



Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien

Dorothée Siou

► To cite this version:

Dorothée Siou. Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112005 . tel-00849969

HAL Id: tel-00849969

<https://theses.hal.science/tel-00849969>

Submitted on 2 Aug 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 PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL :
DU GÈNE À L'ÉCOSYSTÈME

THÈSE

présentée le 14 janvier 2013 par

Dorothée SIOU

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

DISCIPLINE : **BIOLOGIE**

**DEVELOPPEMENT EPIDEMIQUE DE LA
FUSARIOSE DES EPIS DE BLE ET
CONSEQUENCES DES INTERACTIONS
ENTRE ESPECES DU COMPLEXE FUSARIEN**



A. Picot

Membres du jury :

Thierry LANGIN	Directeur de recherche, CNRS, INRA, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Christian BARREAU	Chargé de recherche, CNRS, INRA, Bordeaux	Rapporteur
Marie DUFRESNE	Maître de conférences, IBP, Orsay	Examinatrice
Robert CANALES	Responsable technique fongicides céréales, Bayer CS, Lyon	Examineur
Michel DRON	Professeur, IBP, Orsay	Examineur
Christian LANNOU	Directeur de recherche, INRA, Grignon	Directeur de thèse

Cette thèse ayant bénéficié d'un financement Cifre, j'adresse tous mes remerciements à l'entreprise Bayer CropScience partenaire de l'INRA dans ce projet. Je les remercie également pour nous avoir laissés libres dans notre démarche scientifique mais aussi dans les communications et la rédaction de la thèse.

Je remercie Florence Forget et Anne-Sophie Walker pour nous avoir fourni des souches de *Fusarium* et *Microdochium* ainsi que Marie Dufresne pour son aide méthodologique sur la sporulation des souches et sur les inoculations ponctuelles.

Je remercie enfin la région Ile de France pour leur contribution financière à l'achat de l'UPLC.

Remerciements

Alors que je m'attelle à la rédaction de ces dernières pages, de nombreuses personnes me viennent à l'esprit. Certains noms seront cités, mais pas tous. Je m'excuse d'avance pour les personnes que je n'aurais pas eues la délicatesse de citer.

Je tiens à remercier en tout premier lieu Christian Lannou pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et suivie pendant ces années. Je le remercie également pour la pertinence et la qualité de ses remarques, ses corrections et ses conseils. Ses qualités en tant qu'encadrant ont largement participé au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie Gaëlle Curé, Patrice Dubournet et Robert Canalès de Bayer CropScience pour m'avoir suivie, pour les échanges que nous avons eus toujours très productifs, pour leur convivialité mais aussi pour m'avoir donné la possibilité de participer à leur Université chaque année.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur de leur présence et de leurs critiques. Merci donc à Christian Barreau, Thierry Langin, Marie Dufresne, Michel Dron et Robert Canalès.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Marie Dufresne, Renaud Ioos, Florence Forget et Maxime Trottet, pour leurs nombreux conseils et les discussions riches et productives que nous avons eues et qui ont enrichi ce travail.

Je remercie Sandrine Gélisse qui m'a encadrée et qui m'a aidée tout au long de ma thèse, mais aussi qui a apporté de la bonne humeur dans nos divers travaux. Je la remercie pour m'avoir soutenue et plus particulièrement ces dernières semaines et pour avoir toujours été disponible et à l'écoute de mes requêtes, mes doutes et mes doléances.

Un grand merci aussi à Valérie Laval, qui m'a beaucoup apporté dans la maîtrise des outils de biologie moléculaire. Je la remercie aussi pour ses qualités humaines et pour les échanges que nous avons eus tant professionnels que personnels même s'ils se sont faits plus rares durant cette dernière année.

Je remercie Cédric Repinçay de l'unité PESSAC pour le temps qu'il m'a consacré pour les mises au point de biochimie et pour avoir rendu ces nombreuses heures passées devant l'UPLC plus agréables et moins rébarbatives.

Un grand merci à Jocelyne Bach, Marjolaine Deschamps et Nathalie Bernet pour leur soutien technique en biochimie et pour avoir toujours été disponibles pour répondre à mes questions et résoudre mes problèmes...

Je tiens également à remercier Fred pour m'avoir consacré du temps et pour avoir participé activement à la rédaction de mes articles.

Une petite pensée particulière à Ivan pour son soutien, ses nombreux conseils, ses questions et discussions et surtout son pull absorbant...

Ce travail de thèse n'aurait pu se faire sans une aide conséquente pour les expérimentations. Merci donc à Martin pour ces heures passées en serre à compter des épillets. Je tiens à remercier tout particulièrement Béatrice qui, avec toute ma confiance, a su développer les compétences nécessaires au traitement et à la gestion de mes échantillons, de l'égrainage au broyage en passant par les pesées, pendant des heures entières et malgré des échantillons difficiles, avec toujours de l'entrain et l'envie de mener à bien ces tâches difficiles. Pour toutes ces heures de travail acharné, je leur en suis infiniment reconnaissante.

Je tenais également faire un petit clin d'œil tout particulier à mes potes de bureau qui vont bien me manquer, David, Clémentine, Martin, Sajid, Gustavo et Alexis. Je tiens à tous les remercier pour leur gaieté, leur humour et leur amitié et je leur souhaite le meilleur (même pour les thésards pour qui le pire reste à venir...) tant professionnel que privé. Sans eux, rien n'aurait été pareil, MERCI !

Il faut savoir que la cantine de Grignon n'est pas un des plus grands restaurants gastronomiques de la région. Pour cela, nous sommes quelques uns à avoir abandonné cette cuisine contre la gamelle tupperware, faisant de notre cafet' un endroit de papote bien agréable le midi et indispensable pour se détendre et penser à autre chose. Je tiens donc à remercier tous mes collègues de papote du midi pour avoir fait de cette pause quotidienne un vrai moment de détente et de partage ! Merci, merci et merci !

La gym du mardi et du vendredi a également été pour moi un réel moment de détente indispensable pour évacuer le stress. Un grand merci donc à Nadine qui a largement contribué à mon bien être mais aussi à mes collègues de gym indispensables à la motivation du groupe !

Je suis également reconnaissante envers tous les membres de l'équipe « Epidémiologie », à savoir Anne-Catherine, Christian, Claude, Fred, Ghislain, Gusatvo, Henriette, Ivan, Julie, Laurent, Lucette, Marc, Nathalie, Nicolas, Sajid et Sandrine qui m'ont tout de suite intégrée dans l'équipe, avec qui j'ai eu de nombreux échanges et qui ont toujours été là pour me soutenir et m'apporter de l'aide si nécessaire. Une petite pensée également pour Adeline qui a commencé les travaux sur la fusariose avant moi dans l'équipe et qui a été un exemple à suivre pour l'écriture de ma thèse.

Bioger est un environnement très agréable pour travailler mais aussi par la multitude de personnes accueillantes et prêtes à rendre service que l'on peut rencontrer. Ils ont partagé mon quotidien et ont participé activement à la bonne humeur et la bonne ambiance de travail (même dans les temps difficiles...). Merci aussi à l'équipe administrative pour m'avoir aidé dans les démarches et toujours trouvé les sous pour mes dépenses). Mon travail s'est nourri de ces échanges avec mes collègues et ont fait de ma thèse une expérience riche tant sur le point professionnel que personnel et relationnel.

Il me reste encore à remercier mes amis pour avoir été là sans me voir et pour être toujours là encore après... Mes coupines, Nana, Clairon et Cécé, ma petite Geneviève et tous les copains de prépas et les autres en espérant que nos emplois du temps vont se libérer pour se voir et faire la fête !

Ce manuscrit symbolise la fin d'une période de ma vie. Je n'aurais pu parcourir ce chemin sans le soutien, l'écoute et les encouragements de ma famille, ma sœur et ma nièce, mes cousines et cousins, mes tatas et tontons, mes papis et mamies, toutes les pièces rapportées mais aussi ma belle-famille et mon fillot qui sont la structure de ma vie. Et je remercie surtout mes parents qui m'ont gardé dans leur cocon ces trois dernières années et surtout ma maman qui m'a préparé ma gamelle et fait mon lit tous les jours... Je fais aussi une caresse à mes boules de poil préférées (Gribouille et Quenny) qui sont toujours venus me faire des câlins et des ronrons même les jours de mauvais poil...

Enfin, il me reste à remercier ma moitié, mon pilier, celui qui m'a supportée ces 11 dernières années, qui a papoté de fusa (et surtout écouté...) pendant des heures et qui a même lu et corrigé ma thèse. Un grand merci donc à mon chéri en espérant que les prochaines années soient aussi bonnes que les dernières...

MERCI À TOUS !!!!!

Publications et communications scientifiques

Publications à comité de lecture

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Suffert F, Lannou C. Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation. Article soumis pour publication dans *Plant Pathology*.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Bourdat-Deschamps M, Suffert F, Lannou C. Species Interactions in *Fusarium* complex: Consequences on disease development and toxins production. En préparation pour publication dans *Applied and Environmental Microbiology*.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Lannou C. Interactions among species of the FHB complex in a wheat spike. En préparation pour publication dans *Applied and Environmental Microbiology*.

Communication à des congrès

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, C. Lannou. *Communication orale*) Fusariose du blé et production de toxines : rôle de la composante épidémiologique. 8^{èmes} rencontres de phytopathologie - mycologie, 16 – 20 janvier 2010, Aussois, France.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Lannou C. *Communication orale* Atelier Fongipro : comprendre et lutter contre les fusarioses. Université Bayer, 10 février 2011, Marne-la-Vallée, France.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Lannou C. *Communication orale* Atelier Fongipro : Epidémiologie de la fusariose. Université Bayer, 9 février 2012, Marne-la-Vallée, France.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Lannou C. *Poster* Interactions au sein du complexe fusarien : Conséquences sur le développement des champignons et leur production de toxines. Congrès de la Société Française de Phytopathologie, 5 - 8 juin 2012, Paris, France.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Lannou C. *Poster* Interactions au sein du complexe fusarien : Conséquences sur le développement des champignons et leur production de toxines. 4^{èmes} journées des doctorants SPE, 20 – 22 Juin 2012, Toulouse, France.

Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Lannou C. *Communication orale* Species Interactions in *Fusarium* complex: Consequences on disease development and toxins production. 4th International Symposium on *Fusarium* Head Blight, 23 – 26 août 2012, Nanjing, Chine.

Tables des matières

Introduction générale et contexte bibliographique

Introduction -----	1
I. Le blé -----	3
1. Les Caractéristiques botaniques -----	3
2. Le Cycle végétatif du blé -----	4
3. Les débouchés -----	6
II. La fusariose -----	6
1. Le complexe fusarien -----	9
2. Le cycle de vie -----	11
3. Conditions favorables au développement de la maladie -----	16
III. Les mycotoxines -----	20
1. Généralités -----	20
2. Le rôle des toxines -----	22
3. La réglementation -----	23
IV. Impacts agro-économiques -----	24
1. Un impact économique flagrant -----	24
2. Une lutte difficile -----	24
Objectifs de la thèse -----	28
Références -----	28

Chapitre 1

Introduction -----	35
I. Caractérisation des souches -----	37
1. Caractérisation des souches et mesure de leurs traits de vie -----	37
2. Mesure des variables de sévérité -----	41
II. Liens entre caractéristiques et traits de vie et mesures de sévérité -----	47
1. Effet souche et espèce -----	47
2. Effet chémotype -----	49
3. Lien entre potentiel toxinogène et toxines produites dans l'épi -----	511
4. Lien entre vitesse de croissance et sporulation et sévérité mesurée sur épi et grains -----	511
III. Corrélations entre variables de sévérité -----	54
1. Corrélations entre les différentes variables de sévérité -----	54
2. Classement des souches -----	56

Conclusion -----	58
Références -----	59

Chapitre 2

Effect of wheat spike infection timing on <i>Fusarium</i> head blight development and mycotoxin accumulation -----	64
--	----

Chapitre 3

Species interactions in <i>Fusarium</i> complex: Consequences on disease development and toxins production -----	94
--	----

Chapitre 4

Interactions among species of the FHB complex in a wheat spike -----	126
--	-----

Discussion générale -----	147
---------------------------	-----

Perspectives -----	153
--------------------	-----

Annexes -----	153
---------------	-----

Références bibliographiques -----	15371
-----------------------------------	-------

Liste des figures et tableaux

Figures

Introduction générale et contexte bibliographique

Figure 1 : Schéma illustrant le cycle de développement du blé.

Figure 2 : Photographies des principales maladies des épis et feuilles du blé tendre d'hiver et du blé dur.

Figure 3 : Cycle de vie de *F. graminearum*, principal agent responsable de la fusariose des épis de blé.

Figure 4 : Photographies d'épis fusariés.

Figure 5 : Photographies illustrant la cinétique d'apparition des symptômes de fusariose des épis de blé.

Figure 6 : Photographie de grains fusariés selon la précocité de l'attaque.

Figure 7 : Voie de biosynthèse des toxines chez les champignons du genre *Fusarium*.

Chapitre 1

Figure 1 : Corrélations entre la vitesse de croissance, la capacité de sporulation et le potentiel toxigène de souches des genres *Fusarium* et *Microdochium*.

Figure 2 : Relations entre les toxines produites *in vivo* et *in vitro*.

Figure 3 : Relations entre l'AUDPC ou la biomasse fongique et la vitesse de croissance et la capacité des souches à sporuler.

Figure 4 : Cinétiques d'apparition de symptômes de fusariose sur des épis de blé inoculés avec 4 souches différentes de *Fusarium*.

Figure 5 : corrélations entre l'AUDPC et le PMG, la biomasse fongique et la quantité de toxines produites et entre la biomasse fongique et la quantité de toxines produites.

Chapitre 2

Figure S1: Visual symptoms of FHB on wheat kernels.

Figure 1: Correlation between toxin concentration and fungal DNA and between AUDPC and fungal DNA in wheat spikes inoculated by several *Fusarium* strains at 5 different dates.

Figure 2: Variations of AUDPC, TKW, fungal DNA and toxin concentrations in wheat spikes inoculated with different isolates of three *Fusarium* species at different dates.

Figure 3: Kinetics of visual FHB symptoms on wheat spikes inoculated with two *Fusarium* isolates at different inoculation dates.

Chapitre 3

Figure 1: Correlation between AUDPC and fungal DNA and between toxin concentrations and fungal DNA in wheat samples inoculated by several *Fusarium* strains in 2010 and 2011 alone or in co-inoculations, in the greenhouse (a, b) or in the field experiment (c).

Figure 2: Variations of incidence and fungal DNA in field samples inoculated with different isolates of three *Fusarium* species in single inoculations (SI) or in co-inoculation.

Figure 3: Fungal DNA of each isolate inoculated in wheat spikes in both experiments (2010 and 2011).

Figure 4: Measured minus expected toxin content in individual wheat spikes inoculated with different isolate combinations.

Chapitre 4

Figure 1: Fungal biomass (ng.ng⁻¹ of plant DNA) in the upper, middle and lower sections of wheat spikes inoculated with *F. graminearum* or *F. culmorum* in the 2010 experiment.

Figure 2: Fungal biomass of the challenger isolate (ng.ng⁻¹ of plant DNA) expressed as a function of the fungal biomass of the competitor isolate in the 2010 (a) and 2011 (b & c) experiments.

Tableaux

Introduction et contexte bibliographique

Tableau 1 : Principaux stades de développement du blé et le sur correspondance sur l'échelle de Zadoks.

Tableau 2 : Principales variétés de blé cultivées en France en 2010 et leurs notes de tolérance à la fusariose.

Chapitre 1

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des mesures de traits de vie des souches étudiées.

Tableau 2 : Analyse de variance, pour chaque variable de sévérité étudiée (AUDPC, PMG, PGS, biomasse fongique et toxines produites), 4 sources de variabilité ont été testées : l'expérimentation (Exp), l'espèce de champignon inoculée (Esp), l'isolat (Iso) dans chaque espèce et le chémotype de la souche (Chemo).

Chapitre 2

Tableau 1: isolates of *Fusarium* spp. used in the experiments.

Tableau S1: Eluent conditions used in the UPLC mycotoxins quantification.

Tableau S2: MRM transitions and their corresponding optimized parameters.

Tableau 2: Co-variation analysis of the corresponding relationships between fungal DNA and toxin content, and fungal DNA and AUDPC.

Tableau 3: Variance analyses for the *Fusarium* head blight tests in wheat. For each source of variable (AUDPC, TKW, fungal DNA, toxin concentration and toxin productivity), 4 sources of variance were tested: the inoculation date (Date; FX, F0, F8, F18 or F28), the year of experiment (Exp; 2010 or 2011), the species and the isolate inoculated (Iso).

Table 4: Variance analyses for the *Fusarium* head blight tests in wheat. For the fungal DNA as variable, 3 sources of variance were tested: the inoculation date (Date), the isolate inoculated (Iso), the plant tissue analysed either kernels or chaff (Tissue).

Chapitre 3

Tableau 1: Isolates used in both 2010 and 2011 experiments.

Tableau 2: ANCOVA analysis with the toxin concentrations or the disease severity as variables to be explained and the fungal DNA, the experiment and the isolate as explanatory variables.

Tableau 3: Variance analyses for the *Fusarium* head blight tests in wheat. For each variable to be explain (AUDPC, fungal DNA and toxin concentrations), 2 explanatory variables were tested: the experiment and the isolate.

Tableau 4: Means values for the fungal DNA quantified in wheat spikes inoculated with different isolates of *Fusarium* and *Microdochium* in 2010 (a) and 2011 (b).

Chapitre 4

Table 1: isolates of *Fusarium* spp. used in the experiments

Table 2: Experiment (2010 and 2011) and isolate effects on the disease severity as denoted by AUDPC, in single inoculations. The isolates are indicated in table 1.

Table 3: Effect of the challenger isolate and the competitor isolate on the fungal biomass of the challenger.

Table 4: Means values for the fungal DNA quantified in wheat spikes inoculated with different isolates of *Fusarium* and *Microdochium* in 2011.

Table 5: Variance analyses: effects of the challenger isolate, the competitor isolate, the threshold in the competitor isolate development, and the experiment on the fungal biomass of the challenger isolate.

Annexes

Tableau 1: Conditions du gradient d'élution utilisé pour la séparation des mycotoxines par UPLC.

Tableau 2: Transitions MRM et paramètres optimisés correspondants pour chaque mycotoxine analysée.



INTRODUCTION GENERALE ET CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE



A. Picot

Introduction

En agriculture, les maladies fongiques sont l'une des contraintes les plus importantes pour la production de blé. Parmi ces maladies, on retrouve un cas particulier, la fusariose, qui affecte les rendements mais aussi la qualité sanitaire de la récolte par la présence de toxines dans les grains. Cette maladie endémique, est provoquée par un complexe d'espèces de champignons phytopathogènes, le « complexe fusarien », à large spectre d'hôtes (Miedaner, 1996). Elle regroupe les genres *Microdochium* et *Fusarium*, qui comptent 19 espèces capables d'induire la fusariose. Les souches du genre *Microdochium* ne sont pas toxinogènes. En revanche, les espèces de *Fusarium* sont capables de produire une large gamme de mycotoxines de la famille des trichothécènes, dont les plus courantes sont le Déoxynivalénol (DON) et le Nivalénol (NIV) ; (Leonard et Bushnell, 2003).

La variabilité de cette maladie, au niveau de son incidence et de la production de mycotoxines, pose de nombreux problèmes en agriculture et agroalimentaire. D'une manière générale, les relations entre les niveaux de maladie observés au champ, les concentrations en mycotoxines à la récolte et la présence de champignon dans les grains sont complexes et très mal comprises. Ainsi, la présence d'épis fusariés ne serait pas toujours liée à une présence abondante de toxines et, réciproquement, l'absence de symptômes visibles ne signifie pas une absence de toxines dans les grains. Ceci rend difficile l'évaluation du risque lié à la présence de toxines par simple observation de la maladie. Pour expliquer ces constatations, différentes hypothèses peuvent être avancées. Par exemple, la diversité d'espèces ayant des caractéristiques épidémiologiques différentes pourrait être la source de différences de niveau d'infection avec par exemple des espèces plus agressives ou produisant davantage de toxines que d'autres (Brennan *et al.*, 2003). Egalement, le stade de développement de la plante influence le développement de la maladie, avec une sensibilité maximale autour de la floraison mais des contaminations plus tardives sont possibles (Cowger *et al.*, 2010). D'autre part, les infections

multiples associant différentes espèces du complexe fusarien sont fréquentes dans les champs et conduisent à des interactions dont les conséquences sur la production de toxines *in planta* sont peu connues (Xu *et al.*, 2005 ; Simpson *et al.*, 2004 ; Miedaner *et al.*, 2004 ; Reid *et al.*, 1999).

Dans un contexte général d'optimisation de la gestion des cultures et donc de la protection des plantes, il apparaît primordial de développer des connaissances sur l'épidémiologie de la fusariose de l'épi encore peu connue et d'identifier les déterminants épidémiologiques de l'accumulation de toxines pour développer des méthodes de lutte efficaces. Comprendre la relation entre la contamination de l'épi et la production de toxines, dans le cadre d'un complexe d'espèces interagissant entre elles, apparaît également essentiel à la compréhension du développement épidémiologique de la maladie et de son impact sur la qualité des récoltes.

Le cadre bibliographique de ces problématiques est présenté dans les paragraphes suivants. Tout d'abord, une description de la plante hôte étudiée, le blé tendre d'hiver, permettra de mieux appréhender le développement de la fusariose des épis. Ensuite, les agents pathogènes responsables de cette maladie seront présentés mettant en évidence la grande diversité de souches, d'espèces et de caractéristiques épidémiologiques qui leur sont propres. Le cycle des champignons associé aux stades physiologiques de la plante mettra en évidence la fenêtre de sensibilité de la plante. La description de ce complexe d'espèces donnera des éléments sur d'éventuelles interactions entre elles. Les éléments relatifs aux toxines illustreront les modulations possibles de leur production par les potentielles interactions au sein de ce complexe. Ce contexte bibliographique s'achèvera sur les impacts économiques et les difficultés de contrôle de cette maladie rendant nécessaire une meilleure compréhension de l'épidémiologie des souches pour pallier à ces difficultés. A partir de ces éléments, les objectifs de la thèse seront présentés ainsi que les chapitres qui leur sont associés.

I. Le blé

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) est un membre de la famille des *Poaceae* et son importance économique mondiale n'est plus à démontrer. Originaire de Mésopotamie, c'est une des plus anciennes cultures. Il y a 10 000 ans, le blé poussait à l'état sauvage et il fait partie aujourd'hui des trois céréales les plus importantes au monde avec le maïs et le riz. Les surfaces cultivées de blé dans le monde couvraient 221 millions d'hectares en 2011 (Boussac *et al.*, 2012) et, actuellement, près de 700 millions de tonnes de blé sont produites chaque année dans le monde qui font de lui la céréale la plus consommée par l'homme avec le riz. La France est le premier producteur européen de blé avec 34 millions de tonnes produites en 2011 soit 37% de la production européenne, qui est d'environ 138 millions de tonnes.

1. Les Caractéristiques botaniques

Le blé appartient au genre *Triticum* de la famille des *Gramineae*. C'est une plante herbacée annuelle, monocotylédone, à feuilles alternes, formée d'un chaume portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis. Les fleurs de cette plante sont nombreuses, petites et peu visibles. Elles sont groupées en épis situés à l'extrémité des chaumes. La fleur est cléistogame, c'est-à-dire qu'elle reste fermée, la pollinisation s'effectuant par autogamie qui est le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscant (qui ne s'ouvre pas), appelé caryopse, constitué d'une graine (composée d'un embryon et d'un tissu de réserve constitué de 70% d'amidon et 15% de gluten) et de téguments. Les principaux caractères des espèces de blé que l'homme a cherché à sélectionner sont : la robustesse de l'axe de l'épi (qui ne doit pas se casser lors de la récolte), la séparation facile des enveloppes du grain, la grande taille des grains et la compacité des épis (plus maniable que l'épi lâche), mais également la productivité et la résistance au froid ou aux maladies.

2. Le Cycle végétatif du blé

Le cycle du blé (Fig. 1) débute par la germination d'une graine après humidification. L'embryon n'a qu'un cotylédon (le blé est une monocotylédone) et la plantule comporte un coléorhize, qui donnera la racine, et un coléoptile, qui donnera l'axe feuillé. La levée commence quand la plantule sort de terre, le coléoptile forme un étui protégeant les premières feuilles. Il apparaît un renflement dans la partie supérieure du rhizome qui grossit et forme le plateau de tallage. Ensuite, le stade 3 feuilles est une phase repère pour le développement du blé ; c'est à partir de ce stade qu'il entre en vernalisation, mimée en conditions contrôlées par un passage en chambre climatique à 6°C pendant 6 à 8 semaines. Des bourgeons se forment à l'aisselle des feuilles et donnent des pousses appelées talles. Le tallage commence au début de l'hiver et se poursuit jusqu'à la reprise du printemps. Il est marqué par l'apparition d'une ou plusieurs tiges secondaires qui donneront chacune un nouvel épi. L'épi se développe au sommet du bourgeon terminal puis commence le stade de montaison correspondant à la montée de l'épi et à l'allongement des entre-nœuds. Enfin l'épiaison, en mai ou juin en France, a lieu lorsque la gaine éclatée laisse entrevoir l'épi qui va s'en dégager peu à peu. À ce stade, le nombre total d'épis est défini, de même que le nombre total de fleurs par épi. La reproduction se fait par cléistogamie, ou autopollinisation automatique puisque les fleurs ne s'ouvrent pas. Chaque fleur peut potentiellement donner un grain, mais il est possible que certaines fleurs n'en donnent jamais, en raison d'un déficit de fécondation par exemple ou lorsque la fleur est colonisée précocement par des pathogènes qui vont empêcher la formation des grains et donc altérer le rendement (Cf. Chapitre 2). La floraison s'observe à partir du moment où quelques anthères sont visibles dans le tiers moyen de l'épi, elles entraînent l'ouverture des épillets et sortent en dehors des glumelles, laissant l'entrée possible aux agents pathogènes comme ceux responsables de la fusariose des épis. A leur sortie les anthères sont jaunes puis deviennent blanches après exposition au soleil. En conditions de culture au champ, le stade floraison correspond à 50% des épis fleuris.

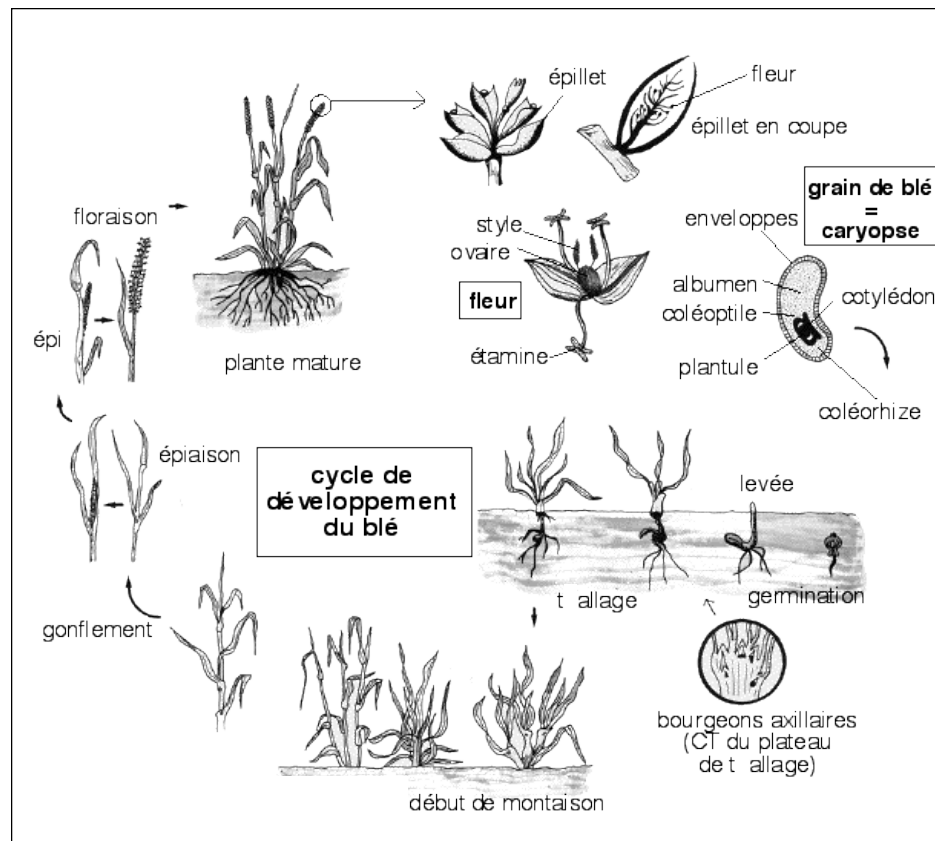


Figure 1 : Schéma illustrant le cycle de développement du blé (www.univ-lehavre.fr).

Environ 15 jours après la floraison, le blé commence à changer de couleur : il perd sa couleur verte pour tourner au jaune - doré. Le cycle s'achève par la maturation qui dure en moyenne 45 jours. Les grains vont progressivement se remplir et passer par différents stades tels que les stades laiteux, puis pâteux, au cours desquels la teneur en amidon augmente et le taux d'humidité diminue. Durant cette phase, les réserves migrent depuis les parties vertes jusqu'aux grains.

Afin de caractériser précisément les stades de développement du blé, le phytopathologiste Néerlandais Jan C. Zadoks a proposé une échelle en 1974 présentée dans le tableau 1. Cette échelle est aujourd'hui couramment utilisée en recherche et en agriculture (Zadoks *et al.*, 1974).

3. Les débouchés

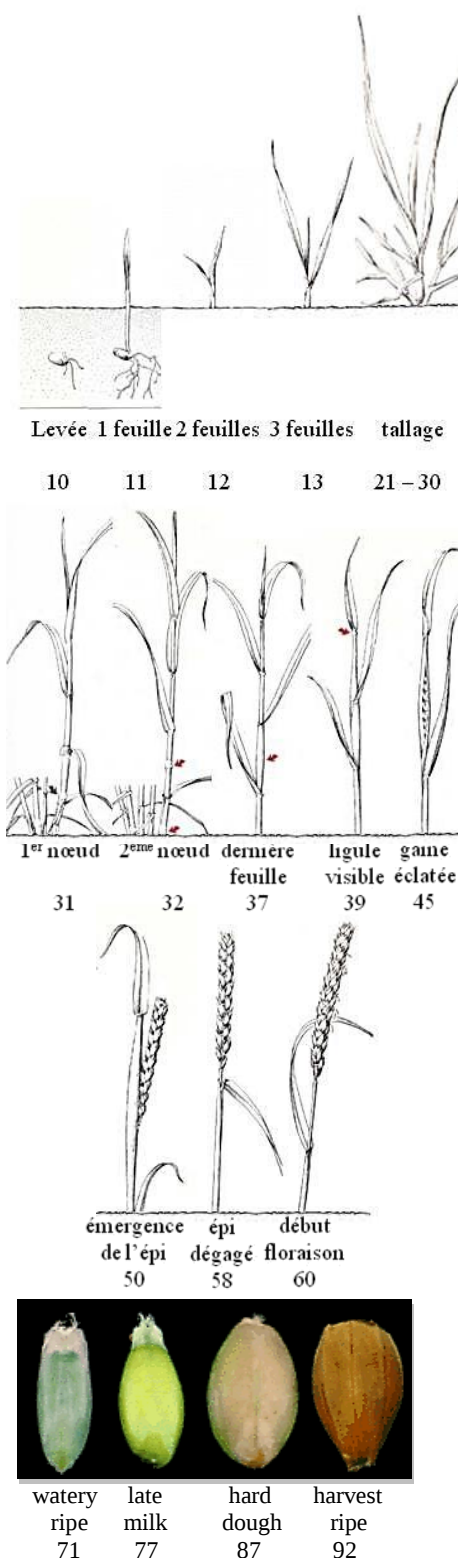
La consommation humaine (pain et biscuiterie) reste le débouché principal (58 % de la récolte), suivie de l'alimentation animale (34 %). Les 8 % restants représentent les usages industriels (amidonnerie et glutennerie).

