (Frankland, 1998; Thirup et al., 2001). The ability of a specific species to grow or survive on the material depends on its ability to use the nutrients available at a particular decomposition stage and on its ability to compete for them with other organisms that are colonising the material concomitantly. Among these groups, microarthropods, nematodes, protozoa, bacteria and fungi have important predator-prey interactions that may determine community assemblages during the early decomposition of crop residues depending on their nature (Ponge, 2005). The fungal community seems to be the least affected by such interactions (Georgieva et al., 2005a), and the increase in fungal biomass that occurs later during succession is more correlated with the decomposition of different crop residues (Georgieva et al., 2005b). Therefore controlling the decomposition process could represent a way of controlling primary inoculum quantities of soil- and residue-borne plant pathogenic fungi such as *F. graminearum*. The succession of fungal populations and the decomposition process are also affected by external factors such as climatic conditions and agronomic practices, which may determine the competitive exclusion among the complex of *Fusarium* species (Doohan et al., 2003; Fernandez et al., 2008). Crop residues present in the soil or at the soil surface are degraded by a wide range of organisms that use the material for their growth. Larger soil organisms such as earthworms and microarthropods fragment the plant material, thereby making it more available for microbial degradation. In general, weak and aggressive pathogens dominate during the initial stages of degradation. Later, the material is more and more colonised by fungi that are specialised for saprotrophic growth (Frankland, 1998; Kjölller and Struwe, 2002). Fresh residue-colonising microorganisms are copiotrophs, which can be considered as r-strategists using easily available carbon sources and maximising their intrinsic growth rate when resources are

abundant (Pianka, 1970). The microorganisms that colonise residues at later stages of decomposition are oligotrophs, which can be considered as K-strategists. Compared with r-strategists, K-strategists have a slower growth rate, a better ability to degrade recalcitrant organic substances and better survival rates when resources are limited (Bastian et al., 2009).

To sum up, the decomposition of the crop residues is a complex process involving the whole soil biota. *Fusarium graminearum* survival could be controlled by driving the balance of this process.

#### 4.2 Interactions with soil microorganisms

By applying the r- and K-strategy concept to the comparison of the different microorganisms involved in crop residues decomposition, we could consider *F. graminearum* as an r-strategist during its saprotrophic phase because it can grow rapidly when fresh matter is available. This can be linked to the enzymes it excretes in the presence of plant material. The many cellulases, hemicellulases and pectinases that *F. graminearum* produces are important early in the decomposition process (Phalip et al., 2005). The relative abundance of *F. graminearum* can be decreased rapidly by keeping the humidity of wheat residues at a high level, which favours the activity of other microbes and can hence hamper *F. graminearum* growth (Burgess and Griffin, 1968). Indeed, *F. graminearum* seems to be a poor competitor over time, particularly compared with other *Fusarium* species. For instance, the amount of *F. graminearum* found on wheat residues rapidly decreases whereas those of *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht., *F. poae* and *F. sporotrichioides* increase. All these species are known to have better saprotrophic capacity in crop residues or in soil than *F. graminearum* (Pereyra and Dill-Macky, 2008). Nevertheless, *F. graminearum* can survive on residues for more than 24 months (Pereyra et al., 2004). *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides*, also involved in Fusarium head blight, are less aggressive than *F. graminearum* on plants, but they have a better saprotrophic capacity and can out-compete other organisms on residues (Fernandez et al., 2008). Few studies have been carried out about the interactions that occur among the different pathogens on residues in the field, but experiments in controlled conditions emphasise how specific these interactions are (Simpson et al., 2004; Velluti et al., 2000). *Fusarium culmorum* growth and *M. nivale* var. *majus*, growth were both limited when the strains were grown together in the same liquid medium, compared with their respective growth rates when they were inoculated alone (Simpson et al., 2004). On wheat seedlings, *F. culmorum* thoroughly inhibited *M. nivale* var. *nivale* and var. *majus* growth; however, when *M. nivale* var. *majus* was established before *F. culmorum*, it co-suppressed *F. culmorum* growth. Similarly, the presence of *F. graminearum* reduced *F. moniliforme* and *F. proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg growth on sterile maize grains, whereas its own growth was not affected by the other two species (Velluti et al., 2000).

Moreover, intraspecific diversity of phenotypic traits within *F. graminearum* species leads to interactions between *F. graminearum* populations for crop residues colonisation. This can be revealed through different levels of aggressiveness or different chemotypes among any given set of *F. graminearum* strains interacting with host plants. This can also be revealed through the intrinsic competitive skills used by different *F. graminearum* populations to rapidly

colonise and efficiently exploit crop residues such as maize stalks (Miedaner et al., 2004; Naef and Defago, 2006).

The role of deoxynivalenol, and of mycotoxins in general, in the multitrophic interactions *F. graminearum* faces during its saprotrophic growth, is poorly understood. While the deleterious impact on animals, including humans, is rather well studied (Pestka, 2010), the impact it might have on soil organisms has less been considered (Abid et al. 2011). The different studies results are conflicting. In some cases, mycotoxins have been shown to have antimicrobial activities against *Trichoderma atroviride* P. Karst. (Lutz et al., 2003), and a possible regulatory role in bacterial–fungal interactions has been proposed (Duffy and Defago, 1997), but in other case, the comparison of toxigenic and non–toxigenic *F. graminearum* strains showed that there was no evidence that deoxynivalenol played a role in the defence against *T. atroviride* (Naef et al., 2006). Moreover, the potential impact of mycotoxins on the microflora can be reduced by bacteria able to degrade these mycotoxins (Awad et al., ; Fuchs et al., 2002). Therefore the putative competitive advantage mycotoxins might confer to *F. graminearum* versus other antagonistic colonisers remains to be demonstrated.

*Fusarium graminearum* seems to be a poor competitor over time for crop residues colonisation, even among *Fusarium* species. The enhancement of the residues decomposition processes by other organisms could be efficient to limit *F. graminearum* survival.

#### 4.3 *Fusarium* species displacement on residues

It is possible to limit *F. graminearum* survival and growth on residues by adding microorganisms that can out–compete it. Already known biocontrol agents like *T. atroviride* and *T. harzianum* Rifai (Naef et al., 2006), or *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert and W. Gams (Gromadzka et al., 2009) are among the possible candidates. It is also possible to screen species isolated from residues (Luongo et al., 2005; Singh et al., 2009). The latter approach increases the likelihood that the microorganisms are adapted to the environment of the studied residues. Magan and Lynch (1986) tested ten fungal isolates for their capacity to colonise straw residues at different temperatures and at different water potentials. Among them, only *Penicillium* spp. and *F. culmorum* were able to grow at a low water potential, confirming the role played by water availability in competitive interactions. *Trichoderma harzianum*, *F. equiseti* and *F. nygamai* L.W. Burgess & Trimboli, which were all isolated from wheat stubble, have been shown to reduce *F. pseudograminearum* growth on culture medium (Singh et al., 2009). The displacement of *F. pseudograminearum* by these fungal isolates on barley straw was tested at different temperatures (5–35°C) and at different water potentials (–0.3 to –5.0 MPa). *Trichoderma harzianum* was the most efficient antagonist but displaced *F. pseudograminearum* very poorly at low temperatures and low water potentials. *Fusarium equiseti* and *F. nygamai* gave moderate displacement. *Fusarium equiseti* was the most efficient at low temperatures and low water potentials, showing that field conditions need to be taken into account when looking for an efficient antagonistic agent. *Clonostachys rosea* isolates were found to suppress sporulation of *F. graminearum* and *F. culmorum* on wheat straw and to suppress sporulation of *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum* and *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg on maize stalks under controlled

conditions. When tested under field conditions, however, their efficiency was limited (Luongo et al., 2005).

With regard to sexual reproduction, a *Microsphaeropsis* sp. isolate significantly reduced ascospore production by *F. graminearum* on wheat and maize residues under controlled conditions (Bujold et al., 2001). *Microsphaeropsis* sp. suppressed ascospore production when inoculated on wheat residues two weeks before the pathogen was inoculated, concomitantly, or four weeks later. Furthermore, it still suppressed ascospore production when inoculated on maize residues six weeks after the pathogen. However, *Microsphaeropsis* sp. significantly reduced the production of perithecia on crop residues under field conditions at only a few sampling dates. This highlights once again that although the antagonist can be found efficient under laboratory conditions, field application may not be so easy.

Along with their effect on pathogen growth and sporulation, competitors for residues can also decrease mycotoxin production. When *T. atroviride* and *F. graminearum* were inoculated together on autoclaved maize leaves, deoxynivalenol production by *F. graminearum* was 36% lower per biomass unit of the pathogenic fungus than when *F. graminearum* was inoculated alone (Naef et al., 2006).

To sum up, the use of specific out-competing microorganisms could be an efficient way to consider to limit *F. graminearum* survival on crop residues. Several fungal species with an interesting effect under laboratory conditions were identified. However, the field efficiency of these fungal strains is still limited, highlighting the difficulties to transpose laboratory experiments to field application.

#### 4.4 Interactions with the soil fauna

The soil animals influence pathogenic fungi and other soil microbes directly by feeding on them and by dispersing them. They also have an indirect influence: they alter the physical environment by fragmenting organic matter, burrowing through the soil, mixing it and by depositing faeces (Brown, 1995; Coleman and Crossley, 1996; Swift et al., 1979). The soil fauna is often divided up into groups, which is useful for understanding how animals move within the soil and influence soil structure and other abiotic and biotic conditions (Coleman and Crossley, 1996; Lavelle and Spain, 2001; Swift et al., 1979). The smaller soil animals grazing on mycelia with selective feeding habits have an important influence on saprotrophically growing fungi. The larger soil animals, which are less selective in their feeding habits, are important consumers of plant residues and soil. Their main influence can probably be seen through their effects on the fragmentation of organic material and on soil mixing (Friberg et al., 2005).

Anecic earthworms, such as *Lumbricus terrestris* L. and *Aporrectodea longa* Ude, which take fresh litter from the soil surface and pull it down into the soil through their burrows, can reduce the quantities of fungal pathogens such as *Fusarium* spp (Moody et al., 1996). The fact that infested wheat straw with high levels of deoxynivalenol was incorporated faster than straw with low levels of deoxynivalenol shows that deoxynivalenol is not repellent for *Lumbricus terrestris* and possibly attractive (Oldenburg et al., 2008). Earthworms also grew

better on infested straw than on non-infested straw, either because the decomposition by *F. graminearum* made compounds in the straw more easily available or because the fungal biomass itself was a source of nutrients for them. Since, fungal biomass and deoxynivalenol degradation increased in the presence of earthworms, it is possible that earthworms take part in deoxynivalenol degradation, maybe through the activity of their associated gut microorganisms (Schrader et al., 2009).

It seems that soil animals able to feed on *F. graminearum*-infested crop residues could participate to *F. graminearum* survival control.

## 5. Importance of agricultural practices for the disease development

### 5.1 Preceding crop

The preceding crop is an important factor determining the risk for Fusarium diseases on wheat (Blandino et al., 2010; Champeil et al., 2004a; Klem et al., 2007; Muller et al., 2010). If the preceding crop is a good host of the pathogen, the disease risk increases due to the inoculum initially present on the crop. The severity of Fusarium head blight caused by *F. graminearum* on wheat and the amount of mycotoxins produced have been found higher after maize than after soya, and continuous wheat cropping implied a higher risk of crown rot development caused by *F. graminearum* than a wheat-pea or wheat-fallow rotation (Dill-Macky and Jones, 2000; Smiley et al., 1996; Teich and Hamilton, 1985). Variations also exist among host plants: the disease is more severe after maize or durum wheat than after wheat or barley due to the quantities of residues produced and to their chemical composition. Schaafsma et al. (2005) found the number of viable propagules trapped at anthesis in wheat fields planted on maize or wheat stubble higher than the number of viable propagules in wheat fields following non-host crops, and the highest number of propagules was found after maize.

The composition of the fungal community causing Fusarium head blight changes depending on the preceding crop. In a survey performed in New Zealand on the community composition of *Fusarium* fungi isolated from harvested wheat grains in relation to the preceding crop, *F. graminearum* was recovered, along with *F. avenaceum*, *F. poae* and *F. culmorum* (Cromey et al., 2002). In each case, *F. graminearum* was the most common species. *F. graminearum* quantities were highest after maize, whereas *F. avenaceum* and *F. poae* quantities were highest after other crops. Where crown rot and Fusarium head blight were caused by *F. graminearum* and *F. culmorum*, the stem-bases were more frequently colonised by *F. culmorum* than by *F. graminearum*, but the situation was reversed on ears. And in this case, after maize, the stem-base disease was generally reduced whereas head blight increased (Bateman et al., 2007).

Most studies about the effects of different preceding crops on the development of *Fusarium* fungi were carried out on crops that are classically included in major rotation systems, such as wheat, maize or rape (Dill-Macky and Jones, 2000; Klem et al., 2007; Muller et al., 2010). It could be worth assessing the role of specific, less frequently studied intermediate crops such

as Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss), which has been shown to suppress *F. graminearum* growth (Kirkegaard et al., 1996; Sarwar et al., 1998).

Briefly, preceding crop is an important factor in the development of Fusarium head blight on wheat. Using a host of the disease as preceding crop carries a risk. Indeed, *F. graminearum* could settle on crop residues, in particular in case of maize which produces high quantities of residues. More care must be paid to the crop rotation scheme to limit the risk of Fusarium head blight development.

## 5.2 Soil tillage

Inversion tillage generally decreases the risk of Fusarium head blight compared with non-inversion tillage (Champeil et al., 2004a; Dill-Macky and Jones, 2000; Fernandez et al., 2008; Steinkellner and Langer, 2004). Several factors can explain why tillage can affect plant disease. Infection caused by splash dispersal during rainfalls or overhead irrigation is increased in the presence of large amounts of infested crop residues at the soil surface (Bateman, 2005; Osborne and Stein, 2007; Sutton, 1982). Bateman (2005) found that the presence of plant material infested by *F. culmorum* on the soil surface three to four weeks before anthesis was necessary to cause infection on ears. As for the preceding crop, tillage can have different effects on the different diseases caused by the same pathogens spectrum. In a study comparing disease on stem-bases and on ears, infection on stem-bases, mainly caused by *F. culmorum*, was decreased by non-inversion tillage whereas infection on ears, mainly caused by *F. graminearum*, was increased (Bateman et al., 2007). However, a test using plating method to determine whether the quantity of *F. culmorum* in a soil sampled to a 10-cm depth was affected by soil tillage showed that the number of propagules.g<sup>-1</sup> of soil was higher with non-inversion tillage than with inversion tillage (Bateman et al., 1998). As already mentioned, the fungus can survive in soil for a extend periods (more than two years) despite low O<sub>2</sub> availability and unfavourable abiotic conditions, but it cannot grow or produce ascospores (Champeil et al., 2004a; Khonga and Sutton, 1988).

Tillage has an effect on the decomposition rate of residues. Decomposition of buried residues is faster and more complete than decomposition of surface residues. Pereyra et al. (2004) found that for wheat residues that were buried for 24 months, only 2% of dry matter remained, whereas 25% remained when the residues were left at the soil surface. In a comparative study between barley straw and red clover foliage (*Trifolium pratense* L.), the limited contact between the soil matrix and the residues affected decomposition dynamics, particularly in the case of straw residues, which are rich in cellulose and hemicelluloses (Henriksen and Breland, 2002). This slow decomposition may be due to insufficient colonisation and growth of holocellulose-degrading microorganisms. The influence of soil tillage on the composition of microbial communities was confirmed by the analysis of bacterial and fungal communities during the decomposition process. The genetic structure of communities on residues is specific to residue location within the soil (soil surface or incorporated in soil; Nicolardot et al., 2007). Comparing buried and non-buried residues showed that the quantity of *F. graminearum* inoculum was twice as high on non-buried residues as on buried residues. Indeed, a slower decomposition at the soil surface allows a longer-lasting availability of



nutrients that are essential for *F. graminearum* development (Pereyra et al., 2004). A positive effect of reduced tillage is that the soil fauna is better preserved and can play a more active role in the decomposition and mineralization of crop residues, thus limiting habitats for saprotrophically surviving plant pathogenic fungi.

Different tillage practices affect the presence of weeds. Weeds can be a source of inoculum: in particular, *F. graminearum* inoculum has been found on *Festuca*, *Digitaria sanguinalis*, *Setaria* spp., *Lolium multiflorum* and *Cynodon dactylon*. When *F. graminearum* was the most common isolated species, other fungi belonging to the complex such as *F. avenaceum*, *F. sambucinum* and *F. poae* were also found (Pereyra and Dill-Macky, 2008). Over the year, the composition of fungi causing Fusarium head blight founds on weeds changes. In a study by Inch and Gilbert (2003b), *F. graminearum* was found on eleven out of thirty-four grass species investigated. *Fusarium sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* and *F. poae* were isolated too, but only *F. graminearum* and *F. sporotrichioides* were isolated in June. In July, *F. equiseti* and *F. culmorum* were isolated in addition to *F. graminearum* and *F. sporotrichioides*, while in August, all species were isolated. Although weed removal has been an important part in the control of different fungal plant diseases for many decades (Mantle et al., 1977; Miedaner et al., 2011), it is clear that the reduction soil tillage and sustainable pesticide use are clearly going to bring about with them a new focus on the role of weeds in Fusarium head blight mediation (Landschoot et al., 2011; Postic et al., 2012).

Shortly, soil tillage is an important factor in the development of Fusarium head blight on wheat. Inversion tillage reduces the risk of disease development in comparison to non-inversion tillage. Inversion tillage 1) hides the primary inoculum infecting wheat ears and prevents splash dispersal, 2) enhances the residues decomposition process and thus limits *F. graminearum* survival, 3) allows controlling weed species which could be a source of *F. graminearum* inoculum.

### 5.3 Fertilization and pesticides

The fungi in the complex causing Fusarium head blight are able to use all forms of nitrogen; however, the effect of fertilizers are mainly indirect and mediated via increased plant vigour (Huber and Watson, 1974). Different forms of nitrogen have different effects on the survival of pathogenic *Fusarium* spp. On one hand, in some cases, the number of propagules of *F. culmorum* in the soil and of *F. graminearum* on residues increases with inorganic nitrogen fertilization and with the application of calcium ammonium nitrate, respectively (Bateman and Coskun, 1995; Lemmens et al., 2004b; Yi et al., 2002). On the other hand, urea can hinder the reproduction of fungi, inhibit the formation of chlamydospores and also prevent ascospore maturation (Teich, 1989).

The herbicides used can influence inoculum levels. As weeds can be inoculum source, applying herbicides could reduce the risks of disease break-outs; however, little information is available about the direct effect of herbicides on *F. graminearum*, or about the way its saprotrophic ability could be affected by their presence. Some glyphosate-based herbicides

can stimulate *F. avenaceum* and *F. graminearum* growth, under *in vitro* conditions as well as on crop residues in the field, which leads to an increase in wheat stem–base and ear infections (Fernandez et al., 2009b; Hanson and Fernandez, 2003). Weed control with glyphosate seems to provide a source of energy for *Fusarium* leading to a proliferation of populations. The numbers of other fungal species decrease when glyphosate is used, suggesting important changes in the structure of fungal communities that should in turn affect their functioning.

Data from European surveys have recently shown that organically–produced cereal grains have an equal or a lower level of *Fusarium*–generated mycotoxins than conventionally–produced cereals (Bernhoft et al., 2010; Birzele et al., 2002; Edwards, 2009; Meister, 2009). There are currently no clear explanations for that fact, but one factor may be differences in the microflora associated with the different cropping systems.

To summarise, little is known about the effect of fertilizers and pesticides on *F. graminearum* saprotrophic survival. Some glyphosate–based herbicides may stimulate *F. graminearum* survival by changing the structure of fungal communities and providing a source of energy.

## 6. Conclusion

An important part of the life cycle of *F. graminearum*, the main causal agent of Fusarium head blight, takes place outside the plant. The fungus produces an array of enzymes which allow it to use crop residues as a trophic and spatial resource for its saprotrophic development.

Figure I.4 is proposed as a model exposing the role of the various factors that affect *F. graminearum* survival on crop residues. Depending on environmental factors, it is able to survive on crop residues, grow, and produce conidia and sexual structures which provide the primary inoculum causing disease on wheat heads. The development of *F. graminearum* is favoured by the presence of large amounts of residues and by nutrient rich residues, with a low C:N ratio. Since *F. graminearum* appears as a poor competitor over time compared to other organisms that colonise crop residues, strategies based on competition for the growth substrate could be an efficient way to control the production of primary inoculum. Some fungal species have been found to suppress sporulation and ascospore production by *F. graminearum* under controlled conditions in that way, but their efficiency still remains to be confirmed under field conditions. In addition, strategies that favour residue decomposition, via the activity of the soil's microflora and fauna, may reduce *F. graminearum* survival.

Since *F. graminearum* overwinters on crop residues, agricultural practices including crop rotation and residue management play a large part in Fusarium head blight management. Primary inoculum production can be limited by using a non–host plant as a preceding crop. Inversion tillage buries the primary inoculum and thus prevents inoculum being splashed up to wheat heads. In addition, inversion tillage favours the decomposition of crop residues in comparison with non–inversion tillage. Finally, inversion tillage makes it possible to control the source of *F. graminearum* inoculum provided by weed species.

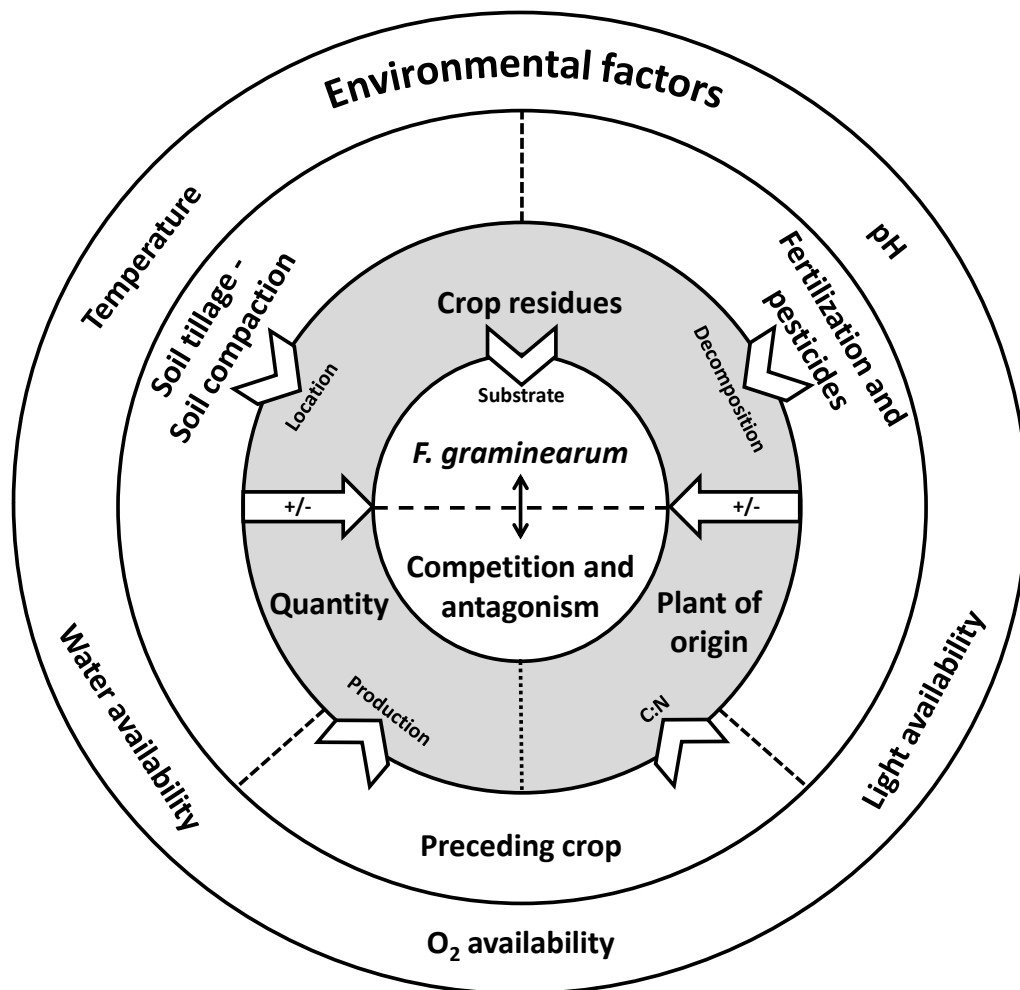


Figure I.4: Saprotrophic survival of *Fusarium graminearum*.

Crop residues are the main habitat of *F. graminearum*. On the one hand, they provide spatial and trophic resources the fungus has to exploit in interaction with the rest of the microflora and the soil fauna. On the other hand, they buffer the impact of environmental factors, including agricultural practices.

**Acknowledgements**

This review is part of a PhD work funded by the Vitagora–FUI programme Farine+ 2007–11. We thank the Swedish Farmers’ Foundation for Agricultural Research (SLF) and La Fondation Franco–Suédoise for financing H. Friberg. We are grateful to P. Mangin and L. Falchetto (INRA, UE Epoisses–France) for fruitful discussions.

We thank A. Buchwalter and C. Woods, proof–readers, for correcting the English language.

## References

- Abid M, Leplat J, Fayolle L, Gautheron E, Héraud C, Gautheron N, Edel-Hermann V, Cordier C, Steinberg C (2011) Ecological role of mycotoxins in wheat crop residues: consequences on the multitrophic interactions and the development of *Fusarium graminearum*. In: Multitrophic interactions in soil, IOBC Bull. 71, 1-5.
- Association Générale des Producteurs de Blé (2012) Récoltes. <http://www.agpb.fr/documentation-et-publications/recoltes/>
- Awad WA, Ghareeb K, Bohm J, Zentek J (2010) Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Addit Contam Part A-Chem* 27 (4):510–520. doi:10.1080/19440040903571747
- Bastian F, Bouziri L, Nicolardot B, Ranjard L (2009) Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biol Biochem* 41 (2):262–275. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.024
- Bateman GL (1993) Development of disease symptoms and fungal pathogens on shoot bases in continuous winter-wheat, and effects of fungicides. *Plant Pathol* 42 (4):595–608. doi:10.1111/j.1365-3059.1993.tb01540.x
- Bateman GL (2005) The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant Pathol* 54 (3):299–307. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01181.x
- Bateman GL, Coskun H (1995) Populations of *Fusarium* spp. in soil growing continuous winter wheat, and effects of long-term application of fertilizers and of straw incorporation. *Mycol Res* 99:1391–1394. doi:10.1016/S0953-7562(09)81227-6
- Bateman GL, Gutteridge RJ, Gherbawy Y, Thomsett MA, Nicholson P (2007) Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. *Plant Pathol* 56 (4):604–615. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01577.x
- Bateman GL, Murray G, Gutteridge RJ, Coskun H (1998) Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat. *Ann Appl Biol* 132 (1):35–47. doi:10.1111/j.1744-7348.1998.tb05183.x
- Belien T, Van Campenhout S, Robben J, Volckaert G (2006) Microbial endoxylanases: Effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Mol Plant-Microbe Interact* 19 (10):1072–1081. doi:10.1094/mpmi-19-1072
- Berndes G, Hoogwijk M, van den Broek R (2003) The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. *Biomass Bioenerg* 25 (1):1–28. doi:10.1016/s0961-9534(02)00185-x

- Bernhoft A, Clasen PE, Kristoffersen AB, Torp M (2010) Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Addit Contam Part A—Chem* 27 (6):842–852. doi:10.1080/19440041003645761
- Beyer M, Roding S, Ludewig A, Verreet JA (2004) Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. *J Phytopathol* 152 (2):92–97. doi:10.1111/j.1439–0434.2003.00807.x
- Beyer M, Verreet JA (2005) Germination of *Gibberella zeae* ascospores as affected by age of spores after discharge and environmental factors. *Eur J Plant Pathol* 111 (4):381–389. doi:10.1007/s10658–004–6470–9
- Birzele B, Meier A, Hindorf H, Kramer J, Dehne HW (2002) Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur J Plant Pathol* 108 (7):667–673. doi:10.1023/a:1020632816441
- Blandino M, Pilati A, Reyneri A, Scudellari D (2010) Effect of maize crop residue density on *Fusarium* head blight and on deoxynivalenol contamination of common wheat grains. *Cereal Res Commun* 38 (4):550–559. doi:10.1556/crc.38.2010.4.12
- Bockus WW, Shroyer JP (1998) The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 36:485–500. doi:10.1146/annurev.phyto.36.1.485
- Bottalico A (1998) *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J Plant Pathol* 80 (2):85–103. doi:10.4454/jpp.v80i2.807
- Bottalico A, Perrone G (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108 (7):611–624. doi:10.1023/A:1020635214971
- Brown GG (1995) How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity. *Plant Soil* 170 (1):209–231. doi:10.1007/BF02183068
- Bujold I, Paulitz TC, Carisse O (2001) Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Dis* 85 (9):977–984. doi:10.1094/PDIS.2001.85.9.977
- Burgess LW, Griffin DM (1968) The recovery of *Gibberella zeae* from wheat straws. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 8 (32):364–370
- Cassini R (1970) Facteurs favorables ou défavorables au développement des fusarioses et septorioses du blé. In: Meeting of Sections Cereals and Physiology, Dijon, 1970. *Eucarpia*, pp 271–279
- Champeil A, Dore T, Fourbet JF (2004) *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci* 166 (6):1389–1415. doi:10.1016/j.plantsci.2004.02.004
- Colbach N, Maurin N, Huet P (1996) Influence of cropping system on foot rot of winter wheat in France. *Crop Prot* 15 (3):295–305. doi:10.1016/0261–2194(95)00150–6

- Coleman DC, Crossley DA, Jr. (1996) Fundamentals of soil ecology. Academic Press, London
- Cromey MG, Shorter SC, Lauren DR, Sinclair KI (2002) Cultivar and crop management influences on *Fusarium* head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand. *N Z J Crop Hortic Sci* 30 (4):235–247. doi:10.1080/01140671.2002.9514220
- Desjardins AE, Proctor RH (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int J Food Microbiol* 119, 47-50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024
- Dill–Macky R, Jones RK (2000) The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis* 84 (1):71–76. doi:10.1094/PDIS.2000.84.1.71
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM (2003) Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur J Plant Pathol* 109 (7):755–768. doi:10.1023/a:1026090626994
- Dufault NS, De Wolf ED, Lipps PE, Madden LV (2006) Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Dis* 90 (5):637–644. doi:10.1094/pd–90–0637
- Duffy BK, Defago G (1997) Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* 87 (12):1250–1257. doi:10.1094/phyto.1997.87.12.1250
- Edwards SG (2009) *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Addit Contam Part A–Chem* 26 (4):496–506. doi:10.1080/02652030802530679
- FAO (2011) Food Outlook Report. November 2011. p. 186. FAO Trade and Markets Division (<http://www.fao.org/giews/>), Rome, It.
- Fernandez MR, Huber D, Basnyat P, Zentner RP (2008) Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil Tillage Res* 100 (1–2):60–71. doi:10.1016/j.still.2008.04.008
- Fernandez MR, Zentner RP, Basnyat P, Gehl D, Selles F, Huber D (2009) Glyphosate associations with cereal diseases caused by *Fusarium* spp. in the Canadian Prairies. *Eur J Agron* 31 (3):133–143. doi:10.1016/j.eja.2009.07.003
- Finlay RD (2007) The Fungi in soil. In: Elsas JD, Jansson, J., Trevors, J.T., (ed) *Modern Soil Microbiology*. CRC Press, New York, pp 107–146
- Frankland JC (1998) Fungal succession – unravelling the unpredictable. *Mycol Res* 102:1–15. doi:10.1017/S0953756297005364
- Friberg H, Lagerlöf J, Ramert B (2005) Influence of soil fauna on fungal plant pathogens in agricultural and horticultural systems. *Biocontrol Sci Technol* 15 (7):641–658. doi:10.1080/09583150500086979

- Fuchs E, Binder EM, Heidler D, Krska R (2002) Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Addit Contam* 19 (4):379–386. doi:10.1080/02652030110091154
- Georgieva S, Christensen S, Petersen H, Gjelstrup P, Thorup–Kristensen K (2005a) Early decomposer assemblages of soil organisms in litterbags with vetch and rye roots. *Soil Biol Biochem* 37 (6):1145–1155. doi:10.1016/j.soilbio.2004.11.012
- Georgieva S, Christensen S, Stevnbak K (2005b) Nematode succession and microfauna–microorganism interactions during root residue decomposition. *Soil Biol Biochem* 37 (10):1763–1774. doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.010
- Gilbert J, Tekauz A (2000) Review: Recent developments in research on fusarium head blight of wheat in Canada. *Can J Plant Pathol–Rev Can Phytopathol* 22 (1):1–8. doi:10.1080/07060660009501155
- Goswami RS, Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515–525. doi: 10.1111/J.1364-3703.2004.00252
- Gromadzka K, Chelkowski J, Popiel D, Kachlicki P, Kostecki M, Golinski P (2009) Solid substrate bioassay to evaluate the effect of *Trichoderma* and *Clonostachys* on the production of zearalenone by *Fusarium* species. *World Mycotoxin J* 2 (1):45–52. doi:10.3920/WMJ2008.x046
- Hanson KG, Fernandez MR Effect of glyphosate herbicides on *Pyrenophora tritici–repentis* and other cereal pathogens. In: Proceedings of Fourth International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop, Bemidji, Minnesota, USA, 21–24 July, 2002., 2003. Agricultural Experiment Station, North Dakota State University, pp 128–131
- Hatsch D, Phalip V, Petkovski E, Jeltsch JM (2006) *Fusarium graminearum* on plant cell wall: No fewer than 30 xylanase genes transcribed. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (3):959–966. doi:10.1016/bbrc.2006.04.171
- Henriksen TM, Breland TA (2002) Carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities as affected by contact between crop residues and soil. *Biol Fertil Soils* 35 (1):41–48. doi:10.1007/s00374–001–0438–0
- Huber DM, Watson RD (1974) Nitrogen form and plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 12:139–165. doi:10.1146/annurev.py.12.090174.001035
- Inch SA, Gilbert J (2003a) Survival of *Gibberella zeae* in *Fusarium*–damaged wheat kernels. *Plant Dis* 87 (3):282–287. doi:10.1094/PDIS.2003.87.3.282
- Inch S, Gilbert J (2003b) The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. *Can J Plant Pathol–Rev Can Phytopathol* 25 (4):379–383. doi:10.1080/07060660309507093
- Ioos R, Belhadj A, Menez M (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158 (3):351–362. doi:10.1007/s11046–004–2228–3



- Jenczmionka NJ, Schafer W (2005) The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Curr Genet* 47 (1):29–36. doi:10.1007/s00294-004-0547-z
- Johnson JMF, Barbour NW, Weyers SL (2007) Chemical composition of crop biomass impacts its decomposition. *Soil Sci Soc Am J* 71 (1):155–162. doi:10.2136/sssaj2005.0419
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO Food and Nutrition Paper (74)
- Khonga EB, Sutton JC (1988) Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Plant Pathol* 10:232–239. doi:10.1080/07060668809501730
- Kikot GE, Hours RA, Alconada TM (2009) Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J Basic Microbiol* 49 (3):231–241. doi:10.1002/jobm.200800231
- Kikot GE, Hours RA, Alconada TM (2010) Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Braz Arch Biol Technol* 53 (4):779–783. doi:10.1590/s1516-89132010000400005
- Kirkegaard JA, Wong PTW, Desmarchelier JM (1996) In vitro suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathol* 45 (3):593–603. doi:10.1046/j.1365-3059.1996.d01-143.x
- Kjöller AH, Struwe S (2002) Fungal communities, succession, enzymes, and decomposition. In: Burns RG, Dick, R.P. (ed) *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, New York, pp 267–284
- Klem K, Vanova M, Hajslova J, Lancova K, Sehnalova M (2007) A neural network model for prediction of deoxynivalenol content in wheat grain based on weather data and preceding crop. *Plant Soil Environ* 53 (10):421–429
- Kohl J, de Haas BH, Kastelein P, Burgers S, Waalwijk C (2007) Population dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in crops and crop residues of winter wheat. *Phytopathology* 97 (8):971–978. doi:10.1094/phyto-97-8-0971
- Kumar A, Cameron JB, Flynn PC (2003) Biomass power cost and optimum plant size in western Canada. *Biomass Bioenerg* 24 (6):445–464. doi:10.1016/s0961-9534(02)00149-6
- Landschoot S, Audenaert K, Waegeman W, Pycke B, Bekaert B, De Baets B, Haesaert G (2011) Connection between primary *Fusarium inoculum* on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. *Crop Prot* 30 (10):1297–1305. doi:10.1016/j.cropro.2011.05.018
- Lavelle P, Spain AV (2001) *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Lemmens M, Haim K, Lew H, Ruckebauer P (2004) The effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat. *J Phytopathol* 152 (1):1–8. doi:10.1046/j.1439-0434.2003.00791.x

- Luongo L, Galli M, Corazza L, Meeke E, De Haas L, Van der Plas CL, Kohl J (2005) Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci Technol* 15 (3):229–242. doi:10.1080/09583150400016852
- Lutz MP, Feichtinger G, Defago G, Duffy B (2003) Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Appl Environ Microbiol* 69 (6):3077–3084. doi:10.1128/aem.69.6.3077–3084.2003
- Magan N, Lynch JM (1986) Water potential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *J Gen Microbiol* 132:1181–1187. doi:10.1099/00221287–132–5–1181
- Maiorano A, Blandino M, Reyneri A, Vanara F (2008) Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot* 27 (2):182–188. doi:10.1016/j.cropro.2007.05.004
- Malhi SSMSS, Nyborg M, Goddard T, Puurveen D (2011) Long-term tillage, straw and N rate effects on quantity and quality of organic C and N in a Gray Luvisol soil. *Nutr Cycl Agroecosyst* 90 (1):1–20. doi:10.1007/s10705–010–9399–8
- Mantle PG, Shaw S, Doling DA (1977) Role of weed grasses in etiology of ergot disease in wheat. *Ann Appl Biol* 86 (3):339–&. doi:10.1111/j.1744–7348.1977.tb01848.x
- McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis* 81 (12):1340–1348. doi:10.1094/PDIS.1997.81.12.1340
- Meister U (2009) *Fusarium* toxins in cereals of integrated and organic cultivation from the Federal State of Brandenburg (Germany) harvested in the years 2000–2007. *Mycotoxin Res* 25 (3):133–139. doi:10.1007/s12550–009–0017–z
- Miedaner T, Klocke B, Flath K, Geiger HH, Weber WE (2011) Diversity, spatial variation, and temporal dynamics of virulences in the German leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *secalis*) population in winter rye. *Eur J Plant Pathol* 132 (1):23–35. doi:10.1007/s10658–011–9845–8
- Miedaner T, Schilling AG, Geiger HH (2004) Competition effects among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye. *Eur J Plant Pathol* 110 (1):63–70. doi:10.1023/B:EJPP.0000010136.38523.a9
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and human well-being: synthesis* (2005). Island Press, Washington
- Moody SA, Pearce TG, Dighton J (1996) Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. *Soil Biol Biochem* 28 (4–5):533–537. doi:10.1016/0038–0717(95)00172–7

- Morel R (1996) Cultivated soils; Les sols cultivés – Technique et documentation –. 2<sup>nd</sup> edn. Lavoisier, Paris
- Muller MEH, Brenning A, Verch G, Koszinski S, Sommer M (2010) Multifactorial spatial analysis of mycotoxin contamination of winter wheat at the field and landscape scale. *Agric Ecosyst Environ* 139 (1–2):245–254. doi:10.1016/j.agee.2010.08.010
- Naef A, Defago G (2006) Population structure of plant–pathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt–transformed and non–transformed maize crops. *Eur J Plant Pathol* 116 (2):129–143. doi:10.1007/s10658–006–9048–x
- Naef A, Senatore M, Defago G (2006) A microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 55 (2):211–220. doi:10.1111/j.1574–6941.2005.00023.x
- Nganje IB, Bangsund DA, Leistritz FL, Wilson WW, Tiapo NM Estimating the economic impact of crop disease: the case of Fusarium head blight in U.S. wheat and barley. In: 2002 National Fusarium Head Blight Forum, East Lansing: Michigan State University, 2002. pp 275–281
- Nicolardot B, Bouziri L, Bastian F, Ranjard L (2007) A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 39 (7):1631–1644. doi:10.1016/j.soilbio.2007.01.012
- Nicolardot B, Recous S, Mary B (2001) Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C : N ratio of the residues. *Plant Soil* 228 (1):83–103. doi:10.1023/a:1004813801728
- Nielsen JKS, Vikstroem AC, Turner P, Knudsen LE (2011) Deoxynivalenol transport across the human placental barrier. *Food Chem Toxicol* 49: 2046–2052. doi:10.1016/j.fct.2011.05.016
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jorgensen LN (2011) Fusarium Head Blight of Cereals in Denmark: Species Complex and Related Mycotoxins. *Phytopathology* 101 (8):960–969. doi:10.1094/phyto–07–10–0188
- Oldenburg E, Kramer S, Schrader S, Weinert J (2008) Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* on the degradation of *Fusarium*–infected and deoxynivalenol–contaminated wheat straw. *Soil Biol Biochem* 40 (12):3049–3053. doi:10.1016/j.soilbio.2008.09.004
- Osborne LE, Stein JM Epidemiology of Fusarium head blight on small–grain cereals. In: Workshop on Mycotoxins from the Field to the Table, Omaha, NE, Nov 29–Dec 01 2007. Elsevier Science Bv, pp 103–108. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) Fusarium ear blight (scab) in small–grain cereals – a review. *Plant Pathol* 44 (2):207–238. doi:10.1111/j.1365–3059.1995.tb02773.x

- Pereyra SA, Dill-Macky R (2005) Colonization and inoculum production of *Gibberella zeae* in components of wheat residue. *Cereal Res Commun* 33 (4):755–762. doi:10.1556/CRC.33.2005.2–3.145
- Pereyra SA, Dill-Macky R (2008) Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. *Plant Dis* 92 (5):800–807. doi:10.1094/pdis-92-5-0800
- Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL (2004) Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Dis* 88 (7):724–730. doi:10.1094/PDIS.2004.88.7.724
- Pestka JJ (2010) Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84 (9):663–679. doi:10.1007/s00204-010-0579-8
- Phalip V, Delalande F, Carapito C, Goubet F, Hatsch D, Leize-Wagner E, Dupree P, Van Dorsselaer A, Jeltsch JM (2005) Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr Genet* 48 (6):366–379. doi:10.1007/s00294-005-0040-3
- Pianka E (1970) On r- and K-selection. *Am Nat* 104:592–597
- Ponge JF (2005) Fungal communities: relation to resource succession. In: Dighton J, White JF, Oudemans P (ed) *The Fungal Community: its organisation and role in the ecosystem*. Taylor & Francis, New York, pp 169–180
- Postic J, Cosic J, Vrandecic K, Jurkovic D, Saleh AA, Leslie JF (2012) Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. *J Phytopathol* 160 (2):76–81. doi:10.1111/j.1439-0434.2011.01863.x
- Ramirez ML, Chulze S, Magan N (2006) Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Int J Food Microbiol* 106 (3):291–296. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004
- Sampietro DA, Marin P, Iglesias J, Presello DA, Vattuone MA, Catalan CAN, Gonzalez Jaen MT (2010) A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biol* 114: 74-81. doi:10.1016/j.mycres.2009.10.008
- Sarwar M, Kirkegaard JA, Wong PTW, Desmarchelier JM (1998) Biofumigation potential of brassicas – III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant Soil* 201 (1):103–112. doi:10.1023/a:1004381129991
- Scarlat N, Blujdea V, Dallemand JF (2011) Assessment of the availability of agricultural and forest residues for bioenergy production in Romania. *Biomass Bioenerg* 35 (5):1995–2005. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.057
- Schaafsma AW, Tamburic-Ilincic L, Hooker DC (2005) Effect of previous crop, tillage, field size, adjacent crop, and sampling direction on airborne propagules of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*, Fusarium head blight severity, and deoxynivalenol accumulation in winter wheat. *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* 27 (2):217–224. doi:10.1080/07060660509507219

- Schrader S, Kramer S, Oldenburg E, Weinert J (2009) Uptake of deoxynivalenol by earthworms from *Fusarium*-infected wheat straw. *Mycotoxin Res* 25 (1):53–58. doi:10.1007/s12550-009-0007-1
- Shaner G (2003) Epidemiology of *Fusarium* head blight of small grain cereals in North America. In: *Fusarium head blight of wheat and barley*. pp 84–119
- Simpson DR, Thomsett MA, Nicholson P (2004) Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environ Microbiol* 6 (1):79–87. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00540.x
- Singh DP, Backhouse D, Kristiansen P (2009) Interactions of temperature and water potential in displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal residues by fungal antagonists. *Biol Control* 48 (2):188–195. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.10.015
- Sinsabaugh RL (2005) Fungal enzymes at the community scale. In: Dighton J, White, J.F., Oudemans, P. (ed) *The Fungal Community: its organisation and role in the ecosystem*. Taylor & Francis, New York, pp 349–360
- Smiley RW, Collins HP, Rasmussen PE (1996) Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendleton, Oregon. *Plant Dis* 80 (7):813–820. doi:10.1094/PD-80-0813
- Smiley RW, Gourlie JA, Easley SA, Patterson LM (2005) Pathogenicity of fungi associated with the wheat crown rot complex in Oregon and Washington. *Plant Dis* 89 (9):949–957. doi:10.1094/pd-89-0949
- Steinkellner S, Langer I (2004) Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant Soil* 267 (1–2):13–22. doi:10.1007/s11104-005-2574-z
- Stromberg ME (2005) Fungal communities of Agroecosystems. In: Dighton J, White, J.F., Oudemans, P. (ed) *The Fungal Community: its organisation and role in the ecosystem*. Taylor & Francis, New York, pp 813–822
- Sutton JC (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* 4:195–209. doi:10.1080/07060668209501326
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM (1979) *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Teich AH (1989) Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp. In: Chelkovski J (ed) *Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 269–282
- Teich AH, Hamilton JR (1985) Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Appl Environ Microbiol* 49 (6):1429–1431
- Thirup L, Johnsen K, Torsvik V, Spliid NH, Jacobsen CS (2001) Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. *Soil Biol Biochem* 33 (11):1517–1524. doi:10.1016/s0038-0717(01)00067-0

- Thompson DP, Metevia L, Vessel T (1993) Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *J Food Prot* 56 (2):134–138
- Toyota K, Young IM, Ritz K (1996) Effects of soil matric potential and bulk density on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Soil Biol Biochem* 28 (9):1139–1145. doi:10.1016/0038–0717(96)00134–4
- Trail F (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol* 149 (1):103–110. doi:10.1104/pp.108.129684
- Trail F, Xu JR, San Miguel P, Halgren RG, Kistler HC (2003) Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet Biol* 38 (2):187–197. doi:10.1016/s1087–1845(02)00529–7
- Tschanz AT, Horst RK, Nelson PE (1976) Effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 68 (2):327–340. doi:10.2307/3759003
- Van den Brink J, de Vries RP (2011) Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 91 (6):1477–1492. doi:10.1007/s00253–011–3473–2
- Velluti A, Marin S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V (2000) The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B–1 and zearalenone formation. *Int J Food Microbiol* 59 (1–2):59–66. doi:10.1016/S0168–1605(00)00289–0
- Vilain M (1989) *Plant production volume 2. La production végétale. Volume 2 – La maîtrise technique de la production.* Lavoisier, Paris,
- Wanjiru WM, Kang ZS, Buchenauer H (2002) Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *Eur J Plant Pathol* 108 (8):803–810. doi:10.1023/A:1020847216155
- Yi CL, Kaul HP, Kubler E, Aufhammer W (2002) Populations of *Fusarium graminearum* on crop residues as affected by incorporation depth, nitrogen and fungicide application. *Z Pflanzenk Pflanzens–J Plant Dis Prot* 109 (3):252–263
- Yuen GY, Schoneweis SD (2007) Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol* 119 (1–2):126–130. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.033



## **Chapitre 2 Matériels et Méthodes**



## I Souche de *F. graminearum*

La souche de *F. graminearum* utilisée au cours de toutes les expériences a été isolée de résidus de maïs. Elle a été fournie par la société BASF et est conservée au sein de la collection « Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment » (MIAE, INRA Dijon, France, <http://www2.dijon.inra.fr/umrmse/spip.php?rubrique47>). Elle porte les numéros BASF 270 et MIAE00376. La souche est conservée à la fois à température ambiante par repiquages successifs sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et par cryoconservation à -80°C.

L'identification de la souche fongique utilisée a été faite à partir de l'étude de ses caractéristiques morphologiques combinée à une identification moléculaire et à une caractérisation de son chemotype (type de mycotoxines qu'elle peut potentiellement produire).

### I.1 Caractérisation morphologique de la souche MIAE00376

L'aspect morphologique d'une souche de champignon est la première étape de la caractérisation d'une espèce. Elle se décompose en une description macroscopique : aspect général de la souche cultivée sur boîte de Petri, et en une description microscopique. Le genre *Fusarium* tire son nom de cette description microscopique par la production de macroconidies en fuseau.

*Fusarium* species, an illustrated manual for identification (Nelson et al., 1983) et The *Fusarium* laboratory manual (Leslie and Summerell, 2006) ont été les clés d'identification utilisées pour cette caractérisation.

#### I.1.1 Caractérisation macroscopique

Le ou les milieux de référence utilisés pour décrire macroscopiquement une souche fongique dépendent du genre de cette souche. Pour le genre *Fusarium*, le milieu PDA est utilisé comme milieu de référence pour la description macroscopique.

Les critères macroscopiques d'identification ont été les suivants :

- vitesse de croissance de la souche ;
- aspect du mycélium ;
- couleur de la partie aérienne de la colonie ;
- couleur de la partie de la colonie en contact avec le milieu et éventuellement coloration du milieu de culture ;
- présence et couleur des sporodochies (structures de production des macroconidies).

#### I.1.2 Caractérisation microscopique

Le milieu de référence pour la description microscopique est le milieu CLA (Carnation Leaf Agar). Il permet une production importante de conidies de forme homogène, facilitant l'identification.

Les critères d'identification microscopique ont été les suivants :

- taille des macroconidies (nombre de loges) ;
- forme des macroconidies, notamment leur incurvation et le fait que les faces dorsales et ventrales aient la même incurvation ou non ;
- forme de la cellule apicale et de la cellule basale aussi appelée cellule du pied pour sa forme caractéristique chez certaines espèces de *Fusarium* ;
- présence ou absence de microconidies ;
- microconidies en chaînes ou en « fausse tête » ;
- forme des microconidies (ovales, en aiguille, citrifformes, piriformes...) ;
- type de conidiophores (structures de production des microconidies) : monophialides ou polyphialides ;
- présence ou absence de chlamydospores et disposition (isolées, par deux, en chaînes...).

## I.2 Caractérisation moléculaire de la souche MIAE00376

Cette caractérisation a été basée sur l'extraction, l'amplification par PCR, le séquençage et l'alignement sur des bases de données de référence de régions spécifiques de l'ADN fongique à partir d'une culture pure sur boîte de Petri. Deux types de portions d'ADN ont été utilisés :

- des portions d'ADN d'intérêt phylogénétique au niveau genre/espèce. ITS, pour Internal Transcribed Spacer, et *tef-1 $\alpha$* , pour Translation Elongation Factor-1 $\alpha$ , utilisées par la suite pour l'identification de souches ;
- une portion d'ADN de *F. graminearum* spécifiquement amplifiée par le couple d'amorces Fg16NF/Fg16NR qui a dans la suite du travail été utilisée pour l'identification de souches et pour suivre la dynamique de population de *F. graminearum* par qPCR (paragraphes I.3.1, III et IV).

### I.2.1 Extraction et purification de l'ADN fongique

#### I.2.1.1 Extraction de l'ADN fongique

L'ADN a été extrait par la méthode « minipréparation », mise au point au laboratoire (Mode opératoire en annexe 1).

#### I.2.1.2 Purification de l'ADN fongique

Dans les cas où l'ADN fongique contenait trop d'inhibiteurs pour permettre une amplification par PCR correcte après extraction, il a été dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans du tampon TE. Si la dilution ne permettait toujours pas d'amplification correcte, l'ADN a été purifié à l'aide du Geneclean® Turbo kit (MPBIO ; annexe 3).

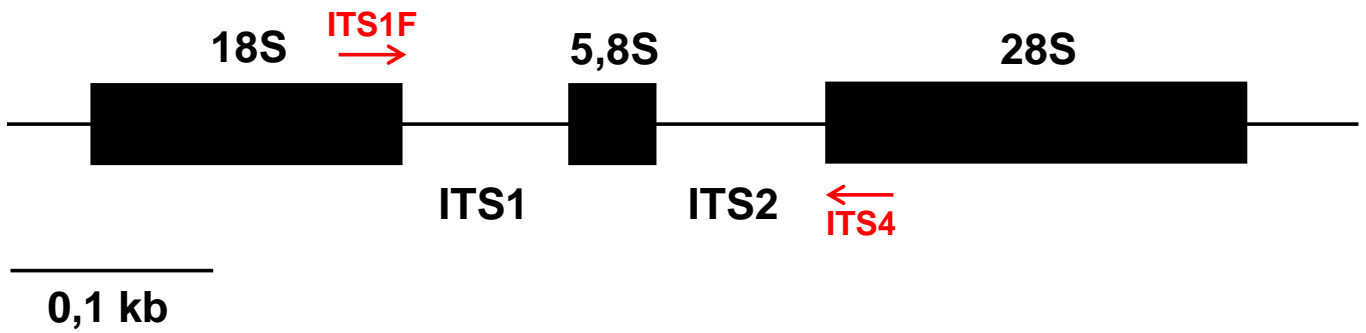


Figure 2.1 : Organisation de la région des ITS de l'ADN d'après (Gardes and Bruns, 1993)

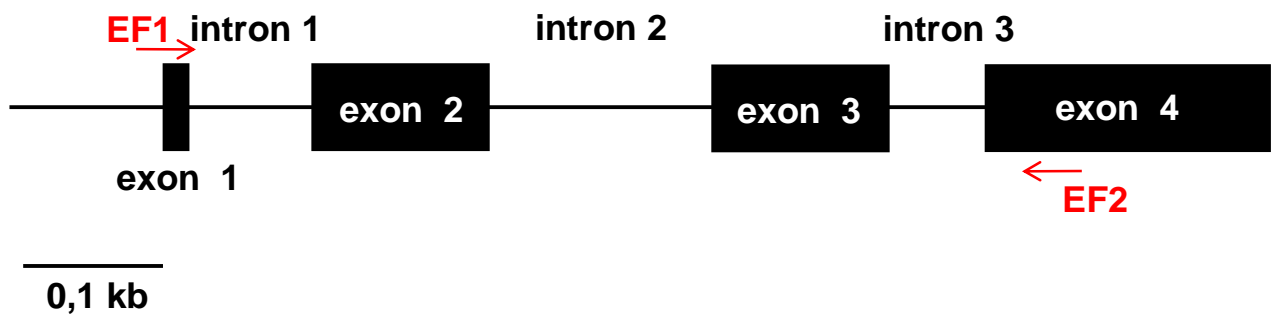


Figure 2.2 : Organisation de la région *tef-1α* de l'ADN d'après *Fusarium-ID*

I.2.2 Caractérisation des régions d'intérêt phylogénétique ITS et *tef-1α* de la souche

Une région génomique d'intérêt phylogénétique est une portion d'ADN informative, orthologue et universelle.

#### I.2.2.1 Région ITS

Pour les champignons, la région classiquement utilisée est la partie ITS de l'ADN ribosomal. Cette région contient des parties d'ADN conservées au cours du temps, celles codant les sous unités 18S, 5.8S et 28S des ribosomes, et des parties à évolution rapide, les ITS1 et ITS2 (Figure 2.1). Cette région a été amplifiée par PCR à l'aide du couple d'amorces ITS1F/ITS4 (Mode opératoire en annexe 2).

Les amplifiats ainsi obtenus ont été séquencés par une société extérieure (Cogenics France, Meylan, France). Les séquences ont ensuite été alignées selon l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur les bases de données de référence : GeneBank® ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)), banque généraliste, et *Fusarium-ID* ([www.fusariumdb.org/](http://www.fusariumdb.org/); Geiser et al., 2004), banque dédiée au genre *Fusarium*.

#### I.2.2.2 Région *tef-1α*

Pour certaines espèces génétiquement proches, l'identification par utilisation de la région ITS ne suffit pas à la discrimination. La région *tef-1α*, codant pour le facteur d'élongation, peut dans certains cas lever l'incertitude. Elle a donc aussi été utilisée pour caractériser la souche MIAE00376 (Figure 2.2). Cette région a été amplifiée par PCR à l'aide du couple d'amorces EF1/EF2 (Mode opératoire en annexe 3).

Les amplifiats obtenus ont été traités comme ceux issus de l'amplification de la région ITS.

I.2.3 Caractérisation de la zone d'ADN spécifique à *F. graminearum* amplifiée par le couple d'amorces Fg16NF/Fg16NR

La caractérisation de cette région d'ADN a été faite de la même manière que celle des zones ITS et *tef-1α* en utilisant le couple d'amorces spécifiques Fg16NF/Fg16NR (Mode opératoire en annexe 4).

### I.3 Caractérisation du chemotype de la souche MIAE00376

L'étude du chemotype d'une souche de *F. graminearum* permet de déterminer si le champignon est producteur de mycotoxines TCT B de type DON ou NIV. La souche a été caractérisée à deux niveaux :

- au niveau phénotypique par croissance du champignon sur grains de blé. Trois variétés de blé ont été choisies : celles utilisées dans les essais au champ (Apache, Charger et Maxwell, paragraphe II.2.1.3). L'expérience a aussi été réalisée sur son de blé (Markal SAS, France) substrat utilisé habituellement pour la production de spores de *F. graminearum* en milieu liquide. Les mycotoxines produites sur les grains de blé ont été quantifiées par

chromatographie en phase liquide (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). La production de matériel fongique sur ces grains de blé a également été contrôlée pour le comparer au niveau de production de mycotoxines. Cette quantification a été faite par PCR quantitative (qPCR) ;

- au niveau du génotype par une étude de la région du génome impliquée dans la production de mycotoxines par PCR spécifiques.

I.3.1 Caractérisation du chemotype de la souche MIAE00376 par croissance du champignon sur grains de blé

#### *I.3.1.1 Inoculation des substrats*

L'étude a été menée sous forme d'une cinétique de 60 jours à 25°C. Des prélèvements ont été effectués aux temps 0, 4, 21 (optimum théorique de production de mycotoxines attendu) et 60 jours. Deux répétitions biologiques ont été réalisées par substrat et par date d'échantillonnage (Schéma de l'échantillonnage en annexe 5, mode opératoire en annexe 6).

Brièvement, des flacons contenant 100 g de grains de chaque variété et 50 g de son ont été autoclavés (110°C, 60 min) trois fois consécutives à 24 h d'intervalle. La stérilité des substrats a été contrôlée après incubation à 20°C pendant 7 j sur milieu PDA de 25 grains de blé de chaque variété et de quelques grammes de son de blé.

Les substrats ont été divisés en autant de flacons de 15 g de grains et de 6 g de son de blé nécessaires à l'obtention d'un flacon par substrat, par date d'échantillonnage et par répétition biologique. Les substrats ont été inoculés à l'aide d'une solution titrée de spores de *F. graminearum* ( $2,5 \cdot 10^3$  spores.g<sup>-1</sup> de blé) obtenue par croissance du champignon en milieu liquide en présence de son de blé.

#### *I.3.1.2 Dosage de la production de mycotoxines*

Pour chaque date d'échantillonnage et chaque modalité, les mycotoxines produites par *F. graminearum* (TCT B/ZEA) ont été extraites à partir de 2 g de substrat et ont été dosées par HPLC (mode opératoire en annexe 7).

#### *I.3.1.3 Détermination de la quantité d'ADN fongique produite par qPCR*

La quantification par qPCR est basée sur une amplification de l'ADN fongique par PCR couplée à une détection de fluorescence. Le nombre de cycles de PCR nécessaire à la détection de la fluorescence, appelé seuil de détection, est lié au nombre initial de copies de la partie d'ADN ciblée présente dans l'échantillon. Une gamme étalon de quantités connues d'ADN permet de relier ce seuil à un nombre de copies d'ADN.

Dans le cas de la quantification de *F. graminearum*, la réaction de qPCR est basée sur l'amplification spécifique, à l'aide du couple de primers Fg16NF/Fg16NR, de la région d'ADN de *F. graminearum* décrite lors de la caractérisation moléculaire de la souche (paragraphe I.2).

#### I.3.1.3.1 Extraction de l'ADN fongique

Pour chaque date d'échantillonnage et chaque modalité, l'ADN contenu dans 1 g de substrat a été extrait (Mode opératoire en annexe 8).

#### I.3.1.3.2 Primers

Des amorces avec un niveau de purification optimal (amorces UltraPureGold™, Eurogentec S.A., Belgium) par rapport à celui des amorces utilisées pour la réaction de PCR classique ont été utilisées, permettant de réduire les bruits de fond de la réaction.

#### I.3.1.3.3 Obtention de la courbe standard

Le fragment spécifiquement amplifié par le couple d'amorce Fg16N/Fg16R a été cloné à l'aide du Kit pGEM®-T easy vector systems II (Promega, USA ; Mode opératoire en annexe 9). Après extraction et purification par le kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Germany, Mode opératoire en annexe 34), le plasmide a été linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *Sal I* (Promega, USA ; Mode opératoire en annexe 10). La concentration du plasmide linéarisé a été ajustée à  $10^9$  copies. $5\mu\text{l}^{-1}$  de fragment spécifique. Des dilutions successives ont permis d'obtenir une gamme allant de  $10^9$  à  $10^2$  copies.  $5\mu\text{l}^{-1}$ .

#### I.3.1.3.4 Réaction de qPCR

La technique, déjà décrite pour la quantification d'un nombre de copies d'ADN de *F. graminearum* à partir de matériel végétal (Brandfass and Karlovsky, 2006), et a été adaptée aux conditions propres de l'étude (Mode opératoire en deuxième partie de l'annexe 11).

### I.3.2 Détermination du chemotype de la souche par étude de la région d'ADN impliquée dans la production de mycotoxines

La production des TCT B chez *F. graminearum* est contrôlée par un cluster de gènes (Figure 2.3). L'identification moléculaire du chemotype de la souche est basée sur l'utilisation de couples d'amorces en multiplex/simplex qui ne répondent qu'en présence d'un chemotype bien particulier. Le gène *Tri13* permet de caractériser les chemotypes DON et NIV. Les gènes *Tri3* et *Tri12* permettent de caractériser les chemotypes 3-ADON, 15-ADON et NIV. L'ADN a été extrait et purifié comme précédemment (paragraphe I.2.1). Après la PCR, l'identification a été faite sur gel d'agarose grâce à une réponse du type présence/absence de bande aux tailles attendues (Mode opératoire en annexe 12).

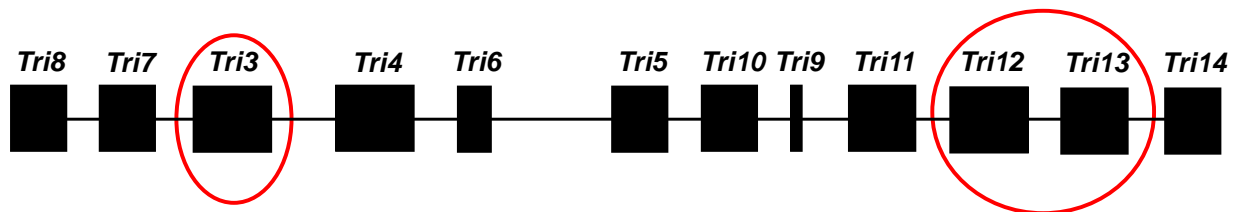


Figure 2.3 : Organisation du cluster de gènes régulant la production des TCT B (d'après Merhej et al., 2011)

## II Essais au champ

### II.1 Domaine expérimental d'Epoisses

Les essais au champ conduits au cours des campagnes 2008-09 et 2009-10 ont été réalisés sur le domaine d'Epoisses, unité expérimentale de l'INRA Dijon, 21120 Bretenières (5°05'E; 47°14'N). Le domaine est situé dans la plaine, à 15 km au sud de Dijon et constitue un exemple particulier de l'environnement et de l'agriculture pratiquée en Bourgogne. Le sol d'Epoisses est limono-argileux : 54% de limons, 38% d'argile, 8% de sable, 2,3% de matière organique, pH 8. Les précédents, anté-précédents et cultures adjacentes aux essais sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Années	Précédent	Anté-précédent	Parcelle adjacente par voix Est	Parcelle adjacente par voix Ouest
2008-2009	Avoine de printemps ( <i>Avena sativa</i> L.)	Betterave ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	Orge de printemps	Avoine de printemps
2009-2010	Moutarde de printemps ( <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern & Coss)	Orge d'hiver ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Maïs grain	Moutarde d'hiver

Tableau 2.1 : Historique de rotation des parcelles utilisées pour les essais au champ

### II.2 Mise en place des essais

Deux essais ont été conduits en parallèle :

- un essai scientifique dans lequel les différentes modalités d'intérêt ont été testées, l'essai Fusa ;
- un essai technique, conduit en mode conventionnel mais incluant des modalités différentes, ayant servi de contrôle technique, l'essai ITK.

II.2.1 Essai Fusa : test de la part relative des différentes sources d'inoculum dans le développement de la fusariose du blé

#### II.2.1.1 Mise en place de l'essai

Ce test a été répété sur deux ans, il portait le nom de Fusa09 la première année et de Fusa10 la seconde. Les modalités de cet essai ont été mises en place dans le but de tester la part relative des différentes sources d'inoculum dans le développement de la fusariose sur blé tendre d'hiver. Trois modalités ont été testées selon une distribution factorielle et répétées sur quatre blocs (définition de l'agencement des parcelles par le logiciel Statbox, Grimmersoft ; Figure en annexe 13). Les modalités testées ont été : *i*) trois variétés de blé différentes ; *ii*) inoculation ou non-inoculation au semis par *F. graminearum* ; *iii*) inoculation ou non-inoculation au stade deux nœuds du blé par *F. graminearum*. Le test comptait donc un total de 48 parcelles d'une taille 9m x 1,25m représentant l'ensemble des combinaisons possibles des trois modalités testées, chaque combinaison étant répétée quatre fois (Plans des essais Fusa09 et Fusa10 en annexe 14).



Chaque parcelle a été divisée en deux sous parcelles : l'une servant pour les notations, la seconde servant à déterminer le rendement. Chaque sous-parcelle contenait six lignes de semis dont les semences n'ont pas été enrobées avec des fongicides. Les dates de mise en place et de fin de l'essai Fusa sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Essai	Date semis	Densité semis	Date d'inoculation au stade deux nœuds,	Date de récolte
Fusa09	24 octobre 2008	400 grains.m <sup>-2</sup>	23 avril 2009	25 juillet 2009
Fusa10	20 octobre 2009	414 grains.m <sup>-2</sup>	26 avril 2010	19 juillet 2010

Tableau 2.2 : Dates de mise en place et de fin de l'essai Fusa

Les cultures de blé ont été menées selon un itinéraire technique conventionnel aux exceptions près suivantes : elles n'ont pas été traitées contre la fusariose ; elles ont reçu une irrigation de 40 mm le jour de l'inoculation à deux nœuds suivie d'une irrigation quotidienne de 6 ou 12 mm jusqu'au stade floraison du blé. Cette irrigation devait favoriser le développement de la maladie.

#### II.2.1.2 Blés utilisés

Trois variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) ont été utilisées sur cet essai : Apache, Charger et Maxwell. Ces variétés ont été choisies car elles présentent des niveaux différents de résistance à la fusariose de l'épi (Tableau 2.3). La variété Apache est tolérante ; les variétés Charger et Maxwell sont sensibles. La variété Maxwell a été retenue car elle est résistante à la septoriose des feuilles, maladie qui avait perturbé des essais préliminaires.

Variété	Tolérance à la fusariose de l'épi	Origine des semences Fusa09	Origine des semences Fusa10
Apache	7	Unité du Moulon, centre INRA de Gif-sur-Yvette (91190)	ITK09
Charger	3	Unité du Moulon, centre INRA de Gif-sur-Yvette (91190)	ITK09
Maxwell	2	Semencier Lemaire Desfontaines	Même semences que pour Fusa09

Tableau 2.3 : Sensibilité des trois variétés de blé à la fusariose de l'épi (source : Arvalis)

#### II.2.1.3 Inoculation des parcelles

Les parcelles ont été inoculées en utilisant des grains d'orge irradiés aux rayons gamma (5KGy, Ionisos, Dagneux, France) enrobés de la souche de *F. graminearum* MIAE00376. L'inoculum a été apporté à hauteur de 8 g de grains.m<sup>-2</sup>, dans la ligne de semis pour l'inoculation au stade semis, et à la surface du sol pour l'inoculation au stade deux nœuds (stade physiologique du blé : Zadoks 32 ; échelle en annexe 15 ;Zadoks et al., 1974).

II.2.2 Essai ITK : test de l'effet de différents itinéraires techniques ; test servant de contrôle négatif à l'essai Fusa

### II.2.2.1 Mise en place de l'essai

Ce test a été répété sur deux ans, il portait le nom de ITK09 la première année et de ITK10 la seconde. Cet essai a été mis en place dans le but de tester le comportement de différentes variétés de blé selon des itinéraires techniques différents, mais il a également servi de contrôle pour l'essai Fusa puisque les parcelles n'ont pas été inoculées au semis ou à deux nœuds et que les semences utilisées ont été enrobées de manière classique par des (0,4 l Austral<sup>®</sup> [fludioxonil 10 g.l<sup>-1</sup>] / 0,4 l Gaucho<sup>®</sup> [bitertanol 37.5 g.l<sup>-1</sup>] qsp 1 l, 1 cl de mélange pour 100 g de blé). Trois modalités ont été testées selon une distribution en split-plot et répétées sur quatre blocs (définition de l'agencement des parcelles par le logiciel Statbox, Grimmssoft, Figure en annexe 16). Les modalités testées ont été : *i*) trois variétés de blé différentes ; *ii*) irrigation ou non-irrigation des parcelles (facteur dominant du split-plot) ; *iii*) culture menée de manière intensive ou extensive (second facteur). Le test comptait donc un total de 48 parcelles d'une taille 9m x 1,25m représentant l'ensemble des combinaisons possibles des trois modalités testées, chaque combinaison étant répétée quatre fois (Plans des essais ITK09 et ITK10 en annexe 17). Chaque parcelle a été divisée en deux sous parcelles : l'une servant pour les notations, la seconde servant à déterminer le rendement. Chaque sous-parcelle contenait six lignes de semis. Les dates de mise en place et de fin de l'essai ITK sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Essai	Conduite	Date semis	Densité semis	Date de récolte
ITK09	Intensive	24 octobre 2008	300 grains.m <sup>-2</sup>	25 juillet 2009
	Extensive		180 grains.m <sup>-2</sup>	
ITK10	Intensive	20 octobre 2009	317 grains.m <sup>-2</sup>	19 juillet 2010
	Extensive		186 grains.m <sup>-2</sup>	

Tableau 2.4 : Dates de mise en place et de fin de l'essai ITK

### II.2.2.2 Blés utilisés

Trois variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) ont été utilisées sur cet essai : Apache, Charger et Ephoros. La variété Ephoros a été choisie en tant que témoin double tolérant à la fusariose de l'épi et à la septoriose des feuilles (Tableau 2.5).

Variété	Tolérance à la fusariose de l'épi	Origine des semences ITK09	Origine des semences ITK10
Apache	7	Unité du Moulon, centre INRA de Gif-sur-Yvette (91190)	ITK09
Charger	3	Unité du Moulon, centre INRA de Gif-sur-Yvette (91190)	ITK09
Ephoros	6	Semencier Agri Obtention	ITK09

Tableau 2.5 : Sensibilité des trois variétés de blé à la fusariose de l'épi (source Arvalis)

### II.2.3 Utilisation de l'essai ITK comme situation contrôle de l'essai Fusa

Les parcelles des variétés Apache et Charger menées selon les modalités irriguée et intensive correspondaient exactement aux conditions techniques utilisées dans l'essai Fusa. Ces parcelles n'ont pas été inoculées et leurs semences ont été enrobées par des fongicides avant d'être semées : elles ont servi, à ce titre, de contrôle négatif pour les parcelles de l'essai Fusa. De plus, elles ont permis d'appréhender l'impact de l'inoculum présent sur les semences dans le développement de la fusariose du blé.

## II.3 Notations de la maladie aux différents stades de croissance du blé

Les notations ont été faites *in situ*, sans prélèvement d'échantillons.

### II.3.1 Notations au stade levée du blé

#### II.3.1.1 Nombre de pieds levés

Les comptages ont été réalisés le 21 novembre 2008 (28 jours depuis le semis) la première année et le 1<sup>er</sup> novembre 2009 (20 jours depuis le semis) la seconde année (Z 11-12 ; Mode opératoire en annexe 18).

#### II.3.1.2 Estimation de la vigueur du blé par méthode visuelle

Cette notation a été basée sur l'attribution d'une note à chaque parcelle en fonction de la quantité de vert de celle-ci, c'est une notation qualitative. Elle a été faite le 19 novembre 2008 la première année (Z 11-12). Deux équipes de notateurs différentes ont fait cette notation visuelle permettant ainsi de réaliser une répétition sur la mesure (Mode opératoire en annexe 19). Le caractère subjectif (lié au notateur) de cette notation visuelle a conduit à son remplacement la seconde année par une notation reposant sur l'analyse d'image qui a été développée à cet effet (voir ci-dessous).

### II.3.2 Notations au stade deux feuilles du blé

#### II.3.2.1 Estimation de la vigueur de parcelle de blé au stade deux feuilles par analyse d'image

Cette notation n'a été faite que la seconde année, le 2 décembre 2009 (Z 12-13). Elle est basée sur l'analyse de la quantité de vert contenue sur une photographie de chaque parcelle (sélection de pixels en code TSL). Un gabarit a été utilisé pour prendre les parcelles en photo. Il a été fabriqué pour correspondre à la zone de comptage utilisée pour déterminer le nombre de levées. Il s'agissait d'une plaque percée en son milieu d'une fenêtre permettant de photographier trois sillons sur 70 cm. Cette plaque était peinte en bleu, couleur qui permettait un contraste suffisant avec le brun de la terre et le vert des plantules de blé, facilitant ainsi l'analyse d'image. Le logiciel d'analyse d'image utilisé a été Mesurim Pro (<http://pedagogie.ac-amiens.fr/svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm> ; Mode opératoire en annexe 20 et instruction pour l'utilisation du logiciel Mesurim Pro en annexe 21).

### *II.3.2.2 Estimation du taux de fusariose au stade deux feuilles du blé*

Cette notation consistait à déterminer le nombre de plantules touchées par la fusariose qui se manifeste par des brunissements au niveau des tiges. Trentes plantules ont été prélevées aléatoirement par parcelle. La notation a été réalisée entre le 27 novembre 2008 et le 04 décembre 2008 la première année (Z 12-13). Seules les 48 parcelles provenant de l'essai Fusa09 ont été notées (pas les parcelles provenant de l'ITK09). Cette notation a été faite le 1<sup>er</sup> et le 02 décembre 2009 la seconde année. Seule la moitié des parcelles a été notée : les blocs 3 et 4 dans l'essai ITK10, et les parcelles non-inoculées au stade deux nœuds dans l'essai Fusa10, la modalité inoculation au stade deux nœuds n'ayant pas encore été mis en place à ce stade de développement du blé (Mode opératoire et mise au point de la notation en annexe 22).

### *II.3.2.3 Isolements de souches fongiques responsables de la fusariose au stade deux feuilles du blé*

Des isolements ont été effectués à partir des plantes de blé portant des symptômes au cours des diverses notations pour confirmer la nature de l'agent responsable de ces symptômes.

Les parties des plants de blé présentant des nécroses ont été séparées du reste de la plante à l'aide d'une lame stérile, ont été désinfectées et mises en incubation de la même manière que des grains testés pour leur qualité sanitaire (Mode opératoire en annexe 23).

Aucun isolement n'a été fait à ce stade en 2009. Quatorze plantules de blé ont été testées à ce stade en 2010.

### II.3.3 Estimation de la quantité de vert des parcelles au stade épi 1 cm du blé

Cette notation a été réalisée pour l'ensemble des parcelles des deux essais lors des deux campagnes par analyse d'image. Le gabarit utilisé pour prendre les photos et la démarche opératoire ont été les mêmes que ceux utilisés lors de la notation au stade deux feuilles (Annexes 20 et 21). La prise de vue a été faite en mars 2009 pour la première année et le 29 mars 2010 pour la seconde année (Z 30).

### II.3.4 Notation de la maladie au stade deux nœuds du blé

#### *II.3.4.1 Estimation du taux de fusariose au stade deux nœuds du blé*

Cette notation consistait à déterminer le taux de maladie sur la partie basse des plantes de blé. Cinquante plantes ont été prélevées aléatoirement par parcelle. La maladie a été notée sur la gaine et la tige sous le premier nœud, sur le premier nœud et sur la gaine et la tige au-dessus du premier nœud. Cette notation a été réalisée sur l'ensemble des parcelles de l'essai Fusa09 entre le 04 et le 08 avril 2009, et sur l'ensemble des parcelles de l'essai ITK09 entre le 11 et le 15 avril 2009 (Z 32). En 2010, seule la moitié des parcelles a été notée, entre le 10 et le 12 mai 2010 : les blocs 1 et 2 dans l'essai ITK10 et les parcelles non-inoculées au stade deux nœuds dans l'essai Fusa10, la modalité inoculation au stade deux nœuds n'ayant été mise en place que 15 jours avant la notation. Pour contrôle, les parcelles de la variété Charger inoculées à deux nœuds ont aussi été prélevées et notées (huit parcelles supplémentaires).

La notation s'est affinée entre les deux campagnes : la première année, la réponse apportée était du type plante malade ou plante non-malade ; la seconde année, un classement en différents types de symptômes a été ajouté. Mode opératoire en annexe 24.