II. La fusariose

En Europe, plusieurs maladies sur blé sont responsables de pertes de rendement ou encore d'une dégradation de la qualité sanitaire des grains. Les plus importantes, illustrées dans la figure 2, sont la septoriose (*Septoria* spp.), les rouilles (*Puccinia striiformis* et *tritricina*), et les fusarioses (*Fusarium* spp. et *Microdochium* spp.). La fusariose de l'épi a été décrite pour la première fois par W. G. Smith en 1884 et nommée « gale du blé » (« wheat scab »), terme modifié en 1920 par Atanasoff en « maladie de *Fusarium* », « *Fusarium* blight », puis « fusariose » par Douin en 1926 (Leonard & Bushnell, 2003). C'est une maladie destructive

Tableau 1 : Principaux stades de développement du blé et le sur correspondance sur l'échelle de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974). Les schémas illustrent ces principaux stades (www.gembloux.ulg.ac.be).

Feekes	Zadoks	General Description
Vegetative Growth & Tillering		
1	10	1 st leaf through coleoptile
	12	2 nd leaf unfolded
	13	3 rd leaf unfolded
2	21	Main shoot and 1 tiller
	22	Main shoot and 2 tillers
	23	Main shoot and 3 tillers
3	26	Main shoot and 6 tillers
4-5	30	Tillering ended, leaf sheaths strongly erected
Stem Extension		
6	31	1 st node detectable
7	32	2 nd node detectable
8	37	Flag leaf just visible
9	39	Flag leaf ligule visible
10	45	Boots swollen
Heading and Flowering		
10.1	50	1 st spikelet visible through split boot
10.2	52	¼ head emerged
10.3	54	½ head emerged
10.4	56	¾ head emerged
10.5	58	Head fully emerged
10.51	60	Start of flowering
Kernel Formation		
10.54	71	Milk stage - watery ripe
11.1	75	Milk stage - medium milk
11.2	85	Soft dough
	87	Hard dough
11.3	91	Dry matter accumulation ends
11.4	92	Harvest ripe



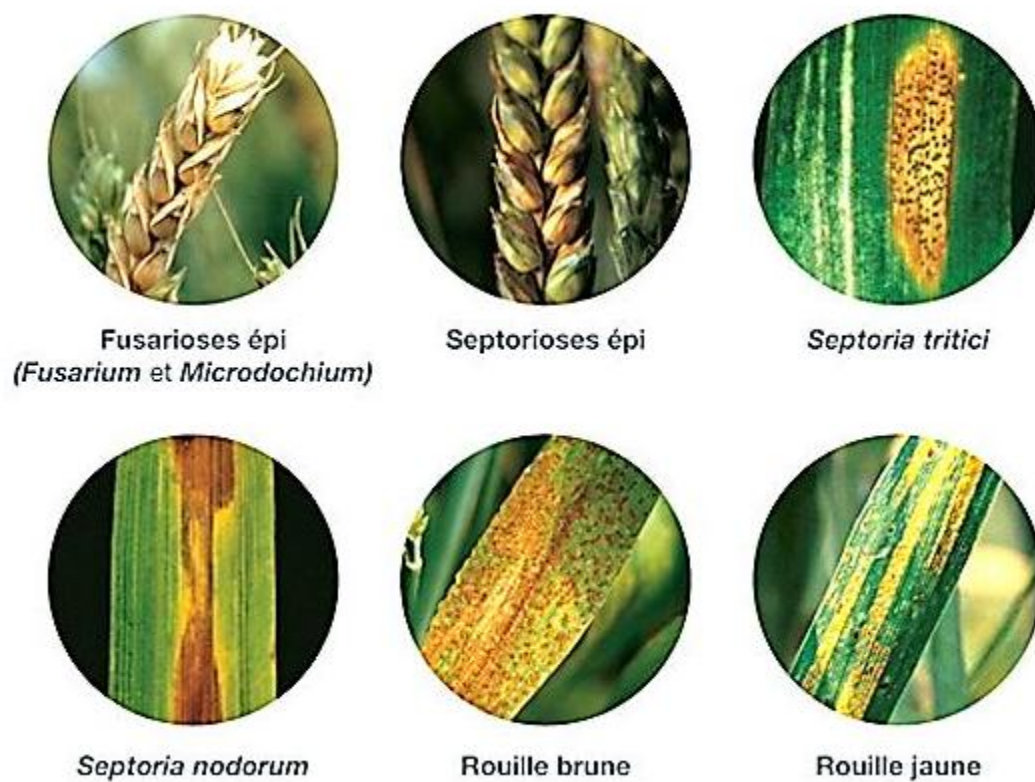


Figure 2 : Photographies des principales maladies des épis et feuilles du blé tendre d'hiver et du blé dur (www.bayer-Agri.fr).

du blé (*Triticum aestivum*) qui peut dévaster une culture quelques semaines avant la récolte. Elle peut être associée à la fois à de fortes pertes de rendement (avortement et faible poids des grains), une réduction de leur qualité germinative ou encore une diminution de leur qualité par la présence de toxines dans les grains.

Outre le blé, elle est également retrouvée sur de nombreuses autres plantes comme l'avoine (*Avena sativa* L.), l'orge (*Hordeum vulgare* L.), le riz (*Zizania palustris* L.), le maïs (*Zea mays* L.), le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) ou encore l'accacia (Mill.), l'Eucalyptus, et l'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) ce qui en fait une maladie à très fort impact agro-économique au niveau mondial puisque des champignons du genre *Fusarium* ont été retrouvés dans les sols de chaque continent excepté en Antarctique (Miedaner, 1997).

1. Le complexe fusarien

La fusariose est associée à un complexe d'espèces regroupant deux genres de champignons phytopathogènes, *Fusarium* et *Microdochium* (Arseniuk *et al.*, 1999). Ces 2 genres regroupent environ 19 espèces capables d'induire la fusariose de l'épi de blé et d'orge (Liddell, 2003). Les espèces les plus fréquentes en Europe sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *M. nivale* et *M. majus* (Xu & Nicholson, 2009 ; Xu *et al.*, 2005), avec une fréquence plus faible de *F. culmorum* et plus forte de *F. poae* depuis 2000 en France (Ioos *et al.*, 2004).

a. Le genre *Fusarium*

La première et véritable description du genre *Fusarium* a été réalisée par Link en 1809. Il doit son nom du latin *fusus* (fuseau) en rapport à la forme de ses macroconidies fusiformes et cloisonnées. Il appartient à la division des Ascomycètes et à la famille des Nectriacées. A l'heure actuelle nous utilisons principalement un classement dérivé de celui de Nelson *et al.* (1983) lesquels regroupent les *Fusarium* dans 15 sections. Ce classement a été amendé par Burgess *et al.* (1994), puis par d'autres chercheurs grâce à l'utilisation des techniques de

biologie moléculaire (Leslie & Summerell, 2006). De nombreuses espèces fusariennes ont été identifiées dans la nature dont les principales capables d'induire la fusariose de l'épi de blé: *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. arthrosporioides*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* (Xu & Nicholson, 2009). Les champignons du genre *Fusarium* sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines, dont la présence augmente l'incidence de la maladie sur les productions agricoles.

b. Le genre *Microdochium*

Il appartient à la famille des Tuberculariacées et regroupe deux espèces, *M. nivale* et *M. majus* (Glynn *et al.*, 2005), provoquant les mêmes symptômes sur épi que les *Fusaria* ainsi que des symptômes sur feuilles. Ces deux espèces ne produisent pas de mycotoxines.

c. Le complexe *F. graminearum*

L'espèce principale responsable de la fusariose des épis et incluse dans le genre *Fusarium* présenté précédemment est *F. graminearum*. (Brown *et al.*, 2010 ; Pereyra *et al.*, 2004 ; Xu & Nicholson, 2009 ; McMullen *et al.*, 1997). Elle est considérée comme un complexe d'espèces à part entière dont 14 ont été récemment identifiées par « Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) » : *F. austroamericanum* (lignée 1), *F. meridionale* (lignée 2), *F. boothii* (lignée 3), *F. mesoamericanum* (lignée 4), *F. acaciae-mearnsii* (lignée 5), *F. asiaticum* (lignée 6), *F. graminearum* (lignée 7), *F. cortaderiae* (lignée 8), *F. brasiliense* (originaire du Brésil), *F. vorosii* (originaire du Japon et de Hongrie), *F. gerlachii* (originaire de la moitié ouest des Etats-Unis), *F. aethiopicum* (originaire d'Ethiopie), *F. ussuriense* (originaire de l'Est de la Russie) et, plus récemment, une nouvelle lignée originaire du Népal (O'Donnell *et al.*, 2008 ; Boutigny *et al.*, 2011 ; Alvarez *et al.*, 2011 ; Starkey *et al.*, 2007). Chacune de ces espèces ainsi que leur chénotype seraient spécifiques d'une région géographique et pour la plupart, endémiques de l'hémisphère sud (Wang *et al.*, 2011). La seule exception reste *F. graminearum sensu stricto* qui est présente

et dominante sur une plus grande échelle en Europe et en Amérique (O'Donnell *et al.*, 2008 ; Scoz *et al.*, 2009 ; Alvarez *et al.*, 2011).

d. Les relations entre espèces du complexe

Plusieurs de ces espèces peuvent être retrouvées ensemble, à l'échelle de la région, de la parcelle et également sur un même épi, où elles forment le complexe fusarien (Xu & Nicholson, 2009). En effet, la fusariose de l'épi est souvent causée par un mélange de 2 ou 3 agents pathogènes du complexe (Xu, 2005 ; Audenaert, 2009). La sévérité, l'incidence et la prévalence de chaque espèce varient selon la localisation géographique et les années (liées aux variations climatiques et aux pratiques culturales ; Oerke *et al.*, 2010). Ainsi, dans chaque région sont retrouvées chaque année les mêmes espèces mais à des fréquences différentes. Associé à cela, certaines espèces comme les *F. poae*, *M. majus* et *M. nivale* ont été décrites comme moins agressives comparées aux autres espèces (Gosman *et al.*, 2010 ; Brennan *et al.*, 2003). La présence sur un même épi de plusieurs de ces espèces est susceptible de modifier leur équilibre et leur dynamique de production de toxines. En effet, comme dans tout écosystème, des interactions peuvent avoir lieu entre souches, soit intra-, soit inter-spécifiques (Xu, 2009 ; Liggitt, 1997) et potentiellement modifier leur développement et leur toxinogénèse. **Ces interactions et leur impact sur le développement des champignons et leur production de toxines sont étudiées dans les chapitres 3 et 4).**

2. Le cycle de vie

a. L'inoculum primaire

Le cycle de vie des agents pathogènes responsables de fusariose est illustré dans la figure 3 par le cycle de *F. graminearum*. Pendant l'hiver et tout au long du cycle cultural, les agents pathogènes responsables de la fusariose des épis survivent dans le sol sous forme de chlamydospores (Bai & Shaner, 1994). Cet inoculum primaire est capable d'infecter les semis et induire une fonte des semis (*seedling blight*) et une pourriture du collet (*foot rot*) (Arsan *et*

al., 2011). L'inoculum est formé principalement de macroconidies ou microconidies (phases télomorphes *Fusarium* et *Microdochium*) et d'ascospores (phases anamorphes *Gibberella* et *Monographella*) qui sont produites en conditions humides et chaudes (Xu *et al.*, 2005 ; Champeil *et al.*, 2004 ; Bai & Shaner, 1994). Les ascospores et les conidies sont dispersés par le vent (Fernando *et al.*, 1997) ou par *splashing* (dispersion par la pluie de feuille en feuille).

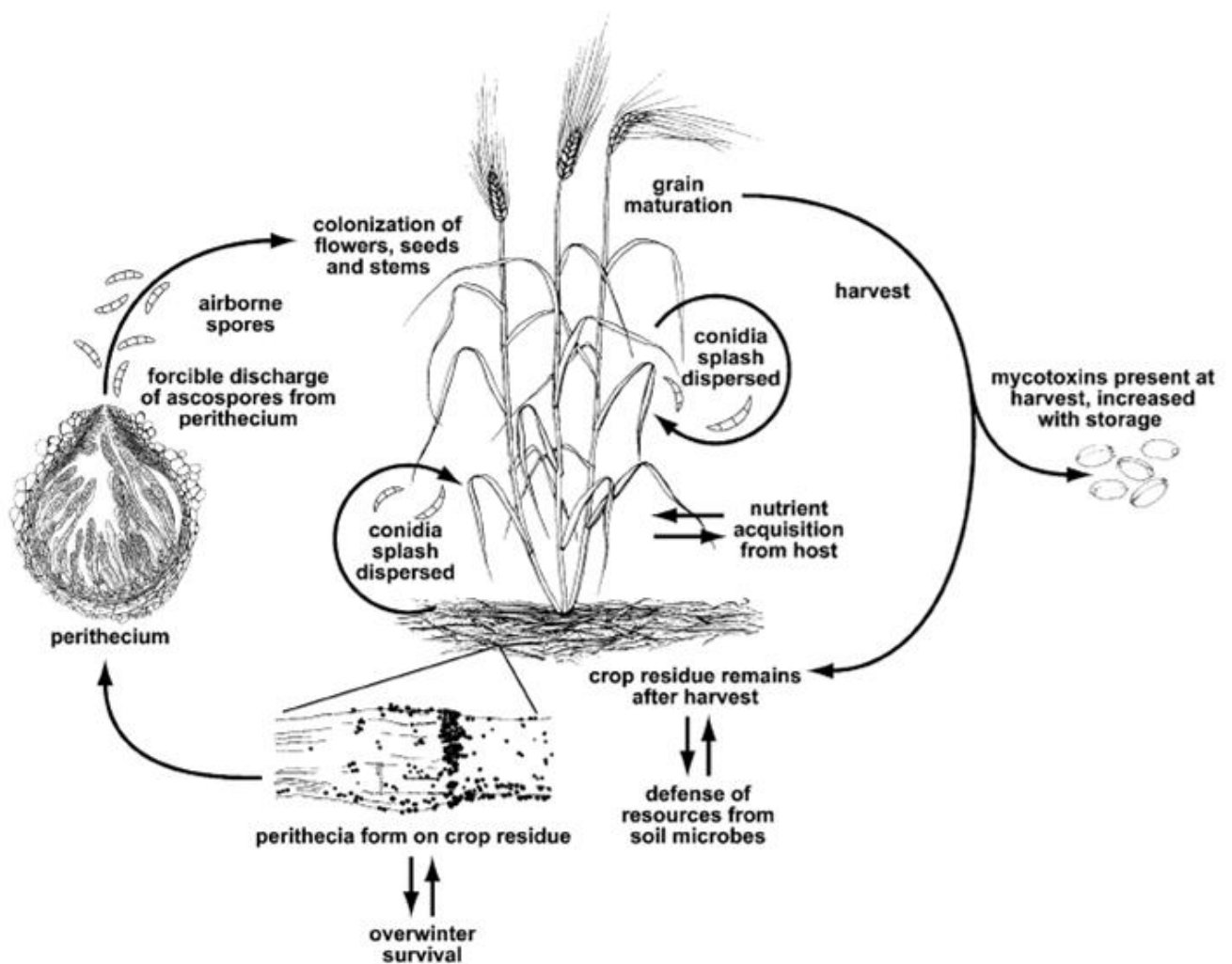


Figure 3 : Cycle de vie de *F. graminearum*, principal agent responsable de la fusariose des épis de blé (Trail, 2009).

Il est à noter que *F. culmorum* et *F. poae* ne se reproduisent pas de façon sexuée (Doohan *et al.*, 2003).

Trois sources d'inoculum peuvent être à l'origine du développement de fusarioses :

Les résidus de culture infectés l'année précédente (source principale) et en particulier les tissus qui se dégradent plus difficilement comme les nœuds (Champeil *et al.*, 2004 ; Osborne & Stein, 2007). La survie des champignons sur résidus peut atteindre plus de 2 ans après récolte ce qui les classe en « source à long terme ». Lorsque les résidus restent en surface, la survie de l'inoculum est plus longue (Pereyra *et al.*, 2004 ; Audenaert *et al.*, 2009). Les précédents culturaux les plus à risque sont les cultures hôtes de la fusariose comme le maïs, le blé et l'orge. Dans la partie plus profonde du sol, seules les chlamydospores peuvent subsister jusqu'à quatre ans ; ces spores ont une vie ralentie et une paroi épaisse leur permettant de résister longtemps à la sécheresse et l'asphyxie (Caron, 1993).

Les semences infectées : lors des infections sur épi, le mycélium attaque les grains à travers les glumes, pénètre dans le péricarpe, l'albumen, voire l'embryon. Cette source inoculum permet à la maladie de se développer dès l'automne. Pendant la germination, le mycélium reprend son activité et, selon le degré de pénétration initial, il ralentit ou inhibe la germination, entraînant des manques à la levée et la fonte des semis (Xu & Nicholson, 2009).

Les plantes hôtes (*Agrostis*, *Bromus*, *Medicago*, *Festuca*...), peuvent également jouer le rôle de réservoir de *Fusarium* sans présenter de symptômes visibles (Leonard & Bushnell, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004).

La maturation des spores dépend des interactions avec les facteurs de l'environnement ; elle est favorisée par l'humidité, la chaleur et la lumière (Guenther & Trail, 2005) et freinée par la sécheresse et le froid de l'hiver (Champeil *et al.*, 2004). Les spores germent ensuite en surface des tissus de l'hôte lorsque les conditions y sont favorables. Ces conditions regroupent une forte humidité (>90%) pendant 48 à 72h en conditions contrôlées et 4 à 5 jours en conditions naturelles, et des températures comprises entre 15°C et 30°C (Bai & Shaner, 1994 ; De Wolf

et al., 2003 ; Gilbert *et al.*, 2008). Lorsque ces périodes favorables sont discontinues ou que la température excède 30°C, la germination est possible mais l'efficacité d'infection est réduite.

b. Initiation de la maladie et développement des champignons

La fusariose de l'épi de blé est donc initiée par le dépôt de spores matures sur des épis de blé en fleur. Ces spores germent, colonisent les anthères extrudées, généralement dans la partie médiane de l'épi, où commence la floraison et où l'humidité est supérieure à celle des autres épillets (Walter *et al.*, 2009 ; Leonard & Bushnell, 2003). Ils entrent dans la fleur et se développent afin de rejoindre la graine en formation, les bractées florales et le rachis. La pénétration dans l'épi peut également avoir lieu en surface des glumes ou via des ouvertures naturelles (stomates, blessures, base de l'épillet ; Brown *et al.*, 2010 ; Champeil *et al.*, 2004).

Dans un premier temps, les tubes germinatifs se développent en surface et forment un réseau dense de mycélium à l'intérieur de l'épillet et autour de l'ovaire 24 à 26 heures après l'inoculation (Brown *et al.*, 2010). Ensuite, sur le front de l'infection, le champignon se développe de façon intercellulaire et se nourrit des exsudats extracellulaires mais n'induit pas encore de symptômes visibles (Guenther & Trail, 2005). A l'arrière du front de progression, les hyphes progressent dans les tissus vivants de l'hôte de façon radiale et induisent une colonisation intracellulaire et nécrotrophique des cellules de l'hôte. Ceci se traduit par l'apparition des premiers symptômes de décoloration (« bleaching ») 2 à 4 jours après l'infection. Les symptômes de nécrose peuvent également être associés à des tâches brunes des glumes et rachis (Christ *et al.*, 2011 ; Bottalico & Perrone, 2002 ; Cf. Fig. 4 a et b). Le pathogène circule via le rachis et colonise préférentiellement les épillets adjacents et plutôt inférieurs à l'infection (Argyris *et al.*, 2005). Cette propagation dans le rachis entraîne un dysfonctionnement du système vasculaire associé à une maturation précoce de la partie de l'épi supérieure à l'infection, l'échaudage (Cf. Fig. 4 c). **La figure 5 illustre ces mouvements dans l'épi qui seront également étudiés dans le chapitre 4.** Lorsque cet échaudage a lieu tôt dans le cycle du blé, les grains peuvent être absents ou présenter un aspect atrophié du fait

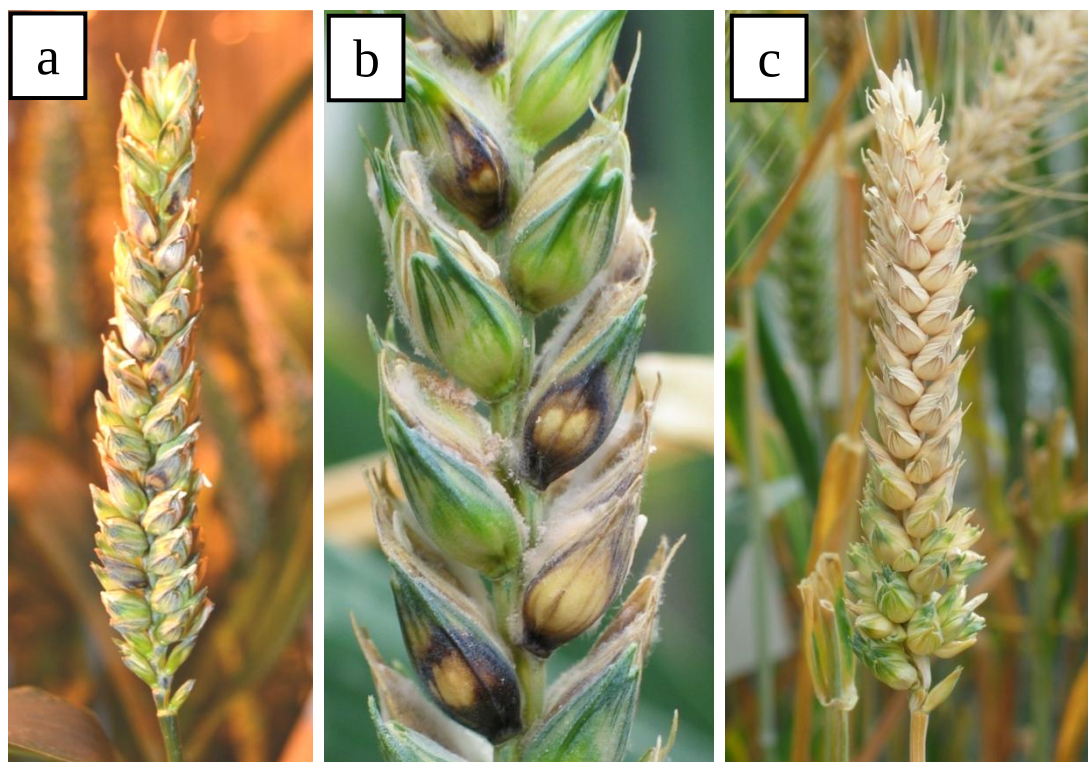


Figure 4 : Photographies d'épis de blé fusariés présentant des symptômes de nécroses (a) avec parfois un développement mycélien en surface des épillets (b) et des symptômes d'échaudage (c).



Figure 5 : Photographies illustrant la cinétique d'apparition des symptômes de fusariose des épis de blé. De gauche à droite : l'apparition des premiers symptômes de décoloration 3 jours après l'infection (JAI) ; la colonisation des épillets adjacents 5 JAI et l'échaudage de la partie supérieure 9 JAI.

d'un manque de nutriments et d'eau (Bai & Shaner, 1994 ; Leonard & Bushnell, 2003). Des spores sexuées et asexuées peuvent ensuite être produites à la surface des plantes infectées ou des résidus de culture lorsque l'humidité est élevée (Vogelgsang *et al.*, 2008 ; Bai & Shaner, 1994).

Les symptômes observés sur grains sont très divers (Cf. Fig. 6). Lorsque l'attaque a lieu avant la formation des grains, ceux-ci seront très atteints voire absents (Bai & Shaner, 1994) ; ils sont plus petits et présentent une coloration blanche ou rose, correspondant au développement mycélien, un aspect rugueux, ridé, galeux et sont souvent liés à de fortes concentrations en toxines ; des taches noires sont également remarquables autour de l'embryon (Christ *et al.*, 2011). Lorsque l'attaque est tardive, les grains ont un volume normal mais sont susceptibles de contenir des toxines (Leonard & Bushnell, 2003). A partir de cela, **le stade de développement du grain apparait clairement important dans l'impact de la maladie sur la récolte ; cette observation est approfondie dans le chapitre 2.**

3. Conditions favorables au développement de la maladie

La sévérité de la fusariose est conditionnée par trois facteurs indépendants des champignons : les facteurs climatiques, les facteurs agronomiques et les facteurs physiologiques de la plante hôte (Bai & Shaner, 1994 ; Sutton, 1982 ; Walter *et al.*, 2009 ; Alvarez *et al.*, 2009).

a. Les facteurs climatiques

Les facteurs climatiques, en particulier l'humidité et la température, jouent un rôle primordial puisqu'ils vont conditionner la germination et l'infection du champignon. Chaque espèce responsable de la fusariose a un optimum de température et d'humidité différents. Des individus de la même espèce mais ayant des origines géographiques différentes vont également avoir des optima différents, en référence avec le climat de leur région d'origine (Xu & Nicholson, 2009 ; Doohan *et al.*, 2003). Des expérimentations réalisées par Rossi *et al.* (2001), sur feuilles détachées ont montré un optimum de fréquence d'infection pour



Figure 6 : Photographie de grains fusariés selon la précocité de l'attaque. Les épis de blé ont été inoculés par la souche fg178 à partir du début de la floraison (attaques précoces) à gauche, jusqu'à 28 jours post floraison (attaques tardives) à droite, le dernier grain de droite étant issu d'un témoin non inoculé.

F. graminearum et *F. avenaceum* à 28-29°C. Pour *M. nivale* et *F. culmorum*, cet optimum est obtenu à 18°C et 26.5°C respectivement. *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* et *M. nivale* sont retrouvées dans des régions plutôt fraîches comme le Royaume-Uni alors que *F. graminearum* est plutôt présent dans les régions plus chaudes comme aux Etats-Unis (Doohan *et al.*, 2003 ; Arseniuk *et al.*, 1999). En Europe la température n'est pas considérée comme un facteur limitant la présence ou non d'une espèce (Xu *et al.* 2008b).

Au niveau de l'humidité, des pluies fréquentes, une forte hygrométrie et / ou de fortes rosées autour de la floraison et des stades précoces de remplissage des grains sont favorables à l'initiation et au développement de la maladie sur l'épi. Durant tout le cycle cultural, l'humidité et le vent favorisent également la survie et la dispersion de l'inoculum primaire (Mc Mullen *et al.*, 1997 ; Alvarez *et al.*, 2009). Si les conditions favorables sont discontinues, l'infection peut toujours avoir lieu mais avec une efficacité réduite (DeWolf *et al.*, 2003).

b. Les facteurs agronomiques

Ils jouent un rôle principalement dans la conservation de l'inoculum primaire. Par exemple, un précédent cultural sensible à la fusariose (maïs, blé, orge), c'est-à-dire potentiellement infecté lors de son cycle, est une source potentielle d'inoculum pour la culture suivante via ses résidus. Egalement, un travail du sol augmenterait la dégradation des résidus en favorisant l'activité microbienne et donc limiterait la colonisation des résidus par *F. graminearum* (Pereyra *et al.*, 2004). Enfin, les grandes surfaces de cultures sensibles à la fusariose sont propices au développement de celle-ci par la multiplication des sources d'inoculum (Mc Mullen *et al.*, 1997).

c. Les facteurs physiologiques

Les facteurs physiologiques de la plante hôte sont nombreux et influencent plus ou moins le développement de la fusariose. L'intensité de la maladie dépend non seulement de la quantité d'inoculum initial et de la virulence des souches pathogènes, mais aussi des caractéristiques physiologiques de la plante (taille, densité d'épillets...), son état de stress, son stade de

développement, la date et la durée de la floraison et le niveau de résistance de la variété (Xu *et al.*, 2005 ; Champeil *et al.*, 2004 ; Bai & Shaner, 1994 ; Audenaert *et al.*, 2009).

Mesterhazy *et al.* (1999) ont décrit 5 types différents de résistance de l'hôte vis-à-vis de la fusariose. Le type I correspond à une résistance à l'infection, le type II à une résistance à la progression du champignon dans l'épi, le type III se réfère à la capacité de l'hôte à empêcher la synthèse de mycotoxines ou promouvoir leur dégradation, le type IV à la résistance de la plante à l'infection des grains et le type 5 à la tolérance à l'infection.

La fusariose des épis cible les épis, les infections ne sont donc possibles qu'entre l'émergence de l'épi et sa maturité avec une sensibilité maximale autour de l'anthèse (Miedaner, 1997 ; Audenaert *et al.*, 2009). Même si à ce stade les conditions sont plus favorables au développement de la maladie, des contaminations plus tardives aux stades grains laiteux (Yoshida & Nakajima, 2010) à pâteux, ont déjà été observées et peuvent conduire à l'infection du grain et à la production de toxines mais à des intensités plus faibles (Bai & Shaner, 1994 ; Champeil *et al.*, 2004 ; McMullen *et al.*, 1997). Le champignon aurait alors plus de difficultés à pénétrer dans les grains du fait de la présence du tégument autour de la graine (Champeil *et al.*, 2004). **L'importance de cette fenêtre de sensibilité et l'existence de contaminations tardives liées à la présence de toxines dans la récolte seront étudiés et approfondis dans le chapitre 2.** La sensibilité de la plante à un stade de développement du blé restreint explique également pourquoi cette maladie est monocyclique (Fernando *et al.*, 1997 ; Audenaert *et al.*, 2009 ; Bai & Shaner, 1994).

III. Les mycotoxines

1. Généralités

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certains champignons microscopiques (Prandini *et al.*, 2007). Elles peuvent être produites avant la récolte dans les épis et donc retrouvées dans les grains, pendant le transport et le stockage des céréales. Elles diffusent dans le substrat qu'elles contaminent même après la destruction du champignon responsable de leur production. Peu labiles, elles sont souvent actives à très faibles doses, thermostables, stables dans le temps et résistantes aux traitements biologiques et aux processus de transformation. Ainsi, lorsqu'elles sont présentes dans le grain, on les retrouve tout au long de la chaîne alimentaire.

Les genres majeurs de champignons producteurs de mycotoxines sont *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Les principales classes de mycotoxines qu'ils produisent sont les aflatoxines, les zéaralénones, les trichothécènes, les fumonisines et les ochratoxines. Les fusariotoxines (produites par les *Fusarium*) sont des Trichothécènes. Ce sont des inhibiteurs de synthèse protéique des cellules eucaryotes (Cumagun *et al.*, 2004) et de l'activation des gènes de défense de la plante (Wagacha & Muthomi, 2007). Par ce fait, les trichothécènes sont responsables d'effets indésirables sur la santé humaine ou animale en cas de consommation d'aliments contaminés et peuvent ainsi provoquer une grande variabilité de symptômes comme des altérations du foie, des reins, du système nerveux central, des dérèglements hormonaux ou encore une réduction des défenses immunitaires (Prandini *et al.*, 2007).