Les résultats et la discussion sur la pertinence et l'utilité de décomposer la notation en type de symptômes sont décrits en annexe 25. Seuls les résultats globaux, suffisamment explicatifs pour l'étude, sont présentés dans la section résultats du manuscrit de thèse.

#### *II.3.4.2 Isolements de souches fongiques responsables de la fusariose au stade deux nœuds du blé*

Dix-sept isolements ont été faits en 2009 à partir de rhizomes, tiges, gaines et nœuds de blé. Seize prélèvements ont été faits en 2010 à partir de tiges, gaines et nœuds de blé.

### II.3.5 Notation de la maladie au stade grain pâteux du blé

#### *II.3.5.1 Estimation du taux de fusariose au stade grain pâteux du blé*

Cette notation consistait à évaluer le taux de maladie sur les épis de blé en fonction de différents symptômes. Cinquante épis par parcelles ont été aléatoirement prélevés. La notation a été faite pour l'ensemble des parcelles des deux essais lors des deux années de test. L'essai Fusa09 a été noté deux fois la première année : un premier prélèvement a été fait le 16 juin 2009 et un second le 22 juin 2009 (Z 85). Ce deuxième prélèvement n'a finalement pas été exploité en raison du degré d'avancement de la maturité des blés. Un seul prélèvement a été fait dans l'essai ITK09, le 16 juin 2009. Les essais ITK10 et Fusa10 ont été prélevés les 21 et 23 juin 2010.

Le classement des symptômes s'est simplifié entre les deux années de notation en fonction des résultats de la première année, comme expliqué dans le mode opératoire en annexe 26.

Les résultats et la discussion sur l'évolution et la pertinence de la notation sont décrits en annexe 27. Seuls les résultats suffisamment explicatifs pour l'étude sont présentés dans la section résultats du manuscrit de thèse.

#### *II.3.5.2 Estimation du taux de fusariose au stade grain pâteux du blé par analyse d'image*

La technique utilisée a été semblable à celle permettant de déterminer la quantité de vert des parcelles (Annexe 20 et 21). Tous les épis d'une parcelle ont été numérisés au scanner sur un fond bleu (qui permettait un contraste optimal des couleurs) d'abord face recto, puis face verso. La quantité de rose (symptôme 1) ou de marron (reste des symptômes) contenue sur les photos a ensuite été déterminée à l'aide du logiciel Mesurim Pro.

#### *II.3.5.3 Isolements de souches fongiques responsables de la fusariose au stade grain pâteux du blé*

Vingt-trois isolements ont été faits en 2009 à partir de gaines et épis de blé. Vingt-sept isolements ont été faits en 2010 à partir d'épis de blé.

### II.3.6 Notations au stade récolte

#### II.3.6.1 Détermination des composantes du rendement

Les parcelles ont été récoltées le 25 Juillet 2009 la première année et le 19 Juillet 2010 la seconde année. Le rendement a été déterminé par pesée des grains récoltés dans chaque parcelle. Les poids de mille grains ont été déterminés par utilisation d'un compteur à grains Contador et par pesée. Le poids spécifique des grains (mesure de la densité du grain établie en pesant un volume connu de grain) a été déterminé à l'aide d'un appareil InfraTec.

#### II.3.6.2 Détermination du taux de grains de blé fusariés

Cette notation a permis d'estimer le taux de grains fusariés au stade récolte par le classement des grains en différentes catégories selon leur aspect (grains roses, ridés, grains mouchetés, grains germés et grains sains).

Lors de la récolte, les petits grains passent à travers le tamis de la moissonneuse et retournent au champ. L'une des raisons de la petite taille de ces grains est le fait qu'ils soient fusariés. Cet aspect a été appréhendé la seconde année par analyse d'image. Pour chaque parcelle, un échantillon de grains récoltés à la moissonneuse (théoriquement sans petits grains) et un échantillon de grains récoltés par battage manuel (contenant théoriquement également les petits grains) ont été classés en groupes basés sur leur surface après numérisation des lots et mesure par le logiciel Mesurim Pro. Les effectifs des groupes ont ensuite été comparés dans le but de déterminer la quantité de grains fusariés retournant au champ (Mode opératoire en annexe 28).

### II.3.7 Qualité sanitaire des grains de blé semés et récoltés dans les essais

#### II.3.7.1 Taux de contamination fongique des grains de blé

Cette notation a été faite afin d'estimer à la fois la dose d'inoculum apportée par les grains dans les essais et la quantité d'inoculum présente sur les grains récoltés. Seuls les *Fusarium* et *Microdochium* ont été notés. Les variétés Apache, Charger et Maxwell semées dans les essais ITK09 et Fusa09 ont été testées ainsi que les grains de la variété Charger enrobées par le fongicide et ces mêmes graines de Charger désenrobées par un lavage de 10 min dans de l'eau stérile avec une agitation manuelle.

Après les récoltes 2009 et 2010, ce test a été réalisé sur les parcelles d'Apache inoculées et non-inoculées à deux nœuds, sur les parcelles de Charger inoculées et non-inoculées à deux nœuds pour les essais Fusa et sur les parcelles d'Apache et Charger irriguées et intensives pour les essais ITK. Chacune de ces modalités représentait huit parcelles dont les grains ont été rassemblés et mélangés avant d'effectuer le contrôle sanitaire (Mode opératoire en annexe 23).

#### II.3.7.2 Taux de contamination des grains de blés par des mycotoxines

Comme précédemment (paragraphe I.3.1), les mycotoxines (DON, 3- et 15-ADON, NIV et ZEA) classiquement produites par le complexe de *Fusarium* sp. ont été recherchées et

quantifiées par HPLC (Mode opératoire en annexe 7) dans les grains récoltés dans toutes les parcelles des essais Fusa09 et Fusa10. Concernant les essais ITK09 et ITK10, seuls les grains provenant des parcelles des modalités Apache et Charger menées de manière irriguées et intensives ont été testés. Un exemple de chromatogramme obtenu grâce aux standards et d'un autre obtenu après dosage dans les grains d'une des parcelles de l'essai sont donnés en annexe 29.

#### **II. 4 Acquisition des données météorologiques**

Les données météorologiques concernant la zone géographique sur laquelle ont été mis en place les essais lors des deux années ont été fournies par la base de données Climatik, gérée par l'unité Agroclim (centre INRA d'Avignon, 84914 Avignon). Des données simples, relatives à la température et aux précipitations ont été collectées, mais aussi des données plus complexes combinant à la fois température et humidité (par exemple, somme des heures combinant à la fois une humidité supérieure à 80% et une température supérieure à 15°C).

#### **II.5 Analyse statistique des résultats**

Les résultats des notations de l'essai Fusa ont été traités par analyse de variance (ANOVA) complétée par un test de comparaison par paires de Newman-Keuls avec un risque  $\alpha$  de 5% à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft). Les variables indépendantes testées ont été l'inoculation au semis, l'inoculation à deux nœuds, la variété, l'effet bloc et l'année de test.

Les résultats de l'essai ITK ont été traités de la même manière avec l'irrigation, le type de conduite, la variété, l'effet bloc et l'année comme variables indépendantes.

Les modalités comparables des deux essais ont été confrontées par comparaison de moyennes.

Les corrélations entre les variables étudiées ont été établies par le calcul d'un coefficient de corrélation de Pearson.

#### **II. 6 Construction d'une base de données relative aux essais au champ**

Afin de compiler, organiser et extraire les informations générées au cours des deux années d'essais, une base de données a été construite à l'aide du logiciel Access (Microsoft® Office). Cette base inclus les modalités mises en place dans les essais Fusa et ITK, les résultats des notations effectuées au champ, les informations relatives au contexte pédoclimatique des essais, les résultats des isollements effectués à partir des grains de blé et des symptômes mais aussi des liens vers les photographies prises au cours des deux années d'étude (Structure de la base en annexe 30).

### **III Identification des souches fongiques isolées**

L'identification des souches fongiques isolées à partir de grains (états sanitaires, paragraphe II.3.7.1) ou de matériel végétal (isolement de symptômes, paragraphe II.3.2.3) a été faite à partir de l'étude des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) éventuellement combinée à une identification moléculaire.

### III.1 Identification morphologique des souches fongiques isolées

L'identification morphologique, macroscopique et microscopique, des souches isolées a été menée de la même manière que la caractérisation de la souche de *F. graminearum* MIAE00376 (paragraphe I.1).

### III.2 Identification moléculaire des souches isolées

Cette identification a permis de compléter l'identification morphologique quand celle-ci ne suffisait pas à définir l'espèce isolée. Elle a été basée sur l'extraction de l'ADN fongique à partir d'une culture pure sur boîte de Petri. Deux stratégies ont ensuite été appliquées selon les cas de figure rencontrés :

- l'identification morphologique s'est révélée non concluante : l'ADN extrait a été amplifié par PCR en ciblant des portions d'ADN d'intérêt phylogénétique (ITS, *tef-1 $\alpha$* ), puis l'amplifiat a été séquencé et aligné sur les bases de données *ad hoc* ;
- l'identification morphologie a permis de restreindre les hypothèses à deux ou trois espèces proches : l'ADN extrait a été amplifié par PCR en ciblant des portions d'ADN spécifiques. La présence ou l'absence sur gel d'agarose d'une bande à la taille attendue a permis l'identification.

#### III.2.1 Extraction et purification de l'ADN fongique

La technique utilisée a été celle déjà mise en œuvre lors de la caractérisation moléculaire de la souche *F. graminearum* MIAE00376 (paragraphe I.2.1.1 et I.2.1.2 ; Mode opératoire en annexe 1).

#### III.2.2 Identification des souches isolées par amplification d'une région génomique d'intérêt phylogénétique

La technique utilisée a été celle déjà mise en œuvre lors de la caractérisation moléculaire de la souche *F. graminearum* MIAE00376 en privilégiant l'amplification de la région ITS dans un premier temps, et en utilisant dans un second temps la région *tef-1 $\alpha$*  si la région ITS n'avait pas permis de conclure (paragraphe I.2.2 ; Modes opératoires en annexe 2 et 3).

#### III.2.3 Identification des souches isolées par amplification d'une région génomique spécifique

Cette identification a été basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques. Elle n'a donc pu être efficace que si l'étude morphologique avait donné une idée assez précise de l'espèce à identifier. Des amorces spécifiques ont été décrites dans la littérature pour l'ensemble des espèces impliquées dans la fusariose des céréales. L'ADN a été extrait et purifié comme expliqué précédemment (paragraphe I.2.1). Après amplification par PCR, l'identification a été faite sur gel d'agarose grâce à une réponse du type présence/absence de bande de taille prédéfinie : la PCR ne répond que si le couple d'amorces utilisé correspond bien à l'espèce de la souche étudiée. La technique d'amplification a été celle déjà mise en œuvre lors de la



caractérisation de la souche de *F. graminearum* MIAE00376 (paragraphe I.2.3), en utilisant le couple d'amorces correspondant à l'espèce ciblée (Mode opératoire en annexe 4).

## IV Dynamique de population de *F. graminearum* en microcosmes

L'expérimentation avait pour but de tester le développement saprotrophe de *F. graminearum* dans le sol, nu ou complétement avec des résidus de culture, en fonction de différents facteurs : le facteur biotique en utilisant du sol désinfecté ou du sol naturel ; le facteur trophique en utilisant différents types de résidus. Le développement du champignon a été suivi sous forme de cinétique avec trois répétitions biologiques indépendantes par modalité et par temps de prélèvement. La quantité de *F. graminearum* a été déterminée par qPCR. Toutes les études ont été menées à 20°C. Cette température représentait un compromis entre les conditions optimales de développement de *F. graminearum* et les conditions effectivement observables au champ. Au préalable, une expérience a permis de vérifier si la technique de qPCR était comparable qualitativement à une technique classique de dénombrement sur boîte de Petri.

### IV.1 Choix des conditions d'étude

#### IV.1.1 Souche fongique et sol

Pour se rapprocher au maximum des conditions rencontrées lors de l'étude menée au champ, la souche de *F. graminearum* MIAE00376 a été utilisée pour les inoculations.

L'inoculum fongique a été produit sous forme d'un mélange de divers types de propagules pour la comparaison entre dénombrement sur boîtes de Petri et qPCR alors que des suspensions de spores seules ont été utilisées pour suivre les dynamiques de population par qPCR en fonction des différentes modalités (paragraphe IV.2). Les propagules ont été produites sur poudre de millet stérile (*Panicum miliaceum*) inoculée par *F. graminearum* (Mode opératoire en annexe 31) afin d'apporter environ 100 cfu.g<sup>-1</sup> de sol (colony forming unit). La concentration en inoculum de la poudre de millet a été déterminée par la méthode de suspension dilution d'un aliquot de poudre de millet dans du milieu Komada en surfusion (42°C) en boîte de Petri. La quantification du nombre de colonies de *F. graminearum*.g<sup>-1</sup> de poudre de millet a été faite sur la base d'un comptage des cfu après incubation des boîtes à 20°C (Mode opératoire en annexe 32).

Les suspensions de spores ont été obtenues par croissance dans un milieu liquide complétement avec du son de blé (Mode opératoire en annexe 11). En tant que contrôle, l'ADN contenu dans des dilutions de spores allant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>6</sup> spores.ml<sup>-1</sup> a été extrait et dosé par qPCR. L'ADN contenu dans 0,1, 0,2, 0,5 et 1 g de mycélium a été extrait et dosé. Le mycélium a été obtenu par croissance en milieu liquide LB (Luria-Bertani) pendant 7 jours à 25 °C à une agitation de 150 tr.min<sup>-1</sup>. Une pelote de mycélium a été récupérée et essorée en la pressant entre l'intérieur d'un couvercle de boîte de Petri et l'extérieur d'un fond de boîte de Petri. Le mycélium a ensuite été fractionné aux poids correspondant. Pour chaque concentration de spores et chaque poids de mycélium, l'ADN de trois répétitions biologiques a été extrait et dosé.

Pour évaluer la croissance radiale de la souche MIAE00376 sur les différents résidus de culture, chaque type de résidu broyé et tamisé à 200  $\mu\text{m}$  a été incorporé à raison de 25  $\text{g.l}^{-1}$  à de l'eau gélosée en surfusion (20  $\text{g.l}^{-1}$  d'agarose autoclavé pendant 20 min à 120 °C). Le milieu a été coulé en boîtes de Petri de 9 mm de diamètre. Les boîtes contenant les différents résidus incorporés à la gélose, ainsi qu'un contrôle ne comportant que de la gélose ont été inoculées en leur centre avec 10  $\mu\text{l}$  d'une suspension de spores de *F. graminearum* MIAE00376 à  $10^3$  spores. $\text{ml}^{-1}$ . Chaque jour, la croissance fongique a été mesurée selon deux axes perpendiculaires. Pour chaque modalité (les six types de résidus et le contrôle sur gélose seule), cinq répétitions ont été faites.

#### IV.1.2 Sol

Le sol testé a été celui provenant du domaine expérimental d'Epoisses. Le sol a été tamisé à 2 mm et placé dans des pots en aluminium à raison de 40 g de sol par pot, constituant les microcosmes destructibles nécessaires à la conduite de trois répétitions biologiques indépendantes par modalité et par date d'échantillonnage. Les microcosmes de sol ont été stérilisés à l'autoclave lorsque les modalités le nécessitaient (Mode opératoire en annexe 33).

#### IV.1.3 Résidus

Les résidus utilisés pour l'expérimentation ont été le blé (*T. aestivum* L. ssp. *aestivum*), substrat de référence de l'étude ; le maïs (*Zea mays* L.) et le colza (*Brassica napus* L.), plantes régulièrement utilisées dans les rotations « classiques », le maïs étant aussi un hôte de la maladie ; la luzerne (*Medicago sativa* L.), plante riche en azote ; la moutarde (*Brassica juncea* L.), souvent utilisée en tant que culture intermédiaire en Bourgogne et productrice de sinigrine. La sinigrine est un glucosinolate, famille de composés connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Il était donc intéressant de tester si la sinigrine avait un effet sur le développement saprotrophe de *F. graminearum*. Deux moutardes différentes ont été testées, bien que les teneurs en sinigrine n'aient pas été dosées. Les résidus utilisés ont été fournis par l'unité expérimentale d'Epoisses : les résidus (pailles) de blé et de colza provenaient de la récolte de juillet 2009, ceux de maïs (essentiellement des feuilles) de la récolte de novembre 2009, la luzerne et les moutardes provenaient de plantes entières en croissance prélevées en octobre 2010.

Les résidus de blé, maïs et colza étaient secs : ils ont pu être broyés sans traitement au préalable. Pour la luzerne et les moutardes, des plantes entières ont été utilisées : elles ont du être séchées à l'étuve (35 °C) pendant trois jours avant d'être broyées et désinfectées. Les résidus ont été broyés à l'aide d'un moulin à café électrique. Ils ont été tamisés à 200  $\mu\text{m}$ . Tous les résidus utilisés ont été désinfectés au préalable par rayons gamma (5KGy) (Ionisos, Dagneux, France). Un gramme de résidus par microcosme a été apporté. Cette quantité a été choisie car elle correspond à la réalité agronomique (en termes de résidus. $\text{ha}^{-1}$ ). Le mélange du sol et des résidus a été assuré par une agitation manuelle de 30 s.

## IV.2 Inoculation des microcosmes

Pour chaque date d'analyse, trois microcosmes destructifs ont été préparés par modalité. Pour la comparaison qualitative entre la technique classique de dénombrement sur boîte de Petri et la technique de quantification par qPCR, chaque microcosme a été inoculé avec une quantité de poudre de millet assurant la présence d'environ 100 cfu de *F. graminearum*.g<sup>-1</sup> de sol. L'humidité du sol a été ajustée à 80% de la Capacité au Champ (CAC) de ce sol grâce à de l'eau stérile. Pour les dynamiques de population, l'humidité du sol a été ajustée à 80% de la CAC avec l'apport de la suspension titrée de macroconidies de *F. graminearum* afin d'obtenir une concentration de 10<sup>3</sup> spores.g<sup>-1</sup> de sol (Mode opératoire en annexe 11). Tous les microcosmes ont été placés à 20°C pour quatre semaines, six semaines ou trois mois en fonction des modalités.

IV.2.1 Evaluation de la relation existant entre le dénombrement sur boîtes de Petri de la quantité de propagules de *F. graminearum* dans le sol et la quantification moléculaire du nombre de copies d'ADN de *F. graminearum* dans le sol

Les modalités testées ont été : *i*) sol désinfecté sans résidus ; *ii*) sol naturel sans résidus. A chaque date d'échantillonnage, trois microcosmes ont été aléatoirement choisis parmi l'ensemble des microcosmes correspondant à chaque modalité. Pour chacun d'eux, cinq sous-échantillons de 5 g de sol ont été utilisés pour le dénombrement sur boîte de Pétri et cinq sous-échantillons de 1 g de sol ont été conservés à -20 °C pour une extraction d'ADN. L'expérience a été menée sur quatre semaines.

IV.2.2 Evaluation du rôle des facteurs biotique et trophique dans la dynamique de population de *F. graminearum*

Les modalités testées ont été : *i*) sol désinfecté sans résidus ; *ii*) sol naturel sans résidus ; *iii*) sol désinfecté avec résidus de blé ; *iv*) sol naturel avec résidus de blé. A chaque date d'échantillonnage, trois microcosmes ont été aléatoirement choisis parmi l'ensemble des microcosmes correspondant à chaque modalité. Cinq sous-échantillons de 1 g de sol ou de mélange sol/résidus ont été conservés à -20 °C pour une extraction d'ADN. La durée de l'incubation a été de dix semaines.

L'étude du rôle du facteur biotique a été complétée par des modalités en présence de paille de blé seule (sans sol). Les modalités testées ont été : *i*) paille désinfectée ; *ii*) paille non désinfectée.

IV.2.3 Evaluation du rôle de l'origine des résidus dans la dynamique de population de *F. graminearum*

Les modalités testées ont été : *i*) sol sans résidu ; *ii*) sol avec résidus de blé ; *iii*) sol avec résidus de maïs (feuilles essentiellement) ; *iv*) sol avec résidus de colza ; *v*) sol avec résidus de luzerne ; *vi*) sol avec résidus de moutarde de la première variété ; *vii*) sol avec résidus de moutarde de la seconde variété. Les échantillonnages et sous-échantillonnage ont été faits comme pour les modalités précédentes. La durée de l'incubation a été de dix semaines pour les

modalités sans résidus, avec résidus de blé, de maïs et de colza et de six semaines pour les modalités avec résidus de luzerne et de moutarde.

### IV.3 Quantification de *F. graminearum*

#### IV.3.1 Par une technique classique de dénombrement sur boîte de Petri

La technique utilisée a été celle du dénombrement de la quantité de cfu sur boîte de Petri déjà décrite pour la quantification de l'inoculum présent dans la poudre de millet (paragraphe IV.1.1 ; Mode opératoire en annexe 32).

#### IV.3.2 Par qPCR

##### IV.3.2.1 Extraction de l'ADN

Pour chaque modalité et chaque date d'échantillonnage, l'ADN contenu dans le sol ou dans le mélange sol/résidus a été extrait à partir d'un des cinq sous-échantillons placé à -20°C. La technique utilisée a été la même que celle mise en œuvre lors de l'extraction d'ADN fongique à partir de grains de blé (paragraphe I.3.1.3.1 ; Mode opératoire en annexe 8).

Dans le cas des modalités en présence de paille seule, l'ADN a été extrait à l'aide du kit DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Germany ; mode opératoire en annexe 34).

##### I.3.2.2 Primers, courbe standard et réaction de qPCR

La technique utilisée a été la même que lors de la détermination du chemotype de *F. graminearum* MIAE00376 par croissance sur grains de blé (paragraphe I.3.1.3 ; Mode opératoire en annexe 11).

### IV.4 Analyse chimique des résidus

La composition chimique des différents types de résidus utilisés a été analysée par le laboratoire SAS (Ardon, France). L'analyse a été faite en double pour chaque type de résidu.

### IV.5 Analyse statistique des résultats

Les résultats de la croissance radiale de *F. graminearum* sur milieu gélosé ont été traités par analyse de variance (ANOVA) complétée par un test de comparaison par paires de Newman-Keuls avec un risque  $\alpha$  de 5% à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft). Les variables indépendantes testées ont été le type de résidu et la date de mesure.

Les résultats de la dynamique de population de *F. graminearum* en microcosmes ont été traités de la même manière avec la désinfection du sol, le type de résidu incorporé et la date d'échantillonnage comme variables indépendantes.

Les techniques de dénombrement sur boîtes de Pétri et de PCR quantitative ont été comparées par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson.



# **Chapitre 3 Caractérisation de la souche de *F. graminearum* MIAE00376**

## I Caractérisation morphologique de la souche de *F. graminearum* MIAE00376

### I.1 Caractérisation macroscopique

Sur milieu PDA la croissance de la souche est rapide (boîte de Petri de 9 cm de diamètre recouverte en 10 jours) avec la production d'un mycélium dense et aérien (cotonneux). Le mycélium est blanc au recto (mycelium aerien) et d'une couleur jaune à fauve au verso (mycelium en contact avec le milieu) quand la culture est jeune. La couleur du verso tourne au rouge carmin lorsque la culture est plus âgée (Figure 3.1).

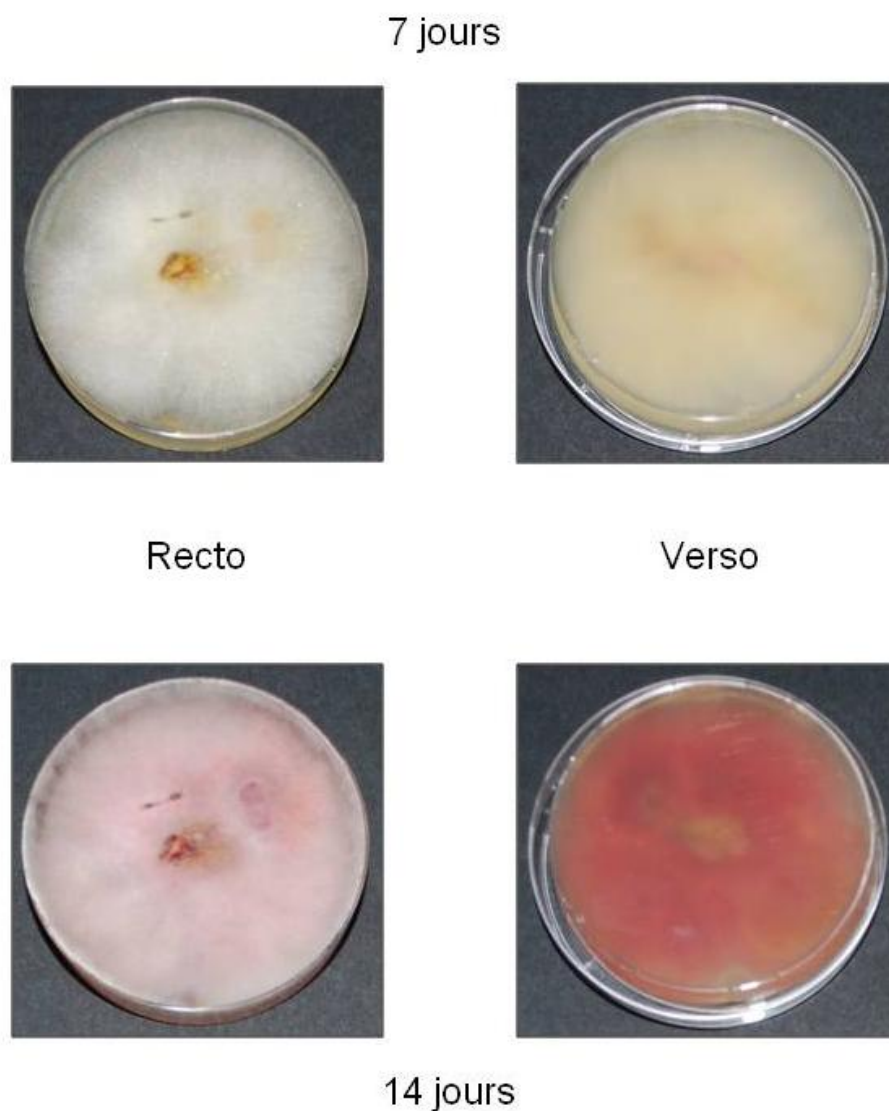


Figure 3.1 : Croissance de *F. graminearum* sur milieu PDA

## I.2 Caractérisation microscopique

La souche ne produit pas de microconidie. La production de macroconidies par les conidiophores de type monophialide, ramifiée ou non, est importante (Figure 3.2). Les macroconidies sont divisées en 6 à 7 loges. Elles sont peu incurvées et leur face dorsale est plus incurvée que leur face ventrale. La cellule basale a distinctement une forme de pied. La cellule apicale a une forme de crochet (Figure 3.3).

L'apparition de la forme parfaite de la souche exige des conditions particulières, elle n'a pas été observée. Elle se caractérise par la production d'ascospores à l'intérieur de périthèces.

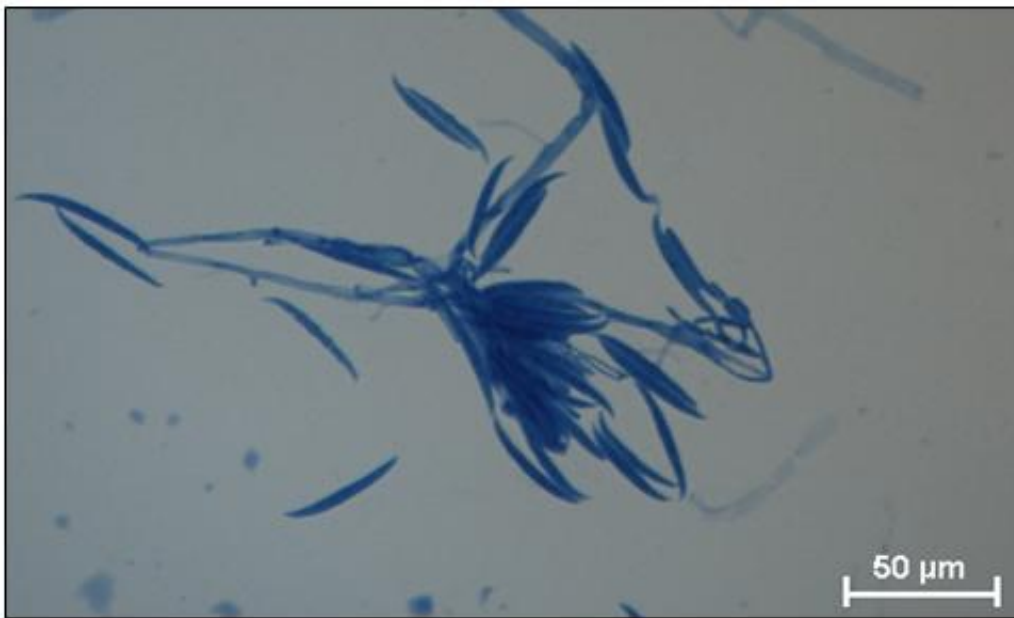


Figure 3.2 : Production de macroconidies par les monophialides

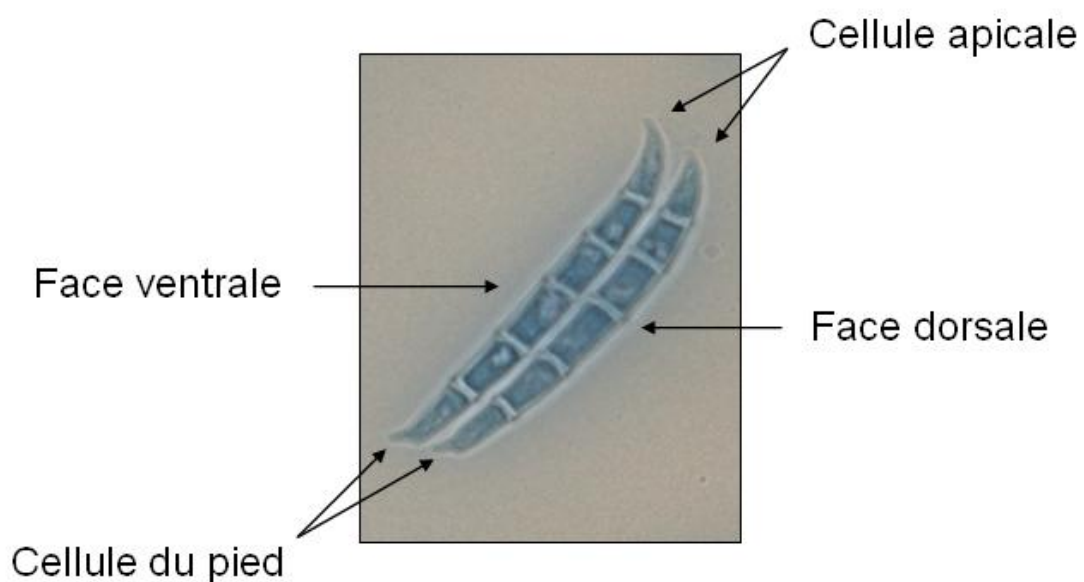


Figure 3.3 : Macroconidies produites par *F. graminearum*



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">JF461110.1</a>	Uncultured fungus clone ITSGutPd47 18S ribosomal RNA gene, partia	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">JF461098.1</a>	Uncultured fungus clone ITSGutPa28 18S ribosomal RNA gene, partia	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ832817.1</a>	Gibberella zeae isolate LH184 18S ribosomal RNA gene, partial sequer	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ176433.1</a>	Gibberella zeae strain LYF027 18S ribosomal RNA gene, partial sequer	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ630964.1</a>	Fusarium sp. 1 TMS-2011 voucher MS7p50-21 18S ribosomal RNA qe	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">HM805047.1</a>	Fusarium culmorum isolate WF3 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">GU327636.1</a>	Gibberella zeae strain ATCC MYA-4620 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ210616.1</a>	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56617-15-30-S internal transcribed s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ210615.1</a>	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 57001-1-2-S internal transcribed spa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ210613.1</a>	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 282b-3-132-S-b internal transcribed	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ210610.1</a>	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56654-8-3-E internal transcribed spa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ210608.1</a>	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56796-18-8-UL internal transcribed s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ210607.1</a>	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56617-16-45-E internal transcribed s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ537074.1</a>	Fusarium culmorum isolate South-west006 18S ribosomal RNA gene,	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">GQ241280.1</a>	Fusarium culmorum strain KUC5013 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ466715.1</a>	Gibberella sp. UFMGCB_536 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ466712.1</a>	Gibberella sp. UFMGCB_533 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240316.1</a>	Fusarium sp. NRRL 45833 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240315.1</a>	Fusarium vorosii strain NRRL 45800 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240314.1</a>	Fusarium sp. NRRL 45795 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240313.1</a>	Fusarium vorosii strain NRRL 45790 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240312.1</a>	Fusarium sp. NRRL 45681 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240311.1</a>	Fusarium sp. NRRL 45665 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240310.1</a>	Fusarium aethiopicum strain NRRL 46738 18S ribosomal RNA gene, pa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240309.1</a>	Fusarium aethiopicum strain NRRL 46726 18S ribosomal RNA gene, pa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240308.1</a>	Fusarium aethiopicum strain NRRL 46722 18S ribosomal RNA gene, pa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240307.1</a>	Fusarium aethiopicum strain NRRL 46718 18S ribosomal RNA gene, pa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">FJ240306.1</a>	Fusarium aethiopicum strain NRRL 46710 18S ribosomal RNA gene, pa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">EU552131.1</a>	Gibberella sp. CBS 122679 culture-collection CBS:122679 18S ribosor	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">EF687909.1</a>	Fusarium cf. culmorum Vega487 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">EF505482.1</a>	Uncultured endophytic fungus clone 37-6-94 18S ribosomal RNA gen	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459870.1</a>	Fusarium culmorum strain NRRL25475 18S ribosomal RNA gene, partia	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459868.1</a>	Fusarium lunulosporum strain NRRL13393 18S ribosomal RNA gene, pa	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459866.1</a>	Fusarium sp. NRRL 38208 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459865.1</a>	Fusarium sp. NRRL 37605 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459864.1</a>	Fusarium sp. NRRL 38405 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459863.1</a>	Fusarium sp. NRRL 38380 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459862.1</a>	Fusarium sp. NRRL 36905 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459860.1</a>	Fusarium brasiliense strain NRRL 31238 18S ribosomal RNA gene, parti	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459859.1</a>	Fusarium cortaderiae strain NRRL31185 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459858.1</a>	Fusarium cortaderiae strain NRRL31171 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459857.1</a>	Fusarium cortaderiae strain NRRL31205 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459856.1</a>	Fusarium cortaderiae strain NRRL29297 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459855.1</a>	Fusarium cortaderiae strain NRRL29306 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459854.1</a>	Fusarium acaciae-mearnsii strain NRRL34207 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459853.1</a>	Fusarium acaciae-mearnsii strain NRRL34461 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459852.1</a>	Fusarium acaciae-mearnsii strain NRRL34197 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459851.1</a>	Fusarium acaciae-mearnsii strain NRRL26755 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459850.1</a>	Fusarium acaciae-mearnsii strain NRRL26754 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459849.1</a>	Fusarium acaciae-mearnsii strain NRRL26752 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459848.1</a>	Fusarium boothii strain NRRL29105 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459847.1</a>	Fusarium boothii strain NRRL29020 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459846.1</a>	Fusarium boothii strain NRRL29011 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459845.1</a>	Fusarium boothii strain NRRL26916 18S ribosomal RNA gene, partial s	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459844.1</a>	Fusarium mesoamericanum strain NRRL29148 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459843.1</a>	Fusarium mesoamericanum strain NRRL25797 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459842.1</a>	Fusarium meridionale strain NRRL28723 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459841.1</a>	Fusarium meridionale strain NRRL29010 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459840.1</a>	Fusarium meridionale strain NRRL28436 18S ribosomal RNA gene, part	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459839.1</a>	Fusarium austroamericanum strain NRRL28585 18S ribosomal RNA ger	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459837.1</a>	Fusarium austroamericanum strain NRRL2903 18S ribosomal RNA gene	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459836.1</a>	Fusarium asiaticum strain NRRL28720 18S ribosomal RNA gene, partia	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459833.1</a>	Fusarium asiaticum strain NRRL6101 18S ribosomal RNA gene, partial	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459831.1</a>	Gibberella zeae strain NRRL28439 18S ribosomal RNA gene, partial se	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459830.1</a>	Gibberella zeae strain NRRL38371 18S ribosomal RNA gene, partial se	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459829.1</a>	Gibberella zeae strain NRRL38393 18S ribosomal RNA gene, partial se	874	874	100%	0.0	100%
<a href="#">DQ459828.1</a>	Gibberella zeae strain NRRL38383 18S ribosomal RNA gene, partial se	874	874	100%	0.0	100%

Figure 3.4 : Alignement de la séquence ITS de la souche *F. graminearum* MIAE00376 par le logiciel BLAST sur les séquences répertoriées sur le site NCBI

Les caractéristiques morphologiques de la souche MIAE00376, autant macroscopiques que microscopiques, correspondent à celles attendues pour une souche de *F. graminearum* (Leslie and Summerell, 2006; Nelson et al., 1983).

## II Caractérisation moléculaire de la souche de *F. graminearum* MIAE00376

### II.1 Etude la région ITS de la souche

Après extraction de l'ADN et amplification par PCR de la région ITS en utilisant le couple d'amorces ITS1F/ ITS4 (Gardes and Bruns, 1993; White et al., 1990), l'amplifié a été séquencé.

Le consensus suivant, de 473 pb, a été obtenu (soumission à la GeneBank® en cours) :

```
>CCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTATGTT
GCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCCGCAGGAACCCCTAAACTC
TGTTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTG
TTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCAGCTTGGTGTTGGGAGCTGCAGTCCTGCTGCACT
CCCCAAATACATTGGCGGTCACGTTCGAGCTTCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTG
GTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA
```

Cette séquence a été alignée sur les séquences contenues dans GeneBank® (Figure 3.4). La séquence s'aligne sur toute sa longueur avec 100% d'homologie pour plusieurs espèces de *Fusarium* : l'espèce attendue, *Gibberella zeae* (forme parfaite de *F. graminearum*) ; des espèces appartenant au clade *F. graminearum*, pratiquement impossible à distinguer sur le plan morphologique comme *F. aethiopicum*, *F. acaciae-mearnsii*... (O'Donnell et al., 2008; O'Donnell et al., 2004) ; mais aussi des espèces proches morphologiquement mais distinguables comme *F. culmorum* (également impliquée dans la FHB). La région ITS seule n'est pas assez discriminante pour caractériser clairement *F. graminearum* (Geiser et al., 2004). Une seconde région d'ADN, plus discriminante, a donc été utilisée pour caractériser la souche : la région du gène du facteur d'élongation de la traduction 1 alpha (*tef-1 $\alpha$*  ; O'Donnell et al., 1998).

### II.2 Etude la région *tef-1 $\alpha$* de la souche

La séquence de cette portion d'ADN a été obtenue de la même manière que celle des ITS, mais en utilisant le couple d'amorces EF1/EF2 (Geiser et al., 2004).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">GU370497.1</a>	Gibberella zeae isolate CS3005 translation elongation factor-1 alpha-	<a href="#">1253</a>	1253	99%	0.0	99%
<a href="#">GQ848545.1</a>	Gibberella zeae isolate 2-1 translation elongation factor 1 alpha (tef)	<a href="#">1243</a>	1243	98%	0.0	99%
<a href="#">JF278571.1</a>	Gibberella zeae strain LMSA 1.09.105 translation elongation factor 1	<a href="#">1242</a>	1242	98%	0.0	99%
<a href="#">JF278591.1</a>	Gibberella zeae strain LMSA 1.09.129 translation elongation factor 1	<a href="#">1229</a>	1229	97%	0.0	99%
<a href="#">GU116585.1</a>	Gibberella zeae isolate M02-7035S-2 DCPA translation elongation fac	<a href="#">1225</a>	1225	97%	0.0	99%
<a href="#">JF278572.1</a>	Gibberella zeae strain LMSA 1.09.106 translation elongation factor 1	<a href="#">1221</a>	1221	96%	0.0	99%
<a href="#">FJ939690.1</a>	Gibberella zeae isolate 152 translation elongation factor 1 alpha gene	<a href="#">1219</a>	1219	97%	0.0	99%
<a href="#">FJ939689.1</a>	Gibberella zeae isolate 163 translation elongation factor 1 alpha gene	<a href="#">1219</a>	1219	97%	0.0	99%
<a href="#">FJ939687.1</a>	Gibberella zeae isolate 109 translation elongation factor 1 alpha gene	<a href="#">1219</a>	1219	97%	0.0	99%
<a href="#">JF278573.1</a>	Gibberella zeae strain LMSA 1.09.107 translation elongation factor 1	<a href="#">1218</a>	1218	96%	0.0	99%
<a href="#">FJ939688.1</a>	Gibberella zeae isolate 36 translation elongation factor 1 alpha gene,	<a href="#">1214</a>	1214	97%	0.0	99%
<a href="#">GU370499.1</a>	Gibberella zeae isolate F10102005 translation elongation factor-1 alp	<a href="#">1208</a>	1208	98%	0.0	98%
<a href="#">GU370498.1</a>	Gibberella zeae strain ATCC 60309 translation elongation factor-1 alp	<a href="#">1208</a>	1208	96%	0.0	99%
<a href="#">HQ889159.1</a>	Fusarium boothii strain 131 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889157.1</a>	Fusarium boothii strain 268 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889154.1</a>	Fusarium boothii strain 158 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889151.1</a>	Fusarium boothii strain 166 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889150.1</a>	Fusarium boothii strain 182 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889148.1</a>	Fusarium boothii strain 299a translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889147.1</a>	Fusarium boothii strain 264 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889144.1</a>	Fusarium boothii strain 205a translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889143.1</a>	Fusarium boothii strain 162 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889142.1</a>	Fusarium boothii strain 180a translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HQ889141.1</a>	Fusarium boothii strain 130 translation elongation factor 1 alpha (EF:	<a href="#">1205</a>	1205	97%	0.0	99%
<a href="#">HM744693.1</a>	Gibberella zeae strain NRRL 31084 transcription elongation factor 1 a	<a href="#">1205</a>	1205	96%	0.0	99%
<a href="#">FJ904869.1</a>	Fusarium meridionale strain CMW25500 isolate FUSMR translation eloi	<a href="#">1205</a>	1205	98%	0.0	98%

Figure 3.5 : Alignement de la séquence *tef-1a* de la souche *F. graminearum* MIAE00376 par le logiciel BLAST sur les séquences répertoriées sur le site NCBI

Le sensensus suivant, de 686 pb, a été obtenu (soumission à la GeneBank® en cours) :

```
>AGGACAAGACTCACCTTAACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCAC
TGTGAGTACCACCGCATCCCAACCCCGCCGACACTTGGCGGGGTAGTTTCAAATTTCCAATG
TGCTGACATACTTTGATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCGGGTGGTATCGACAAGCGAA
CCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTGGTCTCATTTTCCCTCGATCGCGCGCCCTTTTCCCTTTCG
AAATATCATTCGAATCGCCCTCACACGACGACTCGATATGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGGT
CAAAAATTTTGGCGCTTTGTGCGTAATTTTTTTTCCCGGTGGGGCTCATAACCCCGCCACTCGAG
CGACAGGCGTCTGCCCTCTTCCACAAACCATTCCTGGGCGCTCATCATCACGTGTCAACC
AGTCACTAACCACCTGTCAATAGGAAGCCGCGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTCAAGTACGCC
TGGGTTCTTGACAAGCTCAAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCCCTCTG
GAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCACCACTGCTGTCAT
CACATTCTCATACTAACATGGCTATCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACAT
GATCA
```

Cette séquence a été alignée sur les séquences contenues dans GeneBank® (Figure 3.5). Pour cette portion d'ADN, à l'inverse de la précédente, l'alignement n'est pas total : la séquence s'alignant avec le meilleur score recouvre 99% de la séquence trouvée avec 99% d'identité. Les parties non recouvertes sont surlignées en jaunes dans la séquence et correspondent aux extrémités de celle-ci. Une substitution explique que l'identité ne soit pas de 100%, elle est notée en rouge dans la séquence (base T pour la souche MIAE00376, base C pour la séquence alignée).

Toutes les séquences s'alignant avec celle de la souche MIAE00376 correspondent à des souches de *G. zeae* (forme parfaite de *F. graminearum*) ou à des souches appartenant au clade *F. graminearum*, comme *F. boothii* (O'Donnell et al., 2004).

Pour confirmer ce résultat, la séquence *tef-1a* a été alignée sur la base *Fusarium-ID*. Cette base est exclusivement consacrée aux *Fusarium*. Chaque souche est vérifiée par l'auteur de la base, contrairement à la GeneBank® où les soumissions sont libres, ce qui donne un niveau de confiance supplémentaire dans le résultat obtenu.

Le résultat est le même que celui obtenu sur GeneBank®. La souche MIAE00376 s'aligne avec des souches de *F. graminearum* à hauteur de 99 % d'identité. La substitution est la même que celle observée dans la première base.

### II.3 Caractérisation de la zone amplifiée par les amorces Fg16NF/Fg16NR

La dernière région d'intérêt utilisée pour caractériser *F. graminearum* est celle amplifiée par les amorces Fg16NF/Fg16NR qui ne répondent qu'en présence de cette espèce (Nicholson et al., 1998). Dans ce travail de thèse, cette région spécifiquement amplifiée a été utilisée pour faire de l'identification rapide de souches de *F. graminearum* en complément des analyses morphologiques ainsi que pour suivre la croissance du champignon par PCR en temps réel. Elle n'est pas utilisée en tant que région d'intérêt phylogénétique et n'a donc pas été alignée sur les bases de référence, mais elle a été séquencée dans un intérêt informatif. Le fragment d'ADN attendu a une longueur de 280 pb.

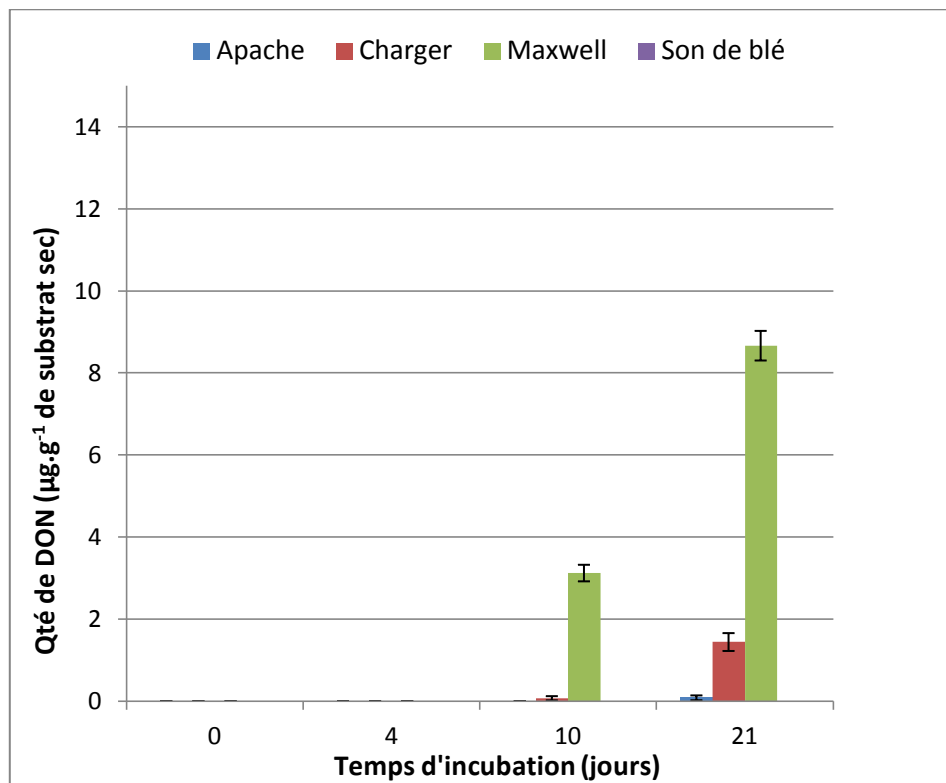
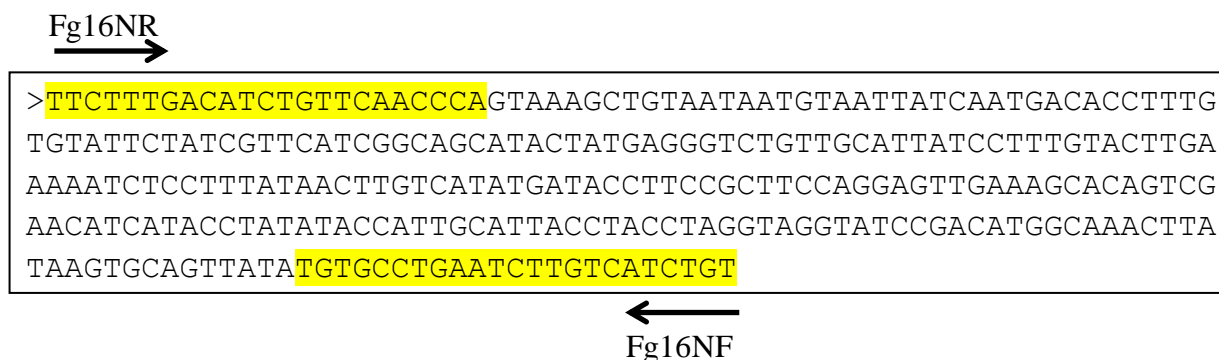


Figure 3.6 : Production de DON par *F. graminearum* en fonction du temps et du substrat de culture

Le consensus suivant, de 284 pb, a été obtenu :



Le fragment amplifié a une longueur de 284 pb, ce qui correspond à la taille attendue (Nicholson et al., 1998). Les zones marquées en jaune sur la séquence correspondent aux amorces Fg16NF/Fg16NR.

### III Caractérisation du chemotype de la souche de *F. graminearum* MIAE00376

L'étude du chemotype d'une souche de *F. graminearum* permet de déterminer si le champignon est producteur de mycotoxines TCT B de type DON ou NIV. Dans le cas d'un producteur de type DON, cette étude permet également de déterminer si la souche est productrice de 3-ADON ou de 15-ADON (dérivés acétylés du DON).

#### III.1 Détermination du chemotype de la souche MIAE00376 par croissance du champignon sur grains de blé

III.1.1 Détermination de la contamination post-autoclavage des substrats utilisés

Les mises en culture de son de blé et de grains d'Apache ont montré que ces substrats post-autoclavage n'étaient plus contaminés. En revanche, pour les grains des variétés Charger et Maxwell, respectivement 32 et 44% des semences restaient contaminées. Cependant, les espèces fongiques s'étant développées appartenaient essentiellement aux genres *Penicillium* et *Cladosporium*. Aucune souche appartenant au complexe de la fusariose ne s'est développée. Les tests ont donc été poursuivis malgré cette contamination. Les grains de blé sont particulièrement difficiles à stériliser, notamment en raison du caractère protecteur du sillon des grains.

#### III.1.2 Dosage de la production de mycotoxines

Aucune production de mycotoxine n'a été détectée sur son de blé au cours des 21 jours d'expérience (Figure 3.6). Le DON a été la seule mycotoxine détectée sur les grains de blé. Jusqu'à 4 jours d'incubation aucune production de mycotoxine n'a été détectée. A partir de 10 jours, la production de DON a été détectée sur les variétés Charger et Maxwell mais pas sur la variété Apache. La production de DON sur la variété Apache a été détectée au bout de 21

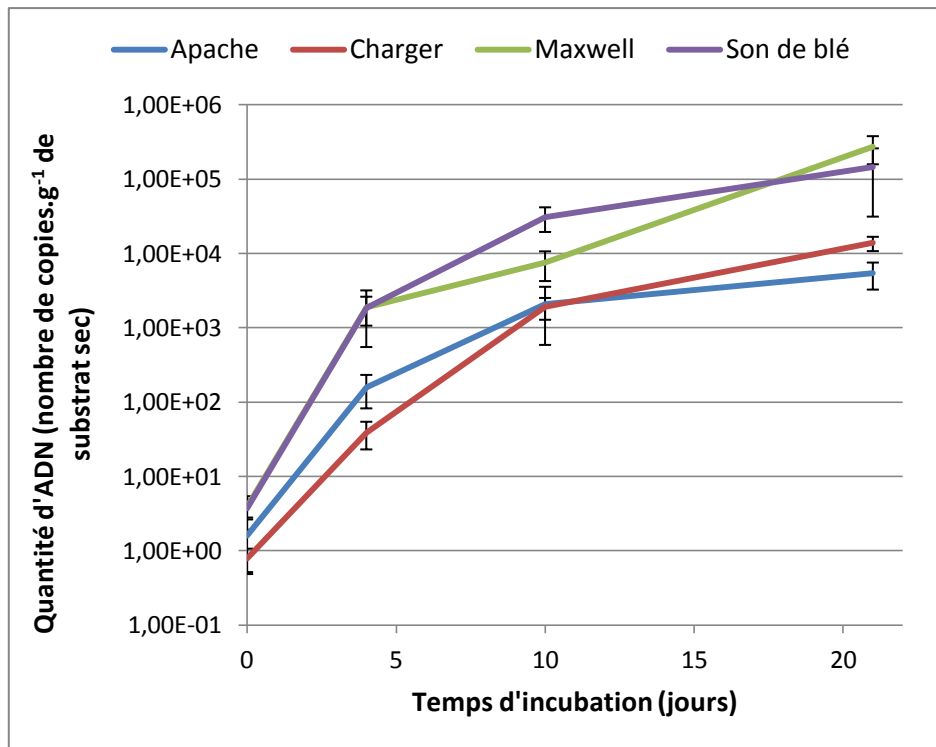


Figure 3.7 : Quantité d'ADN de *F. graminearum* détectée en fonction du temps et du substrat de culture

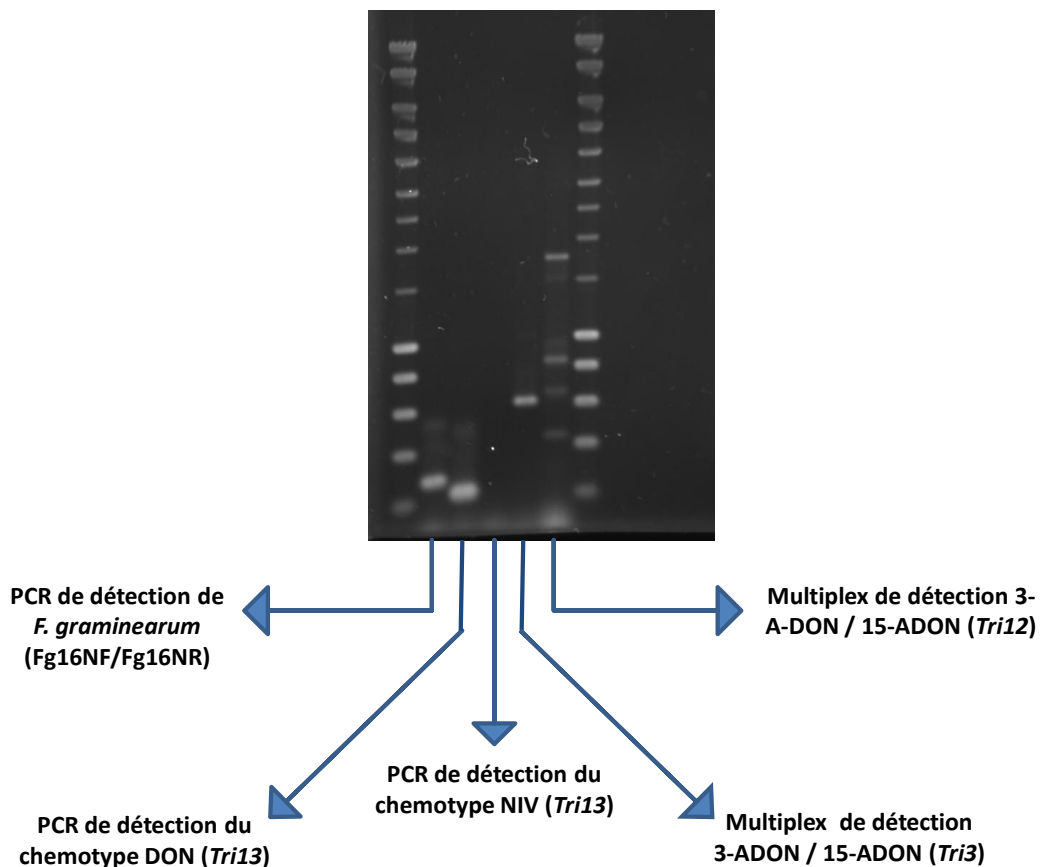


Figure 3.8 : Détermination du chemotype de la souche de *F. graminearum* MIAE00376 par méthode moléculaire

jours d'incubation. A la fin de l'expérience, la production de DON a été la plus forte sur la variété Maxwell (8,67  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de substrat sec), suivie de celle sur la variété Charger (1,44  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de substrat sec) et elle a été la plus faible sur la variété Apache (0,08  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de substrat sec).

### III.1.3 Détermination de la quantité de matériel fongique produite

La détection de copies d'ADN a été la plus forte sur les grains de la variété Maxwell et la plus faible sur ceux de la variété Apache (Figure 3.7). La détection sur les grains de la variété Charger a été intermédiaire. La détection sur son de blé a été très proche de celle sur la variété Maxwell. Cependant, le petit nombre d'échantillons quantifiés n'a pas permis de faire apparaître un effet substrat significatif.

### III.2 Détermination du chemotype par caractérisation moléculaire

L'utilisation de couples d'amorces en multiplex/simplex a révélé la présence de gènes codant pour la production de mycotoxines chez la souche de *F. graminearum* MIAE00376 (Figure 3.8). Les deux premiers puits en partant de la gauche, après le ladder, correspondant à la caractérisation d'un *F. graminearum* (premier puits) de chemotype DON (second puits), ont été positifs. Le troisième puits, correspondant à la caractérisation d'un chemotype NIV, a été négatif. Le quatrième puits, multiplex permettant de caractériser un chemotype 3-ADON, 15-ADON ou NIV sur le gène *Tri3*, a donné une bande d'une taille d'environ 610 pb, mettant en évidence un chemotype 15-ADON. Le dernier puits, multiplex permettant de caractériser un chemotype 3-ADON, 15-ADON ou NIV sur le gène *Tri12* n'a donné aucun résultat exploitable du fait de la présence de plusieurs bandes.

## IV Conclusions à propos de la caractérisation de la souche de *F. graminearum* MIAE00376

La caractérisation morphologique de la souche a confirmé que ses traits phénotypiques correspondaient effectivement à ceux attendus pour une souche de *F. graminearum*. L'étude moléculaire des régions d'ADN d'intérêt phylogénétique a elle aussi confirmé que la souche MIAE00376 était bien une souche de *F. graminearum*.

L'étude de la production de mycotoxines sur grains de blé a montré que la souche de *F. graminearum* MIAE00376 était productrice de DON. L'étude du génome de la souche a confirmé l'étude sur les grains et a permis d'aller plus loin en montrant que la souche était du type 15-ADON. Ce chemotype est celui qui domine en Europe dans les pays tempérés comme la France (Jennings et al., 2004; Talas et al., 2011; Yli-Mattila, 2010). Cette étude du génome est théorique, bien que la souche ait la capacité de produire du DON et son dérivé acétylé 15-ADON, la production réelle de la souche peut-être différente car elle est contrôlée par un grand nombre de facteurs, comme l'a montré l'étude sur grains au cours de laquelle la production de 15-ADON n'a pas pu être détectée. On peut donc parler de potentiel de production. L'un de ces facteurs contrôlant la production de mycotoxines est le temps d'incubation de la souche : aucune production n'a été détectée avant le dixième jour de l'étude. Ceci est en accord avec une étude de Ramirez et al. (2006) qui a montré que même



dans les conditions optimales de température et de disponibilité en eau, la production de DON n'était détectable qu'au bout d'un délai de sept jours. Un second facteur est le substrat sur lequel se développe la souche : aucune production n'a été détectée sur son de blé et des cinétiques et niveaux de production différents ont été observés pour les trois variétés de blé. Le son de blé est connu pour contenir une proportion importante d'acides phénoliques inhibiteurs de la production de mycotoxines, ce qui explique les résultats obtenus (Boutigny et al., 2010). Au bout de 21 jours, la quantité de mycotoxine produite sur les trois variétés de blé était en accord avec la sensibilité de ces variétés à la fusariose : la production sur les variétés sensibles, Charger et Maxwell, a été plus importante que celle sur la variété résistante, Apache. La production entre les variétés sensibles a aussi été différente : elle a été beaucoup plus importante sur Maxwell que sur Charger. La détermination par qPCR de la quantité de matériel fongique a montré que l'augmentation du taux de mycotoxines était accompagnée d'une augmentation du nombre de copies d'ADN. La seule exception est le son de blé sur lequel la quantité de champignon a augmenté sans que cela ne s'accompagne d'une production de mycotoxines. Pour les grains, le coefficient de corrélation entre la production de matériel fongique et l'accumulation de DON est de 0,92. Malgré le peu de points disponibles pour déterminer ce coefficient, il semble donc que les différences dans le taux d'accumulation de DON soient liées, dans les conditions de cette étude, à la quantité de matériel fongique produite. Plusieurs études ont montré qu'une relation existait entre le taux de production de DON et la quantité de matériel fongique produite mesurée par différentes techniques (Dong et al., 2006; Miedaner et al., 2001; Neuhof et al., 2008).





**Chapitre 4 Suivi chronologique du  
processus d'infection au champ ; recherche  
d'indicateurs précoces du risque de  
fusariose**

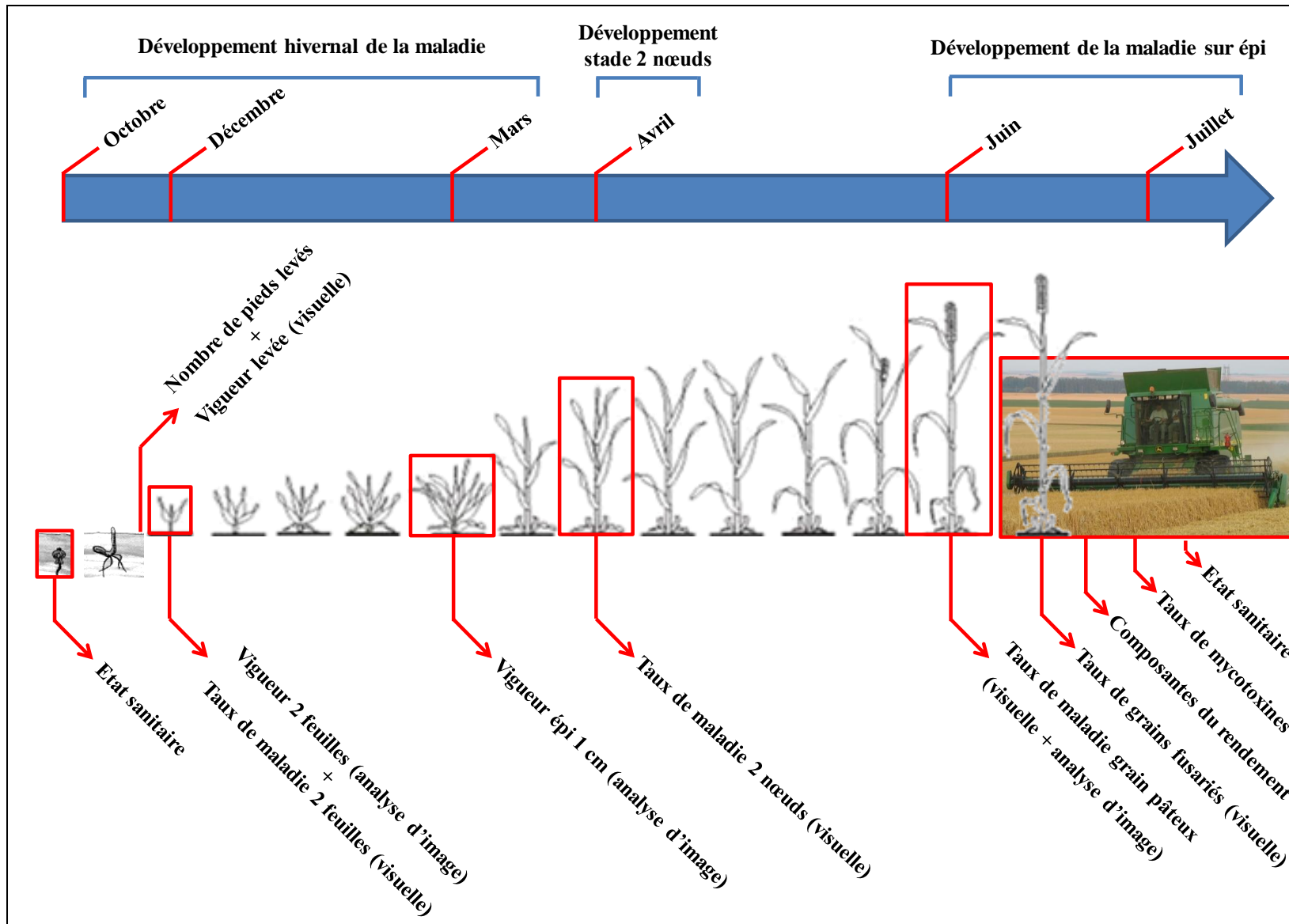


Figure 4.1 : Notations et observations faites sur les cultures de blé durant les deux années d'essai

## Avant propos

L'étude bibliographique a montré l'importance des résidus de culture dans la survie de *F. graminearum*, agent de la fusariose du blé, ainsi que dans l'apparition de la maladie sur les épis. La survie, la production et la dissémination de l'inoculum sont en outre fortement dépendantes des conditions pédoclimatiques.

L'objectif de cette étude était de réaliser un suivi chronologique du processus d'infection du blé au champ afin de rechercher des indicateurs précoces du risque de développement de la fusariose dans le contexte pédoclimatique Bourguignon. La recherche de ces indicateurs de la qualité phytosanitaire et de prévision du risque est un outil de plus en plus fréquemment employé pour établir des grilles d'aide à la décision et à la gestion de ce risque (Janvier et al., 2007).

La démarche choisie pour cette étude a été un test en plein champ mené durant deux années consécutives sur le domaine expérimental d'Epoisses. La présence de résidus contaminés à la surface du sol et/ou dans la couche superficielle du sol a été mimée par l'apport de grains d'orge enrobés par la souche de *F. graminearum* MIAE00376 caractérisée dans la partie précédente. Le développement de la maladie a été suivie depuis le semis jusqu'à la récolte sur trois variétés de blé, dont deux étaient sensibles à la fusariose et la dernière était tolérante (Figure 4.1). Ce chapitre aborde également l'effet des espèces fongiques autres que *F. graminearum* impliquées dans le développement de la fusariose tout au long de la croissance du blé. Ces espèces n'ayant pas été apportées lors des inoculations, elles représentent l'action de l'inoculum indigène. Des corrélations ont été faites entre toutes les variables mesurées afin de mettre en évidence, ou non, l'existence des indicateurs précoces recherchés.

	Grains contaminés (%)	<i>F. graminearum</i> (%)	<i>F. tricinctum</i> (%)	<i>F. poae</i> (%)	<i>F. avenaceum</i> (%)	<i>M. nivale</i> (%)*	<i>F. pseudograminearum</i> (%)	<i>F. cerealis</i> (%)	<i>F. culmorum</i> (%)	<i>F. venetatum</i> (%)	
Semis 2008	Apache	<b>10</b>	(-)	(-)	(-)	<b>100</b> (8/8/84)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	Charger	<b>61</b>	22	3	(-)	<b>68</b> (42/38/20)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	Maxwell	<b>34</b>	<b>42</b>	(-)	7	19	21 (11/67/22)	(-)	7	2	2
	Charger enrobés				Pas de croissance de souches d'intérêt						
	Charger déenrobés	<b>58</b>	7	3	(-)	3	<b>85</b> (15/32/53)	1	(-)	1	(-)
Semis 2009	Apache	<b>23</b>	17	<b>39</b>	17	17	26 (17/83/0)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Charger	<b>58</b>	16	<b>67</b>	3	(-)	14 (0/63/37)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Maxwell	<b>34</b>	<b>42</b>	(-)	7	19	21 (11/67/22)	(-)	7	2	2

\*Les trois nombres entre parenthèses correspondent aux pourcentages de *M. nivale* var. *nivale*, *M. nivale* var. *majus* et *M. nivale* dont la variété n'a pas été déterminée

Tableau 4.1 : Etat sanitaire des semences utilisées lors des essais Fusa et ITK

## I Etat sanitaire des grains semés dans les essais lors des deux campagnes de tests

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au taux de contamination par des espèces fongiques appartenant au complexe de la fusariose des grains de blé semés lors des deux années d'essai.

### I.1 Résultats

Parmi les grains semés en 2008, ceux de la variété Charger ont été les plus touchés avec 61% des semences porteuses d'inoculum, les moins touchés étaient ceux de la variété Apache avec seulement 10% des semences porteuses d'inoculum (Tableau 4.1). Maxwell était en position intermédiaire avec 34% des semences touchées. Les compositions des flores constituant cet inoculum étaient différentes : les variétés Apache et Charger étaient essentiellement contaminées par *M. nivale*, seule espèce isolée des semences d'Apache. La deuxième espèce présente en proportion sur la variété Charger était *F. graminearum* (22% des semences porteuses). *Fusarium tricinctum* et *F. avenaceum* ont aussi été isolées sur Charger. La composition de la flore pathogène sur la variété Maxwell était plus diversifiée avec la présence de sept espèces impliquées dans le complexe de la fusariose. L'espèce la plus importante en proportion était *F. graminearum* avec 42% des semences contaminées.

Aucune souche d'intérêt ne s'est développée à partir des semences traitées de la variété Charger. Après lavage des semences, une proportion de champignons phytopathogènes similaire à celle présente sur semence non-enrobées s'est développée (61% des graines de Charger non-enrobées contaminées et 58% des graines de Charger désenrobées contaminées). *Microdochium nivale* est toujours l'espèce qui était majoritairement isolée mais sa part relative était plus importante : 85% des souches isolées appartenaient à cette espèce contre 68% dans l'état sanitaire sur semence non-enrobées. La part des espèces de *Fusarium*, et particulièrement celle de *F. graminearum*, a diminué : seulement 7% des souches isolées appartenaient à cette espèce contre 22% dans l'état sanitaire sur semences non-enrobées.

Pour les essais Fusa et ITK de l'année 2010, il avait été envisagé d'utiliser les semences récoltées dans l'essai Fusa09. Cependant, des tests de germination sur ces semences ont montré que leur utilisation ne serait pas possible en raison de leur taux de contamination. Les semences des variétés Apache et Charger récoltées dans l'essai ITK09 ont donc été utilisées. L'état sanitaire de ces deux variétés pour le semis 2009 correspond donc à l'état sanitaire de la récolte des parcelles irriguées intensives de l'essai ITK09. La variété Maxwell n'étant pas présente dans l'essai ITK, les semences utilisées pour le semis à l'automne 2009 ont été celles déjà utilisées à l'automne 2008, le test de germination ayant montré qu'elles étaient toujours « actives ». Les taux de contamination des semences Charger et Maxwell étaient pratiquement les mêmes en 2009 qu'en 2008 (Tableau 4.1). En revanche, les semences d'Apache étaient plus contaminées en 2009 qu'en 2008 (23% contre 10%). Pour Apache et Charger, les compositions de la flore étaient différentes en 2008 et en 2009. En 2009, *F. tricinctum* était l'espèce dominante alors que c'était *M. nivale* en 2008. La diversité de la flore sur la variété Apache était supérieure à l'année précédente : en 2008, la seule espèce présente était *M. nivale* alors qu'en 2009, cinq espèces différentes ont été isolées.



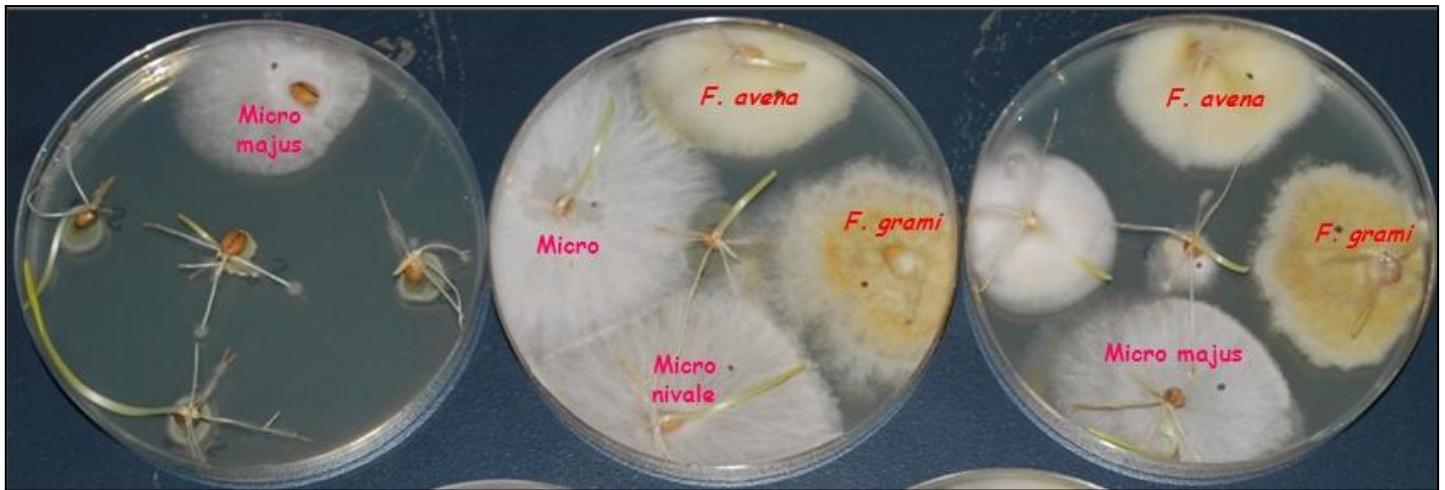


Figure 4.2 : Etat sanitaire sur graines de Chargier non enrobées



Figure 4.3 : Etat sanitaire sur graine de Chargier enrobées



Figure 4.4 : Etat sanitaire sur graines de Chargier enrobées puis lavées

## I.2 Discussion

Les états sanitaires en début d'essai ont prouvé que les semences des trois variétés étaient porteuses d'inoculum, dans des proportions inégales (Tableau 4.1). Ces proportions étaient en accord avec la sensibilité à la fusariose : la variété tolérante, Apache, a été porteuse de moins d'inoculum que les variétés sensibles, Charger et Maxwell. Les espèces rencontrées et leurs fréquences étaient en accord avec celles déterminées ces dernières années sur blé en France (Dubournet et al., 2008; Ioos et al., 2004). Les différences entre Apache et Charger d'un côté et Maxwell de l'autre peuvent s'expliquer par la provenance des semences (unité du Moulon, centre INRA de Gif-sur-Yvette [91190], pour les variétés Apache et Charger et semencier Lemaire Desfontaines pour la variété Maxwell). Quoiqu'il en soit cet état sanitaire a montré que l'inoculum apporté par les semences n'était pas négligeable et devait être pris en compte dans la notation de la fusariose sur blé, notamment en raison de la présence importante de l'espèce *F. graminearum* utilisée dans les essais en champ.

L'état sanitaire des semences initialement enrobées puis lavées a montré l'efficacité et le mode d'action des fongicides. Aucune souche d'intérêt n'a poussé à partir des semences enrobées, ce qui prouve que cet enrobage des graines empêche le développement de l'inoculum présent sur les semences (Figures 4.2, 4.3 et 4.4). Plusieurs études confirment l'efficacité du traitement des semences dans la réduction des pertes à la levée et de la maladie sur plantules due à la fusariose du blé (Cannaert and Sztor, 2006; Glynn et al., 2008; Glynn et al., 2007; Hudec, 2006; Schaafsma and Tamburic-Ilincic, 2005). Cette donnée devra être prise en compte lors de la comparaison des essais Fusa et ITK où la différence principale au moment du semis, outre le fait que la moitié des parcelles de l'essai Fusa aient été inoculées, était l'enrobage des semences. Une proportion similaire de souches phytopathogènes à celle présente sur semences non-enrobées s'est développée après lavage des graines. Le fongicide a donc empêché le développement des souches sans les éliminer. Bien que les taux globaux de contamination des semences enrobées et des semences lavées aient été les mêmes, les compositions des flores étaient différentes. Le fongicide semble donc avoir eu un effet différent sur les différentes espèces composant le complexe de la fusariose : il a été plus efficace contre les espèces de *Fusarium* que contre *M. nivale*. Ce phénomène a déjà été observé dans plusieurs études qui ont montré que deux principes actifs différents avaient une efficacité différente sur une même espèce (Glynn et al., 2008; Glynn et al., 2007; Jones, 1999) et qu'un même principe actif était plus ou moins efficace en fonction de l'espèce du complexe étudiée (Hudec, 2006).

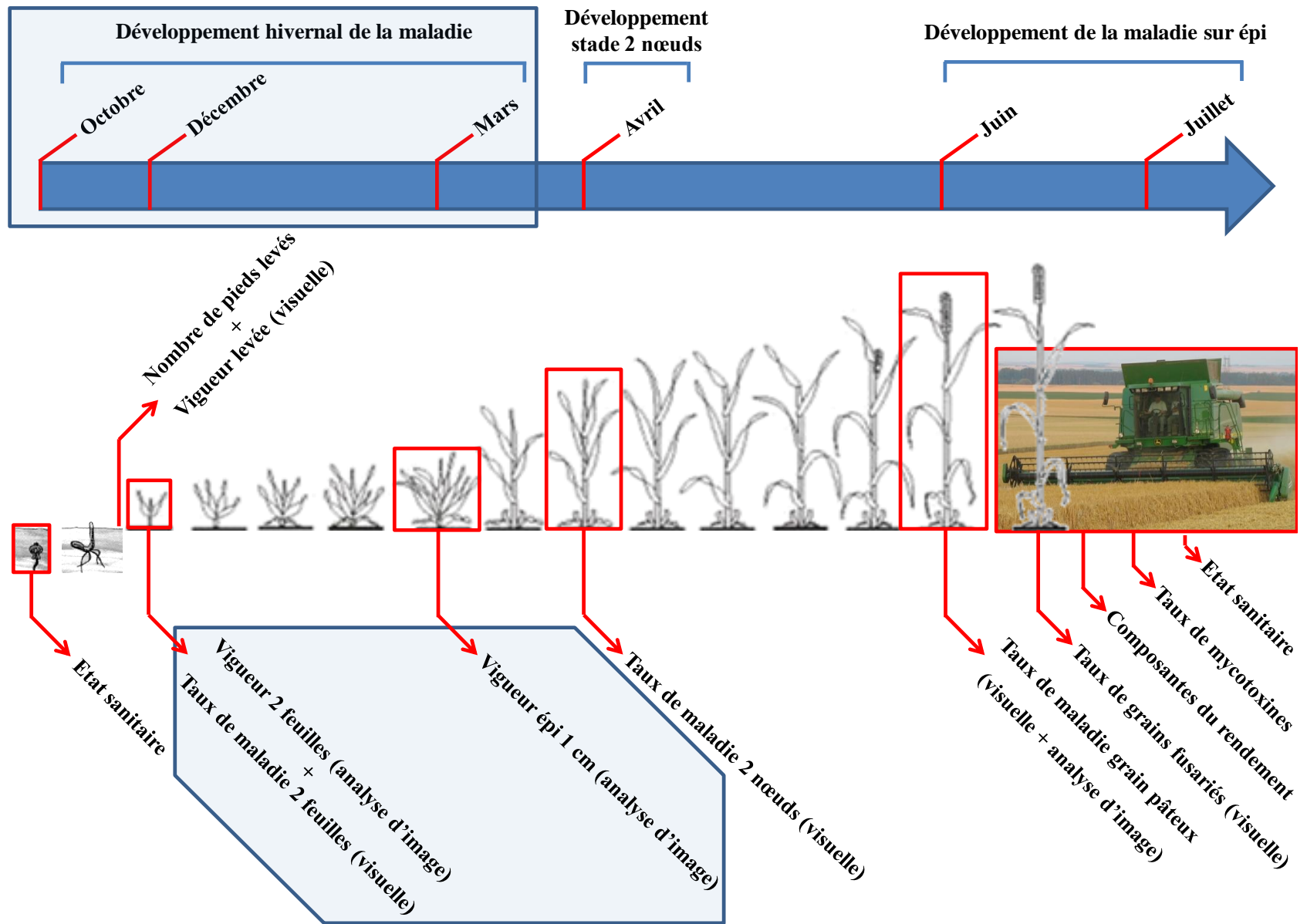


Figure 4.5 : Notations et observations faites sur les cultures de blé pendant la période hivernale durant les deux années d'essai

## II Etude du développement hivernal de la maladie

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au développement de la maladie durant la période hivernale de croissance du blé par des notations lors de la levée, du stade deux feuilles et du stade épi 1 cm du blé (Figure 4.5).

### II.1 Résultats des notations hivernales

Les tableaux bruts résumant les notations hivernales sont présentés en annexe 35.

#### II.1.1 Notations au stade levée du blé

##### II.1.1.1 Notations des essais Fusa et ITK

En 2009, l'inoculation au semis a eu un effet significatif à la fois sur le pourcentage de levée et sur la vigueur des plantes évaluée par méthode visuelle (Tableau 4.2). La levée dans les parcelles inoculées a été significativement plus faible que dans les parcelles non-inoculées. De plus l'impression de vert donnée par les parcelles inoculées était plus faible que celle donnée par les parcelles non-inoculées. L'effet variétal montre que la levée a été significativement la plus basse dans les parcelles de Charger et la plus haute dans les parcelles d'Apache, la variété Maxwell étant intermédiaire. L'effet variétal a été le même lorsque l'on considère la vigueur des plantules à l'exception du fait que la différence entre les parcelles des variétés Apache et Maxwell n'a pas été significative, bien que les notes attribuées à Maxwell aient été plus basses que celles attribuées à Apache. Un effet bloc a en outre été relevé dans la vigueur de la levée.

En 2010, le facteur inoculation au semis n'a pas eu d'influence sur le pourcentage de levées (Tableau 4.2). L'effet variétal a été différent de celui observé en 2009 : Maxwell a eu significativement la meilleure levée et il n'y a pas eu de différence entre Apache et Charger.

Dans l'essai ITK, aucune différence entre les variétés Apache et Charger n'a été notée dans le pourcentage de levées et la vigueur de la levée, en 2009 comme en 2010.

##### II.1.1.2 Comparaison des essais FUSA et ITK

Il n'est pas possible de comparer la vigueur des plantes des essais Fusa et ITK du fait de la différence de densité de semis de ces deux essais. Pour le pourcentage de levées, seules les parcelles comparables ont été prises en compte. Pour l'année 2009 les parcelles irriguées intensives des variétés Charger et Apache de l'essai ITK09 et les parcelles non inoculées au semis des variétés Charger et Apache de l'essai Fusa09 ont été utilisées (le tableau 4.2 montre un effet de l'inoculation au semis sur le pourcentage de levées). Pour l'année 2010, toutes les parcelles des variétés Charger et Apache de l'essai Fusa10 ont été utilisées, le facteur inoculation au semis n'ayant pas été significatif. Au cours des deux années, le pourcentage de levées a été significativement meilleur dans l'essai contrôle, ITK, que dans l'essai Fusa (Tableau 4.3).

Facteur	Source de variation	2009		2010	
		% de levée	Vigueur levée (visuelle)	% de levée	Vigueur levée (visuelle)
Inoculation au semis	+	60,5b	5,25b	NS	
	-	66a	5,833a		
Variété	Apache	75,9a	6,25a	79,3b	(-)
	Charger	48,4c	4,5b	77,1b	
	Maxwell	65,5b	5,875a	98,5a	
Bloc	1	NS	4,75c	NS	
	2		5,833a		
	3		5,333b		
	4		6,250a		

Tableau 4.2 : Pourcentage de plantes levées (par rapport à la densité semée) et quantification visuelle de la vigueur des plantules à la levée selon les traitements en 2009 et 2010 dans les essais Fusa

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05

Facteur	Source de variation	2009	2010
		% de levée	% de levée
Essai	Fusa	65,7b	78,2b
	ITK	95,5a	116,8a

Tableau 4.3 : Comparaison des pourcentages de levée des semences dans les deux itinéraires techniques Fusa et ITK, en 2009 et en 2010, indépendamment de la variété de blé

Au sein d'une même colonne, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05

### II.1.1.3 Effet de l'année sur les notations au stade levée

La comparaison du pourcentage de levées des essais Fusa09 et Fusa10 montre que la levée a été significativement meilleure en 2010 (85%) qu'en 2009 (63,3%).

## II.1.2 Notations au stade deux feuilles du blé

### II.1.2.1 Notations des essais Fusa et ITK

En 2009 comme en 2010, aucun effet de l'inoculation au semis n'a été noté sur le taux de maladie et sur la vigueur (analyse d'image) des plantules au stade deux feuilles (Tableau 4.4). En revanche, un effet variétal s'est dégagé : en 2009, la variété présentant significativement le moins de nécroses sur plantules était Apache et celle en présentant le plus était Charger, la variété Maxwell étant intermédiaire. En outre, un effet bloc a été noté en 2009. En 2010, l'effet variétal sur le taux de maladie au stade deux feuilles n'était pas significatif mais la tendance a été intéressante. La variété Apache a été celle dont le plus grand nombre de plantules étaient malades, contrairement à ce qui a été relevé jusqu'à présent. En ce qui concerne la vigueur de la levée, les variétés Apache et Maxwell présentaient significativement plus de vert par m<sup>2</sup> que la variété Charger.

Facteur	Source de variation	2009		2010	
		Plantules malades (%)	Vigueur (analyse d'image, cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	Plantules malades (%)	Vigueur (analyse d'image, cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )
Inoculation au semis	+	NS		NS	NS
	-				
Variété	Apache	28,7c	(-)	43,3a	1026a
	Charger	52,4a		32,9a	747b
	Maxwell	38,7b		29,6a	1115a
Bloc	1	53,1a		NS	NS
	2	44,3ab			
	3	24,7c			
	4	37,6b			

Tableau 4.4 : Notations au stade deux feuilles dans l'essai Fusa

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05

Les notations au stade deux feuilles n'ont pas été faites dans l'essai ITK en 2009. En 2010, aucune différence variétale n'a été notée sur le taux de maladie au stade deux feuilles dans l'essai ITK. L'effet variétal sur la vigueur des plantules a été le même que celui estimé dans l'essai Fusa : elle était significativement plus importante dans les parcelles de la variété Apache (1153 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) que dans celles de la variété Charger (838 cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>).

Facteur	Source de variation	Plantules malades (%)
Année	2009	NS
	2010	
Charger x Année	Charger x 2009	52,4a
	Charger x 2010	29,6b
Apache x Année	Apache x 2009	28,7b
	Apache x 2010	43,3a

Tableau 4.5 : Comparaison des essais Fusa09 et Fusa10 pour le pourcentage de plantules malades en considérant l'ensemble des trois variétés de blé, ou en considérant uniquement la variété Charger ou la variété Apache

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05

Essai	Code isolement	Variété	Identification spécifique des isolats
Fusa10	F 3-1	Maxwell	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 3-2	Maxwell	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 3-3	Maxwell	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 3-4	Maxwell	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 3-5 <sub>1</sub>	Maxwell	NI
Fusa10	F 3-5 <sub>2</sub>	Maxwell	NI
Fusa10	F 20-1	Apache	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 20-2	Apache	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 20-3	Apache	NI
Fusa10	F 20-4	Apache	<i>M. nivale var. nivale</i>
Fusa10	F 20-5	Apache	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 48-2	Charger	<i>M. nivale</i>
Fusa10	F 48-3	Charger	NI
Fusa10	F 48-4	Charger	<i>F. tricinctum</i>

NI : souche fongique, bactérienne ou de levure, non identifiée spécifiquement car non impliquée dans la fusariose

Tableau 4.6 : Souches isolées à partir de symptômes sur plantules au stade deux feuilles en 2010

### II.1.2.2 Comparaison des essais Fusa et ITK

La comparaison directe pour la vigueur entre les essais Fusa et ITK n'est pas possible en raison de la différence de densité de semis. Les parcelles comparables (même itinéraire technique) des deux essais ont été utilisées pour la comparaison du taux de maladie : les parcelles irriguées intensives des variétés Charger et Apache de l'essai ITK10 et toutes les parcelles des variétés Charger et Apache de l'essai Fusa10. Le taux de maladie a été significativement plus important dans l'essai Fusa (36,5%) que dans l'essai ITK (7,5%).

### II.1.2.3 Effet de l'année sur les notations au stade deux feuilles

La comparaison des années 2009 et 2010 pour l'essai Fusa ne montre pas de différence significative (Tableau 4.5). En revanche, l'interaction variété x année a eu une influence sur le taux de maladie observé au stade deux feuilles. Le nombre de plantules malades était significativement plus élevé en 2009 qu'en 2010 pour la variété Charger. L'inverse a été observé pour la variété Apache.

### II.1.2.4 Isolements au stade deux feuilles du blé

Les mises en culture effectuées à partir des plantules malades en 2010 ont essentiellement permis d'isoler des souches de *M. nivale* (Tableau 4.6, Figure 4.6). Sur quatorze mises en culture, quatre n'ont pas permis d'isoler de souche d'intérêt, une a permis l'isolement d'un *F. tricinctum* et neuf ont permis l'isolement de *M. nivale*.

## II.1.3 Notations au stade épi 1 cm

### II.1.3.1 Notations des essais Fusa et ITK

L'inoculation au semis a eu un effet sur la vigueur des plantules (mesurée par analyse d'image) en 2009 mais pas en 2010 (Tableau 4.7). La vigueur des plantules des parcelles inoculées a été significativement plus basse que celle des parcelles non-inoculées. En 2009, la vigueur des plantules des parcelles de la variété Apache était significativement la plus haute et celle des parcelles de la variété Charger la plus basse, Maxwell étant intermédiaire. En 2010, la vigueur des plantules des parcelles de la variété Apache était toujours la plus haute mais c'est celle des parcelles de la variété Maxwell qui était la plus basse, Charger étant intermédiaire mais sans différence significative avec les deux autres variétés. Un effet bloc à en outre été noté les deux années.

En 2009 comme en 2010, aucun effet variétal n'a été noté dans l'essai ITK.

### II.1.3.2 Comparaison des essais Fusa et ITK

Seules les parcelles comparables ont été prises en compte. Pour l'année 2009 les parcelles irriguées intensives des variétés Charger et Apache de l'essai ITK09 et les parcelles non-inoculées au semis des variétés Charger et Apache de l'essai Fusa09 ont été utilisées (le tableau 4.7 montre un effet de l'inoculation au semis sur la quantité de vert au stade épi 1 cm). Pour l'année 2010, toutes les parcelles des variétés Charger et Apache de l'essai Fusa10 ont



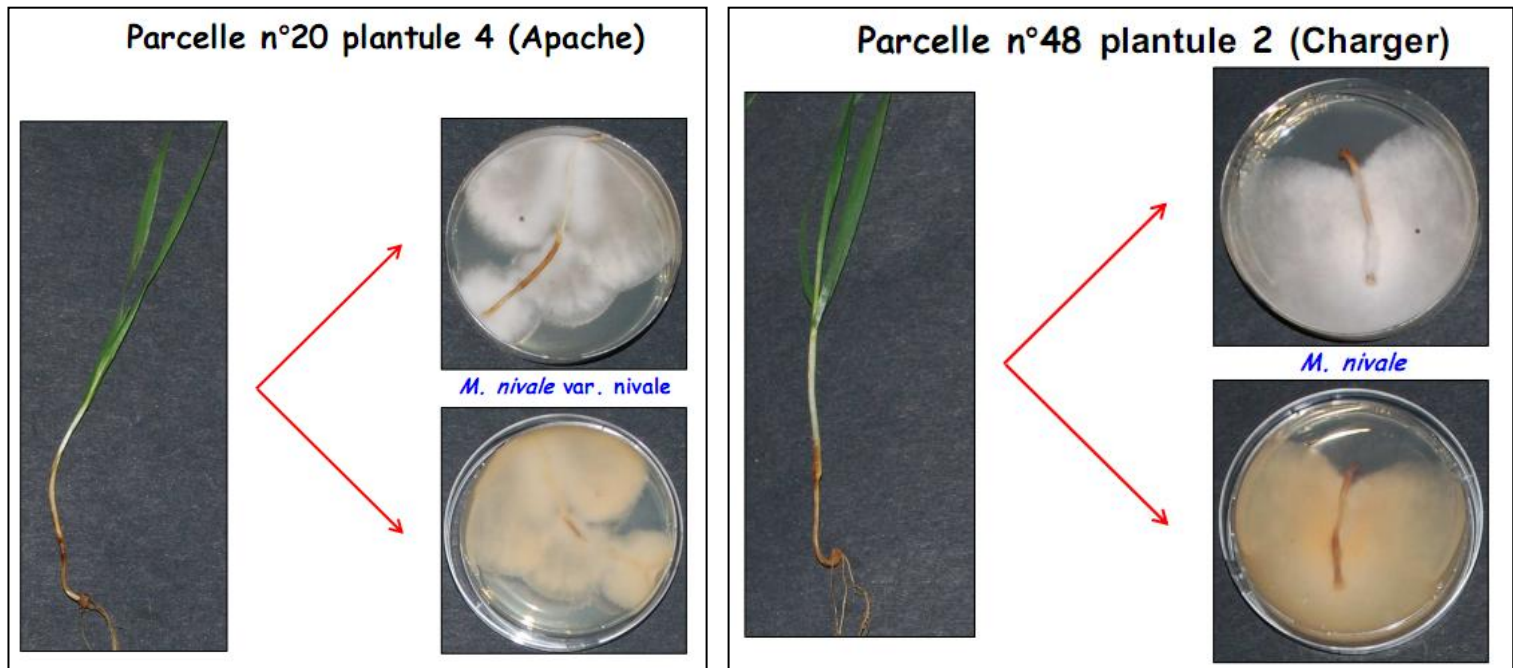


Figure 4.6 : Isolations au stade deux feuilles effectuées à partir de plantules des variétés Apache et Charger prélevées dans l'essai Fusa10

Facteur	Source de variation	2009	2010
		Vigueur épi 1 cm (analyse d'image, en cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	Vigueur épi 1 cm (analyse d'image, en cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )
Inoculation au semis	+	3081b	NS
	-	3351a	
Variété	Apache	3683a	4154a
	Charger	2775c	3806ab
	Maxwell	3190b	3696b
Bloc	1	3014b	3887b
	2	3137ab	3601b
	3	3241ab	4310a
	4	3473a	3744b

Tableau 4.7 : Vigueur des plantules au stade épi 1 cm estimée par analyse d'image pour l'essai Fusa

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05

été utilisées, le facteur inoculation au semis n'ayant pas été significatif. Aucune différence significative sur la vigueur des plantules n'a été notée entre les essais Fusa et ITK en 2009. En 2010, la vigueur des plantules de l'essai ITK à ce stade ( $4995 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ) était significativement supérieure à celle de l'essai Fusa ( $3980 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ).

### II.1.3.3 Effet de l'année sur les notations au stade épi 1 cm

La comparaison des essais Fusa09 et Fusa10 montre que la vigueur des plantules a été significativement plus importante en 2010 ( $3885 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ) qu'en 2009 ( $3216 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ ).

## II.2 Corrélations entre les variables notées durant le développement hivernal de la maladie dans les essais Fusa

L'intérêt de calculer les corrélations entre les différentes variables notées durant le développement hivernal de la maladie est de mettre en évidence les variables informatives quant à l'évolution de la maladie dès les premiers stades de développement des plantules.

En 2009, la corrélation la plus forte pour les variables hivernales a été celle entre le pourcentage de levées et la vigueur des plantules estimée au stade épi 1 cm (Tableau 4.8). La corrélation a également été importante entre ces deux variables et la vigueur de la levée estimée par méthode visuelle. Les corrélations les plus faibles ont été trouvées pour la notation de la maladie au stade deux feuilles et les autres variables. Ces corrélations négatives indiquent que les parcelles où la levée a été la plus faible et où les plantules étaient moins vigoureuses ont été les plus touchées par les symptômes.

En 2010, les résultats ont été très différents (Tableau 4.9). La seule corrélation forte observée a été celle entre le pourcentage de levée et la vigueur notée par analyse d'image au stade deux feuilles. Les autres variables ont été très peu corrélées.

	% de levée	Vigueur levée (visuelle)	Plantules malades à deux feuilles (%)	Vigueur épi 1 cm (analyse d'image, en $\text{cm}^2/\text{m}^2$ )
% de levée	1			
Vigueur levée (visuelle)	0,624	1		
Plantules malades à deux feuilles (%)	-0,437	-0,551	1	
Vigueur épi 1 cm (analyse d'image, en $\text{cm}^2/\text{m}^2$ )	0,758	0,657	-0,577	1

Tableau 4.8 : Matrice de corrélation visant à révéler les variables informatives quant au développement de la maladie durant sa phase hivernale en 2009

	% de levée	Vigueur levée (analyse d'image, en $\text{cm}^2/\text{m}^2$ )	Plantules malades à deux feuilles (%)	Vigueur épi 1 cm (analyse d'image, en $\text{cm}^2/\text{m}^2$ )
% de levée	1			
Vigueur levée (analyse d'image, en $\text{cm}^2/\text{m}^2$ )	0,825	1		
Plantules malades à deux feuilles (%)	-0,249	0,063	1	
Vigueur épi 1 cm (analyse d'image, en $\text{cm}^2/\text{m}^2$ )	0,145	0,365	-0,071	1

Tableau 4.9 : Matrice de corrélation visant à révéler les variables informatives quant au développement de la maladie durant sa phase hivernale en 2010

## II.3 Exploitation des données climatiques de la période hivernale

### II.3.1 Du point de vue de la plante

En 2010, les températures hivernales ont été plus hautes et les précipitations plus importantes qu'en 2009 (Figure 4.7). Dans le détail, la somme des degrés-jour au moment de la notation de la levée était supérieure en 2009 mais uniquement parce que cette notation a été faite dix jours plus tard après le semis par rapport à 2010. Dans les premiers jours après le semis, le blé a bénéficié en 2010 de plus de chaleur et d'eau qu'en 2009 puis les températures et les précipitations se sont rééquilibrées au moment de la notation du pourcentage de levées. Après cette notation et jusqu'à la notation à épi 1 cm, les conditions de 2010 ont été plus douces et les précipitations plus importantes, finissant avec environ 160 degrés-jour et 80 mm d'eau de plus qu'en 2009.

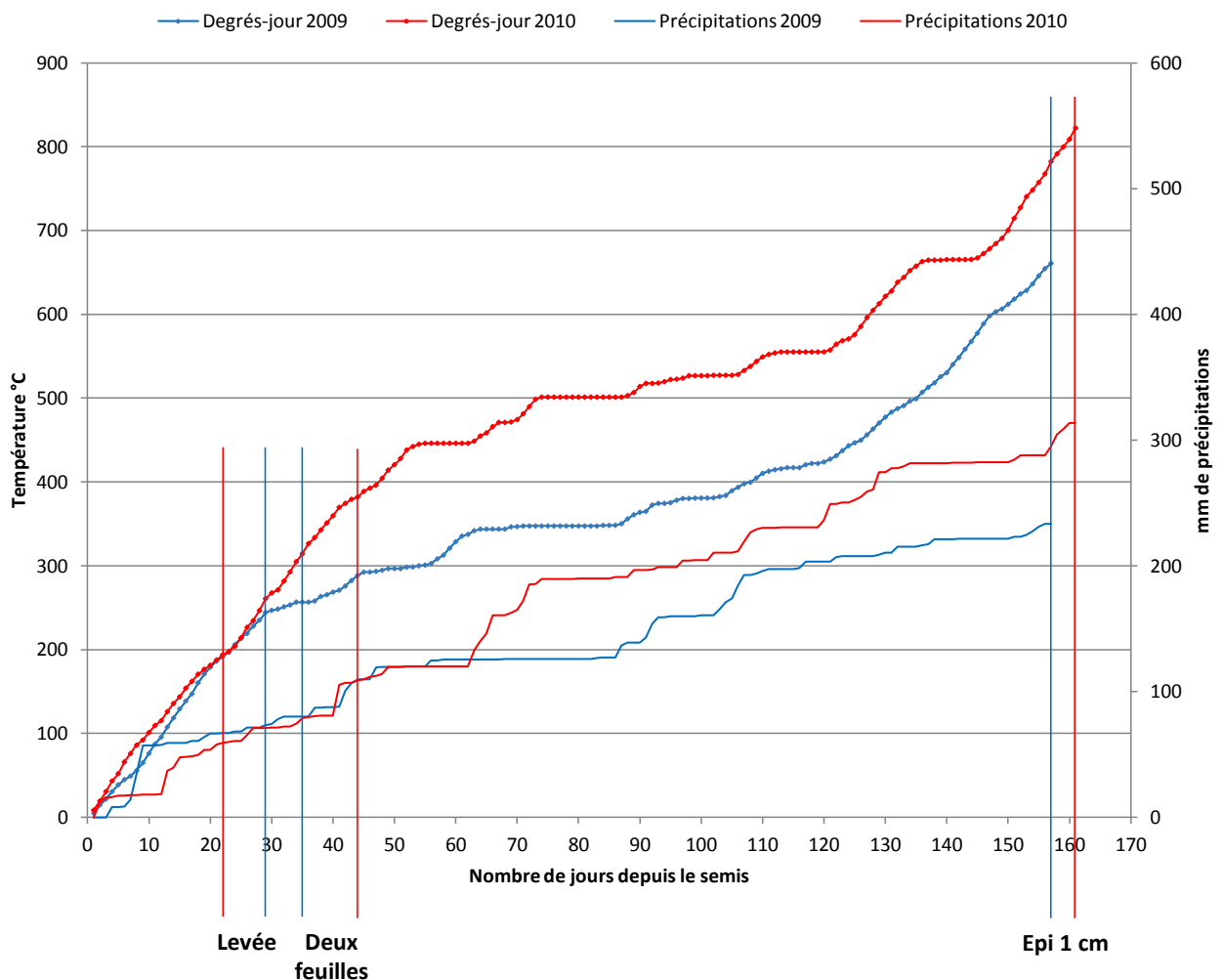


Figure 4.7 : Somme des degrés-jour et des précipitations du semis au stade épi 1 cm

Les axes verticaux en couleur indiquent les dates de restitution des notations aux différents stades de développement du blé.

## II.3.2 Du point de vue des champignons phytopathogènes

Dès le semis, le nombre d'heures cumulant une température supérieure à 10°C et une humidité supérieure à 80% a été plus élevé en 2010 qu'en 2009 (Figure 4.8). Ce nombre a augmenté jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour en 2009 pour atteindre une centaine d'heures alors qu'il a augmenté jusqu'au 70<sup>ème</sup> jour en 2010 pour atteindre une valeur autour de 225 heures. Les deux années, le nombre d'heures cumulant une température supérieure à 15°C et une humidité supérieure à 80% a été faible, ce nombre ayant même été pratiquement nul en 2009.

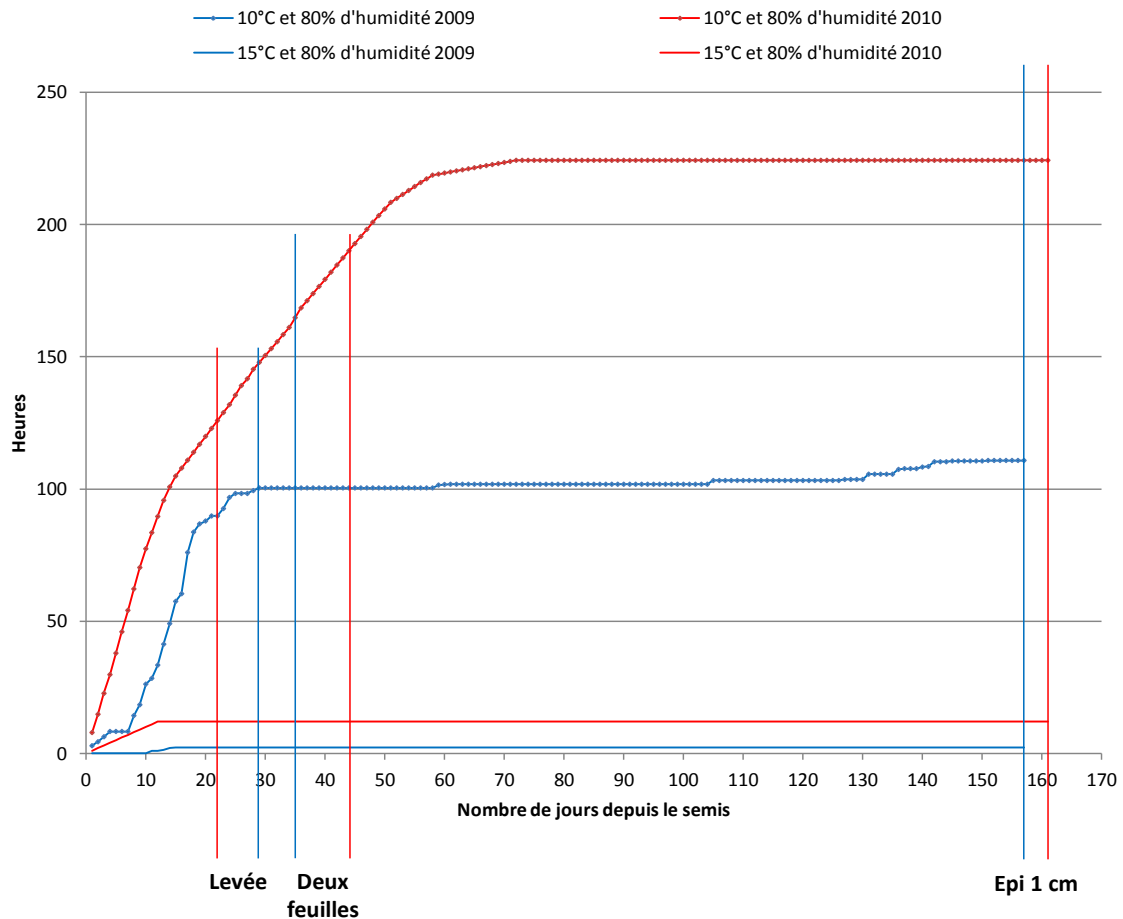


Figure 4.8 : Somme des heures au-dessus de 10 et 15 °C et de 80% d'humidité du semis au stade épi 1 cm

Les axes verticaux en couleur indiquent les dates de restitution des notations aux différents stades de développement du blé.

## II.4 Discussion des résultats collectés pendant la période hivernale durant les deux années d'essai

### II.4.1 Effet de l'inoculum présent sur les résidus de culture

Les résultats de l'année 2009 ont montré que la présence de *F. graminearum* sur des résidus enfouis dans la couche superficielle du sol pouvait avoir des effets sur la culture de blé suivante puisque les parcelles inoculées au semis ont été significativement affectées lors des notations à la levée et au stade épi 1 cm du blé (Tableaux 4.2 et 4.7). Cet effet s'est manifesté à la fois par des pertes à la levée mais aussi par des parcelles apparaissant moins vigoureuses, comme l'ont prouvé les notations de la vigueur de la levée estimée par méthode visuelle et de la vigueur des plantules au stade épi 1 cm estimée par analyse d'image. Ce déficit de développement a pu être causé par le déficit de levée, les différentes notations étant corrélées entre elles (Tableau 4.8), mais aussi par des plantes en retard ou physiologiquement affectées par les pathogènes. Ce phénomène est en accord avec plusieurs études qui ont montré qu'un sol contaminé par *F. graminearum* pouvait provoquer des pertes pré- et post-levée et augmentait le taux de maladie sur racines et plantules (Asran and Amal, 2011; Wang et al., 2006). Dans certains cas, les plantes étaient aussi moins vigoureuses ce qui s'est traduit par un poids inférieur des plantules dans les sols infectés par rapport au contrôle (Asran and Amal, 2011), mais ce phénomène ne se vérifie pas toujours (Jones, 1999). La présence de résidus contaminés dans la couche superficielle du sol, suite à un travail simplifié de ce sol (Bateman et al., 2007; Bateman et al., 1998; Fernandez and Chen, 2005) ou à la remontée de résidus par labourage d'un sol dans lequel des résidus avaient été enfouis l'année précédente (Weber et al., 2001), représente en outre un risque particulier de développement de la maladie.

L'expression de la maladie pendant la période hivernale en 2008-2009 a été confirmée par l'effet variétal. Lors de cette campagne, les variétés sensibles, Charger et Maxwell ont été plus atteintes que la variété Apache, que l'on considère la levée (Tableau 4.2), la notation de la maladie au stade deux feuilles (Tableau 4.4) ou la notation au stade épi 1 cm (Tableau 4.7). Cet effet variétal n'est pas dû aux propriétés intrinsèques des différentes variétés de blé car il n'existait pas dans l'essai contrôle ITK.

### II.4.2 Effet de l'inoculum présent sur les semences

L'année 2010 a été différente de la précédente : l'inoculation au semis n'a eu d'effet sur aucune des notations et l'effet variétal associé à l'expression de la maladie, a disparu (Tableaux 4.2, 4.4 et 4.7). Si l'on considère le taux de maladie au stade deux feuilles, c'est la variété résistante, Apache, qui a été la plus touchée, bien que la différence n'ait pas été significative (Tableau 4.4). Cependant les comparaisons avec l'essai ITK sur le pourcentage de levées (Tableau 4.3), sur le taux de maladie au stade deux feuilles et sur la vigueur des plantules au stade épi 1 cm ont montré que l'essai Fusa10 avait tout de même été plus touché par la maladie que l'essai ITK10. De même en 2009, bien que l'inoculation au semis n'ait pas eu d'effet sur la notation du taux de maladie au stade deux feuilles, l'effet variétal en avait un (Tableau 4.4), et la comparaison des notations à la levée des essais Fusa09 et ITK09 montrait déjà que l'essai Fusa était le plus touché (Tableau 4.3). La seule différence entre les essais Fusa et ITK, outre l'inoculation au semis, était l'enrobage des graines semées par des

fongicides. Les différences observées peuvent être uniquement attribuées à l'inoculum présent sur les semences. Cet inoculum n'était pas négligeable, comme l'ont montré les états sanitaires de la partie I. Cet inoculum présent sur les semences semble être celui qui tient le rôle prépondérant lors de la période hivernale puisqu'il s'est exprimé même lorsque l'inoculation au semis n'a pas eu d'effet. Plusieurs études ont montré que l'utilisation de graines contaminées provoquait effectivement une augmentation des pertes à la levée et du taux de maladie sur plantules (Bateman, 2005; Fernandez et al., 2009a; Hudec, 2006; Jones, 1999; Timmermans et al., 2009). L'inoculum présent sur les semences peut être contrôlé par l'enrobage des semences, comme l'a montré l'état sanitaire effectué sur graines enrobées (partie I). Le phénomène est confirmé par plusieurs études (Cannaert and Sztor, 2006; Fernandez et al., 2009a; Glynn et al., 2008; Haigh et al., 2009; Hare et al., 1999; Hudec, 2006; Jones, 1999; Schaafsma and Tamburic-Ilincic, 2005), mais doit être pris en compte dans le cadre actuel de restriction de l'utilisation des pesticides (Timmermans et al., 2009). Les isolements faits à partir des symptômes relevés au stade deux feuilles plaident aussi en faveur de l'implication de l'inoculum présent sur les semences durant la période hivernale. Aucune des mises en culture n'a permis d'isoler de *F. graminearum* (Tableau 4.6). Les souches isolées étaient des *M. nivale* et un *F. tricinctum*. Le *F. tricinctum* a été isolé à partir d'une plantule de la variété Charger, et les *M. nivale* ont été isolés à partir des trois variétés de blé utilisées. Ces deux espèces étaient présentes lors de la caractérisation de l'état sanitaire effectuée sur les semences analysées.

#### II.4.3 Effets du climat sur la croissance des plantes et sur la croissance de l'inoculum responsable de la maladie

Bien que des phénomènes communs aux deux années de test aient pu être dégagés, ces dernières ont clairement été différentes. La comparaison des deux années a montré pour toutes les notations étudiées que la maladie avait été plus forte durant l'hiver 2008-2009 que durant l'hiver 2009-2010 (Tableau 4.5). Les plantes levées lors de la seconde campagne étaient plus nombreuses et plus vigoureuses. L'étude des corrélations entre les différentes notations montre qu'une année où la croissance hivernale des plantes a été difficile, en 2008-2009, la vigueur des parcelles était dépendante de la levée jusqu'au stade épi 1 cm et que dans une certaine mesure la maladie à deux feuilles l'était également (Tableau 4.8). En revanche, lorsque la croissance hivernale a été plus aisée, en 2009-2010, la vigueur à deux feuilles était toujours corrélée à la levée mais pas celle au stade épi 1 cm (Tableau 4.9). Le taux de maladie au stade deux feuilles n'était en outre corrélé avec aucune des autres notations.

Deux phénomènes principaux peuvent expliquer la différence entre les deux campagnes. Le premier est la différence des conditions climatologiques qui a entraîné des croissances différentes des plantes de blé. La seconde est la différence à la fois quantitative et qualitative dans la contamination des graines semées. L'expression de ce second phénomène est cependant dépendant du premier car régulé par les conditions climatologiques. Toutes les comparaisons ont montré que les plantes étaient plus vigoureuses lors de la seconde année et de fait certainement d'autant moins sensibles aux attaques de la maladie, et ce dès les notations à la levée. Pourtant, en termes de sommes de températures et de précipitations les deux années étaient assez similaires lors de cette notation (Figure 4.7). Cependant, dans les

premiers jours après le semis, la seconde année a bénéficié de températures plus élevées et de plus de précipitations, phénomène qui a du favoriser la croissance végétale. Cette tendance a été fortement confirmée jusqu'à la notation épi 1 cm où la seconde année a bénéficié de 160 degrés-jour et 80 mm de précipitations de plus par rapport à la première année, favorisant le développement de plantes robustes. La croissance fongique est conditionnée par le couple température optimale-humidité suffisante. C'est pour cette raison qu'il a été choisi de présenter la somme des heures au dessus de différentes températures et au dessus de 80% d'humidité pour l'illustrer. Les températures hivernales sont plus favorables au développement de *M. nivale* qu'à celui des espèces de *Fusarium* impliquées dans le complexe de la fusariose du blé, dont la température optimale de développement est plus haute. Plusieurs études ont montré que le taux de maladie sur plantules causé par *M. nivale* augmentait lorsque la température diminuait et qu'à l'inverse, une augmentation de la température du sol favorisait le développement de la maladie causée par *F. graminearum* (Colbach et al., 1996; Glynn et al., 2008; Haigh et al., 2009; Jones, 1999). Même lors de la seconde année durant laquelle les conditions de développement ont été plus chaudes (Figure 4.8), l'espèce majoritairement isolée au stade deux feuilles a été *M. nivale*. L'effet significatif de l'inoculation au semis lors de la première année prouve pourtant que *F. graminearum* peut s'exprimer à des températures basses, mais les plantes étaient aussi plus faibles. Lors de la seconde année, pendant laquelle les plantes étaient plus vigoureuses, *F. graminearum* ne s'est pas exprimé. Bien que les taux globaux de contamination des semences aient été similaires lors des deux années, les proportions de *M. nivale* étaient plus importantes la première année. Les conditions climatiques, moins favorables au développement des plantes, ont en plus favorisé le développement de l'espèce fongique capable de s'exprimer aux températures les plus basses. Les proportions de *M. nivale* étaient moins importantes la seconde année et celles de *Fusarium*, notamment *F. tricinctum*, plus élevées. Malgré des températures plus chaudes, elles n'étaient certainement pas suffisantes pour que l'inoculum majoritaire présent sur les semences s'exprime sur des plantes vigoureuses. *F. tricinctum* est d'ailleurs une espèce peu agressive sur plantules (Arseniuk et al., 1993; Chelkowski et al., 1989; Kane and Smiley, 1987). La seule espèce capable de s'exprimer a donc été *M. nivale*.

#### II.4.4 Conclusions sur le développement de la maladie durant la période hivernale

Les résultats accumulés durant la période hivernale confirment l'importance de la gestion des résidus de culture dans le développement de la fusariose du blé sur plantules. Des résidus contaminés enfouis dans la couche superficielle du sol, mimés dans l'essai par l'inoculation au semis, peuvent fournir l'inoculum primaire nécessaire au développement de la maladie. L'effet de résidus contaminés laissés en surface n'a pas été étudié ici, cette inoculation n'intervenant dans l'essai qu'à partir du stade deux nœuds du blé. Cependant elle pourrait également avoir un effet. Malgré l'action des résidus enfouis, l'inoculum principalement responsable de la maladie a été celui présent sur les semences de blé, en particulier *M. nivale*. Cet inoculum peut-être contrôlé par l'enrobage des graines comme l'a montré l'essai contrôle. Le développement de la maladie est en outre étroitement lié aux conditions climatologiques et



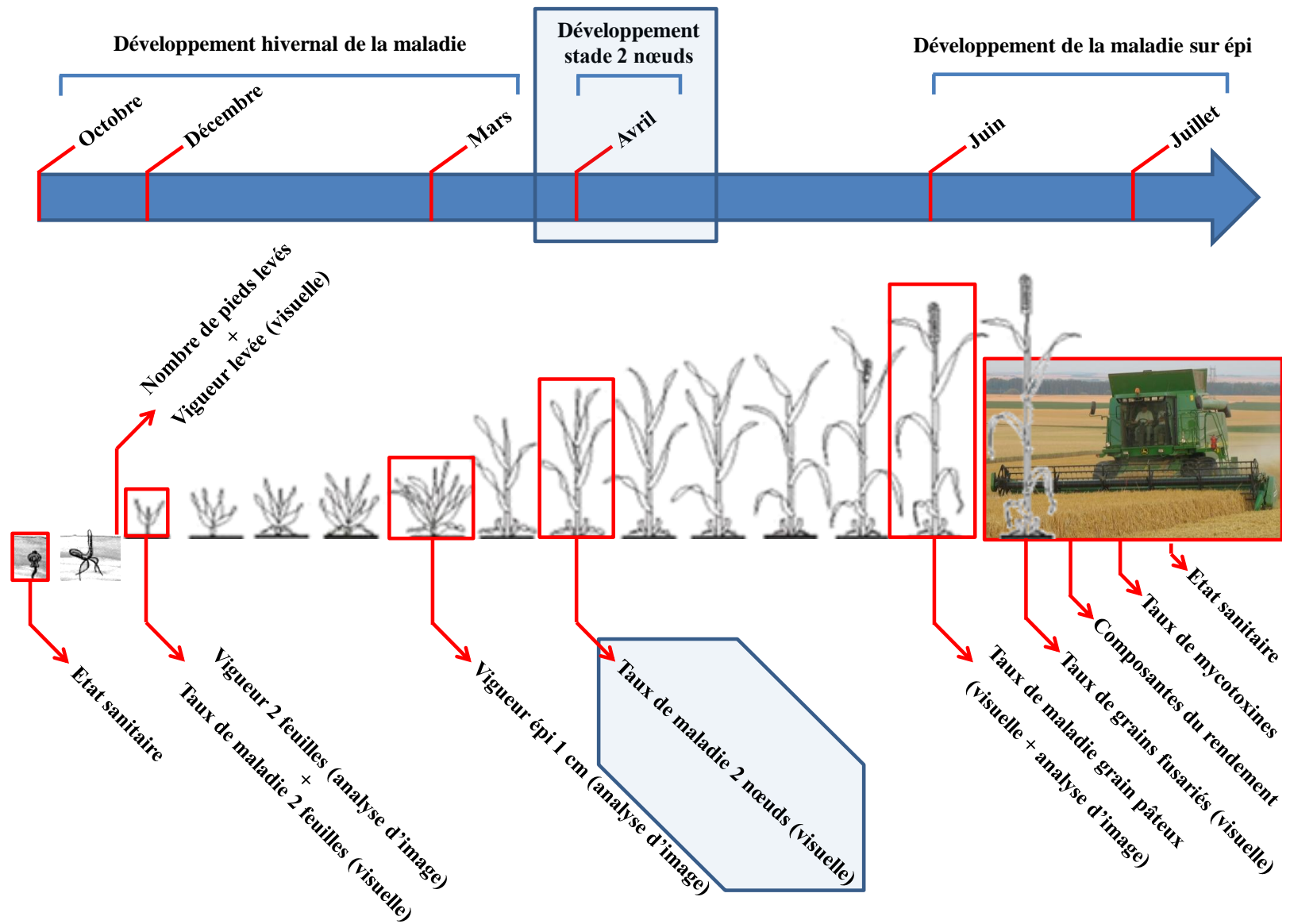


Figure 4.9 : Notations et observations faites sur les cultures de blé au stade deux nœuds durant les deux années d'essai

particulièrement à l'équilibre croissance végétal – croissance de l'inoculum qu'elles entraînent.

### **III Etude du développement de la maladie au stade deux nœuds**

#### **III.1 Résultats des notations au stade deux nœuds**

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au développement de la maladie au stade deux nœuds du blé en regardant les symptômes apparaissant sur la gaine et la tige sous le premier nœud, sur le premier nœud, et sur la gaine et la tige au-dessus du premier nœud (Figure 4.9). Les tableaux bruts résumant les notations au stade deux nœuds sont présentés en annexe 36.

##### **III.1.1 Notations des essais Fusa et ITK en 2009**

Dans l'essai Fusa09, pour les taux de maladie sur la gaine sous le premier nœud, sur le premier nœud et sur la tige au-dessus du premier nœud, aucun facteur n'était significatif (Tableau 4.10).

Pour les autres variables considérées, le pourcentage de plantes malades (plante qui ne présente de symptôme sur aucune des parties étudiées) et les taux de maladie sur la tige sous le premier nœud, sur la gaine au-dessus du premier nœud et la somme des symptômes, seul le facteur variétal a eu un effet significatif. Il a été le même pour toutes les variables : Apache est la variété sur laquelle la maladie a été la plus forte et Charger celle sur laquelle elle a été la plus faible. Maxwell a été intermédiaire : parfois au niveau de Charger (pourcentage de plantes malades, taux de maladie sur la tige sous le premier nœud), parfois au niveau d'Apache (taux de maladie sur la gaine au-dessus du premier nœud), et parfois sans différence significative avec Apache et Charger (somme des symptômes).

Dans l'essai ITK, c'est également le facteur variétal qui s'est le plus exprimé : son effet était non significatif uniquement pour le taux de maladie sur la gaine sous le premier nœud (Tableau 4.10). A l'inverse des observations effectuées dans l'essai Fusa09, la maladie sur Apache a été significativement plus haute que celle observée sur Charger uniquement pour le taux de maladie sur la gaine sous le premier nœud. Les taux de maladie étaient au même niveau sur Apache et Charger pour la notation sur la tige au-dessus du premier nœud. Pour toutes les autres observations, le taux de maladie sur Apache était significativement plus bas que celui sur Charger (pourcentage de plantes malades, taux de maladie sur le premier nœud, sur la gaine au-dessus du premier nœud et somme des symptômes).

La conduite a aussi eu un effet sur le pourcentage de plantes malades et sur la somme des symptômes : les parcelles extensives étaient plus touchées que les parcelles intensives. L'effet bloc a en outre été omniprésent.

Fusa09								
Facteur	Source de variation	Plantes malades (excepté gaine<N1, en%)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	Tige<N1 <sup>a</sup>	N1 <sup>a</sup>	Gaine>N1 <sup>a</sup>	Tige>N1 <sup>a</sup>	Somme symptômes
Inoculation au semis	+ -	NS		NS		NS		NS
Inoculation à 2 nœuds	+ -	NS		NS		NS		NS
Variété	Apache	59,6a	NS	25,7a	NS	9,9a	NS	98,3a
	Charger	41,5b		13,6b		4,6b		77,8b
	Maxwell	47,6b		12,9b		10,7a		84,3ab
Bloc	1	NS		NS		NS		NS
	2							
	3							
	4							
ITK09								
Irrigation	+ -	NS		NS	NS	NS	NS	NS
Conduite	Extensif	46,8a		NS	NS	NS	NS	90,0a
	Intensif	37,3b						83,8b
Variété	Apache	46,5b	NS	25,0a	8,7b	5,1b	2,0a	90,0b
	Charger	57,1a		19,6b	19,4a	13,1a	2,8a	104,6a
	Ephoros	22,5c		7,3c	5,1c	3,4b	0,7b	65,9c
Bloc	1	42,0b		13,5b	14,1a	NS	3,1a	88,0ab
	2	56,5a		26,8a	10,2bc		2,2ab	95,2a
	3	42,5b		15,6b	12,5ab		1,7b	85,3ab
	4	27,1c		13,1b	7,5c		0,3b	78,9b

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en nombre de plantes malades pour 50 plantes ; Gaine<N1 : gaine sous le 1<sup>er</sup> nœud ; Tige<N1 : tige sous le 1<sup>er</sup> nœud ; N1 : premier nœud ; Gaine>N1 : gaine au-dessus du premier nœud ; Tige>N1 : tige au-dessus du premier nœud

Tableau 4.10 : Notation du taux de maladie au stade deux nœuds pour les essais Fusa et ITK en 2009

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

### III.1.2 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2009

Ont été comparées entre elles les parcelles des variétés Apache et Charger de l'essai Fusa09 (pas d'influence des inoculations au semis et à deux nœuds) et les parcelles des variétés Apache et Charger irriguées intensives de l'essai ITK09. La comparaison des essais Fusa09 et ITK09 montre qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les deux essais (Tableau 4.11). En revanche, l'interaction essai x variété montre que le pourcentage de plantes malades pour la variété Apache dans l'essai Fusa09 était significativement plus élevée que celui dans l'essai ITK09.

### III.1.3 Notations des essais Fusa et ITK en 2010

Pour 2010, il avait été décidé de ne noter à ce stade que les parcelles non-inoculées à deux nœuds. En 2009, ce facteur n'avait pas eu d'influence sur le taux de maladie observé. Pour contrôle, les parcelles de la variété Charger inoculées à deux nœuds ont tout de même été notées. L'exploitation des résultats a montré que la décision de ne pas noter les parcelles inoculées à deux nœuds était mauvaise : ce facteur a eu une influence en 2010. Les tableaux suivants détaillent les résultats de cette notation, les résultats de la ligne inoculation au stade deux nœuds concernent uniquement la variété Charger, les résultats des autres lignes concernent uniquement les parcelles non-inoculées au stade deux nœuds.

En 2010, seule la notation sur la gaine sous le premier nœud n'a été influencée par aucun des facteurs considérés (Tableau 4.12). Comme lors de l'essai de 2009, l'inoculation au semis des parcelles n'a pas eu d'effet sur la notation à deux nœuds. De même, lorsque la variété a eu un effet sur la notation, Apache a toujours été la plus touchée. Les résultats ont pourtant été moins tranchés que l'année précédente car la différence entre Apache et Charger n'était significative que pour le pourcentage de plantes touchées, le taux de maladie sur la gaine sous le premier nœud et la somme des symptômes. Pour le taux de maladie sur la tige au-dessus du premier nœud, Apache et Charger étaient au même niveau. En revanche, Maxwell était la variété intermédiaire en 2009, elle a été celle la moins touchée en 2010 : les taux de maladie sur la tige sous le premier nœud et sur la tige au-dessus du premier nœud ont été significativement plus bas pour cette variété que pour les deux autres. Pour le pourcentage de plantes malades, Maxwell n'a pas été différente des deux autres variétés. Enfin, pour la somme des symptômes, Maxwell a été au niveau de Charger, significativement moins touchée qu'Apache.

La comparaison des parcelles de la variété Charger inoculées et non-inoculées à deux nœuds montre que les parcelles inoculées ont été plus atteintes que les parcelles non-inoculées : le pourcentage de plante malades et les taux de maladie sur et au-dessus du premier nœud, ainsi que la somme des symptômes ont été plus élevés dans les parcelles inoculées. De plus, les parcelles de la variété Charger inoculées au semis ont été significativement plus touchées (29,0 plantes touchées pour 50 plantes) que celles non-inoculées au semis (23,4 plantes touchées pour 50 plantes) en ce qui concerne la notation sur la gaine au dessus du premier nœud.

2009								
Facteur	Source de variation	Plantes malades (excepté gaine<N1, en %)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	Tige<N1 <sup>a</sup>	N1 <sup>a</sup>	Gaine>N1 <sup>a</sup>	Tige>N1 <sup>a</sup>	Somme symptômes
Essai	Fusa09	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	ITK09							
Interaction	Fusa09 x Apache	59,6a	NS	25,9a	14,1ab	9,9a	NS	98,3a
	Fusa09 x Charger	41,5b		13,6b	10,8ab	4,6a		77,6a
	ITK09 x Apache	32,0b		19,3ab	7,8b	5,8a		81,3a
	ITK09 x Charger	53,5ab		19,0ab	19,8a	11,3a		101,5a

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en nombre de plantes malades pour 50 plantes ; Gaine<N1 : gaine sous le 1<sup>er</sup> nœud ; Tige<N1 : tige sous le 1<sup>er</sup> nœud ; N1 : premier nœud ; Gaine>N1 : gaine au-dessus du premier nœud ; Tige>N1 : tige au-dessus du premier nœud

Tableau 4.11 : Comparaison des essais Fusa09 et ITK09 pour le taux de maladie au stade deux nœuds

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Fusa10								
Facteur	Source de variation	Plantes malades (%)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	Tige<N1 <sup>a</sup>	N1 <sup>a</sup>	Gaine>N1 <sup>a</sup>	Tige>N1 <sup>a</sup>	Somme symptômes
Inoculation au semis	+	NS		NS	NS	NS	NS	NS
	-							
Inoculation à deux nœuds (Charger)	+	99,6a	NS	NS	36,5a	39,4a	14,9a	157,4a
	-	96,0b			26,8b	13,0b	5,3b	108,6b
Variété	Apache	99,0a	NS	32,4a	NS	NS	8,0a	131,6a
	Charger	96,0b		16,6b			5,3a	108,6b
	Maxwell	97,8ab		5,1c			1,3b	94,6b
Bloc	1	NS		NS	37,8a	15,5a	4,5ab	127,3a
	2				20,0b	7,7b	2,2b	98,3b
	3				23,1b	14,0a	4,8ab	106,0ab
	4				25,7b	16,7a	7,8a	114,3ab
ITK10								
Irrigation	+	63,5b	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	-	74,8a						
Conduite	Extensif	57,8b	26,8b	NS	NS	3,9b	0,4b	0,4b
	Intensif	80,5a	38,8a			7,8a	2,2a	2,2a
Variété	Apache	78,5a	36,5a	16,3a	20,8a	10,9a	2,8a	2,8a
	Charger	73,3a	35,0a	4,8b	15,6ab	4,0b	1,0ab	1,0ab
	Ephoros	55,8b	26,8a	4,0b	6,4b	2,8b	0,1b	0,1b
Bloc	1	64,2b	NS	13,0a	NS	NS	NS	NS
	2	74,2a		3,7b				

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en nombre de symptômes pour 50 plantes ; Gaine<N1 : gaine sous le 1<sup>er</sup> nœud ; Tige<N1 : tige sous le 1<sup>er</sup> nœud ; N1 : premier nœud ; Gaine>N1 : gaine au-dessus du premier nœud ; Tige>N1 : tige au-dessus du premier nœud

Tableau 4.12 : Notation du taux de maladie au stade deux nœuds pour les essais Fusa et ITK en 2010

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

2010								
Facteur	Source de variation	Plantes malades (excepté gaine<N1, en %)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	Tige<N1 <sup>a</sup>	N1 <sup>a</sup>	Gaine>N1 <sup>a</sup>	Tige>N1 <sup>a</sup>	Somme symptômes
Essai	Fusa10	97,5a	48,1a	24,6a	NS	NS	NS	NS
	ITK10	89,0b	39,6b	14,8b				

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en nombre de symptômes pour 50 plantes ; Gaine<N1 : gaine sous le 1<sup>er</sup> nœud ; Tige<N1 : tige sous le 1<sup>er</sup> nœud ; N1 : premier nœud ; Gaine>N1 : gaine au-dessus du premier nœud ; Tige>N1 : tige au-dessus du premier nœud

Tableau 4.13 : Comparaison des essais Fusa10 et ITK10 pour le taux de maladie au stade nœuds

Au sein d'une même colonne, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Fusa et ITK 2009 et 2010		
Facteur	Source de variation	Nombre de symptômes notés
Partie de la plante considérée (parcelles comparables de Fusa et ITK 2009 et 2010)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	47,3a
	Tige<N1 <sup>a</sup>	20,6b
	N1 <sup>a</sup>	17,3c
	Gaine>N1 <sup>a</sup>	9,6d
	Tige>N1 <sup>a</sup>	2,9e
Partie de la plante considérée (parcelles de la variété Charger inoculées et non inoculées à deux nœuds en 2010)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	45,9a
	Tige<N1 <sup>a</sup>	19,2d
	N1 <sup>a</sup>	31,6b
	Gaine>N1 <sup>a</sup>	26,2c
	Tige>N1 <sup>a</sup>	10,1e

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en nombre de symptômes pour 50 plantes ; Gaine<N1 : gaine sous le 1<sup>er</sup> nœud ; Tige<N1 : tige sous le 1<sup>er</sup> nœud ; N1 : premier nœud ; Gaine>N1 : gaine au-dessus du premier nœud ; Tige>N1 : tige au-dessus du premier nœud

Tableau 4.14 : Comparaison du nombre de symptômes observés en fonction de la partie de la plante considérée quelles que soient l'année et la conduite de l'essai (Fusa ou ITK)

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05

Pour l'essai ITK, l'irrigation a eu un effet sur le pourcentage de plantes malades : les parcelles irriguées ont été plus touchées que les parcelles non-irriguées (Tableau 4.12). La conduite a aussi eu un effet, mais inverse de celui observé en 2009 : les parcelles intensives ont été plus touchées que les parcelles extensives lorsque l'on considère le pourcentage de plantes malades, les taux de maladie sur la gaine sous le premier nœud, sur la gaine et la tige au-dessus du premier nœud et la somme des symptômes. Les résultats du facteur variétal ont été similaires à ceux observés dans l'essai Fusa10 : Apache a toujours été la plus touchée, parfois significativement plus que Charger (tige sous le premier nœud, gaine au-dessus du premier nœud), parfois au même niveau statistique que Charger (pourcentage de plantules malades, gaine sous le premier nœud, premier nœud, tige au-dessus du premier nœud et somme des symptômes). L'effet bloc n'a été significatif que pour le pourcentage de plantules malades et pour le taux de maladie sur la tige sous le premier nœud. Enfin, l'interaction inoculation au semis x inoculation à deux nœuds a provoqué l'apparition de plus de symptômes sur la gaine au-dessus du premier nœud que l'interaction non-inoculation au semis x inoculation à deux nœuds.

#### III.1.4 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2010

Ont été comparées entre elles les parcelles des variétés Apache et Charger de l'essai Fusa10 non-inoculées à deux nœuds et les parcelles des variétés Apache et Charger irriguées-intensives pour l'essai ITK10. Contrairement à l'année 2009, l'essai Fusa10 a été plus touché par la maladie que l'essai ITK10 : le pourcentage de plantes malades et les taux de maladie sur la gaine et la tige sous le premier nœud ont été significativement plus élevés dans l'essai Fusa10 (Tableau 4.13). Sur le premier nœud et au-dessus, les taux de maladie ont été également plus forts dans l'essai Fusa10 mais la différence n'a pas été significative.

#### III.1.5 Notation de la maladie en fonction de la partie de la plante considérée

Cette comparaison porte d'une part sur toutes les parcelles comparables des essais Fusa et ITK des années 2009 et 2010, c'est-à-dire les parcelles des variétés Apache et Charger irriguées-intensives des essais ITK09 et ITK10, toutes les parcelles des variétés Apache et Charger de l'essai Fusa09 (pas d'effet des inoculations au semis et à deux nœuds) et les parcelles des variétés Apache et Charger non-inoculées à deux nœuds de l'essai Fusa10 ; d'autre part, sur les parcelles de la variété Charger inoculées et non-inoculées à deux nœuds de l'essai Fusa10. En regroupant les données des deux années et des deux essais, à l'exception des parcelles de la variété Charger inoculées à deux nœuds en 2010, on constate que la maladie a été ascendante et a progressé de l'extérieur vers l'intérieur de la plante : plus la partie de la plante notée était proche du sol et plus la quantité de symptômes était importante, et d'autre part, les gaines ont été plus malades que les tiges qu'elles recouvraient (Tableau 4.14). Si l'on considère les parcelles inoculées et non-inoculées à deux nœuds de la variété Charger de l'essai Fusa10, l'ordre change : le taux de maladie sur la gaine sous le premier nœud était toujours significativement le plus élevé mais il a été suivi par le taux de maladie sur le premier nœud puis le taux de maladie sur la gaine au-dessus du premier nœud. Venaient ensuite la tige sous le premier nœud puis la tige au-dessus du premier nœud.



Fusa								
Facteur	Source de variation	Plantes malades (excepté gaine<N1, en %)	Gaine <N1 <sup>a</sup>	Tige<N1 <sup>a</sup>	N1 <sup>a</sup>	Gaine>N1 <sup>a</sup>	Tige>N1 <sup>a</sup>	Somme symptômes
Année	2009	49,6b	NS	NS	11,8b	8,4b	1,1b	86,8b
	2010	97,6a			26,7a	13,5a	4,8a	111,6a
ITK								
Année	2009	42,0b	49,5a	17,3a	11,1b	NS	NS	86,9a
	2010	69,2a	32,8b	8,3b	14,3a			62,5b

<sup>a</sup>Les résultats sont exprimés en nombre de symptômes pour 50 plantes ; Gaine<N1 : gaine sous le 1<sup>er</sup> nœud ; Tige<N1 : tige sous le 1<sup>er</sup> nœud ; N1 : premier nœud ; Gaine>N1 : gaine au-dessus du premier nœud ; Tige>N1 : tige au-dessus du premier nœud

Tableau 4.15 : Effet de l'année sur les taux de symptômes relevés dans les essais Fusa et ITK

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

### III.1.6 Effet de l'année sur les notations au stade deux nœuds

Pour l'essai Fusa, ont été comparées entre elles toutes les parcelles de l'essai Fusa09 et les parcelles non-inoculées à deux nœuds de l'essai Fusa10. Le facteur année n'a pas été significatif en ce qui concerne les taux de maladie sur la gaine et la tige sous le premier nœud pour l'essai Fusa (Tableau 4.15). En revanche, pour le pourcentage de plantes malades, les taux de maladie sur et au-dessus du premier nœud, ainsi que pour la somme des symptômes, l'essai Fusa a significativement été plus touché en 2010 qu'en 2009. Cependant, ces résultats sont à nuancer car les deux essais ne sont pas complètement comparables : en 2009, la notation était du type oui/non, un seul symptôme a donc été noté par partie de plante alors qu'en 2010, pour une même partie de la plante (gaine, tige et nœud), les symptômes étaient répertoriés selon leur nature, il peut donc y avoir eu plusieurs symptômes notés par partie de plante. La maladie en 2009 a donc été probablement sous-estimée par rapport à celle en 2010.

La comparaison des années 2009 et 2010 pour l'essai ITK est moins tranchée (Tableau 4.15). L'année n'a pas eu d'influence sur les taux de maladie sur la gaine et la tige au-dessus du premier nœud. Le pourcentage de plantes malades et le taux de maladie sur le premier nœud étaient significativement plus élevés en 2010 qu'en 2009, mais les taux de maladie sur la gaine et la tige sous le premier nœud ainsi que la somme des symptômes étaient plus élevés en 2009 qu'en 2010.

### III.1.7 Isolements au stade deux nœuds du blé

Des mises en culture à partir des symptômes observés sur des plantes prélevées dans les essais Fusa09, Fusa10 et ITK09 ont été faites au cours des deux années d'expérimentation. Ces prélèvements couvraient l'ensemble des parties de la plante sur lesquelles la maladie a été notée ainsi que l'ensemble des variétés de blé étudiées (Tableau 4.16, Figure 4.10). Les résultats ont été similaires à ceux obtenus au stade deux feuilles. Sur trente-trois mises en culture, quinze n'ont pas permis d'isoler de souche d'intérêt, dix-sept ont permis l'isolement d'un *M. nivale* et une seule a permis l'isolement d'un *F. tricinctum*.

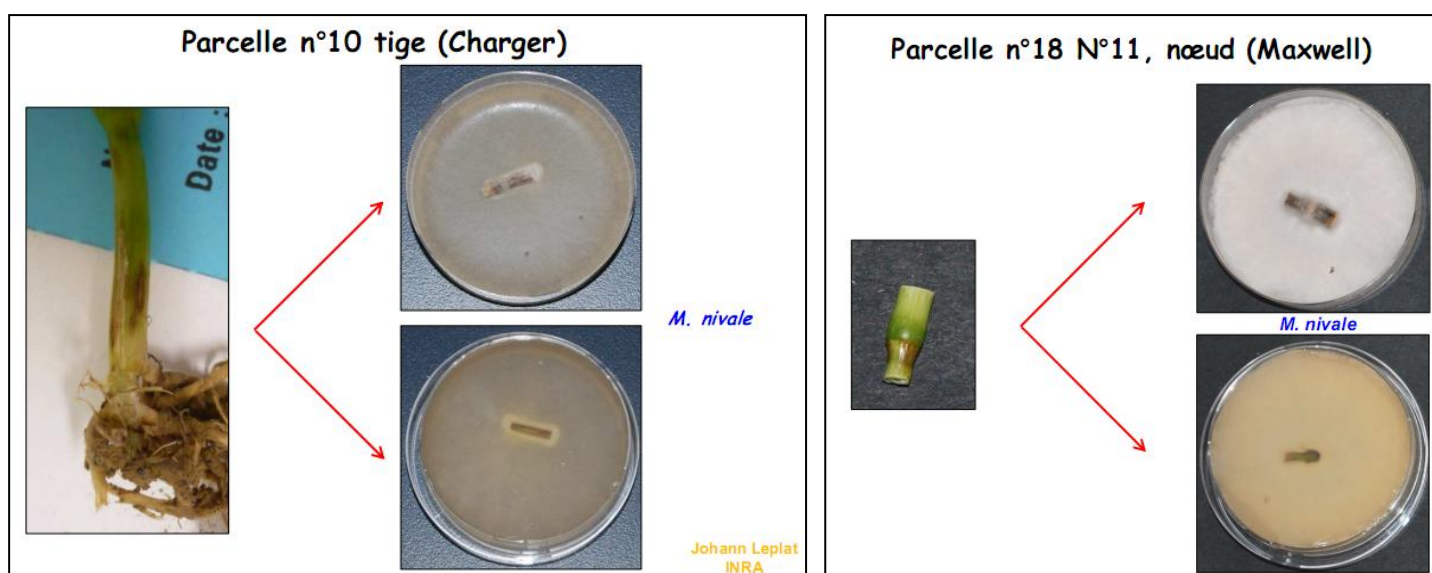


Figure 4.10 : Isolements au stade deux nœuds effectués à partir d'une tige de la variété Charger et d'un nœud de la variété Maxwell prélevés dans l'essai Fusa09

Essai	Année	Variété	Code isolement	Partie de la plante analysée	Identification spécifique des isolats
Fusa09	2009	Apache	8 tige 1	Tige	<i>M. nivale</i>
Fusa09	2009	Apache	8 tige 2	Tige	0
Fusa09	2009	Apache	8 tige 3	Tige	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa09	2009	Charger	10 tige	Tige	<i>M. nivale</i>
Fusa09	2009	Maxwell	17 tige	Tige	NI
Fusa09	2009	Maxwell	17 gaine	Gaine	NI
Fusa09	2009	Apache	18 rhizome	Rhizome	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>
Fusa09	2009	Apache	18 nœud int.	Nœud	NI
Fusa09	2009	Apache	18 nœud ext.	Nœud	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>
Fusa09	2009	Apache	36 tige	Tige	NI
Fusa09	2009	Apache	26 tige + nœud	Tige + nœud	NI
Fusa09	2009	Apache	26 tige	Tige	<i>M. nivale</i>
ITK09	2009	Charger	21 nœud 1	Nœud	NI
ITK09	2009	Charger	21 nœud 2	Nœud	<i>M. nivale</i>
ITK09	2009	Charger	21 nœud 3	Nœud	0
ITK09	2009	Ephoros	23 tige 1	Tige	<i>F. tricinctum</i>
ITK09	2009	Ephoros	23 tige 2	Tige	0
Fusa10	2010	Charger	2N10 1	Gaine	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	2N10 2	Tige	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	2N10 3	Nœud	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	2N10 4	Nœud	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	2N10 5	Nœud	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	2N10 6	Nœud	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	2N10 7	Nœud	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>
Fusa10	2010	Maxwell	2N10 8	Gaine	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Maxwell	2N10 9	Tige	0
Fusa10	2010	Maxwell	2N10 10	Gaine	<i>M. nivale</i> var. <i>nivale</i>
Fusa10	2010	Maxwell	2N10 11	Nœud	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Apache	2N10 12 <sub>1</sub>	Tige	ND
Fusa10	2010	Apache	2N10 12 <sub>2</sub>	Tige	ND
Fusa10	2010	Apache	2N10 13	Tige	ND
Fusa10	2010	Apache	2N10 14	Tige	ND
Fusa10	2010	Apache	2N10 15	Tige	ND

0 : pas de croissance ; NI : souche fongique, bactérienne ou de levure, non identifiée spécifiquement car non impliquée dans la fusariose

Tableau 4.16 : Souches isolées à partir de symptômes sur plante au stade deux nœuds

### **III.2 Corrélations entre les variables notées au stade deux nœuds**

L'intérêt de calculer les corrélations entre les différentes variables notées au stade deux nœuds est de mettre en évidence le cheminement de l'infection sur les plantes de blé.

L'exploitation des corrélations est assez compliquée en raison du nombre important de faibles corrélations et de corrélations inverses en fonction de l'année (positives en 2009 et négatives en 2010). La notation des symptômes sur la gaine sous le premier nœud n'a pas été corrélée avec les autres notations (Tableaux 4.17 et 4.18). Pour le reste, les corrélations ont été les meilleures quand les deux parties considérées de la plante étaient en contact l'une avec l'autre. Le phénomène ascensionnel et allant de l'extérieur de la plante vers l'intérieur évoqué en III.1.5 se retrouve globalement, mais avec des exceptions. Il est particulièrement bien illustré par les corrélations entre le pourcentage de plantes malades en 2009 et les notations faites sur les différentes parties de la plante, à l'exception de la gaine sous le premier nœud (Tableau 4.17). En effet, plus la partie notée de la plante était proche du sol et plus la corrélation a été forte, c'est à dire que lorsqu'un fort pourcentage de plantes étaient malades dans une parcelle, une forte proportion de tiges sous le premier nœud étaient touchées, phénomène qui s'est estompé en remontant la tige.

### **III.3 Exploitation des données climatiques au stade deux nœuds**

#### **III.3.1 Du point du vue de la plante**

Les résultats pour les données météorologiques au stade deux nœuds sont dans la continuité de ceux relevés durant la période hivernale (Figure 4.11). La somme des degré-jours et la somme des précipitations ont été plus importantes en 2010 qu'en 2009. La notation à deux nœuds en 2010 a été réalisée plus tard que celle en 2009. Le biais principal qui en résulte est qu'en 2010 l'inoculation à deux nœuds a été faite avant la notation alors qu'en 2009 l'inoculation a été faite après la notation au stade deux nœuds. Les différences entre existants entre les deux années dans les sommes de degrés-jour et de précipitations au moment de la notation à deux nœuds ont donc été d'autant plus importantes.

	% plantes malades	Gaine<N1	Tige<N1	N1	Gaine>N1	Tige>N1	Somme symptômes
% plantes malades	1						
Gaine<N1	0,164	1					
Tige<N1	0,901	0,184	1				
N1	0,805	0,277	0,727	1			
Gaine>N1	0,679	0,268	0,486	0,649	1		
Tige>N1	0,589	0,085	0,560	0,522	0,473	1	
Somme symptômes	0,916	0,413	0,894	0,881	0,765	0,628	1

Tableau 4.17 : Matrice de corrélation pour les variables notées au stade deux nœuds en 2009

	% plantes malades	Gaine<N1	Tige<N1	N1	Gaine>N1	Tige>N1	Somme symptômes
% plantes malades	1						
Gaine<N1	0,559	1					
Tige<N1	0,248	0,043	1				
N1	0,087	-0,251	0,094	1			
Gaine>N1	0,150	-0,387	0,375	0,567	1		
Tige>N1	0,188	-0,185	0,622	0,344	0,666	1	
Somme symptômes	0,311	-0,080	0,786	0,634	0,749	0,793	1

Tableau 4.18 : Matrice de corrélation pour les variables notées au stade deux nœuds en 2010

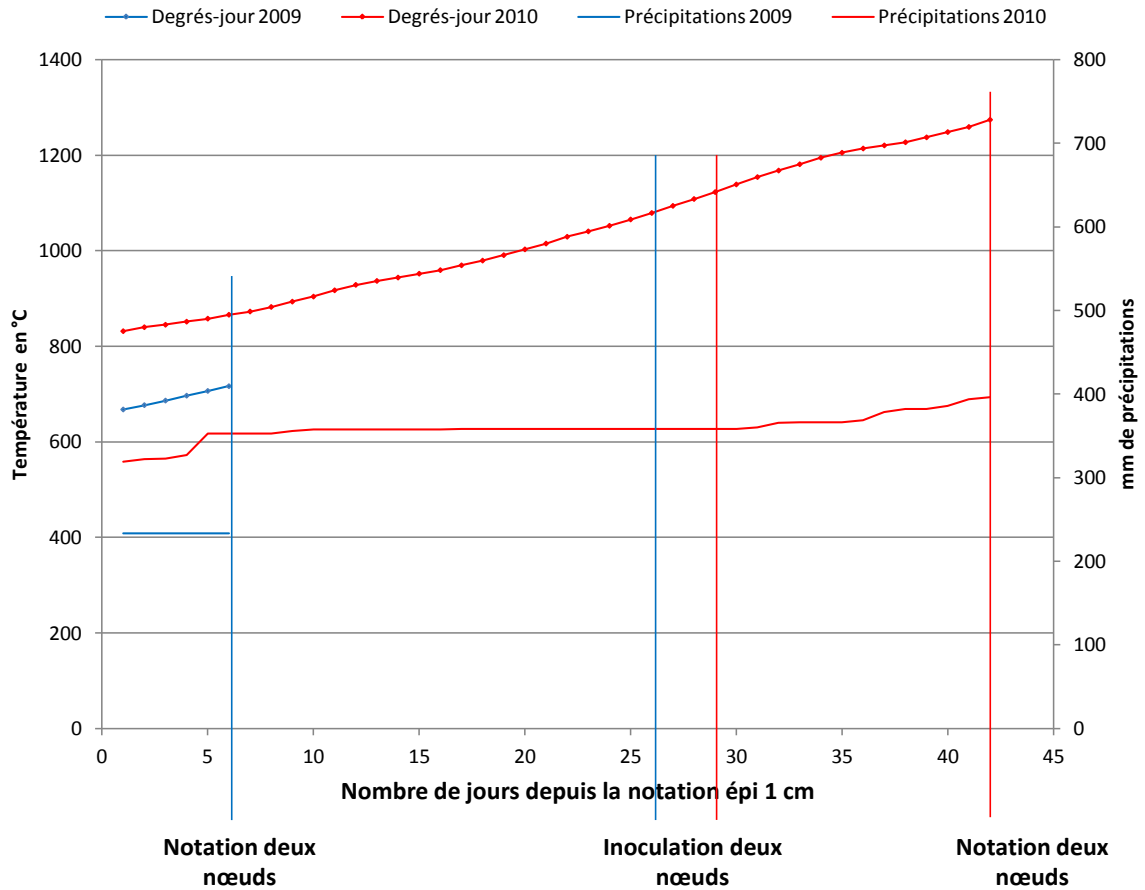


Figure 4.11 : Somme des degrés-jour et des précipitations entre le stade épi 1 cm et la notation au stade deux nœuds

Les axes verticaux en couleur indiquent les dates de restitution de la notation au stade deux nœuds et de l'inoculation au stade deux nœuds.

## III.3.2 Du point de vue des champignons phytopathogènes

Il n'y a pas eu de différence majeure dans les sommes des heures avec une température supérieure à 10 et 15°C et une humidité supérieure à 80% par rapport à ce qui a été noté durant la période hivernale (Figure 4.12). Une faible augmentation des heures supérieures à 10°C est intervenue avant la notation à deux nœuds à la fois en 2009 et en 2010.

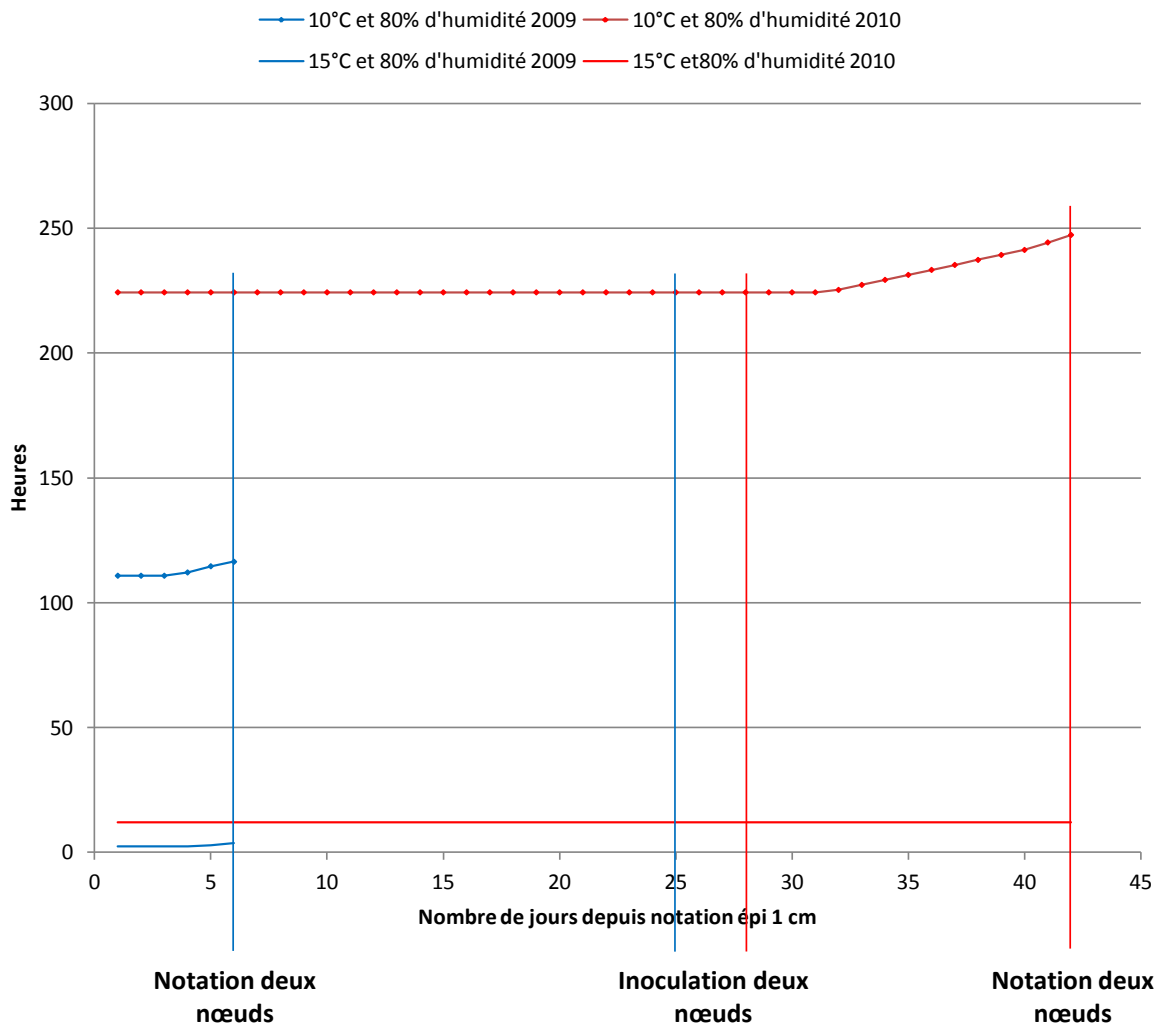


Figure 4.12 : Somme des heures au-dessus de 10 et 15 °C et de 80% d'humidité entre le stade épi 1 cm et la notation au stade deux nœuds

Les axes verticaux en couleur indiquent les dates de restitution de la notation au stade deux nœuds et de l'inoculation au stade deux nœuds.