La biosynthèse des trichothécènes est un processus complexe impliquant de nombreuses étapes d'oxygénation, d'isomérisation et d'estérification (Jenning *et al.*, 2004 ; Fig. 7). Ces molécules sont caractérisées par une structure sesquiterpénoïde avec une double liaison en position C9/C10 et un anneau époxyde en position C12/C13 (Arsan, 2011). Dans cette

famille, 4 types de toxines ont été identifiés : le type A considéré comme le plus toxique (T2, HT2 et Diacétoxyscirpénol (DAS)), le type B

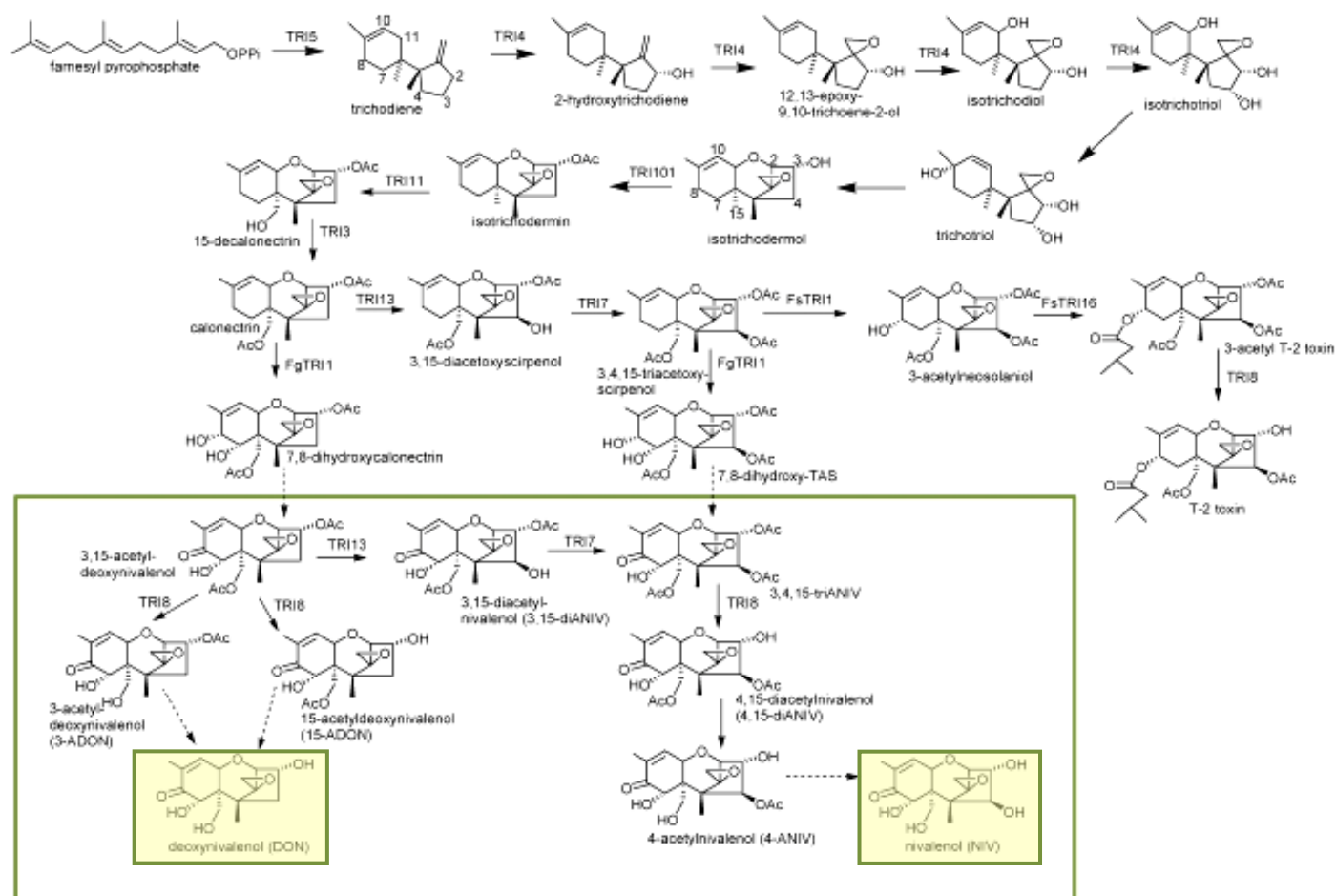


Figure 7 : Voie de biosynthèse des toxines chez les champignons du genre *Fusarium*. Les gènes codant pour une étape enzymatique sont identifiés à côté des flèches indiquant l'étape. Les flèches discontinues indiquent des étapes pour lesquelles aucun gène ne lui a encore été assigné. Les molécules identifiées dans le rectangle vert sont les trichothécènes de type B (McCormick *et al.*, 2011).

(Déoxynivalénol (DON), Acétyldéoxynivalénol (ADON), Nivalénol (NIV), Fusarénone X (FX)), la Zéaralénone (ZEN), et les Fumonisines (FB1 et FB2) (Asran *et al.*, 2011).

Une souche de *Fusarium* produit majoritairement une toxine qui définit son chémotype (Ichinoe *et al.*, 1983). Au sein du type B, deux chémotypes ont été décrits : le chémotype I responsable de la production de DON et ses dérivés acétylés (3-ADON, 15-ADON) et le chémotype II responsable de la production de NIV et de FX (Goswami & Kristler, 2004). On parle également de chémotype DON ou de chémotype NIV, les deux voies de biosynthèse étant incompatibles (Mirocha *et al.*, 1989) ; en fait, le gène Tri13 nécessaire à la conversion de DON en NIV n'est pas fonctionnel chez les individus de chémotype DON. Le Nivalénol est supposé être plus toxique que le Déoxynivalénol ou ses dérivés acétylés. Cependant, la prédominance des individus de chémotype DON dans la nature leur suggère un avantage sélectif pour l'infection des céréales et en particulier le blé avec, malgré tout, un maintien des deux chémotypes (Xu & Nicholson, 2009). Au sein d'une même espèce, il existe différents chémotypes et parmi les individus d'un même chémotype, la capacité de production de toxines *in vitro* (ou potentiel toxinogène) est très variable.

2. Le rôle des toxines

La production de métabolites par un organisme a un coût non négligeable, ce qui suppose une utilité de chacun de ces métabolites. Un avantage probable pour un organisme à produire des métabolites secondaires est la survie dans son environnement, tant pour se protéger contre les événements négatifs de cet environnement, que pour assurer sa nutrition (Fox & Howlett, 2008). Etant donné leur phytotoxicité et la pathogénicité des *Fusarium* vis-à-vis des plantes, les trochithécènes pourraient également être impliquées en tant que facteur de pathogénicité (ou pouvoir pathogène), c'est-à-dire dans le développement des champignons dans l'épi. En effet, une agressivité plus importante sur épi a été observée pour les souches productrices de ces molécules par rapport à des souches mutantes, non productrices (Proctor *et al.*, 2002 ;

Desjardins *et al.*, 1996, Nicholson *et al.*, 1998). Cependant, d'après les travaux d'Arseniuk *et al.* (1999), même si une perturbation par mutation de la voie de biosynthèse des trichothécènes diminue la pathogénicité de *F. graminearum*, celle-ci n'est pas supprimée. Gosman *et al.* (2010) ont également mis en évidence la relation entre la résistance à la colonisation de l'épi (résistance de type II) et la production de DON et, d'après Bai *et al.* (2001), des mutants non producteurs de toxines ne s'étendent pas aux épillets adjacents. La production de DON ne serait donc pas nécessaire à la pathogénicité mais jouerait un rôle dans la virulence du champignon ; les trichothécènes seraient donc des facteurs de virulence essentiels à la colonisation des épis et grains de blé par *Fusarium*. L'expression des gènes de biosynthèse des toxines commence immédiatement après l'infection. Ces toxines produites en avant du front de l'infection ne seraient donc pas indispensables à l'initiation de la maladie mais faciliteraient la colonisation de leur hôte. Ceci suppose que d'autres facteurs interviennent dans le pouvoir pathogène de la fusariose tels que les enzymes de dégradation des parois, par exemple (Schwarz *et al.*, 2002).

Enfin, un dernier rôle majeur des trichothécènes et notamment du DON évoqué dans la littérature serait dans la compétition avec d'autres microorganismes (champignons ou bactéries) (Xu & Nicholson, 2009). **L'impact de potentielles compétitions entre espèces de *Fusarium* est étudié dans le chapitre 3.**

3. La réglementation

La Commission européenne a voté en 2006 un règlement (1831/2003) visant à limiter les teneurs en quelques mycotoxines (DON, zéaralénone, fumonisines) des produits bruts et transformés à destination de l'alimentation humaine (par exemple, le seuil de DON dans un grain de blé tendre est de 1250 ppb). Ces valeurs limites correspondent aux seuils au-delà desquels il y a un risque pour la santé humaine. Ce règlement a été révisé par la Commission le 28 septembre 2007 et comprend également une préconisation pour l'alimentation animale

(CE N° 1126/2007). Une évolution de ce règlement est attendue et prévoit d'ajouter de nouvelles mycotoxines comme les T2 ou les HT2.

IV. Impacts agro-économiques

1. Un impact économique flagrant

La fusariose affecte la qualité technologique et sanitaire des farines de blé avec une dégradation de la force boulangère, un défaut de remplissage du grain, une dégradation des téguments. Les grains infectés étant plus petits et décolorés, les lots de blé peuvent être déclassés, les rendements sont fortement diminués et la qualité germinative des semences est altérée. Les qualités protéiques sont également altérées avec la perte de protéines comme l'albumine et le gluten (Brown *et al.*, 2010). Egalement, les orges de brasserie infectées deviennent impropres à la fabrication de la production de la bière car elles entraînent la formation anormale d'une mousse, c'est ce que l'on appelle le phénomène de gushing. Outre la diminution des qualités technologiques des céréales, la présence de toxines impossibles à éliminer décrit la fusariose comme un problème majeur économique et de santé publique (Le Bail *et al.*, 2005). De plus, la mise en place de seuils réglementaires protège le consommateur avec, comme contrepartie, de lourdes conséquences économiques par le déclassement des lots de céréales infectés (Arseniuk *et al.*, 1999 ; Mc Mullen *et al.*, 1997 ; Guo *et al.*, 2008).

2. Une lutte difficile

Les principaux leviers de lutte contre la fusariose regroupent les pratiques culturales, la résistance variétale et la lutte chimique.

a. Les pratiques culturelles

L'inoculum principal étant conservé dans les résidus de culture, un travail du sol permet l'enfouissement des résidus et donc limite les risques d'apparition de la maladie (Champeil *et al.*, 2004). Certaines cultures, comme le maïs et le blé, sont plus sensibles aux attaques de fusariose ; les résidus issus de ces cultures sont des sources d'inoculum pour l'année suivante. Il est donc nécessaire d'intégrer cette sensibilité dans la rotation des cultures, en évitant la succession de cultures sensibles (Parry *et al.*, 1995). L'irrigation, la fertilisation azotée et le contrôle des adventices jouent également un rôle dans le développement de la fusariose (Wagacha & Muthomi, 2007) mais ils restent mineurs par rapport aux deux leviers présentés précédemment.

b. La résistance variétale

Aujourd'hui, peu de variétés de blé sont résistantes à la fusariose. Cependant, il existe des variétés tolérantes, possédant des niveaux de résistance partiels permettant de limiter les pertes de rendements et l'accumulation des toxines dans la récolte. En France, la tolérance d'une plante aux maladies est notée (de 1 à 9) et fait partie des critères de choix pour les agriculteurs. Il est à noter que moins de 20 % des variétés de blé tendre d'hiver les plus cultivées en France en 2012 ont une note élevée (> 6) de tolérance à la fusariose (Cf. Tableau 2).

c. La lutte chimique

Une fois la culture installée, le recours à la lutte chimique est toujours possible mais avec une efficacité limitée. Toutefois, appliqué à la bonne dose et au bon stade, un traitement à l'aide d'un produit spécifique est un levier supplémentaire pour lutter contre la fusariose. La diversité des agents pathogènes ainsi que les différences d'efficacité des matières actives d'une espèce à l'autre complexifient cette lutte. En effet, les travaux de Simpson *et al.* (2001) soulignent la sensibilité des champignons du genre *Fusarium* aux triazoles et ceux du genre *Microdochium* aux strobilurines. Depuis, des résistances sont apparues limitant l'intérêt des

Tableau 2 : Principales variétés de blé cultivées en France en 2010 et leurs notes de tolérance à la fusariose. Les faibles notes correspondent à des variétés sensibles et les notes plus élevées à des variétés plus tolérantes (www.terre-net.fr).

SENSIBLES				MOYENNES				TOLERANTES	
ACCROC	3	INTERET	3.5	ADAGIO	5.5	INSTINCT	5	ALIGATOR	6
AEROBIC	3.5	ISENGRAIN	3	ALIXAN	5.5	ISTABRAQ	4.5	ANTONIUS	7
ALLEZ Y	(3.5)	MENDEL	3.5	ALTIGO	4	JB DIEGO	4.5	APACHE	7
ALTAMIRA	3	MUSIK	(2.5)	AMADOR	5	KARILLON	(4)	AZZURO	6
AMBITION	3.5	NIRVANA	3.5	AMUNDSEN	4	KORELI	4	BAROK	6
ARISTOTE	3	ORVANTIS	3.5	ARAMIS	4.5	LEAR	4.5	CHEVALIER	6
ARKEOS	(3.5)	PHARE	3.5	AREZZO	4.5	LIMES	5	EPHOROS	6
AZZERTI	2.5	PIERROT	3.5	AS DE COEUR	5.5	LORD	4	FLUOR	(6)
BAGOU	3.5	PR22R58	2	ATTITUDE	4.5	MERCATO	4.5	GALIBIER	6
BERMUDE	3	PREMIO	3	ATTLASS	4.5	ORPIC	(4)	GRAINDOR	7
BOISSEAU	3	RAZZANO	3	BRENTANO	5.5	PAKITO	(5)	HYMACK	6
BOREGAR	3.5	ROSARIO	3.5	CENTENAIRE	(5.5)	PALADAIN	4	HYSUN	6
CAPHORN	3	ROYSSAC	2	CHEVRON	4	PALEDOR	4.5	ILLICO	7
CHARGER	3	SAMURAI	3	CLAIRE	4	PERCEVAL	5	KALYSTAR	6
COMPIL	3	SCOR	3.5	DIALOG	5	PERFECTOR	4	MERCURY	7
CORDIALE	3.5	SHANGO	3	FLAMENKO	(4)	PLAYER	4	MIROIR	(6)
DINOSOR	3.5	TOISONDOR	3	FLAUBERT	(4.5)	PR22R28	4.5	OXEBO	6
EXPERT	3.5	TRAPEZ	3	FOLKLOR	(4.5)	RASPAIL	4	SOKAL	(6)
GLASGOW	(3)	TREMIE	3	FORBAN	4	RUSTIC	4.5	SY ALTEO	(7)
GONCOURT	3.5	WARRIOR	(3)	GALOPAIN	4	SANKARA	4.5	TULIP	(6.5)
				GARANTUS	(5)	SELEKT	4		
				HAUSSMANN	5	SOISSONS	4.5		
				HYBERY	(5)	SPONSOR	5		
				HYSORE	(5)	SWEET	(4.5)		
				HYSTAR	5	SY EPSON	(5)		
						SY MATTIS	(4.5)		

() : à confirmer
* note GEVES corrigée par ARVALIS

strobilurines dans cette lutte. De nouvelles solutions ont été récemment développées couplant par exemple plusieurs familles chimiques comme les triazolinthione et triazole pouvant réduire jusqu'à 70% de la maladie au champ.

La meilleure approche permettant de lutter efficacement contre la fusariose serait donc une approche intégrée combinant de bonnes pratiques culturales, l'utilisation de variétés tolérantes ainsi qu'une application fongicide à la bonne dose et au bon stade de développement de la plante (Wagacha & Muthomi, 2007). Toutefois, l'amélioration des pratiques culturales reste le levier de lutte le plus efficace contre la fusariose de l'épi.

Objectifs de la thèse

Le contexte bibliographique met en évidence les différents facteurs susceptibles de moduler le développement d'une épidémie et la production de toxines. Certains sont directement liés au parasite : espèces/souches présentes, chémotypes... ; d'autres sont liés à la plante et à l'environnement : stade de développement (notamment post-floraison), résistance variétale, mode de conduite. Enfin, la présence simultanée de plusieurs espèces sur un même épi est susceptible de modifier l'équilibre entre espèces et leur production de toxines.

Cette thèse s'articule donc sur 4 objectifs clés autour de l'épidémiologie de la maladie et qui feront l'objet de 4 chapitres :

- Les champignons responsables de la fusariose rendent compte d'une grande diversité de traits de vie ainsi que d'espèces. Le premier objectif est d'identifier et de quantifier ces traits de vie ainsi que les variables de sévérité sur épi qui leur sont associées afin de définir les liens entre les caractéristiques des souches et leur capacité à se développer ou

produire des toxines dans les grains. Nous étudierons également les variables de sévérité de manière à caractériser les souches selon leur agressivité sur épi.

- La floraison étant considérée comme le stade sensible à la fusariose mais il est probable que des infections tardives soient également très efficaces. Le deuxième objectif de la thèse est donc de caractériser la dynamique de contamination et de colonisation des épis par les champignons. Il permettra de comprendre le risque de contaminations très précoces (avant floraison) et tardives (pendant la formation des grains).
- Les infections multiples sont fréquentes sur un même épi, conduisant à une interaction soit compétitive soit synergique pour le développement de la maladie avec une potentielle modulation de la production de toxines. Le troisième objectif de la thèse sera donc d'étudier l'impact de ces interactions sur le développement des champignons et leur production de toxines.
- Enfin, nous étudierons les mouvements de champignons dans l'épi et regarderons si la présence d'une autre espèce influence ces mouvements.

Références

Alvarez CL, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V, 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology* **158**, 173–181.

Alvarez CL, Somma S, Proctor RH, Stea G, Mulè G, Logrieco AF, Fernandez Pinto V, Moretti A, 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* **3**, 1294-1309.

Andersen AL, 1948. The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. *Phytopathology* **38**,595-611.

Argyris J, TeKrony D, Hershman D, VanSanford D, Hall M, Kennedy B, Rucker M, Edge C, 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Science* **45**, 626–634.

Arsan MR, Eraky Amal MI, 2011. Aggressiveness of certain *Fusarium graminearum* isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production. *Plant Pathology* **10**(1), 36-41.

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. *Journal of Phytopathology* **147**, 577-590

- Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B, Messens K, Höfte M, Haesaert G, 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 445–458.
- Bai G, Shaner G, 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease* **78**, 760–766.
- Bai GH, Desjardins AE, Plattner RD, 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**, 91–98.
- Bottalico, A. Perrone, G. 2002. Toxinogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grains cereals in Europe, *European Journal of Plant Pathology* **108**, 667–673.
- Boussac N, Le Lamer O, Bertrand R, Rousselin X, 2012. *Les marchés de FranceAgriMer : Bilan céréalier & oléo-protéagineux / Campagne 2011-2012 - Perspectives 2012-2013*. Montreuil-sous-Bois, France : FranceAgriMer : Établissement national des produits de l'agriculture et de la mer.
- Boutigny AL, Ward TJ, Van Coller GJ, Flett B, Lamprecht SC, O'Donnell K, Viljoen A, 2011. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology* **48**(9), 914–20.
- Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM, 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 577–587.
- Brown NA, Urban M, Van De Meene AML, Hammond-Kosack KE, 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat spikes. *Fungal biology* **114**, 555–571.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994). *Laboratory manual for Fusarium research*, 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia.
- Caron D, 1993. Les Fusarioses. Dans *Maladies des blés et orges* : ITCF, ed., 30–39.
- Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* **166**, 1389–1415.
- Christ DS, Gödecke R, von Tiedemann A, Varrelmann M, 2011. Pathogenicity, symptom development, and mycotoxin formation in wheat by *Fusarium* species frequently isolated from sugar beet. *Phytopathology* **101**, 1338–1345.
- Covarelli L, Beccari G, Steed A, Nicholson P, 2012. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant Pathology* Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02600.x.
- Cumagun CJR, Bowden RL, Jurgenson JE, Leslie JF, Miedaner T, 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* **94**, 520–526.
- D'Mello JPF, Macdonald AMC, Postel D, Dijksma WTP, Dujardin A, Placinta CM, 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 741–751.
- Desjardins AE, Proctor RH, Bai GH, McCormick SP, Shaner G, Buechley G, Hohn TM, 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**, 775–781.
- De Wolf ED, Madden LV, Lipps PE, 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology* **93**, 428–435.
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM, 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 755–768.
- Fernando WGD, Paulitz TC, Seaman WL, Dutilleul P, Miller JD, 1997. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology* **87**, 414–421.

- Fox EM, Howlett BJ, 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 481–487.
- Gilbert J, Woods SM, Kromer U, 2008. Germination of ascospores of *Gibberella zeae* after exposure to various levels of relative humidity and temperature. *Phytopathology* **98**, 504–508.
- Glynn NC, Hare MC, Parry DW, Edwards SG. 2005. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties *majus* and *nivale* to species status. *Mycol. Res.* 109:872–80.
- Gosman N, Srinivasachary, Steed A, Chandler E, Thomsett M, Nicholson P, 2010. Evaluation of type I *Fusarium* head blight resistance of wheat using non-deoxynivalenol-producing fungi. *Plant Pathology* **59**, 147–157.
- Goswami RS, Kistler HC, 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* **5**(6), 515–525.
- Guenther J, Trail F, 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, **97**(1), 229–237.
- Guo, X. W., Fernando, W. G. D., and Seow-Brock, H. Y. 2008. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Disease* **92**, 756–762.
- Ichinoe M, Kurata H, Sugiura Y, Ueno Y, 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(6), 1364–1369.
- 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.
- Ioos R, Belhadj A, Menez M, Faure A, 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection* **24**, 894–902.
- Jennings P, Coates ME, Turner JA, Chandler EA, Nicholson P, 2004. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathology* **53**, 182–190.
- Le Bail M, Verger P, Doré T, Fourbet JF, Champeil, A, Ioos R, Leblanc JC, 2005. Simulation of consumer exposure to deoxynivalenol according to wheat crop management and grain segregation: Case studies and methodological considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **42**, 253–259.
- Leonard KJ, Bushnell WR, 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.
- Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing.
- Liddell CM, 2003. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. Pages 35–43 in: *Fusarium* head blight of wheat and barley. K. J. Leonard and W. R. Bushnell, eds. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ, 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* **3**, 802–814.
- Mc Mullen M, Jones R, Gallenberg D, 1997. Scab of wheat and barley: A Re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* **81**(12), 1340–1348.
- Meeley RB, Johal GS, Briggs SP, Walton JD, 1992. A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell* **4**, 71–77.
- 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 Breeding* **118**, 97–110.
- Miedaner T, 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* **116**, 201–220.
- Mirocha CJ, Abbas HK, Windels CE, Xie W, 1989. Variation in Deoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, and Zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **55**(5), 1315–1316.

- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA.
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D, 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. *Physiological and molecular plant pathology* **53**, 17-37.
- O'Donnell K, Ward TJ, Abera D, Kistler HC, Aoki T, Orwig N, Kimura M, Bjørnstad A, Klemsdal SS, 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 1514–1522.
- Oerke EC, Meier A, Dehne HW, Sulyok M, Krska R, Steiner U, 2010. Spatial variability of *Fusarium* head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. *Plant Pathology* **59**, 671-682.
- Osborne LE, Stein JM, 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 103– 108.
- Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL, 2004. Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease* **88**, 724-730.
- Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G, 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* **47**(5), 927–931.
- Proctor RH, Desjardins AE, McCormick SP, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW, 2002. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 691-698.
- Rossi V, Ravanetti A, Patteri E, Giosuè S, 2001. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing *Fusarium* head blight. *Journal of Plant Pathology* **83**(3), 189-198.
- Scoz LB, Astolfi P, Reartes DS, Schmale DG, Moraes MG, Del Ponte EM, 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* **58**, 344–351.
- Schwarz PB, Jones BL, Steffenson BJ, 2002. Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **60**(3), 130-134.
- Simpson DR, Weston GE, Turner JA, Jennings P, Nicholson P, 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 421-431.
- Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga H, Tóth B, Varga J, O'Donnell K, 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 1191-1204.
- Sutton JC, 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**, 195–209.
- Trail F, 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology* **149**(1), 103-110.
- Vogelgsang S, Sulyok M, Hecker A, Jenny E, Krska R, Schuhmacher R, Forrer HR, 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 265–276.
- Wagacha JM, Muthomi JW, 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* **26**, 877-885.
- Walter S, Nicholson P, Doohan FM, 2010. Research review: Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* **185**, 54–66.
- Wang JH, Ndoye M, Zhang JB, Li HP, Liao YC, 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* **3**, 1020-1037.

Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* **112**, 143-154.

Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, Edwards SG, 2008b. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* **98**, 69-78.

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

Yoshida M, Nakajima T, 2010. Deoxynivalenol and nivalénol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology* **100**, 763-773.

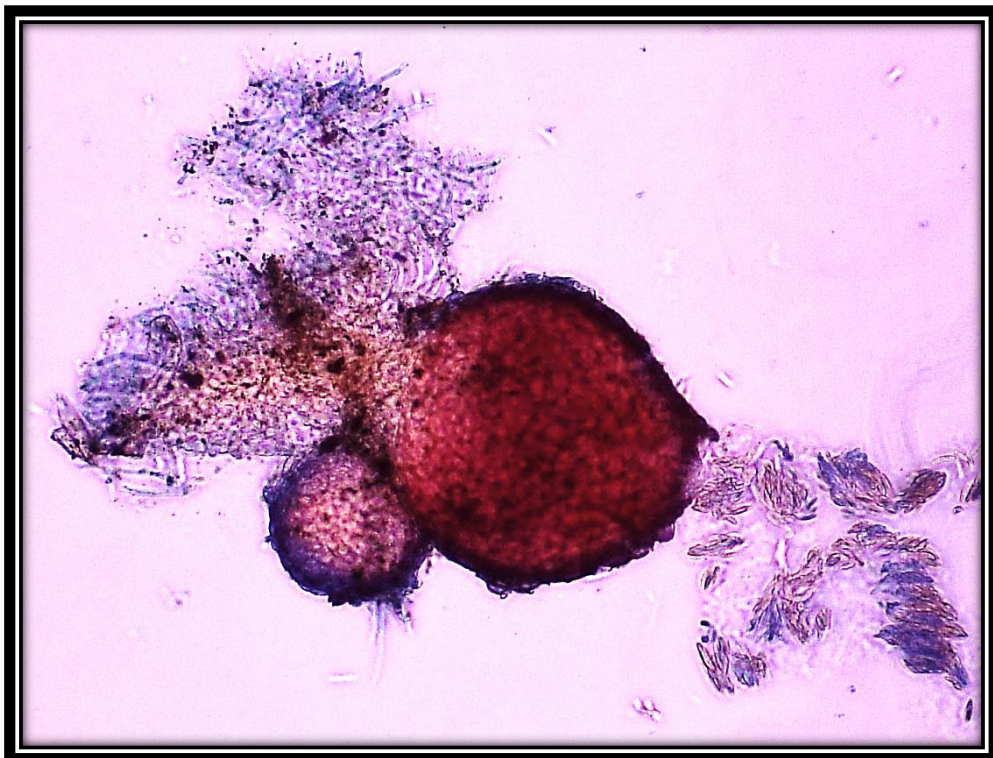
Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, 1974. A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.

Le complexe des maladies des épis et des feuilles supérieures du blé tendre et du blé dur. <http://www.bayer-agri.fr/dossier/cereales-le-point-sur-la-protection-de-lepi-2012/protection-de-lepi-linnovation-prosaror-veille-au-grain/>.

Le blé : Une culture indispensable. http://www.univlehavre.fr/enseign/fst/projets/alternative_desherbages/cultures/cult_bl%E9.html.

CHAPITRE 1 :

CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DES SOUCHES UTILISEES



Introduction

Les agents responsables de la fusariose regroupent plusieurs genres et espèces de champignons qui ont des caractéristiques et traits de vie différents qui peuvent potentiellement influencer leur développement ou leur production de toxines lors d'une épidémie (Picot *et al.*, 2012). Par exemple, le genre *Fusarium* est différent du genre *Microdochium* par sa capacité à produire des mycotoxines. Egalement, dans une région donnée, du fait d'optima de température et d'humidité différents, la distribution et la prédominance d'un ou plusieurs de ces pathogènes est en grande partie liée aux facteurs environnementaux (Xu & Nicholson, 2009). Enfin, Gosman *et al.* (2010) ont montré une croissance plus rapide des individus de chémotype DON dans les épis, vis-à-vis des individus de chémotype NIV. Les nombreuses espèces et souches formant ce complexe fusarien ont fait l'objet de plusieurs travaux d'étude, notamment au niveau de leur différence d'agressivité ou de production de toxines. Au sein des espèces, un effet souche a été étudié par Goswami *et al.* (2005) et Burlakoti *et al.* (2007) qui ont mis en évidence la grande disparité de réponses de souches de *F. graminearum* sur le développement de symptômes sur épi et la production de biomasse et de mycotoxines dans les grains.

Lors de nos expérimentations, nous avons étudié de nombreuses souches d'espèces différentes. Etant donné que dans la littérature ces souches semblent avoir des traits de vie qui influencent leur développement, il a donc été nécessaire de bien identifier ces souches, pour une meilleure compréhension des observations réalisées. Pour cela, nous avons dans une première partie **identifié et mesuré *in vitro* les caractéristiques et les traits de vie** principaux des souches comme leur espèce, leur chémotype, leur taux de croissance en milieu artificiel... En parallèle, nous avons **identifié et mesuré les variables de sévérité** illustrant leur capacité à se développer *in vivo* sur épis et grains. Ensuite, nous avons essayé de mettre en évidence des **liens entre ces traits de vie**, facilement et rapidement mesurables *in vitro*, **et ces mesures de sévérité *in vivo***

de manière à identifier ou non des traits de vie suffisants à la caractérisation du développement et de la production de toxines des souches *in planta*.

Dans une dernière partie, nous avons étudié plus en détails les différentes variables de sévérité et nous avons regardé les relations existant entre elles. Dans la littérature, les relations entre les concentrations en mycotoxines, la biomasse fongique et la quantité de symptômes observés sont complexes, très controversées et très aléatoires selon les auteurs. Ces variables semblent dépendantes de l'environnement (Reid *et al.*, 1999), des espèces de champignon (Reid *et al.*, 1999 ; Simpson *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2005) et même des souches présentes sur la culture (Miedaner *et al.*, 2004 ; Goswami *et al.*, 2005). Plusieurs études, portant sur le lien entre l'évaluation visuelle de la maladie, le développement du champignon et la concentration en mycotoxines, ont montré une forte corrélation entre la biomasse fongique et les symptômes sur épi (Burlakoti *et al.*, 2007), entre la quantité de mycotoxines et la quantité de symptômes sur épis (Snijders & Perkowski, 1990), ou encore entre la quantité de mycotoxines produites et le taux de grains infectés (Liu *et al.*, 1997) et enfin entre la quantité de mycotoxines et la biomasse fongique (Muthomi *et al.*, 2002 ; Abramson *et al.*, 1998 ; Nicholson *et al.*, 1998). Cependant, dans d'autres études, la biomasse fongique n'est pas systématiquement proportionnelle à la quantité de symptômes observés sur épis ou grains, ni à la concentration en mycotoxines (Muthomi *et al.*, 2002 ; Cumagun *et al.*, 2004 ; Alvarez *et al.*, 2010). Dans cette partie nous avons donc regardé **les corrélations entre les différentes variables mesurées *in vivo*** afin de nous faire notre propre idée sur les différentes relations contradictoires de la littérature. Enfin, nous avons utilisé ces données pour **définir et hiérarchiser l'agressivité des souches**.