### III.4 Discussion des résultats collectés au stade deux nœuds durant les deux années d'essai

#### III.4.1 Inoculum responsable des symptômes observés au stade deux nœuds

A l'inverse de ce qui avait été observé durant le développement hivernal de la maladie, l'inoculation au semis n'a eu aucune influence, même lors de la première année d'essai (tableaux 4.10 et 4.12). Les résidus enfouis dans la couche superficielle du sol ne semblent donc plus avoir d'influence à ce stade de développement du blé. Pourtant plusieurs études ont montré que la présence de résidus contaminés dans la couche superficielle du sol pouvait encore avoir des effets à ce stade de développement du blé (Bateman et al., 2007; Bateman et al., 1998). Nicholson et al. (1998) ont en outre montré que bien que la dose d'inoculum dans le sol ait seulement un effet léger sur les symptômes visuels sur tige, la quantité d'ADN retrouvée sur les différentes parties de la tige en était en revanche dépendante. Plus la dose initiale d'inoculum était forte et plus la quantité d'ADN retrouvée a été importante, confirmant ainsi les travaux de Cook (1968). L'effet variétal a en revanche été omniprésent lors des notations au stade deux nœuds, mais il est allé à l'encontre de ce qui était attendu puisque la variété résistante, Apache, a été plus touchée que les variétés sensibles, Charger et Maxwell. Cette tendance avait déjà été remarquée lors de la notation de la maladie au stade deux feuilles durant la deuxième année d'essai pour laquelle Apache avait été la variété la plus touchée sans que la différence avec les autres variétés ne soit significative. D'autre part, la comparaison des essais Fusa et ITK a montré que l'essai Fusa était plus touché par la maladie que l'essai ITK, même si cette différence n'est visible pour la première année que dans la comparaison des parcelles de la variété Apache et qu'elle ne concerne que les parties basses de la plante, jusqu'à la tige sous le premier nœud (Tableaux 4.11 et 4.13). La comparaison a été faite sans tenir compte des parcelles inoculées à deux nœuds de l'année 2010, la différence principale entre les deux essais à ce niveau de l'étude était donc toujours l'enrobage des semences. Il apparaît donc que l'inoculum responsable des symptômes au stade deux nœuds est toujours celui apporté par les semences mais que son effet s'est estompé avec le temps : le nombre de symptômes notés à partir du premier nœud n'a pas été suffisant pour faire apparaître des différences entre les essais. Plusieurs études confirment la responsabilité de l'inoculum présent sur les semences sur le développement de la maladie au stade deux nœuds du blé. Des souches de *F. graminearum* et de *M. nivale* inoculées sur les semences de blé ont provoqué l'apparition de symptômes sur tiges (Fernandez et al., 2009a; Haigh et al., 2009; Xi et al., 2008). Il existe néanmoins des contre-exemples lors desquels le taux de semences infectées n'a pas influencé le développement de la maladie sur la tige (Bateman, 2005). Les mises en culture à partir de symptômes ont confirmé l'importance de *M. nivale* dans le développement de la maladie jusqu'au stade deux nœuds puisque toutes les souches isolées à l'exception d'une appartenaient à cette espèce (Tableau 4.16). Une enquête sur l'interdépendance des espèces impliquées dans la fusariose de la tige de blé a relevé que *M. nivale* était une des espèces prépondérantes à ce stade sous nos latitudes (Pettitt et al., 2002). Jusqu'à ce stade, les conditions climatiques étaient toujours favorables au développement de cette espèce (Figure 4.12). Plusieurs études ont montré que les températures hivernales étaient particulièrement favorables au développement de cette espèce (Haigh et al., 2009; Pettitt et al., 1996). La prépondérance du développement de *M. nivale*



peut également expliquer pourquoi la variété Apache est apparue anormalement atteinte par la maladie jusqu'à ce stade. Les notes de résistance à la fusariose sont données pour la maladie de l'épi. Il est probable qu'Apache soit plus sensible à *M. nivale* qu'aux autres espèces et donc que la variété souffre plus pendant le développement hivernal de la maladie, ce qui n'implique pas qu'elle soit malade au stade épi. Cette hypothèse sera validée dans la suite de l'étude. Dans l'essai ITK, où les semences ont été enrobées par des fongicides, Apache a également été globalement plus atteinte que Charger mais la différence a été moins nette que dans l'essai Fusa et ne s'est pas vérifiée sur toutes les parties de la plante (Tableaux 4.10 et 4.12). Ceci confirme la responsabilité de l'inoculum porté par les semences dans le développement de la maladie à ce stade. L'efficacité du traitement de semences jusqu'au stade deux nœuds a en outre été démontré dans la bibliographie par des notations de maladie et de vigueur des plantes : les parcelles dont les semences avaient été traitées ont été moins malades et plus vigoureuses, phénomène mis en évidence à travers le taux de tallage des plants ou la longueur des tiges (Haigh et al., 2009; Schaafsma and Tamburic-Ilincic, 2005). Cependant, dans d'autres cas, le traitement de semences, bien qu'efficace au niveau de la levée, n'a pas eu d'effet sur la maladie de la tige (Fernandez et al., 2009a). Cette contradiction prouve à nouveau la complexité du système étudié qui dépend à la fois du pathogène étudié, du traitement de semences utilisé et des conditions climatiques rencontrées.

Lors de la première année d'essai, l'inoculation à deux nœuds à la surface du sol n'avait pas été faite au moment de la notation des symptômes à ce stade. La seconde année, la notation a été réalisée plus tard, l'inoculation avait déjà eu lieu, entraînant un biais qui n'avait pas été pris en compte. Cependant la notation de l'ensemble des parcelles de la variété Charger a montré que 15 jours (temps entre l'inoculation et la notation) avait été une période de temps suffisante pour permettre le développement de symptômes dus à l'inoculum de surface. Ceci prouve que des résidus contaminés laissés à la surface du sol peuvent avoir un effet sur le développement de la maladie à ce stade. L'étude de Bateman (2005) qui n'avait pas relevé d'incidence du taux de contamination des semences dans le développement de la maladie sur tige a en revanche révélé une implication de l'inoculum présent à la surface du sol. L'inoculation à deux nœuds en 2010 correspond à un radoucissement du temps avec une reprise de l'augmentation du nombre d'heures au-dessus de 10°C et 80% d'humidité (Figure 5.9). Ces observations confirment que si *M. nivale* est l'espèce qui se développe le plus facilement à des températures basses, *F. graminearum* placé dans des conditions favorables, peut aussi provoquer l'apparition de symptômes. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que *F. graminearum* était également responsable de symptômes sur tige (Mesterhazy et al., 2008; Sutton, 1982). Une enquête menée en Argentine par Larran et al. (2007) sur la nature des souches fongiques présentes sur blé a noté *F. graminearum* parmi les espèces les plus fréquemment isolées alors qu'elle n'a pas relevé la présence de *M. nivale*. Les parcelles de l'interaction inoculation au semis x inoculation à deux nœuds de la variété Charger ont été plus touchées au niveau de la gaine au-dessus du premier nœud que celles de l'interaction non-inoculation au semis x inoculation à deux nœuds. L'inoculation au semis semble donc avoir eu des effets à ce stade, même s'ils ont été faibles. Par quel procédé l'inoculation au semis s'est-elle exprimée ? Parce que les plantes inoculées au semis étaient plus faibles ? Parce qu'une partie de l'inoculum aurait pu se retrouver en surface et agir par le même biais

que l'inoculum ajouté à deux nœuds, ou parce que l'inoculum serait remonté sur la plante depuis les semences ? Les informations disponibles sont trop peu nombreuses pour conclure.

#### III.4.2 Mode de dispersion et de contamination de la plante par l'inoculum au stade deux nœuds

L'étude de l'intensité de la maladie en fonction de la partie de la plante considérée a montré qu'à l'exception des parcelles inoculées au stade deux nœuds, la maladie avait un mouvement ascendant et allait de l'extérieur de la plante vers l'intérieur de la plante (Tableau 4.14). C'est-à-dire que les parties proches du sol étaient plus touchées que les parties hautes de la plante et que les gaines étaient plus touchées que les tiges qu'elles entouraient. En considérant que l'inoculum principalement responsable de l'apparition des symptômes à ce stade était celui apporté par les semences, cette constatation est plutôt logique, l'infection partant de la graine. Ce mouvement de la maladie a globalement été renforcé par l'étude des corrélations : cette étude a montré que dans l'ensemble, les plantes malades au niveau de la tige au-dessus du premier nœud étaient aussi malades au niveau de la gaine au-dessus du premier nœud et que des plantes malades au niveau de la gaine au-dessus du premier nœud étaient aussi malades au niveau du premier nœud (Tableaux 4.17 et 4.18). L'inoculum présent dans le sol semble donc remonter le long de la plante et ce en passant par l'extérieur. Dans ce cas, il apparaît logique que les parties basses soient les plus touchées, d'autant plus qu'étant les premières à se former, ce sont elles qui ont été exposées le plus longtemps à l'inoculum. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Clement and Parry (1998) qui ont étudié la progression systémique de différentes espèces impliquées dans la fusariose du blé depuis un compost inoculé. Dans cette étude, les mêmes constatations ont été faites : plus la partie de la plante était haute et moins la présence fongique était importante et les parties externes (gainnes) étaient plus colonisées que les parties internes (tiges). L'étude microscopique de la présence fongique dans les tissus végétaux a montré que le champignon pénétrait, mais de manière superficielle, excepté à un stage avancé de la croissance du blé. Xi et al. (2008) ont fait la même constatation : le champignon pénètre dans le parenchyme de la tige mais peu dans les tissus vasculaires.

Les parcelles inoculées à deux nœuds apportent une autre information : lorsque cet inoculum était présent, la maladie a « sauté » la tige sous le premier nœud, ce qui s'est traduit par des premiers nœuds et des gaines au dessus du premier nœud plus atteintes que les tiges sous le premier nœud (Tableau 4.14). Ceci illustre l'un des phénomènes principaux de dispersion de l'inoculum présent à la surface du sol : le *splashing* (Parry et al., 1995; Paul et al., 2004; Sutton, 1982). Les eaux de pluie tombant au sol rebondissent en transportant l'inoculum et vont infecter les parties hautes de la plante. C'est ce phénomène qui a conduit à l'effet significatif de l'inoculum laissé à la surface du sol dans le développement des symptômes sur tiges dans l'étude de Bateman (2005).

#### III.4.3 Information complémentaire sur la maladie apportée par l'essai ITK

En 2009, les parcelles extensives ont été plus touchées que les parcelles intensives, le phénomène n'apparaissant que pour le pourcentage de plantes malades et la somme des

symptômes (Tableau 4.10). En 2010, les parcelles intensives ont été plus atteintes que les parcelles extensives, le phénomène apparaissant lors de plus de notations qu'en 2009 (Tableau 4.12). L'année 2009 a été particulière du fait de l'erreur due à l'apport d'azote au stade tallage dans l'essai ITK. L'année 2010 tend à montrer que l'intensification des cultures favorise l'apparition des symptômes, peut-être en favorisant la propagation de la maladie du fait de la proximité des plantes.

#### III.4.4 Différence de développement de la maladie durant les deux campagnes

Dans l'essai Fusa, le nombre de symptômes noté a été plus élevé en 2010 qu'en 2009 (Tableau 4.15). Dans l'essai ITK, le nombre de symptômes noté a été plus élevé en 2009 qu'en 2010, à l'exception de la notation sur le premier nœud. Cependant, en raison des différents biais, la comparaison est difficile. La notation 2010 a été plus tardive (environ 40 jours) laissant plus de temps à la maladie pour se développer et elle a été différente, permettant de noter plusieurs symptômes pour chaque partie de la plante considérée alors que la notation de 2009 était du type oui/non, entraînant une surestimation de la maladie. L'ensemble de ces différences rend difficile la comparaison et ne permet pas de conclusions certaines.

#### III.4.5 Conclusions sur le développement de la maladie au stade deux nœuds

Les résultats au stade deux nœuds sont dans la continuité de ceux de la période hivernale. L'inoculum principal responsable de la maladie est toujours celui apporté par les semences, mais ses effets semblent s'estomper peu à peu. Les effets de l'inoculation au stade deux nœuds commencent à se manifester provoquant deux types de propagation de la maladie : le premier, du à l'inoculum présent sur les semences remonte depuis le sol par l'extérieur de la plante, le second, du à l'inoculum à la surface du sol « saute » sur les parties hautes de la plante par splashing. Du fait des conditions climatiques, l'espèce responsable de la majorité des symptômes est toujours *M. nivale*. Apache, variété résistante à la fusariose de l'épi, est pourtant la plus malade à ce stade, illustrant une sensibilité plus forte à cette espèce pathogène.



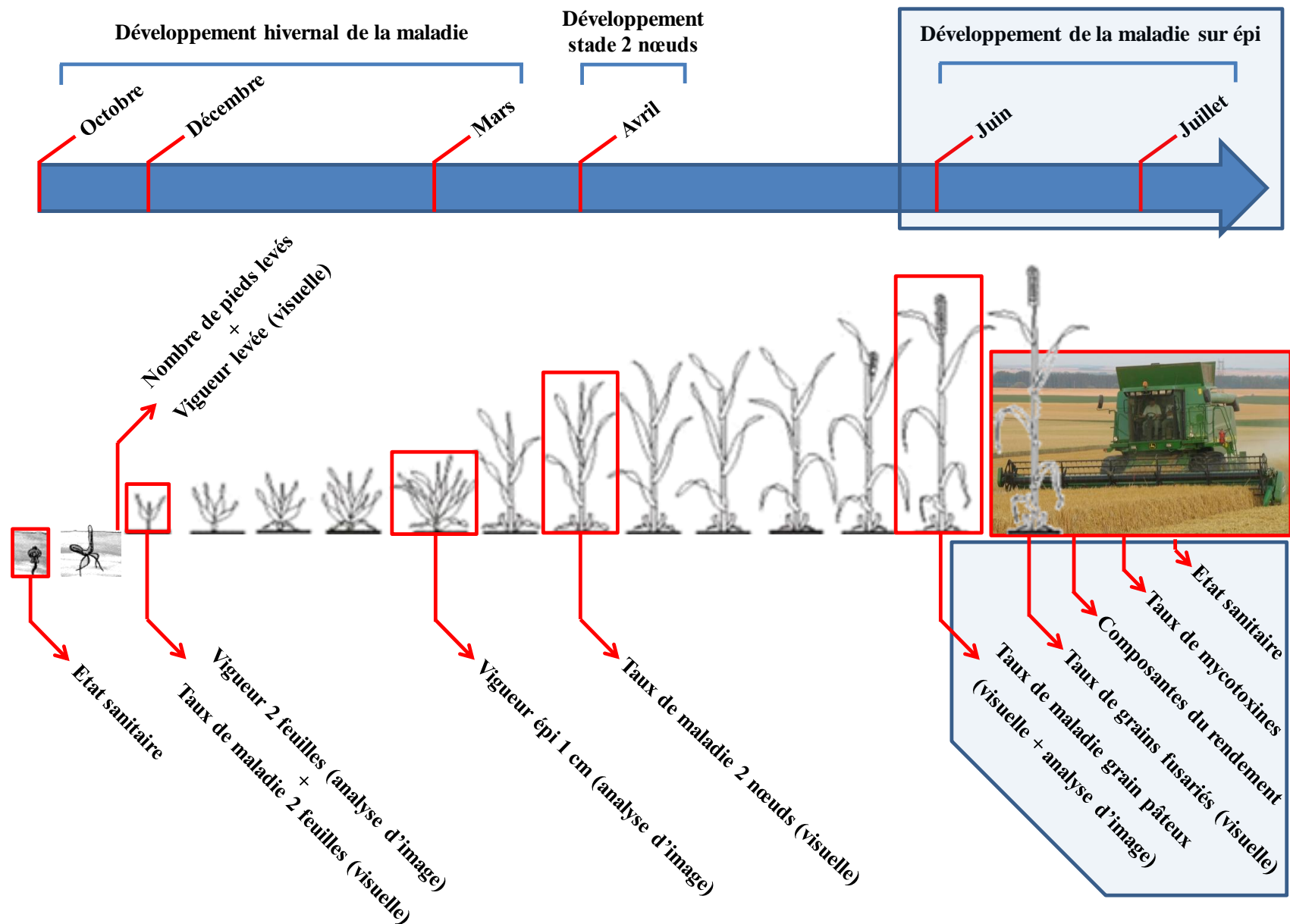


Figure 4.13 : Notations et observations faites sur les épis des cultures de blé au stade deux nœuds durant les deux années d'essai

## IV Etude du développement de la maladie sur épi

Dans cette partie nous nous sommes intéressés au développement de la maladie au stade grain pâteux et au moment de la récolte (Figure 4.13). Nous avons observé les symptômes apparaissant sur les épis de blé ainsi que les symptômes apparaissant sur les grains de blé dans les différentes modalités des essais Fusa et ITK en 2009 et 2010. Enfin nous avons déterminé les composantes du rendement et le taux d'accumulation de mycotoxines dans les grains de blé.

### IV.1 Résultats des notations sur épi

#### IV.1.1 Résultats des notations au stade grain pâteux du blé

Les tableaux bruts résumant les notations au stade grain pâteux sont présentés en annexe 37. L'étude du symptôme S1 (épillet orange) noté par méthode visuelle et par analyse d'image dans les essais Fusa sera abordée dans le chapitre suivant qui se focalise plus particulièrement sur la recherche d'indicateurs d'accumulation de mycotoxines dans les grains à partir des observations faites sur les épis de blé. Ne seront traitées dans cette partie que les informations complémentaires apportées par l'étude des autres symptômes ou de la relation entre S1 et ces autres symptômes.

##### *IV.1.1.1 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2009*

Dans l'essai Fusa 09, la variété a eu une influence sur le pourcentage de plantes malades, sur le taux de symptômes S3 (lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet), et sur la somme des symptômes mais pas l'inoculation à deux nœuds (Tableau 4.19). L'inoculation au semis n'a eu aucun effet. Le pourcentage de plantes malades et le pourcentage de S3 ont été significativement plus élevés dans les parcelles des variétés Charger et Maxwell que dans les parcelles de la variété Apache. L'étude de la somme des symptômes (S1 + S3) a fait apparaître une différence significative entre les variétés Maxwell et Charger qui n'existait pas quand les symptômes étaient étudiés séparément : la variété Maxwell a été significativement plus touchée que la variété Charger, Apache étant toujours la variété sur laquelle le taux de symptômes a été le plus faible. L'effet bloc a en outre été omniprésent.

Dans l'essai ITK09, l'effet variétal a eu une influence sur toutes les variables étudiées (Tableau 4.20). L'irrigation a eu un effet sur le taux de plantes malades, le taux de symptômes S1 et sur la somme des symptômes. Pour S1 comme pour S3, Charger a été la variété la plus touchée par la maladie. Il n'y a pas eu de différence entre les variétés Apache et Ephoros pour S1 mais pour S3 Apache a été moins touchée qu'Ephoros. L'effet variétal pour la somme des symptômes et pour le pourcentage de plantes malades a été le même que pour le taux de symptôme S3. Les parcelles non-irriguées ont été plus touchées par la maladie que les parcelles irriguées. Un effet bloc a en outre été noté.

Fusa09					
Facteur	Source de variation	Plantes malades (%)	Somme symptômes S1 et S3 (% d'épillets touchés)	S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)
Inoculation au semis	+ -	NS	NS	NS	NS
Inoculation à 2 nœuds	+ -	NS	NS	3,7a 1,9b	NS
Variété	Apache	29,0b	3,0c	1,4b	1,6b
	Charger	65,1a	8,1b	3,0a	5,2a
	Maxwell	63,6a	10,2a	4,0a	6,2a
Bloc	1	58,7ab	7,4b	2,3b	5,2b
	2	34,5c	3,9c	2,0b	1,9c
	3	66,3a	10,3a	2,4b	7,9a
	4	50,8b	6,8b	4,5a	2,4c

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet

Tableau 4.19 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai Fusa09

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

ITK09					
Facteur	Source de variation	Plantes malades (%)	Somme symptômes S1 et S3 (% d'épillets touchés)	S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)
Irrigation	+ -	50,4b 62,1a	5,9b 8,1a	1,0b 2,0a	NS
	Extensif Intensif	NS	NS	NS	NS
Variété	Apache	38,5c	3,7c	1,2b	1,3c
	Charger	75,0a	10,8a	2,1a	5,5a
	Ephoros	55,3b	6,6b	1,3b	3,3b
Bloc	1	48,3b	5,4b		2,4b
	2	54,8ab	5,3b	NS	1,8b
	3	65,7a	9,8a		6,8a
	4	56,2ab	7,4ab		2,5b

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet

Tableau 4.20 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai ITK09

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

#### IV.1.1.2 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2009

La comparaison des essais Fusa09 et ITK09 montre une différence significative uniquement pour le taux de symptôme S1 : Fusa09 a été plus touché qu'ITK09 (Tableau 4.21). Si l'on considère uniquement les parcelles non inoculées de l'essai Fusa09, l'effet significatif disparaît, bien que, comme pour S3, la moyenne du taux de symptômes ait été plus forte dans l'essai Fusa09 que dans l'essai ITK09.

Facteur	Source de variation	Fusa09 et ITK09			
		Plantes malades (excepté gaines<N1, en %)	Somme symptômes S1 et S3 (% d'épillets touchés)	S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)
Essai	Fusa09 ensemble des parcelles	NS	NS	2,16a	3,4a
	ITK09			0,96b	2,7a
	Fusa09 parcelles non inoculées à 2 nœuds	NS	NS	1,4a	3,4a
	ITK09			0,96a	2,7a

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet

Tableau 4.21 : Comparaison des essais Fusa09 et ITK09 pour l'apparition des symptômes sur épis au stade grain pâteux

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

#### IV.1.1.3 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2010

Dans l'essai Fusa10, l'inoculation au semis n'a eu aucun effet (Tableau 4.22). L'inoculation à deux nœuds a eu un effet sur le taux de symptôme S7 (épillet échaudé), ainsi que sur la notation par analyse d'image de la somme des symptômes. Les parcelles inoculées à deux nœuds ont été plus touchées par la maladie que les parcelles non-inoculées. Cette inoculation n'a pas eu d'effet sur le taux de S3 et sur le pourcentage de plantes malades. La variété a eu le même effet sur toutes les variables notées excepté la somme des symptômes estimée par analyse d'image. La variété Apache a été significativement moins touchée que les variétés Charger et Maxwell alors que dans le cas de la somme des symptômes estimée par analyse d'image, Charger a été plus touchée que Maxwell, Apache restant la variété la moins touchée. L'effet bloc a à nouveau été présent, notamment sur la notation de S3.



Fusa10								
Facteur	Source de variation	Plantes malades (%)	Somme symptômes S1, S3 et S7 (% d'épillets touchés)	S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)	S7 (% d'épillets touchés)	S1 par Mesurim (en mm <sup>2</sup> pour 50 épis)	Somme des symptômes par Mesurim (en mm <sup>2</sup> pour 50 épis)
Inoculation au semis	+ -	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Inoculation à 2 nœuds	+ -	NS	NS	2,42a 0,93b	NS	4,6a 2,0b	12,1a 4,4b	2302a 1290b
Variété	Apache	89,6b	13,0b	0,39b	11,9b	0,7b	2,8b	904c
	Charger	97,6a	31,8a	1,94a	25,1a	4,8a	9,6a	2756a
	Maxwell	95,9a	34,3a	2,69a	27,2a	4,4a	12,4a	1728b
Bloc	1	94,5a	25,0b	1,4b	19,6b			
	2	97,5a	39,8a	3,0a	35,9a			
	3	96,0a	23,3b	1,1b	17,6c	NS	NS	NS
	4	89,5b	17,2c	1,2b	12,4c			

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet ; S7 : Epillet échaudé ; Mesurim : Logiciel d'analyse d'image

Tableau 4.22 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai Fusa10

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Dans l'essai ITK10, le symptôme S3, la somme des symptômes et le pourcentage de plantes malades ont été les notations les plus affectées par les modalités : l'irrigation, la variété et l'effet bloc ont influencé la notation (Tableau 4.23). Les parcelles irriguées ont été plus touchées que les parcelles non-irriguées et les variétés Apache et Ephoros ont significativement été moins affectées que la variété Charger. La conduite n'a eu d'effet que sur la notation de S1, les parcelles extensives ayant été plus touchées que les parcelles intensives. L'interaction irrigation x conduite a eu un effet sur S3, sur la somme des symptômes et sur le pourcentage de plantes malades, les parcelles intensives et irriguées ayant été plus touchées que toutes les autres (résultat non indiqué dans le tableau). De même, l'interaction variété x conduite a eu un effet sur la somme des symptômes : les parcelles de Charger menées en intensif ayant été plus touchées que toutes les autres (résultat non indiqué dans le tableau).

Facteur	Source de variation	Plantes malades (%)	Somme symptômes S1, S3, et S7 (% d'épillets touchés)	ITK10		
				S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)	S7 (% d'épillets touchés)
Irrigation	+	83,2a	12,2a	NS	11,7a	NS
	-	76,4b	8,0b		7,6b	
Conduite	Extensif	NS	NS	0,37a	NS	NS
	Intensif			0,08b		
Variété	Apache	74,1b	7,0b	NS	6,6b	NS
	Charger	85,5a	13,9a		13,4a	
	Ephoros	79,8ab	9,4b		9,0b	
Bloc	1	93,3a	13,7a	NS	12,7a	0,73a
	2	77,3b	6,3b		5,9b	0,08b
	3	80,3b	11,8a		11,6a	0,00b
	4	68,2c	8,6b		8,5b	0,00b

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet ; S7 : Epillet échaudé

Tableau 4.23 : Notation de la maladie au stade grain pâteux dans l'essai ITK10

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Facteur	Source de variation	Plantes malades (%)	Fusa10 et ITK10			
			Somme symptômes S1, S3 et S7 (% d'épillets touchés)	S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)	S7 (% d'épillets touchés)
Essai	Fusa10 ensemble des parcelles	93,6a	22,4a	1,2a	18,5a	2,76a
	ITK10	87,0b	15,2b	0,07b	14,9a	0,16b
	Fusa10 parcelles non inoculées à 2 noeuds	93,8a	22,4a	0,76a	19,3a	2,32a
	ITK10	87,0a	15,2b	0,07b	14,9a	0,16b

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet ; S7 : Epillet échaudé

Tableau 4.24 : Comparaison des essais Fusa10 et ITK10 pour l'apparition des symptômes sur épis au stade grain pâteux

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Facteur	Source de variation	Fusa			
		Plantes malades (excepté gaine<N1, en %)	Somme symptômes S1 et S3 (% d'épillets touchés)	S1 (% d'épillets touchés)	S3 (% d'épillets touchés)
Année	2009	52,6b	7,1b	2,8a	4,3b
	2010	94,4a	23,0a	1,7b	21,4a
ITK					
Année	2009	56,3b	7,0b	1,5a	3,4b
	2010	79,8a	9,9a	0,2b	9,7a

S1 : Epillet orange ; S3 : Lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet

Tableau 4.25 : Effet de l'année sur les taux de symptômes relevés dans les essais Fusa et ITK au stade grain pâteux

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

#### IV.1.1.4 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2010

La comparaison des essais Fusa10 et ITK10 montre que la maladie a été plus forte dans l'essai Fusa que dans l'essai ITK, que l'on considère toutes les parcelles de l'essai Fusa ou uniquement les parcelles non-inoculées à deux nœuds, même si la différence n'est pas significative pour le pourcentage de plantes malades et pour le taux de S3 (Tableau 4.24).

#### IV.1.1.5 Effet de l'année sur les notations au stade grain pâteux

Dans l'essai Fusa comme dans l'essai ITK, plus de symptômes ont été notés lors de l'année 2010 que lors de l'année 2009, à l'exception de S1 qui a été plus important en 2009 qu'en 2010 (Tableau 4.25).

#### IV.1.1.6 Isolements au stade grain pâteux du blé

La majorité des mises en culture au stade grain pâteux ont pas permis d'isoler une souche d'intérêt (Tableau 4.26). Une forte tendance se dégage : les mises en cultures à partir de S1, le symptôme épillet orange, ont permis d'isoler l'espèce *F. graminearum* (Figure 4.14). Les mises en culture à partir de S3 ont permis d'isoler une espèce impliquée dans le complexe de la fusariose du blé autre que *F. graminearum* : *F. tricinctum* en 2009 et *M. nivale* en 2010 (Figures 4.15 et 4.16).

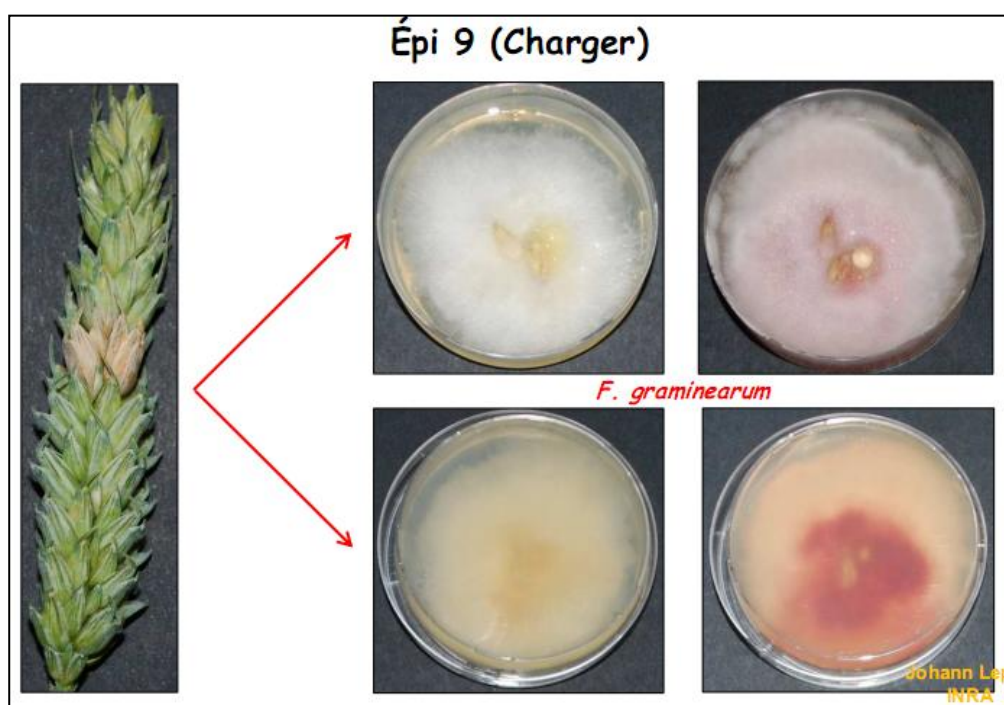


Figure 4.14 : Isolement effectués au stade grain pâteux à partir d'un épi de la variété Charger prélevé dans l'essai Fusa09 (test du symptôme S1)

Essai	Année	Variété	Code isolement	Partie de la plante analysée	Symptôme testé	Identification spécifique des isolats
Fusa09	2009	Charger	37 gaine 1	Gaine sous épi	(-)	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	37 gaine 2	Gaine sous épi	(-)	<i>M. nivale</i>
Fusa09	2009	Charger	37 gaine 3	Gaine sous épi	(-)	NI
Fusa09	2009	Charger	37 gaine 4	Gaine sous épi	(-)	<i>M. nivale</i>
Fusa09	2009	Charger	37 gaine 5	Gaine sous épi	(-)	<i>M. nivale</i>
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 1	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	Épi 2	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Apache	Épi 3	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	Épi 4	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	Épi 5	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	Épi 6	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	Épi 7	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Apache	Épi 8	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Charger	Épi 9	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 10	Épillet	S3	<i>F. tricinctum</i>
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 11	Épillet	S3	<i>F. tricinctum</i>
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 12	Épillet	S3	NI
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 12'	Épillet	S3	<i>F. tricinctum</i>
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 13	Épillet	S3	<i>F. tricinctum</i>
Fusa09	2009	Maxwell	Épi 13'	Épillet	S3	NI
Fusa09	2009	Charger	Épi 14	Épillet	S3	NI
Fusa09	2009	Charger	Épi 14'	Épillet	S3	<i>F. graminearum</i>
Fusa09	2009	Apache	Épi 15	Épillet	S3	<i>F. tricinctum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 1	Épillet	S3	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 2	Épillet	S3	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 3	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 4	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 5	Épillet	S5	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 6	Épillet	S3	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 7	Épillet	S3	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 8	Épillet	S5	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 9	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 10	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 11	Épillet	S3	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 12	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 13	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 14	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 15	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 16	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 17	Épillet	S1	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 18 <sub>1</sub>	Épillet	S3	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 18 <sub>2</sub>	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 19	Épillet	S3	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 20	Épillet	S5	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 21	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 22 <sub>1</sub>	Épillet	S3	<i>F. graminearum</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 22 <sub>2</sub>	Épillet	S3	<i>M. nivale</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 23	Épillet	S3	NI
Fusa10	2010	Charger	GP10 24	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>
Fusa10	2010	Charger	GP10 25	Épillet	S3	<i>M. nivale</i> var. <i>majus</i>

NI : souche fongique, bactérienne ou de levure, non identifiée spécifiquement car non impliquée dans la fusariose

Tableau 4.26 : Souches isolées à partir de symptômes sur plante au stade grain pâteux

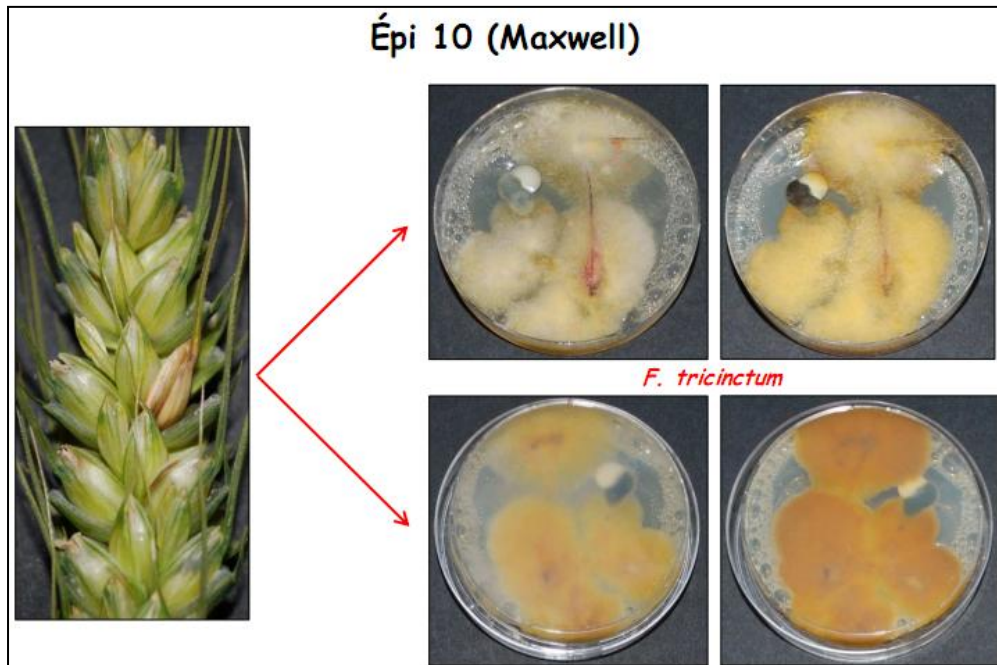


Figure 4.15 : Isolement effectués au stade grain pâteux à partir d'un épi de la variété Maxwell prélevé dans l'essai Fusa09 (test su symptôme S3)

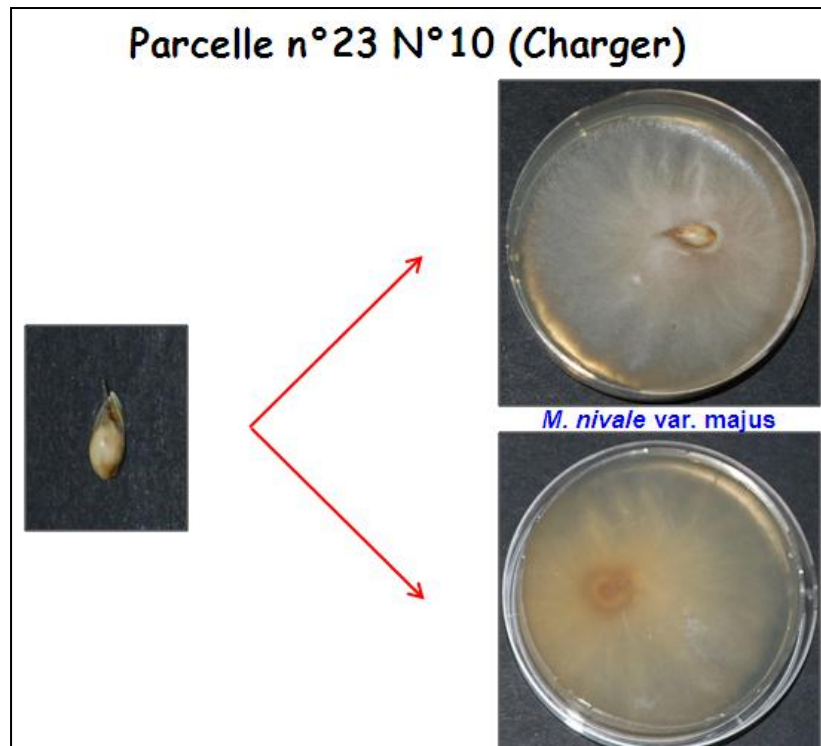


Figure 4.16 : Isolement effectués au stade grain pâteux à partir d'un épi de la variété Charger prélevé dans l'essai Fusa10 (test su symptôme S3)

Fusa09									
Facteur	Source de variation	Grains sains (%)	Grains roses (%)	Grains ridés (%)	Grains mouchetés (%)	Rendement (qx.ha <sup>-1</sup> )	Poids de mille grains (g)	Poids spécifique	Quantité de DON (µg/g de farine sèche) <sup>a</sup>
Inoculation au semis	+ -	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Inoculation à 2 nœuds	+ -	48,3b 55,3a	16,2a 10,9b	24,0a 19,8b	11,5b 14,7a	61,5b 71,7a	30,8b 34,3a	65,8b 71,0a	4,8b 8,7a
Variété	Apache	69,7a	5,5c	10,3c	14,4a	70,5a	37,8a	72,9a	2,3c
	Charger	39,1c	15,2b	34,1a	11,6b	63,7b	26,4c	65,4b	6,6b
	Maxwell	46,5b	19,8a	21,4b	13,2ab	65,4b	33,5b	66,8b	11,3a
Bloc	1	58,0a				67,6a	31,0b		
	2	49,0b	NS	NS	NS	68,7a	33,4a	NS	NS
	3	51,8b				67,5a	33,3a		
	4	48,5b				62,5b	32,6a		
ITK09									
Irrigation	+ -	70,8b 75,0a		NS	10,4a 7,1b	68,1a 61,8b	NS		(-)
	Conduite	Extensif	NS		NS	10,3a	54,7b	40,4a	
Intensif					7,2b	75,2a	39,0b		
Variété		Apache	75,8b	NS	12,7b	10,5a	56,0c	39,6b	NS
	Charger	60,4c		27,6a	10,5a	67,8b	35,6c		
	Ephoros	82,6a		11,3b	5,3b	71,1a	43,9a		
Bloc	1	71,2b			11,2a	68,1a			
	2	72,4b		NS	10,6a	66,1ab	NS		NS
	3	71,1b			11,0a	63,6bc			
	4	76,8a			2,3b	62,0c			

(-) : modalité non testée ; <sup>a</sup>Uniquement les parcelles irriguées intensives des variétés Apache et Charger pour l'essai ITK09

Tableau 4.27 : Notation du taux de maladie au stade récolte et détermination des composantes du rendement pour les essais Fusa09 et ITK09

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

#### IV.1.2 Résultats des notations à la récolte

Les tableaux bruts résumant les notations au stade récolte sont présentés en annexe 38. L'exploitation des résultats liée au symptôme grain rose, au rendement et à l'accumulation de mycotoxines dans les grains dans le cas des essais Fusa sera abordée dans le chapitre suivant qui se focalise plus particulièrement sur la recherche d'indicateurs d'accumulation de mycotoxines dans les grains à partir des observations faites sur les épis de blé. Ces points ne seront donc pas abordés excepté s'ils apportent un éclairage à l'exploitation des autres variables étudiées.

##### IV.1.2.1 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2009

Dans l'essai Fusa09, le facteur inoculation au semis n'a pas eu d'influence sur les variables notées (Tableau 4.27). En revanche, les facteurs inoculation à deux nœuds et variétal ont influencé toutes les notations. L'effet bloc n'a influencé que le taux de grains sains des parcelles, le rendement et le poids de mille grains. Les notations vont dans le sens observé précédemment pour le taux de grains roses : la quantité de grains sains a été moindre dans les parcelles inoculées à deux nœuds, inoculation qui a aussi provoqué une augmentation du nombre de grains ridés. En revanche, le symptôme grain moucheté a été significativement supérieur dans les parcelles non-inoculées à deux nœuds. En ce qui concerne les composantes du rendement, le poids de mille grains et le poids spécifique ont été inférieurs dans les parcelles inoculées à deux nœuds.

La variété Apache est celle dont le taux de grains sains a été le plus élevé et Charger celle pour laquelle il a été le plus bas. En termes de symptômes, cela s'est traduit par un taux de grains ridés plus fort chez Charger et plus faible chez Apache, mais c'est chez Apache que le taux significativement le plus fort de grains mouchetés a été relevé. Apache a été la variété avec le poids de mille grains et le poids spécifique les plus élevés. Le poids de mille grains de la variété Charger a été le plus bas mais il n'y a pas eu de différence entre Charger et Maxwell pour le poids spécifique.

Dans l'essai ITK09, les modalités étudiées n'ont pas eu d'effet sur les variables taux de grains roses, poids spécifique et sur la quantité de mycotoxines accumulée dans les grains (Tableau 4.27). Les parcelles non-irriguées ont été significativement moins malades que les parcelles irriguées, résultat porté par le taux de grains mouchetés supérieur dans les parcelles irriguées. Le rendement a été supérieur dans les parcelles irriguées. Le taux de grains mouchetés a également été affecté par la conduite, les parcelles extensives ayant été plus touchées que les intensives. Le rendement a été supérieur dans les parcelles intensives bien que le poids de mille grains ait été supérieur dans les parcelles extensives. L'effet variétal est comparable à celui constaté dans l'essai Fusa pour la notation des symptômes : Charger a été la variété avec le taux de grains ridés significativement le plus élevé et Apache celle avec le plus de grains



		Fusa09 et ITK09							
Facteur	Source de variation	Grains sains (%)	Grain roses (%)	Grain ridés (%)	Grains mouchetés (%)	Rendement (qx.ha <sup>-1</sup> )	Poids de milles grains (g)	Poids spécifique	Quantité de DON (µg/g de farine sèche)
Essai	Fusa09 ensemble des parcelles	54,4b	10,4a	22,2a	13,0a	67,1b	32,1b	69,2b	4,5a
	ITK09	65,4a	1,4b	22,8a	10,4a	75,6a	36,6a	74,1a	0,2b
	Fusa09 parcelles non-inoculées à 2 nœuds	57,7b	8,1a	19,9a	14,3a	71,9a	33,5b	71,5b	2,90a
	ITK09	65,4a	1,4b	22,8a	10,4b	75,6a	36,6a	74,1a	0,2b

Tableau 4.28 : Comparaison du taux de maladie au stade récolte et des composantes du rendement pour les essais Fusa09 et ITK09

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

mouchetés bien qu'il n'y ait pas eu de différence significative avec Charger pour ce symptôme. Contrairement à l'essai Fusa09, dans ITK09, Charger a eu un meilleur rendement qu'Apache bien que le poids de mille grains ait été plus élevé chez Apache. Pour ces deux variables, c'est la variété Ephoros qui a significativement eu les meilleurs scores. L'interaction irrigation x conduite montre que le taux de grains sains a été le plus fort dans les parcelles non-irriguées et intensives et que le poids de mille grains a été le plus faible dans les parcelles irriguées et intensives (résultat non indiqué dans le tableau). L'interaction conduite x variété montre que le taux de grains ridés chez Charger a été fortement influencé par l'intensification (résultat non indiqué dans le tableau).

#### *IV.1.2.2 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2009*

La comparaison des essais Fusa09 et ITK09 montre que le taux de grains sains a été significativement supérieur dans ITK, la quantité de grains roses ayant été supérieure dans l'essai Fusa (Tableau 4.28). L'étude des grains ridés et des grains mouchetés prend un intérêt différent si l'on considère l'ensemble des parcelles de Fusa ou uniquement les parcelles non-inoculées à deux nœuds. Pour les grains ridés, le taux a été supérieur dans l'essai ITK bien que la différence n'ait pas été significative, mais cette différence s'accroît lorsque l'on considère uniquement les parcelles non-inoculées de Fusa. Pour les grains mouchetés, le taux a été supérieur dans l'essai Fusa, mais non significatif si l'on considère l'ensemble des parcelles. Cependant cette différence devient significative si l'on considère uniquement les parcelles non-inoculées à deux nœuds. Les rendements, poids de mille grains et poids spécifique ont été supérieurs dans l'essai ITK09. Enfin, la quantité de mycotoxines accumulées dans les grains a été supérieure dans l'essai Fusa09. La majorité des différences notées entre Fusa09 et ITK09 a été portée par les différences de performances de la variété Charger.

#### *IV.1.2.3 Notations dans les essais Fusa et ITK en 2010*

Les résultats à la récolte dans l'essai Fusa10 ont été très similaires à ceux observés dans Fusa09 (Tableau 4.29). Les seules différences à noter sont un taux supérieur de grains sains pour Charger par rapport à Maxwell dans l'essai Fusa10, alors que c'était l'inverse dans l'essai Fusa09, Apache restant la variété avec le taux le plus fort. Cette différence est supportée par la notation des grains mouchetés : Maxwell a été significativement la variété la plus touchée dans l'essai Fusa10, Apache ayant été à nouveau noté plus haut que Charger pour ce symptôme. Les dernières différences apparaissent dans les composantes du rendement : le poids de mille grains d'Apache et Maxwell n'a pas été différent, celui de Charger restant plus bas, et l'inoculation à deux nœuds n'ayant pas eu d'effet sur le poids spécifique des grains.

Fusa10									
Facteur	Source de variation	Grains sains (%)	Grains roses (%)	Grains ridés (%)	Grains « cul noir » (%)	Rendement (qx.ha <sup>-1</sup> )	Poids de mille grains (g)	Poids spécifique	Quantité de DON (µg/g de farine sèche) <sup>a</sup>
Inoculation au semis	+ -	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Inoculation à 2 nœuds	+ -	57,0b 62,6a	4,6a 1,5b	25,6a 17,9b	12,7b 18,0a	76,3b 82,1a	42,9b 45,8a	NS	4,1a 2,1b
Variété	Apache	71,8a	0,29c	15,5c	12,4b	86,6a	47,2a	78,4a	0,4c
	Charger	62,9b	3,50b	26,9a	6,7c	74,6b	38,0b	72,1b	2,6b
	Maxwell	44,8c	5,36a	22,9b	27,0a	76,3b	47,8a	72,0b	6,2a
Bloc	1			20,1b	15,9a		44,8a		
	2	NS	NS	19,6b	16,7a	NS	45,3a	NS	NS
	3			26,2a	12,7b		42,1b		
	4			21,1b	16,2a		45,1a		
ITK10									
Irrigation	+ -					78,2a 71,7b		76,6b 78,5a	(-)
	Extensif Intensif					66,2b 83,6a		NS	(-)
Variété	Apache	(-)	(-)	(-)	(-)	76,3a	(-)	78,5a	
	Charger					70,2b		74,9b	NS
	Ephoros					78,2a		79,1a	
Bloc	1								
	2					NS		NS	NS
	3								
	4								

(-) : modalité non testée ; <sup>a</sup>Uniquement les parcelles irriguées intensives des variétés Apache et Charger pour l'essai ITK10

Tableau 4.29 : Notation du taux de maladie au stade récolte et détermination des composantes du rendement pour l'essai Fusa10

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Les seules informations relevées sur l'essai ITK en 2010 ont été le rendement, le poids spécifique des grains et le taux de mycotoxines accumulés dans les grains (Tableau 4.29). Aucun facteur n'a été significatif en ce qui concerne le dosage des mycotoxines. L'irrigation et l'intensification ont permis un meilleur rendement que la non-irrigation et l'extensification. Contrairement à l'effet observé dans l'essai ITK09 où le rendement de la variété Apache était le plus faible des trois, dans l'essai ITK10, Apache a été à la hauteur d'Ephoros et c'est Charger qui a eu le rendement le plus faible. Le poids spécifique a été influencé par l'irrigation et le facteur variétal : les parcelles irriguées ont eu un poids spécifique inférieur et les parcelles des variétés Apache et Ephoros ont eu un poids spécifique supérieur à celles de Charger.

#### *IV.1.2.4 Comparaison des essais Fusa et ITK en 2010*

La comparaison des essais Fusa10 et ITK10 fait ressortir les mêmes informations que la comparaison de 2009 : le rendement et le poids spécifique des grains ont été plus élevés dans l'essai ITK et l'accumulation de mycotoxines plus importante dans l'essai Fusa (Tableau 4.30).

#### *IV.1.2.5 Effet de l'année sur les notations au stade récolte*

La comparaison des deux années d'essais dans l'essai Fusa montre que le taux de grains sains a été plus fort en 2010 (Tableau 4.31). Ce résultat a essentiellement été porté par le symptôme grain rose, plus fort en 2009 qu'en 2010, puisqu'il n'y a pas eu de différence dans le taux de grains ridés et que le taux de grains mouchetés a été plus important en 2010. L'étude des interactions variété x année montre que l'effet année dans les taux des différents symptômes relevés a surtout été conditionné par les variétés sensibles à la fusariose, Charger et Maxwell (résultat non indiqué dans le tableau). Le rendement, le poids de mille grains et le poids spécifique ont été supérieurs en 2010 par rapport à 2009.

Pour l'essai ITK, l'effet de l'année sur le rendement, sur le poids spécifique et sur l'accumulation de mycotoxines dans les grains a été le même que celui dans l'essai Fusa (Tableau 4.31).

Fusa10 et ITK10									
Facteur	Source de variation	Grains sains (%)	Grain roses (%)	Grain ridés (%)	Grains mouchetés (%)	Rendement (qx.ha <sup>-1</sup> )	Poids de milles grains (g)	Poids spécifique	Quantité de DON (µg/g de farine sèche)
Essai	Fusa10 ensemble des parcelles					80,6b		75,2b	1,53a
	ITK10					85,8a		76,3a	0,08b
	Fusa10 parcelles non inoculées à 2 nœuds	(-)	(-)	(-)	(-)	82,4b	(-)	75,3a	0,831a
	ITK10					85,8a		76,3a	0,08b

(-) : modalité non testée

Tableau 4.30 : Comparaison du taux de maladie au stade récolte et des composantes du rendement pour les essais Fusa10 et ITK10

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

Fusa									
Facteur	Source de variation	Grains sains (%)	Grain roses (%)	Grain ridés (%)	Grains mouchetés (%)	Rendement (qx.ha <sup>-1</sup> )	Poids de milles grains (g)	Poids spécifique	Quantité de DON (µg/g de farine sèche) <sup>a</sup>
Année	2009	51,8b	13,5a	21,9a	13,1b	66,6b	32,6b	68,4b	6,7a
	2010	59,8a	3,1b	21,8a	15,4a	79,2a	44,3a	74,2a	3,1b
ITK									
Facteur	Source de variation	Grains sains (%)	Grain roses (%)	Grain ridés (%)	Grains mouchetés (%)	Rendement (qx.ha <sup>-1</sup> )	Poids de milles grains (g)	Poids spécifique	Quantité de DON (µg/g de farine sèche) <sup>a</sup>
Année	2009	(-)	(-)	(-)	(-)	65,0b	(-)	74,2b	0,020a
	2010	(-)	(-)	(-)	(-)	74,9a	(-)	77,5a	0,081b

(-) : modalité non testée ; <sup>a</sup>Uniquement les parcelles irriguées intensives des variétés Apache et Charger

Tableau 4.31 : Effet de l'année sur les notations à la récolte et les composantes du rendement dans les essais Fusa et ITK

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

IV.1.2.6 Part des grains fusariés retournant au champ lors de la récolte

L'inoculation au semis n'a eu d'effet sur aucune des variables étudiées (Tableau 4.32). L'effet bloc a lui été présent pour toutes les notations. L'étude du poids d'un grain déterminé par l'analyse d'environ 2000 grains confirme logiquement les effets observés dans Fusa 10 lors de l'étude du poids de mille grains : le poids d'un grain des parcelles inoculées à deux nœuds a été inférieur à celui des parcelles non-inoculées et les poids d'un grain des variétés Apache et Maxwell ont été supérieurs à celui de la variété Charger. L'interaction inoculation à deux nœuds x variété montre que la différence constatée entre les parcelles inoculées et non-inoculées a essentiellement été provoquée par la variété Maxwell (résultat non indiqué dans le tableau). En revanche, le type de récolte, manuelle ou à la machine, n'a pas eu d'effet sur le poids des grains. L'étude statistique de la différence de poids des grains entre la récolte à la machine et la récolte manuelle montre qu'elle a été significativement différente en ce qui concerne l'inoculation à deux nœuds. Ainsi, la différence de poids des grains entre les deux récoltes dans les parcelles inoculées a significativement été plus forte que celle dans les parcelles non-inoculées. L'interaction inoculation à deux nœuds x variété montre en plus que ce résultat a surtout été provoqué par la variété Maxwell (résultat non indiqué dans le tableau).

Facteur	Source de variation	Fusa10				
		Poids moyen d'1 grain (g)	Différence poids d'1 grain machine-manuelle	Surface moyenne d'1 grain (mm <sup>2</sup> )	Différence surface d'1 grain machine-manuelle	Rapport poids/surface d'un grain (g/mm <sup>2</sup> )
Type de récolte	Machine	NS	(-)	17,00b	(-)	0,00262a
	Manuelle			17,41a		0,00254b
Inoculation au semis	+	NS	NS	NS	NS	NS
	-					
Inoculation à 2 nœuds	+	0,0435b	0,00110a	16,99b	NS	0,00255b
	-	0,0456a	-0,00033b	17,42a		0,00261a
Variété	Apache	0,0472a	NS	17,85a	-0,697b	0,00265a
	Charger	0,0382b		15,71b	-0,061a	0,00243b
	Maxwell	0,0482a		18,06a	-0,464ab	0,00267a
Bloc	1	0,0445a	-0,00078b	16,97b	-0,289ab	0,00261a
	2	0,0456a	0,00060ab	17,44a	0,150a	0,00261a
	3	0,0426b	0,00122a	16,90b	-0,698b	0,00253b
	4	0,0453a	0,00049ab	17,51a	-0,791	0,00258a

Tableau 4.32 : Etude de la morphologie des grains récoltés dans l'essai Fusa10

Les valeurs (poids et surface) d'un grain sont des valeurs moyennes calculées à partir d'un échantillon d'environ 1000 grains obtenus par récolte à la machine et d'un échantillon d'environ 1000 grains obtenus par battage manuel. Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

		Grains contaminés (%)	<i>F. graminearum</i> (%)	<i>F. tricinctum</i> (%)	<i>F. poae</i> (%)	<i>F. avenaceum</i> (%)	<i>M. nivale</i> (%)*
Récolte 2009	Charger non inoculées	76	70	20	5	1	4 (0/0/100)
	Charger inoculées	91	93	5	0	0	2 (0/0/100)
	Apache non inoculées	40	59	17	7	2	15 (50/17/33)
	Apache inoculées	70	75	15	3	0	7 (0/20/80)
	Charger irriguées intensives	58	16	67	3	0	14 (0/63/37)
	Apache irriguées intensives	23	17	39	17	17	26 (17/83/0)
Récolte 2010	Charger non inoculées	29	83	7	0	0	10 (33/33/33)
	Charger inoculées	32	78	6	0	0	13 (0/40/60)
	Apache non inoculées	15	33	13	0	0	53 (0/50/50)
	Apache inoculées	38	79	5	0	0	16 (17/33/50)
	Charger irriguées intensives	11	33	8	0	17	42 (40/20/40)
	Apache irriguées intensives	22	5	5	0	0	90 (15/20/65)

\* Les trois pourcentages entre parenthèses correspondent à *M. nivale* var. *nivale*, *M. nivale* var. *majus* et *M. nivale* dont la variété n'a pas été déterminée

Tableau 4.33 : Etat sanitaire des grains récoltés dans les essais Fusa et ITK en 2009 et 2010

Fusa et ITK 2009 et 2010		
Facteur	Source de variation	% d'infection des parcelles
Année	+	57,8a
	-	34,3b
Inoculation à 2 nœuds	+	59,7a
	-	24,5b
Variété	Apache Charger	NS

Tableau 4.34 : Effet des différentes variables sur l'état sanitaire des grains récoltés

Au sein d'une même colonne, et pour un facteur donné, les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil P=0,05.

L'étude de la surface d'un grain déterminée par l'analyse d'environ 2000 grains montre que les facteurs inoculation à deux nœuds, variétal et type de récolte ont eu un effet sur la surface d'un grain. Les grains des parcelles inoculées à deux nœuds étaient plus petits que ceux des parcelles non-inoculées et les grains de la variété Charger plus petits que ceux des variétés Apache et Maxwell. D'autre part les grains récoltés à la machine étaient plus petits que ceux récoltés manuellement. L'étude statistique de la différence de surface des grains entre la récolte à la machine et la récolte manuelle montre que celle-ci a été significative en fonction des variétés considérées.

Le type de récolte, l'inoculation à deux nœuds et la variété ont aussi eu un effet sur le rapport poids/surface des grains récoltés. Ce rapport a été plus faible dans les parcelles inoculées à deux nœuds et plus faible pour la variété Charger que pour les variétés Apache et Maxwell. D'autre part, les grains récoltés à la machine ont eu un rapport poids/surface supérieur à celui des grains récoltés manuellement.

#### IV.1.2.7 Etat sanitaire des grains à la récolte

L'étude de l'état sanitaire des grains à la récolte dans les essais Fusa sera abordée dans le chapitre suivant qui se focalise plus particulièrement sur la recherche d'indicateurs d'accumulation de mycotoxines dans les grains à partir des observations faites sur les épis de blé. Ne seront traitées dans cette partie que les informations complémentaires apportées par l'étude et la comparaison avec l'état sanitaire des grains récoltés dans les essais ITK. Les grains des essais ITK ont été moins contaminés que les grains des essais Fusa (Tableau 4.33). La composition de la flore contaminante a été en outre différente dans les essais Fusa et ITK. Dans les essais Fusa, le champignon le plus fréquemment isolé a été *F. graminearum*, excepté pour les parcelles de la variété Apache non-inoculées à deux nœuds en 2010 pour lesquelles c'est *M. nivale* qui a été le plus isolé. En 2009, c'est *F. tricinctum* qui a été le plus isolé dans l'essai ITK à la fois dans les parcelles de la variété Apache et dans celles de la variété Charger, suivi de *F. graminearum* et de *M. nivale*. Les espèces *F. avenaceum* et *F. poae* ont également été détectées. En 2010, c'est *M. nivale* qui a été le plus fréquemment isolé dans l'essai ITK suivi de *F. graminearum*. Les espèces *F. tricinctum* et *F. avenaceum* ont également été détectées.

Devant le peu de données disponibles, l'étude statistique a été menée en regroupant les essais Fusa et ITK des années 2009 et 2010 en considérant les parcelles de l'essai ITK similaires aux parcelles non-inoculées à deux nœuds de l'essai Fusa. L'étude statistique des variables a bien fait ressortir un effet de l'inoculation à deux nœuds, les parcelles inoculées ayant été plus contaminées que les parcelles non-inoculées, ainsi qu'un effet année, la récolte 2009 ayant été plus contaminée que la récolte 2010 (Tableau 4.34). En revanche, l'effet variétal n'a pas été significatif.



	% plantes malades	S1	S3	Somme S1 + S3	Grains sains	Grains roses	Grains ridés	Grains mouchetés	Rdt	PMG	PS	Qté de DON
% plantes malades	1											
S1	0,439	1										
S3	0,828	0,055	1									
Somme S1 + S3	0,914	0,549	0,865	1								
Grains sains	-0,556	-0,555	-0,286	-0,519	1							
Grains roses	0,476	0,651	0,266	0,550	-0,771	1						
Grains ridés	0,501	0,391	0,237	0,395	-0,905	0,514	1					
Grains « cul noir »	-0,234	-0,288	-0,079	-0,211	0,207	-0,410	-0,310	1				
Rdt	-0,370	-0,589	-0,054	-0,341	0,450	-0,468	-0,440	0,497	1			
PMG	-0,535	-0,299	-0,236	-0,348	0,684	-0,507	-0,747	0,593	0,580	1		
PS	-0,555	-0,523	-0,252	-0,474	0,688	-0,747	-0,612	0,623	0,712	0,820	1	
Qté de DON	0,500	0,521	0,285	0,500	-0,594	0,737	0,417	-0,340	-0,491	-0,413	-0,645	1

Tableau 4.35 : Matrice de corrélation pour les variables notées sur épi en 2009

#### IV.2 Corrélations entre les variables notées sur épi

L'intérêt de calculer les corrélations entre les différentes variables notées sur épis est de mettre en évidence la présence d'indicateurs de pertes de rendement et de production de mycotoxines à partir de la notation des taux de maladie à la fois au stade grain pâteux et au stade récolte.

Les corrélations en bleu seront abordées dans le chapitre suivant qui se focalise plus particulièrement sur la recherche d'indicateurs d'accumulation de mycotoxines dans les grains à partir des observations faites sur les épis de blé. L'étude des corrélations en 2009 montre que le symptôme S3 noté au stade grain pâteux n'a pas été corrélé aux différents symptômes notés à la récolte, au rendement et à la production de mycotoxines alors que le symptôme S1 l'était, même modérément (Tableau 4.35). Comme pour le symptôme grain rose, les autres symptômes notés à la récolte n'ont été que faiblement corrélés au rendement. En revanche le poids de mille grains et le poids spécifique des grains ont été plus fortement corrélés à ces symptômes, négativement lorsque l'on considère les grains roses et les grains ridés et positivement lorsque l'on considère les grains sains et les grains mouchetés. La production de mycotoxines n'a été que faiblement corrélée aux symptômes grains ridés et grains mouchetés.

L'étude des corrélations pour l'année 2010 montre que la notation du symptôme S1 au stade grain pâteux et la notation de ce même symptôme par analyse d'image ont été corrélées mais imparfaitement (Tableau 4.36). La correspondance entre la somme des symptômes notée par analyse d'image et celle notée par analyse visuelle a été moins bonne. Les corrélations entre ces deux types de notations et les notations suivantes de la maladie ainsi que les composantes du rendement ont en outre été différentes alors que les deux notations, visuelle et par analyse d'image, devraient représenter la même chose. Comme en 2009, la notation du symptôme S3 à grain pâteux n'a pas été corrélée avec les notations suivantes. Le symptôme S7 noté à grain pâteux a été faiblement corrélé à la notation de S1 par méthode visuelle mais fortement corrélé aux notations de S1 et de la somme des symptômes par analyse d'image. Pour les corrélations entre S7 et les variables à la récolte, S7 a été assez proche de la somme des symptômes estimée par analyse d'image. La corrélation entre S7 et la production de mycotoxines a en outre été assez bonne. Au contraire de l'année 2009, en 2010, comme pour le symptôme grain rose, le symptôme grain ridé a fortement été corrélé au rendement, négativement et dans une moindre mesure, le nombre de grains sains l'a aussi été, positivement. En revanche le symptôme grain à moucheté n'a pas été corrélé au rendement. Les symptômes grain ridé et grain moucheté ont aussi fortement été corrélés au poids de mille grains, le premier négativement, le second positivement. Le symptôme grain rose a été moins corrélé au poids de mille grains qu'en 2009. Enfin, le nombre de grains sains a fortement été corrélé, négativement, à la production de mycotoxines, le symptôme grain ridé a été moyennement corrélé à cette production et le symptôme grain moucheté faiblement corrélé.

	% plantes malades	S1	S1 Mesurim	S3	S7	Somme S1+S3+S7	Somme S Mesurim	Grains sains	Grains roses	Grains ridés	Grains mouchetés	Rdt	PMG	PS	Qté de DON
% plantes malades	1														
S1	0,465	1													
S1 Mesurim	0,401	0,648	1												
S3	0,588	0,598	0,159	1											
S7	0,391	0,376	0,861	-0,070	1										
Somme S1 + S3 +S7	0,692	0,765	0,483	0,930	0,291	1									
Somme S Mesurim	0,465	0,576	0,834	0,137	0,862	0,455	1								
Grains sains	-0,224	-0,448	-0,418	-0,306	-0,351	-0,432	-0,164	1							
Grains roses	0,283	0,562	0,592	0,264	0,555	0,471	0,447	-0,760	1						
Grains ridés	0,230	0,369	0,381	0,160	0,457	0,326	0,426	-0,561	0,726	1					
Grains « cul noir »	-0,004	0,070	0,012	0,167	-0,125	0,117	-0,301	-0,547	0,020	-0,369	1				
Rdt	-0,498	-0,658	-0,642	-0,448	-0,561	-0,646	-0,660	0,584	-0,734	-0,702	0,093	1			
PMG	-0,295	-0,220	-0,258	-0,089	-0,413	-0,231	-0,557	-0,020	-0,426	-0,737	0,787	0,533	1		
PS	-0,560	-0,523	-0,576	-0,411	-0,588	-0,605	-0,560	0,680	-0,749	-0,661	-0,058	0,839	0,493	1	
Qté de DON	0,325	0,536	0,697	0,186	0,668	0,435	0,470	-0,821	0,830	0,513	0,334	-0,660	-0,132	-0,744	1

Tableau 4.36 : Matrice de corrélation pour les variables notées sur épi en 2010

### IV.3 Exploitation des données climatiques au stade épi

#### IV.3.1 Du point de vue de la plante

A partir de l'inoculation à deux nœuds, les courbes de la somme des degrés-jour et de la somme des précipitations ont eu la même allure en 2009 et 2010 avec un bénéfice d'une centaine de degrés-jour et de 70 mm de précipitations au moment de cette inoculation pour l'année 2010 (Figure 4.17). Au moment de la notation au stade grain pâteux, le bénéfice des précipitations pour l'année 2010 était passé au-dessus de la centaine de mm avant de se combler. La récolte 2009 ayant été plus tardive, les sommes des degrés-jour et des précipitations ont été strictement les mêmes à la fin des essais 2009 et 2010.

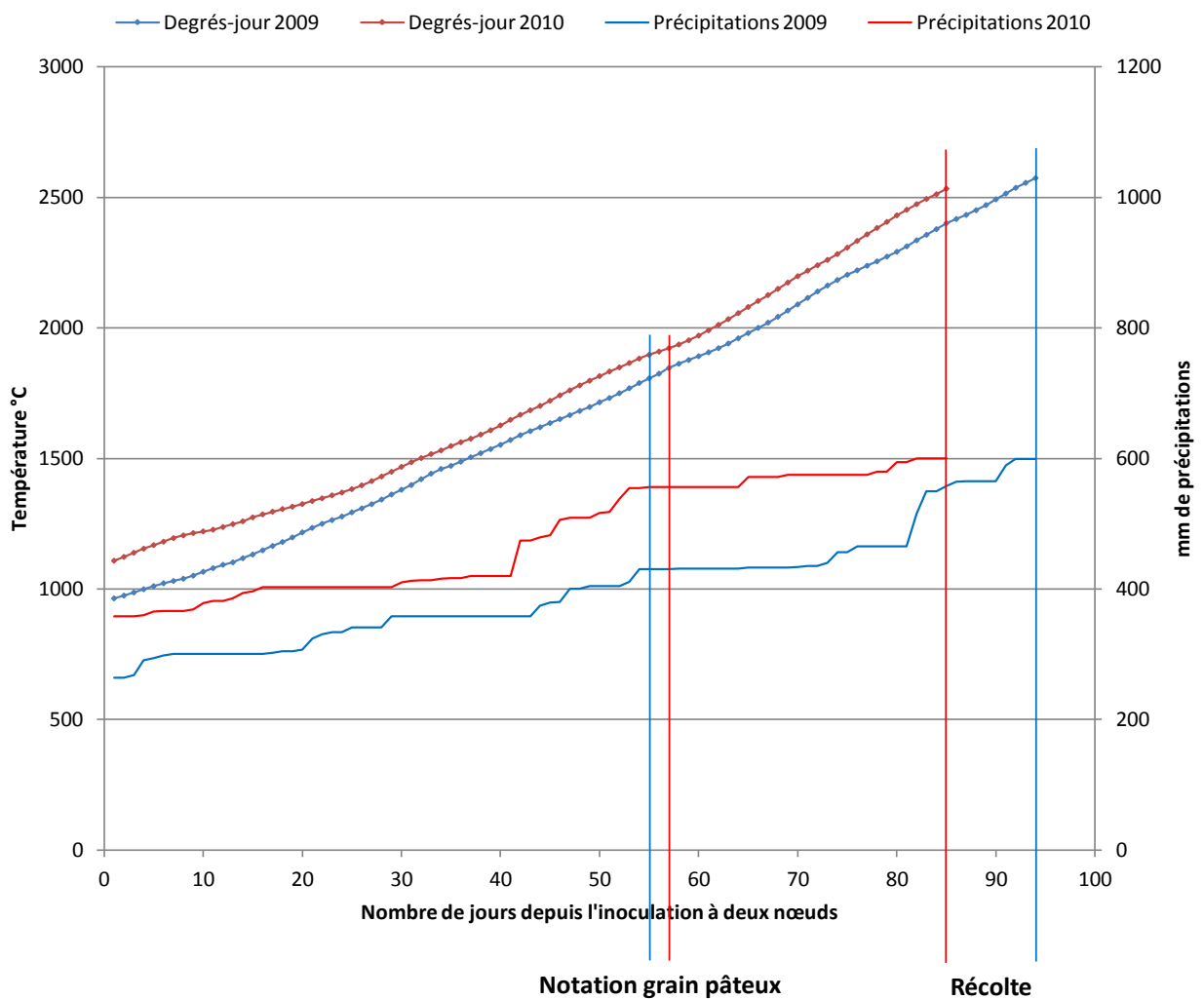


Figure 4.17 : Somme des degrés-jour et des précipitations entre l'inoculation au stade deux nœuds et la récolte

Les axes verticaux en couleur indiquent les dates de restitution de la notation au stade épi et de la récolte.

## IV.3.2 Du point de vue des champignons phytopathogènes

Durant la période s'étendant de l'inoculation au stade deux nœuds jusqu'à la récolte, le nombre d'heures cumulant une température chaude et une forte humidité a été plus élevé en 2009 qu'en 2010, notamment durant la floraison du blé (Figure 4.18). Trente-deux jours après l'inoculation au stade deux nœuds, 85 heures cumulant une température supérieure à 15°C et une humidité supérieure à 80% avait déjà été enregistrées en 2009, ce qui n'a pas été le cas en 2010. A partir de ce moment, le cumule des heures en 2010 a commencé à rattrapper celui de 2009, sans jamais le dépasser. De plus, aucune heure cumulant une température supérieure à 20°C et une humidité supérieure à 80% n'a été enregistrée en 2010 jusqu'à 69 jours après l'inoculation au stade deux noeud, alors que durant la même période, 34 heures avaient été accumulées en 2009.

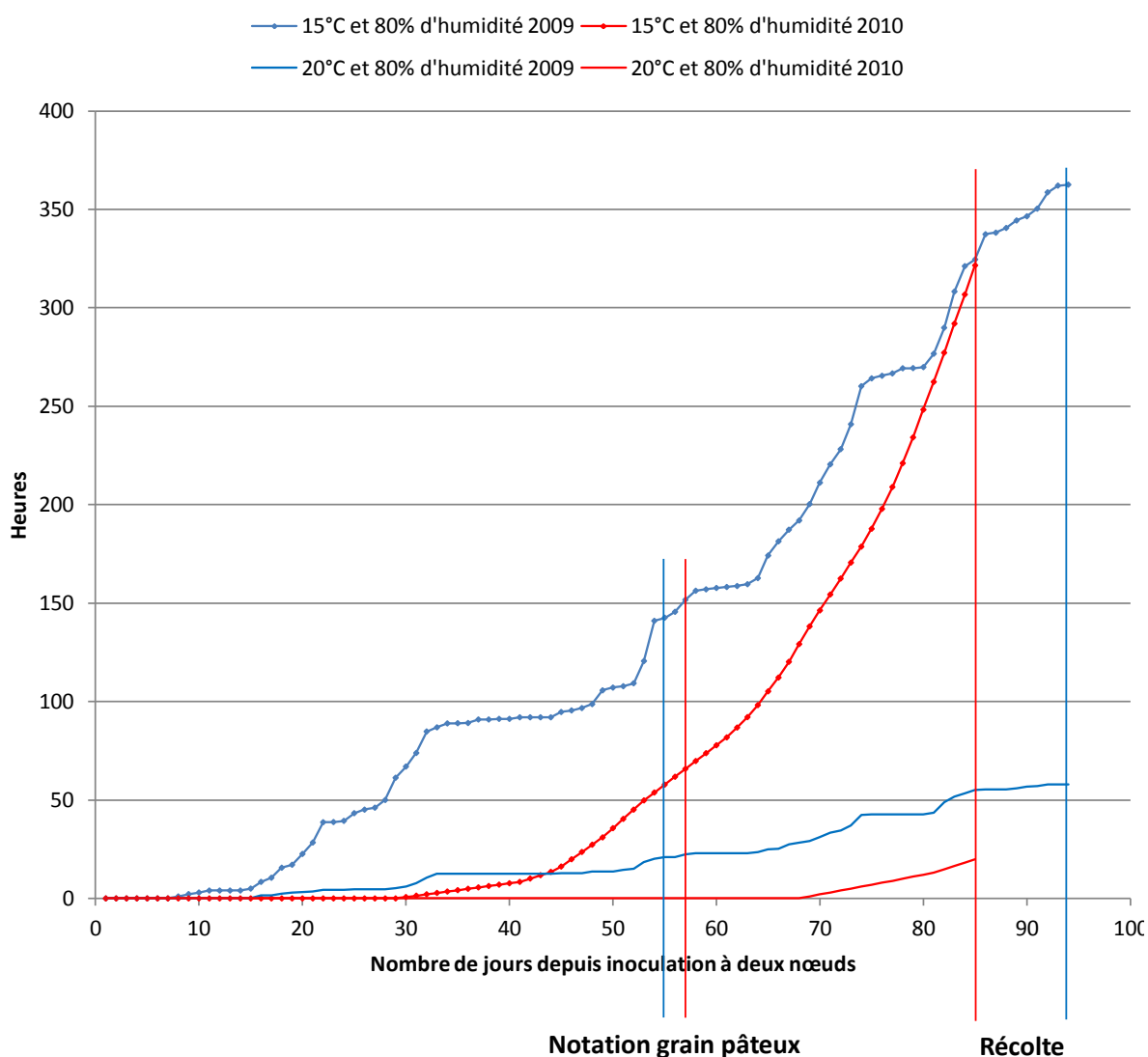


Figure 4.18 : Somme des heures au-dessus de 15 et 20 °C et de 80% d'humidité entre l'inoculation au stade deux nœuds et la récolte

Les axes verticaux en couleur indiquent les dates de restitution de la notation au stade épi et de la récolte.

#### IV.4 Discussion des résultats collectés sur épis durant les deux années d'essai

IV.4.1 Implication des symptômes autres que S1 (épillet orange) notés au stade grain pâteux sur le rendement et l'état sanitaire des grains récoltés

IV.4.1.1 Cas du symptôme S3 (lésion rouge à noire sur une partie de l'épillet) : lié à la fusariose du blé mais pas à *F. graminearum*

En 2009 comme en 2010, le symptôme S3 n'a pas été influencé par l'inoculation au stade deux nœuds (Tableaux 4.19 et 4.22). Pourtant il a été influencé par la variété de blé dans le sens attendu pour un symptôme de fusariose : les variétés sensibles, Charger et Maxwell, ont été plus touchées par S3 que la variété résistante, Apache. Ces deux constatations tendent à prouver que S3 a bien été provoqué par des espèces liées au complexe de la fusariose, ce que laissaient entendre les données bibliographiques (ITCF, 1999; Parry et al., 1995), mais pas par *F. graminearum*. Cette hypothèse a été confirmée par les mises en culture à partir de symptômes faites au stade grain pâteux : alors que toutes les souches isolées à partir de S1 appartenaient à l'espèce *F. graminearum*, toutes les souches isolées à partir de S3, à l'exception d'une, appartenaient à l'espèce *F. tricinctum* en 2009 et à l'espèce *M. nivale* en 2010 (Tableau 4.26, Figures 4.14, 4.15 et 4.16). En théorie, ces isolements sont insuffisants pour établir un lien de cause à effet, le postulat de Koch n'ayant pas été vérifié, mais ils donnent tout de même de fortes présomptions.

Les notations dans les essais ITK ont confirmé celles des essais Fusa en ce qui concerne ce symptôme S3. Si le taux S1, attribué à *F. graminearum*, a significativement été plus bas dans les essais ITK (non-inoculés), il n'y a pas eu de différence significative lors de la notation du symptôme S3 (Tableaux 4.21 et 4.24). En absence d'inoculation, les états sanitaires au stade récolte ont confirmés les isolements effectués au stade grain pâteux (Tableau 4.33). Dans l'essai ITK09, l'espèce majoritairement isolée a été *F. tricinctum* et dans l'essai ITK10, l'espèce majoritairement isolée a été *M. nivale*. Ceci est en accord avec plusieurs études menées au cours des dernières années sur les populations responsables de la fusariose du blé en France qui ont montré la part non négligeable prise par *M. nivale* et *F. tricinctum*, notamment dans l'Est de la France où *F. graminearum* n'a pas été l'espèce la plus fréquemment isolée (Dubournet et al., 2008; Ioos et al., 2004).