Dans ce chapitre, nous avons donc i) mesuré les traits de vie et les variables de sévérité propres à chaque isolat étudié. A partir de cela, nous avons essayé de ii) mettre en évidence un ou plusieurs traits de vie des champignons qui pourraient être liés à leur capacité à se développer ou produire des toxines sur épi. Enfin, nous avons étudié les iii) relations entre les

différentes variables de sévérité mesurées afin de caractériser l'agressivité des souches et d'identifier les meilleurs indicateurs de risque de fusariose ou de toxines dans la récolte. L'acquisition de ces connaissances s'est également avérée nécessaire pour faciliter l'interprétation des résultats, pour optimiser les analyses et développer les méthodes les plus appropriées pour étudier cette maladie. Nous avons ouvert nos recherches aux cinq espèces majeures retrouvées en France : *F. graminearum* (fg), *F. culmorum* (fc), *F. poae* (fp), *M. nivale* (mn) et *M. majus* (mm). Dix-sept isolats du genre *Fusarium* et cinq du genre *Microdochium* ont été mis à notre disposition pour cette expérimentation (Cf. Tableau 1).

I. Caractérisation des souches

Les isolats utilisés sont issus des collections INRA de Bordeaux et Versailles. Ils ont été choisis de manière à avoir la plus grande diversité de chémotype et de potentiel toxinogène par rapport au matériel disponible. Les souches mères ont été repiquées, mises en collection et conservées à -80°C dans 20% de glycérol (Cf. Annexe 1).

1. Caractérisation des souches et mesure de leurs traits de vie

En plus de l'**espèce**, et du **chémotype** (majeure toxine produite), les champignons peuvent être caractérisés par leurs traits de vie qui leur sont propres et sont mesurés dans des conditions favorables à leur développement. Ils regroupent : leur **potentiel toxinogène** (capacité à produire des toxines *in vitro*), leur **capacité de sporulation** (quantité de spores produites en milieu de culture) ou encore leur **vitesse de croissance** en milieu de culture.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des mesures de traits de vie des souches étudiées. Ces traits de vie regroupent l'espèce, le chémotype (DON, NIV ou pas de production de toxines (-)), la capacité de sporulation (estimée par la concentration en spores produites en milieu de culture (spores.mL⁻¹)), le potentiel toxino-gène (quantités de toxines produites *in vitro* (ppb) ; les valeurs NA correspondent à des mesures non réalisées) et la vitesse de croissance (estimée par le nombre de centimètres parcourus par les souches en une journée (cm.jour⁻¹)). Ces données ont été obtenues à partir d'expérimentations menées *in vitro*.

Nom de la souche	Espèce	Chémotype	Capacité de sporulation		Potentiel toxino-gène	Vitesse de croissance	
			moyenne	écart type		moyenne	écart type
fg91	<i>F. graminearum</i>	NIV	425000	176777	66	1.215	0.141
fg139	<i>F. graminearum</i>	DON	605000	98995	6	1.068	0.074
fg158	<i>F. graminearum</i>	DON	195000	56569	1	0.915	0.000
fg159	<i>F. graminearum</i>	DON	2700000	494975	3500	0.685	0.007
fg165	<i>F. graminearum</i>	DON	475000	35355	106	1.233	0.124
fg178	<i>F. graminearum</i>	DON	545000	14142	500	0.753	0.110
fg201	<i>F. graminearum</i>	DON	472500	10607	5	0.948	0.138
fc124	<i>F. culmorum</i>	DON	640000	14142	300	1.758	0.032
fc129	<i>F. culmorum</i>	NIV	462500	67175	207	1.783	0.011
fc233	<i>F. culmorum</i>	DON	550000	77782	27	2.293	0.004
fc285	<i>F. culmorum</i>	NIV	98000	80610	2	2.268	0.018
fc317	<i>F. culmorum</i>	NIV	120000	49497	0.67	1.795	0.148
fc337	<i>F. culmorum</i>	NIV	517500	265165	35	1.875	0.035
fp2	<i>F. poae</i>	NIV	730000	360624	NA	1.403	0.053
fp3	<i>F. poae</i>	NIV	2375000	176777	NA	1.703	0.011
fp4	<i>F. poae</i>	NIV	532500	166170	NA	1.485	0.014
fp6	<i>F. poae</i>	NIV	3175000	247487	NA	1.255	0.000
fp14	<i>F. poae</i>	NIV	2925000	247487	NA	1.475	0.021
mn58	<i>M. majus</i>	-	6685000	6102332	0	1.58	0.042
mn221	<i>M. majus</i>	-	9750000	353553	0	0.93	0.057
mn229	<i>M. majus</i>	-	3350000	777817	0	1.598	0.067
mn224	<i>M. nivale</i>	-	0	0	0	1.363	0.180
mn227	<i>M. nivale</i>	-	17000000	1414214	0	1.205	0.085

a. Espèce

L'espèce des souches a été déterminée par observation au microscope optique de la morphologie des spores produites après culture sur un milieu SNA (Spezieller Nährstoffärmer Agar). Nous avons ensuite validé ces données microbiologiques par analyse de l'ADN de chaque souche par Q-PCR (Cf. Annexe 2) avec un système d'amorces et sondes spécifiques de chaque espèce.

b. Chémotype

Chaque souche du genre *Fusarium* dont nous disposons est capable de produire des toxines dont une majoritaire qui définit son chémotype. Le chémotype de chaque souche a donc été identifié par analyse des résultats de toxines obtenus lors des mesures de potentiel toxinogène *in vitro* (Cf. paragraphe c ci-dessous).

c. Potentiel toxinogène

Le potentiel toxinogène des souches correspond à la capacité des souches à produire des toxines *in vitro*. Il a été mesuré par l'unité dont les souches proviennent (équipe Mycsa de l'INRA de Bordeaux). Pour réaliser cette mesure, des grains de blé ont d'abord été humidifiés pendant 4 à 7 jours à 4°C (l'eau recouvrant tout juste la surface des grains), puis très soigneusement égouttés, répartis dans des erlenmeyers (110 g par erlenmeyer de 500 mL) et autoclavés 25 min à 110 °C. Une fois les grains bien imbibés d'eau et stérilisés, ils ont été inoculés avec les souches testées, préalablement incubées pendant 15 jours à 26°C dans 100 mL de milieu GYEP (Glucose Yeast Extract Peptone). Après 21 jours de culture, les toxines produites dans les grains ont été dosées par HPLC. Le potentiel toxinogène correspond alors à la concentration (en ppb ou ng.g⁻¹) de la majeure toxine produite par la souche définissant son chémotype.

d. Capacité de sporulation

La capacité de sporulation des souches a été mesurée par détermination de la concentration en spores produites sur milieu CMC ((carboxy-méthyl-cellulose) liquide pour les *Fusarium* ou sur milieu PDA (potato dextrose agar, 39 g.L⁻¹) pour les *Microdochium* après 4 jours de culture.

Les souches de *Fusarium* et *Microdochium* en conservation ont été repiquées au préalable sur une boîte de Pétri contenant un milieu PDA et cultivées pendant quelques jours, à 19°C, avec une photopériode de 12 heures. Un plug de mycélium a ensuite été prélevé pour chaque souche et transféré dans 50 mL de milieu CMC liquide contenu dans un Erlenmeyer de 100 mL pour les *Fusaria* et sur une boîte de Pétri contenant un milieu PDA pour les *Microdochia*. Pour les *Fusaria*, après 4 jours d'agitation permanente, les suspensions obtenues ont été filtrées séparément à l'aide d'une étamine fine. La concentration en spores a été déterminée après comptage à la cellule de Malassez. Pour les *Microdochia*, après 4 jours de croissance sur le milieu de culture, les spores ont été récoltées par ajout de 5mL d'eau osmosée stérile dans la boîte de Pétri. La concentration en spores a également été déterminée après comptage à la cellule de Malassez. Pour confirmer ces résultats de sporulation, 2 comptages ont été réalisés pour une même suspension de spores ainsi que 2 répétitions pour chaque souche. La capacité de sporulation des souches correspond donc à la concentration en spores, donnée en nombre de spores produites par mL de suspension récoltée.

e. Vitesse de croissance

La mesure de croissance radiale sur boîte de Pétri a permis de déterminer la vitesse de croissance des souches sur boîte. A partir des souches mères en conservation, un repiquage a été réalisé sur milieu PDA sur boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Après quelques jours de croissance, un deuxième repiquage a été fait à l'aide d'un emporte-pièce sur un même milieu PDA. Les boîtes de Pétri ainsi obtenues ont été placées dans une chambre climatique avec une photopériode de 12 heures, une température de 20°C et entre 60 et 70% d'humidité. Pour chaque isolat repiqué, deux diamètres ont été mesurés chaque jour pendant 5 jours. Deux répétitions ont été faites correspondant à 2 boîtes de Pétri par souche. Ces mesures ont permis de déterminer la vitesse de croissance de chaque souche en cm par jour.

f. Liens entre les différents traits de vie quantitatifs mesurés

Les paramètres relatifs aux souches et à leur croissance et production de toxines *in vitro* ont été regroupés dans le tableau 1. Dans les tests de croissance réalisés, seule une souche n'a pas sporulé (mn224). Elle est malgré tout capable de produire des spores puisque nous l'avons utilisée lors d'essais en serre. A partir de ces données, nous avons regardé si la vitesse de croissance, la capacité de sporulation ou le potentiel toxinogène d'une souche sont reliés. La figure 1 illustre les faibles corrélations entre ces 3 variables. Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, les souches produisant le plus de spores ne sont pas forcément les souches qui se développent le plus vite sur boîte (Fig. 1 a). Le fort coefficient de corrélation observé ($r=0.51$) entre le potentiel toxinogène et la vitesse de croissance est majoritairement lié à une souche (fg159) qui se développe peu mais produit beaucoup de toxines *in vitro* (Fig. 1 b). Ainsi, les faibles quantités de toxines produites *in vitro* par certaines souches, comme fg158 ou fg201, ne semblent pas liées à leur capacité à sporuler ou à se développer sur boîte de Pétri.

Ces résultats montrent que la vitesse de croissance d'une souche est indépendante de sa capacité à sporuler et à produire des toxines *in vitro*. A partir de cela, nous pourrions nous attendre à avoir, *in vivo*, une mauvaise corrélation entre les différentes variables de sévérité, comme par exemple une vitesse de croissance sur épi indépendante de la production de toxines dans les épis (Cf. paragraphe III 1).

A partir de ces résultats obtenus *in vitro*, 19 souches ont été conservées pour les expérimentations de manière à conserver une grande diversité dans leurs profils de production de toxines (potentiel toxinogène et chémotype).

2. Mesure des variables de sévérité

Nous avons dans un deuxième temps caractérisé ces 19 souches avec des inoculations sur épi de manière à comparer leurs caractéristiques et traits de vie aux variables de sévérité mesurées *in vivo*. Les données utilisées dans cette partie regroupent les inoculations simples des

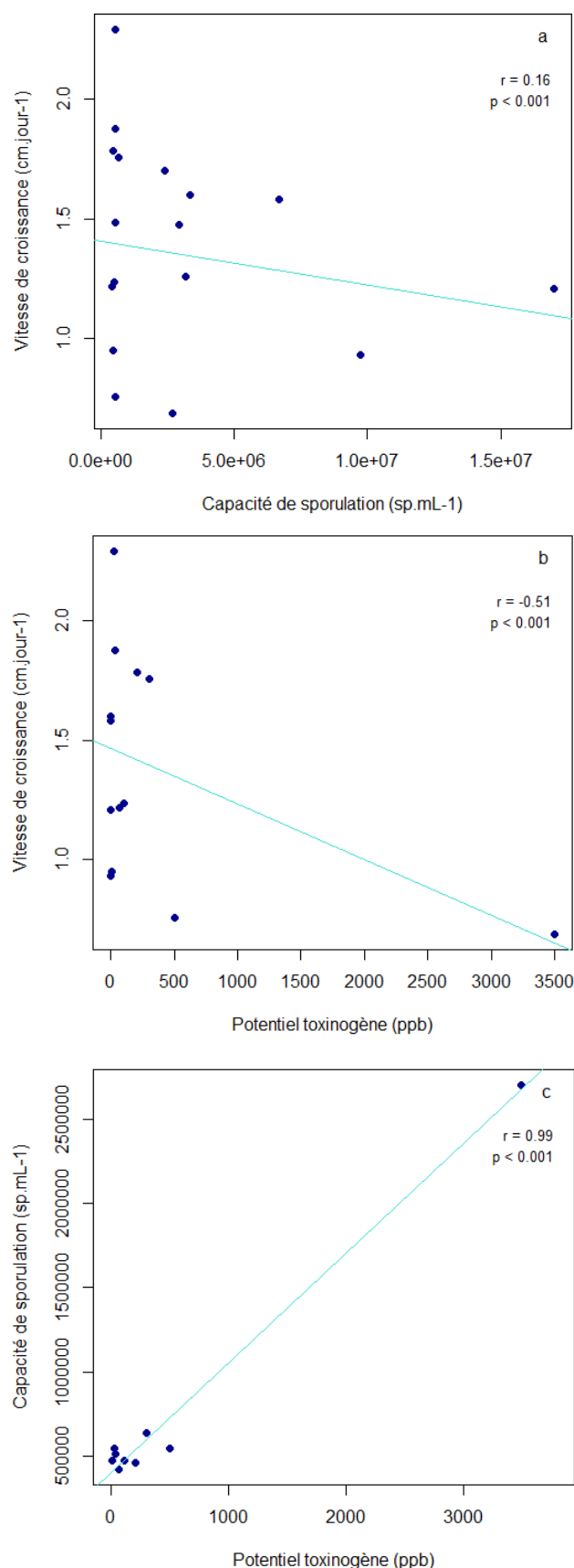


Figure 1 : Corrélations entre la vitesse de croissance, la capacité de sporulation et le potentiel toxinogène mesurés *in vitro* de souches des genres *Fusarium* et *Microdochium*. Ces données ont été obtenues à partir d'expérimentations menées *in vitro*. Les droites représentent les régressions linéaires de chaque corrélation étudiée. La forte corrélation entre la sporulation et le potentiel toxinogène est uniquement liée à une souche (fg159) ; sans cette souche, le coefficient de corrélation est < 0.5 .

expérimentations étudiant les interactions entre souches (Cf. chapitres 3 et 4). A partir de ces inoculations, 5 variables de sévérité ont été mesurées :

- L'AUDPC (Area Under Disease Progression Curve), illustrant les symptômes sur épi et donc le développement des champignons dans l'épi,
- Le pourcentage de grains symptomatiques (PGS) illustre l'impact de la maladie sur grains,
- Le poids de mille grains (PMG) qui permet d'estimer l'intensité de ces attaques sur grains,
- La biomasse fongique, évaluée par Q-PCR, permet d'estimer la réelle colonisation des grains par les champignons,
- La quantité de toxines produites (uniquement pour le genre *Fusarium*).

a. Dispositif expérimental

Les essais ont été réalisés sur du blé de la variété Royssac, très sensible à la fusariose. Les graines ont été semées dans des pots séparés à raison de trois graines par pot, une seule plantule étant conservée. Ensuite, les plantules ont été placées en vernalisation pendant six à huit semaines environ en chambre climatique, à 6-8°C en respectant l'alternance jour / nuit, 10h / 14h. Elles ont été repiquées dans des pots d'un litre avec 2 g de fertilisant N, P, K (Osmocote® Exact 16-11-11N-P-K 3MgO Te) et placées en serre. En serre, les conditions de culture respectent également l'alternance jour / nuit. La durée du jour est de 15h, le blé étant une plante de jours longs, avec un éclairage complémentaire par des lampes à sodium d'environ 400V.m⁻² de 6h à 21h. La température de la serre est de 20°C le jour et 15°C la nuit. Chaque épi a été étiqueté à la sortie des premières anthères afin d'identifier le début de la floraison. Une solution nutritive complémentaire, Hydrokani C2 (Hydro Agri Spécialités, France), a été apportée environ 3 semaines avant le stade épiaison à une dilution au 100^{ème}.

Les plantes ont été protégées contre l'oïdium par des traitements spécifiques à la Métrafénone (Flexity® à 1 mL.L⁻¹; Bayer CropScience, Germany) et contre les insectes avec de la Lambda-cyhalothrine Karaté® Zéon à 0.2 mL.L⁻¹; Syngenta Agro S.A.S., France). Ces produits de protection des plantes ont préalablement été testés et n'ont aucun effet sur la fusariose.

Les souches de *Fusarium* et *Microdochium* ont été cultivées pendant 3 jours, à 19°C, sous une lumière continue, sur milieu PDA (potato dextrose agar, 39 g.L⁻¹) à partir de notre collection. 4 plugs de mycélium ont ensuite été prélevés et transférés dans 250 mL de milieu CMC liquide. Après environ 3 jours d'agitation permanente, les suspensions obtenues ont été filtrées séparément à l'aide d'une étamine fine et ajustées avec de l'eau stérile osmosée à 2.10⁴ spores par mL, après comptage à la cellule de Malassez. Les suspensions de spores ainsi préparées ont ensuite été stockées à 4°C quelques heures jusqu'à l'inoculation. Après chaque inoculation, quelques gouttes de chaque suspension ont été déposées sur un milieu PDA de manière à vérifier la viabilité des spores. Les suspensions ont été considérées viables si les spores contenues dans la suspension germaient et donc induisaient un développement mycélien. Entre 9 et 15 épis ont été inoculés pour chaque modalité testée entre 0 et 18 jours après la sortie des premières anthères. Deux méthodes d'inoculation ont été testées :

- l'inoculation par spray permet d'obtenir une infection optimale de l'épi. Cette méthode est réalisée par vaporisation (Ecospray; Prolabo, France) de 1mL de suspension de spores sur les deux faces de l'épi, dans une cage en plexiglas pour éviter les contaminations croisées. Cette méthode d'inoculation ne permet pas le développement des *Microdochia*, c'est pourquoi nous avons inoculé ces champignons par piqûre et injection d'une goutte de suspension de spores dans chaque épillet de l'épi, permettant pour eux aussi une infection optimale de la totalité de l'épi.
- l'inoculation ponctuelle permet d'évaluer la progression des champignons dans l'épi et informe sur leur capacité de colonisation des épis. Cette méthode a consisté en un dépôt d'une goutte de suspension de spores à l'aide d'une pipette à l'intérieur d'une cavité florale située dans le premier tiers supérieur de l'épi. Avec cette méthode, il est possible de suivre le champignon inoculé par observation de la propagation des symptômes.

Les épis ont ensuite été recouverts d'un sac en polyéthylène transparent pendant 72 h afin de maintenir une humidité relative maximale, nécessaire aux premières étapes de développement du champignon.

b. Mesure de l'AUDPC

Dès l'apparition des premiers symptômes sur épi (une semaine environ), un comptage du nombre d'épillets symptomatiques a été effectué 3 fois par semaine. A partir de ces comptages, le pourcentage d'épillets symptomatiques (PES) par épi a été déterminé au cours du temps, permettant ainsi d'illustrer la cinétique de la maladie sur 20 à 30 jours environ. L'AUDPC illustre la cinétique de progression de la maladie (en pourcentage d'épillets symptomatiques) entre la première et la dernière notation. Dans la mesure où les notations n'ont pas été effectuées à la même date pour l'ensemble des expérimentations, l'AUDPC a été pondérée par le nombre de jours d'observation. L'AUDPC est donnée par la relation suivante : $AUDPC = (\sum_{i=0}^n [(Y_i + Y_{i+1})/2][t_{i+1} - t_i]) / (t_n - t_0)$, avec Y_i le PES à la $i^{ème}$ notation, t_i le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la dernière notation, t_0 = le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la 1^{ère} notation et n le nombre total de notations.

c. Mesure du PGS et du PMG

A maturité, chaque épi a été récolté. Les épis ont été égrainés à la main (uniquement pour les inoculations par spray) de manière à récupérer la totalité des grains, y compris les grains momifiés qui sont très petits et collés aux glumes. La totalité des grains a été comptée et pesée de manière à obtenir le PMG, puis les grains sains et fusariés de chaque épi ont été identifiés et comptés afin de définir le PGS.

d. Mesure de la biomasse fongique

Les grains ont été broyés à l'aide d'un broyeur à billes (MM 400, Retsch®, France) pour obtenir une farine suffisamment fine nécessaire à optimiser les rendements d'extraction d'ADN et de toxines. Pour les inoculations ponctuelles, les épis ont été découpés en 2, la partie supérieure au point d'inoculation et la partie inférieure incluant le point d'inoculation. A partir des analyses de migration des champignons dans l'épi, dont les résultats sont détaillés dans le chapitre 4, nous savons que les champignons ont plutôt tendance à descendre dans l'épi. La

partie supérieure de l'épi regroupant en majorité des épillets échaudés, seules la partie inférieure a été broyée pour analyse.

Les méthodes traditionnelles d'identification morphologique ainsi que les notations peuvent être longues et peu précises dans la distinction des espèces en particulier dans le cadre d'un complexe d'espèces comme celui étudié. Nielsen *et al.* (2011) ont d'ailleurs mis en évidence la nécessité d'une bonne identification et quantification des souches par des techniques précises et fiables de Q-PCR. C'est pourquoi nous avons développé au sein de l'unité, en collaboration avec V. Laval (équipe R-Syst de l'INRA de Grignon), les outils nécessaires à la détection et la quantification des différentes espèces étudiées par Q-PCR. Les protocoles d'extraction et de quantification ont été optimisés de manière à augmenter les rendements, la sensibilité et la spécificité du système (Cf. Annexe 2). La biomasse fongique de chaque échantillon a été estimée par la quantité d'ADN de champignon obtenue par la PCR quantitative rapportée à la quantité d'ADN de plante. Ainsi, les résultats de biomasse fongique ont été exprimés en ng d'ADN fongique par ng d'ADN de plante.

e. Mesure des toxines produites

Afin de limiter la variabilité liée à l'échantillonnage de plusieurs épis, nous avons mis au point une méthode d'extraction de toxines à partir d'un gramme de farine nous permettant de travailler à l'échelle de l'épi. Nous avons également développé et optimisé une méthode de quantification des toxines par une technique de chromatographie en phase liquide (UPLC) couplée à un spectromètre de masse, en collaboration avec C. Repinçay (unité PESSAC de l'INRA de Versailles). Cette technique permet de détecter et quantifier de très faibles quantités de toxines à des concentrations inférieures à 2 ppb et donc de travailler sur ces petites quantités de farines (Cf. Annexe 3). Les quantités de toxines produites dans les grains ont été exprimées en mg par g de farine sèche.

Les relations entre les variables de sévérité seront analysées dans le paragraphe III.

II. Liens entre caractéristiques et traits de vie et mesures de sévérité

La relation entre l'expression des symptômes et le contenu en mycotoxines pourrait être influencée par les traits de vie de l'isolat tel que son potentiel toxigène. Aucune étude n'a mis en parallèle la vitesse de croissance des champignons sur boîte de Pétri et la vitesse de croissance sur épi ou encore le potentiel toxigène d'une souche et la quantité de toxines qu'elle produit dans les grains. C'est pourquoi dans cette partie, nous avons essayé de relier les caractéristiques des champignons facilement et rapidement mesurables *in vitro* à leur développement et leur production de toxines *in vivo* de manière à identifier ou non des traits de vie suffisants à la caractérisation de leur agressivité *in planta*. Les effets espèce, souche, chémotype et potentiel toxigène ont été testés sur les données des inoculations par spray. Par contre, pour la comparaison entre croissance et sporulation *in vitro* et croissance *in vivo*, les données utilisées sont celles des inoculations ponctuelles. En effet, la vitesse de croissance et les capacités de sporulation des souches *in vitro* ont été obtenues à partir d'un point source (plug de mycélium). Ces résultats sont donc plus facilement comparables aux résultats des inoculations ponctuelles qui correspondent à un point unique d'infection par rapport aux multiples points d'infection obtenus lors des inoculations par spray.

1. Effet souche et espèce

Une analyse de variance dont les résultats sont regroupés dans le tableau 2 nous a permis de mettre en évidence un effet principal de l'espèce sur chaque variable de sévérité mesurée (AUDPC, PMG, PGS, biomasse fongique, production de toxines) avec aucune différence significative entre *F. graminearum* et *F. culmorum* et entre *M. majus* et *M. nivale* (test de Tukey HSD, $p > 0.05$), les deux *Fusaria* présentant des niveaux plus élevés de sévérité. L'espèce *F. poae* s'est révélée significativement moins agressive que les autres *Fusaria* avec

Tableau 2 : Analyse de variance, pour chaque variable de sévérité étudiée (AUDPC, PMG, PGS, biomasse fongique et toxines produites), 3 sources de variabilité ont été testées : l'expérimentation (Exp), l'espèce de champignon inoculée (Esp) et l'isolat (Iso) dans chaque espèce. 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Source de variabilité	Df	MS	F-value	p-value
AUDPC				
Exp (A)	1	0.972	42.434	< 0.001 ***
Esp (B)	4	4.062	177.275	< 0.001 ***
Iso dans Esp (C)	12	0.435	18.99	< 0.001 ***
A x B	4	0.363	15.852	< 0.001 ***
A x C	6	0.217	9.455	< 0.001 ***
Résidus	327	0.023		
PMG				
Exp (A)	1	2418	28.632	< 0.001 ***
Esp (B)	4	6238	73.876	< 0.001 ***
Iso dans Esp (C)	12	570	6.749	< 0.001 ***
A x B	4	74	0.876	0.479
A x C	6	538	6.367	< 0.001 ***
Résidus	327	84		
PGS				
Exp (A)	1	0.1998	7.025	0.008 **
Esp (B)	4	1.103	38.784	< 0.001 ***
Iso dans Esp (C)	12	0.2981	10.48	< 0.001 ***
A x B	4	0.0958	3.369	0.010 *
A x C	6	0.1658	5.83	< 0.001 ***
Résidus	326	0.0284		
Biomasse fongique				
Exp (A)	1	0.06498	10.545	0.001 **
Esp (B)	4	0.14956	24.272	< 0.001 ***
Iso dans Esp (C)	12	0.05553	9.012	< 0.001 ***
A x B	4	0.08711	14.137	< 0.001 ***
A x C	6	0.13556	21.999	< 0.001 ***
Résidus	178	0.00616		
Toxines				
Exp (A)	1	0.03987	13.805	< 0.001 ***
Esp (B)	2	0.14475	50.118	< 0.001 ***
Iso dans Esp (C)	9	0.07451	25.799	< 0.001 ***
A x B	2	0.00784	2.714	0.070
A x C	6	0.03002	10.393	< 0.001 ***
Résidus	129	0.00289		

des quantités de biomasse et de toxines très faibles mais significativement différentes de zéro (test de Student, $p < 0.001$). L'effet isolat reflète les différences d'agressivité entre les souches choisies et donc les disparités dans leur développement et leur production de toxines. L'influence de l'expérimentation sur les différentes variables étudiées reflète un meilleur développement des champignons en 2011 avec des niveaux d'AUDPC, PMG, biomasse fongique et toxines significativement supérieurs qu'en 2010 ($p < 0.05$). Enfin, les interactions observées peuvent être liées au fait que nous n'avons pas utilisé exactement les mêmes souches d'une année sur l'autre. Ces effets principaux de l'espèce et de l'isolat ont également été mis en évidence par Xu *et al.* (2007) qui ont observé une plus faible quantité de symptômes produits par les souches de *F. poae* comparé aux souches de *F. graminearum* ou *F. culmorum* et Alvarez *et al.* (2010) qui ont montré des différences d'agressivité (AUDPC) entre souches de la même espèce. Les différences entre souches et espèces ayant été confirmées par l'analyse de variance, ce sont des caractéristiques des champignons qui influencent significativement chaque variable de sévérité mesurée en serre.

2. Effet chémotype

Pour tester l'effet du chémotype sur les variables de sévérité, seules les souches productrices de toxines ont été utilisées. De plus, étant donné qu'une plus faible agressivité des souches de *F. poae* vis-à-vis des autres souches de *Fusarium* a été mise en évidence, et afin d'éviter toute redondance avec l'effet espèce, nous avons réalisé cette analyse uniquement sur les souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* (tableau 3). Les souches de chémotype DON se sont significativement plus développées sur épi (AUDPC) et ont en moyenne produit davantage de toxines que les individus de chémotype NIV ($p < 0.05$). Cet effet chémotype a également été mis en évidence par Gosman *et al.* (2010) avec une propagation plus lente de leurs souches de chémotype NIV dans l'épi. Cependant, dans notre étude, une souche de chémotype DON (fg159) s'est significativement (test de Tukey HSD ; $p < 0.05$) moins développée que d'autres

Tableau 3 : Analyse de variance, pour chaque variable de sévérité étudiée (AUDPC, PMG, PGS, biomasse fongique et toxines produites), 3 sources de variabilité ont été testées : l'expérimentation (Exp), l'espèce de champignon inoculée (Esp) et le chémotype de la souche (Chemo). Seules les souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* ont été utilisées dans cette analyse. 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Source de variabilité	Df	MS	F-value	p-value
AUDPC				
Exp (A)	1	1.6217	29.731	< 0.001 ****
Chemo (B)	1	0.2864	5.251	0.023 *
A x B	1	0.0004	0.007	0.931
Résidus	211	0.0545		
PMG				
Exp (A)	1	1099	8.561	0.004 **
Chemo (B)	1	176.1	1.372	0.243
A x B	1	25.2	0.197	0.658
Résidus	211	128.4		
PGS				
Exp (A)	1	0.0559	1.607	0.206
Chemo (B)	1	0.06029	1.733	0.189
A x B	1	0.00587	0.169	0.682
Résidus	211	0.03479		
Biomasse fongique				
Exp (A)	1	0.27202	12.261	< 0.001 ****
Chemo (B)	1	0.06642	2.994	0.086
A x B	1	0.05713	2.575	0.111
Résidus	115	0.02219		
Toxines				
Exp (A)	1	0.07555	9.609	0.002 **
Chemo (B)	1	0.29962	38.109	< 0.001 ****
A x B	1	0.02946	3.747	0.055
Résidus	114	0.00786		

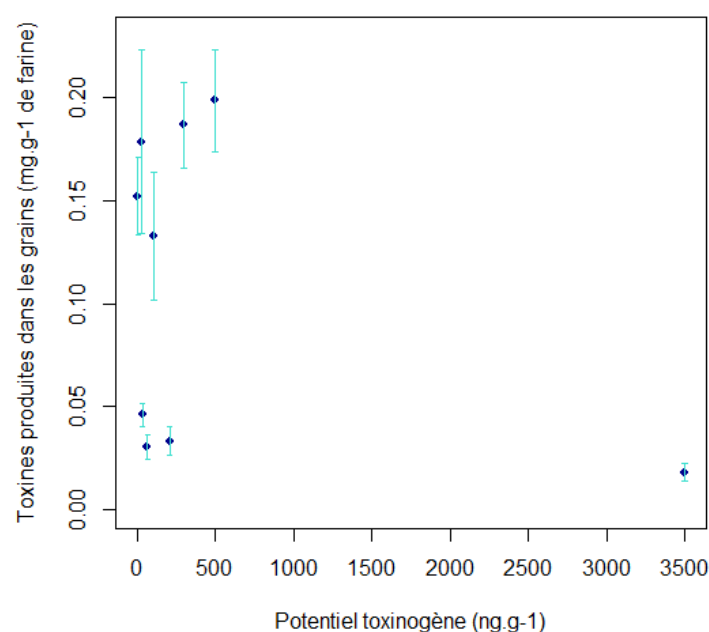


Figure 2 : Relations entre les toxines produites *in vivo* (toxines produites dans les grains (mg.g^{-1} de farine)) et *in vitro* (potentiel toxinogène en (ng.g^{-1})) par les souches de *Fusarium* étudiées. Chaque point représente la moyenne des valeurs de toxines produites dans les grains pour chaque valeur de potentiel toxinogène. Les toxines produites dans les grains ont été déterminées par UPLC-MSMS.

souches de chémotype NIV (fc129, fc337) avec des valeurs d'AUDPC en moyenne plus faibles. Cet effet chémotype sur le développement des souches est donc à vérifier avec davantage de souches et à pondérer selon leur agressivité.