L'étude des corrélations entre les différentes variables notées sur épi montre qu'à l'inverse de S1 qui avait une influence, même faible, S3 n'a pas eu d'influence sur les notations à la récolte, que l'on considère les symptômes sur grains ou les composantes du rendement (Tableaux 4.35 et 4.36). Il a déjà été montré, au moins dans le cas de *M. nivale*, que bien que le champignon produise des symptômes sur épis, la sévérité n'était pour autant pas forcément corrélée au rendement, même si des pertes ont été constatées en présence du pathogène (Brennan et al., 2005; Maurin et al., 1996). Ce symptôme S3 n'a pas non plus influencé l'accumulation des mycotoxines dans les grains. Cette constatation est logique puisque *M. nivale* n'est pas producteur de mycotoxines et que *F. tricinctum* est producteur de moniliformine, mycotoxine qui n'a pas été dosée durant l'expérimentation (Bottalico, 1998; Logrieco et al., 1991). Il semble donc que l'inoculum indigène, bien que présent lors des notations n'ait pas eu d'effet significatif sur les problématiques essentielles considérées par cette étude : économiques, avec le rendement, et sanitaires, avec l'accumulation des

mycotoxines. Ceci révèle en outre que lors des deux années d'études, dans le contexte pédoclimatique étudié, la fusariose n'aurait pas été un problème majeur.

#### IV.4.1.2 Cas du symptôme S7 (épillet échaudé) : lié à *F. graminearum*

Le symptôme S7 correspond à un échaudage d'une partie de l'épi. La bibliographie avance que ce symptôme serait la conséquence d'une attaque de fusariose sur un épillet qui empêcherait une nutrition correcte des épillets situés au-dessus de l'épillet touché (Logrieco et al., 2002; Sutton, 1982). S7 s'est comporté de la même manière que S1, *F. graminearum* a donc bien été lié à l'apparition de ce symptôme (tableau 4.22) : les parcelles inoculées au stade deux nœuds ont été plus touchées que les parcelles non-inoculées et l'effet variétal a été celui attendu, les variétés Charger et Maxwell ayant été plus touchées qu'Apache. Dans l'essai ITK10, S7 a été très peu relevé et la comparaison des essais Fusa10 et ITK10 montre que l'essai Fusa a été significativement plus touché qu'ITK10, confirmant l'action de *F. graminearum* (Tableaux 4.23 et 4.24). L'étude des corrélations entre les variables notées sur épi en 2010 a également montré les effets proches des symptômes S1 et S7 (Tableau 4.36). La corrélation de S7 avec le taux de grains roses était la même que celle qui existait entre S1 et le taux de grains roses. Si S7 a été moins corrélé au rendement que S1, il a en revanche été plus corrélé à l'accumulation des mycotoxines dans les grains, ce qui prouve que les deux notations peuvent apporter des informations complémentaires.

IV.4.2 Implication des symptômes autres que « grain rose » notés au stade récolte sur le rendement et l'état sanitaire des grains récoltés

#### IV.4.2.1 Cas du symptôme grain ridé : lié à *F. graminearum*

Le symptôme grain ridé est habituellement lié dans la bibliographie au développement de la fusariose (ITCF, 1999; Logrieco et al., 2002; Sutton, 1982). Les résultats observés dans l'essai Fusa au cours des deux années d'études ont confirmé cette relation (Tableaux 4.27 et 4.29) : le taux de grains ridés a été supérieur dans les parcelles inoculées au stade deux nœuds à celui dans les parcelles non-inoculées. L'effet variétal a également confirmé le lien avec la fusariose, les variétés Charger et Maxwell ayant été plus touchées par ce symptôme que la variété Apache. Cependant, l'effet variétal dû à Charger s'est aussi fortement fait ressentir dans la notation de ce symptôme dans l'essai ITK09, particulièrement dans les parcelles menées de manière intensive (Tableau 4.27). De plus la comparaison des essais Fusa09 et ITK09 n'a pas pu faire apparaître de différence entre les deux essais, malgré l'effet de l'inoculation au stade deux nœuds dans l'essai Fusa09 (Tableau 4.28). Ces deux constatations montrent que si le symptôme grain ridé a bien été influencé par la présence de *F. graminearum*, les caractéristiques variétales ont aussi fortement contribué, Charger semblant avoir plus de grains ridés de façon naturelle.

En 2009 comme en 2010, le symptôme grain ridé a été corrélé négativement de manière assez élevée au poids de mille grains et au poids spécifique des grains (Tableaux 4.35 et 4.36). Cette corrélation avec le poids de mille grains et le poids spécifique se comprend assez facilement : par intuition, les grains ridés semblent moins remplis que des grains sains. Cette relation entre le taux de grains ridés et le poids de mille grains illustre, au moins dans l'essai

ITK où les grains ridés ont été plus importants en conditions intensives, le phénomène de compétition existant entre les plantes de blé pour la disponibilité en lumière, eau et nutriments lors du remplissage des grains. Valerio et al. (2009) ont montré qu'au delà d'une certaine densité de semis, le poids de mille grains pouvait diminuer, la densité optimale de semis étant aussi fortement influencée par la variété de blé considérée et par l'environnement. Cependant, d'autres études ont montré que le poids de mille grains était la composante du rendement la moins affectée par la densité de semis (Lloveras et al., 2004; Ozturk et al., 2006). En 2009, la corrélation entre le taux de grains ridés et le rendement d'une part, l'accumulation de mycotoxines d'autre part, a été faible alors qu'en 2010 la corrélation avec ces deux facteurs a été meilleure. Bien que liés à la fusariose du blé, les grains ridés ne présentent pas de mycélium apparent à leur surface, à l'inverse des grains roses : l'accumulation de mycotoxines dans ces grains est certainement moins importante, rendant la corrélation entre ces deux facteurs peu significative. Quant au rendement, s'il est bien dépendant du poids de mille grains, il dépend aussi du nombre d'épis au m<sup>2</sup> et du nombre de grains par épi, facteurs qui prennent une place plus importante dans sa détermination (Ozturk et al., 2006). Il semble donc que le taux de grains ridés ait plus ou moins d'importance selon les cas de figure rencontrés chaque année.

#### IV.4.2.2 Cas du symptôme grain moucheté : inversement lié à *F. graminearum*

En 2009 comme en 2010, le symptôme grain moucheté a été influencé par l'inoculation au stade deux nœuds et par la variété de blé (tableaux 4.27 et 4.29). Mais à la différence des symptômes considérés jusqu'à présent, la proportion de grains mouchetés a été supérieure dans les parcelles non-inoculées et la variété Apache a été plus touchée que la variété Charger. La bibliographie attribue ce symptôme à l'espèce *M. nivale* (ITCF, 1999). Il semble que son développement soit d'autant plus aisé que l'espèce n'est pas en compétition avec *F. graminearum*. Cassini (1981) considère d'ailleurs *M. nivale* comme un faible compétiteur dont le développement peut être limité par celui d'autres *Fusarium* sp.. Ce phénomène a été confirmé sur plantules de blé où le développement de *M. nivale* a été inhibé par la présence de *F. culmorum* (Simpson et al., 2004). Le fait que la variété Apache ait été significativement plus touchée que la variété Charger confirme en outre l'hypothèse avancée dans la partie III.4.1 : bien que résistante à la maladie sur épi, Apache serait plus sensible à l'espèce *M. nivale*, faisant apparaître des différences de réactions des variétés en fonction de l'agent rencontré. Cette hypothèse est également confortée par les états sanitaires à la récolte qui ont montré que quelles que soient les modalités considérées, la proportion de *M. nivale* était toujours plus forte sur la variété Apache que sur la variété Charger (Tableau 4.33). La sensibilité plus forte de la variété Apache à *M. nivale* qu'aux *Fusarium* spp. est en contradiction avec les phénomènes habituellement rapportés qui montrent que le niveau de résistance d'une variété est le même contre tous les acteurs du complexe de la fusariose, y compris *M. nivale* (Diamond and Cooke, 1999; Mesterhazy et al., 2005; Vaneeuwijk et al., 1995). Quoiqu'il en soit, cette différence de sensibilité ne semble pas avoir eu de conséquence sur les rendements.



Le seul fait en contradiction avec la responsabilité de *M. nivale* dans le développement du symptôme grain moucheté est la corrélation entre ce symptôme et S3 sur grain pâteux en 2010 (Tableau 4.36). En effet, S3 et le symptôme grain moucheté, bien que tous les deux attribués à *M. nivale*, n'ont absolument pas été corrélés. Il est possible qu'un même agent soit responsable de plusieurs infections différentes à des moments différents. Les notations de la première année ont d'ailleurs prouvé que ce champignon pouvait être présent et provoquer l'apparition de grains mouchetés sans avoir été détecté sur épi puisque le symptôme S3 avait été attribué à *F. tricinctum*. Plusieurs études ont montré que dans le cas de *F. graminearum*, des infections tardives lors de la maturation des grains pouvaient provoquer des symptômes sur ces grains et l'accumulation de mycotoxines sans que cela ne s'accompagne par des signes de maladie sur épis (Argyris et al., 2003; Del Ponte et al., 2007; Yoshida and Nakajima, 2010). Les mêmes études n'ont pas été menées sur *M. nivale* en raison de son impact plus faible à ce stade de développement du blé. Bateman (2005) a en effet montré que contrairement au phénomène observé en présence d'autres espèces impliquées dans la fusariose, une inoculation à l'anthèse du blé par *M. nivale* n'avait pas eu d'effet sur le rendement. Quoiqu'il en soit le symptôme grain moucheté n'a pas eu d'influence sur le rendement et sur la production de mycotoxines (Tableaux 4.35 et 4.36). Les grains touchés par ce symptôme avaient d'ailleurs l'allure de grains sains et *M. nivale*, n'étant pas producteur de mycotoxines, n'a pas influencé leur accumulation (Bottalico, 1998; Logrieco et al., 1991). Dans une étude menée sur l'accumulation de mycotoxines en fonction de l'allure des grains récoltés, Neuhof et al. (2008) ont remarqué que les grains touchés par des spots noirs étaient peu porteurs de mycotoxines, mais sans déterminer la cause de ces spots. Ce résultat tend à confirmer ceux obtenus dans la présente étude.

#### IV.4.3 Part des grains de blé fusariés revenant au champ durant la récolte

La moisson s'accompagne de la perte d'une partie des grains de blé de façon inévitable. Le taux de perte lors de l'opération de séparation des grains du matériel autre que les grains ne dépasse généralement pas les 3% (Anil et al., 1998; Nik et al., 2009). Cette perte dépend de plusieurs facteurs : du type de culture, de la variété cultivée, du taux d'humidité de la culture au moment de la moisson, du taux de plantes adventices dans la parcelle récoltée, mais aussi des caractéristiques techniques de la moissonneuse-batteuse utilisée comme la hauteur de coupe du matériel ou la vitesse du rotor de séparation (Miu and Kutzbach, 2008a, b). Il est sûr que le taux de fusariose, jouant sur les caractéristiques des grains, doit également influencer cette perte. Si un nombre important d'études a montré que les grains de blé fusariés avaient un poids plus faible que des grains sains (Beyer et al., 2007; Cosic et al., 2006; Perkowski and Chekowski, 1991; Siuda et al., 2010), et que d'autres ont souligné que parmi les résidus sur lesquels survivait *F. graminearum* se trouvaient les résidus d'épis de blé, dont des grains fusariés (Khonga and Sutton, 1988; Kohl et al., 2007), aucune étude à ma connaissance n'a cherché à caractériser ni à quantifier la proportion de ces grains retournant au champ.

L'étude statistique portant sur la différence du poids d'un grain récolté par machine et du poids d'un grain récolté manuellement a montré une différence significative entre les parcelles non-inoculées à deux nœuds et celles inoculées à deux nœuds (Tableau 4.26). En admettant que les échantillons avant récolte aient été identiques, car provenant des mêmes

parcelles, alors si les deux types de récolte avaient été comparables, la différence aurait été égale à zéro, ce qui est plus ou moins le cas pour les parcelles non-inoculées (différence de 0,7% dans les parcelles non-inoculées et de 2,5% dans les parcelles inoculées). Pourtant l'écart avec les parcelles inoculées est significativement différent, ce qui veut dire qu'il s'est passé quelque chose dans ces parcelles inoculées lors de la récolte qui n'a pas eu lieu dans les parcelles non-inoculées. En admettant que la récolte manuelle permette de conserver l'intégralité des grains, alors la différence entre les deux types de récolte s'explique par une perte d'un type de grains lors de la récolte par la machine. Puisque la différence machine – manuelle est positive, cela veut dire que le poids des grains récoltés par la machine était globalement plus haut : les grains perdus seraient donc des grains de faible poids.

Par un raisonnement similaire à celui mené sur le poids d'un grain, il est possible de conclure que les grains de grande surface ont été perdus lors de la récolte à la machine, particulièrement dans le cas de la variété Apache alors que moins de grains ont été perdus pour la variété Charger, la variété Maxwell étant intermédiaire. Cet effet de la variété sur la différence entre les récoltes confirme l'effet montrant que les grains récoltés manuellement avaient une surface plus importante : les grains de grande surface auraient été perdus lors de la récolte à la machine.

Les données accumulées à la fois sur le poids des grains et sur la surface des grains tendent à montrer que ce n'est pas seulement la taille des grains qui est importante pour déterminer ce qui retourne au champ. Les grains ayant eu la plus faible surface étaient ceux de la variété Charger, pourtant, c'est aussi pour cette espèce que la différence entre les récoltes par machine et manuelle était la plus faible. Les grains perdus lors de la récolte à la machine étaient d'une part les grains de faible poids, et d'autre part les grains de grande surface. Il semble donc que la notion influençant principalement les différences soit plutôt la densité des grains. Ce fait est confirmé par l'étude du rapport poids : surface des grains qui montre que celui-ci a été plus faible dans les parcelles récoltées manuellement, ce qui signifie que les grains de faible densité ont été perdus lors de la récolte à la machine. Cela semble assez logique si l'on considère le fonctionnement de la moissonneuse batteuse qui fait voler les parties du blé de faible densité pour les évacuer (glumes et glumelles). Les grains de faible densité s'envoleraient de la même manière. Ces grains retournant au champ sont à la fois conditionnés par leur état fusarié (étude du poids d'un grain) mais aussi par la variété (étude de la surface).

S'il est possible par cette étude de mettre en évidence une perte de grains lors de la récolte machine, il est en revanche difficile de quantifier cette perte. Il aurait fallu pour cela pouvoir récolter le même nombre d'épis dans chaque parcelle pour les deux types de récoltes, ce qui n'a pas été le cas. En effet il est difficile d'imaginer récolter seulement 35 épis à la machine ou l'intégralité de la parcelle manuellement.

#### IV.4.4 Information complémentaire sur la maladie apportée par l'essai ITK

L'irrigation et l'intensification ont eu les effets attendus sur le rendement (Tableaux 4.20 et 4.23). Les parcelles irriguées ont logiquement eu un meilleur rendement que les parcelles non-irriguées. Elles favorisent la santé des plantes et permettant un remplissage correct des

grains dans les périodes importantes que sont l'anthèse et le remplissage des grains (Debaeke, 1995; Zhang et al., 2011). La conduite intensive a aussi favorisé le rendement par rapport à l'extensification grâce à un nombre plus important de pieds de blé. A des densités de semis faibles comme celles utilisées dans l'essai ITK, environ 180 grains.m<sup>-2</sup> pour la conduite extensive et 300 grains.m<sup>-2</sup> pour la conduite intensive, l'augmentation du nombre de semences s'accompagne généralement d'une augmentation du rendement (Lloveras et al., 2004; Ozturk et al., 2006; Valerio et al., 2009).

Pour le reste, aucune tendance vraiment forte ne s'est dégagée, les facteurs ayant été significatifs au cours d'une campagne ne l'ayant pas été au cours de la seconde. Il semble tout de même que les symptômes S1 et S3 notés sur grains pâteux réagissent de manière inverse (Tableaux 4.20 et 4.23). En 2009 les parcelles non-irriguées étaient plus touchées par S1, la conduite n'ayant pas eu d'effet et en 2010 les parcelles extensives étaient plus touchées par S1, l'irrigation n'ayant pas eu d'effet. Pour S3, irrigation et conduite n'avaient pas d'effet en 2009 mais en 2010 les parcelles irriguées et intensives ont été plus touchées que les autres. L'irrigation et la conduite intensive pourraient favoriser les conditions d'humidité nécessaires à l'infection des épis de blé et à la dissémination de la maladie. Plusieurs études ont montré l'importance de l'humidité au moment de l'infection et plus particulièrement à l'anthèse. En contrôlant l'humidité par l'irrigation, la sévérité des symptômes relevés a été plus forte qu'en conditions non-irriguées (Lacey et al., 1999; Lemmens et al., 2004a; Xu et al., 2007). L'irrigation n'a pas eu d'impact sur S3 en 2009, mais les conditions climatiques avaient été plus humides qu'en 2010 au moment de l'anthèse (Figure 4.18), ce qui aurait pu gommer en partie l'effet de l'irrigation. La fréquence de S3 a aussi été plus faible en 2009 qu'en 2010 et a pu être insuffisante pour faire ressortir des facteurs significatifs. De même, Schaafsma and Tamburic-Ilincic (2005) ont relevé dans certains cas une augmentation de l'indice de fusariose sur épi liée à une augmentation de la densité de semis, certainement parce que la différence dans la densité de la canopée a favorisé le développement de la maladie, ce qui explique que les parcelles intensives aient été plus touchées.

Ce raisonnement n'est pas en accord avec ce qui a été relevé pour le symptôme S1 en 2009 pour lequel les parcelles irriguées ont été moins touchées par la maladie que les parcelles non-irriguées, résultat surprenant et pour lequel nous ne pouvons que spéculer : il est possible que les plantes aient été plus faibles et plus sensibles à la maladie ou encore que des erreurs de notations aient été commises en raison de l'état d'avancement des blés, le symptôme S1 se caractérisant par un épillet grillé. De plus, les parcelles ont été victimes d'une forte attaque de cécidomyies (*Sitodisplosis mosellana*) en 2009. Plusieurs études ont montré que les femelles de cette espèce étaient naturellement porteuses de propagules de *F. graminearum* et lors d'un test portant sur la dissémination par ces insectes de ces propagules, 29% des épis ont été contaminés par ce mode de dissémination (Mongrain et al., 2000; Mongrain et al., 1997). Ce phénomène a aussi pu jouer sur la dissémination de la maladie. La différence entre parcelles extensives et intensives lors de la notation du symptôme S1 peut aussi s'expliquer par l'application différente des fongicides. Lors de la floraison, les parcelles extensives n'ont reçu qu'un fongicide curatif à base d'époxiconazole destiné à stopper le développement de la rouille alors que les parcelles intensives, en accord avec leur conduite, ont reçu un fongicide à base de tébuconazole ciblant la fusariose. Une étude *in vitro* à propos de l'efficacité de ces

deux substances à contrôler le développement de *F. graminearum* a montré que le tébuconazole inhibait la germination des ascospores alors que l'époxiconazole n'avait que peu d'effet aux concentrations testées (Klix et al., 2007). De plus, l'époxiconazole n'est pas parvenu à inhiber complètement la croissance mycelienne. En conditions naturelles, l'époxiconazole et le tébuconazole ont été capables de contrôler la fusariose sur épi en cas de faible pression en inoculum, mais l'époxiconazole a été d'une faible efficacité dans le contrôle de l'accumulation de DON à la fois lorsque les blés ont été inoculés par *F. graminearum* et lorsqu'ils ne l'ont pas été (Mennitti et al., 2003). L'efficacité des fongicides semble en outre étroitement liée aux conditions climatologiques car lors d'une étude recherchant à mettre en relation facteurs environnementaux et l'utilisation des fongicides, à la fois l'époxiconazole et le tébuconazole ont entraîné une stimulation de la croissance fongique lors de la croissance de blés à une température de 15°C et à des humidités relatives de 0,99 et 0,97 (Ramirez et al., 2004). Quoiqu'il en soit, ces résultats pour S1 sont à manier avec prudence et semblent peu robustes en raison du faible développement de la maladie due à *F. graminearum* dans l'essai ITK.

Les données sur les taux de maladie à la récolte sont également difficiles à exploiter. Elles ne sont disponibles que pour une seule année, les notations n'ayant pas été faites dans l'essai ITK en 2010. Le taux de grains mouchetés a été affecté par l'irrigation et par la conduite (Tableau 4.27). Les parcelles irriguées ont été plus touchées que les parcelles non-irriguées, certainement à nouveau en liaison avec des conditions d'humidité plus favorables au développement fongique. Les parcelles extensives ont été plus touchées que les parcelles intensives. L'étude des grains ridés a tout de même confirmé que Charger était particulièrement sensible à ce phénomène, l'intensification chez cette variété ayant été accompagnée d'un fort taux de grains ridés, en raison de la compétition pour le remplissage des grains déjà évoquée.

#### IV.4.5 Effets du climat sur la croissance de l'inoculum responsable de la maladie sur épi

La pertinence des variables utilisées pour expliquer le développement de la maladie sur épi, c'est-à-dire la somme des heures ayant cumulé une température supérieure à 15 ou 20°C et une humidité supérieure à 80% est confirmée par une étude de De Wolf et al. (2003) qui ont montré que les éléments prédictifs les plus efficaces concernant le climat étaient la durée des précipitations sept jours avant l'anthèse, la durée des températures entre 15 et 30°C sept jours avant l'anthèse et le nombre d'heures entre 15 et 30°C avec une humidité relative supérieure à 90% après l'anthèse. Le chapitre suivant, qui se focalise plus particulièrement sur la recherche d'indicateurs d'accumulation de mycotoxines dans les grains à partir des observations faites sur les épis de blé, montrera que le climat a eu une grande influence sur le développement de la maladie causée par *F. graminearum* au stade grain pâteux et à la récolte. La maladie causée par cet inoculum a été plus forte en 2009 car favorisée par des conditions climatiques chaudes et humides durant la floraison et la maturation des grains. Dans l'essai Fusa comme dans l'essai ITK, le phénomène a été l'inverse en ce qui concerne le développement du symptôme S3 et le développement global de la maladie, surtout supporté par la notation de ce symptôme (Tableau 4.25). Le taux de S3 a été plus fort en 2010 qu'en 2009. Des phénomènes de

compétition liés aux conditions climatiques peuvent expliquer ces résultats. Bien que la cohabitation des espèces liées au complexe de la fusariose soit systématique, le phénomène de compétition entre ces espèces régit leurs proportions relatives. L'espèce dominante ne colonise pas les épis de façon plus importante en présence du faible pathogène par rapport à une inoculation individuelle mais la croissance de ce faible pathogène est inhibée (Xu et al., 2007; Xu and Nicholson, 2009; Xu et al., 2006). En 2009, le fort développement de *F. graminearum* lié à des conditions climatiques favorables aurait pu freiner le développement de l'inoculum sauvage, essentiellement composé de *F. tricinatum* comme l'ont montré les isolements au stade grain pâteux et les états sanitaires à la récolte (Tableaux 4.26 et 4.33). En 2010 au contraire, les conditions moins favorables de chaleur et d'humidité auraient défavorisé le développement de *F. graminearum* au profit de celui de *M. nivale* qui est capable de se développer à des températures plus basses. Cette explication est confortée par la comparaison des années 2009 et 2010 au stade récolte (tableau 4.31). Le taux de grains mouchetés symptôme attribué à *M. nivale*, a été plus fort en 2010 qu'en 2009. Xu et al. (2008) ont confirmé la relation entre *F. graminearum* et *M. nivale* dans une étude qui visait à déterminer les conditions environnementales favorisant le développement de ces espèces : *F. graminearum* a été associé à des conditions chaudes et humides alors que *M. nivale* a été associé à des conditions plus fraîches et à des précipitations fréquentes mais courtes. Ces conditions correspondent en effet à ce qui a été observé durant les deux années de l'essai Fusa. Le développement de *F. tricinatum* en liaison avec les autres espèces impliquées dans la fusariose a été beaucoup moins étudié, *F. tricinatum* n'étant pas une espèce fréquente en règle générale. Elle a pourtant été très présente dans les conditions particulières de nos essais en 2009, année durant laquelle elle a été l'espèce sauvage dominante. De façon très intéressante, c'est dans une étude menée en France que ce phénomène a déjà été observé (Ioos et al., 2004). Dans cette étude, la fréquence de *F. tricinatum* a été particulièrement forte durant l'année 2001, situation qui ne s'est pas répétée les années suivantes. Ceci a correspondu à des conditions d'humidité forte juste avant la récolte. L'hypothèse des auteurs est que les espèces moins pathogènes pourraient être favorisées par des conditions post-anthèse d'humidité forte résultant de précipitations fréquentes.

#### IV.4.6 Difficultés dans les notations liées au facteur humain et pertinence de l'utilisation de l'analyse d'image pour la notation des symptômes

La notation visuelle des symptômes est difficile et hautement dépendante de l'œil du notateur. Ceci s'est traduit par des effets blocs omniprésents lors des notations, comme l'ont montré la notation au stade grain pâteux (Tableaux 4.19, 4.20, 4.22) et avant elle la notation au stade deux nœuds (partie III). Plus la notation a été fine, décomposée en de nombreux symptômes, et plus cet effet a été important. C'est pour cette raison que les résultats présentés sont des synthèses de différents symptômes notés, comme l'expliquent les annexes 19 et 21. Cela ne signifie pas que de réels effets bloc liés à des conditions locales particulières n'aient pas existé, mais ils sont masqués par l'effet notateur.

Il est en outre difficile d'attribuer un type de symptôme à un agent : l'exemple de la notation du symptôme S3 au stade grain pâteux a été représentatif. Ce symptôme était un ensemble de plusieurs symptômes qui avaient d'abord été différenciés les uns des autres mais qui ont

finaleme nt été traités ensembles (Annexe 21). S3 a été attribué majoritairement à *F. tricinctum* en 2009 et à *M. nivale* en 2010, ce qui montre à la fois qu'à un agent peuvent correspondre plusieurs formes de symptômes et qu'à un même symptôme peuvent correspondre plusieurs agents. Les études décrivant les symptômes liés à la fusariose attribuent d'ailleurs en général un type de symptôme au complexe d'espèces et non à une espèce particulière (ITCF, 1999; Logrieco et al., 2002; Parry et al., 1995). Ce phénomène a été plutôt neutre dans les essais étudiés ici car l'accent a été mis sur *F. graminearum* qui a été l'espèce responsable de la production de mycotoxines, mais en conditions naturelles, des effets pourraient être envisagés : l'étude du symptôme S3 ne permettrait pas de prédire avec certitude si une attaque est liée à *F. tricinctum* ou *M. nivale* alors que les conséquences de ces deux espèces sur la récolte peuvent être très différentes, *F. tricinctum* étant producteur de mycotoxines et pas *M. nivale*.

C'est pour essayer d'éliminer en partie le biais dû au notateur que les notations par analyse d'image ont été envisagées. Plusieurs études ont entrepris la même démarche pour s'affranchir de ce biais (Luscier et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Skaloudova et al., 2006; Vizhanyo and Felfoldi, 2000). Ainsi, l'étude d'une quantité de vert sur une parcelle agricole a déjà été plusieurs fois menée, que cela soit pour déterminer le peuplement d'une culture, la présence de plantes adventices ou pour caractériser des paysages (Booth et al., 2006; Luscier et al., 2006; Meyer et al., 2004; Panneton and Brouillard, 2009; Rasmussen et al., 2007; Richardson et al., 2008; Wiles, 2011). Ici, les notations de la vigueur des plantes par analyse d'image durant l'hiver ont été efficaces, elles ont fait ressortir les mêmes facteurs significatifs que les techniques manuelles ou visuelles (Partie II). Comme pour la quantification de vert d'une parcelle, plusieurs études se sont intéressées à la détermination et à la quantification de symptômes par analyse d'image. Elle a été utilisée aussi bien pour identifier des infections bactériennes sur des champignons que pour déterminer des dégâts sur feuilles causés par des insectes ou des virus, ou encore pour mesurer des symptômes fongiques sur semences de soja, racines d'orges ou tronc d'arbres (Ahmad et al., 1999; Cermak et al., 2006; Kokko et al., 2000; Martin et al., 1999; Skaloudova et al., 2006; Vizhanyo and Felfoldi, 2000). Le chapitre suivant montrera que la notation du symptôme S1 au stade grain pâteux (épillet orange) a fait ressortir les mêmes variables significatives, l'inoculation au stade deux nœuds et la variété, qu'elle ait été menée par méthode visuelle ou par analyse d'image. L'étude des corrélations de ces deux notations avec les autres variables notées sur épi a montré que si la corrélation entre les deux notations n'était pas parfaite, celle avec les composantes essentielles que sont le taux de grains roses à la récolte, le rendement et l'accumulation des mycotoxines étaient identiques pour les deux types de notation (Tableau 4.36). La corrélation entre l'accumulation des mycotoxines dans les grains a même été meilleure avec la notation par analyse d'image qu'avec la notation par méthode visuelle. Des études ont montré que l'analyse d'image était effectivement plus précise, dans certains cas, que l'analyse classique (Skaloudova et al., 2006; Vizhanyo and Felfoldi, 2000). La comparaison de la somme des symptômes notée par analyse visuelle et par analyse d'image est à traiter avec plus de précautions. L'analyse d'image semble plus précise : elle a fait ressortir un effet de l'inoculation au stade deux nœuds et a permis de différencier les variétés Charger et Maxwell là où l'analyse visuelle ne le permettait pas (tableau 4.22). Les deux types de notation ont été moins bien corrélés entre eux que

pour l'étude du symptôme S1 (Tableau 4.36). S'ils ont été corrélés de manières semblables aux composantes fondamentales que sont le rendement et l'accumulation des mycotoxines dans les grains, il existe des différences, par exemple dans la corrélation avec le taux de grains mouchetés pour laquelle la corrélation était positive avec l'analyse visuelle et négative avec l'analyse d'image. Ceci tient au fait que l'analyse d'image a surtout été conditionnée par le symptôme S7 (épillet échaudé), comme le montre la corrélation entre les deux notations. S7 n'a pas été le symptôme le plus fréquent en termes de taux d'épillets touchés mais le fait que les épillets soient entièrement échaudés a forcément influencé la quantification basée sur l'analyse des couleurs. Ce fait explique aussi pourquoi l'inoculation au stade deux nœuds a été significative. L'analyse visuelle serait donc plutôt une analyse de fréquence de maladie alors que l'analyse d'image serait une analyse d'intensité.

Sur le plan pratique, la notation du symptôme S1 (épillet orange) par analyse d'image n'a nécessité qu'une seule calibration du logiciel pour l'étude de toutes les parcelles alors que l'analyse de la somme des symptômes a nécessité une calibration par variété. Ces calibrations peuvent être réutilisées au cours des années suivantes. Enfin, un avantage incontestable de l'analyse d'image par rapport à l'analyse visuelle est le temps de manipulation. En 2010, l'analyse visuelle a nécessité 68h30 avec un notateur par bloc, alors que l'analyse d'image n'a nécessité que 21h30. Ce gain de temps apporté par l'analyse d'image est un des attraits qui pousse à son utilisation (Cermak et al., 2006).

L'analyse d'image a des avantages indéniables en termes d'objectivité et d'économie de temps et est puissante dans l'analyse d'un phénomène particulier comme la quantité de vert d'une parcelle ou la quantité d'orange sur des épillets mais doit être maniée avec plus de précautions quand elle étudie des phénomènes plus globaux impliquant plusieurs agents, comme lors de l'analyse de la somme des symptômes sur épi.

#### IV.4.7 Conclusions sur le développement de la maladie sur épi

L'étude du développement de la maladie sur épi confirme l'implication des phénomènes principaux impliqués dans les pertes de rendement et dans l'accumulation des mycotoxines dans les grains qui seront abordés dans le chapitre suivant, mais sont évoqués dès à présent pour faciliter la compréhension : l'inoculum principalement responsable de la maladie a été *F. graminearum* présent sur les résidus de surface. Si l'inoculum sauvage, principalement représenté par *F. tricinctum* en 2009 et par *M. nivale* en 2010, s'est exprimé, il n'a pas eu de conséquence sur le rendement et sur la production de mycotoxines.

L'étude à ce stade a tout de même fait ressortir quelques pistes intéressantes d'investigation, aussi bien scientifiques, que techniques. Sur le plan scientifique, elle a prouvé qu'une différence de sensibilité des variétés de blé aux différentes espèces impliquées dans le complexe de la fusariose pouvait exister : la sensibilité particulière de la variété Apache à l'espèce *M. nivale* a été confirmée, même si cette sensibilité n'a pas eu d'effet sur les rendements, y compris une année où cette espèce s'est plus fortement exprimée, comme en 2010. Elle a mis en évidence les compétitions existant au niveau de l'épi entre les différents acteurs de la fusariose en liaison avec le climat. Elle a, en outre, montré qu'une part des grains de blé porteuse d'inoculum retournait au champ lors de la récolte. Sur le plan technique,

l'étude a démontré l'intérêt de l'outil informatique dans la notation des symptômes, apportant objectivité, répétabilité et permettant une économie certaine de temps.

## **V Recherche d'indicateurs précoces du risque de développement de la maladie tout au long de la croissance de la plante**

Afin de mettre en évidence les paramètres les plus à même de prédire le risque d'évolution de la maladie pour le rendement et l'accumulation de mycotoxines dans les grains, des corrélations multiples ont été calculées.

### **V.1 Corrélations entre les variables notées du semis à la récolte**

Les corrélations en bleu ont déjà été étudiées dans les parties précédentes. L'étude des corrélations restantes a pour but de lier entre elles les trois parties considérées précédemment : le développement hivernal de la maladie, le développement de la maladie au stade deux nœuds et le développement de la maladie sur épis.

En 2009, les notations faites au stade hivernal de la maladie ont été peu corrélées à celles faites au stade deux nœuds, et encore moins à celles réalisées au stade grain pâteux (Tableau 4.37). De même les notations faites au stade deux nœuds n'ont pas été corrélées à celles faites sur épis (grain pâteux et récolte) et aux composantes du rendement. En revanche, les notations hivernales ont été corrélées au poids de mille grains, en particulier le pourcentage de levée qui a aussi bien été corrélé à la notation des grains ridés et dans une moindre mesure à celles des grains mouchetés et des grains sains.

En 2010 au contraire, aucune corrélation claire n'est ressortie (Tableau 4.38). Le seul point à noter a été une faible corrélation entre la somme des symptômes à deux nœuds et les notations de S3 au stade grain pâteux, des grains mouchetés, des grains sains et du rendement.

### **V.2 Discussion générale sur la possibilité de prédiction des effets de la maladie sur le rendement et la production de mycotoxines**

L'étude des corrélations entre les trois périodes de notations a montré qu'il était difficile de faire le lien entre des phénomènes se passant au début de la croissance du blé et des phénomènes se passant à la fin de la croissance du blé. En effet, les notations hivernales, la notation au stade deux nœuds et les notations sur épi n'ont pas été corrélées entre elles. Cette tendance est celle largement répandue dans la bibliographie. Haigh et al. (2009) ont tout de même noté que lors d'une infection par *M. nivale*, les plantules fortement malades développaient des symptômes plus sévères sur tiges et Xi et al. (2008) ont prouvé qu'en conditions contrôlées, des semences et des plantules infestées pouvaient causer des symptômes sur bas de tige mais sans être sûr du même phénomène au champ. Bateman (2005) n'a trouvé en revanche aucune corrélation entre la maladie sur tige et les taux de semences infectées et de plantules malades. Lors d'une étude portant sur *M. nivale* (Maurin et al., 1996), la corrélation entre les symptômes notés sur tiges et ceux notés sur épis n'a pas été très forte et si Bateman et al. (2007) ont noté que l'infection des grains récoltés était corrélée à



	% levée	Vigueur levée	Maladie à deux feuilles	Vigueur épi 1 cm	% plantes malades à deux nœuds	Somme des symptômes à deux nœuds	S1 grain pâteux	S3 grain pâteux	Rdt	PMG	Grains roses	Grains ridés	Grains mouchetés	Grains sains	Qté de DON
% levée	1														
Vigueur levée	0,624	1													
Plantules malades à deux feuilles	-0,437	-0,551	1												
Vigueur épi 1 cm	0,758	0,657	-0,577	1											
% plantes malades à deux nœuds	0,432	0,397	-0,244	0,369	1										
Somme des symptômes à deux nœuds	0,355	0,309	-0,337	0,326	0,916	1									
S1 grain pâteux	-0,080	-0,048	0,166	-0,021	0,062	0,034	1								
S3 grain pâteux	-0,373	-0,339	-0,016	-0,317	-0,352	-0,275	0,055	1							
Rdt	0,373	0,171	-0,189	0,266	-0,024	-0,014	-0,589	-0,054	1						
PMG	0,770	0,706	-0,589	0,637	0,364	0,333	-0,299	-0,236	0,580	1					
Grains roses	-0,391	-0,214	0,276	-0,360	-0,197	-0,156	0,651	0,266	-0,468	-0,507	1				
Grains ridés	-0,612	-0,428	0,431	-0,459	-0,180	-0,140	0,391	0,237	-0,440	-0,747	0,514	1			
Grains à mouchetés	0,520	0,398	-0,334	0,311	0,118	0,139	-0,288	-0,079	0,497	0,593	-0,410	-0,310	1		
Grains sains	0,528	0,354	-0,381	0,429	0,193	0,138	-0,555	-0,286	0,450	0,684	-0,771	-0,905	0,207	1	
Qté de DON	-0,246	-0,170	0,245	-0,282	-0,054	-0,025	0,521	0,285	-0,491	-0,413	0,737	0,417	-0,340	-0,594	1

Tableau 4.37 : Corrélations entre les variables notées du semis à la récolte en 2009

	% levée	Vigueur à deux feuilles	Maladies à deux feuilles	Vigueur épi 1 cm	% plantes malades à deux nœuds	Somme des symptômes à deux nœuds	S1 grain pâteux	S3 grain pâteux	S7 grain pâteux	Rdt	PMG	Grains roses	Grains ridés	Grains mouchetés	Grains sains	Qté de DON
% levée	1															
Vigueur à deux feuilles	0,825	1														
Maladie à deux feuilles	-0,249	0,063	1													
Vigueur épi 1 cm	0,145	0,365	-0,071	1												
% plantes malades à deux nœuds	0,065	0,150	0,219	-0,116	1											
Somme des symptômes à deux nœuds	-0,398	-0,147	-0,021	0,311	0,311	1										
S1 grain pâteux	0,185	0,125	-0,054	-0,267	-0,068	-0,278	1									
S3 grain pâteux	0,076	-0,133	0,105	-0,347	-0,093	-0,456	0,598	1								
S7 grain pâteux	0,093	0,090	-0,414	0,202	-0,428	-0,075	0,376	-0,070	1							
Rdt	-0,145	0,094	0,353	0,200	0,405	0,508	-0,658	-0,448	-0,561	1						
PMG	0,158	0,382	0,335	-0,167	0,362	-0,154	-0,220	0,362	-0,413	0,533	1					
Grains roses	0,258	0,167	-0,459	0,017	0,027	-0,305	0,562	0,264	0,555	-0,734	-0,426	1				
Grains ridés	0,100	-0,084	-0,401	0,067	-0,385	-0,174	0,369	0,160	0,457	-0,702	-0,737	0,726	1			
Grains à mouchetés	0,362	0,390	0,098	-0,246	0,141	-0,431	0,070	0,167	-0,125	0,093	0,787	0,020	-0,369	1		
Grains sains	-0,419	-0,295	0,183	0,145	0,075	0,568	-0,448	-0,306	-0,351	0,584	-0,020	0,760	-0,561	0,547	1	
Qté de DON	0,413	0,342	-0,353	0,040	-0,082	-0,412	0,536	0,186	0,668	-0,660	-0,132	0,830	0,513	0,334	-0,821	1

Tableau 4.38 : Corrélations entre les variables notées du semis à la récolte en 2010

L'infection sur tige, ils n'ont pas attribué le phénomène à un lien direct de cause à effet mais plutôt au fait que la source d'inoculum pour les deux infections était la même. L'infection systémique du blé depuis les tiges sur les épis est très peu probable, que cela soit par *M. nivale* ou par *F. graminearum*, les deux espèces fongiques les plus fortement impliquées au cours des essais (Clement and Parry, 1998). Plusieurs études ont d'ailleurs souligné qu'une même variété de blé n'était pas forcément résistante de la même manière durant toutes les phases de son développement : une variété sensible sur plantules peut être résistante sur épis et inversement (Arseniuk et al., 1993; Li et al., 2010; Wisniewska and Busko, 2005).

Les deux années d'étude ont montré des scénarii radicalement différents. Ils dépendent d'un équilibre entre le développement de la plante et le développement de l'inoculum responsable de l'infection, ou plus précisément, des différentes infections, cet équilibre étant fortement conditionné par les conditions climatiques. Deux, voire trois infections différentes causées par le complexe d'espèces impliquées dans la fusariose du blé apparaissent durant une campagne de culture de blé. L'inoculum responsable de ces différentes infections est différent, à la fois en termes d'espèce responsable et de source de l'inoculum. Même pour une espèce donnée, la pathogénicité peut être différente en fonction de la partie de la plante considérée. Fernandez and Chen (2005) ont montré que *F. avenaceum* était moins pathogène sur plantules que sur semences ou sur épis et que *F. graminearum* était relativement moins pathogène sur tiges que sur épis. La première infection intervient précocement, dès la levée des plantules de blé et pendant tout le développement hivernal de la plante. Elle est causée à la fois par l'inoculum présent sur les semences et par l'inoculum présent sur les résidus enfouis dans les premières couches du sol. L'implication de résidus contaminés laissés à la surface du sol au cours de cette période n'a pas été étudiée mais aurait aussi pu avoir des conséquences. Du fait des conditions climatiques assez froides, elle est principalement causée par *M. nivale*, espèce dont le développement est le plus facile dans de telles conditions, mais le scénario de l'hiver 2008-2009 a montré que *F. graminearum* pouvait aussi s'exprimer durant cette période. Les scénarii climatiques des campagnes 2008-2009 et 2009-2010 ont été différents dès la période hivernale. La première année, des conditions difficiles de levée ont permis une expression plus forte de l'inoculum sur des plantules certainement fragilisées, ce qui s'est traduit par des corrélations assez fortes entre les notations à la levée et celle au stade épi 1 cm (tableau 4.37). La seconde année, les conditions climatiques plus douces, qui auraient pu favoriser le développement de *F. graminearum*, ont surtout eu pour conséquence de permettre une vigueur plus importante des plantes, les rendant plus à même de résister au développement de la maladie. Cela s'est traduit par une faible corrélation entre les notations à la levée et celle au stade épi 1 cm (Tableau 4.38).

La deuxième infection est celle qui touche les tiges de blé, illustrée par la notation au stade deux nœuds. Si l'inoculum présent sur les semences de blé est toujours impliqué dans cette infection, ses effets semblent se diluer peu à peu. En 2009 comme en 2010, aucune implication des résidus contaminés présents dans la première couche du sol n'a pu être mise en évidence à ce stade. En revanche, l'effet de l'inoculum présent sur les résidus contaminés laissés à la surface du sol commence à se manifester, mettant en évidence deux modes différents de contamination du blé. Le premier remontant sur la plante depuis le sol est le résultat de l'action de l'inoculum apporté par les semences. Le second qui saute les parties

basses de la plante par splashing est le résultat de l'action de l'inoculum présent sur les résidus de surface. Bien que l'infection principale soit toujours causée par *M. nivale*, aucune correspondance entre l'infection hivernale et l'infection au stade deux nœuds n'a pu être mise en évidence (Tableaux 4.37 et 4.38).

La dernière infection est celle qui intervient sur épi, jusqu'à la récolte. L'inoculum responsable de cette infection est *F. graminearum*, apporté par les résidus contaminés laissés à la surface du sol. En 2009 comme en 2010, aucune implication de l'inoculum apporté par les semences et de celui apporté par les résidus contaminés enfouis dans la couche superficielle du sol n'a pu être mise en évidence. Les deux campagnes ont à nouveau montré des scénarii différents à ce stade, liés au climat. La maladie a été forte la première année, ce qui s'est traduit par de fortes pertes de rendement et par des taux de DON importants dans les grains : si l'effet variétal a bien été respecté, les taux de DON dans les grains ont dépassé la limite légale,  $1,25 \mu\text{g.g}^{-1}$  de matière sèche (réglementation européenne 1881/2006/CE), y compris pour la variété résistante. La seconde année, la maladie s'est moins exprimée, ce qui s'est traduit par des rendements plus hauts et par des taux de mycotoxines plus bas. Les taux de DON dans les grains de la variété résistante étaient en-dessous de la limite légale au cours de cette seconde année. Le développement de *F. graminearum* est favorisé par des conditions à la fois chaudes et humides. La somme des heures avec à la fois une température au-dessus de  $15^{\circ}\text{C}$  et une humidité supérieure à 80% a non seulement été plus haut la première année au moment de la récolte, mais il a surtout été plus haut au moment de la floraison et du remplissage des grains, la seconde année ne rattrapant son retard que peu de jours avant la récolte. Deux phases peuvent même être distinguées au niveau de l'épi : la première jusqu'à la floraison (notation au stade grain pâteux) et ensuite celle de remplissage des grains (notation à la récolte). En effet, au cours des deux années, alors que le taux de maladie était significativement le même au stade grain pâteux pour les deux variétés sensibles, la différence devenait significative au stade récolte, prouvant que l'histoire continue d'évoluer durant la phase terminale de la culture de blé. La première année, lors de laquelle l'évolution au cours de cette phase a été importante, le coefficient de corrélation entre le symptôme S1 au stade grain pâteux et le rendement a été inférieur à 0,6 ; la seconde année, lors de laquelle l'évolution a été plus faible au cours de cette phase, le coefficient de corrélation entre le symptôme S1 au stade grain pâteux et le rendement a été supérieure à 0,6. Si ce coefficient inférieur à 0,6 traduit une liaison indéniable entre les notations, il permet difficilement de faire de la prédiction. Au cours des deux années, le coefficient de corrélation entre la notation de S1 au stade grain pâteux et l'accumulation de DON dans les grains a en outre été inférieur à 0,6. Lors de la seconde campagne, l'accumulation de DON dans les grains était plus corrélée à la notation du symptôme S7 qu'à la notation de S1, mais c'était l'inverse pour le rendement, prouvant que les différentes notations pouvaient être complémentaires en termes de prédiction.

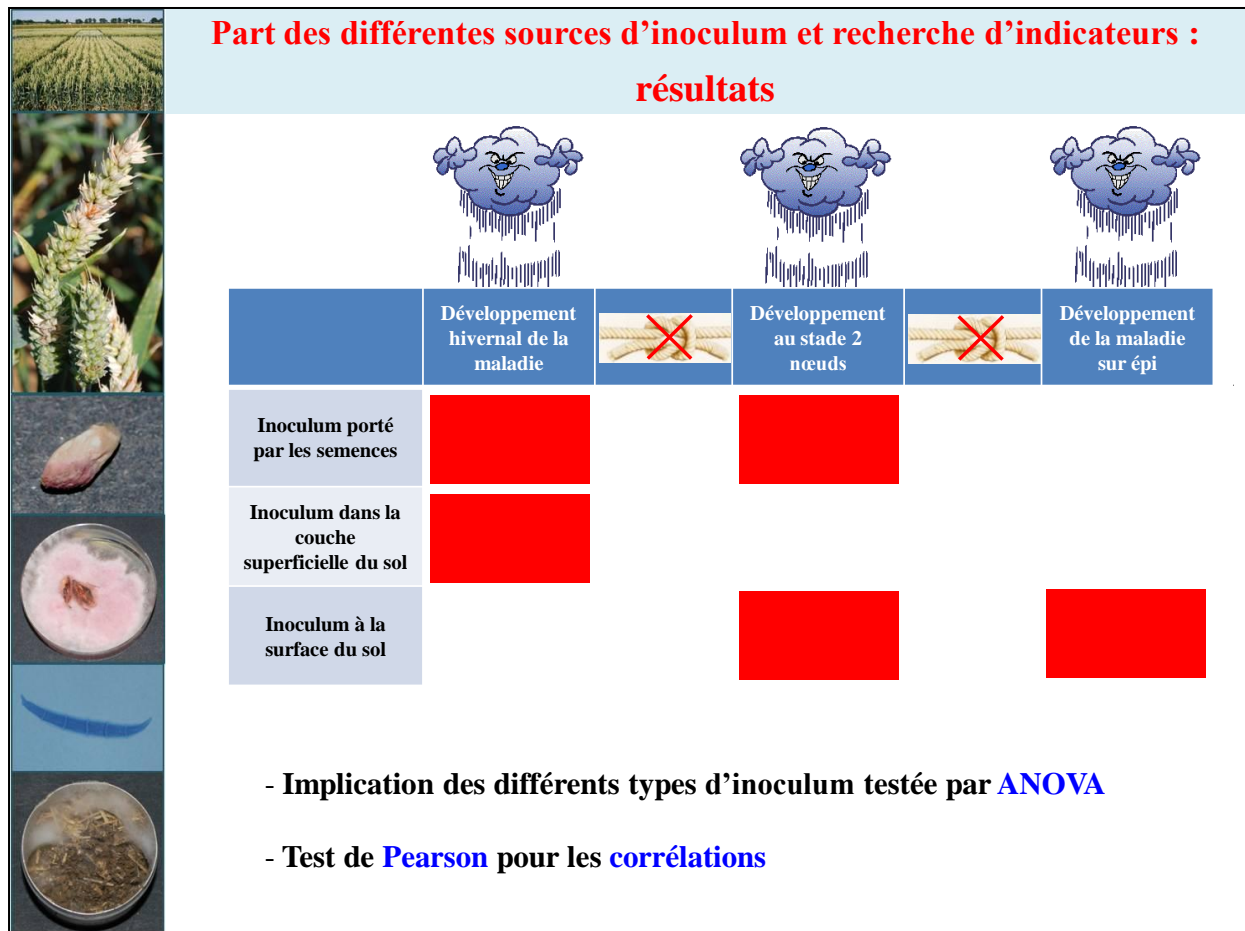
L'inoculation au stade deux nœuds a été une sorte de remise à zéro pour le développement de la maladie. Les notations essentielles que sont le rendement et l'accumulation de DON dans les grains n'ont pas été corrélées aux notations hivernales ni à celles faites au stade deux nœuds. Les notations du taux de maladie au stade grain pâteux et à la récolte n'ont pas été corrélées non plus avec les notations précédentes. Pourtant, lors d'un scénario comme celui de

la première année, durant lequel les plantes ont souffert lors de la période hivernale, il aurait pu y avoir des conséquences sur les résultats finaux. En effet, même si les inoculums responsables des différentes infections ne sont pas les mêmes, intuitivement, des plantes plus faibles à cause de l'infection hivernale, auraient pu être plus sensibles à l'infection sur épi. La remise à zéro lors de cette première année n'a pas été totale : les notations hivernales ont été corrélées avec le poids de mille grains. Les parcelles les plus vigoureuses ont donné les grains les mieux remplis. Cependant cela ne semble pas avoir eu de conséquence visible sur le rendement.

Les deux scénarios présentés ne sont que deux possibilités parmi un nombre important en Bourgogne. Que se serait-il passé une année où la maladie aurait été forte en hiver mais faible en été ? Une année où la maladie aurait été faible en hiver mais forte en été ? Ou encore faible jusqu'au stade grain pâteux mais forte durant le remplissage ? Autant d'autres possibilités qui peuvent être rencontrées en fonction du climat. L'étude au cours d'une troisième année aurait été particulièrement intéressante lors des notations hivernales en raison du taux important de *M. nivale* présent sur les grains récoltés en 2010.

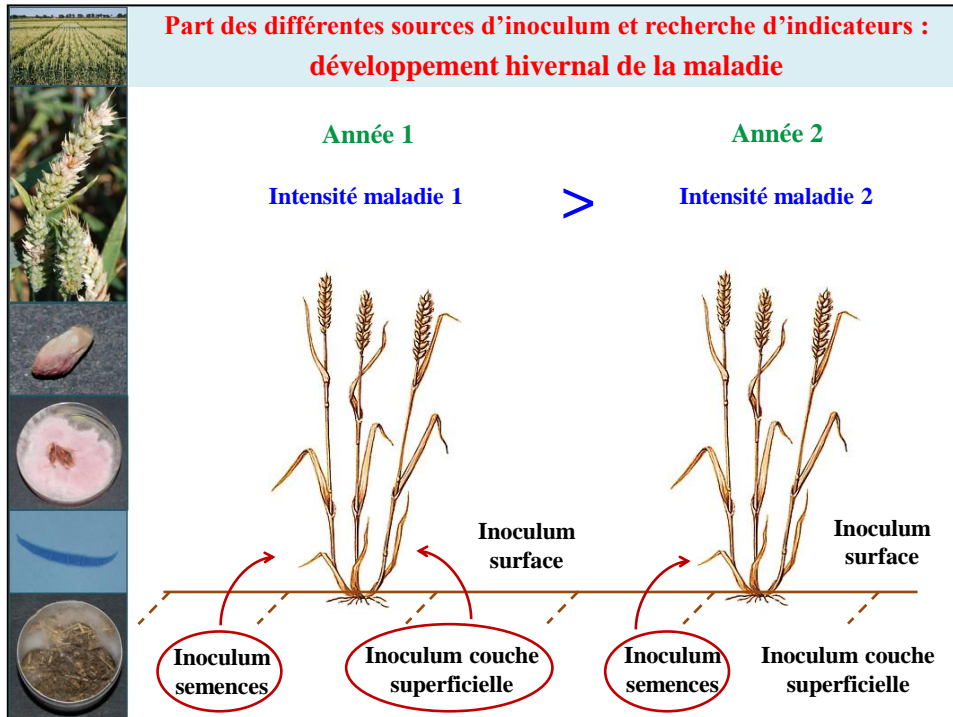
Dans ces conditions, il semble difficile de faire des prédictions sur les rendements et sur la production de mycotoxines assez précoces pour être efficaces. Les notations les plus corrélées à ces deux informations essentielles sont logiquement celles qui en sont les plus proches dans le temps, comme la quantité de grains roses à la récolte. Ce résultat est confirmé par une méta-analyse portant sur 163 études (Paul et al., 2005). Même la notation au stade grain pâteux ne semble pas assez informative, et si elle l'était, il serait déjà trop tard pour agir et ne servirait qu'à identifier des parcelles à risques et à garder sous surveillance. Le climat, seul facteur impossible à contrôler et à prévoir joue un rôle primordial dans le développement de la maladie, y compris en phase terminale de la culture du blé. Ce qui est possible en revanche est d'identifier et de contrôler des facteurs susceptibles d'influencer l'apparition de la maladie : le choix variétal, la gestion des résidus de culture, surtout en fonction de la campagne précédente qui peut instruire de la présence d'inoculum et la connaissance de l'inoculum apporté par les semences.

**VI Synthèse des résultats obtenus par le suivi chronologique du processus d'infection au champ et la recherche d'indicateurs précoces du risque de fusariose (présentation de soutenance de thèse)**

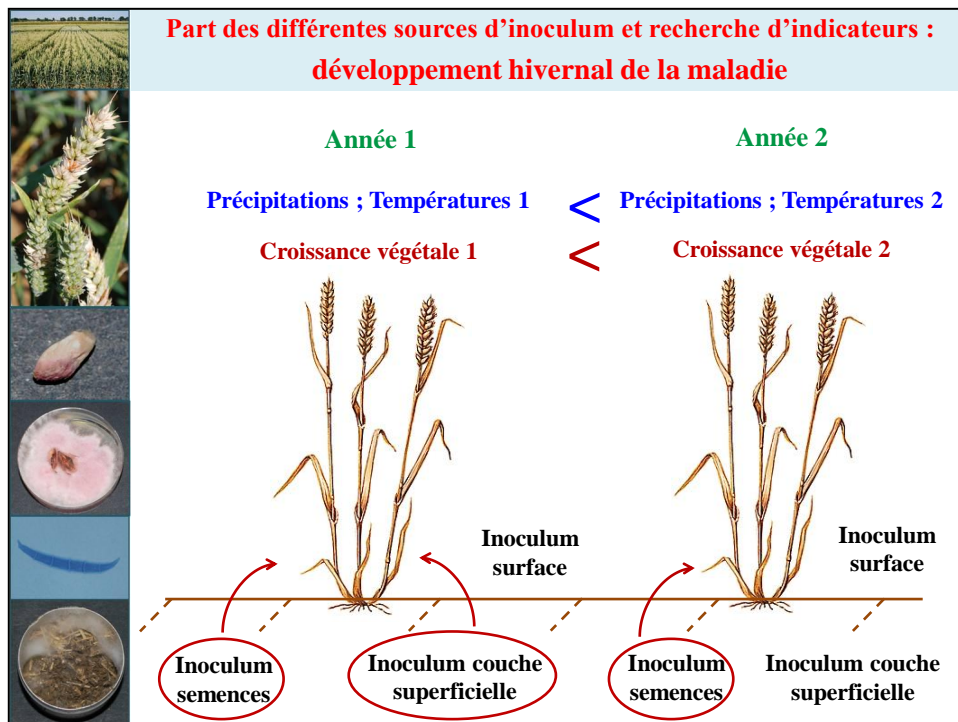


- Part relative des différentes sources d'inoculum identifiées dans le développement de la fusariose du blé durant les trois phases d'infection identifiées ;

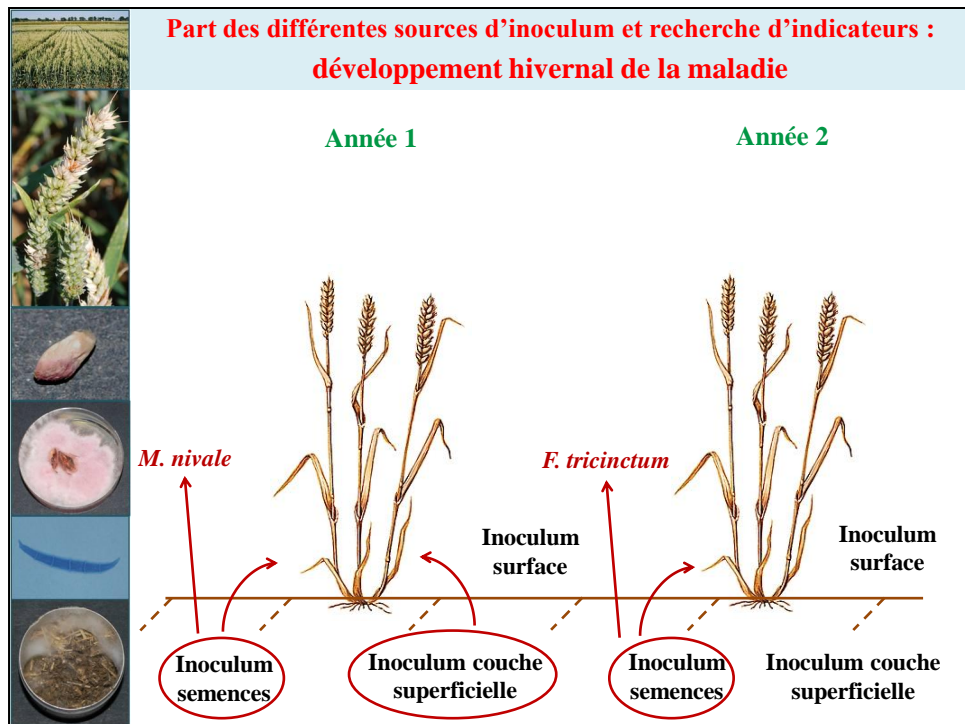
- pas de lien établi entre les différentes phases de développement de la maladie, notamment en raison de la prépondérance du climat lors de ces trois phases.



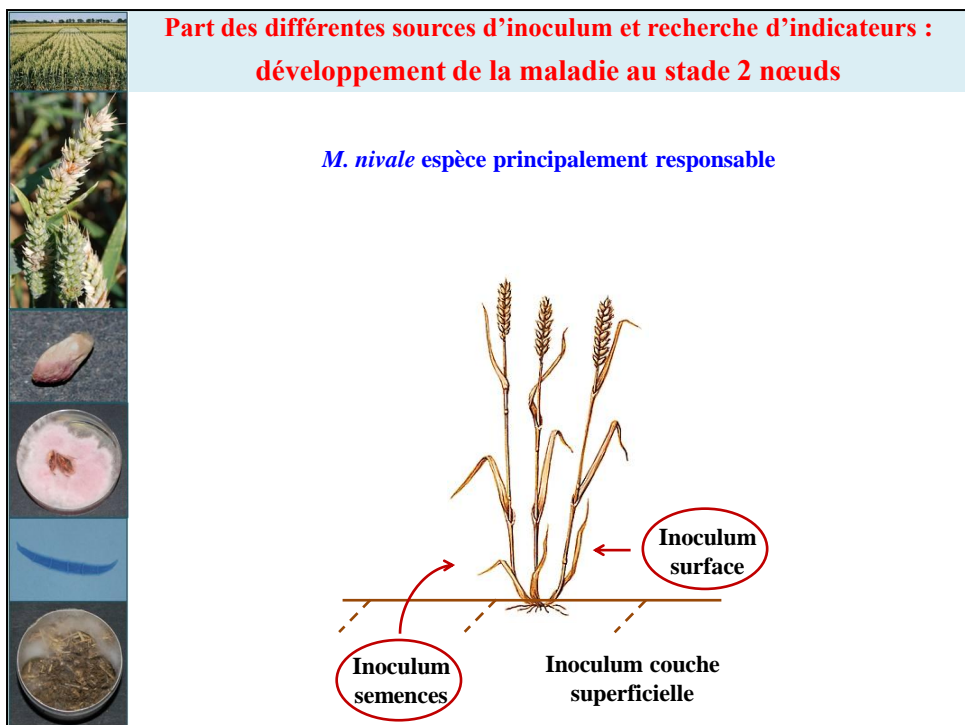
- Développement hivernal de la maladie : deux années différentes en termes d'intensité et d'inoculum responsable.



- En raison des conditions climatiques qui ont favorisées la croissance végétale la seconde année au détriment de la croissance de l'inoculum.

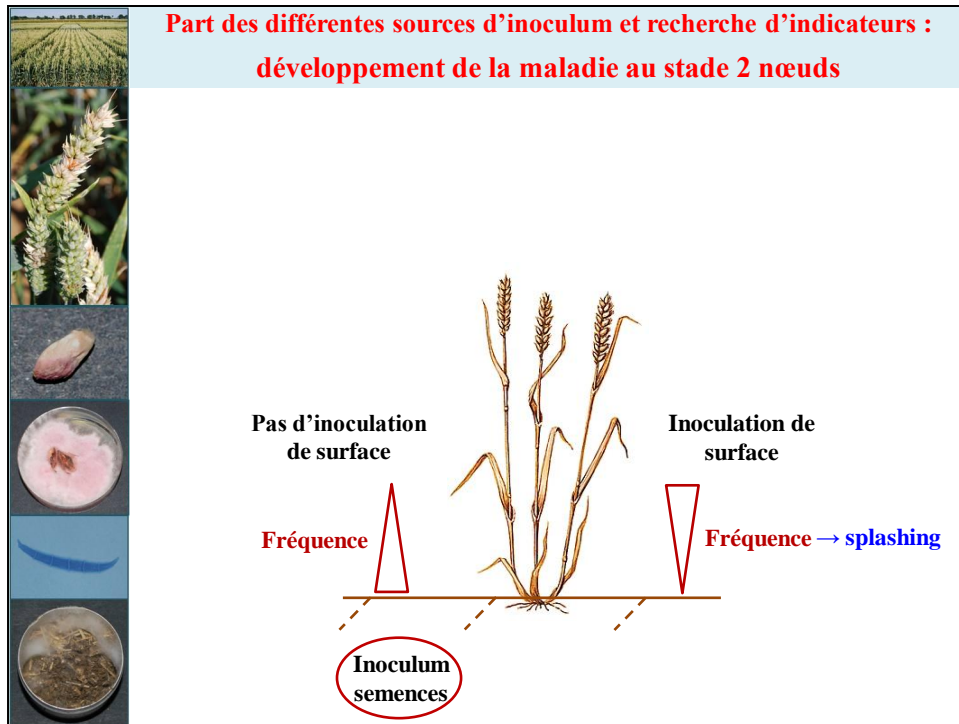


- En raison de la différence de l'inoculum ayant contaminé les semences de blé : *M. nivale* était majoritaire la première année, or le développement de ce champignon est favorisé par les conditions hivernales.

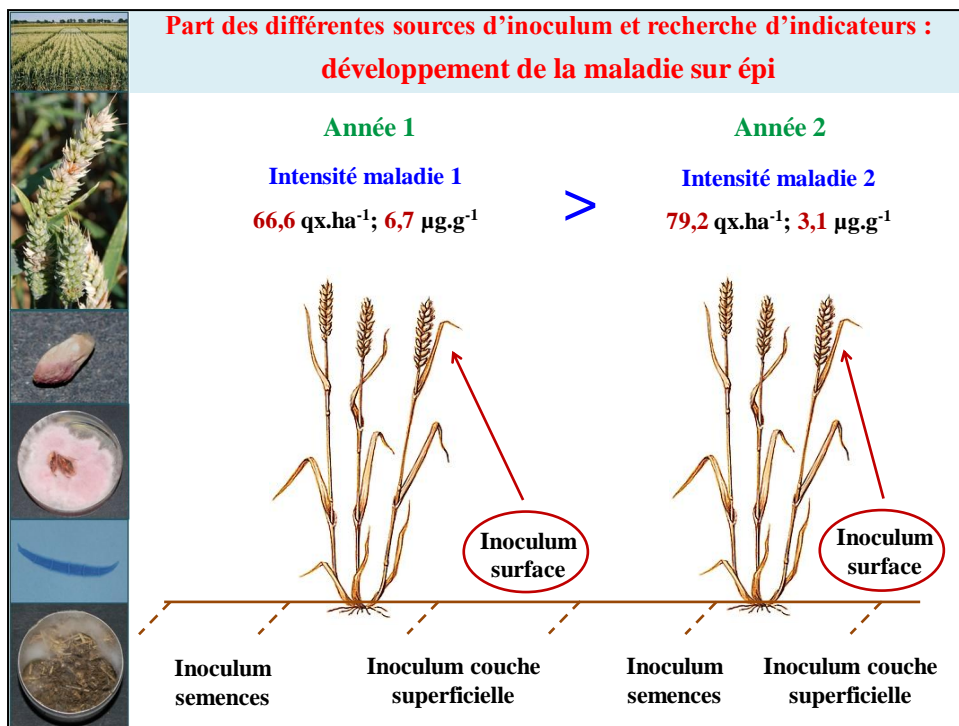


- Développement de la maladie au stade deux nœuds dans la continuité du développement hivernal : *M. nivale* est toujours l'espèce principalement responsable des symptômes.

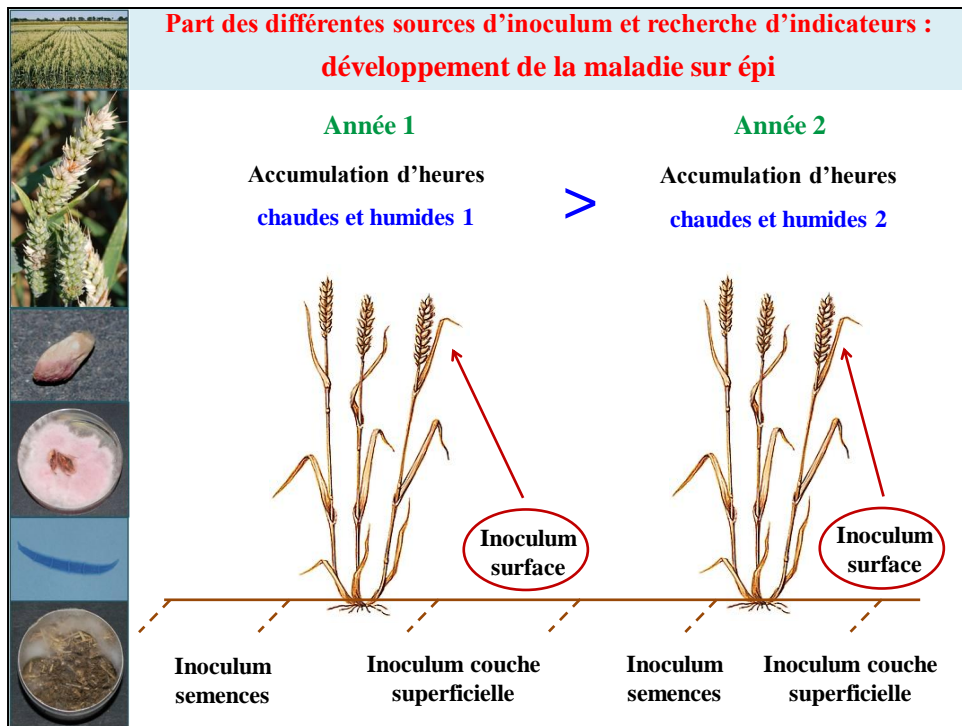




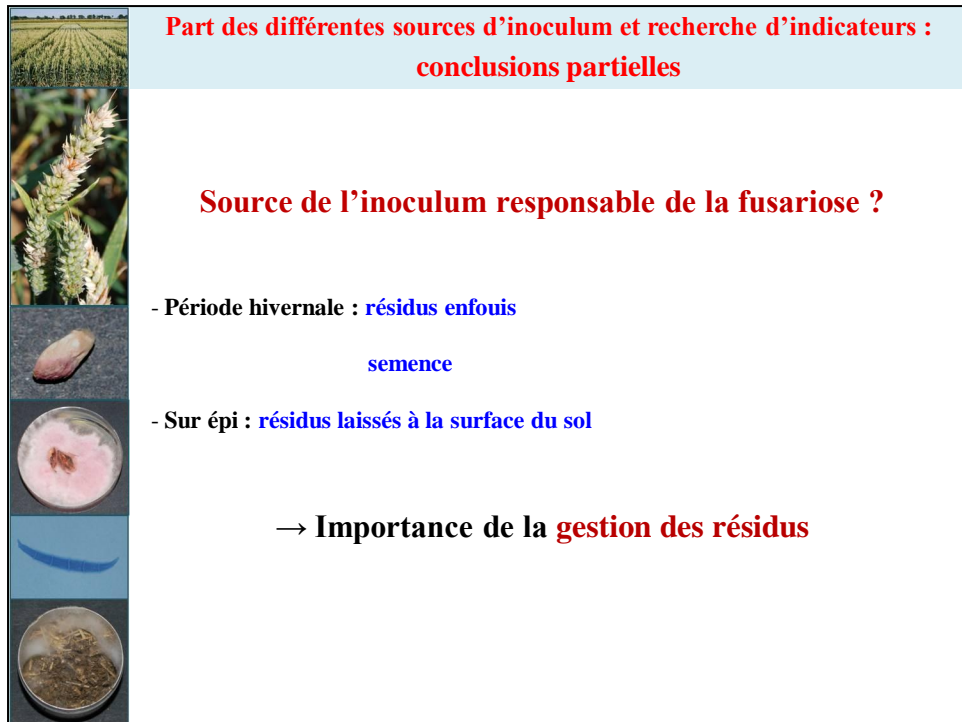
- Illustration de deux mode de propagation de la maladie : remontée de l'inoculum sur la plante depuis le sol ou dissémination de l'inoculum par splashing directement sur les parties hautes de la plante.



- Développement de la maladie sur épi : deux années différentes en terme d'intensité.



- En raison des conditions climatiques qui ont favorisées le développement de la maladie la première année.



**Part des différentes sources d'inoculum et recherche d'indicateurs : conclusions partielles**

**Possibilité de définir des indicateurs précoces du développement de la maladie sur épi ?**

- Pas de lien entre : développement hivernal , développement au stade deux nœuds et développement sur épi

→ **Pas d'indicateur précoce disponible**



**Part des différentes sources d'inoculum et recherche d'indicateurs : relation maladie sur épi / mycotoxines**

**Notation au stade grain pâteux**

**Notations au stade récolte**

0,61

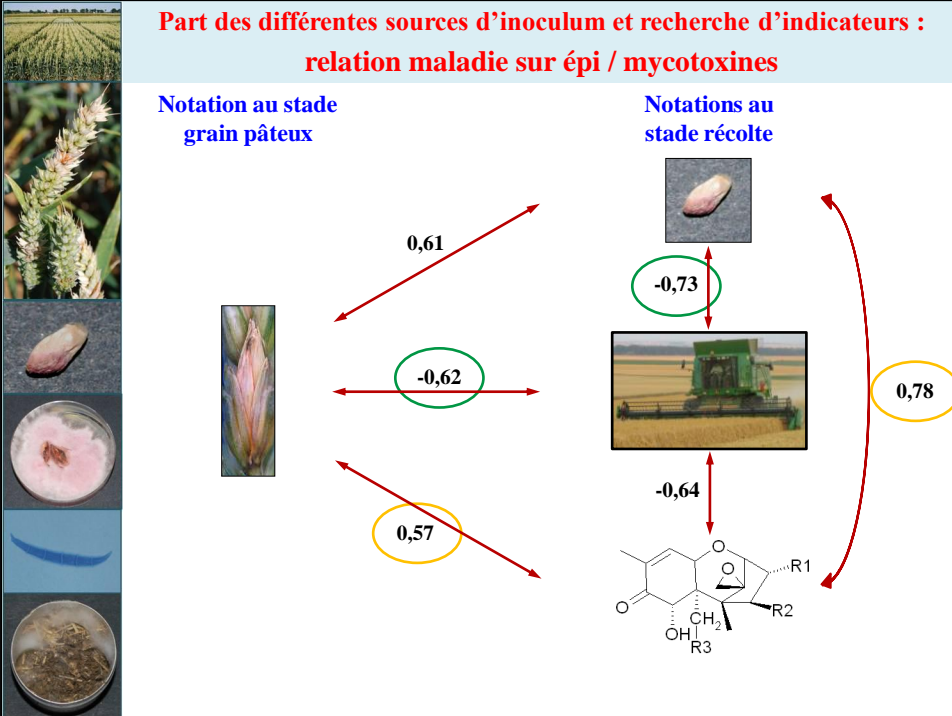
-0,62

0,57

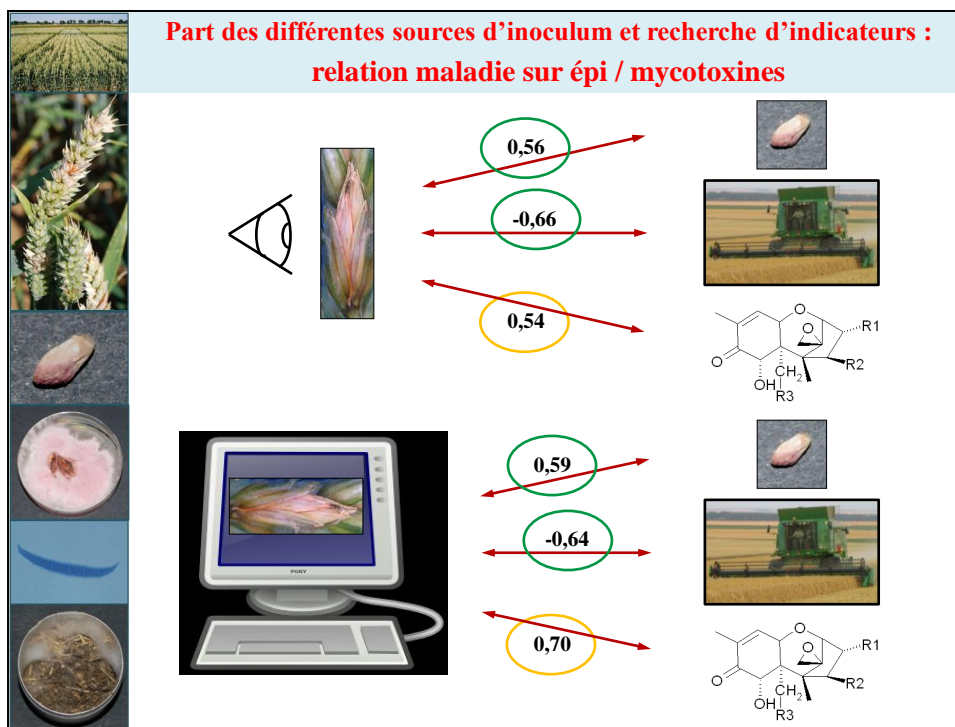
-0,73

-0,64

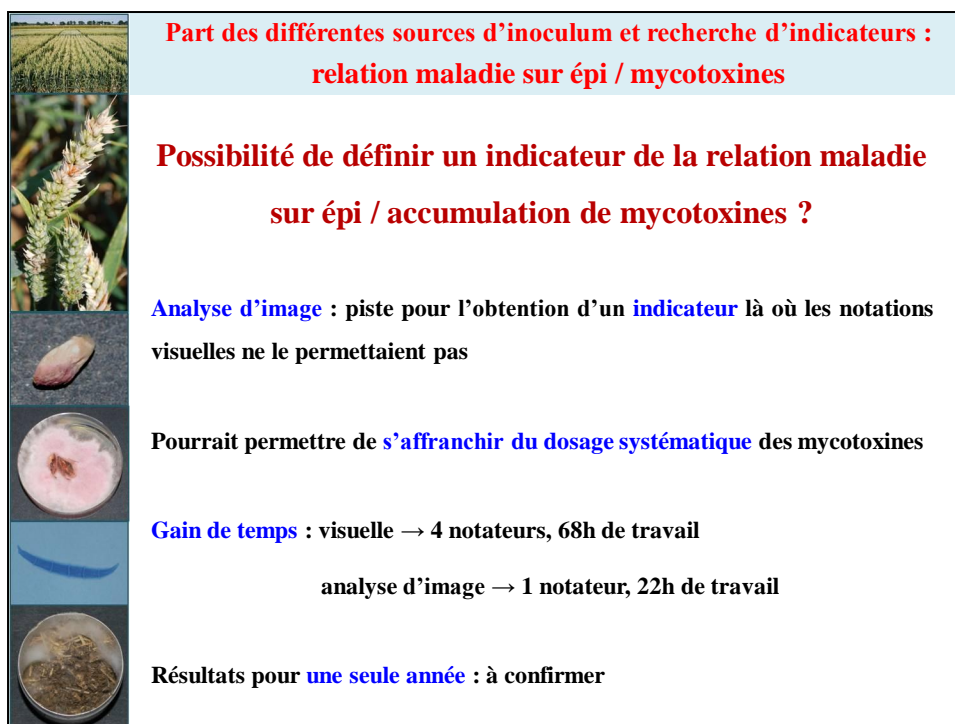
0,78



- Comparaison de la notation de la maladie au stade grain pâteux et au stade récolte : plus la notation est proche de la détermination du rendement et de l'accumulation du taux de mycotoxines dans les grains et plus la corrélation avec ces paramètres est forte.