3. Lien entre potentiel toxinogène et toxines produites dans l'épi

D'après nos résultats d'analyse, le potentiel toxinogène s'est révélé mauvais indicateur de la production de toxines dans les grains ($r = -0.27$, $p > 0.05$; Fig. 2). Alvarez *et al.* (2010) ont également mis en évidence l'absence de relation entre toxines obtenues *in vitro* et celle réellement produites par les champignons *in vivo*.

4. Lien entre vitesse de croissance et sporulation et sévérité mesurée sur épi et grains

Nous avons, dans cette partie, regardé les relations existantes entre le développement des champignons sur boîte de Pétri (vitesse de croissance) et sur épi (AUDPC) et grains (biomasse fongique). Aucune corrélation significative n'a été observée entre ces variables ($p < 0.05$; Fig. 3 a et b). De même, les relations entre l'AUDPC ou la biomasse fongique et la sporulation des souches *in vitro* montrent des coefficients de corrélations faibles et pour la plupart ne sont pas significatives (Fig. 3 c et d). Ces différences de croissance entre un milieu artificiel (sur feuille détachée) et naturel (sur épi) ont également été retrouvées par Nopsa (2010) ce qui renforce le manque de cohérence entre les résultats d'expérimentations *in vitro* versus *in vivo*.

Ces résultats montrent que les paramètres de croissance, de sporulation ou encore de potentiel toxinogène mesurés *in vitro* ne sont pas de bons estimateurs du développement des souches sur épi et grains et donc ne pourraient pas être utilisés pour estimer leur agressivité ou leur production de toxines *in planta*. L'espèce et l'isolat sont les facteurs principaux expliquant la variabilité des mesures effectuées en serre, il est donc

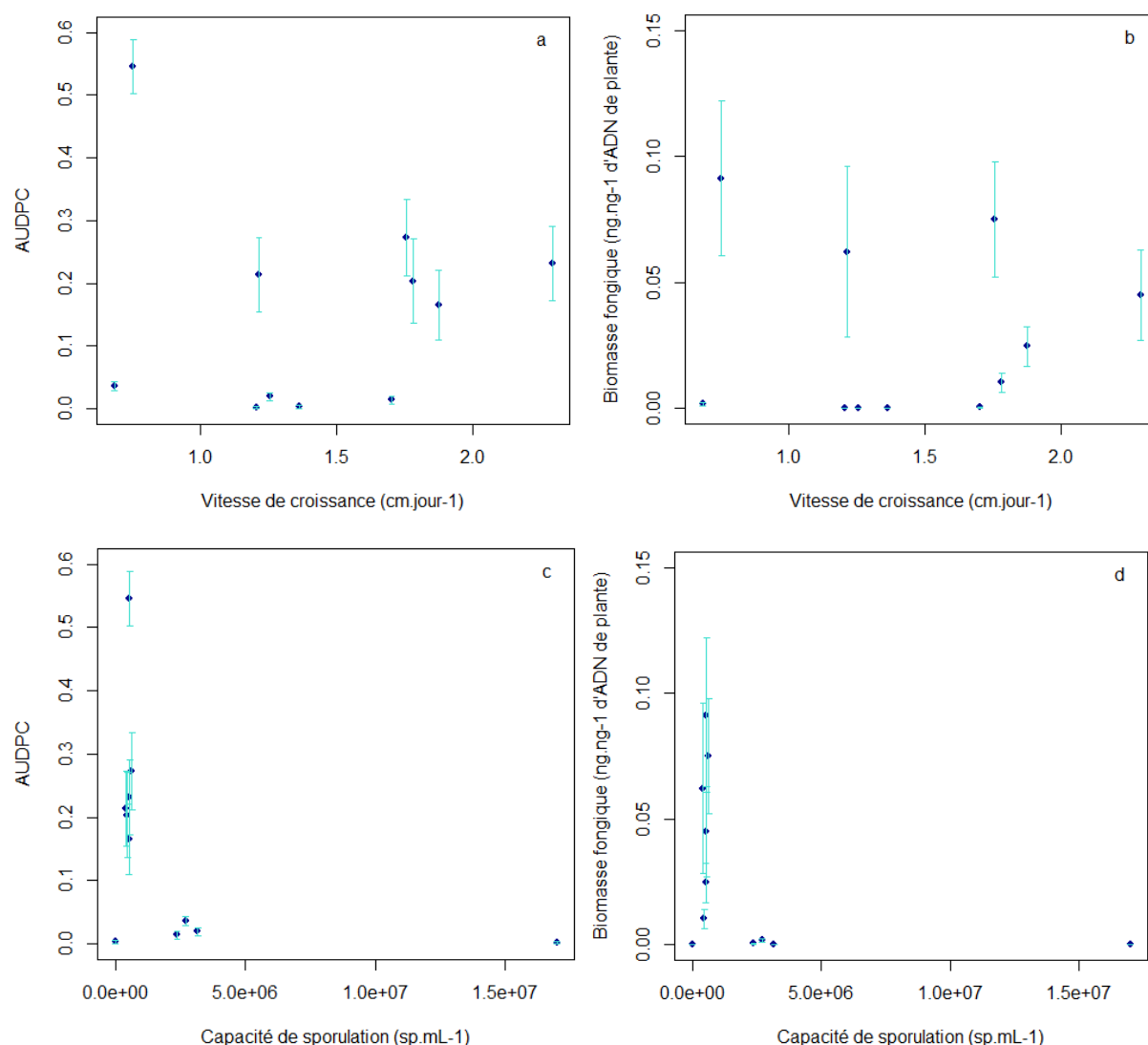


Figure 3 : Relations entre l’AUDPC ou la biomasse fongique dans les grains et la vitesse de croissance *in vitro* et la capacité des souches à sporuler. Chaque point représente la moyenne des valeurs d’AUDPC ou de biomasse fongique pour chaque valeur de vitesse de croissance ou de capacité à sporuler. La biomasse fongique a été déterminée par Q-PCR.

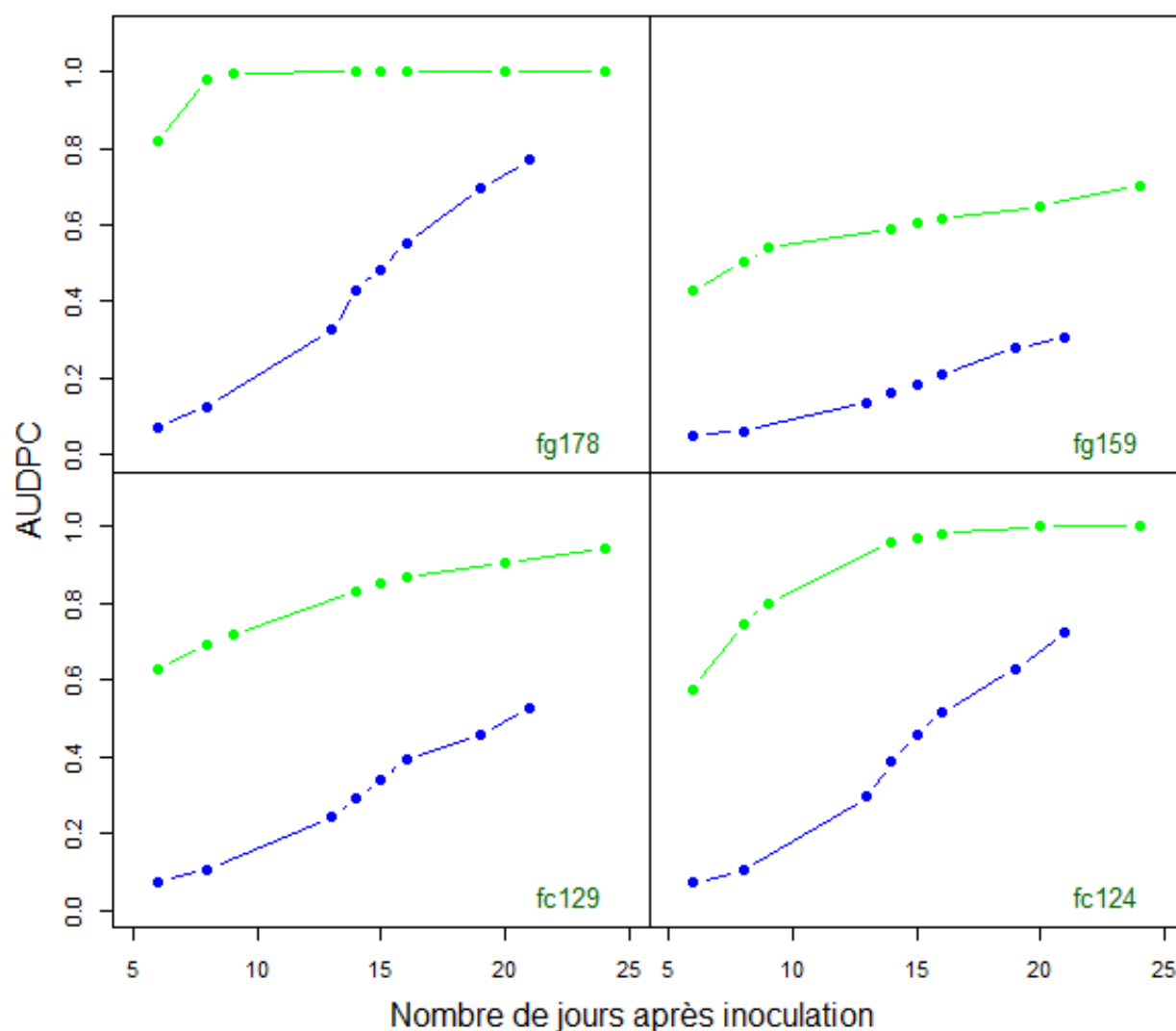


Figure 4 : Cinétiques d'apparition de symptômes de fusariose sur des épis de blé inoculés avec 4 souches différentes de *Fusarium* (fg178, fg159, fc124 et fc124). Les cinétiques en vert illustrent des cinétiques moyennes de 9 épis inoculés par spray ; les cinétiques en bleu illustrent des cinétiques moyennes de 10 épis inoculés par inoculation ponctuelle.

nécessaire de bien les identifier à chaque expérimentation. Enfin, l'effet de l'expérimentation reflète l'importance des conditions environnementales dans l'expression de la maladie.

III. Corrélations entre variables de sévérité

1. Corrélations entre les différentes variables de sévérité

Les inoculations ponctuelles permettent d'illustrer les capacités des souches à coloniser les épis tandis que les inoculations par spray informent sur l'efficacité d'infection de ces souches. Les valeurs d'AUDPC et de biomasse fongique obtenues lors des inoculations ponctuelles sont plus faibles que les valeurs obtenues lors des inoculations par spray (Fig. 4). Malgré cette différence, l'AUDPC reste proportionnelle entre les deux méthodes d'inoculation utilisées, c'est-à-dire que les souches les plus agressives le sont quelque soit le type d'inoculation tout comme les moins agressives. C'est pourquoi, par simplification, seuls les résultats issus des inoculations par spray seront utilisés dans ce paragraphe.

Selon les données récoltées en 2010 et 2011, toutes les variables étudiées sont significativement bien corrélées entre elles avec des coefficients de corrélation supérieurs à ± 0.5 . Il est à noter que pour les corrélations impliquant des données de toxines, seules les souches de *Fusarium* ont été utilisées puisque ce sont les seules à produire des toxines. La figure 5 illustre les corrélations entre l'AUDCP et le PMG ($r=-0.71$, $p<0.001$; Fig. 5 a), la biomasse fongique ($r=0.78$, $p<0.001$; Fig. 5 b) et les toxines ($r=0.79$, $p<0.001$; Fig. 5 c). L'AUDPC apparaît comme un bon indicateur de l'agressivité des souches sur épi et grains, de leur impact sur le rendement (PMG), sur leur développement dans les grains (biomasse fongique) et leur production de toxines. Cependant, le meilleur candidat pour estimer la

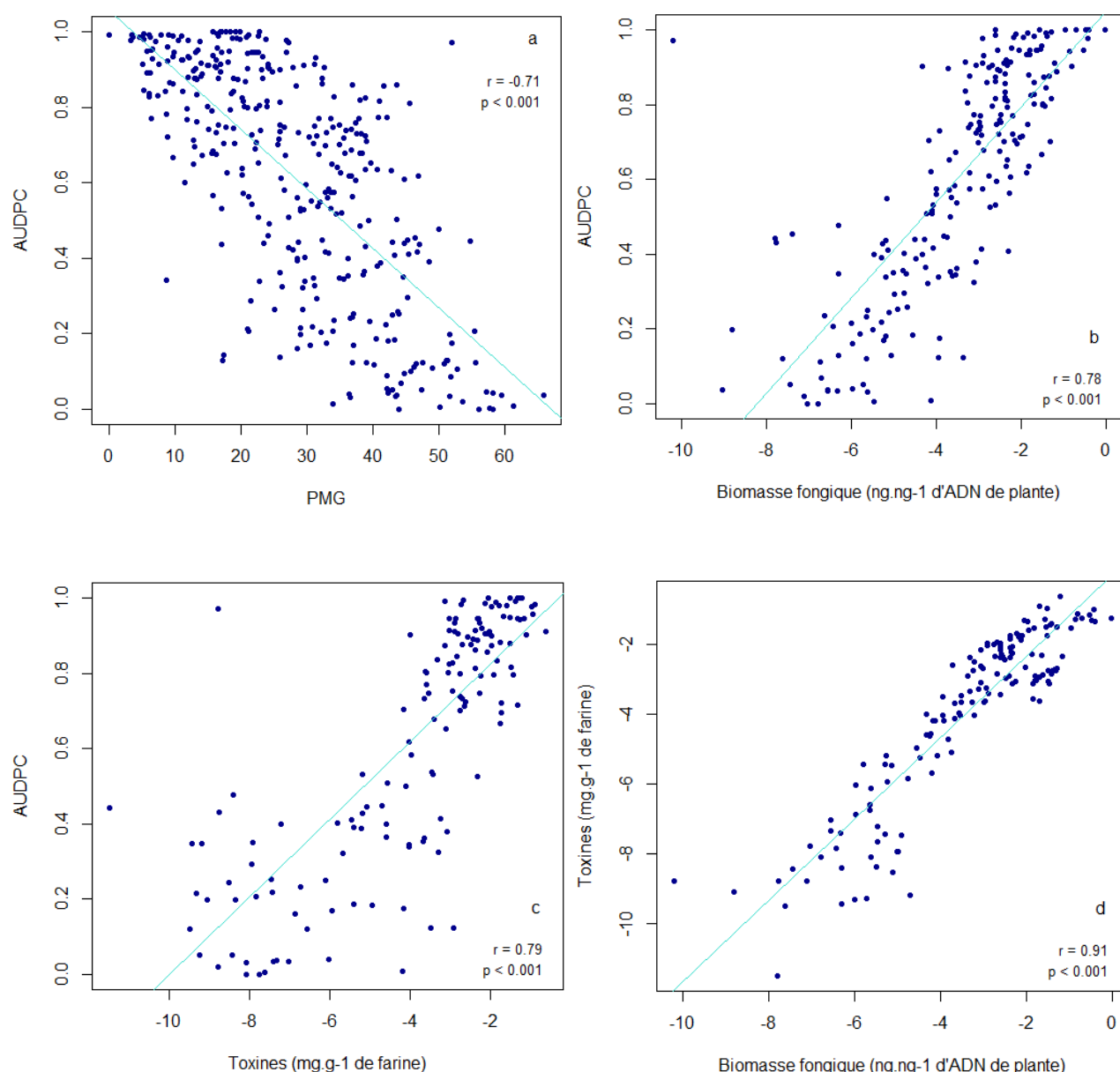


Figure 5 : corrélations entre l’AUDPC et le PMG, la biomasse fongique et la quantité de toxines produites et entre la biomasse fongique et la quantité de toxines produites. Ces données ont été obtenues à partir de l’analyse d’épis de blé inoculés par spray par plusieurs souches de *Fusarium* et *Microdochium* en 2010 et 2011. La biomasse fongique a été déterminée par Q-PCR. Les toxines produites dans les grains ont été déterminées par UPLC-MSMS. Ces modèles sont basés sur une transformation logarithmique de la biomasse fongique et des toxines produites. Il est à noter que les données de toxines utilisées ne concernent que les inoculations avec les souches de *Fusarium* (seules à produire des toxines).

quantité de toxines dans la récolte reste la biomasse fongique ($r=0.91$; $p < 0.001$; Fig. 5 d). Le PGS s'est révélé dans notre étude moins bien corrélé aux autres variables étudiées avec des coefficients de corrélations plus faibles ($r < 0.65$). Lors des mesures de PGS, l'intensité des attaques n'est pas prise en compte. Un grain très fusarié et donc chétif va être considéré symptomatique au même titre qu'un grain faiblement fusarié, juste coloré mais de taille et poids proches d'un grain non fusarié. Ceci pourrait expliquer pourquoi le PGS est moins bien corrélé aux autres variables de sévérité (PMG, AUDPC, biomasse fongique).

Ainsi, les variables de sévérité sont apparues dans cette étude bien corrélées entre elles.

L'AUDPC est une mesure facile et rapide à réaliser comparé aux autres variables de sévérité. Etant bien corrélée à toutes ces variables, nous l'avons choisie pour caractériser et hiérarchiser l'agressivité des souches sur épi et grains (Cf. paragraphe III 3). Toutefois, Paul *et al.* (2005) ont réalisé une méta-analyse regroupant différentes analyses statistiques concernant la relation entre les estimations visuelles de la fusariose et l'accumulation de DON dans les grains récoltés. Dans cette analyse, plusieurs cas de figures ont été reportés allant d'une corrélation positive et significative jusqu'à des corrélations négatives voire nulles. Il est à noter que nos expérimentations ont été réalisées dans des conditions optimales d'infection en serre avec de simples inoculations et au stade de sensibilité maximale de la plante à la fusariose (autour de la floraison). On peut donc supposer que la relation symptômes-biomasse fongique-toxines n'est pas stable et dépend de plusieurs facteurs, comme la température ou l'humidité (Xu *et al.*, 2007), le stade de la plante (Cf. Chapitre 2) ou encore des interactions entre souches qui pourraient modifier leur équilibre et leur production de toxines (Cf. chapitres 3 et 4).

2. Classement des souches

A partir des résultats précédents mettant en évidence les différences entre souches, nous avons souhaité classer ces souches de manière à identifier des souches plus ou moins agressives. Les

différentes variables de sévérité étant bien corrélées (Cf. paragraphe précédent), nous avons choisi d'utiliser l'AUDPC pour les différencier puisque cette mesure est facile à mettre en œuvre et souvent utilisée pour caractériser l'agressivité d'une souche (Alvarez *et al.*, 2010).

Tout d'abord, nous avons comparé les capacités de chaque souche à coloniser les épis en comparant les valeurs d'AUDPC obtenues lors des inoculations ponctuelles. Les souches de *F. poae* et fg159 se sont développées moins vite que les autres avec des valeurs moyennes d'AUDPC inférieures à 0.05 (Test de Tukey HSD ; $p < 0.05$). Les *M. nivale* ne se sont pas du tout développés avec des valeurs d'AUDPC non significativement différentes de zéro (test de Student ; $p > 0.05$). Ces souches sont donc de mauvaises colonisatrices des épis. Parmi les autres souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* seul fg178 s'est significativement développé plus vite que les autres avec une moyenne d'AUDPC de 0.55.

Pour compléter cette analyse, nous avons ensuite analysé les données issues des inoculations par spray en 2010 et 2011 qui informent sur l'efficacité d'infection des souches et sur leur colonisation des épis. Globalement, les valeurs d'AUDPC mesurées en 2010 étaient significativement plus faibles qu'en 2011, illustrant l'effet environnemental sur le développement des champignons (test de Tukey HSD ; $p < 0.05$). Les inoculations par spray ont, comme les inoculations ponctuelles, différencié les souches de *F. poae* avec des valeurs d'AUDPC moyenne inférieures à 0.3. Les souches de *Microdochium* présentent des AUDPC moyennes comprises entre 0.5 et 0.75. Elles restent malgré tout difficiles à comparer aux autres souches puisque l'inoculation optimale s'est faite par une série de piqûres étant donné que les inoculations par spray n'induisent aucune infection. La souche fg159 s'est plus développée que les souches de *F. poae* avec des valeurs d'AUDPC significativement supérieures. Par contre, elle s'est significativement moins développée que les autres souches de *F. graminearum* et *F. culmorum*. Concernant les autres souches de *F. graminearum* et *F. culmorum*, certaines souches présentant une AUDPC moyenne comprise entre 0.5 et 0.6 en 2010 (fg165, fg91 et fc129) se sont révélées beaucoup plus agressives en 2011 avec des AUDPC supérieures à 0.8. Enfin, les

dernières souches (fc124, fc233, fc337, fg201 et fg178) ont présenté des AUDPC très élevées chaque année et plus particulièrement fg178, avec des valeurs d'AUDPC significativement plus élevées que les autres en 2010 (test de Tukey HSD, $p < 0.05$).

A partir de ces observations, il a été possible de définir 4 catégories de souches :

- catégorie 1 (-) : regroupe les souches de *Microdochium*, qui se développent pas ou très peu dans l'épi et dont l'efficacité d'infection est quasi nulle, lié à un problème d'inoculation.
- catégorie 2 (+) : regroupe les souches qui sont faiblement agressives dans leur colonisation et dans leur efficacité d'infection, soit les souches de *F. poae* et fg159.
- catégorie 3 (++) : regroupe les souches dont la colonisation des épis est rapide mais dont l'efficacité d'infection est variable selon l'année. Ces souches correspondent à fg165, fg91 et fc129.
- catégorie 4 (+++) : regroupe les souches à forte colonisation et efficacité d'infection quelque soit l'année. Ces souches correspondent à fc124, fc233, fc337, fg201 et fg178.

Ces différentes catégories déterminées et correspondant à des critères d'agressivité sur épi croissants seront utilisées dans les chapitres suivants afin de différencier les souches entre elles selon leur agressivité sur épi illustrée par des valeurs moyennes d'AUDPC différentes. Bai *et al.*, 2001 ont mis en évidence le rôle du DON dans la propagation des souches dans l'épi. Les très faibles valeurs d'AUDPC et de toxines produites par les souches des catégories 1 et 2 (*Microdochium spp*, *F. poae* et fg159) seraient donc en accord avec cette hypothèse et pourraient être un premier élément expliquant les difficultés de ces champignons à se propager d'épillet en épillet.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les souches étudiées, mesuré leurs différents traits de vie *in vitro* et caractérisé leur sévérité sur épi. A partir de ces données, nous avons observé que

la vitesse de croissance d'une souche était indépendante de ses capacités à produire des spores ou des toxines. Egalement, l'espèce et l'isolat sont les facteurs principaux expliquant la variabilité des mesures effectuées en serre. Un effet chémotype a également été mis en évidence avec une production de toxines par les souches de chémotype DON supérieure à celle des souches de chémotype NIV. Enfin, étant donné qu'il nous a été impossible de corréler les traits de vie illustrant la croissance, la sporulation et le potentiel toxigène des souches, aux variables de sévérité (AUDPC, biomasse fongique et production de toxines), **il semble difficile de caractériser par des mesures de traits de vie *in vitro* l'agressivité des souches et leur productivité en toxines *in planta*.**

En parallèle, nous avons regardé les corrélations entre les différentes variables de sévérité. Contrairement aux traits de vie, ces variables se sont révélées bien corrélées entre elles. L'AUDPC étant facile et rapide à mesurer, nous l'avons choisie pour caractériser l'agressivité des souches sur épi et grains et les hiérarchiser. La biomasse fongique reste, toutefois, le meilleur estimateur de la quantité de toxines produites dans les grains dans nos conditions d'expérimentation. Ces corrélations entre variables de sévérité sont parfois contradictoires dans la littérature et montrent que d'autres facteurs peuvent intervenir dans le développement de la maladie comme le stade de la plante (Cf. chapitre 2) ou des interactions entre champignons (Cf. chapitres 3 et 4).

Références

Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR, 1998. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology* **45**, 217-224.

Alvarez CL, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V, 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology* **158**, 173–181.

Bai GH, Desjardins AE, Plattner RD, 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**, 91–98.

Burlakoti RR, Estrada RJ, Rivera VV, Boddada A, Secor GA, Adhikari TB, 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology* **97**, 835-841.

- Cumagun CJR, Bowden RL, Jurgenson JE, Leslie JF, Miedaner T, 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* **94**, 520-526
- Gosman N, Srinivasachary, Steed A, Chandler E, Thomsett M, Nicholson P, 2010. Evaluation of type I *Fusarium* head blight resistance of wheat using non-deoxynivalenol-producing fungi. *Plant Pathology* **59**, 147-157.
- Goswami RS, Kistler HC, 2005. Pathogenicity and *in planta* mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* **95**, 1397-1404.
- Liu W, Elen ON, Sundheim L, Langseth W, Skinnes H, 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* **103**(7), 589-595.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 63-70.
- Muthomi JW, Oerke EC, Dehne HW, Mutitu EW, 2002. Susceptibility of Kenyan wheat varieties to head blight, fungal invasion and deoxynivalenol accumulation inoculated with *Fusarium graminearum*. *J. Phytopathology* **150**, 30-36.
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D, 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. *Physiological and molecular plant pathology* **53**, 17-37.
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN, 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* **101**, 960-969.
- Nopsa JFH, 2010. *Fusarium* head blight: winter wheat cultivar responses and characterization of pathogen isolates. Lincoln, Nebraska: University of Nebraska, PhD thesis.
- 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**, 1225-1236
- Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C, 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* **61**, 140-151.
- Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW, 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* **89**, 1028-1037.
- 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*. *Environmental Microbiology* **6**(1), 79-87.
- Snijders CHA, Perkowski J, 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* **80**, 566-570.
- Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* **112**, 143-154.
- Xu XM, Monger W, Ritieni A, Nicholson P, 2007b. 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 Pathology* **56**, 943-956.
- Xu XM, Nicholson P, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 83-103.

CHAPITRE 2 :

EFFECT OF WHEAT SPIKE INFECTION
TIMING ON *FUSARIUM* HEAD BLIGHT
DEVELOPMENT AND MYCOTOXIN
ACCUMULATION



Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence les différences entre espèces et entre souches illustrées par une importante hétérogénéité de leurs traits de vie et des variables de sévérité (Chapitre 1). C'est pourquoi dans l'ensemble de nos expérimentations présentées dans les chapitres suivants, nous avons utilisé plusieurs souches et espèces différentes de manière à prendre en compte la diversité du complexe fusarien.

La fenêtre de sensibilité du blé à la fusariose a été bien caractérisée et centrée sur la mi-floraison du blé, c'est-à-dire lorsque 50% des anthères sont extrudées. Pourtant, des infections avant floraison sont possibles mais également pendant, en fin de floraison et après. Ces situations ont été jusqu'à présent peu étudiées et la présence récurrente de toxines dans les récoltes sans symptômes visibles au champ suggère que cette fenêtre de sensibilité peut selon les conditions être plus étendue.

Cette expérimentation a donc pour but d'étudier i) la dynamique de croissance ainsi que l'impact du développement des champignons dans un épi de blé ii) ainsi que l'incidence de ce développement sur la présence de toxines dans les grains. iii) Enfin, l'utilisation de plusieurs espèces et de plusieurs souches, caractérisées dans le chapitre précédent, permettra de valider et d'étendre ou non cette fenêtre de sensibilité du blé à plusieurs espèces du complexe fusarien.

Après inoculation des souches de *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. poae* par spray sur des épis à 5 dates différentes : avant, pendant et après la floraison, des notations sur épi et sur grains ont été effectuées. La quantité de champignon et les teneurs en toxines ont été analysées sur ces échantillons. Cette expérimentation a été menée deux années de suite en serre, sur la même variété de blé Royssac.

Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation

Siou D.¹, Gélisse S.¹, Laval V.¹, Repinçay C.², Suffert F.¹, Lannou C.¹

¹ INRA, UMR1290 BIOGER, F-78850 Thiverval-Grignon

² INRA, UR 251 PESSAC, RD 10- 78026 Versailles Cedex

Submitted to Plant Pathology

Abstract

Mycotoxins in mature wheat kernels are usually correlated with symptoms produced by *Fusarium* infection. The fungi that cause the disease may infect head tissues from flowering to late stages of kernel development and a better understanding of the influence of the time of infection on yield, fungal development and mycotoxin accumulation is needed. We investigated in a greenhouse experiment, the development of eight well characterized strains of three *Fusarium* species, *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae* inoculated by spray on spikes of winter wheat 3 days before or 0, 8, 18 and 28 days post anthers extrusion. The disease levels were estimated complementary by the AUDPC, the thousand kernels weight (TKW), the fungal DNA by qPCR and the toxin concentrations (Deoxynivalenol, DON and Nivalenol, NIV) by UPLC-UV/MSMS.

The highest fungal DNA levels and toxin concentrations were found around anthesis (F0 and F8). A difference between aggressive and low aggressive isolates was observed with a greater impact of the inoculation date on the aggressive isolates development. The inoculation date appeared to condition the intensity of attacks with higher disease levels for inoculations performed at F0. Early or late contaminations were possible with aggressive isolates and led to lower disease levels but these infections were source of detectable amounts of toxins in the harvested kernels which could explain a rise of disease late when conditions become again favourable.

Key words: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, flowering date

Introduction

Fusarium head blight (FHB) is one of the most destructive diseases of wheat. It is distributed worldwide and caused by several species of the genus *Fusarium* and *Microdochium*. Among the 19 species identified as potentially responsible for FHB, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *M. nivale*, and *M. majus* are the most frequent in Europe (Xu & Nicholson, 2009, Ioos *et al.*, 2005). FHB induces quantitative yield losses and can result in the contamination of the kernels with mycotoxins, such as Deoxynivalenol (DON) or Nivalenol (NIV) (Mc Mullen *et al.*, 1997). Anthesis is the most susceptible stage for *Fusarium* infection, especially when anthers are mature and begin to senesce (Parry *et al.*, 1995). At anthesis, the opening of the florets allows the fungal hyphae to colonize the caryopsis more easily and promote the systemic colonization of the spike (Brown *et al.*, 2010). Moreover, anthers contain high levels of nutrients that are known to stimulate the growth of *Fusarium* hyphae (Strange *et al.*, 1974).

The fungus can infect the plant through other ways such as the adaxial surface of the glumes, the lemma or the palea or even through a wound in the chaff (Bai & Shaner, 1994; Brown *et al.*, 2010; Goswami *et al.*, 2004). In the field, spore production and release from infected debris can occur anytime before and after flowering, as long as the climatic conditions are favourable. This potentially extends the plant receptivity period and might explain the recurrent observations of high DON contents in relatively asymptomatic spikes (Del Ponte *et al.*, 2003 and 2007; Hallen-Adams *et al.*, 2011). Several studies point out the fact that wheat spike contamination at stages later than flowering can occur and result in healthy-appearing kernels that contain toxins, especially when moisture conditions are high (Hart *et al.*, 1984; Cowger *et al.*, 2009). For instance, late infections in field conditions have been observed in France, in 2007, when humid conditions at the end of the wheat cycle resulted in high DON

levels in the harvested kernels. That year, FHB severity and toxin contents were largely underestimated by the forecast models, which tend to ignore the risk of late infections.

The impact of late contaminations on disease development and toxin production has been explored by Cowger & Arrellano (2010) who inoculated eight winter wheat cultivars with four *F. graminearum* isolates, from 0 to 20 days after mid-anthesis. The period of maximum receptivity was around 10 days after mid-anthesis, while the occurrence of rain after anthesis extended the normal window of susceptibility and was conducive to the low-symptom, high-DON scenario. These results are consistent with other studies. Hart *et al.* (1984) infected wheat spikes with one isolate of *F. graminearum*, both in controlled conditions and in the field, with inoculation time ranging from watery to mid-dough stage. Yield reductions were greater when infections occur before kernel filling, whereas DON was produced in wheat spikes under favourable moisture conditions, even at late stages of kernel development. In a controlled-environment study, Del Ponte *et al.* (2007) inoculated a *F. graminearum* isolate on spikes of a wheat cultivar at six stages from mid-anthesis to hard dough. The percentage of damaged kernels was over 94% for inoculations performed between mid-anthesis and late milk stages but fell to 23% for inoculation at hard dough. The highest DON concentrations were found in samples inoculated at the watery-ripe and early milk stages but DON was still detected at later stages, without significant reductions in the kernel weight. Other authors reached however different conclusions. Using several species of *Fusarium*, Lacey *et al.* (1999) inoculated a winter wheat cultivar at different times from spike emergence to harvest. Little or no disease and DON levels were observed for inoculations performed between spike emergence and the start of anthesis. Anthesis was the only infection time for which high DON concentrations were observed and both severity and DON content sharply decreased for inoculations performed after mid anthesis.

The papers reviewed above suggest that late infections may to some extent allow fungal development and toxin production. To further explore this question, we attempted to more specifically relate the fungus development with the toxin content in the kernels by using accurate quantification techniques (qPCR for fungal DNA estimation and Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for toxins quantification) and by working at the spike level for all measurements. This allowed better estimating the disease severity at late development stages of the spike, when plant senescence makes difficult the symptom quantification by visual assessment. Moreover, assessing both the fungal DNA and the toxin content in a given spike made possible to precisely correlate the observable disease severity, the level of kernel colonization by the fungus, and the toxin production. Since it is still unclear whether the different species composing the FHB complex present the same risk in terms of late infection and toxin production, the experiments involved three species of the FHB complex in Europe, *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae*.

Materials and methods

Plant material

A greenhouse experiment was carried out in 2010 and replicated in 2011. Seeds of winter wheat cv. Royssac, considered to be highly susceptible to FHB, were sown in Jiffy peat pots and kept for two weeks under greenhouse conditions for seedling emergence. Seedlings were vernalized in a growth chamber for 8 weeks at 8°C with a 10h light period and a 14h dark period. Then, they were individually transplanted into pots filled with 1 L of commercial compost (Klasmann Peat Substrat 4; Klasmann France SARL, France), with two g of slow-release fertilizer (Osmocote Exact 16-11-11 N-P-K 3MgO Te). Pots were placed in a greenhouse compartment at 15-20°C and under a 15-hr-day photoperiod. During plant growth, natural daylight was supplemented with 400-W sodium lights between 6:00 am and 9:00 pm. Plants were fertilized with Hydrokani C2 (Hydro Agri Spécialités, France) at a 1:100 dilution rate. In each pot, only the main tiller was maintained. For each plant, the

flowering date of the spike was recorded. The plants were sprayed with Metrafenone (Flexity[®] at 1 mL.L⁻¹; Bayer CropScience, Germany) and Lambda-cyhalothrine (Karaté[®] Zéon at 0.2 mL.L⁻¹; Syngenta Agro S.A.S., France) as a preventive measure to control powdery mildew (*Blumeria graminis*) and insects, respectively. These pesticides have been tested in other experiments and have no detectable effect on FHB.

Fungal material

The fungal isolates used in the experiments are described in table 1. The *F. graminearum* and the *F. culmorum* isolates were provided by F. Forget (INRA Bordeaux, France) and the *F. poae* isolates were provided by R. Canalès (Bayer CropScience, France). They all originate from field samplings in France. For spore production, the isolates were grown in Petri dishes on PDA (potato dextrose agar, 39 g L⁻¹) at 19°C and kept in the light during three days. Four mycelial plugs were then transferred in 250 mL of CMC medium. After at least three days with continual shaking, the medium was filtered through cheesecloth to collect the spores. For each isolate, a spore suspension in sterile distilled water was adjusted to a concentration of 2.10⁴ conidia.mL⁻¹ using a Malassez cell. Suspensions were then stored at 4°C until they were used for inoculation, which took place within the same day. After inoculation a few microliters of each spore suspension was deposited on PDA to check for spore viability.

Experimental design and inoculation procedure

The experiment was conducted in autumn 2010 and repeated in 2011 with the same cultivar and using the same protocols for inoculation, disease assessment, and toxin analyses. The experiment was set up as eight to nine ears of main tillers which were inoculated with several isolates of the three *Fusarium* species (see table 1) at different dates. The plants were grown in different pots and the pots were randomised in the greenhouse. Four dates of inoculation were tested: F0, anthers extrusion (apparition of the first extruded anthers), F8, eight days post anther extrusion (dpae), F18 (18 dpae), corresponding to the milky kernel development stage,

Table 1: isolates of *Fusarium* spp. used in the experiments.

Code	Species	Chemotype ^a	Aggressiveness ^b	2010 ^c	2011 ^c
fg159	<i>F. graminearum</i>	DON	+	x	x
fg178	<i>F. graminearum</i>	DON	+++	x	x
fg165	<i>F. graminearum</i>	DON	+++	x	-
fc124	<i>F. culmorum</i>	DON	+++	x	x
fc129	<i>F. culmorum</i>	NIV	++	x	x
fp2	<i>F. poae</i>	unknown	-	x	-
fp3	<i>F. poae</i>	unknown	-	x	-
fp6	<i>F. poae</i>	unknown	-	-	x

a: main toxin produced.

b: Average aggressiveness as measured on wheat spikes in a greenhouse in different experiments.

c: year of experiment.

and F28 (28 dpae), corresponding to the dough development stage (Zadoks *et al.*, 1974). In the 2011 experiment only, additional inoculations were performed before flowering and anther extrusion (FX). For the FX treatment, the apparition of the first anthers sometimes occurred during the incubation time and the corresponding spikes were then re-affected to the F0 class. The spikes were inoculated using an atomizer (Ecospray; Prolabo, France). Inoculation consisted in spraying each side of a spike with 1mL of inoculum suspension. After spraying, the spikes were enclosed in a transparent polyethylene bag sealed to maintain 100% relative humidity and promote infection.

Disease assessment

The spikes were observed from 5 days after inoculation (appearance of first symptoms) to 25 days after inoculation. The number of spikelets with FHB symptoms was visually assessed thrice a week. Since the aspect of FHB symptoms may vary, each symptomatic spikelet showing a premature bleaching or brown necrosis was putatively considered as diseased and this status was confirmed or infirmed at the following assessment date. The percentage of diseased spikelets on each spike was calculated. The dynamics of appearance of symptomatic spikelets on each spike was characterized by the Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC), calculated from the first symptoms observation to 15 days after inoculation.

At maturity, spikes were cut and hand-threshed to separate each kernel from the chaff. Kernels were then weighed to estimate the thousand kernel weight (TKW). The status (symptomless or diseased) of each kernel was assessed to evaluate the percentage of damaged kernels per spike (%DK). A kernel was considered damaged when showing tombstones like symptoms, white mycelium or discoloured kernels (Fig. S1). After visual observation, the kernels of each spike were ground with a mixer mill (MM 400, Retsch®, France) and stored for DNA and toxin quantification.



F0:	F8:	F18:	F28:	Control:
6.54 g	12.68 g	24.06 g	41.58 g	43.45 g

Figure S1: Visual symptoms of FHB on wheat kernels. Wheat kernels collected from different spikes inoculated with fg178 (*F. graminearum*) in 2011 at different dates (F0 to F28) and corresponding mean TKW.

In order to explain the relatively high amount of toxins in kernels of some spikes inoculated at late growth stages in 2010, we tested the hypothesis that the mycelium present in the chaff could be a source of toxins for the kernels. The chaff of five spikes inoculated at dates F8 and F18 with each isolate of *F. graminearum* and *F. culmorum* were ground for DNA analyses. The low quantities of plant material obtained after the chaff grinding did not allow quantifying the toxins in these samples.

Detection and quantification of fungal DNA

The fungal DNA in the kernels was estimated by qPCR which is considered as an accurate technique for assessing the fungal development in the kernels (Nicolaisen *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2011).

Extraction. The total DNA was extracted from around 50mg of grounded material using the DNeasy® Plant Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen Ltd., Courtaboeuf, France) with a slightly modified version. In short, flour was vortexed with 400 μ L of AP1 buffer, 4 μ L of RNase and 4 μ L of proteinase K solution (20mg.mL⁻¹) before incubation at 65 °C for 1 hour. Samples were homogenized during the incubation each 10 to 15 min. After that, 260 μ L of AP2 buffer were added and samples were incubated on ice for 10 minutes. The tubes were centrifuged at 14000 rpm for 5 min. The supernatant was then transferred to purple columns and centrifuged at 14000 rpm for 2 min. In new tubes, 750 μ L of AP3/Ethanol buffer were added to the supernatant. After homogenization by tubes inversion, 650 μ L of this mix were transferred to white columns and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. This step was repeated with the leftover of extracts. The DNA pellet, trapped in the white column was washed with 500 μ L of the AW/Ethanol buffer and a centrifugation at 8000 rpm for 1min and this wash was repeated with a centrifugation at maximum speed for 2 min. Then, DNA was eluted by adding 50 μ L of AE buffer and, after an incubation of 5 min at room temperature, centrifuged at 8000 rpm for 1min. This step was repeated twice. The DNA

was quantified with a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology®, Cambridge, UK) and diluted to a final concentration of 20 ng.µL⁻¹.

Q-PCR quantification. The amount of both fungal and wheat DNA was estimated by quantitative PCR (qPCR). Species-specific primer pairs and species-specific Taqman probes were used to enhance the specificity of the test (Elbelt *et al.*, in prep). The primers and probes were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). Primers were designed using the OLIGO V.6 Primer Analysis Software. Probes were designed using the Primer Express® Software, version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the probes used were Taqman® labelled with FAM/TAMRA quencher. Real-time PCR was carried out in a total of 25 µL consisting of 6.25 µL qPCR MasterMix with ROX and Uracil N Glycosylase (UNG) at the final concentration of 1X (Eurogentec, Angers, France), 300 nM of each primer, 100 nM of the species specific probe and 5 µL of template DNA. The samples were standardized with the quantification of the plant DNA using plant EF1α real time PCR primers and sybergreen technology as described in Nicolaisen *et al.* (2008). For wheat DNA quantification, we used the MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec) at the final concentration of 1X, with the same concentration of each primer and 5µL of template DNA diluted 1:10. The PCR reactions were performed in duplicate on all samples and in triplicate on samples used for the standard curve on ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in Applied Biosystem 96 well plates. The amplification conditions included: an initial step of 2 min at 50°C; 95°C for 10 min; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 62°C (60°C for *F. poae*). DNA quantifications were done using standard curves of DNA from *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* or wheat extracted from pure cultures and non-contaminated wheat kernels. Each standard curve was generated by ten-fold dilution series ranging from 1 to 1.10⁻³ ng.µL⁻¹ for fungal DNA and 5 to 5.10⁻³ ng.µL⁻¹ for wheat DNA. Results were analysed on the AB SDS2.2.2 software (Applied Biosystem). PCR efficiency always ranged from 90 to 100%. As described by Nicolaisen *et*

al. (2008), the amount of fungal DNA was calculated from cycle threshold (Ct) values using the standard curve, and these values were normalized with the estimated amount of plant DNA based on the plant EF1 α assay.

Detection and quantification of mycotoxins

Toxins standards were purchased from Sigma Chemical Company. The water used for all extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) was purified in a Milli-Q[®] Integral Water Purification System (EMD Millipore, Billerica, MA, U.S.A). All other chemicals and solvents were of HPLC-grade, except methanol used for UPLC analysis which was LCMS-grade (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France). Only DON and NIV were quantified.

Toxin extraction. A representative homogenized flour sample of around 1g of ground kernels was used for the toxin extraction from five out of the eight repeats for each greenhouse treatment. Flours were frozen and vacuum dried using a freeze-drier to evaluate the moisture of each sample. This flour was shaken for 1.5 hours at room temperature in 6 mL of acetonitrile-water (84:16, v/v). The suspension was centrifuged at 9500 rpm for 10 min, and 4 mL of the supernatant were collected. These extracts were evaporated to dryness using a SpeedVac[®] Concentrator (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 45°C during 2 hours and then 60°C. Dried samples were dissolved in 200 μ L methanol and were sonicated for 10 min in an ultrasounds bath. Then 800 μ L water were added before a second sonication for 10 min in an ultrasounds bath. To avoid flour residues, samples were centrifuged at 9500 rpm for 10 min and only clear supernatant was taken for UPLC-MS analysis. For the most concentrated samples, the supernatant was diluted 5, 10 or 20 times in a methanol-water solution (20:80).

UPLC-MS-MS conditions. The UPLC-MS analysis of the toxin extract was performed with an Acquity ultra-performance liquid chromatograph (UPLC) coupled with a TQD tandem mass

spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA). Instrument monitoring and data processing were performed using Masslynx 4.1 software (Waters).

Chromatographic separation was carried out with an EC 100/2 NUCLEODUR C18 Gravity column from Macherey-Nagel GmbH & Co (Düren, Germany) (100 mm × 2 mm i.d., 1.8 µm particle size) at a flow rate of 0.33 mL/min. The column was maintained at 30°C and the sample manager was kept at 10°C. A volume of 10 µL of toxin extract was injected. The sample injection needle and loop were flushed with 200 µL of methanol followed by 600 µL of methanol-water (5:95, v/v). Mobile phases used were: A, water and B, methanol, both supplemented with 5 mM ammonium acetate. The gradient conditions were summarized in Table S1.

Mass spectrometer was operated in electrospray ionization (ESI negative ion mode) under multiple-reaction monitoring mode (MRM). The parameters influencing the MS signal were optimized individually for each compound by infusing standard solution at 10 µg.mL⁻¹ in acetonitrile continuously into the mass spectrometer. The resulting optimized values were as follows: capillary voltage, 3 kV; source and desolvation temperatures, 120 and 450°C, respectively; nitrogen, obtained from pressurized air in a nitrogen generator (Zefiro 35 LC-MS, F-DBS, Villejust, France) used for cone and desolvation gas, was used at 50 and 600 L/h, respectively; argon (99.9999% purity, Air Liquide) used as collision gas with a pressure of 2.5 10⁻³ mbar in the collision cell (T-Wave). Dwell times varying between 0.125 and 0.3 s were selected in order to obtain at least 15 points per peak. The MRM transitions for each compound and the corresponding optimized parameters (cone voltage and collision energy) are listed in table S2.

Identification of the target analytes was accomplished by comparing the retention time and the UPLC-MS-MS signals of the compounds in the samples with those of standards analyzed under identical conditions. For each analyte, two MS-MS signals were monitored corresponding to the two most abundant transitions: the most abundant one was to quantify the analytes and the less abundant one to confirm their identity. For quantification, external

Table S1: Eluent conditions used in the UPLC mycotoxins quantification

Time (min)	%A	%B
1	95	5
7	15	85
7.30	0	100
10.30	0	100
10.40	95	5
12.40	95	5

Table S2: MRM transitions and their corresponding optimized parameters

Analyte	Ionization mode	Transition	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
NIV	ES-	371.16>281.13	18	15
		371.16>311.18		10
DON	ES-	355.10>59.00	19	30
		355.10>295.00		9
ADON	ES-	397.05>59.1	22	10
		397.05>134.93		12
HT2	ES+	442.22>215.12	22	17
		442.22>263.11		17
T2	ES+	484.26>245.10	22	15
		484.26>305.13		14
ZEA	ES-	317.30>131.12	45	30
		317.30>175.17		22

standard method was used, with standard solutions containing a mixture of DON and NIV in Acetonitrile. Concentrations were ranging from 0.002 to 5 mg.L⁻¹.

Results were then converted in mg.g⁻¹ of dry biomass with the following equation.

Toxin concentration = $[(X \times V \times DF \times 6/4) / DW]$ where X is the concentration given by the software in mg.L⁻¹, V the final toxin extract volume (0.001 L), DF a dilution factor, and DW the dry weight of flour. The value 6/4 corresponds to the 4 mL collected from the 6 mL acetonitrile-water added to the flour for the toxin extraction.

The limit of detection and quantification for both toxins were all < 2.10⁻⁶ mg.g⁻¹.

Data analyses

The toxin productivity was calculated as the quantity of toxin produced per unit of fungal DNA (Simpson *et al.*, 2004). Variance analyses were used to determine the effects of the inoculation date, the experiment (year), the species, and the isolate on AUDPCr, %DK, TKW, the fungal DNA, and the toxin content of the kernels. Tukey's HSD test was used for the multiple mean comparisons. Residuals distribution was checked for linearity and variance homogeneity. Regression analyses were used to explore the relationship between the different measured variables, especially visual or microbiological assessment, fungal DNA, and toxin contents.

Results

Correlations between variables

Over all samples, the toxin concentration and the fungal DNA were highly correlated ($r = 0.85$, $p < 0.001$, Fig.1a). A co-variance analysis (table 2), with the fungal DNA as a co-variable, showed a strong effect of the fungal DNA, the isolate and the inoculation date on the toxin concentration. There was however no significant interaction between the inoculation date and the fungal DNA, indicating that the toxin concentration – fungal DNA relationship was independent of the inoculation date. The slope of the linear regression of toxin

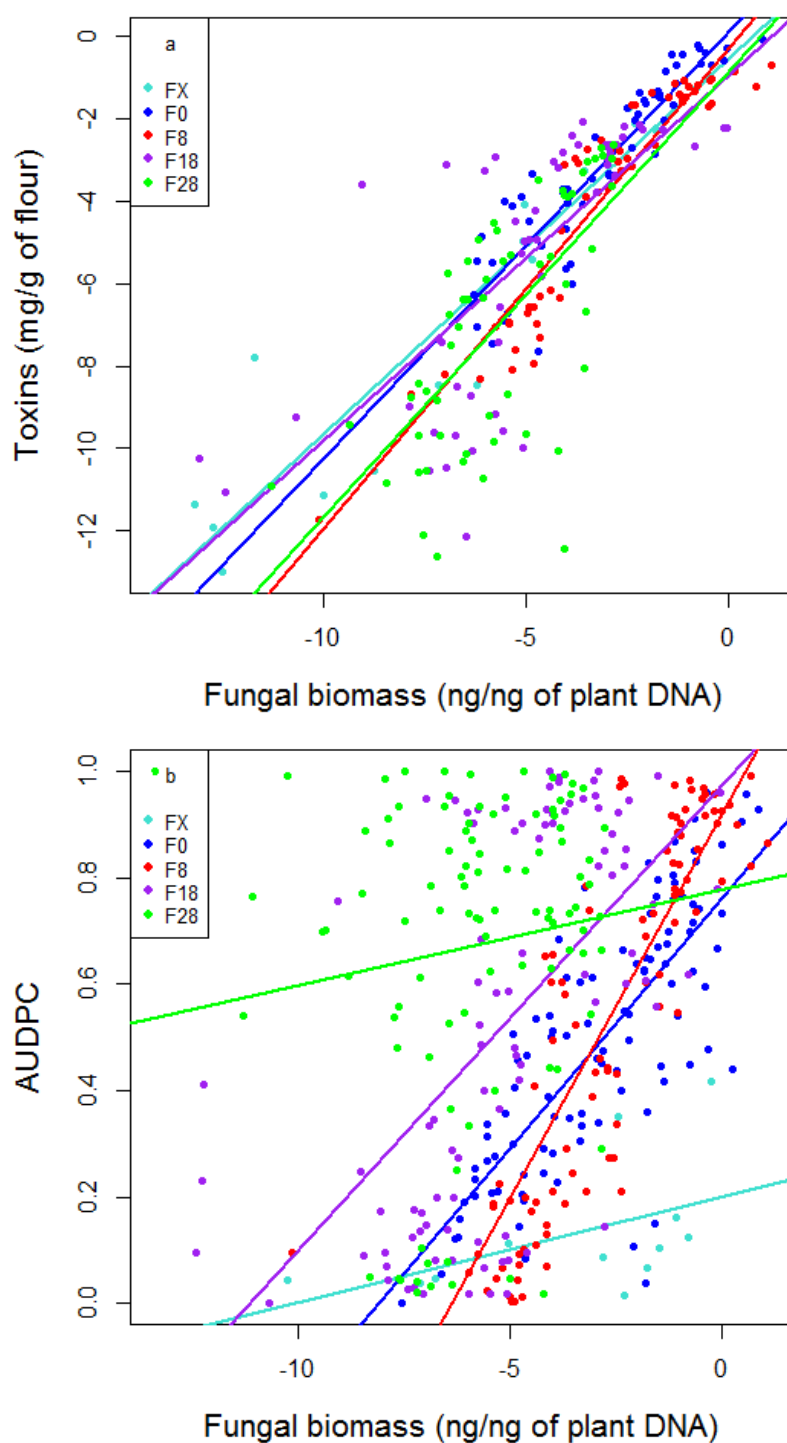


Figure 1: Correlation between toxin concentration and fungal DNA (a) and between AUDPC and fungal DNA (b) in wheat spikes inoculated by several *Fusarium* strains at 5 different dates. Two experiments (2010 and 2011) are represented together. The fungal DNA and the toxin content were determined in each individual spike. The data are log-transformed. The lines show linear regression for each inoculation date (but see table 2 for a detailed Ancova analysis including the different factors of variation)

Table 2: Co-variation analysis of the corresponding relationships between fungal DNA and toxin content, and fungal DNA and AUDPC. For each relationship, 3 sources of variance were tested: the inoculation date (Date), the year experiment (Exp) and the isolate inoculated (Iso). Signification codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Source of variation	Df	MS	F-value	p-value
Toxin content				
Date(A) ^a	4	148.42	216.60	< 0.001 ***
Fungal DNA (B)	1	262.37	382.89	< 0.001 ***
Exp (C) ^b	1	0.22	0.32	0.575
Iso (D) ^c	7	189.32	276.29	< 0.001 ***
A x B	4	1.07	1.56	0.186
A x C	3	4.99	7.28	< 0.001 ***
B x C	1	10.25	14.95	< 0.001 ***
A x D	25	3.19	4.66	< 0.001 ***
B x D	7	3.87	5.65	< 0.001 ***
C x D	3	8.70	12.69	< 0.001 ***
Residuals	179	0.69		
AUDPC				
Date(A) ^a	4	1.186	50.39	< 0.001 ***
Fungal DNA (B)	1	1.064	45.21	< 0.001 ***
Exp (C) ^b	1	5.147	218.69	< 0.001 ***
Iso (D) ^c	7	2.908	123.56	< 0.001 ***
A x B	4	0.236	10.01	< 0.001 ***
A x C	3	0.654	27.77	< 0.001 ***
B x C	1	0.006	0.24	0.624
A x D	25	0.261	11.07	< 0.001 ***
B x D	7	0.101	4.31	< 0.001 ***
C x D	3	0.100	4.25	0.006 **
Residuals	379	0.024		

^a Date = Inoculation date (FX, F0, F8, F18 or F28)

^b Exp = experiment (2010 or 2011)

^c Iso = isolate inoculated

concentration on fungal DNA is a measure of the toxin productivity. The analysis then indicates that the inoculation date, and thus the stage at which the infection took place, did not influence the toxin productivity. The experiment as a main factor had no effect on the toxin concentration but the interaction between experiment and fungal DNA influenced the toxin concentration. Nevertheless, this interaction, as well as the others that were detected in this analysis, only accounted for a small part of the global variance in toxin concentration and do not change the general conclusion of a clear link between toxin concentration and fungal DNA, independent of the time of inoculation, as observed in Fig.1a.

The AUDPC was found highly correlated to the fungal DNA for inoculations performed at F0 and F8 ($r = 0.70$, $p < 0.001$ and $r = 0.84$, $p < 0.001$, respectively) but this correlation became weaker for F18 ($r = 0.62$, $p < 0.001$) and was not significant at FX and F28 ($r = 0.16$, $p = 0.11$ and $r = 0.13$, $p = 0.21$, respectively; Fig. 1b). The covariance analysis (Table 2) revealed a significant interaction between the slope of the relationship and the inoculation date, confirming that the link between visual symptoms, denoted by AUDPC, and the fungal DNA varies with the stage at which the spikes are inoculated. The experiment had a significant and strong effect on the AUDPC, indicating that uncontrolled changes in the environment between the 2010 and 2011 experiments influenced the disease development. The TKW gave roughly the same information than the AUDPC, except that the experiment accounted for a lower part of its variance than it did for AUDPC (data not shown).

Species effect

The species effect, with the isolate as a nested effect, was tested in an ANOVA analysis on the different measured variables (Table 3). Multiple mean comparisons (Tukey's HSD test) showed that *F. poae* was less aggressive than the two other species, with lower disease severity values ($p < 0.001$ for AUDPC, TKW and fungal DNA), and produced less toxins ($p < 0.001$). Interactions were detected between the species and other factors (inoculation date and

Table 3: Variance analyses for the *Fusarium* head blight tests in wheat. For each source of variable (AUDPC, TKW, fungal DNA, toxin concentration and toxin productivity), 4 sources of variance were tested: the inoculation date (Date; FX, F0, F8, F18 or F28), the year of experiment (Exp; 2010 or 2011), the species and the isolate inoculated (Iso). Signification codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05

Source of variance	Df	MS	F-value	p-value
AUDPC				
Date(A)	4	2.279	73.71	< 0.001 ***
Species (B)	2	3.632	117.48	< 0.001 ***
Exp (C)	1	3.743	121.05	< 0.001 ***
Iso in species (D)	5	2.378	76.90	< 0.001 ***
A x B	8	0.423	13.68	< 0.001 ***
A x C	3	0.499	16.14	< 0.001 ***
B x C	1	0.299	9.67	0.002 **
A x D	17	0.158	5.13	< 0.001 ***
C x D	2	0.328	10.62	< 0.001 ***
Residuals	404	0.031		
TKW				
Date(A)	4	5092	64.35	< 0.001 ***
Species (B)	2	4389	55.46	< 0.001 ***
Exp (C)	1	636	8.04	0.005 **
Iso in species (D)	5	1628	20.57	< 0.001 ***
A x B	8	553	6.99	< 0.001 ***
A x C	3	405	5.12	0.002 **
B x C	1	20	0.25	0.616
A x D	17	424	5.36	< 0.001 ***
C x D	2	401	5.06	0.007 **
Residuals	401	79		
Fungal DNA				
Date(A)	4	1.4387	29.06	< 0.001 ***
Species (B)	2	1.3017	26.29	< 0.001 ***
Exp (C)	1	0.4727	9.55	0.002 **
Iso in species (D)	5	1.4204	28.69	< 0.001 ***
A x B	8	0.2739	5.53	< 0.001 ***
A x C	3	0.0579	1.17	0.321
B x C	1	0.0021	0.04	0.836
A x D	17	0.3430	6.93	< 0.001 ***
C x D	2	1.0265	20.74	< 0.001 ***
Residuals	400	0.0495		
Toxin concentration				
Date(A)	4	0.3366	49.61	< 0.001 ***
Species (B)	2	0.2841	41.87	< 0.001 ***
Exp (C)	1	0.0030	0.44	0.509
Iso in species (D)	5	0.2773	40.86	< 0.001 ***
A x B	8	0.0539	7.94	< 0.001 ***
A x C	3	0.0084	1.24	0.298
B x C	1	0.0005	0.08	0.783
A x D	17	0.0625	9.21	< 0.001 ***
C x D	2	0.0389	5.74	0.004 **
Residuals	210	0.0068		
Toxin productivity				
Date(A)	4	380.9	1.69	0.153
Species (B)	2	692.4	3.08	0.048 *
Exp (C)	1	445.9	1.98	0.161
Iso in species (D)	5	278.8	1.24	0.292
A x B	8	286.3	1.27	0.260
A x C	3	538.5	2.39	0.070
B x C	1	336.3	1.50	0.223
A x D	17	255.8	1.14	0.321
C x D	2	940.7	4.18	0.017 **
Residuals	203	225		

experiment), but they resulted only from slight changes in the mean values, and did not change the main conclusion that *F. poae* was less aggressive than the two other species whereas no significant difference was observed between *F. graminearum* and *F. culmorum* at the species level. In the following, we will focus on the date and isolate effects.

Effect of inoculation date on disease development and toxin production

AUDPC, TKW, fungal DNA, and toxin concentration were influenced by the inoculation date and by the isolate (Table 3). Except for the toxin concentration, they were also influenced by the experiment. The interaction between the isolate and the inoculation date and between the isolate and the experiment were significant. The inoculation date, the species, and the isolate (within the species) however accounted together for 82%, 66% and 84% of the variance of TKW, fungal DNA and toxin concentration, respectively. The isolate - experiment interaction that influenced the fungal DNA partly resulted from the fact that some isolates were changed between both years (table 1).