- Comparaison de la notation de la maladie au stade grain pâteux par méthode visuelle et par analyse d'image : analyse d'image significativement plus efficace pour la corrélation avec le taux d'accumulation de mycotoxines dans les grains grâce à l'introduction de la notion d'intensité de la maladie.





**Chapitre 5 Using Fusarium head blight field  
assessment to predict the mycotoxins  
accumulation in wheat grains in Burgundy,  
France**

## Avant propos

Le chapitre précédent a montré la complexité de prévoir longtemps à l'avance les risques liés au développement de la fusariose du blé. Bien que les manifestations de la maladie puissent être visibles dès la levée et pendant tous le développement du blé, la diversité des agents impliqués, la diversité des symptômes observés et la part prépondérante prise par le climat rendent difficile toute interprétation et toute prédiction à long terme.

Ce chapitre, complément du chapitre précédent, est également basé sur les résultats obtenus lors de l'essai au champs mené durant deux ans. Il se focalise sur l'action particulière de *F. graminearum* durant la période s'étalant entre le stade grain pâteux du blé et la récolte. L'objectif de cette étude, après avoir vérifié l'action de l'inoculum de *F. graminearum* apporté par les résidus de culture, était de déterminer dans quelle mesure une relation pouvait être établie entre la notation du niveau de maladie sur épis, le rendement et l'accumulation de mycotoxines dans les grains afin de pouvoir prédire le risque encouru par les cultures de blé et aider à la fois agriculteurs et coopératives dans la détermination du risque de production de mycotoxines en complément des outils déjà à leur disposition.

## Using *Fusarium* head blight field assessment to predict the mycotoxins accumulation in wheat grains in Burgundy, France (submitted in *Biology and Fertility of Soils*)

J. Leplat<sup>a</sup>, P. Mangin<sup>b</sup>, L. Falchetto<sup>b</sup>, C. Heraud<sup>a</sup>, E. Gautheron<sup>a</sup>, C. Steinberg<sup>a</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France, 21065 Dijon, France

<sup>b</sup>Experimental Station of Epoisses, INRA Dijon, 21120 Bretenières, France.

### Abstract

The possible use of *Fusarium* head blight assessment in the field to determine mycotoxins accumulation in wheat grains (*Triticum aestivum* L. ssp *aestivum*) was assessed. The implication of agronomical factors in the development of the disease inferred by the phytopathogen fungus *Fusarium graminearum* Schwab, in the field, was checked during two consecutive years in Burgundy area, France. Hence, contaminated crop residues left at the soil surface or buried in the first layer of the soil were simulated by a field inoculation thanks to previously irradiated grains of barley coated with *F. graminearum*. The development of the disease on ears and on harvested grains of one resistant and two susceptible wheat varieties was assessed. The accumulated amount of mycotoxins was measured in harvested grains. As expected, the measured factors revealed that (i) the inoculum responsible for the infection on ears mainly came from residues left at soil surface rather than from buried residues and (ii) the susceptible varieties were more affected. The climatic conditions were shown to have a important effect on disease development. Yields and deoxynivalenol (DON) amounts were significantly correlated to disease notation on harvested grains but less correlated to visual disease notation on wheat ears. However, a new technique of disease assessment on ears based on image analysis seemed more efficient, objective and time saving than visual assessment, showing a better correlation to DON accumulation. It might be a good complement to the use of existing predicting tools and might limit the systematic mycotoxins measurement in suspected plots.

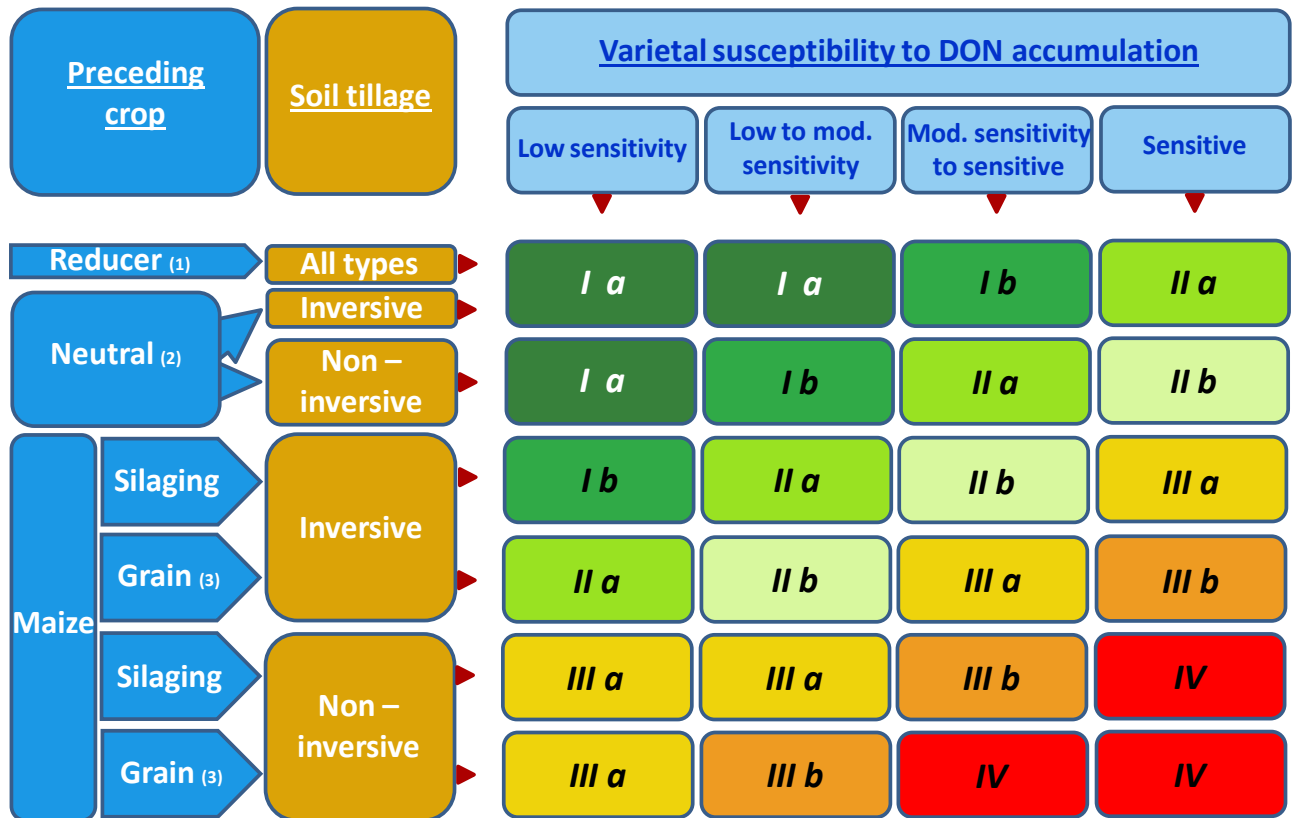
### Keywords

*Fusarium graminearum*, preceding crops residues, soil tillage, weather conditions, image analysis, Qualimetre<sup>®</sup>.

### Introduction

*Fusarium* head blight (FHB) is a worldwide disease affecting crop cultures, particularly wheat (Parry et al. 1995). The development of the disease affects the quantity, by important





**Reducer (1):** Rape, pea, flax, oil poppy, horse bean, alfalfa, cabbage, barley, potato

**Neutral (2):** Oat, beet, wheat, endive, Belgian endive, bean, fallow, white lupine, onion, ray grass, soybean, sunflower

**Grain–maize (3):** Grain–maize, sorghum

Figure V.1: Classes of agronomical hazard to DON accumulation in wheat grains

Hazard is divided into four different classes (I, II, III and IV), which are divided into two subclasses (a and b; <http://www3.syngenta.com>).

yield losses, as well as the quality of the grains, due to mycotoxin synthesis by the fungus. These mycotoxins are a major concern for human and animal health, since they are toxigenic and are stable during the storage (JEFCA 2001). In Europe, the most frequent and abundant mycotoxin produced in wheat is deoxynivalenol (DON), for which the European regulations set to  $1.25 \mu\text{g.g}^{-1}$  the acceptable limit in grains (1881/2006/CE; Talas et al. 2011; Yli-Mattila 2010). Besides, its acetylated derivatives 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV) and zearalenone (ZEA) could also be produced. The economical and health threats due to FHB originated a scientific concern about the pathogenic agent ecology and the way to manage it since 20<sup>th</sup> century (Parry et al. 1995; Sutton 1982).

Several *Fusarium* species have been described as belonging to a complex of fungi responsible for the disease. Nowadays, *Fusarium graminearum*, the anamorph stage of *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, is identified as one of the most important worldwide species composing the fungal complex (Bottalico and Perrone 2002; Parry et al. 1995). Similarly to the other *Fusarium* species in the complex, *F. graminearum* survives saprotrophically on infested crop residues which constitute the primary inoculum responsible for the infection of wheat heads (Bateman 2005; Summerell et al. 1990). Indeed, no-tillage or reduced tillage increases the risk of disease development and DON accumulation as compared to inversion tillage which reduces it (Blandino et al. 2010; Dill-Macky and Jones 2000; Maiorano et al. 2008). As extended period of warm temperature and relative moisture during wheat flowering are recognized to increase the severity of FHB, climate is another factor to consider during the disease development (Magan et al. 2011).

In France, wheat is the most cultivated crop (4935 thousand of ha cultivated in 2010) as well as the most traded (18.13 millions of tons exported during the 2009–10 campaign, [www.agpb.fr](http://www.agpb.fr)). In eastern France area, the farming cooperatives union (U.C.A., Union des Coopératives Agricoles) Cérévia markets the wheat production of four cooperatives, accounting for three millions of tons traded in 2009. In Burgundian area, the farming cooperative Dijon Céréales, one of the four cooperatives composing Cérévia, pools in silos wheat harvested from almost thousand subscribers from four distinct pedoclimatic areas. The silo contents are then pooled again to be transported through railway and fluvial way to Mediterranean harbour to be loaded on container ships. Each of these steps represents a risk to contaminate healthy harvests with non-healthy ones. Therefore, the main issue for the cooperative is to identify plots contaminated by mycotoxins before harvesting, in order to separate healthy plots from contaminated plots during storage and shipment.

Prediction tools exist to forecast the risk of mycotoxins accumulation in grains. Qualimetre<sup>®</sup> (Syngenta, AG., Switzerland) is the one used in Burgundian area. It is based on the analysis of agronomical hazards (preceding crops, soil tillage and varietal sensitivity to DON accumulation in grains, Figure V.1) coupled to a local climatic hazard analysis. The efficiency of this tool as been proved but the main drawback remains in the late availability of analysed results. This issue leads to a short time to perform ELISA tests and possibly HPLC controls on the suspected plots. On the other hand, a systematic control of the harvest is not economically and technically sustainable because of the price and the complexity of such analyses. Therefore the seek of indicators free from mycotoxins analysis and allowing a early

diagnosis is still relevant today. However, to conserve a reliable and objective measure of disease development, the observations of several assessors must be combined, which is again time consuming. This is why image analysis of representative samples of the plots can be an interesting alternative to identify appropriate indicators.

The aim of this study was (i) to estimate the implication of agronomical factors in the development of FHB under the Burgundian pedoclimatic context; (ii) to determine if a visual assessment of the disease can complete or improve the use of existing tools like Qualimetre<sup>®</sup>; (iii) to evaluate the efficiency of a disease assessment technique based on image analysis.

## Materials and methods

### *Field experiment design*

Wheat was cropped on the experimental field of Epoisses (INRA, Dijon, Bretenières, France) during two consecutive years (2009–2010). The soil from Epoisses is a silt loamy soil (8% sand, 54% silt, 38% clay, 2.3% organic matter, pH 8.2).

The test was conducted on a field (5°05'E; 47°14'N) of forty eight plots (9 m x 1.25 m per plot) divided in four blocks with a factorial randomization. In each block, three wheat varieties were studied: Apache, tolerant to FHB, Charger and Maxwell both susceptible to FHB. Sowing was performed with non-fungicide coated seeds of the three varieties of wheat according to a six furrows per plot pattern, at a density of 400 seeds.m<sup>-2</sup>. Using an inoculum consisting of 8 g.m<sup>-2</sup> of irradiated barley seeds, coated with *F. graminearum* (strain MIAE00376), the varieties were subjected to four different treatments: (i) non inoculated soil, (ii) soil inoculated during sowing (10/24/2008 and 10/20/2009) in the first layer of the soil, (iii) soil inoculated at the two nodes stage of wheat (04/23/2009 and 04/26/2010; Zadoks 32; Zadoks et al. 1974) at soil surface to simulate the action of non-buried contaminated residues, (iv) soil inoculated during sowing and at the two nodes stage. The treatments combination should cover the four main classes of agronomical hazard defined by the Qualimetre<sup>®</sup> tool (Figure 1). Crop was conducted under classical agricultural practices except it was not treated against FHB. Irrigation was applied from the inoculation at the two nodes stage until ear emergence, to promote FHB development.

A control field was conducted in parallel without any *F. graminearum* inoculation and with seeds coated with fungicides (0,4 l Austral<sup>®</sup> [fludioxonil 10 g.l<sup>-1</sup>] / 0,4 l Gaucho<sup>®</sup> [bitertanol 37.5 g.l<sup>-1</sup>] qsp 1 l, 1 cl for 100 g of wheat). The control was conduct under classical agricultural practices including treatment against FHB and was irrigated as test field.

### *Disease severity at soft dough stage of wheat (Z 85)*

#### Visual assessment (DS<sub>1</sub>)

Sampling was performed on June the 16<sup>th</sup> in 2009 and on June the 21<sup>th</sup> in 2010. Fifty wheat ears were randomly sampled in each plot. Severity of the disease was evaluated by counting the percentage of orange spikelets, corresponding to symptoms attributed to *F. graminearum*,

for each plot. Orange spikelets were kept for incubation on PDA medium (Potato Dextrose Agar), seven days at 25°C, to allow for microbial development and to identify the pathogens.

#### Assessment through picture analysis (*DS*<sub>2</sub>)

The second year, the ears sampled in each plot were scanned on both sides on a blue background using an A3-size scanner (Epson 10000XL, resolution: 2400 x 4800 dpi, optical density: 3.8 D). Two pictures per plot, corresponding to both sides of ears, were analyzed using Mesurim Pro (<http://pedagogie.ac-amiens.fr/svt/info/logiciels/Mesurim2/Index.htm>). Parameters were set to detect a range of orange colored pixels (HSL encoding) corresponding to FHB symptoms. These settings were applied to all pictures for image analysis leading to an estimation of the surface of FHB symptoms in mm<sup>2</sup>.

#### *Fusarium-damaged kernels (FDK)*

Together with the harvest, thirty five spikes from each plot were randomly sampled and threshed to obtain around thousand kernels. Percentage of damaged kernels was evaluated for each plot by counting the number of pink kernels.

#### *Grain yields and quality*

Yields were determined after harvesting on July the 25<sup>th</sup>, 2009 and on July the 19<sup>th</sup>, 2010. Quality of grains was evaluated using sanitary status of harvested grains. Regardless of the inoculation in the first layer of the soil, grains of Charger and Apache varieties were tested at the time of inoculation at soil surface. For each year, grains from replicated plots of a given modality were pooled and one hundred grains were assessed for their sanitary status.

Grains were first surface sterilized to detect putative microorganisms within the sample grains. Grains were washed 10 min in sodium hypochlorite (0.1% of active chlorine), rinsed 3 min in a sodium chloride solution (5 g.l<sup>-1</sup>) and two times in sterile water. Grains were incubated on PDA at 25°C for 7 days. The emerging isolates strains were morphologically and molecularly identified.

#### *Mycotoxins extraction and quantification*

A sample of 15 g of grains from the harvest was milled and screened to 0.5 mm for each plot. Two grams of the obtained meal were used to determine the moisture content of the samples. Mycotoxins were extracted by shaking 2 g of meal in 10 ml of acetonitril/H<sub>2</sub>O (84/16), for 3 h at 250 rpm and 25°C. Supernatant was recovered after a centrifugation for 3 min at 2000 g and purified through a Trichothecene P column (R-Biopharm Rhône Ltd., France). Two millilitres of filtrate were evaporated to dryness at room temperature. The residue was resuspended in 200 µl of methanol/H<sub>2</sub>O (1/1) for HPLC analysis in a Beckman Gold<sup>®</sup> HPLC module 126 and a Beckman Gold<sup>®</sup> DAD 168 nm detector (Beckman Coulter, Inc., USA). The mycotoxins were detected at 230 nm. HPLC conditions were adapted from (Bily et al. 2004). Twenty microlitres of each sample were injected into an HPLC column (Ultrasphere<sup>®</sup> 5 Octyl, Hichrom, Ltd., England) with the following gradient conditions using acid orthophosphoric

0.01 % ultra-pure water pH 2.6 (A) and acetonitril (B). The flow rate was 1 ml.min<sup>-1</sup>. The gradient started at 5 % B and went linearly to 30 % B at 14 min, then to 90 % B at 24 min and stayed isocratic during 5 min before returning to initial conditions at 31 min. Retention times were 5.3 min for NIV, 7.6 min for DON, between 13.3 and 13.6 for 3-ADON and 15-ADON and 22.4 min for ZEA. The mycotoxins quantification (*DON*) was performed using external standards (1 µg.ml<sup>-1</sup> to 50 µg.ml<sup>-1</sup>) prepared from commercial solutions (n'TOX, France) in methanol/H<sub>2</sub>O (1/1), with a detection limit of 0.11 µg of DON.g<sup>-1</sup> of wheat.

#### *Meteorological data*

The meteorological data were provided by the Climatik database managed by the Agroclim unit (INRA, Avignon, France). The sums of hours with a temperature above 15 °C or 20 °C and humidity above 80 % were chosen to represent the effect of humidity and temperature during the period from inoculation at two nodes stage to harvest.

#### *Statistical treatment of results*

For each year of experiment, the factors accounting for the variation of each variable were analyzed with an analysis of variance model:

$$Z_{ijkl} = \mu + Block_i + Inoculation1_j + Inoculation2_k + Variety_l + Inoculation1*Inoculation2_{jk} + Inoculation1*Variety_{jl} + Inoculation2*Variety_{kl} + Inoculation1*Inoculation2*Variety_{jkl} + \varepsilon_{ijkl} \quad (1)$$

where *Z* is the quantitative variable (*DS*<sub>1</sub>, *DS*<sub>2</sub>, *FDK*, *Yield*, *DON*), *Block* is the effect of the four repeated blocks (*i* = 1, ..., 4), *Inoculation1* is the effect of the inoculation in the first layer of the soil (*j* = 1, 2), *Inoculation2* is the effect of the inoculation at soil surface (*k* = 1, 2), *Variety* is the effect of wheat variety (*l* = 1, 2, 3), *Inoculation1\*Inoculation2*<sub>jk</sub>, *Inoculation1\*Variety*<sub>jl</sub>, *Inoculation2\*Variety*<sub>kl</sub>, *Inoculation1\*Inoculation2\*Variety*<sub>jkl</sub> are interaction effects and  $\varepsilon$  is the residual error.

the factors accounting for the variation of each variable including the year effect were also analyzed with an analysis of variance model:

$$Z_{ijkl} = \mu + Year_i + Inoculation1_j + Inoculation2_k + Variety_l + Year*Inoculation1_{ij} + Year*Inoculation2_{ik} + Year*Variety_{il} + Year*Inoculation1*Inoculation2_{ijk} + Year*Inoculation1*Variety_{ijl} + Year*Inoculation2*Variety_{ikl} + \varepsilon_{ijklm} \quad (2)$$

where *Z* is the quantitative variable (*DS*<sub>1</sub>, *FDK*, *Yield*, *DON*), *Year* is the effect of the two years of experiment (*i* = 1, 2), *Inoculation1* is the effect of the inoculation in the first layer of the soil (*j* = 1, 2), *Inoculation2* is the effect of the inoculation at soil surface (*k* = 1, 2), *Variety* is the effect of wheat variety (*l* = 1, 2, 3), *Year\*Inoculation1*<sub>ij</sub>, *Year\*Inoculation2*<sub>ik</sub>,

$Year*Variety_{il}$ ,  $Year*Inoculation1*Inoculation2_{ijk}$ ,  $Year*Inoculation1*Variety_{ijl}$ ,  $Year*Inoculation2*Variety_{ikl}$  are interaction effects and  $\varepsilon$  is the residual error.

For each trait, the normality and homogeneity of the residual distribution were studied. According to the studied trait, no transformation, a logarithmic transformation or a squared root transformation proved to be necessary to have normally and homogeneously distributed residues. Significance of differences between means was assessed using Newman–Keuls method. The ANOVA and Newman–Keuls test with  $\alpha = 5\%$  were carried out using XLSTAT (Addinsoft™, France). The traits were analysed using the inoculation type (in the first layer of the soil or at soil surface), the variety and the year were considered as independent variables. The correlations between traits were estimated using Pearson's' correlation coefficient.

## Results

The incidence of *F. graminearum* pathogenic activity was significantly more pronounced in 2009 than in 2010 (Table V.1). More kernels were damaged and more mycotoxins were found in the grains which consequently provoked lower yields in 2009. However, going more in detail through the various parameters which were measured (disease severity, *Fusarium*-damaged kernels, yield and DON content), the *F. graminearum* pathogenic activity appeared to be linked to the inoculum source and, as expected, to the varietal susceptibility to *Fusarium* head blight (Table V.2). The differences were statistically supported and were strengthened by the effect of the triple interaction between these factors (Table V.3).

### *Disease severity at soft dough*

In 2009, the proportion of orange spikelets varied from 0.47% to 9.01% while in 2010, it varied from 0% to 8.23% (Table V.2). Both years, the wheat from the plots inoculated at soil surface was more diseased than the one from the non-inoculated plots. Both susceptible varieties, Maxwell and Charger, were significantly more infested than the tolerant variety, Apache. Statistical analyses confirmed that the effects of the inoculation at soil surface, the variety as well as the interaction between these two factors were significant (Table V.3). The inoculation in the first layer of soil had no significant effect on the severity of the symptoms. The first year, the rate of disease was significantly higher than the second year (Table V.1). All isolations from orange spikes confirmed the presence of *F. graminearum* (Figure V.2).

In 2010, the disease assessment was also performed through image analysis. This observation gave the same trends as the visual disease assessment and showed in addition an effect of the inoculation in the first layer of the soil while the visual disease assessment did not (Table V.2). The surface of orange spikelets varied from 0.04 mm<sup>2</sup> to 34.48 mm<sup>2</sup>.

Table V.1: Effect of the year on disease development, grain yield and DON accumulation in grains

Source of variation	<i>DS<sub>1</sub></i> (%)			<i>FDK</i> (%)		<i>Yield</i> (qx.ha <sup>-1</sup> )		<i>DON</i> (µg.g <sup>-1</sup> )	
2009	2.8a			13.5a		66.6b		6.7a	
2010	1.7b			3.1b		79.2a		3.1b	
	<i>DS<sub>1</sub></i>			<i>FDK</i>		<i>Yield</i>		<i>DON</i>	
	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>
<i>Year</i>	1	2.50	19.24***	97.22	470.13***	3098.34	260.95***	1.80	78.64***
<i>Year*Inoculation1</i>	1	0.08	0.60	0.37	1.79	12.84	1.08	0.008	0.33
<i>Year*Inoculation2</i>	1	0.26	2.01	0.09	0.42	174.75	14.72***	0.004	0.16
<i>Year*Variety</i>	2	0.79	6.10**	0.55	2.63	51.30	4.32*	0.03	1.16
<i>Year*Inoculation1*Inoculation2</i>	2	0.03	0.21	0.02	0.09	18.63	1.57	0.001	0.06
<i>Year*Inoculation1*Variety</i>	4	0.02	0.17	0.11	0.52	15.28	1.29	0.008	0.34
<i>Year*Inoculation2*Variety</i>	4	0.79	6.09***	0.63	3.04*	85.73	7.22***	0.05	2.18

*df*: degrees of freedom, *MS*: Mean Square, *F*: Fisher's F

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

*DS<sub>1</sub>*: Disease severity assessed by visual observations; *FDK*: *Fusarium*-damaged kernels

*Inoculation1*: inoculation in the first layer of the soil; *Inoculation2*: inoculation at soil surface

Values in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) when they are followed by different letters

Table V.2: Effect of the single parameters inoculations in the first layer of soil, at soil surface and variety on disease development, grain yield and DON accumulation in grains

Factor	Source of variation	2009				2010				
		<i>DS<sub>1</sub></i> (%)	<i>FDK</i> (%)	<i>Yield</i> (qx.ha <sup>-1</sup> )	<i>DON</i> (µg.g <sup>-1</sup> )	<i>DS<sub>1</sub></i> (%)	<i>DS<sub>2</sub></i> (mm <sup>2</sup> )	<i>FDK</i> (%)	<i>Yield</i> (qx.ha <sup>-1</sup> )	<i>DON</i> (µg.g <sup>-1</sup> )
Minimal value		0.47	1.7	54.14	0	0	0.04	0	65.24	0.02
Maximal value		9.01	28.5	81.23	19.41	8.23	34.48	10.68	92.52	14.61
<i>Inoculation in the first layer of soil</i>	+	2.70a	13.2a	66.5a	7.0a	1.89a	9.5a	3.06a	78.8a	3.1a
	-	2.86a	13.8a	66.6a	6.5a	1.46a	7.0b	3.05a	79.6a	3.1a
<i>Surface inoculation</i>	+	3.65a	16.2a	61.5b	8.7b	2.42a	12.1a	4.61a	76.3b	4.1a
	-	1.91b	10.9b	71.7a	4.8a	0.93b	4.4b	1.5b	82.1a	2.1b
<i>Wheat variety</i>	Maxwell	4.02a	19.8a	65.4b	11.3a	2.69a	12.4a	5.36a	76.3b	6.2a
	Charger	2.91a	15.2b	63.7b	6.6b	1.94b	9.6a	3.5b	74.6b	2.6b
	Apache	1.4b	5.5c	70.5a	2.3c	0.39c	2.8b	0.29c	86.6a	0.4c

*DS<sub>1</sub>*: Disease severity assessed by visual observations; *FDK*: *Fusarium*-damaged kernels; *DS<sub>2</sub>*: Disease severity assessed through image analyses

Values related to a given factor in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) when they are followed by different letters.

Table V.3: Analysis of variance for the influence of the different tested modalities on the different studied traits in 2009 and 2010

2009										
Source of variation	df	DS <sub>1</sub>		FDK		Yield		DON		
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	
Block	3	0.30	3.30*	11.44	0.66	65.90	4.40*	0.02	0.79	
Inoculation1	1	0.01	0.11	5.17	0.30	0.18	0.01	0.00	0.02	
Inoculation2	1	6.84	74.74***	336.67	19.56**	1300.2	86.82**	0.75	31.51**	
Variety	2	1.14	12.47***	850.43	49.40**	219.28	14.64**	1.61	67.85**	
Inoculation1*Inoculation2	1	0.002	0.03	1.29	0.08	6.17	0.41	0.001	0.06	
Inoculation1*Variety	2	0.13	1.38	8.10	0.47	2.61	0.17	0.009	0.40	
Inoculation2*Variety	2	0.76	8.27***	13.01	0.76	92.04	6.15**	0.006	0.26	
Inoculation1*Inoculation2*Variety	2	0.19	2.07	1.25	0.07	3.02	0.20	0.01	0.56	

2010											
	df	DS <sub>1</sub>		DS <sub>2</sub>		FDK		Yield		DON	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
Block	3	1.13	9.52***	3.76	4.08*	0.50	2.76	18.88	1.88	0.17	2.50
Inoculation1	1	0.30	2.52	4.99	5.41*	0.12	0.65	6.43	0.64	0.11	1.56
Inoculation2	1	3.74	31.56**	18.74	20.30**	8.30	45.67**	395.44	39.27**	1.39	20.13**
Variety	2	4.96	41.78**	14.14	15.32**	12.40	68.27**	676.95	67.23**	6.41	92.90**
Inoculation1*Inoculation2	1	0.002	0.02	0.00	0.00	0.45	2.50	7.08	0.70	0.001	0.01
Inoculation1*Variety	2	0.002	0.02	0.46	0.50	0.56	3.06	19.98	1.98	0.11	1.63
Inoculation2*Variety	2	0.56	4.69*	2.66	2.89	1.77	9.72***	93.90	9.33***	0.01	0.19
Inoculation1*Inoculation2*Variety	2	0.06	0.47	0.45	0.49	0.21	1.15	15.68	1.56	0.03	0.46

df: degrees of freedom, MS: Mean Square, F: Fisher's F

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

*Inoculation1*: inoculation in the first layer of the soil; *Inoculation 2*: inoculation at soil surface

*DS*<sub>1</sub>: Disease severity assessed by visual observations; *FDK*: *Fusarium*-damaged kernels; *DS*<sub>2</sub>: Disease severity assessed through image analysis





Figure V.2: *F. graminearum* isolated from orange spikelet (Photograph: courtesy of J. Leplat)

Table V.4: Proportion (%) of infected harvested grains and of each species recovered

	<i>Source of variation</i>	<i>Infected grains</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>M. nivale</i>
2009	<i>Charger non-inoculated</i>	76	70	20	5	1	4
	<i>Charger inoculated</i>	91	93	5	(-)	(-)	2
	<i>Apache non-inoculated</i>	40	59	17	7	2	15
	<i>Apache inoculated</i>	70	75	15	3	(-)	7
	<i>Charger control field</i>	58	16	67	3	(-)	14
	<i>Apache control field</i>	23	17	39	17	17	26
2010	<i>Charger non-inoculated</i>	29	83	7	(-)	(-)	10
	<i>Charger inoculated</i>	32	78	6	(-)	(-)	13
	<i>Apache non-inoculated</i>	15	33	13	(-)	(-)	53
	<i>Apache inoculated</i>	38	79	5	(-)	(-)	16
	<i>Charger control field</i>	11	33	13	(-)	(-)	42
	<i>Apache control field</i>	22	5	5	(-)	(-)	90

### *Fusarium*–damaged kernels

In 2009, proportion of damaged kernels varied from 1.7 to 28.51% and in 2010, from 0% to 10.68% (Table V.2). The wheat from the plots inoculated at soil surface was more diseased than the one from non–inoculated plots, which was statistically supported (Table V.3). Maxwell had the significantly highest level of pink kernels and Apache the lowest. In 2010, the interaction between inoculation at soil surface and variety was also significant. The first year, the quantity of damaged kernels was significantly higher than the second year (Table V.1).

### *Grain yields and quality*

In 2010, the yields were significantly higher than the yields in 2009 (Table V.1). Indeed, in 2009, the yields varied from 54.14 to 81.23 qx.ha<sup>-1</sup> while they ranged from 65.24 to 92.52 qx.ha<sup>-1</sup>, in 2010 (Table V.2). The yields in the plots inoculated at soil surface and in the plots enclosing susceptible varieties were lower than the ones in non–inoculated plots and in tolerant variety plots, respectively. In the control fields there was no significant difference of yield between the varieties (data not shown). Both years, the differences were statistically supported and were strengthened by the effect of the interaction between inoculation at soil surface and variety (Table V.3). The effect of the inoculation in the first layer of soil was not significant.

In 2009, grains from inoculated plots were more infested than these from non–inoculated plots, with a higher proportion of grain infection for Charger than for Apache (Table V.4). In 2010, the difference between the plots was less significant. It has to be noticed that Charger grains were less infested than Apache ones in the inoculated plots. Since the FHB occurrence was more important in 2009, fungi isolation was more frequent than in 2010. Several species involved in the complex of fungi inferring *Fusarium* head blight were isolated. In the control plots, the main fungi isolated from the complex were either *F. tricinctum* (in 2009) or *M. nivale* (in 2010), whatever the variety was. Conversely, *F. graminearum* was the dominant species in most of the assay plots except the non-inoculated plots of Apache, in 2010. The ANOVA test performed on the infection rate showed that this parameter was significantly depending on the year, the inoculation at soil surface and the variety (data not shown).

### *Mycotoxins assays*

The only detected mycotoxin was DON. Both years, the DON concentration was the highest for the susceptible variety Maxwell, and the lowest for the tolerant variety, Apache (Table V.2). In 2009, the concentrations of DON varied from 0 to 19.41 µg.g<sup>-1</sup> of dry meal while they varied from 0.02 to 14.61 µg.g<sup>-1</sup> of dry meal, in 2010. The ANOVA test revealed that DON concentration in grains was significantly higher in 2009 (Table V.1). As observed for the other measured parameters, the inoculation at soil surface, the variety and the year have significant impact on DON concentration in the grains (Table V.3).

Table V.5: Correlation coefficients between visual disease assessment, yield and DON accumulation in harvested grains (2009+2010)

	<i>All data<sup>a</sup></i>	<i>Apache</i>	<i>Charger</i>	<i>Maxwell</i>
<i>DS<sub>I</sub> vs. FDK</i>	0.61***	0.68***	0.49**	0.47**
<i>DS<sub>I</sub> vs. Yield</i>	-0.62***	-0.64***	-0.54***	-0.68***
<i>DS<sub>I</sub> vs. DON</i>	0.57***	0.52**	0.54**	0.32
<i>FDK vs. Yield</i>	-0.73***	-0.72***	-0.71***	-0.79***
<i>FDK vs. DON</i>	0.78***	0.64***	0.71***	0.72***
<i>Yield vs. DON</i>	-0.64***	-0.51**	-0.81***	-0.71***

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Table V.6: Comparison of the correlations between the two different notation techniques of disease severity at soft dough wheat stage and the other notations (2010)

	<i>Visual</i>	<i>Image analysis</i>
<i>DS vs. FDK</i>	0.56***	0.59***
<i>DS vs. Yield</i>	-0.66***	-0.64***
<i>DS vs. DON</i>	0.54***	0.70***

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

*DS*: Disease severity assessed by visual observations or through image analyses; *FDK*: *Fusarium*-damaged kernels

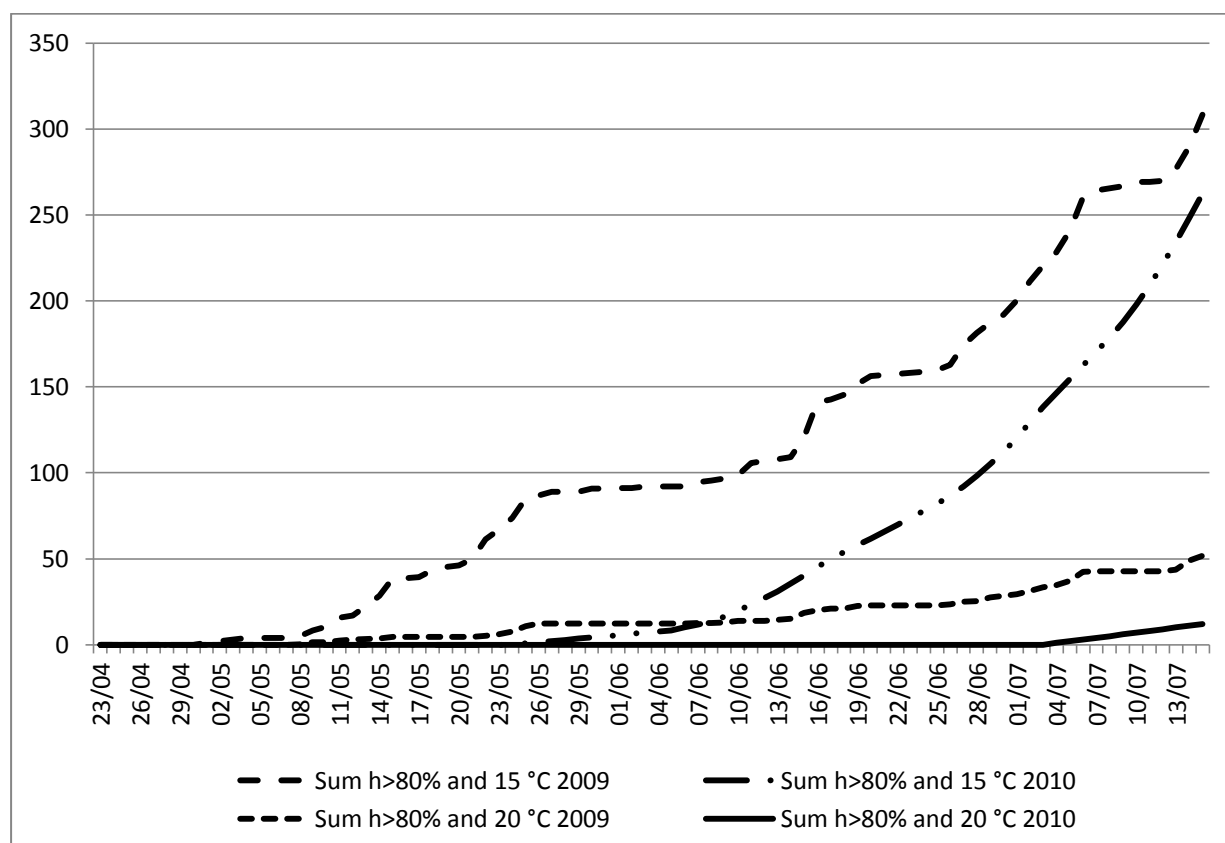


Figure V.3: Sum of hours with humidity up to 80% and temperature up to 15°C and 20°C for 2009 and 2010 from the inoculation at soil surface to the harvest

### *Correlation coefficients between the different assessments*

The correlation coefficients obtained between the different assessments are summarized in tables V.5 and V.6. Roughly, the closer in time the assessments were, the better the correlation between the assessments was (Table V.5). All correlation coefficients about the tolerant variety (Apache) had an absolute value above 0.5, when the correlations between visual disease assessment and other assessments were much lower about susceptible varieties, and in particular in case of Maxwell variety. The comparison between visual disease assessment and disease assessment through image analysis showed that both techniques were similar about FDK and yield evaluations, but the correlation between disease assessment and DON accumulation in grains was much better in case of disease assessment through image analysis (Table V.6).

### *Meteorological data*

The number of hours with high temperature and humidity was higher in 2009 than in 2010, notably during the flowering time of the wheat (Figure V.3). Between April 23<sup>rd</sup> and May 25<sup>th</sup> may 2009, 85 hours with more than 80% of humidity and a temperature of 15°C were recorded, while it did not occur in 2010. From this date, the curve of 2010 started to catch up the curve of 2009 without overlapping it. Afterwards, there was no period with more than 80% of humidity and 20°C temperature until July 3<sup>rd</sup> 2010, while 34 hours were accumulated in 2009.

## **Discussion and conclusions**

Although the occurrence of *Fusarium* head blight was very much higher in 2009 than in 2010 (Table V.1), identical rankings of the tested parameters were observed on both two years, what strengthen the previous establishment (Table V.2). Indeed, the inoculum responsible for wheat ears infection mainly came from residues let at the soil surface. Inoculation at soil surface had a significant effect on the development of the disease and on mycotoxins production while inoculation in the first layer of the soil had not excepted for the disease severity assessed through image analysis in 2010. Whatever this effect of the inoculum in the first layer of soil did not occur in yield and DON accumulation This is consistent with a study by Bateman (2005) depicting that the presence of residues at the soil surface before anthesis was necessary to disease development. It is also assumed that an inversive tillage reduces the disease contrary to a non–inversive tillage (Bateman et al. 2007; Dill-Macky and Jones 2000; Fernandez et al. 2008; Steinkellner and Langer 2004). Moreover, the presence of strongly colonized residues at soil surface promotes the dispersal of the inoculum by splashing (Bateman 2005; Osborne and Stein 2007; Sutton 1982). In comparison to buried residues, non–buried residues provide a longer-lasting availability of nutrient on which *F. graminearum* can saprotrophically grow (Leplat et al. 2012), while a fast decomposition leads to a low amount of inoculum as described in the literature for other pathogens involved in FHB (Bateman et al. 1998; Pereyra et al. 2004). Thus, it can be assumed that *F. graminearum* was subjected to the same phenomenon in the experimental plots.

As expected, the choice of the cultivated wheat variety was important as susceptible varieties, Charger and Maxwell, were most affected by *Fusarium* head blight and their grains contained higher DON amounts than the tolerant variety, Apache (Table V.2). The results on the non-inoculated plots showed no effect of variety on the yields, confirming that the decrease of yields was mainly due to FHB (data not shown). Moreover, differences between susceptible varieties, Maxwell and Charger, were statistically supported (Table V.3). In 2009, both varieties were affected at the same level by the disease at soft dough stage of wheat and had the same yield but the percentage of *Fusarium*-damaged kernels and the DON accumulation was higher for Maxwell (Table 2). In 2010, the rate of disease was lower than in 2009 and the significant difference between Charger and Maxwell appeared from the visual assessment of the disease at soft dough stage of wheat. This could be explained by the different types of resistance among wheat cultivars which make that similar levels of disease on ears can lead to different amounts of *Fusarium*-damaged kernels and mycotoxins accumulation. According to Mesterhazy et al. (1999; 2005), the resistance of type I and II are against initial infection and spread within infected tissues while resistances of type III, IV and V are against mycotoxins accumulation and damages caused to the kernels. These two results about the source of the inoculum responsible for the FHB and the role of the varietal susceptibility are in accordance with the database ("Clé des champs"; <http://www3syngenta.com>) associated with Qualimetre<sup>®</sup>, relying on an eleven years collection of data, which more precisely gives a bigger weight to preceding crop and soil tillage (32%) than to wheat variety (15%).

*Fusarium graminearum* strains are divided into two groups for the production of mycotoxins: DON-chemotype and NIV-chemotype (Kim et al. 2003; Li et al. 2005). The strain MIAE00376 used for the inoculations is a DON-chemotype. Strains of DON-chemotype are supposed to be able to produce DON but also its derivative compounds (3-ADON and 15-ADON) and/or ZEA. However DON was the only mycotoxin detected in this study. The DON limit in wheat grains is set in Europe to 1.25  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of grain. Despite the visible effect of inoculation at soil surface and variety on DON amounts, the quantity assessed were generally above the limit except for the variety Apache in 2010 (0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Table V.2). The highest average was reached for the Maxwell variety in 2009 (11.3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). These high mycotoxins amounts can be partly explained by the inoculation of the plots since DON amount in the control field without any inoculation was much lower (data not shown). However, similar DON amounts have already been observed worldwide in field without inoculation. A review by Placinta et al. (1999) showed that similar or bigger DON levels have been reached on wheat in Germany, Poland, Japan, USA or Argentina. The inoculation by *F. graminearum* at soil surface of wheat could represent conditions encountered during a year of strong infection.

The pedoclimatic context takes part for 48% in DON variability as defined by the database associated to Qualimetre<sup>®</sup>. In this study, even if the significant factors were the same the both years, the disease amounts and DON production were significantly higher in 2009 than in 2010 pointing to the predominant role of weather conditions in the FHB development. *Fusarium graminearum* development is promoted by warm and wet conditions (Brennan et al. 2003; Dufault et al. 2006; Ramirez et al. 2006; Xu et al. 2007; Xu et al. 2008). In 2009, climatic conditions were warmer and wetter than in 2010 since sum of hours from inoculation

to the harvest with a temperature up to 15°C and humidity up to 80% was higher (Figure V.3). Moreover sum of hours from inoculation with a temperature up to 20 °C and humidity up to 80% was zero until July the 4<sup>th</sup> in 2010 while there were already 34 cumulated hours in 2009 at the same date. The weather conditions are especially important during wheat flowering (Isebaert et al. 2009; Koch et al. 2006; Schaafsma and Hooker 2007). In 2009, climatic conditions were particularly favourable in comparison with 2010 during wheat flowering since the sum of hours from the inoculation with a temperature up to 15°C and humidity up to 80% was already at 85 hours on May the 25<sup>th</sup> in 2009 while it was zero at the same date in 2010. Then the curve of 2010 began to catch up with the curve of 2009 but did not join it.

The sanitary status of the grains confirms the influence of the different factors studied, mainly the inoculation at two nodes and the year (Table V.4). The only unexpected result was the high level of grains contamination from plots of Apache inoculated in 2010 compared to grains from plots of Charger inoculated. This result is in disagreement with other notations in the study for which the susceptible variety Charger was more affected by *Fusarium* head blight than the tolerant variety Apache. *Fusarium graminearum* was the dominant species found on harvested grains but was not the only one, which reflects the expression of the indigenous flora. *Fusarium tricinctum* and *Microdochium nivale* were also isolated and in smaller amounts *F. poae* and *F. avenaceum*. These are the predominant species found in Europe for several years (Bottalico and Perrone 2002; Nielsen et al. 2011) and especially in France (Dubournet et al. 2008; Ioos et al. 2004). The sanitary status on grains from the control field showed that, without inoculation, *F. graminearum* was not the dominant species. *Fusarium tricinctum* was the dominant species in 2009 and *M. nivale* was the dominant species in 2010. This is consistent with a survey by Ioos et al. (2004) which showed that *F. graminearum* was not the most frequent species on wheat in eastern France. Difference between years could be attributed to climatic factors (Birzele et al. 2002). The year 2010 was much cooler and drier at flowering than the year 2009 favouring the development of *M. nivale* (Doohan et al. 2002; Dubournet et al. 2008; Xu et al. 2008).

The highest correlation was found between *Fusarium*-damaged kernels and DON accumulation while the lowest was found between disease severity assessed by visual evaluation and DON accumulation (Table V.5). This is consistent with a study by Paul et al. (2005) who used meta-analyses of published and unpublished studies to conclude that percentage of *Fusarium*-damaged kernels is the most correlated parameters with DON accumulation, while the disease severity evaluated on ears was less correlated to the quantity of DON measured in harvested grains. Several reasons could explain this phenomenon. First, the only disease symptom assessed in this study was orange spikelets because it was the only symptom which could be attributed to *F. graminearum* without doubt, but other symptoms appeared in the field which could be caused either by *F. graminearum* or by the other indigenous species such as *M. nivale* and *F. tricinctum*. Because the pathogens responsible for these symptoms were difficult to determine, the latter were not considered for the statistical analyse but they could be linked to the mycotoxins production. However DON production may be certainly attributed to *F. graminearum* since the others isolated species are not DON-producers. *Fusarium poae* produces fusarenone and NIV, *F. tricinctum* and *F. avenaceum* produce moniliformin and *M. nivale* is not a mycotoxin producer (Bottalico 1998; Logrieco et

al. 1991). The second reason is the possible evolution of the infection between the notation of the disease on ears and the mycotoxins measurement at harvest. The coefficient of correlation between disease on ears assessed by visual evaluation and *Fusarium*-damaged kernels was only 0.61. Diseased spikelets quantity was much lower than damaged kernels quantity in inoculated as well as in non-inoculated plots in 2009 (3.65% of diseased spikelets in inoculated plots and 1.91% in non-inoculated plots whereas 16.2% and 10.9% of the kernels were damaged; Table V.2). As explained before, *F. graminearum* growth is enhanced by warm and wet conditions: both in 2009 and 2010 the numbers of hours with an humidity up to 80% and a temperature up to 15°C increased most rapidly between the notation of the disease on ears and the harvest than between the inoculation of the plots at two nodes and the notation of the disease on ears. Evenmore, DON production is stimulated by wet conditions and warm temperatures, being optimal at 30°C (Ramirez et al., 2006). Therefore the evolution of the climatic conditions provoked an increase of the disease during this time. The extreme cases of this phenomenon is illustrated by several studies in which late infections caused by *F. graminearum* provoked accumulation of DON in wheat grains without visible symptoms on ears (Del Ponte et al. 2007; Yoshida and Nakajima 2010). Finally, the resistance types, if any, expressed by the wheat varieties may limit either the fungal development or the DON production (Mesterhazy et al. 1999; 2005), what can affect the correlation values between symptom occurrence and DON accumulation. In this study, the varieties Charger and Maxwell had the same level of disease on ears but kernels of Maxwell were more diseased and DON accumulation was higher than for Charger. The correlation between disease severity on ears and DON accumulation in grains was particularly low (0.32; Table V.5) for the variety Maxwell what suggests a greater evolution between these two notations for this susceptible variety than for the others.

Although the highest correlation was found between the percentage of *Fusarium*-damaged kernels and DON accumulation, this parameter cannot be really helpful in association with software as Qualimetre<sup>®</sup>. This evaluation is performed at the same time as harvest which does not allow anticipating the software results which were available before. Nevertheless, the correlation between *Fusarium*-damaged kernels and DON accumulation could be efficient enough to do without a mycotoxins analysis and particularly in case of susceptible varieties for which the correlation was the highest (Table V.5), but a major drawback of this assessment is that the notation is time consuming.

The disease visual assessment allows anticipating on the Qualimetre<sup>®</sup> results, but the correlation with DON accumulation was low. The disease assessment through image analysis was much more interesting. The correlation between this assessment and DON accumulation was better than the correlation between visual evaluation and DON accumulation (Table V.6), which foresees the possibility to find an indicator of DON accumulation from disease assessment on ears. This is the first report of the use of image analysis to predict FHB on wheat ears. However, since this experiment was performed on a single year, the data were not large enough to test the correlation for each single variety and should be duplicated before it is possible to conclude on the real assessment performance. However, image analysis has already been shown to be more precise than classical visual assessment in the evaluation of other multiple diseases (Skaloudova et al. 2006; Vizhanyo and Felfoldi 2000). In the case of

this study, the good performance of image analysis could be explained by the notion of disease intensity whereas visual assessment reflects only the disease frequency. One of the main advantages is that such technique bias avoids the bias caused by the assessor (Luscier et al. 2006; Rasmussen et al. 2007), and ensures the results repeatability since the analysis settings are the same for all treated images. Moreover the disease assessment through image analysis is time saving in comparison with the visual assessment (21h for image analysis against 68h for four assessors for visual assessment in 2010). The Qualimetre<sup>®</sup> use enforces to sample ears to check the suspicious plots, but the DON assessment might be replaced by the image analysis which is faster and less expensive than HPLC analysis. In addition, disease assessment through image analysis may efficiently replace visual assessment in future scientific studies based on this notation.

In conclusion, the study agrees with the model proposed by Qualimetre<sup>®</sup> software about the importance of soil tillage and varietal choice in the development of Fusarium head blight and DON accumulation in grains. The non-buried residues provided the primary inoculum responsible for the infection on ears. The second element of Qualimetre<sup>®</sup> was also underlined since FHB development and DON accumulation were very different during the two years of the study according to different climatic conditions. It seems difficult to predict the final effect of the disease on yield and mycotoxins accumulation only from disease observation in field since disease severity and mycotoxins accumulation are too poorly correlated. Therefore, the use of tools like Qualimetre<sup>®</sup> remains consistent, but disease assessment through image analysis might be a good complement, which could allow suppressing the systematic measurement of mycotoxins amount in suspected plots. This new techniques could be effective both in terms of time and money saving. However, in the current environmental context leading to reduction of pesticides and soil tillage, the focus should be put on the prevention of damages caused by the pathogens as early as possible and so on the origin of the infection. Therefore, residues management appears to be a central point in the control of the disease. To do so, several strategies should be explored and combined to minimize the infestation of residues and the availability of inoculum for the infection: these strategies include soil tillage and field rotation as underlined by Qualimetre<sup>®</sup>, but also control of the pathogens on residues using organisms with an antagonistic effect.

## **Acknowledgements**

This study is part of a PhD work funded by the Vitagora-FUI programme Farine+ 2007-11. We thank Catherine Maire from C.A. Dijon Céréales for helpful discussions and for allowed us to use pieces of information exposed in this study and Aymé Spor for his assistance in the statistical analysis of the results.



## References

- Bateman GL (2005) The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant Pathol* 54 (3):299-307. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01181.x
- Bateman GL, Gutteridge RJ, Gherbawy Y, Thomsett MA, Nicholson P (2007) Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. *Plant Pathol* 56 (4):604-615. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01577.x
- Bateman GL, Murray G, Gutteridge RJ, Coskun H (1998) Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat. *Ann Appl Biol* 132 (1):35-47. doi:10.1111/j.1744-7348.1998.tb05183.x
- Bily AC, Reid LM, Savard ME, Reddy R, Blackwell BA, Campbell CM, Krantis A, Durst T, Philogéne BJR, Arnason JT, Regnault-Roger C (2004) Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* 157 (1):117-126. doi:10.1023/B:MYCO.0000012218.27359.ec
- Birzele B, Meier A, Hindorf H, Kramer J, Dehne HW (2002) Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur J Plant Pathol* 108 (7):667-673. doi:10.1023/a:1020632816441
- Blandino M, Pilati A, Reyneri A, Scudellari D (2010) Effect of maize crop residue density on *Fusarium* head blight and on deoxynivalenol contamination of common wheat grains. *Cereal Res Commun* 38 (4):550-559. doi:10.1556/crc.38.2010.4.12
- Bottalico A (1998) *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J Plant Pathol* 80 (2):85-103. doi:10.4454/jpp.v80i2.807
- Bottalico A, Perrone G (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108 (7):611-624. doi:10.1023/A:1020635214971
- Brennan JM, Fagan B, van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM (2003) Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *Eur J Plant Pathol* 109 (6):577-587. doi:10.1023/A:1024712415326
- Champeil A, Dore T, Fourbet JF (2004) *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci* 166 (6):1389-1415. doi:10.1016/j.plantsci.2004.02.004
- Del Ponte EM, Fernandes JMC, Bergstrom GC (2007) Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *J Phytopathol* 155 (10):577-581. doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01281.x
- Dill-Macky R, Jones RK (2000) The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis* 84 (1):71-76. doi:10.1094/PDIS.2000.84.1.71

- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. In: Workshop on Agriculturally Important Toxigenic Fungi, Bari, Italy, Sep 2002. Kluwer Academic Publ, pp 755-768
- Dubournet P, Gestat T, Mailly T *Fusarium* Head Blight: Main conclusions of the Bayer Cropscience France monitoring. In: 3rd International Symposium on *Fusarium* Head Blight, Szeged, Hungary, Sep 01-05 2008. pp 703-706
- Dufault NS, De Wolf ED, Lipps PE, Madden LV (2006) Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Dis* 90 (5):637-644. doi:10.1094/pd-90-0637
- Fernandez MR, Huber D, Basnyat P, Zentner RP (2008) Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil Tillage Res* 100 (1-2):60-71. doi:10.1016/j.still.2008.04.008
- Ioos R, Belhadj A, Menez M (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158 (3):351-362. doi:10.1007/s11046-004-2228-3
- Isebaert S, De Saeger S, Devreese R, Verhoeven R, Maene P, Heremans B, Haesaert G (2009) Mycotoxin-producing *Fusarium* species occurring in winter wheat in Belgium (Flanders) during 2002-2005. *J Phytopathol* 157 (2):108-116. doi:10.1111/j.1439-0434.2008.01443.x
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO Food Nutr Pap 74
- Kim HS, Lee T, Dawlatana M, Yun SH, Lee YW (2003) Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol- and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycol Res* 107:190-197. doi:10.1017/s0953756203007317
- Koch HJ, Pringas C, Maerlaender B (2006) Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *Eur J Agron* 24 (4):357-366. doi:10.1016/j.eja.2006.01.006
- Leplat J, Friberg H, Abid M, Steinberg C (2012) Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agron Sustain Dev* In press. doi:10.1007/s13593-012-0098-5
- Li HP, Wu AB, Zhao CS, Scholten O, Löffler H, Liao YC (2005) Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett* 243 (2):505-511. doi:10.1016/j.femsle.2005.01.015
- Logrieco A, Vesonder RF, Peterson SW, Bottalico A (1991) Reexamination of the taxonomic disposition of, and deoxynivalenol production by *Fusarium nivale* NRRL 3289. *Mycologia* 83 (3):367-370. doi:IND91038879
- Luscier JD, Thompson WL, Wilson JM, Gorham BE, Dragut LD (2006) Using digital photographs and object-based image analysis to estimate percent ground cover in

- vegetation plots. *Front Ecol Environ* 4 (8):408-413. doi:10.1890/1540-9295(2006)4[408:udpaoi]2.0.co;2
- Magan N, Medina A, Aldred D (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol* 60 (1):150-163. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02412.x
- Maiorano A, Blandino M, Reyneri A, Vanara F (2008) Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot* 27 (2):182-188. doi:10.1016/j.cropro.2007.05.004
- Mesterhazy A, Bartok T, Kaszonyi G, Varga M, Toth B, Varga J (2005) Common resistance to different *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight in wheat. *Eur J Plant Pathol* 112 (3):267-281. doi:10.1007/s10658-005-2853-9
- Mesterhazy A, Bartok T, Mirocha CG, Komoroczy R (1999) Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed* 118 (2):97-110. doi:10.1046/j.1439-0523.1999.118002097.x
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NHH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jorgensen LN (2011) Fusarium head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* 101 (8):960-969. doi:10.1094 / PHYTO-07-10-0188
- Osborne LE, Stein JM Epidemiology of Fusarium head blight on small-grain cereals. In: Workshop on Mycotoxins from the Field to the Table, Omaha, NE, Nov 29-Dec 01 2007. Elsevier Science Bv, pp 103-108. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) Fusarium ear blight (scab) in small-grain cereals - a review. *Plant Pathol* 44 (2):207-238. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x
- Paul PA, Lipps PE, Madden LV (2005) Relationship between visual estimates of Fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: A meta-analysis. *Phytopathology* 95 (10):1225-1236. doi:10.1094/phyto-95-1225
- Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL (2004) Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Dis* 88 (7):724-730. doi:10.1094/PDIS.2004.88.7.724
- Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol* 78 (1-2):21-37. doi:10.1016/s0377-8401(98)00278-8
- Ramirez ML, Chulze S, Magan N (2006) Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Int J Food Microbiol* 106 (3):291-296. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004
- Rasmussen J, Norremark M, Bibby BM (2007) Assessment of leaf cover and crop soil cover in weed harrowing research using digital images. *Weed Res* 47 (4):299-310. doi:10.1111/j.1365-3180.2007.00565.x

- Schaafsma AW, Hooker DC (2007) Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. *Int J Food Microbiol* 119 (1-2):116-125. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.006
- Skaloudova B, Krivan V, Zemek R (2006) Computer-assisted estimation of leaf damage caused by spider mites. *Comput Electron Agric* 53 (2):81-91. doi:10.1016/j.compag.2006.04.002
- Steinkellner S, Langer I (2004) Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant Soil* 267 (1-2):13-22. doi:10.1007/s11104-005-2574-z
- Summerell BA, Burgess LW, Klein TA, Pattison AB (1990) Stubble management and the site of penetration of wheat by *Fusarium graminearum* group-1. *Phytopathology* 80 (9):877-879. doi:10.1094/Phyto-80-877
- Sutton JC (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* 4:195-209. doi:10.1080/07060668209501326
- Talas F, Parzies HK, Miedaner T (2011) Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum* sensu stricto populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. *Eur J Plant Pathol* 131 (1):39-48. doi:10.1007/s10658-011-9785-3
- Vizhanyo T, Felfoldi J (2000) Enhancing colour differences in images of diseased mushrooms. *Comput Electron Agric* 26 (2):187-198. doi:10.1016/s0168-1699(00)00071-5
- Xu XM, Monger W, Ritieni A, Nicholson P (2007) Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathol* 56 (6):943-956. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01650.x
- Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mule G, Homok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, Edwards SG (2008) Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* 98 (1):69-78. doi:10.1094/phyto-98-1-0069
- Yli-Mattila T (2010) Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *J Plant Pathol* 92 (1):7-18. doi:10.4454/jpp.v92i1.10Yoshida M, Nakajima T (2010) Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology* 100 (8):763-773. doi:10.1094/phyto-100-8-0763
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14 (6):415-421. doi:10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x



## **Chapitre 6 Dynamique de population saprotrophe de *F. graminearum***

## Avant propos

Les chapitres précédents ont confirmé l'importance de l'implication de résidus contaminés dans le développement de la fusariose du blé. De plus, ils ont souligné qu'il était difficile de prévoir le développement de la maladie à l'avance. Par conséquent, la gestion des résidus de culture est un point important pour le contrôle de la maladie. Trouver des moyens de réduire la survie et la production de l'inoculum primaire dans son milieu naturel pourrait contribuer à diminuer le risque de développement de la maladie.

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre le développement saprotrophe de *F. graminearum* dans le sol et sur les résidus de culture en fonction de différents facteurs : le facteur biotique, le facteur trophique et la nature des résidus de culture.

La démarche choisie pour cette étude a été un test en conditions contrôlées. Des microcosmes ont été inoculés par la souche de *F. graminearum* MIAE00376 et la dynamique de population du champignon a été suivie par qPCR. Au préalable, une étude comparative a été menée entre un dénombrement classique de *F. graminearum* sur boîte de Petri et le dénombrement par qPCR afin de vérifier que les deux techniques soient comparables qualitativement. Le facteur biotique a été testé en utilisant du sol désinfecté et du sol naturel ; le facteur trophique a été testé en travaillant en présence ou en absence de résidus ; et la nature des résidus de culture a été testée en travaillant avec des résidus provenant de cinq plantes différentes.

**Population dynamics of *Fusarium graminearum* MIAE00376 in various crop residues using real-time PCR measurements** (submitted in *Journal of Applied Microbiology*)

J. Leplat<sup>a</sup>, C. Heraud<sup>a</sup>, E. Gautheron<sup>a</sup>, E. Remesal<sup>b</sup>, P. Mangin<sup>c</sup>, L. Falchetto<sup>c</sup>, C. Steinberg<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Institute for Sustainable Agriculture, 14080 Cordoba, Spain

<sup>c</sup> Experimental Unit of Epoisses, INRA Dijon, F-21120 Bretenières, France.

\* Corresponding author: C. Steinberg, INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 69 30 50; fax: +33 3 80 69 32 24; e-mail: christian.steinberg@dijon.inra.fr

Abbreviated running headline: *F. graminearum* survival in residues

## Abstract

During its saprotrophic phase, *Fusarium graminearum* Schwab has to settle in appropriate habitats, where it has to face the indirect and direct effects of competition with the indigenous soil microflora to survive and overwinter. In this study, real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) targeting a specific DNA portion was used to monitor the development of *F. graminearum* in microcosms under controlled conditions. The influence of biotic (disinfected vs. natural soil) and trophic (presence or absence of crop residues) factors on the saprotrophic competence of *F. graminearum* MIAE00376 in the soil were investigated, as well as the influence of residue nature (maize [*Zea mays* L.], wheat [*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*], rape [*Brassica napus* L.], alfalfa [*Medicago sativa* L.] and Indian mustard [*Brassica juncea* L.]). The main factor regulating *F. graminearum* growth was the biotic component, which showed that *F. graminearum* survival was regulated by soil microbial communities. Crop residues provided favourable trophic resources for *F. graminearum*, except for mustard residues which interestingly inhibited it, but its growth was promoted to various extents depending on residue origin. As residues were disinfected, their biochemical and physical properties are likely to account for the differences among the population dynamics of *F. graminearum*.

## Keywords

Saprotrophic development, primary inoculum, soil microbial interactions, survival, plant pathogenic fungus, *Fusarium* head blight.



## Introduction

Fusarium Head Blight (FHB) is a disease that affects crop production worldwide. It mainly infects wheat, but also maize and barley (Parry et al. 1995). The development of the disease affects grain quantity due to important yield losses, and also grain quality due to the mycotoxins produced by the fungi responsible for the infection. These mycotoxins are of major concern for human and animal health, for they are toxigenic and they maintain during storage (JEFCA 2001).

Several *Fusarium* species as well as *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallet are involved in the development of the disease. *Fusarium graminearum*, the anamorph stage of *Gibberella zae* (Schwein.) Petch, is the most important species in many parts of the world (Parry et al. 1995; Bottalico 1998; Ioos et al. 2004; Dubournet et al. 2008). Like other *Fusarium* species within the complex, *F. graminearum* survives saprotrophically on infested crop residues (maize stalks, wheat straw and other host plants; (Sutton 1982). These residues are believed to harbour the primary inoculum responsible for infection on wheat heads (Summerell et al. 1990). Bateman (2005) showed that the presence of infested residues on the ground three to four weeks before anthesis was necessary for the disease to develop on wheat heads.

Both the quantity and the composition of residues affect pathogen survival, but surprisingly, apart from field observations, few studies investigate the way crop residues and their nature can supply a beneficial habitat for *F. graminearum*. On the one hand, increases in inoculum sizes and in disease severity are correlated with increasing quantities of residues (Bateman et al. 1998; Maiorano et al. 2008; Blandino et al. 2010). On the other hand, *F. graminearum* survival appears to be better ensured by wheat kernels than by other parts of the plant (Khonga and Sutton 1988; Pereyra and Dill-Macky 2005). This can be partly explained by the composition of residues, especially by their C:N ratio (Khonga and Sutton 1988). This ratio depends on the plant species, on the plant organ, and for a given plant material it also varies over time depending on residue decomposition stage (Nicolardot et al. 2001). Therefore, the C:N ratio influences growth, and also asexual (macroconidia) and sexual structure production (Pereyra and Dill-Macky 2005).

Agricultural practices and mainly crop residue management could play an important role in the control of primary inoculum (Bailey and Lazarovits 2003; Perez et al. 2008). For instance, using FHB-susceptible plant cultivars before wheat in the rotation scheme could dramatically favour the survival and the establishment of the primary inoculum with deleterious consequences for the wheat crop, while non-susceptible host plants could hinder it (Dill-Macky and Jones 2000; Schaafsma et al. 2005). Variations exist among host plants: the disease is more severe after maize or durum wheat than after soft wheat or barley, because of the quantities of residues produced and of their chemical composition (Champeil et al. 2004). Unfortunately, the effects of other plants used as intermediate crops in crop rotations such as alfalfa, ryegrass or mustard have not been studied precisely enough within the framework of a possible biological control of *F. graminearum*. These plants can have particular chemical composition and can therefore promote or reduce *F. graminearum* survival. For instance,

alfalfa is rich in nitrogen and mustard is rich in glucosinolates (Fahey et al. 2001). Soil tillage is also important for the development of the disease since no tillage or minimum tillage practices increase the disease risk as compared to ploughing which decreases it (Dill-Macky and Jones 2000; Bateman et al. 2007). Residues left at the surface promote the splash dispersal of inoculums (Paul et al. 2004). Moreover, the decomposition of residues is faster and more complete in deep, biologically active soils than on the surface (Pereyra et al. 2004; Nicolardot et al. 2007).

The stage of decomposition of the crop residues determines the nutritive quality of the substrate (Frankland 1998; Bertrand et al. 2009). These modifications could be both a cause and a consequence of the successions of fungal populations colonising the residues during the decomposition process, as previously shown in forest litters (Lindahl and Finlay 2006), as well as in various arable ecosystems (Hattenschwiler et al. 2005; Bastian et al. 2009). The ability of a specific species to keep growing or surviving on the material depends on its ability to use the nutrients available at a particular stage of decomposition and to compete for them with other organisms that are also colonising the material (Naef et al. 2006). *Fusarium graminearum* quantities rapidly decreased as residue decomposition increased (Burgess and Griffin 1968; Pereyra and Dill-Macky 2008).

Therefore, a promising alternative for preventing FHB would be to control the development of *F. graminearum* primary inoculum in its natural habitat. There is a real need to improve knowledge about *F. graminearum* survival in its habitat because it is difficult to comprehend the complex interactions between the factors that affect it. The aim of this study was to better understand the saprotrophic competence of *F. graminearum* in the soil and in crop residues. To that end, its population dynamics was monitored by real-time PCR for several weeks, in disinfected soil and in natural soil, in microcosms, in the absence or in the presence of different crop residues. Beforehand, the population dynamics of *F. graminearum* in natural soil and sterile soil were assessed, using a Pasteurian approach based on plate counts and a molecular approach based on real-time PCR to ensure that the monitoring of *F. graminearum* in complex environments using real-time PCR provided reliable data.

## Materials and methods

### *Fungal strain*

The strain (*Fusarium graminearum* MIAE00376) was provided by the collection 'Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment' (MIAE, INRA Dijon, France, <http://www2.dijon.inra.fr/umrmse/spip.php?rubrique47>).

It was isolated from infested maize residues. It was morphologically characterised using phenotypic traits assessed through macroscopic and microscopic observations and genetically identified using molecular tools by sequencing the ITS and the *tef-1 $\alpha$*  regions (White et al. 1990; Gardes and Bruns 1993; Macia-Vicente et al. 2008).

The strain was kept on PDA (Potato Dextrose Agar) medium at room temperature and also stored by cryopreservation at  $-80^{\circ}\text{C}$  in glycerol.

Fungal inoculum was produced as a mixture of various types of propagules for comparisons between plate counts and real-time PCR, but later only conidia were used to assess the population dynamics of *F. graminearum* by real-time PCR. Propagules were produced on sterile millet (*Panicum miliaceum* L., autoclaved 40 min at 110 °C for three consecutive days) at room temperature in the dark. Millet colonisation was promoted by manual shaking every two days. After ten days, millet was air-dried in sterile conditions and ground to a coarse powder using a coffee grinder. Propagule concentrations in millet powder were measured by classical plate count method according to the technique described below.

Conidia were produced in wheat bran liquid medium (distilled water complemented by 1% wheat bran, autoclaved at 120°C, 20 min) adapted from (Hassan and Bullerman 2009) at 25°C on a rotary shaker (150 rpm). After seven days' growth, the cultures were filtered through sterile cheesecloth (approximately 50-µm mesh size) to remove the mycelial mat and the remaining pieces of bran and conidial concentration was assessed through Malassez counting chamber. The concentration was then adjusted by dilution in sterile distilled water according to the experimental requirements.

To assess the radial growth of *F. graminearum* MIAE00376 on the crop residues (see below), water agar (2%) and a water-residue agar medium (1 l of water agar containing 25 g of dry  $\gamma$ -irradiated crop residues [5K Gy; Ionisos, Dagneux, France] previously sifted through 200-µm mesh sieves and autoclaved 20 min at 120°C) were prepared. Ten µl of a titrated suspension of *F. graminearum* spores ( $10^3$  conidia.ml<sup>-1</sup>) were placed in the centre of each Petri dish. Five replicates were performed for each residue type as well as for the water-agar, residue-free control. Fungal radial growth was measured daily on two orthogonal diameters of the fungal colony for each Petri dish for six days.

### Soil

The soil was sampled at the INRA Experimental Unit of Epoisses (Côte d'Or, France [5°05'E; 47°14'N]), It had a silty-clayey texture (sand 6.1%, silt 57.7%, clay 36.2%), a pH value of 7.1, 2.5% organic matter, a C:N ratio of 9.7 and a Cation Exchange Capacity of 20.1 cmol(+).kg<sup>-1</sup> soil. The soil (4% moisture content) was sifted through 2-mm mesh sieves and was distributed into small aluminium boxes, 40 g dry weight per box. When needed, the so-called microcosms were autoclaved 1 hr at 105 °C for three consecutive days and left one week before use to allow escape of any remaining toxic gas.

### Crop residues

Crop residues of wheat, maize, rape, alfalfa and Indian mustard were also sampled at the INRA Experimental Unit of Epoisses after harvest (July 2009 for wheat and rape, and November 2009 for maize) or during plant growth (October 2010 for alfalfa and mustard). They were air-dried, coarsely chopped and grinded using a coffee grinder. They were then  $\gamma$ -irradiated (5K Gy) to sterilise them and maintain their physical and chemical properties.

### *Setting up microcosms*

For each treatment, *i.e.* soil treatment or soil–crop residue treatment, a set of three microcosms were prepared for destructive sampling date. In order to compare plate–count dilution method and real–time PCR assessment, each soil microcosm was supplied under sterile conditions with millet powder to obtain 100 propagules.g<sup>-1</sup> of soil. To study population dynamics, apart from the control treatments composed of residue–free soil, each soil microcosm was supplemented with 1 g of  $\gamma$ –irradiated residue. The mixture was prepared by manual shaking for 30 sec. The soil and the soil–crop residue mixture moisture content of each microcosm was adjusted under sterile conditions to 80 % of Water Holding Capacity of the soil with a titrated suspension of *F. graminearum* conidia containing 10<sup>3</sup> conidia.g<sup>-1</sup> of soil. Microcosms were covered to ensure sterile conditions and placed at 20°C for either four weeks, six weeks or three months depending on the treatments.

### *Assessment of the relation between classical plate counts of soil *F. graminearum* MIAE00376 propagules and molecular quantification of soil *F. graminearum* MIAE00376 DNA copies*

The treatments were: (i) residue–free disinfected soil; (ii) residue–free natural soil. Three independent replicates (*i.e.* destructive microcosms) were performed per treatment and per sampling date.

Incubation time of the experiment lasted four weeks. At each destructive sampling date three microcosms of each treatment were randomly taken from the whole set of the corresponding treatment. For each of them, five sub–samples of 5 g of fresh soil were used for plate counts and five sub–samples of 1 g of soil were stored at –20°C for DNA extraction. The remaining soil was used to measure the soil moisture content of each used microcosm.

*Assessment of the role of biotic and trophic factors on the population dynamics of *F. graminearum* MIAE00376* The treatments were: (i) residue–free disinfected soil; (ii) residue–free natural soil; (iii) disinfected soil with wheat straw; and (iv) natural soil with wheat straw. Incubation time of the experiment lasted ten weeks. Sampling and sub–sampling were performed as above, except that no sub–sampling for plate counts was performed.

### *Assessment of the influence of crop residue origin on the population dynamics of *F. graminearum* MIAE00376*

The treatments were: (i) residue–free soil (replicate of the treatment (ii) of the preceding assessment); (ii) soil with wheat straw (replicate of the treatment (iv) of the preceding assessment); (iii) soil with maize residues (leaves mainly); (iv) soil with rape straw; (v) soil with alfalfa; and (vi) soil with Indian mustard. Incubation time of the experiment lasted ten weeks with residue–free soil and with soils containing wheat, maize and rape residues, and six weeks with soils containing alfalfa and mustard. Sampling and sub–sampling were performed as above.

### Plate count method

The same classical plate count method as the one used for the quantification of *F. graminearum* in millet was used to quantify viable propagules of *F. graminearum* inoculated on disinfected and natural soil. Briefly, 1 g of soil from one out of the five sub-samples of each replicate at each sampling date was added to 45 ml of sterile water. The suspension was vigorously shaken for 20 min (700 oscillations.min<sup>-1</sup>, 12-mm amplitude) and 1:10 serially diluted. For each dilution level, five 1-ml aliquots of the suspension were plated on Petri dishes and embedded in 15 ml of molten Komada medium (Komada 1975). *Fusarium graminearum* colonies were counted after 13 days' incubation at room temperature.

### DNA extraction

DNA was extracted from one out of the five sub-samples of each replicate at each sampling date. One g of soil was added to 2 g of 106- $\mu$ m-diameter acid-washed glass beads, eight 2-mm-diameter sterile glass beads and 4 ml of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl and 1% (w/v) sodium dodecyl sulphate. Samples were shaken for 30 sec at 4 m.s<sup>-1</sup> in a FastPrep<sup>®</sup>-24 Instrument (MP Biomedicals, LLC, USA) to physically disrupt the matrix. Then DNA was extracted as described previously by Edel-Hermann et al. (2004). Briefly, after chemical DNA extraction at 70°C, samples were purified twice using polyvinylpolypyrrolidone spin columns to remove co-extracted humic acids, and then once using GeneClean<sup>®</sup> Turbo kit (Q-BIOgene, Inc., USA). DNA samples were stored at 4°C until use.

### Real-time PCR

#### Primers

Primers Fg16NF (ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA) and Fg16NR (TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA) amplifying specially *F. graminearum* were used to obtain a 280-bp product (Nicholson et al. 1998). Primers were purchased lyophilised with UltraPureGold<sup>™</sup> quality (Eurogentec S.A., Belgium). Primers were dissolved to a 10- $\mu$ M concentration in DNase/RNase free water.

#### Standard curve production

The specific fragment amplified by Fg16NF/Fg16NR was cloned through Kit pGEM<sup>®</sup>-T easy vector systems II (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. Then the plasmid was purified with QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Germany) and linearised using *Sal I* restriction enzyme (Promega, USA). The concentration of linearised plasmid solution was adjusted to 10<sup>9</sup> copies. $\mu$ l<sup>-1</sup> of the specific fragment. Dilutions were performed to obtain solutions whose concentrations ranged from 10<sup>9</sup> down to 10<sup>2</sup> DNA copies. $\mu$ l<sup>-1</sup>.

#### PCR reaction conditions and cycling parameters

PCR reactions were performed in an ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems<sup>™</sup>, USA) in a final volume of 25  $\mu$ l. Each sample contained 12.5  $\mu$ l of

Absolute QPCR SYBR Green ROX MIX (2X) (Thermo Fisher scientific Inc., USA), 1.75 µl of each primer and 1 µl of either water (control) or DNA sample. Two series of the standard ( $10^2$  to  $10^9$  copies) were assessed during each experiment.

All PCR reactions were run using the following protocol: initial denaturation and polymerase activation at 95°C for 15 min, 45 cycles of 95°C for 15 s, 64°C for 30 s, 72°C for 30 s. During the process, fluorescence detection was carried out during the annealing step. A melting curve analysis followed the cycling protocol: the samples were heated at 95°C for 1 min, cooled to 55°C for 1 min and then temperature was increased from 70 to 90°C at the rate of  $1.75^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , with continuous measurement of the fluorescence to check the amplified fragment purity. Three technical replicates were performed for each biological sample.