Because of the interactions between the isolate and other factors, the effect of the inoculation date was tested separately for each isolate. For the most aggressive isolates (fg178, fg165, fc124 and fc129), significantly ($p < 0.05$) higher fungal DNA and toxin concentrations were found for inoculation dates F0 and F8 than for the other dates and the TKW significantly ($p < 0.001$) increased from F0 to F28 (Fig. 2). This pattern was less clear for AUDPC, with high values still measured for the last inoculation dates (F18 and F28). The less aggressive strains (fg159, fp2, fp3 and fp6) produced a lower disease severity ((AUDPC and fungal DNA) and fewer toxins. For those isolates, the amounts of fungal DNA and toxins were found significantly higher for at least one of the inoculation dates F0 or F8, depending on the isolate. Regarding TKW, the pattern was less clear than for the aggressive isolates but fp2 still showed an increasing tendency (except for F28). Regarding AUDPC, high values were still measured for the last inoculation date (F28). This can be explained by a visual confusion

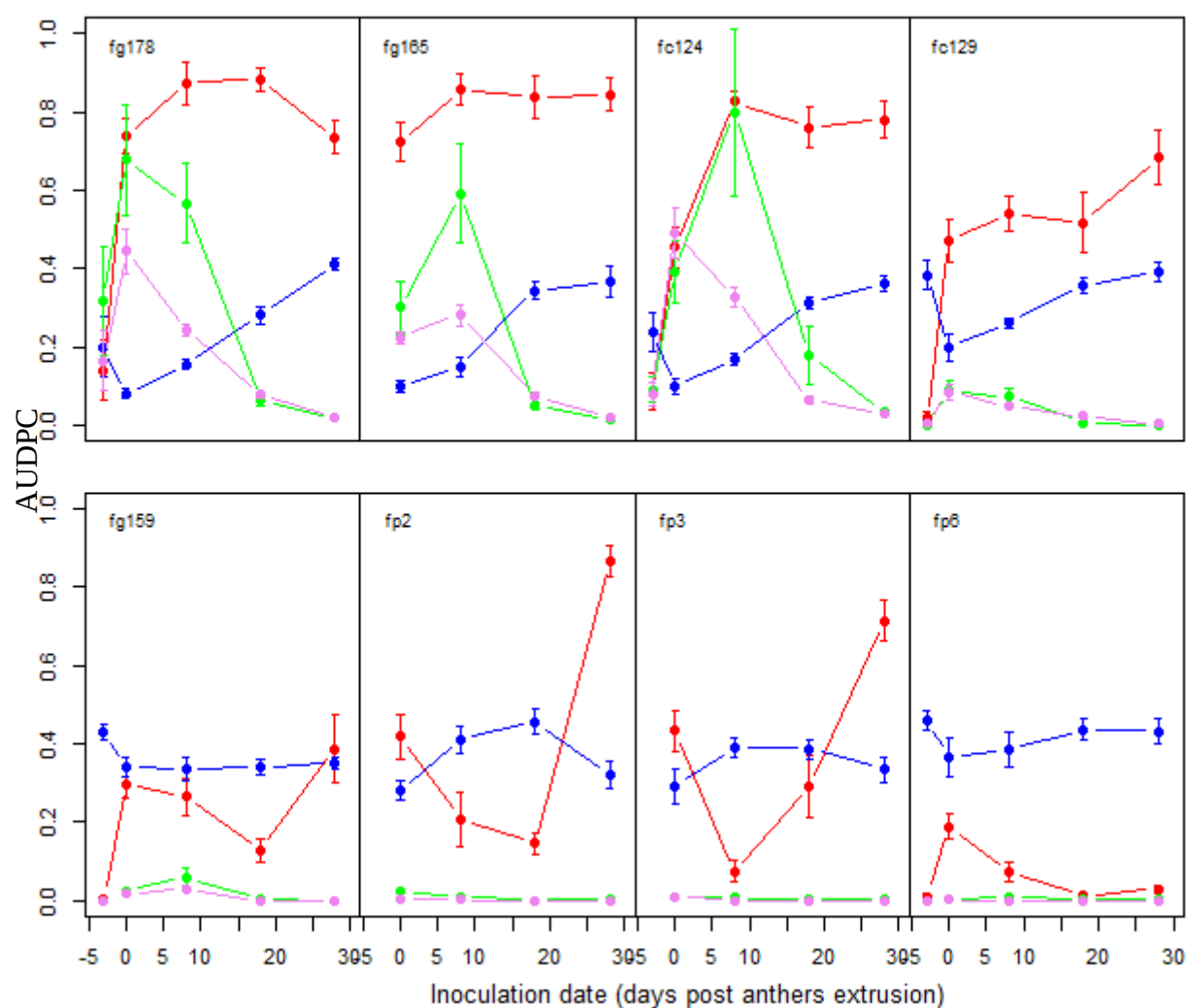


Figure 2: Variations of AUDPC (red dots), TKW (blue dots), fungal DNA (green dots) and toxin concentrations (pink dots) in wheat spikes inoculated with different isolates of three *Fusarium* species at different dates (FX, F0, F8, F18 and F28, respectively 3 days before anthers extrusion and 0, 8, 18 and 28 days post anthers extrusion). Data from the 2010 and 2011 are shown together. An ANOVA analysis on the same data is presented in table 3.

between head blight symptoms and natural spike maturation. Even if the fungal DNA and the toxin concentrations in the kernels were low for the F18 and F28 treatments, they were detected at a quantifiable level for all aggressive isolates (++ and +++ in table 1) in each inoculated spike and their average value was significantly greater than zero (Student's Test, $p < 0.05$).

Inoculations performed before flowering (FX, in the 2011 experiment) resulted in a lower disease severity (AUDPC and fungal DNA) and lower toxin concentrations in the kernels than those made at F0 and F8 (Fig. 2). In this treatment, the disease progression was slower than in F0 and F8: we first observed a few and localized initial symptoms, followed by a slow colonization of the spikes (Fig. 3). This denotes a lower infection efficiency, followed by a limited spike colonisation. As for the F18 and F28 treatments, a quantifiable level of fungal DNA was detected here for fg178 and fc124 in each inoculated spike whereas for lower aggressive isolates, the level of fungal DNA was not significantly different from zero.

Overall, no difference was found in toxin productivity between the different inoculation dates (Table 3), confirming the conclusion of the analysis of the fungal DNA – toxin concentration relationship (Table 2). In some replicates, however, the toxin production was unexpectedly high for F18, compared to F8. Even though the differences in productivity were finally found not significant, we tested the hypothesis that a high fungal development in the glumes and rachis could have been a source of toxins for the kernels. We then measured the fungal DNA in the chaff of those F8 and F18 replicates. The fungal DNA measured in the chaff was not significantly different for F8 and F18 but the variance analysis revealed a significant effect of the tissue (kernel or chaff) in which the fungal DNA was quantified (Table 4). Interestingly, there was a significant interaction between tissue and inoculation date, originating from the fact that the fungal DNA was higher in the kernels than in the chaff for F8 but higher in the chaff than in the kernels for F18.

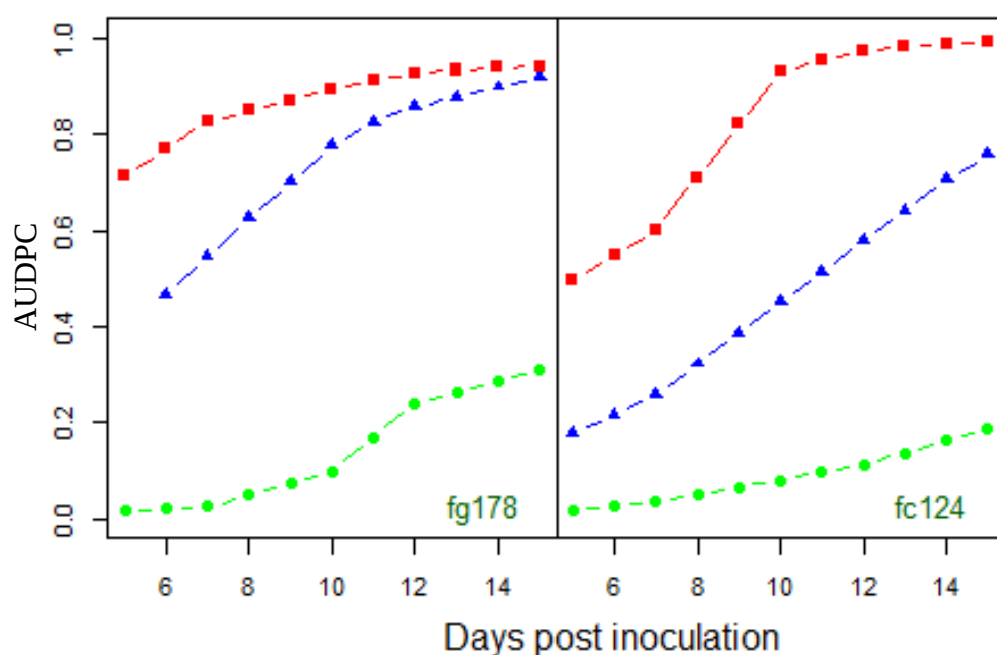


Figure 3: Kinetics of visual FHB symptoms on wheat spikes inoculated with two *Fusarium* isolates (fg178 and fc124) at different inoculation dates (FX (green dots), F0 (blue triangles) and F8 (red squares), respectively 3 days before anthers extrusion, 0 and 8 days post anthers extrusion) in 2011. Each point represents the average of 8 replicates.

Table 4: Variance analyses for the *Fusarium* head blight tests in wheat. For the fungal DNA as variable, 3 sources of variance were tested: the inoculation date (Date), the isolate inoculated (Iso) and the plant tissue analyzed either kernels or chaff (Tissue). Signification codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05

Source of variance	Df	MS	F-value	p-value
Fungal DNA				
Date(A) ^a	1	1.402	50.33	< 0.001 ***
Iso (B) ^b	4	0.2767	9.93	< 0.001 ***
Tissue (C) ^c	1	0.136	4.88	0.029 *
A x B	4	0.1275	4.58	0.002 **
A x C	1	0.6263	22.48	< 0.001 ***
B x C	4	0.0267	0.96	0.432
Residuals	120	0.0279		

^a Date = Inoculation date (F8 and F18)

^b Iso = Isolate inoculated

^c Tissue = plant tissue analyzed (kernels or chaff)

Discussion

F. poae is considered to be a relatively weak pathogen compared to *F. graminearum* and *F. culmorum* (Brennan *et al.*, 2003; Stenglein *et al.*, 2009). Our data are in accordance with this view: significantly lower disease severity, fungal DNA, and toxin concentrations were obtained with *F. poae* isolates, compared to *F. culmorum* and *F. graminearum*. On the contrary, no significant difference in pathogenicity was found between *F. graminearum* and *F. culmorum* in our experiments. The low number of isolate per species that were tested does not however allow drawing a conclusion at the species level and this was not our objective. Therefore, we only discuss thereafter the differences between isolates.

A good correlation was found between the fungal DNA and the toxin concentration whatever the inoculation date and with only slight differences between isolates and experiments. The stage at which the spikes were inoculated did not alter this correlation. This, along with the ANOVA analysis (table 3), indicates that the toxin productivity did not significantly change with the timing of inoculation relative to spike maturation, even though the fungal development was considerably lower for late inoculations.

We found that the fungal DNA was lower in the chaff than in the kernels for inoculations at anthesis (F8) whereas it was the opposite for later inoculations (F18). Xu *et al.* (2008) found that the fungal DNA was significantly higher in the chaff than in the kernels and they considered that the fungus colonises the chaff tissue first and then proceed to infect and colonise kernels; so, when conditions are not conducive to infection and colonisation, as it is after flowering stages, kernel infection is less likely to occur than chaff infection. Moreover, at later stages, the water contents in kernels decrease, the several layers of the pericarp get compressed and cell walls thicken, leading to a higher resistance of kernels to *Fusarium* invasion which explains why the fungus tends to colonize other tissues (Leonard & Bushnell, 2003).

The AUDPC is a common measure used to estimate the disease level in a crop. The relation

between the AUDPC and the fungal DNA was high for inoculations performed around anthesis (F0 and F8) but rather low or even not significant for earlier or later inoculation dates. The visual assessment of disease on the spike appeared thus to be a poor estimator of the actual infection level for those early or late infections. Such a discrepancy between visual assessments and actual infection level may explain why disease severity and toxin concentrations are sometimes poorly correlated (Alvarez *et al.*, 2010). Regarding the late infections, a likely explanation is that FHB symptoms can be visually confused with natural maturation, leading to over-estimating FHB severity. Another possible cause is that the fungus seems to develop better in the glumes than in the kernels for late infection dates (Xu *et al.*, 2008), which might increase the level of visible symptoms. Our finding that the fungal DNA was higher in the chaff than in the kernels for inoculations at F18 supports this idea.

When the inoculations were performed before anthesis (FX treatment), we observed a few and localized initial symptoms, followed by a slow colonization of the spikes (see Fig. 3). This probably denotes a lower infection efficiency than for the infections performed around anthesis but it shows that infection, followed by some level of spike colonisation, is nevertheless possible when contamination occurs before flowering. Gourdain & Rosengarten, (2012) have found in a field experiment that inoculations performed before heading can lead to an observable disease development.

The infection timing strongly conditioned the intensity of attacks on kernels, with increasing values of TKW from F0 to F28, especially for inoculations performed with aggressive isolates. Our data are in good accordance with the generally accepted fact that F0 and F8 correspond to the most favourable period for FHB infection. Several authors suggested or have shown that this results from the fact that the flower parts offer a direct access to kernel cells, which greatly favours kernels colonization (Hart *et al.*, 1984; Bai & Shaner, 1994). Nevertheless, the fungal DNA and toxin concentration obtained for FX and for late inoculations (F18 and F28) were clearly above the detection level in each spike inoculated

with an aggressive strain, and were in average significantly greater than zero. This suggests that early infections as well as late infections can lead to a certain level of fungal colonization and toxin production in the spike. Hallen-Adams *et al.* (2011) showed that the toxin production may extend over a long period after infection and can still occur in mature kernels. Hart *et al.* (1984) and Cowger *et al.* (2009) also demonstrated that DON can be produced in wheat when there is adequate moisture for fungal growth, regardless of the kernels stage. In our experiments, the spikes were not exposed to a high HR level after the incubation time and this probably explains the low toxin content observed for F18 and F28. The presence of the fungus at a detectable level in these treatments nevertheless suggests that, given suitable moisture conditions, higher toxin levels could be obtained, leading to a low-symptom, high-DON scenario. Another possible consequence of late infections is the production of kernels that are infected but that keep a good germination capacity. In a field situation, this can lead to *Fusarium* damage at early growth stages, foot rot and can increase the level of inoculum in the soil for the following years.

CONCLUSION

Our study confirms that wheat is more receptive to FHB when anthers are extruded. Early or late contaminations led to relatively low disease levels that would probably not impact the yield in field conditions. Nevertheless, these infections produced a detectable amount of toxins in the harvested kernels. Such late infection may lead to higher toxin concentrations when the climatic conditions are favourable (Cowger *et al.*, 2009). Moreover, late kernel contamination might have consequences for seed production since they lead to viable but infected kernels. Fungicides applications and FHB risk assessments, which are today focused on a narrow window around flowering, might be useful at later development stages when environmental conditions are favourable. To quote Del Ponte *et al* (2003), “We need to consider integrated strategies that will protect wheat spikes from infection for several weeks rather than several days after flowering”.

Acknowledgements

The authors are grateful to Bayer CropScience for their financial support and to the Ile de France region for their contribution to the UPLC-UV-MS/MS acquisition. They would like to thank the INRA of Bordeaux for the isolates supply, M. Bourdat-Deschamps for her help in the toxin analysis and B. Beauzoune and M. Willigsecker for their technical help in the microbiological experiments. The PCR tools were developed by V. Laval and S. Elbelt.

References

- Alvarez CL, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V, 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology* **158**, 173–181.
- Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM, 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 577–587.
- Bai G, Shaner G, 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease* **78**, 760–766.
- Brown NA, Urban M, Van De Meene AML, Hammond-Kosack KE, 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat spikes. *Fungal biology* **114**, 555–571.
- Covarelli L, Beccari G, Steed A, Nicholson P, 2012. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant Pathology* Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02600.x.
- Cowger C, Patton-Özkurt J, Brown-Guedira G, Perugini L, 2009. Post-anthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology* **99**, 320–327.
- Cowger C, Arrellano C, 2010. Plump kernels with high deoxynivalenol linked to late *Gibberella zeae* infection and marginal disease conditions in winter wheat. *Phytopathology* **100**, 719–728.
- Del Ponte EM, Fernandes JMC, Bergstrom GC, 2003. *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated at developmental stages from flowering through grain maturation. In: Canty SM, Lewis J, Siler L, Ward RW, eds. Proceedings of the National *Fusarium* Head Blight Forum, 2002. Erlanger, KY, 129–132.
- Del Ponte EM, Fernandes JMC, Bergstrom GC, 2007. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology* **155**, 577–581.
- Goswami RS, Kistler HC, 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* **5**(6), 515–525.
- Gourdain E, Rosengarten P, 2011. Effects of infection time by *Fusarium graminearum* on ear blight, Deoxynivalenol and Zearalenone production in wheat. *Plant Breeding and Seed Science* **63**, 67–76.
- Hallen-Adams HE, Wenner N, Kuldau GA, Trail F, 2011. Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* **101**(9), 1091–1096.
- Hart LP, Pestka JJ, Liu MT, 1984. Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **74**, 1415–1418.
- Lacey J, Bateman GL, Mirocha CJ, 1999. Effects of infection time and moisture on development of spike blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology* **134**, 277–283.
- Mc Mullen M, Jones R, Gallenberg D, 1997. Scab of wheat and barley: A Re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* **81**(12), 1340–1348.
- Leonard KJ, Bushnell WR, 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.

- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF, 2008. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* **76**(3), 234-240.
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN, 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* **101**, 960-969.
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L, 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* **44**, 207–238.
- 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. *Environmental Microbiology* **6**(1), 79–87.
- Stenglein SA, 2009. Offered review: *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* **91**(1), 25-36.
- Strange RN, Majer JR, Smith H, 1974. The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **4**, 277–290.
- Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Monaghan S, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, 2008a. Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *European Journal of Plant Pathology* **120**, 21-34.
- Xu XM, Nicholson P, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 83–103.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, 1974. A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.

CHAPITRE 3 :

SPECIES INTERACTIONS IN *FUSARIUM* COMPLEX: CONSEQUENCES ON DISEASE DEVELOPMENT AND TOXINS PRODUCTION



Dans le chapitre précédent, nous avons validé la fenêtre de sensibilité du blé à la fusariose autour de la floraison pour toutes les espèces / souches testées. Nous avons également pu constater que le stade de croissance du blé pouvait influencer la croissance et la production de toxines des souches lors d'inoculations précoces et tardives mais conduisant à des niveaux de contamination moindre. Les différences observées entre espèces et souches dans le chapitre 1 ainsi que la possibilité d'en retrouver plusieurs sur un même épi nous ont conduits à réfléchir sur d'éventuelles interactions entre elles. Dans ce chapitre, nous allons également nous porter sur une question très débattue dans la littérature qui est le rôle des toxines dans la compétition.

Dans ce chapitre, nous avons donc réalisé des inoculations sur épis de blé par spray en serre mettant en jeu une ou deux souches afin d'étudier l'effet de potentielles interactions entre *F. graminearum* et *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus* et *M. nivale* sur leur développement fongique mais aussi sur leur production de toxines. Les teneurs en toxines et le développement fongique ont ensuite été analysés sur les grains de blé des épis récoltés à maturité. Cette expérimentation a été menée deux années de suite en serre et sur la même variété de blé Royssac. En parallèle, cette expérimentation a été réalisée en conditions de culture au champ de manière à valider les résultats obtenus en conditions contrôlées. Nous avons donc pour cela utilisé les mêmes protocoles d'inoculation, de récolte et d'analyse mais avec seulement une partie des souches utilisées en serre.

Species interactions in *Fusarium* complex: Consequences on disease development and toxins production

Siou D.¹, Gélisse S.¹, Laval V.¹, Repinçay C.², Bourdat-Deschamps M.³, Suffert F.¹, Lannou C.¹

¹ INRA, UMR1290 BIOGER, F-78850 Thiverval-Grignon

² INRA, UR 251 PESSAC, RD 10- 78026 Versailles Cedex

³ INRA-AgroParisTech, UMR 1091 EGC, F-78850 Thiverval-Grignon

In preparation to Applied and Environmental Microbiology

Abstract

Fusarium head blight (FHB) is one of the most damaging diseases on wheat and induces significant yield losses and toxin accumulation in grains. Fungal pathogens responsible of FHB include the genera *Microdochium* with 2 species (*majus* and *nivale*) and *Fusarium* (toxin producers) with 3 main species (*F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae*). Field studies and surveys show that 2 or more species can co-exist within a same field, on the same plant or on the same spike. In this study, we investigated how the concomitant presence of *F. graminearum* and another of the FHB complex species influences the spike colonization and the toxin production by the fungi. To study these interactions, 17 well characterized strains representing the 5 species cited above, were inoculated by spray on wheat spikes alone or in pairs. The fungal DNA in the grains was estimated by Q-PCR and toxin contents (Deoxynivalenol, DON and Nivalenol, NIV) by UPLC-UV/MSMS. The responses of the different isolates to the presence of a competitor were variable and probably strain-specific more than species-specific. The fungal DNA could increase, decrease or remain stable in co-inoculation, with regards to single isolate inoculations, depending on the isolates considered. Nevertheless, aggressive isolates were almost unchanged in their fungal DNA or a bit promoted whereas less aggressive isolates were reduced against more aggressive. However, in all cases there was a general trend of a decreased toxin production in co-inoculation independently of the fungal DNA and with regards to single isolate inoculations.

Key words: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. Majus*, *M. Nivale*, *Fusarium* Head Blight, interaction, toxins.

Introduction

Several pathogen species can coexist on the same host plant but they may then have to compete to access the host resource (Xu & Nicholson, 2009). In some cases, however, the presence of a pathogen species can facilitate the host infection by another species (Picot *et al.*, 2012) or, although they are present on the same host, the different species can exploit different resources. A range of interactions can then be observed in multiple infections. The *Fusarium* complex, involving different species causing a wheat disease (*Fusarium* Head Blight, or FHB) is an interesting biological system for studying such interactions.

The “*Fusarium* complex” includes 2 genera of Ascomycetes: *Fusarium* spp., able to produce mycotoxins such as Deoxynivalenol (DON) and Nivalenol (NIV), that pose a threat for human and animal health, and *Microdochium* spp., which do not produce mycotoxins. Even though 19 species can potentially be responsible of FHB, the most frequent in Europe are *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *M. majus* and *M. nivale* (Xu & Nicholson, 2009; Ioos *et al.*, 2005). Field studies and population surveys show that two or three species can co-exist within a same field, on the same plant or even on the same spike (Xu *et al.*, 2005; Audenaert *et al.*, 2009). Positive or negative interactions are likely to occur among these species but their consequences on fungal development and toxin production are still poorly understood.

Most studies on interactions among *Fusarium* species were carried out under *in vitro* conditions (Simpson *et al.*, 2004; Cooney *et al.*, 2001). Only a few ones were done on the host. Intra- and inter-specific interactions have been investigated and most were described as competitive (Xu *et al.*, 2007a; Pan & May, 2009). Simpson *et al.* (2004) studied interactions between *F. culmorum*, *M. nivale* and *M. majus* in *in vitro* and *in plant* conditions and under different

temperature regimes. In these experiments, the output of the competition depended on the temperature and the sequence in which the species were inoculated and the co-inoculation led to a decrease in DON production. In another *in vitro* study, Cooney *et al.* (2001) studied the competition between *F. graminearum* and different fungal species. They showed that DON production was reduced in the presence of all but one of the competing species. Vellutti *et al.* (2000) inoculated maize grains *in vitro* with single isolates of three *Fusarium* species and under different water and temperature conditions. They found that *F. moniliforme* and *F. proliferatum* developed less in the presence of *F. graminearum* and that the toxin production could be enhanced or reduced, depending on the species in presence. In the field conditions, Miedaner *et al.* (2004) found that interactions between four isolates of *F. culmorum* led to reduced visual symptoms and toxins levels, excepted when two highly aggressive isolates were inoculated together, which led to higher DON contents. In a field experiment, Reid *et al.* (1999) found that in co-inoculation of *F. verticillioides* and *F. graminearum* isolates in maize ears the fungal DNA was lower than in single inoculations but not the amount of toxin produced. This result was later extended by Picot *et al.* (2012), who showed in a field study that prior inoculation of *F. graminearum* facilitated the subsequent development of *F. verticillioides*. Even when the frequency of *F. verticillioides* was as low as 1/10 in the initial inoculum, it remained able to outcompete a previously established *F. graminearum* isolate. In their experiment, the DON productivity did not vary much or was reduced in co-inoculations compared to single inoculations.

One of the most complete studies on *Fusarium* species competition was published by Xu *et al.* (2007b). They compared interactions between single isolates of *F. graminearum*, *F. poae*, *F. culmorum* and *F. avenaceum* when inoculated on wheat ears in controlled conditions. In all cases, *F. graminearum* was slightly or not affected by its competitor whereas the other species tended to decrease. A noticeable point was that the toxin production was increased up to 100 times in most combinations tested. In a population survey, Xu *et al.* (2008a) found a positive

correlation between two *Microdochium* spp. and they observed that the frequencies of 6 FHB-related species were positively correlated to each other. Such observations can indicate the existence of synergistic effect but can also be due to favourable climatic conditions. The different studies reviewed above show partly contradictory results and a range of situations, suggesting that the output of species competition within the FHB complex is probably species- and even isolate-dependant, and may vary with the environmental conditions.

In this study, we investigated how the concomitant presence of *F. graminearum* and another of the FHB complex species influences the wheat spike colonization and the toxin production by the fungi. To this aim, we compared the fungal development and the toxin production in wheat spikes after single and mixed inoculations of *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus* and *M. nivale*. The use of precise quantification techniques (Q-PCR, liquid chromatography and mass spectrometry) allowed to quantify both fungal DNA and toxin contents on the same individual spikes.

Materials and methods

Overview

A set of 17 isolates belonging to 5 species was used in a greenhouse experiment carried out in 2010 and replicated in 2011. The disease severity, the fungal colonization and the toxin production were assessed in single and in co-inoculations of these species on adult wheat plants. A subset of the isolates was used for replicating the experiment in the field conditions. In the co-inoculations, each isolate of *F. graminearum* was confronted to isolates of the other species. In addition, each isolate was inoculated alone in order to evaluate its aggressiveness.

Plant material

For the greenhouse experiment, seeds of winter wheat cv. Royssac, considered to be highly susceptible to FHB, were sown in Jiffy peat pots kept for two weeks under greenhouse

conditions for seedling emergence. Seedlings were vernalized in a growth chamber for 8 weeks at 8°C with a 10 h light period and a 14 h dark period. Then, they were individually transplanted into pots filled with 1 L of commercial compost (Klasmann Peat Substrat 4; Klasmann France SARL, France) with two g of slow-release fertilizer (Osmocote Exact 16-11-11N-P-K 3MgO Te). Pots were then placed in a greenhouse compartment at 15-20°C and under a 15-hr-day photoperiod. During plant growth, natural daylight was supplemented with 400-W sodium lights between 6:00 am and 9:00 pm. Plants were fertilized with Hydrokani C2 (Hydro Agri Spécialités, France) at a 1:100 dilution rate. In each pot, two or three tillers were maintained. For each spike, the flowering date was recorded.

The plants were sprayed with Metrafenone (Flexity® at 1 mL L⁻¹; Bayer CropScience, Germany) and Lambda-cyhalothrine (Karaté® Zéon at 0.2 mL L⁻¹; Syngenta Agro S.A.S., France) as a preventive measure to control powdery mildew (*Blumeria graminis*) and insects, respectively. These pesticides have been tested in preliminary experiments and have no detectable effect on FHB (data not shown). For each treatment (single inoculations and mixed inoculations), five pots with two or three spikes per pot were inoculated. This resulted in 10 (2011) or 15 (2010) replicates per treatment. The pots were randomized in the greenhouse.

For the field experiment, the same wheat cv. Royssac was sown at 275 kernels per square meter in 2011 in Grignon (Paris area) on 28 October. Plants were grown in micro-plots (9 wheat rows of one meter long) laid out as a randomized block design with 12 treatment combinations (five individual isolates, six co-inoculations and a non-inoculated control) and four replicates. Each plot was surrounded on its four sides by border plots of another variety to minimize the impact of unwanted cross-inoculations.

Fungal material

The list of fungal isolates used in the experiments is given in table 1. The *F. graminearum* and the *F. culmorum* isolates were provided by F. Forget (INRA Bordeaux, France), the

Table 1: Isolates used in the 2010 and 2011 experiments. In the co-inoculations, each *F. graminearum* isolate was inoculated in a 50-50 mixture with each one of the *F. culmorum*, *F. poae* or *Microdochium* isolates.

Code	Species	Chemotype ^a	Aggressiveness ^b	2010 ^c	2011 ^c
fg91	<i>F. graminearum</i>	NIV	++	x	x
fg159	<i>F. graminearum</i>	DON	+	x	x
fg165	<i>F. graminearum</i>	DON	++	x	x
fg178	<i>F. graminearum</i>	DON	+++	x	x
fg201	<i>F. graminearum</i>	DON	+++	x	-
fc124	<i>F. culmorum</i>	DON	+++	x	x
fc233	<i>F. culmorum</i>	DON	+++	x	x
fc129	<i>F. culmorum</i>	NIV	++	x	x
fc337	<i>F. culmorum</i>	NIV	+++	x	x
fp3	<i>F. poae</i>	NIV	+	x	x
fp4	<i>F. poae</i>	NIV	+	x	-
fp6	<i>F. poae</i>	NIV	+	x	x
fp14	<i>F. poae</i>	NIV	+	x	-
mn58	<i>M. majus</i>	-	-	x	x
mn221	<i>M. majus</i>	-	-	x	-
mn227	<i>M. nivale</i>	-	-	x	x
mn229	<i>M. majus</i>	-	-	x	-

^a: main toxin produced.

^b: Average aggressiveness as measured on wheat spikes in other experiments. “+”, “++”, “+++” indicate low, moderate and high aggressiveness, respectively, as denoted by AUDPC measured on wheat spikes. *Microdochium* isolates were inoculated with a different method and cannot be directly compared to the other isolates.

^c: isolates used in the 2010 or the 2011 experiment.

F. poae isolates were provided by Bayer CropScience and the *Microdochium* were provided by A. S. Walker (INRA Versailles-Grignon, France). They all originate from field sampling in France. The isolates were grown in Petri dishes on PDA (potato dextrose agar, 39 g L⁻¹) at 19°C and kept in the light during three days. For *Fusarium*, four mycelial plugs were then transferred in 250mL of CMC medium with continual shaking. After three days, the medium was filtered through cheesecloth to collect the spores. For *Microdochium*, fungi were transplanted twice in Petri dishes with PDA and kept at 19°C in the light during five days. Five mL of sterile water were then added in the Petri dish to collect the spores. For each isolate, a spore suspension in sterile distilled water was adjusted to a content of 2.10^4 conidia.mL⁻¹ using a Malassez cell. For the co-inoculations, mixed inoculums were prepared by mixing two spore suspensions at 4.10^4 sp.mL⁻¹ resulting in 2.10^4 sp.mL⁻¹ of each isolate. The suspensions were then stored at 4°C until they were used for inoculation, which took place within the same day. After inoculation a few microliters of each spore suspension was deposited on PDA to check for spore viability.

Inoculation procedure

In the greenhouse, the spikes were inoculated with either single isolates or a mixture of two isolates. In the co-inoculation, each *F. graminearum* isolate was confronted to each of the other isolate (see table 1). The inoculations were performed with an atomizer (Ecospray; Prolabo, France). An inoculation consisted in spraying each side of the entire spike with 1mL of inoculum suspension. Due to very low infection efficacy, *Microdochium* isolates were inoculated differently by injection of the spore suspension within each spikelet along the spike. After the inoculation, the wheat heads were enclosed during three days in a transparent polyethylene bag to maintain 100% humidity and promote infection. In the field, the five central rows of each plot were inoculated with 60mL of spore suspension at the mid-flowering stage with a portable sprayer. Co-inoculations were done by spraying successively each

isolate (approximately 120 mL of suspension in total). A mist-irrigation was applied for two hours after inoculation then every morning and evening of the three following days.

Disease assessment

In the greenhouse, the number of spikelets with FHB symptoms was visually assessed thrice a week from five days after inoculation (appearance of first symptoms) to 28 days after inoculation. Since the aspect of FHB symptoms may vary, each symptomatic spikelet showing a premature bleaching or brown necrosis was putatively considered as diseased. The percentage of diseased spikelets in each spike was calculated. The dynamics of the appearance of symptomatic spikelets on each spike was characterized by the Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC) which was normalized by dividing the AUDPC value by the number of observation days. At maturity, the spikes were cut and hand-threshed to separate the kernels from the chaff. Kernels were then weighed to estimate the thousand kernel weight (TKW). Then, the kernels of each spike were ground with a mixer mill (MM 400, Retsch[®], France) and stored for DNA and toxin quantification.

In the field, head blight was assessed once when symptoms were the most visible (33 days after inoculation). Disease incidence was estimated visually as the percentage of blighted spikes in each micro-plot. At maturity, all the spikes along three central rows per plot were harvested and threshed by hand. From these samples, the TKW was assessed and sub-samples were ground with a mixer mill (MM 400, Retsch[®], France) and stored for DNA and toxin quantification. The methods for the detection and quantification of the fungal DNA and toxin contents are described in Annexes 1 and 2.