The detection limit of the PCR reaction is defined as the minimal number of DNA copies needed to distinguish it from the background noise measured in the negative control sample. That limit varies with each PCR reaction. It was set to ten times the quantity of copies detected in the negative sample.

The presence of PCR inhibitors was checked by spiking  $10^4$  copies of *F. graminearum* specific fragment in different samples of each modality. Spiked and non-spiked samples were compared to check for inhibitory effect.

#### *Chemical analysis of the residues*

The C:N ratios of the residues were determined by SAS laboratory (Ardon, France). Analyzes were performed in duplicate for each type of residue.

#### *Statistical analyses*

The correlations between plate counts and real time PCR counts in disinfected soil and natural soil were estimated using Spearman's correlation coefficient.

The factors accounting for the variation of radial growth of *F. graminearum* on media containing different crop residues were analyzed with analysis of variance model:

$$\text{Fungal radial growth}_{ij} = \mu + \text{Residue nature}_i + \text{Growth duration}_j + \text{Residue nature} * \text{Growth duration}_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where *Residue nature* is the effect of the type of residue ( $i = 1, \dots, 5$ ), *Growth duration* is the effect of the incubation duration ( $j = 1, \dots, 5$ ), *Residue nature\*Growth duration* is the interaction effect and  $\varepsilon$  is the residual error.

The factors accounting for the assessment of the role of biotic and trophic factors on the population dynamics of *F. graminearum* variation were analyzed with analysis of variance model:

$$\begin{aligned} \text{Number of fungal DNA copies}_{ijk} = & \mu + \text{Soil disinfection}_i + \text{Presence of straw residues}_j + \\ & \text{Sampling date}_k + \text{Soil disinfection} * \text{Presence of straw residues}_{ij} + \text{Soil disinfection} * \text{Sampling date}_{ik} + \\ & \text{Presence of straw residues} * \text{Sampling date}_{jk} + \text{Soil disinfection} * \text{Presence of straw residues} * \text{Sampling date}_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \end{aligned} \quad (2)$$

where *Soil disinfection* is the effect the biotic factor ( $i = 1, 2$ ), *Presence of straw residues* is the effect of the trophic factor ( $j = 1, 2$ ), *Sampling date* is the effect of the incubation duration ( $k = 1, \dots, 9$ ), *Soil disinfection\*Presence of straw residues*, *Soil disinfection\*Sampling date*, *Presence of straw residues\*Sampling date* are the interactions effects and  $\varepsilon$  is the residual error.

The factors accounting for the assessment of the influence of crop residue origin on the population dynamics of *F. graminearum* variation were analyzed with analysis of variance model:

$$\begin{aligned} \text{Number of fungal DNA copies}_{ij} = & \mu + \text{Residue nature}_i + \text{Sampling date}_j + \text{Residue nature} * \text{Sampling date}_{ij} + \varepsilon_{ijk} \end{aligned} \quad (3)$$

where *Residue nature* is the effect of the type of residue ( $i = 1, \dots, 6$ ), *Sampling date* is the effect of the incubation duration ( $j = 1, \dots, 7$ ), *Residue nature\*Sampling date* is the interaction effect and  $\varepsilon$  is the residual error.

For each trait, the normality and homogeneity of the residual distribution were studied. For all traits, a logarithmic transformation proved to be necessary to have normally and homogeneously distributed residues. The 0 times were not included in the realization of the models (2) and (3).

Significance of differences between means was assessed using Newman–Keuls method. The ANOVA and Newman–Keuls test with  $\alpha = 5\%$  were carried out using XLSTAT (Addinsoft™, France). Copy numbers were analysed using soil disinfection, residue nature and sampling date as independent variables. Radial growth was analysed using residue nature and growth duration as independent variables.

## Results

### *Radial growth of F. graminearum MIAE00376 on water agar complemented with residues in Petri dishes*

The radial growth of *F. graminearum* varied according to the crop residues, and so did radial extension speed (Table VI.1). Three types of residues, *i.e.* wheat, maize and rape, allowed a statistically greater growth than the control (Figure VI.1), but no statistical difference was noticed among them. The measurements were stopped after six days because the fungus reached the edges of Petri dishes for several treatments. No growth was observed on medium complemented with mustard residues after six days, which introduced a significant interaction between *Residue nature* and *Growth duration*. However, the fungus began to slowly grow on medium supplied with mustard during the second week, indicating that fungal growth was strongly slowed down during the first week. Alfalfa had not been included in this experiment.

Table VI.1: Analysis of variance for the radial growth of *F. graminearum* on media amended with different residues.

Source of variation	Fungal radial growth		
	df	MS	F
<i>Residue nature</i>	4	1.46	7171.64***
<i>Growth duration</i>	4	0.76	3707.94***
<i>Residue nature*Growth duration</i>	16	0.05	240.50***

df: degrees of freedom, MS: Mean Square, F: Fisher's F

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

### *Assessment of the relation between classical F. graminearum MIAE00376 propagules plate counts and molecular quantification of F. graminearum MIAE00376 DNA copies in a given soil.*

The number of DNA copies provided by real-time PCR was 10- to 100-fold higher than the number of propagules assessed by the plate count method (Figure VI.2). Simultaneous quantitative variations were observed on propagules and on DNA copy numbers, indicating that the two monitoring methods revealed a unique behaviour of the population dynamics. However, the number of propagules was about 10 fold higher in disinfected soil than in natural soil what shown an effect of soil disinfection on the determination of the number of *F. graminearum* propagules by plate counts. The correlation coefficients between the two monitoring techniques were positive and significant in natural soil (Spearman's coefficient of correlation  $\rho$  of 0.72; p = 0.023) and in disinfected soil (Spearman's coefficient of correlation  $\rho$  of 0.73; p = 0.02).



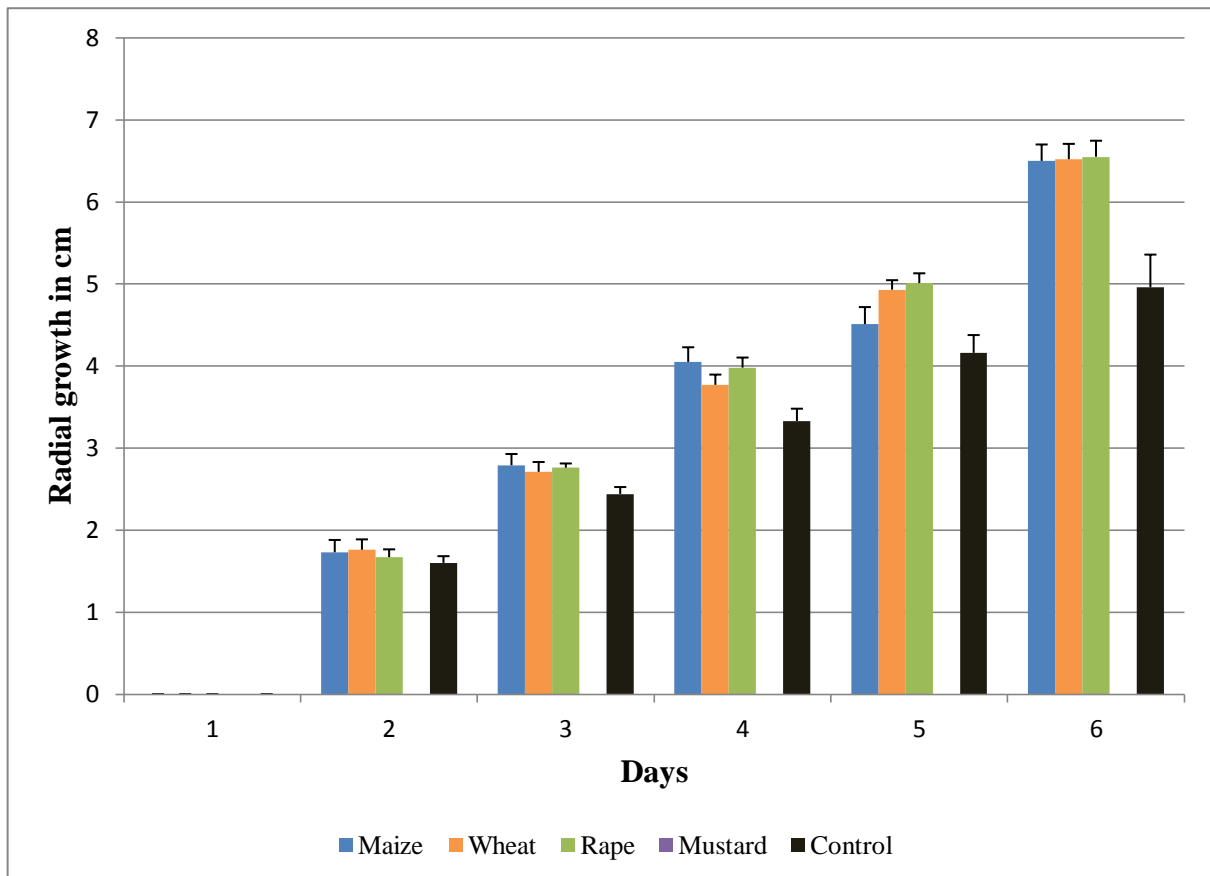


Figure VI.1: Radial growth of *F. graminearum* on media amended with different residues.

The control was provided by the radial growth of *F. graminearum* on water agar medium without any type of residue. Each point was obtained by the average of five values corresponding to five biological repetitions. For each biological repetition, the value was obtained by the average of two measurements of the fungal colony diameter on two orthogonal axes. Error bars represent standard errors.

Statistical groups based on Newman–Keuls test with  $\alpha=0.05$  for the *Residue nature*: maize, wheat and rape: a; control: b, mustard: c.

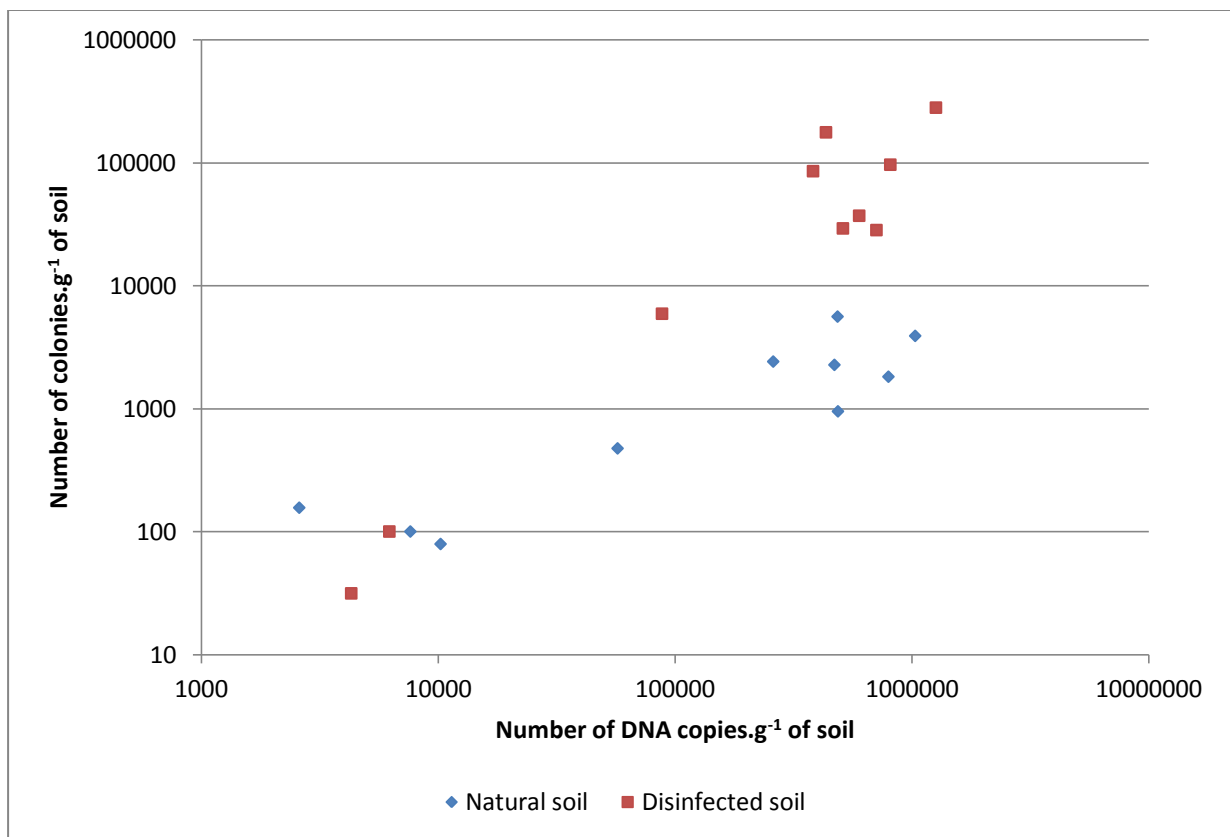


Figure VI.2: Assessment of the relation between classical plate counts of *F. graminearum* and molecular quantification of *F. graminearum* DNA copies in disinfected soil and in natural soil.

Each value for classical plate count was obtained by the average of three values corresponding to three biological repetitions. For each biological repetition, the value was obtained by the average of five counts on five different Petri dishes.

Each value for molecular quantification was obtained by the average three values corresponding to three biological repetitions. For each biological repetition, the value was obtained by the average of three successive measurements by real-time PCR.

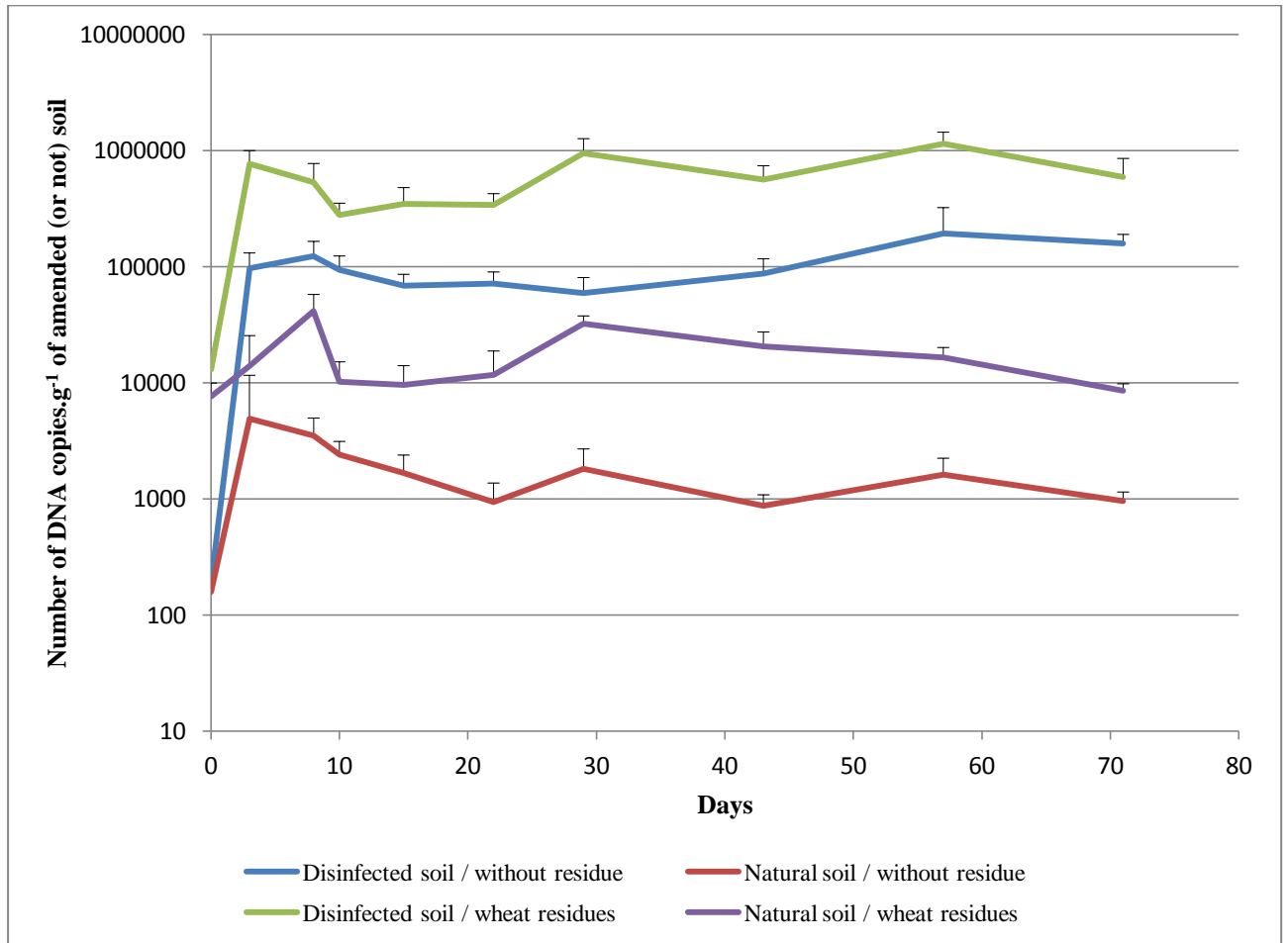


Figure VI.3: Role of biotic and trophic factors on the population dynamics of *F. graminearum*.

Each point was obtained by the average of three values corresponding to three biological repetitions. For each biological repetition, the value was obtained by the average of three successive measurements by real-time PCR. Errors bars represent standard errors.

Statistical groups based on Newman-Keuls test with  $\alpha=0.05$  for the *Soil disinfection\*Presence of residues* interaction: disinfected soil / wheat residues: a; disinfected soil / without residue: b; natural soil / wheat residue: c; ,natural soil / without residue: d.

*Role of biotic and trophic factors on the population dynamics of F. graminearum MIAE00376*

Although the curves displayed quite similar shapes in response to the different treatments, four clear and significantly distinct population dynamics were observed (Figure VI.3). *Fusarium graminearum* developed faster and established at a higher density in the disinfected soil than in the natural soil. As a whole, the curves showed that the indigenous microflora could slow down the development of *F. graminearum*. In disinfected as well as in natural soil, development and final densities increased when sterile wheat straw was added to the soil. The three studied factors, *i.e.* the presence of biotic components the presence of residues and the sampling date, as well as the interaction between them, were statistically significant (Table VI.2). However, from three days post incubation, the top-to-bottom ranking of the carrying capacities provided by the different modalities seemed to be finally established, which allowed concentrating on the main effect of the interaction between soil disinfection and the presence of straw residues. The highest carrying capacity for *F. graminearum* was provided by the interaction of disinfected soil supplied with wheat straw, while the lowest was provided by the natural soil residue-free. Between these two values, the disinfected, residue-free soil provided a higher carrying capacity for *F. graminearum* than the natural soil supplied with straw, which highlights the role of natural soil biotic components in the regulation of *F. graminearum* development, and also the important reservoir of resources released by the autoclaving process when wheat straw supply is concerned.

Table VI.2: Analysis of variance for the role of biotic and trophic factors on the population dynamics of *F. graminearum*.

Source of variation	Number of fungal DNA copies		
	df	MS	F
Soil disinfection	1	87.91	1735.02***
Presence of straw residues	1	21.41	422.51***
Sampling date	9	0.26	5.09***
Soil disinfection*Presence of straw residues	1	0.37	7.37**
Soil disinfection*Sampling date	9	0.16	3.18**
Presence of straw residues*Sampling date	9	0.06	2.48*
Soil disinfection*Presence of straw residues*Sampling date	9	0,06	1.26

df: degrees of freedom, MS: Mean Square, F: Fisher's F

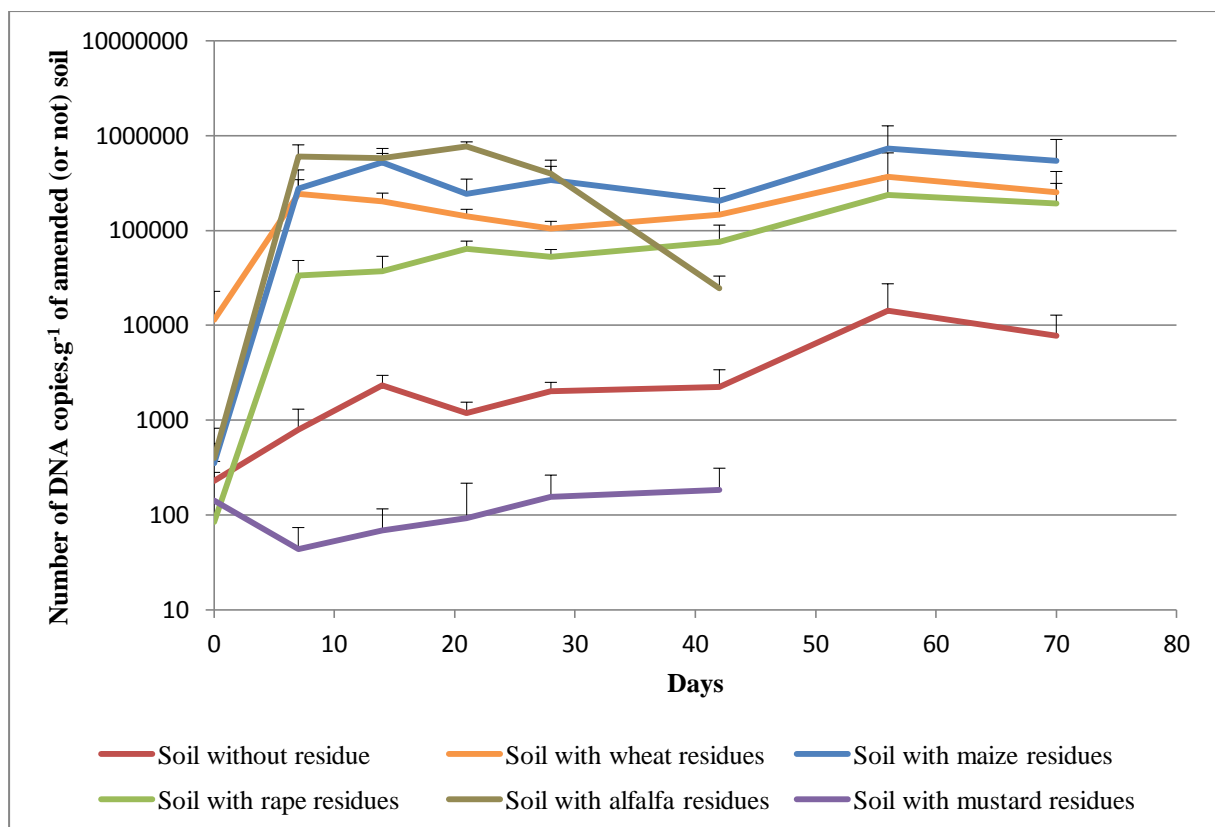
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Table VI.3: Analysis of variance for the influence of crop residue origin on the population dynamics of *F. graminearum*.

Source of variation	Number of fungal DNA copies after six weeks			Number of fungal DNA copies after ten weeks		
	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>
<i>Residue nature</i>	5	30.83	430.71***	5	34.60	529.60***
<i>Sampling date</i>	4	0.10	1.35	6	0.80	12.19***
<i>Residue nature*Sampling date</i>	20	0.32	4.42***	26	0.28	4.26***

*df*: degrees of freedom, *MS*: Mean Square, *F*: Fisher's F

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Figure VI.4: Influence of crop residue origin on the population dynamics of *F. graminearum*

Each point was obtained by the average of three values corresponding to three biological repetitions. For each biological repetition, the value was obtained by the average of three successive measurements by real-time PCR. Errors bars represent standard errors.

Statistical groups based on Newman-Keuls test with  $\alpha=0.05$  for global fungal growth as a function of *Residue nature* after six weeks: maize: a; alfalfa: ab; wheat: b; rape: c; no amendment: d and mustard: e; after ten weeks: maize: a; wheat: b; rape: c; no amendment: d.

*Role of crop residue origin on the population dynamics of F. graminearum MIAE00376*

Curve shapes for that experiment were the same as for the test on biotic and trophic factors. The supply of different types of crop residues in natural soils led to the establishment of *F. graminearum* at significant various densities of DNA copies in the amended soils (Table VI.3; Figure VI.4). The sampling date had a significant effect only ten weeks post incubation, while the interaction between residue nature and sampling date had a significant effect from six weeks post incubation. Apart from the case of alfalfa crop residues, the top-to-bottom ranking of the carrying capacities provided by the various amended and non-amended soil treatments seemed to be finally established seven days post incubation. In case of alfalfa crop residues, a particular attention needs to be paid on the interaction between the nature of the residue and the sampling date. In most cases, the carrying capacities resulting from crop residue amendments were higher than the one provided by the non-amended soil. In the case of mustard crop residues, the carrying capacity for DNA copies of the amended soil was lower than that of the non-amended soil. This ranking was: soil with maize residues, soil with wheat residues, soil with rape residues, non-amended soil and soil with mustard residues. Mustard residues did not promote the development of *F. graminearum*, moreover mustard seemed to reduce *F. graminearum* survival, as the respective carrying capacities of the mustard residue soil and of the non-amended soil for *F. graminearum* DNA copies were significantly different six weeks post incubation. The amount of fungal DNA copies in case of soil amended with mustard residues was below the detection threshold, which strengthens the case for *F. graminearum* disappearing in the presence of them. Anyway, the mustard residue-amended soil and the non-amended soil provided significantly lower DNA copies than the maize residue-amended soil, the wheat residue-amended soil and the rape residue-amended soil respectively, and these three amended soil treatments also significantly differed from one another.

The soil amended with alfalfa residues had a different effect towards *F. graminearum* population dynamics. *Fusarium graminearum* first developed quite fast in the amended soil and the resulting carrying capacity for fungal DNA copies was greater than those provided by the other treatments up to three weeks' time. Thereafter, six weeks post incubation, the quantity of *F. graminearum* DNA copies dramatically dropped to a lower value which was in-between non-amended soil and rape residue-amended soil carrying capacities. Everything appeared as if the substrate had been exhausted. Unfortunately, the experiment was planned to last for 42 days because a plateau was expected, as in the other soil treatments.

*C:N ratios of the residues*

The C:N ratios of the residues varied from 14 for alfalfa to 116 for rape including 22, 33 and 76 for mustard, maize and wheat respectively (table VI.4).

Table VI.4: C:N ratios of the residues

Type of residue	C:N	
Alfalfa	14	± 0,2
Wheat	76	± 3,0
Maize	33	± 2,8
Rape	116	± 2,2
Mustard	22	± 0,1

## Discussion and conclusions

Until recently, the detection and the quantification of plant fungal pathogens were based on Pasteurian techniques that consisted in plating onto selective media. But these methods have major drawbacks: it is hard to find the adapted medium to trigger fungal growth, the process is time-consuming and requires intensive labour, and skilled taxonomical expertise is needed (McCartney et al. 2003; Lievens et al. 2005). PCR-based molecular techniques can overcome several of these drawbacks since they are usually more sensitive, more specific and much faster than conventional techniques. Thus, real-time PCR methods have been designed to detect and quantify the causal agents of FHB, in particular *F. graminearum* (Nicholson et al. 1998; Horevaj et al. 2011). Such techniques have mostly been used to detect pathogens on plant material such ears and kernels of wheat (Brandfass and Karlovsky 2006; Horevaj et al. 2011), wheat stems and seedlings (Nicholson et al. 1998; Glynn et al. 2007), or wheat residues (Kohl et al. 2007). When *F. graminearum* and other species that cause the disease are searched for in the soil, plate count is still frequently used (Hussein et al. 2003; Steinkellner and Langer 2004). The aim of the preliminary comparison performed between plate count and real-time PCR was to ensure that both techniques yielded the same information; the aim was not to optimise the reliability between them. In that part of the work, inoculum was first provided by millet powder to ensure the presence of about 100 propagules at the beginning of the experiment, and then in the form of conidia to make sure not to provide any other substrate for fungal growth than soil or soil-residue mixtures. Spearman's coefficients of correlation ( $\rho$ ) between methods, 0.72 in natural soil and 0.73 in disinfected soil (Figure VI.2), were sufficient to establish a positive relation between the microbiological and the molecular techniques and consequently allow it possible to use real-time PCR to monitor the population dynamics of *F. graminearum* in various complex environments. Plating method and real-time PCR targeting soilborne microorganisms have already been compared for other genera than *Fusarium*. In the case of *Trichoderma* sp. or *Rhizoctonia* sp., the correlation between the two techniques was higher than in this study ( $R^2 = 0.99$  and  $R^2 = 0.94$ , respectively; (Lievens et al. 2006; Cordier et al. 2007), but in other cases the results were the same as *F. graminearum* results presented here (Providenti et al. 2004; Weaver et al. 2005). In both cases, the real-time PCR technique appeared as a useful tool to monitor the population dynamics of soilborne fungi.

Besides, although PCR inhibitors were dependent of soil disinfection, residues nature as well as sampling date, they did not affect the ranking and the significance of differences from one modality to the next. To date, few studies included the notion of *F. graminearum* survival dynamic in soil and crop residues using real-time PCR measurement. They rather focused on a photograph at a given point. This study is one of the first to focus on the behaviour of a particular *F. graminearum* strain based on the variation of biotic and trophic factors (*i.e.* wide range of crop residues). The shapes of the curves were similar for all treatments. First a priming effect was observed. It could correspond to the activation of fungal growth, during which *F. graminearum* grows from inoculated spores (macroconidia) to active mycelium through the use of resources directly available from its environment. A complementary real-time PCR assay on DNA extracted from initial conidial inoculum showed that the quantity



used to inoculate the microcosms was too low to be detected (data not shown). However, DNA quantities in microcosms complemented with wheat straw were not null at the beginning of the different experiments, although the residues had been disinfected, because  $\gamma$ -rays kill organisms without completely destroying DNA. It is assumed that such residual DNA rapidly disappears during the experiments (Romanowski et al. 1992; Dale et al. 2002). Anyway, residual DNA could not be responsible for the ranking of the different modalities, since even subtracting the threshold values from the results did not change this ranking. On the other hand, the 0 times led to significant interactions between the presence of wheat residues and the sampling date in analysis of variance models (2) and (3) which were technical bias. Since the suppression of 0 times in analysis of variance models did not change the main effects due to the residues presence and nature, the 0 times had not been included in the models which were therefore more relevant. After the priming effect, the subsequent pseudo-stagnation could correspond to adaptation to the habitat, during which fungal enzymatic machinery targeting the complex trophic resources was activated. Eventually, the final curves decrease could correspond to the exhaustion of available resources, during which *F. graminearum* evolves from mycelium to new conidia and long-living ascospores (Bateman et al. 2007).

A large part of *F. graminearum* life cycle concerns its saprotrophic phase. During that phase, *F. graminearum* has to settle in an appropriate habitat and it is bound to face the indirect and direct effects of competition with indigenous soil microflora. As tillage practices are now turned toward more reduced tillage and less conventional ploughing, the role of crop residues in the survival of *F. graminearum*, which can use them to overwinter, is of major interest. Unfortunately, there is a knowledge gap about the ecological requirements of its saprotrophic survival, although such knowledge is needed to further control its primary inoculum production. The present study showed that several crop residues could indeed favour its growth and preservation to different extents, and it also showed that some crop residues such as alfalfa residues could have a temporary beneficial effect while others such as mustard residues could have a deleterious impact on its survival.

The biotic factor was the main factor that influenced the population dynamics of *F. graminearum*: PCR-based quantities of fungal DNA in the disinfected soil, whether supplied with wheat residues or not, were one-hundred-fold higher than that in the natural soil (Figure VI.3). We can therefore conclude that *F. graminearum* development was regulated by soilborne communities. Moreover, in this study all tested residues had previously been disinfected, but the initial residue-borne communities would probably have increased that regulatory effect. This result was expected because it is known that *F. graminearum* is not highly persistent in soil, and real-time PCR assays allowed the comprehension of this population dynamics. The development of pathogen populations on residues could be reduced by managing indigenous soil microbial communities in order to increase soil suppressiveness (Weller et al. 2002; Peters et al. 2003). Trying to promote the growth of indigenous or introduced microorganisms able to outcompete plant pathogenic fungi present in crop residues was recently suggested (Singh et al. 2009). Particular species such as *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert and W. Gams or *Microsphaeropsis* sp. were found to suppress the sporulation of *F. graminearum* macroconidia and ascospores as well as

perithecia production on wheat straw and maize stalks under controlled conditions (Bujold et al. 2001; Luongo et al. 2005). However, their efficiency under field conditions remained limited. In the present experiment, microbial communities were probably mainly concerned since no macrofaunal communities such as earthworms or insects were present in the microcosms. However, the role of the macrofauna as well as the role of the microfauna (mites, enchytraeides or protozoa) cannot be left aside. For example, *Lumbricus terrestris* L. were more effective in incorporating *Fusarium*-infested wheat straw into the soil and in favouring its decomposition when high levels of mycotoxins were produced than when low levels of mycotoxins were produced (Oldenburg et al. 2008). So, on the one hand, multitrophic interactions within the soil could regulate and control such soil- and residue-borne pathogenic inoculums; however, on the other hand, exogenous resources such as crop residues appear to promote the development of pathogenic populations such as *F. graminearum*, which overwinters saprotrophically on residues from preceding crops (Sutton 1982; Parry et al. 1995). In disinfected as well as in natural soil, the presence of wheat residues provided a favourable habitat for fungal development (Figure 3). The residues could constitute either trophic resources by providing carbohydrates, or structural resources by altering soil environments. *Fusarium graminearum* produces a wide range of enzymes in the presence of plant material, and several of them degrade cellulose, hemicelluloses and pectin (Phalip et al. 2005). Therefore it contains the enzymatic machinery to degrade compounds of the primary cell wall and therefore to use residues as nutrients, as revealed by its radial growth on media supplied with crop residues (Figure VI.1). Radial growth patterns were not significantly different among the crop residues (wheat, maize and rape straw) used as substrates in water agar. This was probably due to the too short duration of the incubation period on plates; discrimination between the easily and not easily available nutrients provided to *F. graminearum* by each of the residues was not possible, unlike in amended soils. Indeed, maize induced significantly better growth of strain MIAE00376 than wheat, which in turn induced significantly better growth than rape, and all crop residues except Indian mustard provided better sets of resources than bare soil. Maize and wheat are hosts of the disease. As a result, having these crops as preceding cultures increases disease risks (Smiley et al. 1996; Dill-Macky and Jones 2000; Champeil et al. 2004). Surprisingly, rape, which is not a host plant, also favoured fungal growth, but to a lesser extent than cereal residues. Maize residues are usually presented as a good promoter of inoculum production because of the quantity of residues produced, *i.e.* 9.0 tons of residues.ha<sup>-1</sup> versus only 3.5 tons of residues.ha<sup>-1</sup> for wheat (Vilain 1989; Morel 1996). The survival of *F. graminearum*, together with that of other pathogens causing Fusarium head blight, is favoured by increased amounts of residues. A comparison of four different densities of maize residues left on the soil surface showed that *F. graminearum*-caused disease severity and mycotoxin occurrence in wheat grains increased with residue quantities (Maiorano et al. 2008; Blandino et al. 2010). A two- or four-fold increase in the quantity of wheat residues increased the density of *F. culmorum* in the soil (Bateman et al. 1998). However, residue quantity is not enough to explain the development of *F. graminearum*, since in the present study all residues were added to the soil in the same proportion (1 g dry matter.microcosm<sup>-1</sup>). Champeil *et al.* (2004) noticed that wheat and durum wheat produce similar amounts of residues, but the level of infection of wheat after these crops is different. Inoculum production varies with the plant species, it is not the same

on a given plant over time, and it depends on the plant part (Khonga and Sutton 1988; Pereyra and Dill-Macky 2008). This can be partly explained by the composition of residues and particularly by their C:N ratio, which varies over time depending on the decomposition stage of the residues. It influences both growth and production of macroconidia and sexual structures. Rich residues with a low C:N ratio provide a favourable habitat, allowing longer saprotrophic development before perithecia production as compared to poor residues with a high C:N ratio (Khonga and Sutton 1988). In the present study, maize, wheat and rape were ranked depending on their C:N ratio value (Table VI.4). The low C:N ratio of maize (33) best promoted fungal growth, while the high C:N ratio of rape (116) least promoted it. Since mainly maize leaves were used in the experiment, the C:N ratio of maize was particularly low, but the results could have been different if more maize stalks, whose C/N ratio is about 130, had been used (Nicolardot et al. 2001).

Maize, wheat and rape were first chosen for this study because they are major rotational crops in the region (Burgundy, France; (Agreste 2010). Rape was also tested because it is a Brassicaceae, known for its deleterious action on fungi, and more generally on microbial communities through the release of allelopathic molecules in its rhizosphere (Brown and Morra 1997; Morra and Kirkegaard 2002). However, growth in water agar supplied with rape residues showed no clear action of antifungal products since no difference was noticed between rape, maize and wheat. Conversely, when water agar was supplied with mustard, no early growth of *F. graminearum* was observed for the first six days of incubation, although the fungus was still alive and started to grow later. The presence of such deleterious secondary metabolites was therefore evidenced in mustard. *Fusarium graminearum* growth was significantly lower than in the control, which means that the presence of mustard inhibited its growth. As the residues added to the medium were disinfected, inhibition could only originate from mustard. Fungal growth inhibition may have been due to the action of glucosinolates. Sinigrin is the main one found in mustard (Rangkadilok et al. 2002; Bellostas et al. 2007). Some studies showed that among several cereal root pathogens, *F. graminearum* was moderately sensitive to isothiocyanates resulting from the hydrolysis of glucosinolates, and particularly to sinigrin, as compared to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* J. Walker, which was the most sensitive fungus tested, and to *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker and *Pythium irregulare* Buisman, which were the most tolerant ones (Kirkegaard et al. 1996; Sarwar et al. 1998). The type and the amount of glucosinolates produced depend on Brassicaceae species, on variety within a same species, on plant maturity, on the part of the plant considered and on environmental plant growth conditions (Bellostas et al. 2007). This could explain why the population dynamics of *F. graminearum* differ in the soil in the presence of mustard residues that contain high levels of sinigrin as compared to rape residues that contain low levels of glucosinolates.

The experiment in microcosms confirmed the inhibitory effect of mustard: fungal growth in mustard-supplied soil was close to zero and was below the technical limit of real-time PCR reliability, although mustard had a favourable C:N ratio of twenty-two (Figure VI.4). The importance of the C:N ratio was confirmed by the experiment in alfalfa-supplied soil. *Fusarium graminearum* growth in the presence of alfalfa was significantly the highest of the set of experiments. Alfalfa had the significantly lowest C:N ratio (14) of all types of residues

tested. However, the number of DNA copies decreased twenty–one days post inoculation, and reached a lower value than those observed with the other crop residues. Alfalfa, with the lowest C:N ratio, was expected to mineralise faster than mature wheat or rape straw which had a higher C:N ratio (Trinsoutrot et al. 2000; Pascault et al. 2010). Therefore, the rapid exhaustion of the trophic resource could lead to a drastic decrease in *F. graminearum* population density. Further studies should focus on the role of legumes and their subsequent crop debris on *F. graminearum* survival.

In conclusion, due to the saprotrophic phase of *F. graminearum* life cycle, there is a real need to better understand how it survives in the soil and in residues. *Fusarium graminearum* appears to be a poor competitor over time, particularly compared with other *Fusarium* species. Yet, it seems to overcome that difficulty since it can still cause FHB. This study showed that the biotic component of the soil was the main factor regulating *F. graminearum* development, but that it was buffered by the presence of residues. Crop residues supply *F. graminearum* with different resources depending on their type. Consequently, several techniques can be applied and should be combined to control primary inoculum production by that phytopathogenic fungus, *i.e.* residue management through rotations and soil tillage, the stimulation of the antagonistic microflora, and the use of preventive preceding crops, such as mustard to produce antifungal compounds, or the use of legumes to speed up mineralization and destroy *F. graminearum* habitat.

## Acknowledgements

This study is part of a PhD work funded by the Vitagora–FUI programme Farine+ 2007–11. The authors are grateful to Yann Jaworski for fruitful discussions and technical help during his training in our lab and Aymé Spor for his assistance in the statistical analysis of the results. We thank A. Buchwalter, proof–reader, for correcting the English language.

## References

- Agreste (2010) Pratiques culturales 2006. *Agreste Les Dossiers* **8**, 13-52.
- Bailey, K.L. and Lazarovits, G. (2003) Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Tillage Res* **72**, 169-180.
- Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B. and Ranjard, L. (2009) Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biol Biochem* **41**, 262-275.
- Bateman, G.L. (2005) The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant Pathol* **54**, 299-307.
- Bateman, G.L., Gutteridge, R.J., Gherbawy, Y., Thomsett, M.A. and Nicholson, P. (2007) Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. *Plant Pathol* **56**, 604-615.
- Bateman, G.L., Murray, G., Gutteridge, R.J. and Coskun, H. (1998) Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat. *Ann Appl Biol* **132**, 35-47.
- Bellostas, N., Sorensen, J.C. and Sorensen, H. (2007) Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four *Brassica* species of the U-triangle for their biofumigation potential. *J Sci Food Agric* **87**, 1586-1594.
- Bertrand, I., Prevot, M. and Chabbert, B. (2009) Soil decomposition of wheat internodes of different maturity stages: Relative impact of the soluble and structural fractions. *Bioresour Technol* **100**, 155-163.
- Blandino, M., Pilati, A., Reyneri, A. and Scudellari, D. (2010) Effect of maize crop residue density on *Fusarium* head blight and on deoxynivalenol contamination of common wheat grains. *Cereal Res Commun* **38**, 550-559.
- Bottalico, A. (1998) *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J Plant Pathol* **80**, 85-103.
- Brandfass, C. and Karlovsky, P. (2006) Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiol* **6**, 10.
- Brown, P.D. and Morra, M.J. (1997) Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Adv Agron* **61**, 167-231.
- Bujold, I., Paulitz, T.C. and Carisse, O. (2001) Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Dis* **85**, 977-984.
- Burgess, L.W. and Griffin, D.M. (1968) The recovery of *Gibberella zeae* from wheat straws. *Aust J Exp Agric Anim Husb* **8**, 364-370.
- Champeil, A., Dore, T. and Fourbet, J.F. (2004) *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci* **166**, 1389-1415.

- Cordier, C., Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C. and Alabouvette, C. (2007) SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *J Microbiol Methods* **68**, 60-68.
- Dale, P.J., Clarke, B. and Fontes, E.M.G. (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat Biotech* **20**, 567-574.
- Dill-Macky, R. and Jones, R.K. (2000) The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Dis* **84**, 71-76.
- Dubournet, P., Gestat, T. and Mailly, T. (2008) Fusarium Head Blight: Main conclusions of the Bayer Cropscience France monitoring. In *3rd International Symposium on Fusarium Head Blight*. pp.703-706. Szeged, Hungary.
- Edel-Hermann, V., Dreumont, C., Perez-Piqueres, A. and Steinberg, C. (2004) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 397-404.
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T. and Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**, 5-51.
- Frankland, J.C. (1998) Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycol Res* **102**, 1-15.
- Gardes, M. and Bruns, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **2**, 113-118.
- Glynn, N.C., Ray, R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Parry, D.W., Barnett, C.J. and Beck, J.J. (2007) Quantitative *Fusarium* spp. and *Microdochium* spp. PCR assays to evaluate seed treatments for the control of Fusarium seedling blight of wheat. *J Appl Microbiol* **102**, 1645-1653.
- Hassan, Y.I. and Bullerman, L.B. (2009) Wheat bran as an alternative substrate for macroconidia formation by some *Fusarium* species. *J Microbiol Methods* **77**, 134-136.
- Hattenschwiler, S., Tiunov, A.V. and Scheu, S. (2005) Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. In *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. pp.191-218. Palo Alto: Annual Reviews.
- Horevaj, P., Milus, E.A. and Bluhm, B.H. (2011) A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels. *J Appl Microbiol* **111**, 396-406.
- Hussein, H.M., Christensen, M.J. and Baxter, M. (2003) Occurrence and distribution of *Fusarium* species in maize fields in New Zealand. *Mycopathologia* **156**, 25-30.
- Ioos, R., Belhadj, A. and Menez, M. (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* **158**, 351-362.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO Food and Nutrition Paper*, 701 pp.
- Khonga, E.B. and Sutton, J.C. (1988) Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Plant Pathol* **10**, 232-239.

- Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W. and Desmarchelier, J.M. (1996) In vitro suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathol* **45**, 593-603.
- Kohl, J., de Haas, B.H., Kastelein, P., Burgers, S. and Waalwijk, C. (2007) Population dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in crops and crop residues of winter wheat. *Phytopathology* **97**, 971-978.
- Komada, H. (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev Plant Prot Res* **8**, 114-124.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A., Cammue, B.P.A. and Thomma, B. (2006) Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci* **171**, 155-165.
- Lievens, B., Grauwet, T.J.M.A., Cammue, B.P.A. and Thomma, B.P.H.J. (2005) Recent developments in diagnostics of plant pathogens: a review. *Recent Res Dev Microbiol*, **9**, pp.57-79.
- Lindahl, B.D. and Finlay, R.D. (2006) Activities of chitinolytic enzymes during primary and secondary colonization of wood by basidiomycetous fungi. *New Phytol* **169**, 389-397.
- Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meekes, E., De Haas, L., Van der Plas, C.L. and Kohl, J. (2005) Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci Technol* **15**, 229-242.
- Macia-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Abdullah, S.K., Descals, E., Salinas, J. and Lopez-Llorca, L.V. (2008) Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol Ecol* **64**, 90-105.
- Maiorano, A., Blandino, M., Reyneri, A. and Vanara, F. (2008) Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot* **27**, 182-188.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A. and Ward, E. (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag Sci* **59**, 129-142.
- Morel, R. (1996) *Cultivated soils; Les sols cultivés - Technique et documentation* -: second ed., Lavoisier, Paris.
- Morra, M.J. and Kirkegaard, J.A. (2002) Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biol Biochem* **34**, 1683-1690.
- Naef, A., Senatore, M. and Defago, G. (2006) A microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* **55**, 211-220.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. and Joyce, D. (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol Mol Plant Pathol* **53**, 17-37.

- Nicolardot, B., Bouziri, L., Bastian, F. and Ranjard, L. (2007) A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* **39**, 1631-1644.
- Nicolardot, B., Recous, S. and Mary, B. (2001) Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C : N ratio of the residues. *Plant Soil* **228**, 83-103.
- Oldenburg, E., Kramer, S., Schrader, S. and Weinert, J. (2008) Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* on the degradation of *Fusarium*-infected and deoxynivalenol-contaminated wheat straw. *Soil Biol Biochem* **40**, 3049-3053.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. and McLeod, L. (1995) Fusarium ear blight (scab) in small-grain cereals - a review. *Plant Pathol* **44**, 207-238.
- Pascault, N., Cecillon, L., Mathieu, O., Henault, C., Sarr, A., Leveque, J., Farcy, P., Ranjard, L. and Maron, P.A. (2010) *In situ* dynamics of microbial communities during decomposition of wheat, rape, and alfalfa residues. *Microb Ecol* **60**, 816-828.
- Paul, P.A., El-Allaf, S.M., Lipps, P.E. and Madden, L.V. (2004) Rain splash dispersal of *Gibberella zeae* within wheat canopies in Ohio. *Phytopathology* **94**, 1342-1349.
- Pereyra, S.A. and Dill-Macky, R. (2005) Colonization and inoculum production of *Gibberella zeae* in components of wheat residue. *Cereal Res Commun* **33**, 755-762.
- Pereyra, S.A. and Dill-Macky, R. (2008) Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. *Plant Dis* **92**, 800-807.
- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R. and Sims, A.L. (2004) Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Dis* **88**, 724-730.
- Perez, C., Dill-Macky, R. and Kinkel, L.L. (2008) Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. *Plant Soil* **302**, 53-69.
- Peters, R.D., Sturz, A.V., Carter, M.R. and Sanderson, J.B. (2003) Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil Tillage Res* **72**, 181-192.
- Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorsselaer, A. and Jeltsch, J.M. (2005) Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr Genet* **48**, 366-379.
- Providenti, M.A., Mautner, S.I., Chaudhry, O., Bombardier, M., Scroggins, R., Gregorich, E. and Smith, M.L. (2004) Determining the environmental fate of a filamentous fungus, *Trichoderma reesei*, in laboratory-contained intact soil-core microcosms using competitive PCR and viability plating. *Can J Microbiol* **50**, 623-631.
- Rangkadilok, N., Nicolas, M.E., Bennett, R.N., Premier, R.R., Eagling, D.R. and Taylor, P.W.J. (2002) Determination of sinigrin and glucoraphanin in *Brassica* species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. *Sci Hortic* **96**, 27-41.



- Romanowski, G., Lorenz, M.G., Sayler, G. and Wackernagel, W. (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3012-3019.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W. and Desmarchelier, J.M. (1998) Biofumigation potential of brassicas - III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant Soil* **201**, 103-112.
- Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilincic, L. and Hooker, D.C. (2005) Effect of previous crop, tillage, field size, adjacent crop, and sampling direction on airborne propagules of *Gibberella zea*/*Fusarium graminearum*, Fusarium head blight severity, and deoxynivalenol accumulation in winter wheat. *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* **27**, 217-224.
- Singh, D.P., Backhouse, D. and Kristiansen, P. (2009) Interactions of temperature and water potential in displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal residues by fungal antagonists. *Biol Control* **48**, 188-195.
- Smiley, R.W., Collins, H.P. and Rasmussen, P.E. (1996) Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendleton, Oregon. *Plant Dis* **80**, 813-820.
- Steinkellner, S. and Langer, I. (2004) Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant Soil* **267**, 13-22.
- Summerell, B.A., Burgess, L.W., Klein, T.A. and Pattison, A.B. (1990) Stubble management and the site of penetration of wheat by *Fusarium graminearum* group-1. *Phytopathology* **80**, 877-879.
- Sutton, J.C. (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* **4**, 195-209.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Lineres, M., Cheneby, D. and Nicolardot, B. (2000) Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Sci Soc Am J* **64**, 918-926.
- Vilain, M. (1989) *Plant production volume 2. La production vegetale. Volume 2 - La maîtrise technique de la production*: Lavoisier, Paris.
- Weaver, M., Vedenyapina, E. and Kenerley, C.M. (2005) Fitness, persistence, and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms. *Appl Soil Ecol* **29**, 125-134.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M. and Thomashow, L.S. (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 309.
- White, T.J., Bruns, T. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications* ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. pp.315-322: San Diego: Academic Press.



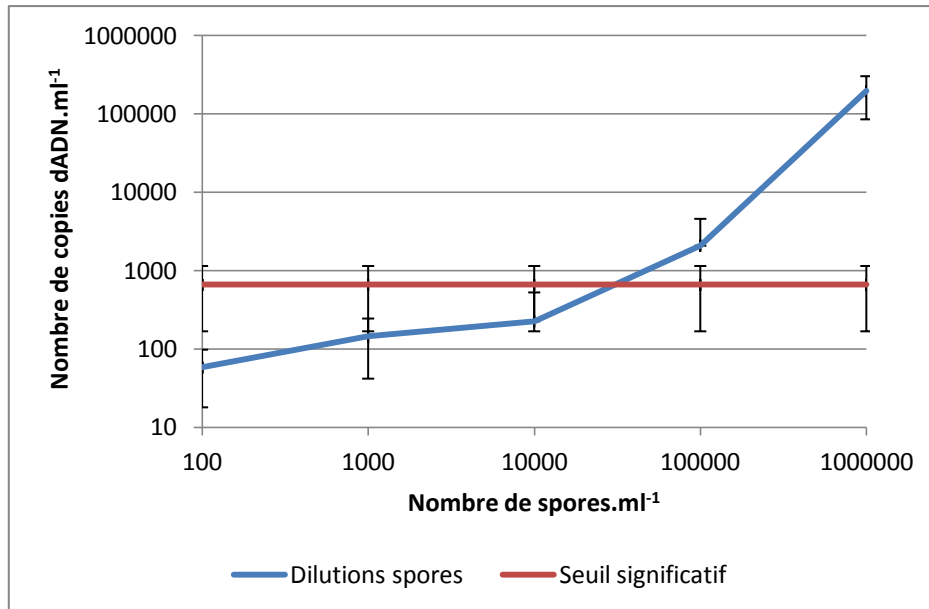


Figure 6.1 : Nombre de copies d'ADN détecté en fonction de la concentration initiale en spores de la suspension extraite

Chaque point a été obtenu en faisant la moyenne de trois valeurs correspondant à trois répétition biologiques. Pour chaque répétition biologique, la valeur a été obtenue en faisant la moyenne de trois mesures successives par PCR quantitative. Les écarts-types représentent l'erreur standard.

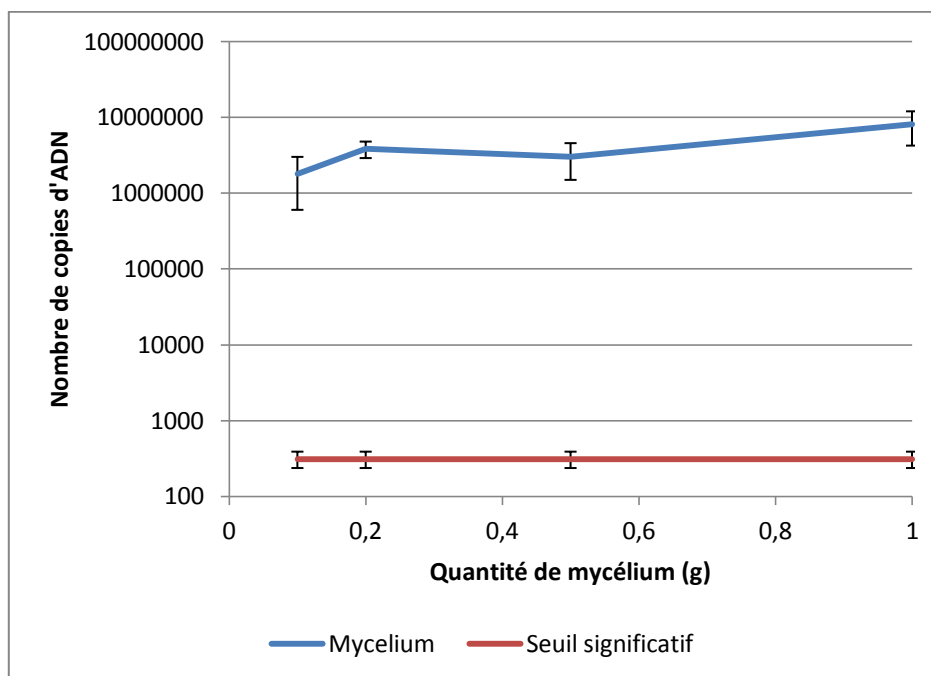


Figure 6.2 : Nombre de copies d'ADN détecté en fonction de la quantité de mycélium extraite

Chaque point a été obtenu en faisant la moyenne de trois valeurs correspondant à trois répétition biologiques. Pour chaque répétition biologique, la valeur a été obtenue en faisant la moyenne de trois mesures successives par PCR quantitative. Les écarts-types représentent l'erreur standard.

## II Quelle généricité donner aux résultats observés dans des microcosmes ?

### II.1 Quantification d'une population fongique par PCR quantitative en milieu complexe

La technique de PCR quantitative (qPCR) s'établit aujourd'hui comme un outil universel pour quantifier l'abondance d'une communauté microbienne ou d'un taxon particulier dans un environnement complexe (Chemidlin Prevost-Boure et al., 2011). Dans le cadre de cette étude sur la survie de *F. graminearum* dans le sol et les résidus de culture, quelques mises au point méthodologiques ont été effectuées qui amènent à discuter la notion de biomasse moléculaire utilisée pour désigner la valeur phénotypique que représente la quantification du nombre de copies d'ADN de bactéries et de champignons par PCR quantitative.

Les nombres de copies d'ADN de *F. graminearum* contenus dans des suspensions de spores à différentes concentrations et dans des aliquots de mycélium, préalablement quantifiés par pesée, ont été comparés en utilisant les protocoles décrits précédemment.

Le nombre de copies d'ADN détecté par PCR quantitative a augmenté avec la concentration en spores (Figure 6.1). Cependant, ce nombre de copies ( $2 \cdot 10^3$  copies d'ADN.ml<sup>-1</sup>) n'a été dissociable du bruit de fond qu'à partir d'une concentration de  $10^5$  spores.ml<sup>-1</sup> de suspension. La quantité maximale de copies détectées a été de  $2 \cdot 10^5$  pour une concentration initiale maximale testée de  $10^6$  spores.ml<sup>-1</sup>.

L'extraction d'ADN à partir de mycélium a permis de détecter un nombre de copies d'ADN supérieur au bruit de fond dès la plus petite quantité initiale de mycélium (Figure 6.2). Le nombre de copies d'ADN détecté a globalement augmenté avec la quantité initiale de mycélium extraite, variant d'environ  $2 \cdot 10^6$  copies d'ADN pour 0,1g de mycélium à environ  $8 \cdot 10^6$  copies pour 1 g de mycélium.

Si dans le cas de communautés ou de populations bactériennes, organismes mononucléaires, l'analogie "équivalent génome-individu" (=copie d'ADN-cellule bactérienne) est difficile (Klappenbach et al., 2000), chez les champignons, une telle conversion l'est encore davantage du fait d'une organisation multinucléaire et multigenomique des cellules changeante selon l'état physiologique (mycélium ou spore) dans lequel se trouve les organismes (Klappenbach et al., 2001 ; Tourova, 2003). En outre, cet état physiologique peut également modifier le rendement d'extraction de l'ADN et donc influencer la fidélité à la réalité de la quantification (Cordier et al., 2006). La connaissance de ces biais à la fois biologiques et méthodologiques permet d'expliquer les variations de densités d'équivalents génomes lors du stress de l'inoculation à la mise en place de l'expérimentation. Par ailleurs, La partie précédente a montré que la PCR quantitative pouvait refléter la variation de biomasse fongique telle que les dénombrements classiques sur boîte de Petri peuvent le faire, avec des limites tout aussi discutables. C'est pourquoi, bien qu'il soit difficile de parler de variation de la biomasse fongique, les écarts d'abondance en équivalents génomes de *F. graminearum* en présence de différents résidus de culture et dans le sol correspondent sans doute effectivement à des différences de capacité biotique offertes par ces résidus de culture au champignon saprotrophe.

## II.2 Habitat privilégié ou niche écologique ?

La survie de *F. graminearum* dans des résidus de culture d'espèces différentes, plus ou moins intimement mélangés à du sol, a été discutée dans la partie précédente. La survie de *F. graminearum* dans des résidus de culture de même espèce mais de variétés différentes (cas de la moutarde) ou bien les mêmes résidus de culture mais traités différemment (stérilisés ou non, en présence de sol ou non) a également été testée. Ces différentes approches amènent la question de la notion d'habitat privilégié ou de celle de niche écologique pour qualifier cet ensemble de ressources spatiales et trophiques que constituent les résidus dans lesquels *F. graminearum* se développe.

i) Dans la première partie de ce chapitre, il a été montré qu'une moutarde brune avait un effet négatif sur la survie de *F. graminearum*. L'effet d'une seconde variété de moutarde a été testé. Sa composition chimique était proche de celle de la première variété (C:N de 30 pour la seconde variété contre 23 pour la première). Pourtant, la croissance radiale de *F. graminearum* sur milieu gélosé amendé avec cette nouvelle variété, certes significativement plus faible que celle observée avec le contrôle, a été plus importante que celle observée avec la première variété, qui était totalement inhibitrice. De la même manière, dans le sol amendé avec les résidus de cette seconde variété de moutarde, *F. graminearum* s'est comporté comme avec les résidus de colza. Il n'y a pas eu l'effet inhibiteur observé avec la première variété.

Il apparaît donc difficile de généraliser à toutes les moutardes les effets observés avec une seule variété. En revanche, il apparaît possible de se fier aux tests relativement simples de croissance radiale sur milieu gélosé pour prédire l'effet potentiellement assainissant d'une variété de moutarde et d'ainsi la proposer comme culture intermédiaire susceptible de réduire l'inoculum de *F. graminearum* *in situ*.

ii) Les dynamiques de populations de *F. graminearum* inoculé dans de la paille préalablement stérilisée et dans de la paille naturelle ont été mesurées comme précédemment par PCR quantitative pendant trois mois, dans des conditions d'incubation en microcosmes à 20°C, mais en absence de sol. L'humidité de la paille a été difficile à maintenir et il a été nécessaire de procéder à une ré-humectation au bout de 30 jours. Néanmoins, les mêmes types dynamiques de populations que celles décrites dans la comparaison sol naturel-sol stérile ont été observées. *Fusarium graminearum* s'est développé et a atteint un plateau de l'ordre de  $3.10^5$  équivalents génomes de champignon au bout de 10 jours dans la paille naturelle alors que la densité atteinte au niveau du plateau dans la paille désinfectée à été 10 à 20 fois plus élevée. Il est donc possible de parler d'une capacité biotique potentielle importante offerte par le substrat *sensu stricto* mais sévèrement limitée par la microflore indigène qui entre en compétition avec *F. graminearum* en colonisant une partie de l'habitat (ressources spatiales et trophiques) que constitue la paille de blé

La survie de *F. graminearum* a été mesurée aussi bien dans différentes espèces de résidus végétaux que dans des résidus d'une même espèce mais de variété différente ou dans des résidus stérilisés ou non d'une même espèce végétale. La survie du champignon a dépendu à

la fois de la nature des résidus, mais aussi et des interactions que *F. graminearum* pouvait avoir avec le reste de la microflore. Cependant, le rôle fonctionnel que joue *F. graminearum* par rapport à ces résidus n'a pas été appréhendé. Il est néanmoins vraisemblable que pour se développer, *F. graminearum* puise dans les résidus les ressources trophiques dont il a besoin et de ce fait, le champignon, dans sa phase saprotrophe, contribue à la décomposition des résidus, à la ré-organisation, la mobilisation, la séquestration et la minéralisation des éléments les composant. Il est donc possible de considérer que *F. graminearum*, en tant que saprotrophe, participe activement au fonctionnement biologique de l'environnement qui l'héberge.

Par définition, une espèce, ici *F. graminearum*, se caractérise par trois paramètres généraux dans ses relations à l'environnement naturel : son aire de répartition, son habitat et sa niche écologique.

*F. graminearum* est ubiquiste et son aire de répartition recouvre presque tous les continents, avec une abondance plus ou moins importante et quelques restrictions géographiques localisées (Chakraborty et al., 2006).

Les résidus de culture fournissent les ressources spatiales, trophiques et de reproduction (des périthèces ont été observés ; Pereyra et al., 2004) qui permettent d'assurer les besoins vitaux de *F. graminearum* (Leplat et al., 2012). Ils constituent donc l'habitat de *F. graminearum*.

La niche écologique relève du concept. Elle comprend non seulement l'espace physique que constitue l'habitat occupé par une espèce mais également le rôle fonctionnel joué par cette espèce, incluant les multiples interactions biotiques dans lesquelles elle est impliquée et dont l'issue lui est favorable, ce qui caractérise son adaptation.

Les résultats présentés et leur analyse permettent sans conteste de considérer que les résidus de culture constituent un habitat privilégié, favorable dans certains cas, à *F. graminearum*. C'est pourquoi ce vocable a été utilisé tout au long de cette étude.

Les interactions compétitives de *F. graminearum* avec le reste de la microflore, qu'il s'agisse de compétition directe (par antagonisme) ou indirecte (par exploitation commune des ressources de l'habitat) ont souvent abouti à la survie du champignon saprotrophe, sauf dans le cas de la moutarde de la première variété. Il reste cependant un certain nombre de points à élucider avant de parler de niche écologique. Parmi ceux-ci, les aptitudes de *F. graminearum* à la décomposition des résidus, les mécanismes de la compétition avec le reste de la microflore, les mécanismes de la compétition avec le complexe fusarien responsable de la fusariose des céréales, l'avantage compétitif éventuel que pourraient constituer la production de mycotoxines *in situ*, et enfin et surtout, les mécanismes évolutifs caractérisant l'adaptation de *F. graminearum* aux résidus ainsi que leur modifications à son avantage. Un schéma permettant de représenter la situation actuelle, préalable à la définition de la niche écologique que constitueraient les résidus de culture pour *F. graminearum*, est présenté ci-contre (Figure 6.3).

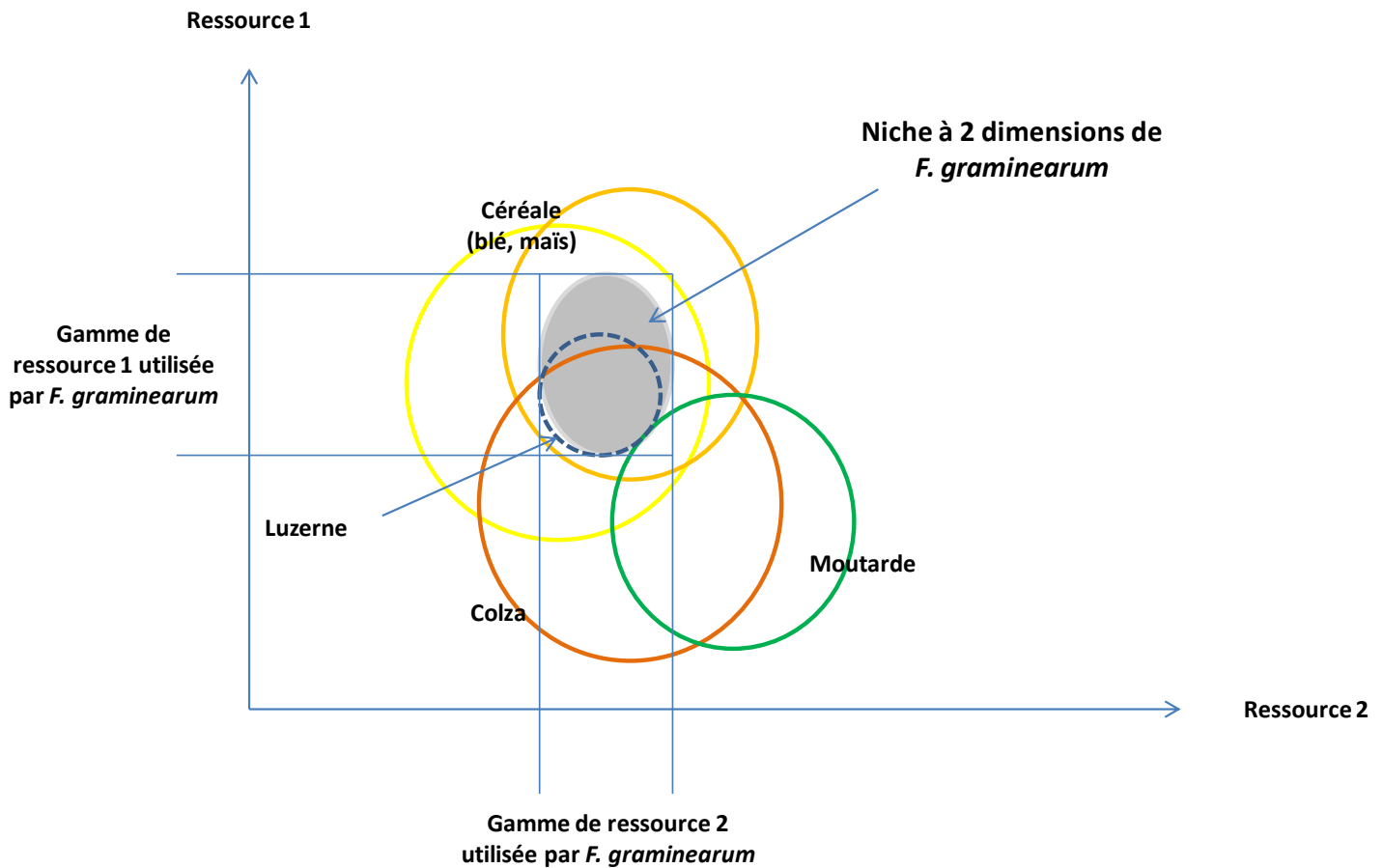


Figure 6.3 : Représentation de la niche écologique hypothétique que pourraient constituer les résidus de culture pour *Fusarium graminearum*

Les céréales fournissent de quoi couvrir plus que l'ensemble des besoins de *F. graminearum*, alors que le colza n'en couvre qu'une partie, que la moutarde n'en fournit pas du tout (mais le pourrait) et que la luzerne (en pointillé) est très vite limitante.







# **Chapitre 7 Discussion générale et perspectives**

Blé, orge et colza constituent les trois cultures phares de la région Bourgogne. Elles occupent près des 2/3 des terres labourables régionales. Au delà des quantités produites, la région Bourgogne a aussi pour volonté de valoriser la qualité des produits issus des terroirs qui la composent. Dans ce cadre, le projet Farine+ soutenu par le pôle de compétitivité Bourguignon VITAGORA s'intéressait plus particulièrement à la qualité du blé depuis la production jusqu'à un produit fini ayant une forte valeur ajoutée originale répondant à des besoins particuliers de groupes de consommateurs ciblés. Ainsi, le projet Farine+ comprenait trois volets essentiellement : le volet Production (variétés, itinéraires culturaux, rendements et qualité phytosanitaires), le volet Transformation (minoterie, assemblages, pétrissage, fermentation et cuisson), et le volet Qualité (goût, nutrition et santé).

Le travail de thèse s'inscrivait clairement dans le volet Production. Nous avons plus particulièrement mis l'accent sur le problème de la fusariose du blé car au-delà des pertes de rendement direct qu'entraînent les attaques dues au complexe *Fusarium-Microdochium* se pose le problème de la qualité alimentaire du blé et des produits de panification lié à la présence de mycotoxines produites par *Fusarium graminearum* dans les grains de blé.

Notre étude a nécessité en préalable une revue bibliographique afin de mettre en évidence les exigences écologiques de ce champignon phytopathogène au cours de la phase saprophyte de son cycle de vie et au cours de laquelle il est soumis aux contraintes environnementales pour assurer sa survie, son développement et sa reproduction sexuée. En effet, *F. graminearum* est un anamorphe dont la forme sexuée (téléomorphe) est *Gibberella zea*, producteur d'ascospores également impliquées dans le processus d'infection. Les résidus de culture sont apparus comme des éléments déterminants dans cette phase et c'est la raison pour laquelle, le travail d'investigation a essentiellement porté sur les interactions entre *F. graminearum* et les résidus de culture.

Des développements méthodologiques mineurs mais surtout des adaptations à notre étude d'outils existant ont été nécessaires de même que la caractérisation complète d'une souche qui a été utilisée comme souche modèle pour l'ensemble de notre travail a dû être réalisée. Il s'agit de la souche MIAE00376, actuellement conservée dans la collection MIAE de l'Ensemble des Ressources Biologiques de l'UMR Agroécologie.

Notre approche a ensuite été conduite à deux niveaux. Le premier consistait en la réalisation au domaine expérimental d'Epoisses de plusieurs expérimentations mettant en jeu les résidus de culture au champ, afin de rechercher et mettre en évidence d'éventuels indicateurs précoces du risque de fusariose et du risque d'accumulation de mycotoxines dans les grains. Le second a consisté en la réalisation d'expérimentations en laboratoire, dans des microcosmes afin de caractériser plus finement l'interaction entre la souche MIAE00376 et les résidus de culture.

L'ensemble de ces points et les résultats que leur étude a fournis font l'objet de la discussion générale ci-dessous.

## I Diversité des techniques et des échelles utilisées pour répondre à la problématique

Les techniques utilisées pour aborder le problème de l'implication des résidus dans le développement de la fusariose du blé, ainsi que pour suivre le développement saprotrophe de *F. graminearum* dans le sol et les résidus ont été diverses et variées. Elles ont permis une approche systémique de la problématique, nécessaire lorsque l'on étudie des phénomènes aussi complexes que cette maladie dans lesquels interviennent un nombre important de facteurs, dont certains, tels que le climat, impossibles à contrôler. Elles ont en outre constitué un enrichissement personnel indéniable. Ainsi, les échelles utilisées se sont étendues du microcosme jusqu'à l'essai au champ. Les domaines étudiés ont touché aussi bien à l'agronomie, par le suivi du taux de maladie de manière conventionnelle (par comptages visuels), mais aussi par l'introduction de l'outil informatique par l'intermédiaire de l'analyse d'image, démarche utilisée par ailleurs mais assez nouvelle dans le suivi de la fusariose du blé ; à la chimie par l'intermédiaire de l'extraction et du dosage des mycotoxines présentes sur les grains de blé ; à la microbiologie, pasteurienne et moléculaire, pour l'isolement des souches impliquées dans la maladie et leur identification ; enfin, à des techniques moléculaires plus poussées pour le suivi de la dynamique de population de *F. graminearum* en microcosmes par qPCR.

Le changement d'échelle est une démarche nécessaire à l'appréhension d'un phénomène tel que la fusariose. Les études en microcosmes permettent de décomposer les facteurs et de les étudier un à un en contrôlant l'environnement pour comprendre l'impact de chaque facteur sur le système. Les essais au champ représentent la réalité du terrain mais sont impossibles à contrôler et difficiles à exploiter en raison du nombre de facteurs influençant le système, même si l'expérimentateur influe sur certains facteurs, comme avec l'inoculation artificielle de l'essai Fusa. Ils permettent en outre de confronter les résultats obtenus en conditions contrôlées à l'environnement réel. Une échelle intermédiaire n'a pas été présentée au cours de l'étude : celle de l'essai en serre. Elle a pourtant été abordée mais les résultats obtenus ne sont pas encore concluants. Ces essais doivent permettre d'aborder le développement saprotrophe du champignon sous un nouvel angle : celui du potentiel infectieux des sols et de la résistance des sols. La sévérité d'une maladie d'origine tellurique dépend de la sensibilité de l'hôte considéré, des conditions climatiques et du potentiel infectieux du sol dans lequel la culture est menée (Figure 7.1). Le potentiel infectieux d'un sol est défini comme l'énergie pathogène présente dans ce sol (Bouhot, 1979). Il dépend de la concentration en inoculum pathogène, de l'agressivité intrinsèque de cet inoculum, de la résistance du sol et des pratiques culturales. Le potentiel infectieux est évalué par la croissance d'un hôte sensible au pathogène sous des conditions environnementales favorables au développement de la maladie. Le sol à tester est dilué en différentes proportions dans ce même sol désinfecté et les symptômes sur plantes sont relevés. En dessous d'une certaine concentration en inoculum, les symptômes sur la plante ne sont pas apparents même si le pathogène est en présence de l'hôte. Un sol résistant est défini comme un sol dans lequel le pathogène ne s'établit pas ou ne persiste pas, un sol dans lequel le pathogène s'établit mais ne provoque que de faibles dommages, ou dans lequel il s'établit et provoque des dommages dans un premier temps mais

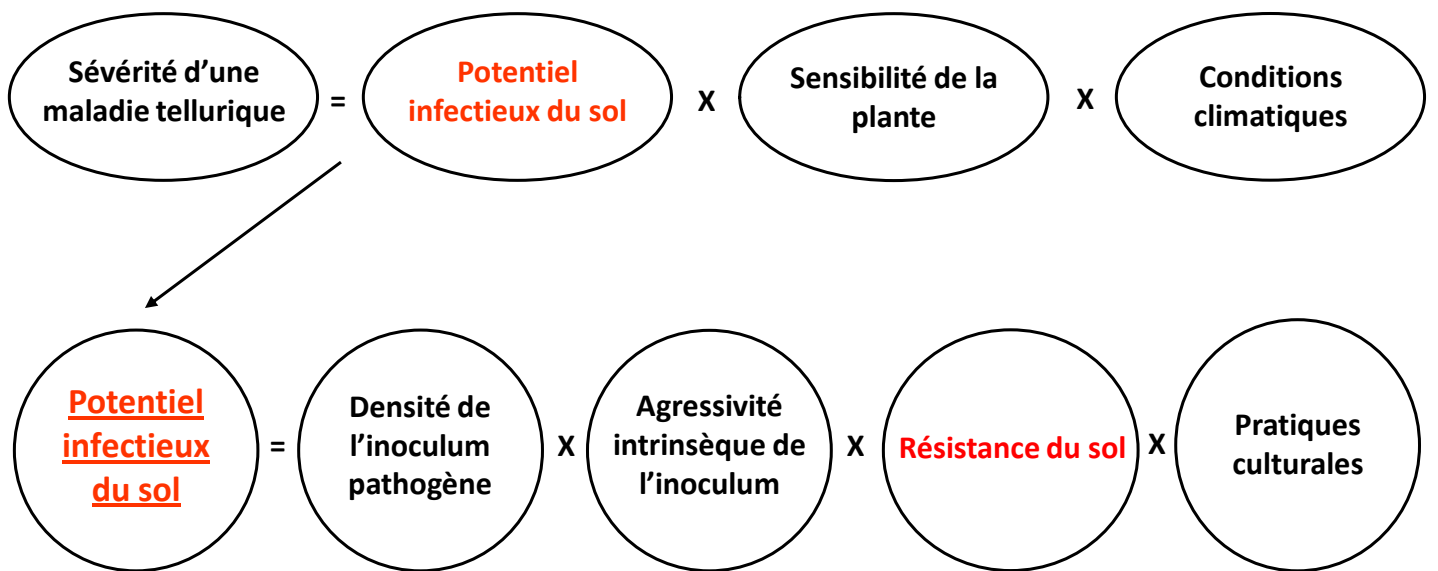


Figure 7.1 : Définition des variables intervenant dans la sévérité d'une maladie d'origine tellurique

moins ensuite, bien que le pathogène persiste (Baker and Cook, 1974). Le caractère résistant d'un sol est principalement lié à sa biologie. La résistance d'un sol est évaluée en étudiant l'effet sur la croissance d'un hôte sensible de l'apport de doses connues et croissantes d'inoculum dans ce sol. Des cas de résistance du sol à *F. oxysporum* sont connus pour de nombreuses fusarioses vasculaires (Alabouvette, 1990; Cook et al., 1983), mais ne sont pas efficaces contre les espèces de *Fusarium* non vasculaires, telles que celles impliquées dans la fusariose du blé (Deacon and Berry, 1993).

Dans le cas précis de la fusariose du blé, plusieurs problèmes se posent qui font que les tests ne sont pas encore au point. Le premier est le choix du sol d'étude. Le sol naturellement choisi a été le sol d'Époisses puisqu'il avait déjà servi à l'essai au champ et à la dynamique de population. Cependant, il n'est peut-être pas le sol idéal pour la mise au point de tests sur le potentiel infectieux et la résistance. Le second problème est le type d'inoculum à apporter et la manière de le faire (suspension de spores, plugs de culture sur gélose, apport de résidus infectés...). Le dernier est directement lié au type de maladie. Il est impossible de se servir de la fusariose sur épi de blé pour étudier le potentiel infectieux ou la résistance d'un sol. En effet, le délai entre l'inoculation et l'apparition des symptômes est trop long pour le lier aux propriétés du sol. Deux stratégies ont été imaginées pour contourner cette difficulté. La première est d'utiliser la maladie sur plantules : la fusariose cause également des fontes de semis et des symptômes sur les coléoptiles. Cependant, les essais au champ ont montré que ces symptômes précoces n'étaient pas de bons prédicteurs du risque de fusariose de l'épi. Cette voie n'est donc peut-être pas celle sur laquelle s'engager. La seconde est d'utiliser une plante modèle herbacée dont les inflorescences sont sensibles à la fusariose. *Brachypodium distachyon* semble être un bon modèle pour l'étude de la fusariose du blé car son cycle de développement est très court, inférieur à huit semaines (Peraldi et al., 2011).

## II Points d'amélioration et perspectives ouvertes par l'essai au champ

L'essai au champ a fourni un nombre important d'informations. Il a permis de confirmer l'implication des résidus de culture dans le développement de la fusariose du blé. Il a souligné le risque que représente l'inoculum porté par les semences. Il a montré la difficulté de prévoir suffisamment à l'avance les effets du développement fongique sur le rendement et le taux d'accumulation de mycotoxines dans les grains, en raison de la part essentielle que prend le climat dans le développement de la maladie. Cependant, plusieurs points auraient pu être menés autrement pour optimiser l'essai, et d'autres modalités auraient pu être imaginées.

Le premier point est le choix de la variété Ephoros dans l'essai ITK. Cette variété avait été choisie pour sa double résistance à la fusariose du blé et à la septoriose, maladie qui avait troublé les notations lors d'essais préliminaires. Ce problème n'a pas été rencontré au cours des deux années d'expérimentation, ce qui était impossible à prévoir. Cependant, il aurait peut-être mieux valu remplacer la variété Ephoros par la troisième variété utilisée dans l'essai Fusa, la variété Maxwell. En effet, ne pas inclure cette variété dans l'essai qui a servi de comparaison n'a pas permis de suivre le développement de la maladie dans les conditions « naturelles », comme cela a été possible pour les variétés Apache et Charger. L'essai Fusa a montré que bien que les variétés Charger et Maxwell soient toutes les deux sensibles à la

fusariose, l'expression de la maladie était différente chez ces deux variétés, notamment en ce qui concerne l'accumulation des mycotoxines dans les grains. Toutes les comparaisons faites entre les essais Fusa et ITK auraient ainsi été plus robustes sur le plan statistique, notamment celles pour lesquelles peu de modalités étaient disponibles, comme les états sanitaires.

L'essai ITK devait tester l'effet de différents itinéraires techniques. Grâce aux variétés communes avec l'essai Fusa, Apache et Charger, il a pu servir de contrôle en conditions naturelles (non-inoculé). Le fait que les semences utilisées dans cet essai aient été enrobées a en outre permis de mettre en évidence la part prise par l'inoculum porté par les semences dans le développement de la maladie. Dans le contexte actuel de réduction de l'utilisation des fongicides, il serait intéressant de pousser le raisonnement encore plus loin et de transformer cet essai ITK pour pouvoir comparer agriculture biologique et agriculture conventionnelle. Les parcelles intensives de l'essai ITK, utilisant des semences enrobées et ayant reçu un traitement contre la fusariose au stade floraison du blé, correspondaient à de l'agriculture conventionnelle. Les parcelles de l'essai Fusa, avec des semences non-enrobées et n'ayant pas reçu de traitement contre la fusariose au stade floraison, correspondaient à de l'agriculture biologique. Si l'essai ITK avait été inoculé lors du semis et au stade deux nœuds, comme l'a été l'essai Fusa, la comparaison agriculture biologique / agriculture conventionnelle aurait été possible. Relativement peu de données sont disponibles à l'heure actuelle sur la relation entre agriculture biologique et fusariose du blé. Pendant la période hivernale, l'inoculum porté par les graines peut s'exprimer et causer des pertes à la levée si ces semences ne sont pas enrobées (Timmermans et al., 2009), mais il a aussi été montré que l'expression de la maladie sur tiges de blé causée par *F. avenaceum* et *F. culmorum* était moins forte en agriculture biologique que dans un système en semis direct dans lequel des fertilisants avaient été utilisés et où la population adventice avaient été contrôlée (Fernandez et al., 2011). Concernant la maladie sur épi et l'accumulation des mycotoxines dans les grains, dans certains cas aucune différence n'est apparue entre agriculture biologique et agriculture conventionnelle (Champeil et al., 2004b; Ok et al., 2011), alors que dans d'autres, l'accumulation des mycotoxines dans le blé, l'orge ou l'avoine a été plus faible en agriculture biologique (Bernhoft et al., 2010; Birzele et al., 2002; Doll et al., 2002; Gottschalk et al., 2007).

Le second point est le choix du moment de l'inoculation de surface dans l'essai Fusa. Cette inoculation a été faite au stade deux nœuds. Ce choix se comprend par le désir de bien séparer les modalités testées pour optimiser les chances d'obtenir des résultats exploitables. Cette technique a été payante puisque l'action de chacun des inoculums a bien été identifiée. Cependant, elle ne représente pas complètement la réalité puisque lors d'une culture classique, les résidus de surface auraient été présents dès le début du test. Dans ce cas, les notations sur épi auraient pu être moins tranchées car l'inoculum aurait été plus âgé. L'inoculum de surface aurait très certainement eu une influence dès les notations hivernales. Bateman et al. (2007) ont noté que si la présence de résidus de surface avait bien pour effet de favoriser la maladie sur épi, elle avait aussi tendance à diminuer celle sur bas de tige, certainement en favorisant les phénomènes de compétition et d'antagonisme avec les communautés microbiennes. Mais dans ces essais, la maladie sur bas de tige était surtout causée par *F. culmorum* et l'incidence de *F. graminearum* sur ces mêmes bas de tige a augmenté en présence de résidus de maïs à la surface. Un autre point à aborder est celui de l'inoculum sauvage. Les essais ont prouvé qu'en

conditions naturelles, *F. graminearum* n'était pas l'espèce prédominante. La première année, l'espèce la plus fréquemment isolée dans l'essai ITK a été *F. tricinctum*. Cette espèce est productrice d'une mycotoxine qui n'a pas été recherchée au cours des essais, la moniliformine (Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002). La toxicité de la moniliformine a été prouvée chez l'animal (Harvey et al., 2002; Harvey et al., 2001; Harvey et al., 1997; Jestoi, 2008; Ledoux et al., 1995). Des infections sévères dues à *F. avenaceum* et à *F. tricinctum* ont été relevées dans les pays du nord et du centre de l'Europe. Des taux significatifs de moniliformine ont été trouvés sur des grains de blé récoltés en Pologne, en Allemagne et en Autriche (Adler et al., 1995; Golinski et al., 1996; Oerke et al., 2010; Tomczak et al., 2002). Le taux de cette mycotoxine dans les grains n'est pas couvert par la réglementation car son occurrence est moindre par rapport à celle de la DON par exemple. Cependant, il aurait été intéressant de contrôler si elle avait été produite dans les essais Fusa et ITK.

Il aurait également été intéressant de pouvoir reconduire les essais au moins une année de plus. Les deux campagnes successives ont bénéficié de conditions climatiques différentes, à la fois pendant la période hivernale et pendant la période de développement de la maladie sur épi. Ces deux scénarii climatiques ont permis d'obtenir des résultats allant dans le même sens mais avec des différences entre les années. Comme expliqué dans le chapitre 4, le développement de la maladie a été fort à la fois pendant la période hivernale et sur épi la première année alors qu'il a été plus faible à la fois pendant la période hivernale et sur épi la seconde année. Ceci s'explique en grande partie par les conditions climatiques plus douces au cours de la période hivernale la seconde année mais plus fraîches et mois humides au cours du développement de la maladie sur épi. De ce fait, l'inoculum principalement isolé des grains récoltés dans l'essai ITK10 a été *M. nivale*. Sachant que les semences récoltées dans l'essai ITK09 ont été utilisées dans l'essai Fusa10 et que l'espèce s'exprimant principalement au cours de la période hivernale est *M. nivale*, il aurait été intéressant de poursuivre l'expérimentation qui aurait probablement apporté d'autres informations.

Une alternative à l'arrêt de cette expérience a été imaginée sur le domaine d'Epoisses qui pourrait être étendue à d'autres maladies que la fusariose du blé. Le projet de monter un observatoire à maladies est en cours de réflexion. Il serait fondé sur des mesures répétables dans le temps, les plus indépendantes possibles des notateurs. Les essais Fusa et ITK ont montré que la notation de la maladie était fortement dépendante de l'œil et de l'appréciation du notateur. Un tel observatoire nécessiterait de s'en affranchir le plus possible pour pouvoir envisager des observations à long terme. Les essais menés sur les techniques d'analyse d'image ont montré que des pistes intéressantes pouvaient être explorées à ce niveau. Cet observatoire pourrait être associé à une base de données du type de celle montée grâce aux deux années d'essais Fusa et ITK. Un tel observatoire, en répétant les observations d'une année sur l'autre, aurait l'avantage, à l'usage, de permettre à la fois de rencontrer toutes les conditions climatiques observables dans la région et de répéter les observations faites dans des conditions climatiques similaires. Des réseaux nationaux de collecte d'informations relatives aux maladies des cultures existent, les réseaux de Protection Intégrée des Cultures (PIC). Les données locales collectées à travers l'observatoire devraient s'inscrire dans cette démarche nationale en alimentant les bases de données de ces réseaux.



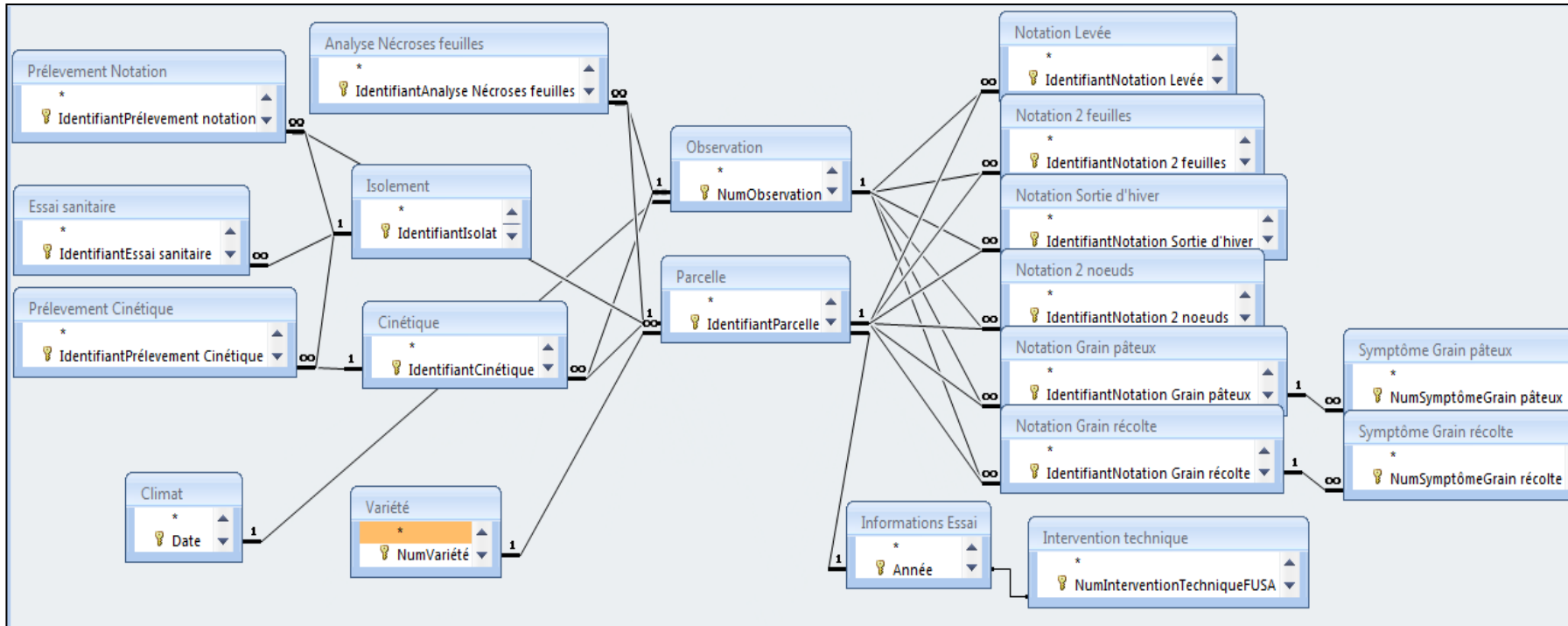


Figure 7.2 : Modèle Conceptuel de Données (MCD) de la base de données constituée lors de cette étude (L. Henneron – stagiaire ingénieur ISA Lille, 2010)

La recherche d'indicateurs de la qualité phytosanitaire et de prévision du risque est un outil de plus en plus fréquemment employé pour établir des grilles d'aide à la décision et à la gestion de ce risque (Janvier et al., 2007). Dans le cas de la fusariose sur épi du blé, il existe des outils d'aide à la gestion du risque essayant d'intégrer les paramètres agronomiques et les paramètres climatiques pour prévoir le développement de la maladie et l'accumulation des mycotoxines dans les grains, comme le programme Qualimètre<sup>®</sup> présenté dans l'introduction générale. Cependant, lorsque cet outil décèle un risque, un prélèvement d'épis de blé est nécessaire à la vérification. Les études essayant d'établir une corrélation entre taux de maladie observée et pertes de rendement ou accumulation de mycotoxines passent en général par ces prélèvements et par une notation visuelle, comme cela a été le cas ici et montrent qu'il est difficile de faire un lien. L'analyse d'image a révélé son efficacité lors de cette notation, étant même mieux corrélée au taux d'accumulation de DON dans les grains que la notation visuelle. Elle a permis de s'affranchir du biais lié à l'œil du notateur et a aussi représenté un gain de temps indéniable. Cependant, le prélèvement des épis a été également nécessaire à cette notation. Il serait intéressant d'essayer d'exploiter la possibilité que représente l'analyse d'image en testant un mode de notation qui ne nécessiterait pas de prélèvements, comme celui utilisé pour estimer la quantité de vert des parcelles lors duquel les photos étaient prises directement sur le terrain. Les photos pourraient être prises à l'aide d'un chariot élévateur et être analysées comme l'ont été les photos scannées des épis. C'est le principe du phénotypage en plein champ qui est d'ailleurs en train de se mettre en place sur le domaine expérimental d'Epoisses, dans le cadre d'un projet national appelé « Phénome » (phénomique végétale et stress climatique). Cependant, il serait plus difficile de noter les parties orange : le contraste dû à l'éloignement nécessaire à la prise de vue serait moins bon. L'échaudage des épis pourraient éventuellement être noté.

L'ensemble des observations au cours de ces deux années d'expérimentation au champ a permis de constituer une base de données intégrant le caractère informatif de ces différentes observations. Cette base de données a été organisée modestement en utilisant le logiciel Access<sup>®</sup> (Figure 7.2). Elle est fonctionnelle et peut être interrogée mais jusqu'à présent, elle n'a pas permis de révéler d'indicateur du risque de fusariose, ni d'indicateur du risque d'accumulation de mycotoxines plus précis que ceux que les corrélations ont permis de proposer dans les chapitres 4 et 5. Il est possible d'admettre soit qu'il n'y a pas d'indicateur précoce, comme cela a été proposé dans ces chapitre 4 et 5, soit que les mesures réalisées n'étaient pas suffisamment pertinentes pour les révéler, soit enfin que la base de données telle qu'elle a été construite n'est pas le meilleur outil pour identifier des indicateurs pertinents. C'est pourquoi nous avons contacté une équipe à Toulouse ayant construit, dans le cadre du programme ENDURE, un modèle décrivant le développement de la fusariose (et d'autres maladies, Willocquet et al., 2008) du blé dans des situations complexes. Nous espérons ainsi qu'une exploitation par cet outil et une approche différente puissent nous permettre de répondre définitivement à la question de l'existence, ou non, d'indicateurs précoces du risque de développement de la fusariose et du risque d'accumulation de mycotoxines dans les grains.

### III Perspectives ouvertes par les dynamiques de populations en microcosmes

Les dynamiques de population ont montré l'importance de la présence des résidus dans le développement saprotrophe de *F. graminearum*. Ce développement est modulé par les communautés microbiennes du sol. Les perspectives ouvertes par ce type d'expérience pour la compréhension du développement saprotrophe de *F. graminearum* sont multiples et variées. Dans un souci de décomposer le problème pour comprendre l'implication de chaque facteur, les résidus utilisés ont tous été désinfectés. De ce fait, le facteur dominant pour le développement du champignon a été le rapport C:N des résidus. La même expérience devrait être reconduite avec des résidus non-désinfectés pour tester l'action de la flore indigène des résidus sur le développement saprotrophe de *F. graminearum*. La dynamique de population en fonction de chaque résidu pourrait en être changée.

Outre qu'elle permettrait de concrétiser le concept de niche écologique pour les résidus, cette dynamique pourrait être couplée à une analyse des structures microbiennes du sol et des résidus par des techniques telles que la t-RFLP ou la métagénomique afin de repérer des microorganismes ou des groupes fonctionnels d'intérêt pour le contrôle du développement saprotrophe de *F. graminearum*. Dans le mesure ou l'enfouissement des résidus par labour est de moins en moins pratiqué, il faut limiter le développement du pathogène sur les résidus par des moyens de contrôle biologique (Bujold et al., 2001; Luongo et al., 2005; Singh et al., 2009). La capacité des microorganismes identifiés à limiter la croissance du pathogène dépend des conditions de température et d'humidité. Les espèces responsables de la fusariose du blé ont une capacité meilleure que celle des organismes potentiellement compétiteurs à se développer sur les résidus (habitat ou niche écologique ?) dans des conditions de faible potentiel hydrique (Magan and Lynch, 1986; Singh et al., 2009). La sélection d'antagonistes adaptés à ces conditions est donc essentielle : *Clonostachys rosea* est capable d'empêcher la sporulation du champignon sur résidus de blé et de maïs (Luongo et al., 2005) et une espèce de *Microsphaeropsis* réduit la production d'ascospores par *F. graminearum* sur résidus de blé et de maïs (Bujold et al., 2001). Dans ce dernier cas, la souche est efficace qu'elle soit apportée avant (deux semaines), en même temps ou après (quatre semaines) l'implantation de *F. graminearum*. Cependant, pour *Clonostachys rosea* comme pour *Microsphaeropsis* sp., ces résultats ont été obtenus en conditions contrôlées. Lors du passage au champ, l'efficacité a été moindre, ce qui prouve à nouveau l'importance des deux approches. Dans un premier temps, le pouvoir antagoniste des souches identifiées pourrait être testé par des confrontations sur boîtes de Pétri (Franco et al., 2011; He et al., 2009; Singh et al., 2009). La technique de dynamique des populations telle qu'elle a été présentée dans ce manuscrit pourrait ensuite être utilisée pour contrôler le pouvoir antagoniste de ces souches dans le sol et sur les résidus grâce à des co-inoculations, et ce, dans différentes conditions environnementales. L'expérience a été menée à 20 °C et l'humidité n'a pas été contrôlée, mais il est tout à fait envisageable de tester le développement de *F. graminearum* à d'autres températures, ou bien avec une alternance de températures et à des conditions d'humidité fixées.

*Fusarium graminearum* semble être un faible compétiteur par rapport aux autres espèces colonisant les résidus. Sa densité diminue rapidement lorsque la décomposition des résidus avance. Des techniques basées sur la destruction de ces résidus en accélérant leur décomposition pourraient représenter un autre moyen de contrôler la survie de l'inoculum primaire. La décomposition des résidus pourrait être accélérée en stimulant leur flore microbienne et la flore du sol qui sont impliquées dans ce processus.

La contamination des grains de blé et ses conséquences sur l'alimentation humaine et animale est bien documentée (Placinta et al., 1999), mais l'essai au champ a aussi montré qu'une partie des grains fusariés retournait au sol au moment de la récolte. Plus généralement, des mycotoxines ont été trouvées dans les résidus de culture (Brinkmeyer et al., 2006; Grabarkiewicz-Szczesna et al., 1996; Moore, 2005). Ceci pose la question de la signification écologique de la production des mycotoxines au niveau du sol et des résidus et de l'impact que leur présence peut avoir. Des microorganismes, champignons ou bactéries, ont été étudiés pour leur pouvoir antagoniste contre *F. graminearum*. De même, l'effet de la présence de vers de terre sur la quantité de *F. graminearum* et de mycotoxines retrouvée sur des résidus a été testé (Oldenburg et al., 2008). Cependant, l'effet de la présence de mycotoxines sur les communautés du sol reste très peu étudié (Abid et al., 2011). Il peut être étudié sur les communautés fongiques et bactériennes, comme sur les vers de terre, mais aussi sur d'autres communautés du sol, comme les nématodes par exemple. Comme pour la recherche de souches à pouvoir antagoniste, deux types d'expérience peuvent être envisagés. La croissance de souches d'intérêt sur boîtes de Pétri en présence de différentes concentrations de mycotoxines pourrait permettre d'identifier des souches résistantes aux plus fortes concentrations éventuellement présentes dans les résidus. C'est au sein de ces populations résistantes aux mycotoxines des *Fusarium* du complexe responsable de la fusariose qu'il faudrait alors identifier cette capacité de contrôler le développement de ces pathogènes, que ce soit par antagonisme directe ou par compétition pour l'exploitation des ressources fournies par l'habitat que représente les résidus.

Les dynamiques de populations, et plus particulièrement celles en présence de résidus de moutarde, ont montré une autre possibilité pour limiter le développement de l'inoculum primaire de *F. graminearum* : la rotation des cultures et l'introduction de cultures intermédiaires à vocation assainissante. L'importance du précédent cultural dans le développement de la fusariose du blé a déjà été soulignée (Klem et al., 2007; Muller et al., 2010; Parry et al., 1995). Cependant, les essais en présence de moutarde ont montré que ces résidus n'étaient pas seulement neutres pour le développement de *F. graminearum* mais intrinsèquement défavorables. Cette culture est aujourd'hui utilisée essentiellement en tant que culture intermédiaire piège à nitrate (CIPAN). Des variétés fortement productrices de sinigrine ou autres glucosinolates fongistatiques et/ou fongicides capables de combiner les fonctions CIPAN et biodésinfection devraient être sélectionnées. Elles seraient alors intégrées dans les rotations pour essayer de réduire l'inoculum primaire de *F. graminearum* présent sur les résidus après la culture d'un blé fortement touché par la maladie par exemple.

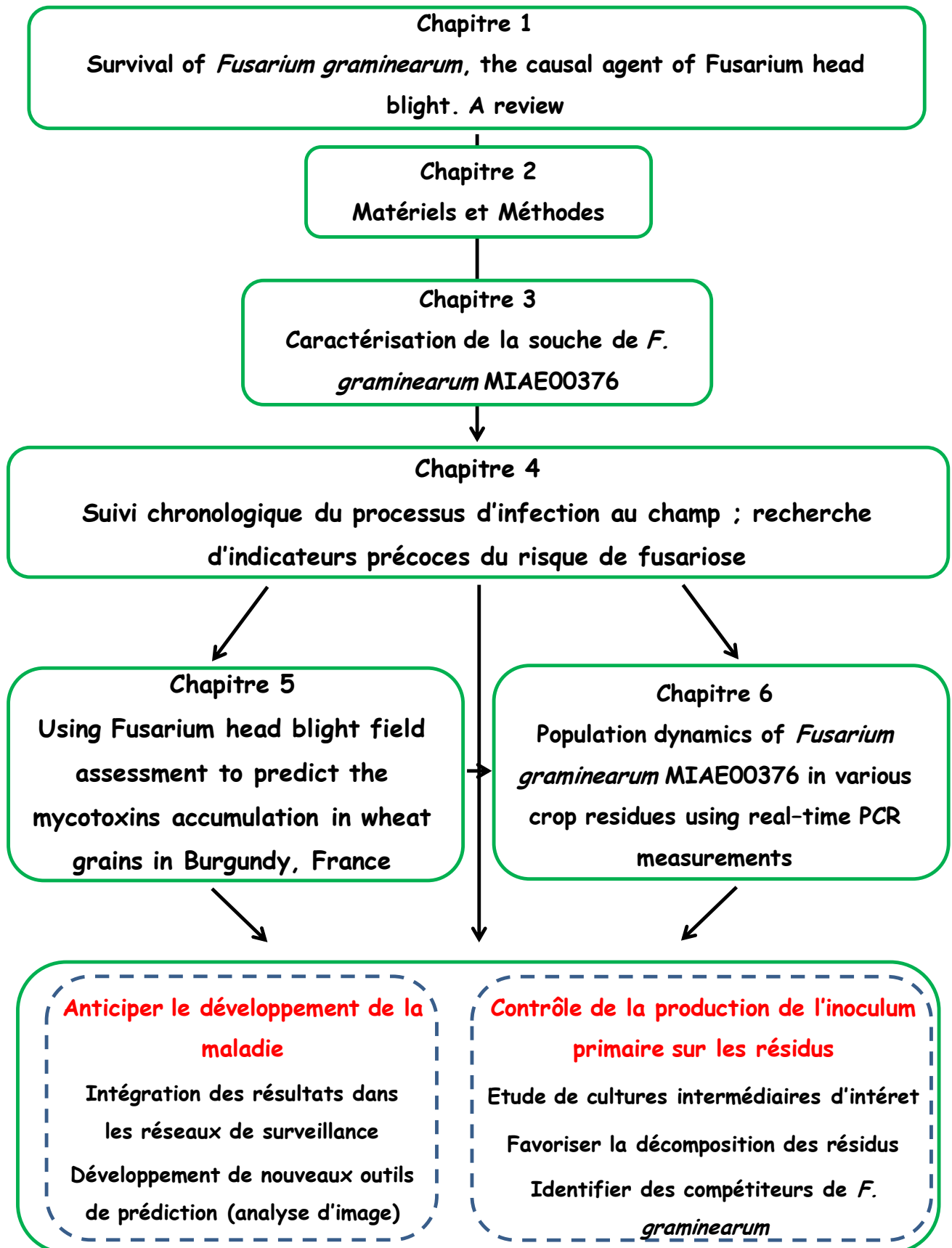


Figure 7.3 : Perspectives ouvertes à l'issue du travail de thèse

## Conclusion

Il est bien évident que le domaine d'Epoisses à Bretenière (47.2° Nord 5.1° Est) n'est pas vraiment représentatif des terroirs de la Bourgogne (4 départements, 31 582 km<sup>2</sup> de superficie) dont la diversité est une des caractéristiques et un des atouts de la région (Chrétien, 2000). Les itinéraires techniques que nous avons utilisés ne sont pas non plus les plus représentatifs du champ des possibles actuellement testés sur différents sites, des GEDA (Groupement d'Etude et de développement Agricole) et CETA (Centre d'Etude Technique Agricole) notamment, disséminés dans la région.

Cependant notre démarche dans le cadre du programme Farine+ était de mettre l'accent sur le risque que représente la fusariose du blé pour la qualité du produit fini. Grâce à la revue bibliographique que nous avons réalisée, nous avons pu mettre en exergue le rôle que les résidus de culture tenaient dans le développement saprophyte du champignon, *a fortiori* parce que le labour et l'enfouissement des résidus sont des nouvelles pratiques se généralisant. Nous avons donc proposé des protocoles expérimentaux susceptibles de maximiser ce risque pour pouvoir identifier des indicateurs précoces de ce risque utilisables pour le prévenir et assurer ainsi la qualité du produit souhaité. Bien que nous n'ayons pas pu identifier de tels indicateurs, la démarche était originale et la collaboration établie *in fine* avec l'INRA de Toulouse pour utiliser la modélisation comme approche pouvant aider à la décision montre la confiance que nous avons dans le jeu de données acquis et la manière dont il a été acquis. De la même manière, si nous avons montré que les résidus peuvent constituer un facteur de risque, ils constituent également le maillon faible du champignon pathogène dans sa phase saprophyte et c'est sur la gestion de ces résidus que doivent porter les efforts. Des solutions biologiques ont été proposées comme perspectives, notamment en évoquant la sélection et l'introduction d'agents de lutte biologique, quelques soient les mécanismes mis en jeu (antagonisme, compétition par exploitation, ...). L'objectif de ce travail de thèse a donc été atteint même si des questions restent sans réponse pour l'instant et devront être abordées (Figure 7.3).

Nous avons en particulier évoqué la notion de gestion du potentiel infectieux du sol et celle de résistance du sol à la maladie. Concrètement, cela revient à orienter le fonctionnement biologique des communautés, faune et microflore, indigènes du sol pour qu'elles limitent le développement du complexe fusarien. C'est à ce niveau que la généralisation des objectifs initiaux du projet Farine+ peut s'envisager en impliquant dans la démarche les approches poursuivies par les GEDA et CETA de la région, plus particulièrement le GEDA de la Tille qui depuis 25 ans met en œuvre une agriculture de conservation. En pratiquant le semis direct sous couvert végétal (SDSCV), le mulch de résidus laissé en surface a sans doute permis le développement d'une composant biotique particulière, dont le niveau d'interactions multitrophiques doit être bien établi et qui peut constituer un modèle intéressant d'équilibre biologique à caractère suppressif.



## **Références bibliographiques**



**A**

- Abid, M., Leplat, J., Fayolle, L., Gautheron, E., Héraud, C., Gautheron, N., Edel-Hermann, V., Cordier, C., Steinberg, C., 2011. Ecological role of mycotoxins in wheat crop residues: consequences on the multitrophic interactions and the development of *Fusarium graminearum*. In: Multitrophic interactions in soil, IOBC Bull. 71, 1-5.
- Adler, A., Lew, H., Brodacz, W., Edinger, W., Oberforster, M., 1995. Occurrence of moniliformin, deoxynivalenol, and zearalenone in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Mycotoxin Res. 11, 9-15.
- Agreste, 2010. Pratiques culturales 2006. Agreste Les Dossiers 8, 13-52.
- Agreste Bourgogne, 2005. Blé, orges, colza : des filières qui comptent en Bourgogne.
- Ahmad, I.S., Reid, J.F., Paulsen, M.R., Sinclair, J.B., 1999. Color classifier for symptomatic soybean seeds using image processing. Plant Dis. 83, 320-327.
- Alabouvette, C., 1990. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils, in: Hornby, D. (Ed.), Biological control of soil-borne plant pathogens. Wallingford, UK: CAB International, pp. 27-43.
- Anil, J., Guruswamy, T., Deasi, S.R., Basavaraj, T., 1998. Effect of cylinder speed and feed rate on the performance of thresher. Karnataka J. Agric. Sci. 11, 1120-1123.
- Argyris, J., Van Sanford, D., TeKrony, D., 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. Crop Sci. 43, 1782-1788.
- Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T., Chelkowski, J., 1999. Fusarium head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. J. Phytopathol.-Phytopathol. Z. 147, 577-590.
- Arseniuk, E., Goral, T., Czembor, H.J., 1993. Reaction of triticale, wheat and rye accessions to gramineous *Fusarium* spp. infection at the seedling and adult-plant growth-stages. Euphytica 70, 175-183.
- Asran, M.R., Amal, M.I.E., 2011. Aggressiveness of certain *Fusarium graminearum* isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production. Plant Pathol. J. (Faisalabad) 10, 36-41.
- Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales, 2012. Récoltes. <http://www.agpb.fr/documentation-et-publications/recoltes/>
- Awad, W.A., Ghareeb, K., Bohm, J., Zentek, J., 2010. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. Food Addit. Contam. Part A-Chem. 27, 510-520.

**B**

- Bailey, K.L., Lazarovits, G., 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. Soil Tillage Res. 72, 169-180.
- Baker, K.F., Cook, R.J., 1974. Control of plant pathogens. San Francisco: Freeman.

- Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B., Ranjard, L., 2009. Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biol. Biochem.* 41, 262-275.
- Bateman, G.L., 1993. Development of disease symptoms and fungal pathogens on shoot bases in continuous winter-wheat, and effects of fungicides. *Plant Pathol.* 42, 595-608.
- Bateman, G.L., 2005. The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant Pathol.* 54, 299-307.
- Bateman, G.L., Coskun, H., 1995. Populations of *Fusarium* spp. in soil growing continuous winter wheat, and effects of long-term application of fertilizers and of straw incorporation. *Mycol. Res.* 99, 1391-1394.
- Bateman, G.L., Gutteridge, R.J., Gherbawy, Y., Thomsett, M.A., Nicholson, P., 2007. Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. *Plant Pathol.* 56, 604-615.
- Bateman, G.L., Murray, G., Gutteridge, R.J., Coskun, H., 1998. Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat. *Ann. Appl. Biol.* 132, 35-47.
- Belien, T., Van Campenhout, S., Robben, J., Volckaert, G., 2006. Microbial endoxylanases: Effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 1072-1081.
- Bellostas, N., Sorensen, J.C., Sorensen, H., 2007. Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four *Brassica* species of the U-triangle for their biofumigation potential. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1586-1594.
- Berndes, G., Hoogwijk, M., van den Broek, R., 2003. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. *Biomass Bioenerg.* 25, 1-28.
- Bernhoft, A., Clasen, P.E., Kristoffersen, A.B., Torp, M., 2010. Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27, 842-852.
- Bertrand, I., Prevot, M., Chabbert, B., 2009. Soil decomposition of wheat internodes of different maturity stages: Relative impact of the soluble and structural fractions. *Bioresour. Technol.* 100, 155-163.
- Beyer, M., Klix, M.B., Verreet, J.A., 2007. Estimating mycotoxin contents of *Fusarium*-damaged winter wheat kernels. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 153-158.
- Beyer, M., Roding, S., Ludewig, A., Verreet, J.A., 2004. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. *J. Phytopathol.* 152, 92-97.
- Beyer, M., Verreet, J.A., 2005. Germination of *Gibberella zea* ascospores as affected by age of spores after discharge and environmental factors. *Eur. J. Plant Pathol.* 111, 381-389.

- Bily, A.C., Reid, L.M., Savard, M.E., Reddy, R., Blackwell, B.A., Campbell, C.M., Krantis, A., Durst, T., Philogéne, B.J.R., Arnason, J.T., Regnault-Roger, C., 2004. Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* 157, 117-126.
- Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Kramer, J., Dehne, H.W., 2002. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 667-673.
- Blandino, M., Pilati, A., Reyneri, A., Scudellari, D., 2010. Effect of maize crop residue density on *Fusarium* head blight and on deoxynivalenol contamination of common wheat grains. *Cereal Res. Commun.* 38, 550-559.
- Bockus, W.W., Shroyer, J.P., 1998. The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 485-500.
- Booth, D.T., Cox, S.E., Meikle, T.W., Fitzgerald, C., 2006. The accuracy of ground-cover measurements. *Rangel. Ecol. Manag.* 59, 179-188.
- Bottalico, A., 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80, 85-103.
- Bottalico, A., Perrone, G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 611-624.
- Bouhot, D., 1979. Estimation of inoculum density and inoculum potential: Techniques and their values for disease prediction, in: Schippers, B., Gams, W. (Ed.), *Soil-borne plant pathogens*. London: Academic, pp. 21-34.
- Boutigny, A.L., Atanasova-Penichon, V., Benet, M., Barreau, C., Richard-Forget, F., 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 275-286.
- Brandfass, C., Karlovsky, P., 2006. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiol.* 6, 10.
- Brennan, J.M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B.M., Doohan, F.M., 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 577-587.
- Brennan, J.M., Leonard, G., Cooke, B.M., Doohan, F.M., 2005. Analysis of head and leaf reaction towards *Microdochium nivale*. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 79-83.
- Brinkmeyer, U., Danicke, S., Lehmann, M., Valenta, H., Lebzien, P., Schollenberger, M., Sudekum, K.H., Weinert, J., Flachowsky, G., 2006. Influence of a *Fusarium culmorum* inoculation of wheat on the progression of mycotoxin accumulation, ingredient concentrations and ruminal in sacco dry matter degradation of wheat residues. *Arch. Anim. Nutr.* 60, 141-157.
- Brown, G.G., 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity. *Plant Soil* 170, 209-231.

Brown, P.D., Morra, M.J., 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Adv. Agron.* 61, 167-231.

Bujold, I., Paulitz, T.C., Carisse, O., 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Dis.* 85, 977-984.

Burgess, L.W., Griffin, D.M., 1968. The recovery of *Gibberella zeae* from wheat straws. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husband.* 8, 364-370.

## C

Cannaert, F., Sztor, E., 2006. Fusarium wilt: Studying the possibility of migration from seed to the epidermis and consequences of seed protection based on fludioxonil against the production of the mycotoxin

Fusariose: étude sur la possibilité d'une migration de la semence vers l'épi et conséquences d'une protection de semence à base de fludioxonil sur la production de mycotoxine, 8<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, France, 5 et 6 Décembre, 2006, pp. 288-292.

Cassini, R., 1970. Facteurs favorables ou défavorables au développement des fusarioses et septorioses du blé, Meeting of Sections Cereals and Physiology. *Eucarpia*, Dijon, pp. 271-279.

Cassini, R., 1981. *Fusarium* disease of cereals in Western Europe, in: Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J. (Ed.), *Fusarium*, diseases, biology, and taxonomy. Pennsylvania State Univ Press, USA, pp. 56-63. ^

Cermak, P., Mazal, P., Palovcikova, D., Jankovsky, L., 2006. Application of image analysis in plant pathology and forest protection. *J. For. Sci.* 52, 316-323.

Chakraborty, S., Liu, C.J., Mitter, V., Scott, J.B., Akinsanmi, O.A., Ali, S., Dill-Macky, R., Nicol, J., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., 2006. Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and Fusarium head blight management. *Australasian Plant Pathol.* 35, 643-655.

Chambre d'Agriculture de Bourgogne, 2010. Moulin Decollogne.

Champeil, A., Dore, T., Fourbet, J.F., 2004a. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Sci.* 166, 1389-1415.

Champeil, A., Fourbet, J.F., Dore, T., Rossignol, L., 2004b. Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Prot.* 23, 531-537.

Chelkowski, J., Manka, M., Kwasna, H., Visconti, A., Golinski, P., 1989. *Fusarium sporotrichioides* Sherb., *Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc., and *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. - Cultural-characteristics, toxinogenicity and pathogenicity towards cereals. *J. Phytopathol.-Phytopathol. Z.* 124, 155-161.

Chemidlin Prevost-Boure, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelievre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L., 2011. Validation and application of a

PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. Plos One 6.

Chrétien, J., 2000. Référentiel pédologique de Bourgogne à 1/250 000. Régions naturelles, pédopaysages et sols de la Côte-d'or. INRA, Paris.

Clement, J.A., Parry, D.W., 1998. Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *Microdochium nivale*. Eur. J. Plant Pathol. 104, 323-330.

Colbach, N., Maurin, N., Huet, P., 1996. Influence of cropping system on foot rot of winter wheat in France. Crop Prot. 15, 295-305.

Coleman, D.C., Crossley, D.A., 1996. Fundamentals of soil ecology. Academic Press, London.

Cook, R.J., 1968. Fusarium root and foot rot of cereals in the Pacific Northwest. Phytopathology 58, 127-131.

Cook, R.J., Baker, K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society.

Cordier, C., Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2007. SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. J. Microbiol. Methods 68, 60-68.

Cosic, J., Jurkovic, D., Vrandecic, K., Simic, B., 2006. Occurrence of *Fusarium* species isolated from winter wheat and barley grains in Croatia, Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-Product Protection, ABRAPOS, Passo Fundo, RS, Brazil, 15-18 October 2006, pp. 123-127.

Cromey, M.G., Shorter, S.C., Lauren, D.R., Sinclair, K.I., 2002. Cultivar and crop management influences on Fusarium head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand. N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 30, 235-247.

## D

De Wolf, E.D., Madden, L.V., Lipps, P.E., 2003. Risk assessment models for wheat Fusarium head blight epidemics based on within-season weather data. Phytopathology 93, 428-435.

Deacon, J.W., Berry, L.A., 1993. Biocontrol of soil-borne plant-pathogens - concepts and their application. Pestic. Sci. 37, 417-426.

Debaeke, P., 1995. Wheat response to supplementary irrigation in south-western France: II. A frequential approach using a simulation model. Agric. Mediterr. 125, 64-78.

Del Ponte, E.M., Fernandes, J.M.C., Bergstrom, G.C., 2007. Influence of growth stage on Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat. J. Phytopathol. 155, 577-581.

Desjardins, A.E., Proctor, R.H., 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. Int. J. Food Microbiol. 119, 47-50.

- Diamond, H., Cooke, B.M., 1999. Towards the development of a novel in vitro strategy for early screening of *Fusarium* ear blight resistance in adult winter wheat plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 363-372.
- Dill-Macky, R., Jones, R.K., 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 84, 71-76.
- Dodd, S.L., Hill, R.A., Stewart, A., 2004. A duplex-PCR bioassay to detect a *Trichoderma virens* biocontrol isolate in non-sterile soil. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1955-1965.
- Doll, S., Valenta, H., Danicke, S., Flachowsky, G., 2002. *Fusarium* mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany. *Landbauforsch. Volk.* 52, 91-96.
- Dong, Y.H., Steffenson, B.J., Mirocha, C.J., 2006. Analysis of ergosterol in single kernel and ground grain by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4121-4125.
- Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M., 2002. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals, Workshop on Agriculturally Important Toxigenic Fungi. Kluwer Academic Publ, Bari, Italy, pp. 755-768.
- Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M., 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 755-768.
- Dubournet, P., Gestat, T., Mailly, T., 2008. *Fusarium* Head Blight: Main conclusions of the Bayer Cropscience France monitoring, 3rd International Symposium on *Fusarium* Head Blight, Szeged, Hungary, pp. 703-706.
- Dufault, N.S., De Wolf, E.D., Lipps, P.E., Madden, L.V., 2006. Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Dis.* 90, 637-644.
- Duffy, B.K., Defago, G., 1997. Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* 87, 1250-1257.

## E

- Edel-Hermann, V., Dreumont, C., Perez-Piqueres, A., Steinberg, C., 2004. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 397-404.
- Edwards, S.G., 2009. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* 26, 496-506.

## F

- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51.
- FAO, 2011. Food Outlook Report - November 2011. FAO Trade and Markets Division, Rome.

- Feldman, M., Millet, E., 2001. The contribution of the discovery of wild emmer to an understanding of wheat evolution and domestication and to wheat improvement. *Isr. J. Plant Sci.* 49, S25-S35.
- Fernandez, M.R., Chen, Y., 2005. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Dis.* 89, 164-169.
- Fernandez, M.R., Huber, D., Basnyat, P., Zentner, R.P., 2008. Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil Tillage Res.* 100, 60-71.
- Fernandez, M.R., Turkington, T.K., May, W.E., 2009a. Effectiveness of fungicide seed treatments for preventing seed-to-seedling transmission of *Fusarium graminearum* under controlled-environment conditions. *Can. J. Plant Sci.* 89, 811-821.
- Fernandez, M.R., Ulrich, D., Brandt, S.A., Zentner, R.P., Wang, H., Thomas, A.G., Olfert, O., 2011. Crop management effects on root and crown rot of wheat in West-Central Saskatchewan, Canada. *Agron. J.* 103, 756-765.
- Fernandez, M.R., Zentner, R.P., Basnyat, P., Gehl, D., Selles, F., Huber, D., 2009b. Glyphosate associations with cereal diseases caused by *Fusarium* spp. in the Canadian Prairies. *Eur. J. Agron.* 31, 133-143.
- Finlay, R.D., 2007. The Fungi in soil, in: Elsas, J.D., Jansson, J., Trevors, J.T., (Ed.), *Modern Soil Microbiology*. CRC Press, New York, pp. 107-146.
- Franco, T.S., Garcia, S., Hirooka, E.Y., Ono, Y.S., dos Santos, J.S., 2011. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *J. Appl. Microbiol.* 111, 739-748.
- Frankland, J.C., 1998. Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycol. Res.* 102, 1-15.
- Friberg, H., Lagerlöf, J., Ramert, B., 2005. Influence of soil fauna on fungal plant pathogens in agricultural and horticultural systems. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 641-658.
- Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P., 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5409-5420.
- Fuchs, E., Binder, E.M., Heidler, D., Krska, R., 2002. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Addit. Contam.* 19, 379-386.

## G

- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113-118.
- Geiser, D.M., Jimenez-Gasco, M.D., Kang, S.C., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 473-479.

- Georgieva, S., Christensen, S., Petersen, H., Gjelstrup, P., Thorup-Kristensen, K., 2005a. Early decomposer assemblages of soil organisms in litterbags with vetch and rye roots. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1145-1155.
- Georgieva, S., Christensen, S., Stevnbak, K., 2005b. Nematode succession and microfauna-microorganism interactions during root residue decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1763-1774.
- Gilbert, J., Tekauz, A., 2000. Review: Recent developments in research on fusarium head blight of wheat in Canada. *Can. J. Plant Pathol.-Rev. Can. Phytopathol.* 22, 1-8.
- Glynn, N.C., Hare, M.C., Edwards, S.G., 2008. Fungicide seed treatment efficacy against *Microdochium nivale* and *M. majus* *in vitro* and *in vivo*. *Pest Manag. Sci.* 64, 793-799.
- Glynn, N.C., Ray, R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Parry, D.W., Barnett, C.J., Beck, J.J., 2007. Quantitative *Fusarium* spp. and *Microdochium* spp. PCR assays to evaluate seed treatments for the control of Fusarium seedling blight of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1645-1653.
- Golinski, P., Perkowski, J., Kostecki, M., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chekowski, J., 1996. *Fusarium* species and *Fusarium* toxins in wheat in Poland - a comparison with neighbour countries. *Sydowia* 48, 12-22.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515-525.
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K., 2007. Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1547-1553.
- Grabarkiewicz-Szczesna, J., Foremska, E., Golinski, P., 1996. Distribution of trichothecene mycotoxins in maize ears infected with *F. graminearum* and *F. crookwellense*. *Mycotoxin Res.* 12, 45-50.
- Gromadzka, K., Chelkowski, J., Popiel, D., Kachlicki, P., Kostecki, M., Golinski, P., 2009. Solid substrate bioassay to evaluate the effect of *Trichoderma* and *Clonostachys* on the production of zearalenone by *Fusarium* species. *World Mycotoxin J.* 2, 45-52.

## H

- Haigh, I.M., Jenkinson, P., Hare, M.C., 2009. The effect of a mixture of seed-borne *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivale* infection on Fusarium seedling blight severity and subsequent stem colonisation and growth of winter wheat in pot experiments. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 65-73.
- Hanson, K.G., Fernandez, M.R., 2003. Effect of glyphosate herbicides on *Pyrenophora tritici-repentis* and other cereal pathogens, Proceedings of Fourth International Wheat Tan Spot and Spot Blotch Workshop, Bemidji, Minnesota, USA, 21-24 July, 2002. Agricultural Experiment Station, North Dakota State University, pp. 128-131.



- Hare, M.C., Parry, D.W., Baker, M.D., 1999. The relationship between wheat seed weight, infection by *Fusarium culmorum* or *Microdochium nivale*, germination and seedling disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 859-866.
- Harvey, B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R., Genovese, K.J., Ziprin, R.L., Nisbet, D.J., 2002. Toxicity of fumonisin from *Fusarium verticillioides* culture material and moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material when fed singly and in combination to growing barrows. *J. Food Prot.* 65, 373-377.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R., Genovese, K.J., Nisbet, D.J., 2001. Toxicity of moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material to growing barrows. *J. Food Prot.* 64, 1780-1784.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R., Casper, H.H., Buckley, S.A., 1997. Moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material and deoxynivalenol from naturally contaminated wheat incorporated into diets of broiler chicks. *Avian Dis.* 41, 957-963.
- Hassan, Y.I., Bullerman, L.B., 2009. Wheat bran as an alternative substrate for macroconidia formation by some *Fusarium* species. *J. Microbiol. Methods* 77, 134-136.
- Hatsch, D., Phalip, V., Petkovski, E., Jeltsch, J.M., 2006. *Fusarium graminearum* on plant cell wall: No fewer than 30 xylanase genes transcribed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 959-966.
- Hattenschwiler, S., Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems, *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 191-218.
- He, J., Boland, G.J., Zhou, T., 2009. Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1805-1817.
- Henriksen, T.M., Breland, T.A., 2002. Carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities as affected by contact between crop residues and soil. *Biol. Fertil. Soils* 35, 41-48.
- Hope, R., Aldred, D., Magan, N., 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 295-300.
- Horevaj, P., Milus, E.A., Bluhm, B.H., 2011. A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels. *J. Appl. Microbiol.* 111, 396-406.
- Huber, D.M., Watson, R.D., 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12, 139-165.
- Hudec, K., 2006. Influence of seed treatment, temperature and origin of inocula on pathogenicity of *Fusarium* species to wheat and barley seedlings. *Cereal Res. Commun.* 34, 1059-1066.
- Hussein, H.M., Christensen, M.J., Baxter, M., 2003. Occurrence and distribution of *Fusarium* species in maize fields in New Zealand. *Mycopathologia* 156, 25-30.

**I**

Inch, S., Gilbert, J., 2003a. The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. *Can. J. Plant Pathol.-Rev. Can. Phytopathol.* 25, 379-383.

Inch, S.A., Gilbert, J., 2003b. Survival of *Gibberella zeae* in *Fusarium*-damaged wheat kernels. *Plant Dis.* 87, 282-287.

Ioos, R., Belhadj, A., Menez, M., 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158, 351-362.

Isebaert, S., De Saeger, S., Devreese, R., Verhoeven, R., Maene, P., Heremans, B., Haesaert, G., 2009. Mycotoxin-producing *Fusarium* species occurring in winter wheat in Belgium (Flanders) during 2002-2005. *J. Phytopathol.* 157, 108-116.

ITCF, 1999. Fusarioses des blés.

**J**

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., MATEILLE, T., Steinberg, C., 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol. Biochem.* 39, 1-23.

Jenczmionka, N.J., Schafer, W., 2005. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Curr. Genet.* 47, 29-36.

Jennings, P., Coates, M.E., Walsh, K., Turner, J.A., Nicholson, P., 2004. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathol.* 53, 643-652.

Jestoi, M., 2008. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin - A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 21-49.

Johnson, J.M.F., Barbour, N.W., Weyers, S.L., 2007. Chemical composition of crop biomass impacts its decomposition. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 155-162.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO Food and Nutrition Paper*, 701 pp.

Jones, R.K., 1999. Seedling blight development and control in spring wheat damaged by *Fusarium graminearum* group 2. *Plant Dis.* 83, 1013-1018.

Jouany, J.P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 342-362.

**K**

Kane, R.T., Smiley, R.W., 1987. Relative pathogenicity of selected *Fusarium* species and *Microdochium bolleyi* to winter wheat in New-York. *Plant Dis.* 71, 177-181.

- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., Wormald, P.J., 2006. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J. Microbiol. Methods* 65, 38-48.
- Keller, N., 2011. The fungal treasure chest: Spore origins? *Fungal Biol. Rev.* 25, 73-77.
- Khonga, E.B., Sutton, J.C., 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Plant Pathol.* 10, 232-239.
- Kikot, G.E., Hours, R.A., Alconada, T.M., 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J. Basic Microbiol.* 49, 231-241.
- Kikot, G.E., Hours, R.A., Alconada, T.M., 2010. Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 779-783.
- Kim, H.S., Lee, T., Dawlatana, M., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2003. Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol- and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycol. Res.* 107, 190-197.
- Kirkegaard, J.A., Sarwar, M., 1998. Biofumigation potential of brassicas - I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant Soil* 201, 71-89.
- Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W., Desmarchelier, J.M., 1996. In vitro suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathol.* 45, 593-603.
- Kjöller, A.H., Struwe, S., 2002. Fungal communities, succession, enzymes, and decomposition, in: Burns, R.G., Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 267-284.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2001. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1328-1333.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M., 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181-184.
- Klem, K., Vanova, M., Hajslova, J., Lancova, K., Sehnalova, M., 2007. A neural network model for prediction of deoxynivalenol content in wheat grain based on weather data and preceding crop. *Plant Soil Environ.* 53, 421-429.
- Klix, M.B., Verreet, J.A., Beyer, M., 2007. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Prot.* 26, 683-690.
- Koch, H.J., Pringas, C., Maerlaender, B., 2006. Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *Eur. J. Agron.* 24, 357-366.
- Kohl, J., de Haas, B.H., Kastelein, P., Burgers, S., Waalwijk, C., 2007. Population dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in crops and crop residues of winter wheat. *Phytopathology* 97, 971-978.
- Kokko, E.G., Conner, R.L., Lee, B., Kuzyk, A.D., Kozub, G.C., 2000. Quantification of common root rot symptoms in resistant and susceptible barley by image analysis. *Can. J. Plant Pathol.-Rev. Can. Phytopathol.* 22, 38-43.

Komada, H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Prot. Res. 8, 114-124.

Kumar, A., Cameron, J.B., Flynn, P.C., 2003. Biomass power cost and optimum plant size in western Canada. Biomass Bioenerg. 24, 445-464.

## L

Lacey, J., Bateman, G.L., Mirocha, C.J., 1999. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. Ann. Appl. Biol. 134, 277-283.

Landschoot, S., Audenaert, K., Waegeman, W., Pycke, B., Bekaert, B., De Baets, B., Haesaert, G., 2011. Connection between primary *Fusarium* inoculum on gramineous weeds, crop residues and soil samples and the final population on wheat ears in Flanders, Belgium. Crop Prot. 30, 1297-1305.

Larran, S., Perello, A., Simon, M.R., Moreno, V., 2007. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). World J. Microbiol. Biotechnol. 23, 565-572.

Lavelle, P., Spain, A.V., 2001. Soil ecology, Soil ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherlands.

Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Rottinghaus, G.E., Broomhead, J., Bennett, G.A., 1995. Effects of feeding *Fusarium fujikuroi* cultural material, containing known levels of moniliformin, in young broiler chicks. Poult. Sci. 74, 297-305.

Lemmens, M., Buerstmayr, H., Krska, R., Schuhmacher, R., Grausgruber, H., Ruckebauer, P., 2004a. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. Eur. J. Plant Pathol. 110, 299-308.

Lemmens, M., Haim, K., Lew, H., Ruckebauer, P., 2004b. The effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat. J. Phytopathol. 152, 1-8.

Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., Steinberg, C., 2012. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. Agron. Sustain. Dev. DOI 10.1007/s13593-012-0098-5.

Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Ames USA.

Leslie, J.F., Zeller, K.A., Lamprecht, S.C., Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from Sorghum and Millet. Phytopathology 95, 275-283.

Li, H.P., Wu, A.B., Zhao, C.S., Scholten, O., Loffler, H., Liao, Y.C., 2005. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiol. Lett. 243, 505-511.

- Li, X., Zhang, J.B., Song, B., Li, H.P., Xu, H.Q., Qu, B., Dang, F.J., Liao, Y.C., 2010. Resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat is associated with activation of a cytochrome P450 gene. *Phytopathology* 100, 183-191.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A., Cammue, B.P.A., Thomma, B., 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Sci.* 171, 155-165.
- Lievens, B., Grauwet, T.J.M.A., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J., 2005. Recent developments in diagnostics of plant pathogens: a review, *Recent Research Developments in Microbiology*, Vol. 9, Part I, pp. 57-79.
- Lindahl, B.D., Finlay, R.D., 2006. Activities of chitinolytic enzymes during primary and secondary colonization of wood by basidiomycetous fungi. *New Phytol.* 169, 389-397.
- Lloveras, J., Manent, J., Viudas, J., Lopez, A., Santiveri, P., 2004. Seeding rate influence on yield and yield components of irrigated winter wheat in a Mediterranean climate. *Agron. J.* 96, 1258-1265.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G., 2002. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops, *Workshop on Agriculturally Important Toxigenic Fungi*. Kluwer Academic Publ, Bari, Italy, pp. 645-667.
- Logrieco, A., Vesonder, R.F., Peterson, S.W., Bottalico, A., 1991. Reexamination of the taxonomic disposition of, and deoxynivalenol production by *Fusarium nivale* NRRL 3289. *Mycologia* 83, 367-370.
- Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meekes, E., De Haas, L., Van der Plas, C.L., Kohl, J., 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 229-242.
- Luscier, J.D., Thompson, W.L., Wilson, J.M., Gorham, B.E., Dragut, L.D., 2006. Using digital photographs and object-based image analysis to estimate percent ground cover in vegetation plots. *Front. Ecol. Environ.* 4, 408-413.
- Lutz, M.P., Feichtinger, G., Defago, G., Duffy, B., 2003. Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3077-3084.

## M

- Macia-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Abdullah, S.K., Descals, E., Salinas, J., Lopez-Llorca, L.V., 2008. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 90-105.
- Magan, N., Lynch, J.M., 1986. Water potential, growth and cellulolysis of fungi involved in decomposition of cereal residues. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1181-1187.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D., 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol.* 60, 150-163.

- Maiorano, A., Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., 2008. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot.* 27, 182-188.
- Malhi, S.S.M.S.S., Nyborg, M., Goddard, T., Puurveen, D., 2011. Long-term tillage, straw and N rate effects on quantity and quality of organic C and N in a Gray Luvisol soil. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 90, 1-20.
- Mantle, P.G., Shaw, S., Doling, D.A., 1977. Role of weed grasses in etiology of ergot disease in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 86, 339-&.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2354-2359.
- Martin, D.P., Willment, J.A., Rybicki, E.P., 1999. Evaluation of maize streak virus pathogenicity in differentially resistant *Zea mays* genotypes. *Phytopathology* 89, 695-700.
- Maurin, N., Saur, L., Capron, G., 1996. Stem and head reaction of winter wheat cultivars to artificial inoculation by *Microdochium nivale* under controlled environment and field conditions. *Euphytica* 92, 359-366.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A., Ward, E., 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.* 59, 129-142.
- McMullen, M., Jones, R., Gallenberg, D., 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81, 1340-1348.
- Meister, U., 2009. *Fusarium* toxins in cereals of integrated and organic cultivation from the Federal State of Brandenburg (Germany) harvested in the years 2000-2007. *Mycotoxin Res.* 25, 133-139.
- Mennitti, A.M., Pancaldi, D., Maccaferri, M., Casalini, L., 2003. Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 109-115.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2011. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 519-528.
- Mesterhazy, A., Bartok, T., Kaszonyi, G., Varga, M., Toth, B., Varga, J., 2005. Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 267-281.
- Mesterhazy, A., Bartok, T., Mirocha, C.G., Komoroczy, R., 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed.* 118, 97-110.
- Mesterhazy, A., Toth, B., Szabo-Hever, A., Varga, J., Lehoczki-Krsjak, S., 2008. Node infection caused by *Fusarium graminearum* in wheat. *Cereal Res. Commun.* 36, 471-475.
- Meyer, G.E., Neto, J.C., Jones, D.D., Hindman, T.W., 2004. Intensified fuzzy clusters for classifying plant, soil, and residue regions of interest from color images. *Comput. Electron. Agric.* 42, 161-180.

- Miedaner, T., Klocke, B., Flath, K., Geiger, H.H., Weber, W.E., 2011. Diversity, spatial variation, and temporal dynamics of virulences in the German leaf rust (*Puccinia recondita* f. *sp secalis*) population in winter rye. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 23-35.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Lauber, U., Schollenberger, M., Geiger, H.H., 2001. Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed.* 120, 97-105.
- Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H., 2004. Competition effects among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 63-70.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and human well-being: synthesis.* Island Press, USA Washington.
- Miu, P.I., Kutzbach, H.D., 2008a. Modeling and simulation of grain threshing and separation in axial threshing units - Part II. Application to tangential feeding. *Comput. Electron. Agric.* 60, 105-109.
- Miu, P.I., Kutzbach, H.D., 2008b. Modeling and simulation of grain threshing and separation in threshing units - Part I. *Comput. Electron. Agric.* 60, 96-104.
- Mongrain, D., Couture, L., Comeau, A., 2000. Natural occurrence of *Fusarium graminearum* on adult wheat midge and transmission to wheat spikes. *Cereal Res. Commun.* 28, 173-180.
- Mongrain, D., Couture, L., Dubuc, J.P., Comeau, A., 1997. Occurrence of the orange wheat blossom midge [Diptera: *Cecidomyiidae*] in Quebec and its incidence on wheat grain microflora. *Phytoprotection* 78, 17-22.
- Moody, S.A., Pearce, T.G., Dighton, J., 1996. Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. *Soil Biol. Biochem.* 28, 533-537.
- Moore, D.D., 2005. Mycotoxins in straw used in Australian deep-litter pig housing systems, Manipulating pig production X. Proceedings of the Tenth Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association, p. 251.
- Morel, R., 1996. *Cultivated soils; Les sols cultivés - Technique et documentation -*. second ed., Lavoisier, Paris.
- Morra, M.J., Kirkegaard, J.A., 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1683-1690.
- Muller, M.E.H., Brenning, A., Verch, G., Koszinski, S., Sommer, M., 2010. Multifactorial spatial analysis of mycotoxin contamination of winter wheat at the field and landscape scale. *Agric. Ecosyst. Environ.* 139, 245-254.

## N

- Naef, A., Defago, G., 2006. Population structure of plant-pathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt-transformed and non-transformed maize crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 116, 129-143.

- Naef, A., Senatore, M., Defago, G., 2006. A microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 211-220.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, USA.
- Neuhof, T., Koch, M., Rasenko, T., Nehls, I., 2008. Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat harvest lot. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7566-7571.
- Nganje, I.B., Bangsund, D.A., Leistriz, F.L., Wilson, W.W., Tiapo, N.M., 2002. Estimating the economic impact of crop disease: the case of *Fusarium* head blight in U.S. wheat and barley, 2002 National Fusarium Head Blight Forum, East Lansing: Michigan State University, pp. 275-281.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W., Joyce, D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 17-37.
- Nicolardot, B., Bouziri, L., Bastian, F., Ranjard, L., 2007. A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1631-1644.
- Nicolardot, B., Recous, S., Mary, B., 2001. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C : N ratio of the residues. *Plant Soil* 228, 83-103.
- Nielsen, L.K., Jensen, J.D., Nielsen, G.C., Jensen, J.E., Spliid, N.H., Thomsen, I.K., Justesen, A.F., Collinge, D.B., Jorgensen, L.N., 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* 101, 960-969.
- Nik, M.A.E., Khademolhosseini, N., Abbaspour-Fard, M.H., Mahdinia, A., Alami-Saied, K., 2009. Optimum utilisation of low-capacity combine harvesters in high-yielding wheat farms using multi-criteria decision making. *Biosyst. Eng.* 103, 382-388.

## O

- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2044-2049.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjornstad, A., Klemsdal, S.S., 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1514-1522.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal



recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet. Biol. 41, 600-623.

Oerke, E.C., Meier, A., Dehne, H.W., Sulyok, M., Krska, R., Steiner, U., 2010. Spatial variability of fusarium head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. Plant Pathol. 59, 671-682.

Ok, H.E., Choi, S.W., Chang, H.J., Chung, M.S., Chun, H.S., 2011. Occurrence of five 8-ketotrichothecene mycotoxins in organically and conventionally produced cereals collected in Korea. Food Control 22, 1647-1652.

Oldenburg, E., Kramer, S., Schrader, S., Weinert, J., 2008. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* on the degradation of *Fusarium*-infected and deoxynivalenol-contaminated wheat straw. Soil Biol. Biochem. 40, 3049-3053.

ONIGC, 2008. Bourgogne Franche-Comté Filière grandes cultures.

Osborne, L.E., Stein, J.M., 2007. Epidemiology of Fusarium head blight on small-grain cereals, Workshop on Mycotoxins from the Field to the Table. Elsevier Science Bv, Omaha, NE, pp. 103-108.

Ozturk, A., Caglar, O., Bulut, S., 2006. Growth and yield response of facultative wheat to winter sowing, freezing sowing and spring sowing at different seeding rates. J. Agron. Crop Sci. 192, 10-16.

## P

Panneton, B., Brouillard, M., 2009. Colour representation methods for segmentation of vegetation in photographs. Biosyst. Eng. 102, 365-378.

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

Pascault, N., Cecillon, L., Mathieu, O., Henault, C., Sarr, A., Leveque, J., Farcy, P., Ranjard, L., Maron, P.A., 2010. *In situ* dynamics of microbial communities during decomposition of wheat, rape, and alfalfa residues. Microb. Ecol. 60, 816-828.

Paul, P.A., El-Allaf, S.M., Lipps, P.E., Madden, L.V., 2004. Rain splash dispersal of *Gibberella zeae* within wheat canopies in Ohio. Phytopathology 94, 1342-1349.

Paul, P.A., Lipps, P.E., Madden, L.V., 2005. Relationship between visual estimates of Fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: A meta-analysis. Phytopathology 95, 1225-1236.

Peraldi, A., Beccari, G., Steed, A., Nicholson, P., 2011. *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. BMC Plant Biol. 11, 14.

Pereyra, S.A., Dill-Macky, R., 2005. Colonization and inoculum production of *Gibberella zeae* in components of wheat residue. Cereal Res. Commun. 33, 755-762.

- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R., 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. *Plant Dis.* 92, 800-807.
- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R., Sims, A.L., 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Dis.* 88, 724-730.
- Perez, C., Dill-Macky, R., Kinkel, L.L., 2008. Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. *Plant Soil* 302, 53-69.
- Perkowski, J., Chekowski, J., 1991. Deoxynivalenol content dependence on kernel size in wheat grain naturally infected by *Fusarium*. *Microbiol. Aliments Nutr.* 9, 217-221.
- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 84, 663-679.
- Peters, R.D., Sturz, A.V., Carter, M.R., Sanderson, J.B., 2003. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil Tillage Res.* 72, 181-192.
- Pettitt, T., Xu, X.M., Parry, D., 2002. Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex, Workshop on Agriculturally Important Toxigenic Fungi. Kluwer Academic Publ, Bari, Italy, pp. 769-774.
- Pettitt, T.R., Parry, D.W., Polley, R.W., 1996. Effect of temperature on the incidence of nodal foot rot symptoms in winter wheat crops in England and Wales caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale*. *Agric. For. Meteorol.* 79, 233-242.
- Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorsselaer, A., Jeltsch, J.M., 2005. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr. Genet.* 48, 366-379.
- Pianka, E., 1970. On r- and K-selection. *Am. Nat.* 104, 592-597.
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P., 2003. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals, Workshop on Agriculturally Important Toxigenic Fungi. Kluwer Academic Publ, Bari, Italy, pp. 731-742.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 21-37.
- Ponge, J.F., 2005. Fungal communities: relation to resource succession, in: Dighton, J., White, J.F., Oudemans, P. (Ed.), *The Fungal Community: its organisation and role in the ecosystem*. Taylor & Francis, New York, pp. 169-180.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.N., Barreau, C., Richard-Forget, F., 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 102-107.
- Postic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Jurkovic, D., Saleh, A.A., Leslie, J.F., 2012. Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. *J. Phytopathol.* 160, 76-81.

Providenti, M.A., Mautner, S.I., Chaudhry, O., Bombardier, M., Scroggins, R., Gregorich, E., Smith, M.L., 2004. Determining the environmental fate of a filamentous fungus, *Trichoderma reesei*, in laboratory-contained intact soil-core microcosms using competitive PCR and viability plating. *Can. J. Microbiol.* 50, 623-631.

## Q

Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Logrieco, A., Mule, G., Visconti, A., 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 7-13.

## R

Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Prot.* 23, 117-125.

Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 291-296.

Rangkadilok, N., Nicolas, M.E., Bennett, R.N., Premier, R.R., Eagling, D.R., Taylor, P.W.J., 2002a. Determination of sinigrin and glucoraphanin in *Brassica* species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. *Sci. Hortic.* 96, 27-41.

Rangkadilok, N., Nicolas, M.E., Bennett, R.N., Premier, R.R., Eagling, D.R., Taylor, P.W.J., 2002b. Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Sci. Hortic.* 96, 11-26.

Rasmussen, J., Norremark, M., Bibby, B.M., 2007. Assessment of leaf cover and crop soil cover in weed harrowing research using digital images. *Weed Res.* 47, 299-310.

Richardson, M.D., Karcher, D.E., Hignight, K., Rush, D., 2008. Drought tolerance and rooting capacity of Kentucky bluegrass cultivars. *Crop Sci.* 48, 2429-2436.

## S

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., 1998. Biofumigation potential of brassicas - II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant Soil* 201, 91-101.

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W., Desmarchelier, J.M., 1998. Biofumigation potential of brassicas - III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant Soil* 201, 103-112.

Scarlat, N., Blujdea, V., Dallemand, J.F., 2011. Assessment of the availability of agricultural and forest residues for bioenergy production in Romania. *Biomass Bioenerg.* 35, 1995-2005.

- Schaafsma, A.W., Hooker, D.C., 2007. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 116-125.
- Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilincic, L., 2005. Effect of seeding rate and seed treatment fungicides on agronomic performance, *Fusarium* head blight symptoms, and DON accumulation in two winter wheats. *Plant Dis.* 89, 1109-1113.
- Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilincic, L., Hooker, D.C., 2005. Effect of previous crop, tillage, field size, adjacent crop, and sampling direction on airborne propagules of *Gibberella zeae/Fusarium graminearum*, *Fusarium* head blight severity, and deoxynivalenol accumulation in winter wheat. *Can. J. Plant Pathol.-Rev. Can. Phytopathol.* 27, 217-224.
- Schrader, S., Kramer, S., Oldenburg, E., Weinert, J., 2009. Uptake of deoxynivalenol by earthworms from *Fusarium*-infected wheat straw. *Mycotoxin Res.* 25, 53-58.
- Scott, P.M., 1988. Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 70-76.
- Shaner, G., 2003. Epidemiology of *Fusarium* head blight of small grain cereals in North America, *Fusarium* head blight of wheat and barley, pp. 84-119.
- Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P., 2004. Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environ. Microbiol.* 6, 79-87.
- Singh, D.P., Backhouse, D., Kristiansen, P., 2009. Interactions of temperature and water potential in displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal residues by fungal antagonists. *Biol. Control* 48, 188-195.
- Sinsabaugh, R.L., 2005. Fungal enzymes at the community scale, in: Dighton, J., White, J.F., Oudemans, P. (Ed.), *The Fungal Community: its organisation and role in the ecosystem*. Taylor & Francis, New York, pp. 349-360.
- Siuda, R., Grabowski, A., Lenc, L., Ralcewicz, M., Spychaj-Fabisiak, E., 2010. Influence of the degree of fusariosis on technological traits of wheat grain. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 2596-2604.
- Skaloudova, B., Krivan, V., Zemek, R., 2006. Computer-assisted estimation of leaf damage caused by spider mites. *Comput. Electron. Agric.* 53, 81-91.
- Slageren, M.W.S.J.M.v., 1994. *Wild wheats: A monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae) : a revision of all taxa closely related to wheat, excluding wild Triticum species, with notes on other genera in the tribe Triticeae, especially Triticum*. Wageningen Agricultural University Wageningen, The Netherlands and Aleppo, Syria.
- Smiley, R.W., Collins, H.P., Rasmussen, P.E., 1996. Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendleton, Oregon. *Plant Dis.* 80, 813-820.
- Smiley, R.W., Gourlie, J.A., Easley, S.A., Patterson, L.M., 2005. Pathogenicity of fungi associated with the wheat crown rot complex in Oregon and Washington. *Plant Dis.* 89, 949-957.
- Steinkellner, S., Langer, I., 2004. Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant Soil* 267, 13-22.

Stromberg, M.E., 2005. Fungal communities of Agroecosystems, in: Dighton, J., White, J.F., Oudemans, P. (Ed.), *The Fungal Community: its organisation and role in the ecosystem*. Taylor & Francis, New York, pp. 813-822.

Summerell, B.A., Burgess, L.W., Klein, T.A., Pattison, A.B., 1990. Stubble management and the site of penetration of wheat by *Fusarium graminearum* group-1. *Phytopathology* 80, 877-879.

Sutton, J.C., 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.-Rev. Can. Phytopathol.* 4, 195-209.

Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. Blackwell Scientific Publications., Oxford UK.

## T

Talas, F., Parzies, H.K., Miedaner, T., 2011. Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum sensu stricto* populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 39-48.

Teich, A.H., 1989. Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp., in: Chelkowski, J. (Ed.), *Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam Netherlands, pp. 269-282.

Teich, A.H., Hamilton, J.R., 1985. Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1429-1431.

Thirup, L., Johnsen, K., Torsvik, V., Spliid, N.H., Jacobsen, C.S., 2001. Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1517-1524.

Thompson, D.P., Metevia, L., Vessel, T., 1993. Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *J. Food Prot.* 56, 134-138.

Timmermans, B.G.H., Osman, A.M., Van der Burgt, G.H.M., 2009. Differences between spring wheat cultivars in tolerance to *Fusarium* seedling blight under organic field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 377-386.

Tomczak, M., Wisniewska, H., Stepień, L., Kostecki, M., Chelkowski, J., Golinski, P., 2002. Deoxynivalenol, nivalenol and moniliformin in wheat samples with head blight (scab) symptoms in Poland (1998-2000). *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 625-630.

Tourova, T.P., 2003. Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses. *Microbiology* 72, 389-402.

Toyota, K., Young, I.M., Ritz, K., 1996. Effects of soil matric potential and bulk density on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Soil Biol. Biochem.* 28, 1139-1145.

Trail, F., 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol.* 149, 103-110.

Trail, F., Xu, J.R., San Miguel, P., Halgren, R.G., Kistler, H.C., 2003. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). Fungal Genet. Biol. 38, 187-197.

Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Lineres, M., Cheneby, D., Nicolardot, B., 2000. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. Soil Sci. Soc. Am. J. 64, 918-926.

Tschanz, A.T., Horst, R.K., Nelson, P.E., 1976. Effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. Mycologia 68, 327-340.

## V

Valerio, I.P., de Carvalho, F.I.F., de Oliveira, A.C., Benin, G., de Souza, V.Q., Machado, A.D., Bertan, I., Busato, C.C., da Silveira, G., Fonseca, D.A.R., 2009. Seeding density in wheat genotypes as function of tillering potential. Sci. Agric. 66, 28-39.

Van den Brink, J., de Vries, R.P., 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91, 1477-1492.

Vaneeuwijk, F.A., Mesterhazy, A., Kling, C.I., Ruckenbauer, P., Saur, L., Burstmayr, H., Lemmens, M., Keizer, L.C.P., Maurin, N., Snijders, C.H.A., 1995. Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with european strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. Theor. Appl. Genet. 90, 221-228.

Velluti, A., Marin, S., Bettucci, L., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B-1 and zearalenone formation. Int. J. Food Microbiol. 59, 59-66.

Vilain, M., 1989. Plant production volume 2. La production végétale. Volume 2 - La maîtrise technique de la production. Lavoisier, Paris.

Vizhanyo, T., Felfoldi, J., 2000. Enhancing colour differences in images of diseased mushrooms. Comput. Electron. Agric. 26, 187-198.

## W

Wang, H., Hwang, S.F., Eudes, F., Chang, K.F., Howard, R.J., Turnbull, G.D., 2006. Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. Plant Pathol. 55, 224-230.

Wanjiru, W.M., Kang, Z.S., Buchenauer, H., 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. Eur. J. Plant Pathol. 108, 803-810.

Weaver, M., Vedenyapina, E., Kenerley, C.M., 2005. Fitness, persistence, and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms. Appl. Soil Ecol. 29, 125-134.

- Weber, R., Hrynczuk, B., Runowska-Hrynczuk, B., Kita, W., 2001. Influence of the mode of tillage on diseases of culm base in some winter wheat varieties, oats and spring wheat. *J. Phytopathol.-Phytopathol. Z.* 149, 185-188.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309-+.
- White, T.J., Bruns, T., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, pp. 315-322.
- Wiles, L.J., 2011. Software to quantify and map vegetative cover in fallow fields for weed management decisions. *Comput. Electron. Agric.* 78, 106-115.
- Willoquet, L., Aubertot, J.N., Lebard, S., Robert, C., Lannou, C., Savary, S., 2008. Simulating multiple pest damage in varying winter wheat production situations. *Field Crops Res.* 107, 12-28.
- Wisniewska, H., Busko, M., 2005. Evaluation of spring wheat resistance to *Fusarium* seedling blight and head blight. *Biologia* 60, 287-293.

## X

- Xi, K., Turkington, T.K., Chen, M.H., 2008. Systemic stem infection by *Fusarium* species in barley and wheat. *Can. J. Plant Pathol.-Rev. Can. Phytopathol.* 30, 588-594.
- Xu, X.M., Monger, W., Ritieni, A., Nicholson, P., 2007. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 56, 943-956.
- Xu, X.M., Nicholson, P., 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 83-103.
- Xu, X.M., Nicholson, P., Ritieni, A., 2006. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation, *Workshop on Mycotoxins from the Field to the Table*. Elsevier Science Bv, Omaha, NE, pp. 67-71.
- Xu, X.M., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mule, G., Homok, L., Beki, E., Tatnell, J., Ritieni, A., Edwards, S.G., 2008. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* 98, 69-78.

## Y

- Yi, C.L., Kaul, H.P., Kubler, E., Aufhammer, W., 2002. Populations of *Fusarium graminearum* on crop residues as affected by incorporation depth, nitrogen and fungicide application. *Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.* 109, 252-263.

Yli-Mattila, T., 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *J. Plant Pathol.* 92, 7-18.

Yoshida, M., Nakajima, T., 2010. Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology* 100, 763-773.

Yuen, G.Y., Schoneweis, S.D., 2007. Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 126-130.

## Z

Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14, 415-421.

Zhang, Y.P., Zhang, Y.H., Wang, Z.M., Wang, Z.J., 2011. Characteristics of canopy structure and contributions of non-leaf organs to yield in winter wheat under different irrigated conditions. *Field Crop. Res.* 123, 187-195.





*« Oui je suis fou.*

*Mais le jour où je ne m'en rendrai plus compte,*

*alors je serai vraiment malade. »*