Data analyses

An objective of the paper was to evaluate the impact of species interaction on the amount of toxin produced. For that, the toxin content in the grains was compared between spikes inoculated with a single species or with a mixture of two species. An expected toxin content was calculated for the mixed inoculations, based on the respective fungal DNA that were

estimated with qPCR and on the toxin production in spikes inoculated with a single species. The expected toxin content was compared to the measured toxin content to establish whether the presence of another species in the same spike enhanced or reduced the toxin production. For each isolate, the expected toxin content was calculated as $(TOX.S / DNA.S) \times DNA.C$ with TOX.S and DNA.S the average toxin and fungal DNA concentrations, respectively, in single inoculations and DNA.C the fungal DNA produced by the isolate in co-inoculations. A Wilcoxon test was used to test the difference between expected and measured toxin contents. Variance analyses were used to identify potential sources of variability (year, species, isolate) influencing the disease development and the toxin production. Multiple mean comparisons were done with the Tukey's HSD test. Residuals distribution was checked for variance homogeneity and normality. Regression analyses were used to investigate the relationship between variables such as AUDPC and fungal DNA or fungal DNA and toxin contents.

Results

Correlations between variables

The AUDPC was found highly correlated to the fungal DNA ($r = 0.78$, $p < 0.001$; Fig. 1a). As well, the toxin content was found highly correlated to the fungal DNA ($r = 0.82$, $p < 0.001$; Fig. 1b). These relationships were further explored with a covariance analysis, with fungal DNA as co-variable (Table 2). Both the isolate (or pair of isolates) and the experiment had a significant effect on AUDPC and on toxin content but most of the variation ($> 98\%$) was accounted for by the fungal DNA. The TKW gave roughly the same information than the AUDPC and so was not further explored.

In the field experiment, a similar correlation was found between the fungal DNA and the toxin contents ($r = 0.78$, $p < 0.001$; Fig. 1c) and the covariance analysis revealed that this relationship was not influenced by the isolate or the pair of isolates inoculated ($p > 0.05$; Table 2).

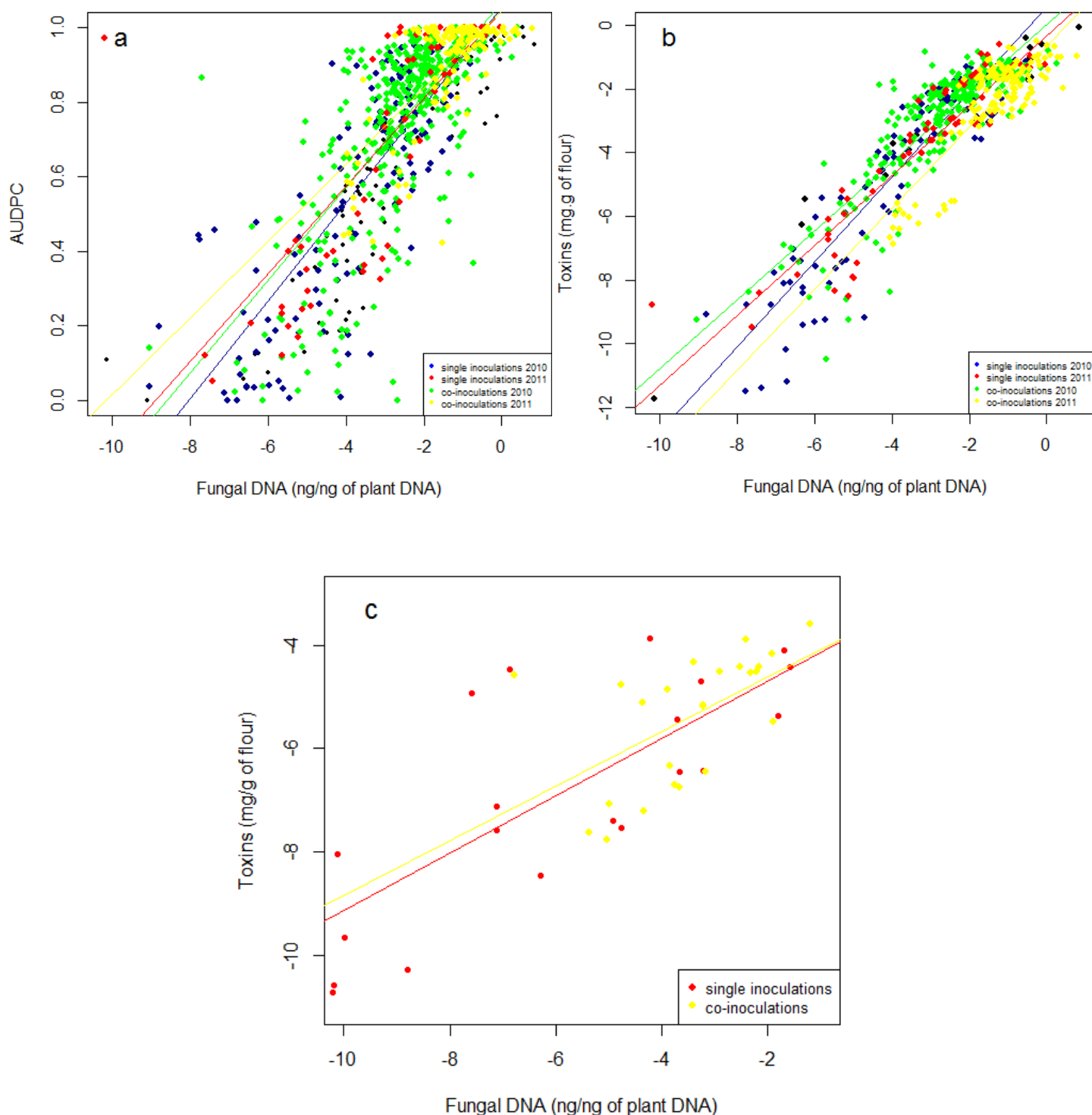


Figure 1: Correlation between AUDPC and fungal DNA and between toxin concentrations and fungal DNA in wheat samples inoculated by several *Fusarium* strains in 2010 and 2011 alone or in co-inoculations, in the greenhouse (a, b) or in the field experiment (c). The fungal DNA was quantified by Q-PCR. The toxin concentration was determined using UPLC-MSMS. Fungal DNA and toxin concentrations data are log-transformed.

Table 2: ANCOVA analysis with the toxin concentrations or the disease severity as variables to be explained and the fungal DNA, the experiment and the isolate as explanatory variables.

Signification codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Source of variation	Df	MS	F-value	p-value
Toxin concentration in greenhouse experiment				
Fungal DNA (A)	1	2330.4	6241.99	< 0.001 ***
Exp (B) ^a	1	10.4	27.72	< 0.001 ***
Iso (C) ^b	69	10.7	28.61	< 0.001 ***
A x B	1	10.4	27.99	< 0.001 ***
A x C	69	2.0	5.42	< 0.001 ***
B x C	32	2.3	6.22	< 0.001 ***
Residuals	538	0.4		
AUDPC of greenhouse experiment				
Fungal DNA (A)	1	36.22	2312.36	< 0.001 ***
Exp (B)	1	0.09	5.78	0.016 *
Iso (C)	73	0.09	5.49	< 0.001 ***
A x B	1	0.12	7.64	0.006 **
A x C	73	0.06	3.72	< 0.001 ***
B x C	34	0.04	2.29	< 0.001 ***
Residuals	605	0.02		
Toxin concentration in field experiment				
Fungal DNA (A)	1	107.33	318.554	< 0.001 ***
Iso (B)	11	5.14	15.256	< 0.001 ***
A x B	11	0.37	1.084	0.416
Residuals	22	0.34		
Disease incidence of field experiment				
Fungal DNA (A)	1	0.8352	73.848	< 0.001 ***
Iso (B)	11	0.0591	5.229	< 0.001 ***
A x B	11	0.0226	1.996	0.076
Residuals	24	0.0113		

^a: experiment

^b: either single isolates or pairs of isolates

Table 3: Variance analyses of the development of *Fusarium* head blight in wheat. For each variable to be explained (AUDPC, fungal DNA and toxin concentrations), 2 explanatory variables were tested: the experiment and the isolate. 0 ‘****’ 0.001 ‘***’ 0.01 ‘**’ 0.05

Source of variance	Df	MS	F-value	p-value (>F)
AUDPC				
Exp (A) ^a	1	1.730	90.96	< 0.001 ***
Iso (B) ^b	73	0.846	44.51	< 0.001 ***
A x B	34	0.239	12.55	< 0.001 ***
Residuals	1334	0.019		
Fungal DNA				
Exp (A) ^a	1	5.362	143.15	< 0.001 ***
Iso (B) ^b	73	0.127	3.38	< 0.001 ***
A x B	34	0.144	3.84	< 0.001 ***
Residuals	1336	0.037		
Toxin concentrations				
Exp (A) ^a	1	0.552	135.56	< 0.001 ***
Iso (B) ^b	69	0.083	20.34	< 0.001 ***
A x B	32	0.028	6.86	< 0.001 ***
Residuals	615	0.004		

^a: experiment

^b: isolates inoculated: either single isolates or pairs of isolates

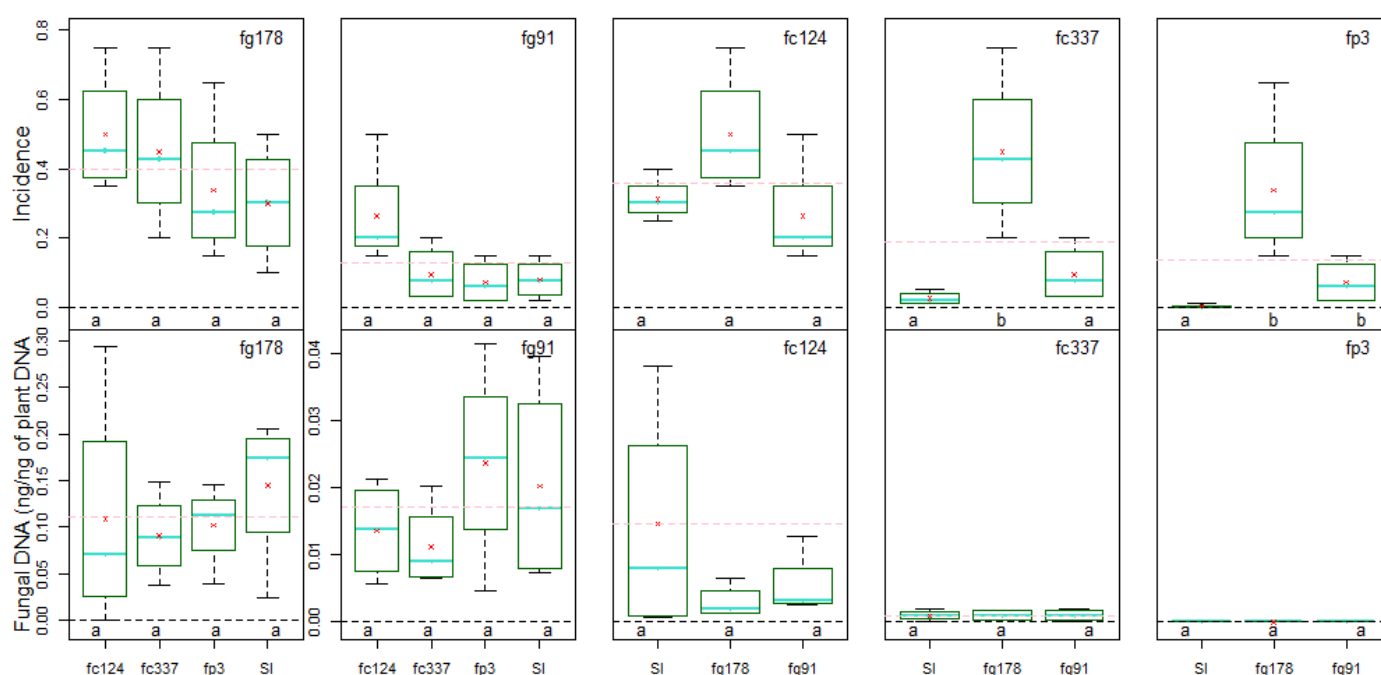


Figure 2: Variations of incidence and fungal DNA in field samples inoculated with different isolates of three *Fusarium* species in single inoculations (SI) or in co-inoculation. Modalities with the same letter within a same graph were not significantly different.

Effect of co-inoculations on disease severity

In both greenhouse experiments and whatever the isolate considered AUDPC was highly variable. An ANOVA analysis showed a significant experiment effect that explained most of the variance in AUDPC (Table 3). In general, the AUDPC was lower in 2010 (0.65 in average) than in 2011 (0.74 in average), except for fc337, for which it was the opposite. The isolate (or isolate pair) significantly influenced the AUDPC. Multiple mean comparisons (Tukey's HSD test) were performed separately for each year and showed that *F. poae* isolates and fg159 were less aggressive than the other isolates. Since *Microdochium* isolates were inoculated differently, their AUDPC cannot be compared to the others.

In the field experiment (Fig. 2), fp3 and fc337 developed less symptoms than the three other isolates when inoculated alone. No other significant difference was observed.

Effect of co-inoculations on fungal DNA

In the co-inoculations, the fungal DNA of each species was expected to decrease relative to single inoculations since both isolates had to share the same spike. This was not always the case, however. For instance, the fungal DNA of fc124 was significantly greater when it was inoculated with fg159, compared to single inoculations, in the 2010 experiment (Table 4a).

Differences were observed between experiments and there was a significant interaction between the experiment and the isolate or isolate pair ($p < 0.001$; Table 3). For instance, in 2011, both *Microdochium* isolates mn58 and mn227 produced more fungal DNA when inoculated with fg178 than when inoculated alone but this was not the case in 2010. That year, mn58 produced less fungal DNA in the presence of fg178 and there was no significant difference for mn227 (Table 4b).

Depending on the isolates and on the year, the fungal DNA increased, decreased or remained stable in the co-inoculations compared to the single inoculations and no general trend could be inferred from these data (Table 4). Nevertheless, some isolates appeared better competitor

Table 4: Means values for fungal DNA quantified in wheat spikes inoculated with different isolates of *Fusarium* and *Microdochium* in 2010 (a) and 2011 (b). Each average values are compared between single inoculations (SI) and mixed inoculations. In the blue rows, the values are to be compared to the *F. graminearum* single inoculation in the first column; in the red rows, the values are to be compared to the *F. culmorum*, *F. poae* or *M. spp* single inoculation in the last row. ***: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$; *: $p < 0.1$

a	SI	Isolate in competition with <i>F. graminearum</i> (fg)										
		fc124	fc129	fc233	fc337	fp4	fp6	fp14	mn58	mn221	mn227	mn229
fg91	0.027	0.012	0.027	0.011	0.100 ***	0.038	0.052	0.040	0.039	0.031	0.065 **	0.03
		0.088	0.003	0.013 *	0.149	0.001	0.001 ***	0.0004 *	0.042 ***	0.049	0.046 **	0.021
fg159	0.011	0.000 1	0.000 4	0.000 1	0.000 3	0.000 1	0.002	0.004	0.002	0.002	0.004	0.002 ***
		0.244 **	0.019 **	0.080	0.063 ***	0.004	0.003	0.003	0.065	0.028	0.051 **	0.020
fg165	0.034	0.023	0.099	0.034	0.503 ***	0.108	0.219 **	0.204 ***	0.245 **	NA	0.066	NA
		0.044	0.002 **	0.055	0.060 ***	0.000 2	0.0002 ***	0.0003 **	0.058	NA	0.098	NA
fg178	0.248	0.144	0.113	0.044 *	0.144	0.081	0.060	0.301	0.127	0.232	0.247	0.198
		0.084	0.003 **	0.010 *	0.088 **	0.001	0.0002 ***	0.001	0.046 ***	0.134 ***	0.088	0.094
fg201	0.130	0.143	0.234	0.119	0.057	0.148	0.182	0.187	0.093	0.365 *	0.130	0.249
		0.087	0.010 *	0.011 *	0.073 ***	0.002	0.0003 ***	0.0001 **	0.050 **	0.070	0.099	0.141 **
SI		0.108	0.037	0.064	0.205	0.003	0.004	0.002	0.090	0.052	0.110	0.043

b	SI	Isolate in competition with <i>F. graminearum</i>							
		fc124	fc129	fc233	fc337	fp3	fp6	mn58	mn227
fg91	0.212	0.067	0.387	0.380	0.260	0.361	0.323	x	x
		0.063	0.225	0.220	0.113	0.001	0.0004 ***	x	x
fg159	0.060 0.010	0.009 **	0.013 *	0.012 **	0.005 ***	0.030	0.039	0.020	0.029 **
		0.464	0.397	0.411	0.329 ***	0.006	0.006	0.012	0.026
fg165	0.609	0.384	0.284	0.783	0.351	0.322	0.445	x	x
		0.259	0.113	0.236	0.127	0.001	0.001 **	x	x
fg178	0.227 0.837	0.303	0.204	0.156	0.247	0.398	0.338	0.955	0.404
		0.261	0.120	0.065	0.157	0.002	0.001 *	0.100 ***	0.109 *
SI		0.212	0.121	0.158	0.078	0.006	0.004	0.021	0.041

than others. Isolates fg159, fp6 and fp14 produced in most cases less fungal DNA (although the difference was not always significant) when confronted to a competitor. In 2010, fc129 and fc337 also developed less in the presence of a competitor. On the contrary, fg91 produced more fungal DNA in several situations (but the difference was not always significant), except when it was inoculated with fc124 or fc233. Fg201 also produced more fungal DNA in most situations (it outcompeted the other isolate in eight combinations out of eleven) but the difference was generally not significant. The situation was less clear with fg165, which seemed to be a good competitor in 2010 (outcompeted the other isolate in eight combinations out of nine) but not in 2011 (outcompeted the other isolate only in one combination out of six). As well, fg178 seemed to be a good competitor in 2011 (outcompeted the other isolate in five combinations out of eight) but not in 2010 (outcompeted the other isolate in one combination out of nine). When fg159 was inoculated with another poorly aggressive isolate (such as fp3, fp4, fp6 and fp14), their development was not significantly affected.

The difficulty to draw conclusion for the above analysis partly came from the high variability in the fungal development among the different replicates. We thus performed a different analysis, based on the direct comparison of the fungal DNA of each isolate within each spike. Figure 3 shows the fungal DNA of the *F. culmorum* isolates as a function of the *F. graminearum* DNA in each individual spike. We then analyzed the difference in fungal DNA between the *F. graminearum* isolate and its competitor in each of these samples. A Wilcoxon test was used to test whether the difference was greater, lower or equal to zero. Positive values mean that the *F. graminearum* isolate produced more fungal DNA than its competitor in the spike. *F. graminearum* developed more (24.6%) or as (63.2%) its competitor (depending on the experiment and the couple of isolates). Regarding each isolate separately, fg159 developed significantly less than all competing *F. culmorum* isolates ($p < 0.001$). The other *F. graminearum* produced in most spikes more fungal DNA than their competitors. Fg178 produced more DNA than the competing isolate in 69/75 of the spikes in 2010 and

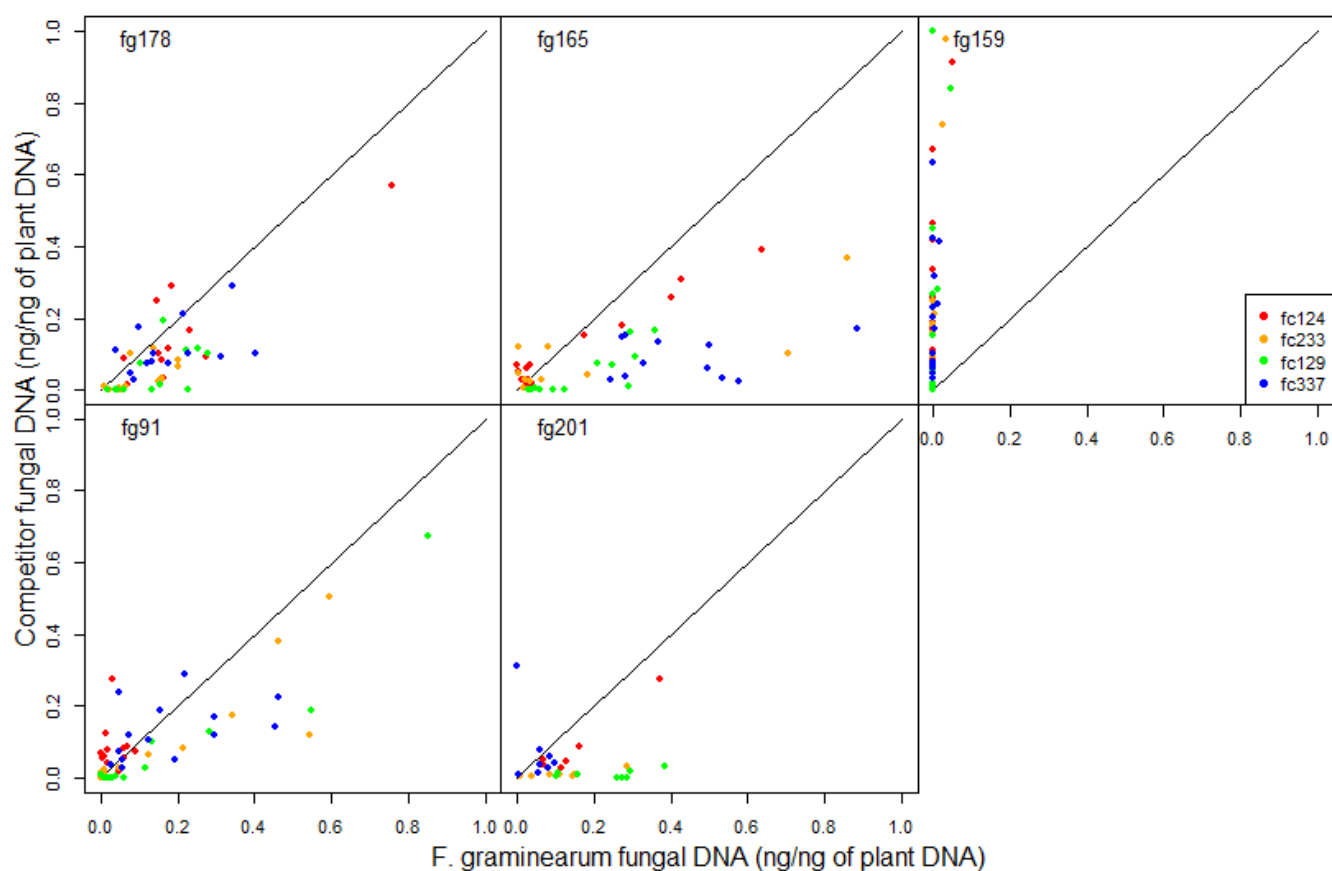


Figure 3: Fungal DNA in wheat spikes in both experiments (2010 and 2011). The *F. graminearum* DNA is on the abscissa and the *F. culmorum* DNA on the ordinate. Each graph corresponds to a *F. graminearum* isolate and each color indicates its *F. culmorum* competitor. In this graph, we only considered *F. graminearum* and *F. culmorum* because the others isolates (comparable to fg159) had a very low aggressiveness (Table 1) and usually did not develop much in the spike, in comparison to *F. graminearum* and *F. culmorum*.

26/30 in 2011. Fg165 produced more DNA than the competing isolate in 50/65 in 2010 and in every spike in 2011. Fg201 produced more DNA in 71/78 spikes in 2010 and fg91 in 50/85 spikes in 2010 and in 33/35 in 2011. In the field experiment, no significant difference in fungal DNA was observed between co-inoculations and single inoculations. Figure 2 suggests that fc124 produced more DNA when

inoculated alone, compared to co-inoculations, and that fg91 produced less DNA when inoculated with *F. culmorum* but these differences were found not significant.

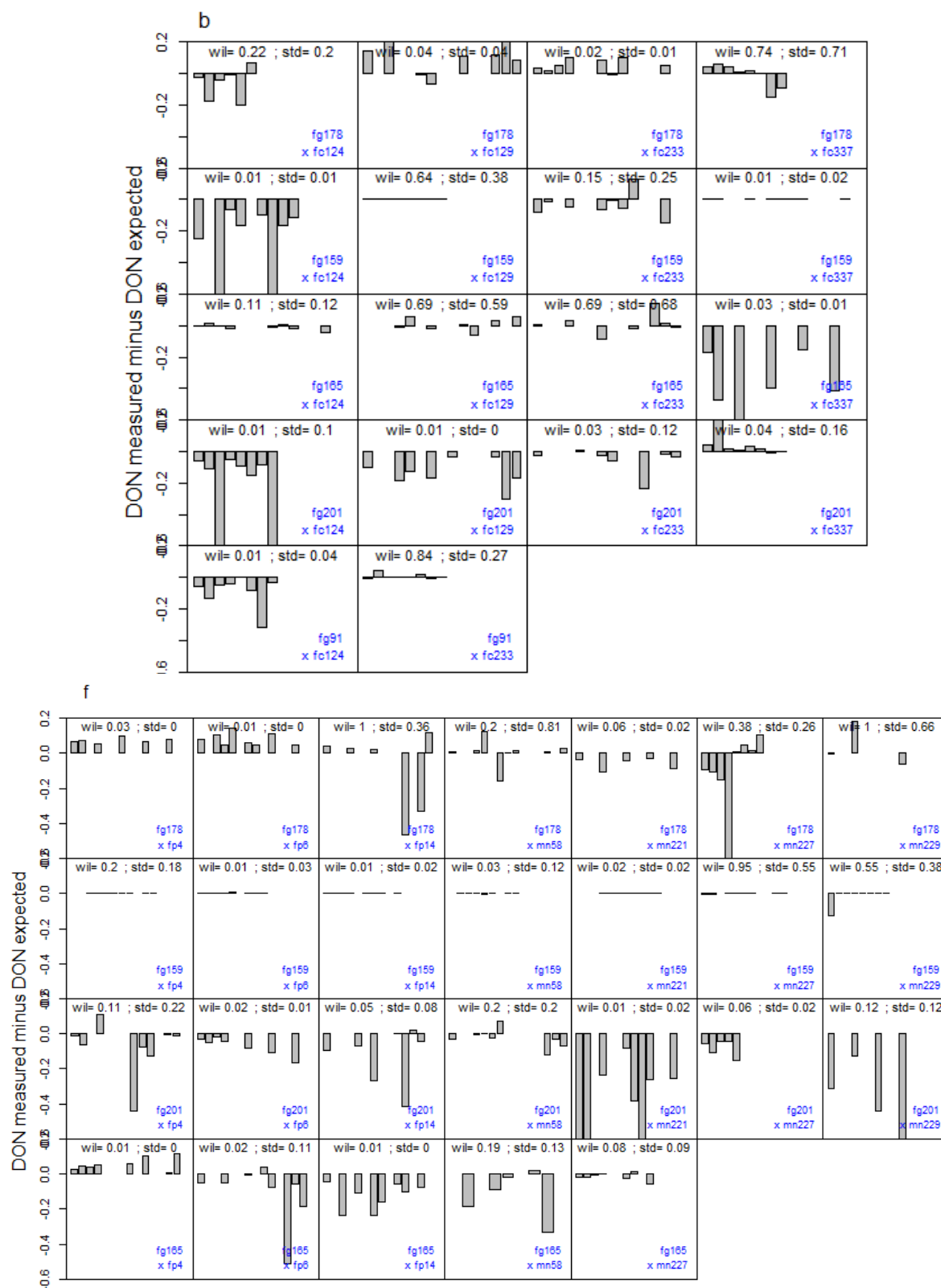
Effect of co-inoculations on toxin production

The amount of toxins produced depended on the experiment, the isolate (or pair of isolates) and their interaction (Table 3). Since the toxin content in the spikes was highly correlated with the fungal DNA (Fig. 1), it is likely that the dependency to the environmental condition (experiment effect and interaction) was largely accounted for by differences in the fungus development. Therefore, we compared expected and measured values for toxin content, relative to the fungal DNA, in order to account for those differences in the fungal development in each individual spike (Annexe, Fig. 4).

Whatever the year and the isolate combination, less DON was produced than expected in 57.4% of the spikes and less NIV than expected was produced in 64.2% of the spikes. On average, the amount of toxin produced was lower or as expected in 2011. The situation was less clear in 2010. More DON was measured in only 48/75, 2/74, 10/85, 21/64 and 2/16 spikes including fg178, fg159, fg201, fg165 and fg91 respectively. More NIV was measured in only 16/36, 9/40, 6/40, 9/38 and 14/63 spikes including fg178, fg159, fg201, fg165 and fg91 respectively. All *F. poae* isolates were poor toxin producers with NIV contents close to zero.

In the field experiment, expected and measured toxin values were not found significantly different (Sup. mat., Fig. 4i).

Figure 4: Measured minus expected toxin content in individual wheat spikes inoculated with different isolate combinations (b & f: DON, 2010). The other graphs are in the supplementary material, at the end of the chapter. The pair of isolates and the p values obtained with the Wilcoxon and Student tests are indicated on each graph.



Discussion

We examined the correlation between the different measured variables in order to confirm our previous results (Siou *et al.*, in prep). There were strong and positive correlations between the fungal DNA and the AUDPC and the fungal DNA and the toxin content, in agreement with other studies using similar techniques (Xu *et al.*, 2007b; Hestberg *et al.*, 2002; Lemmens *et al.*, 2004). The same conclusion was reached in the field experiment, although the data were less clear. This is not surprising, however, when comparing a field experiment with controlled-condition experiments. A good correlation between fungal biomass (here estimated by the fungal DNA) and disease severity (AUDPC) is expected when the inoculations are performed at the most receptive stage of the host plant. The correlation between the fungal DNA and the toxin content, along with the covariance analysis presented in table 2 indicates that there were small differences in toxin productivity among isolates (isolate – fungal DNA interaction) as well as significant environmental effects (experiment and experiment – isolate interaction). These effects were small, however, and barely influenced the fungal DNA – toxin content relationship (see Fig. 1).

Fusarium poae is generally believed to be less aggressive than the other *Fusarium* species (Brennan *et al.*, 2003; Stenglein, 2009). The present study supports this view, with low severity values (AUDPC and TKW) and low amounts of fungal DNA in the grains for inoculations with *F. poae*, compared to other *Fusarium* species in both the greenhouse and the field experiments. On the opposite, no statistical difference was observed between *F. graminearum* and *F. culmorum* for spike colonization (as denoted by the fungal DNA concentration). Xu *et al.* (2007b) suggests that inoculations with *F. graminearum* lead to a higher disease severity on spikes whereas *F. culmorum* tend to colonize more the kernels. This was however based on the comparison of one isolate for each species and might be specific to these particular isolates. Using a larger set of isolates, we did not find any

significant difference in aggressiveness between the *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates.

In most cases, the AUDPC increased or remained stable in co-inoculations compared to single inoculations. However, some exceptions were observed in 2010 with lower AUDPC values in mixed inoculations. In all these cases, the decrease in AUDPC was linked to a decrease in fungal biomass. This is in accordance with the results of Miedaner *et al.* (2004) who found that the head blight rating and the reduction of yield may be significantly lower in co-inoculations than in single inoculations. This indicates that in co-inoculations of two isolates, an inhibition of the fungal development may occur, but this was more an exception than a general rule in our observations.

When a poorly aggressive isolate (such as *F. poae* or fg159) was combined with an aggressive isolate, more symptoms were observed than when it was inoculated alone. These poorly aggressive isolates did not develop more than in single inoculation, however, with either less or the same amount of fungal DNA. The increase in symptom expression can then be clearly attributed to the competitor. The aggressive isolates (fg178, fg201, fc124 and fc233) were slightly or not affected in their development (as denoted by AUDPC or fungal DNA) by the presence of a poorly aggressive competitor. In their experiment on irradiated maize grain, Velluti *et al.* (2000) found that the growth rate of *F. graminearum* (aggressive) was relatively unaffected by the presence of *F. proliferatum* and *F. moniliforme* (less aggressive) whereas the development of the less aggressive isolates was reduced. Our observations confirmed that less aggressive isolates are poor competitors against aggressive ones whereas the development of aggressive isolates is not or slightly modified by the presence of a less aggressive isolate.

Some isolates appeared good competitors against the others, such as fg91 and fg201 which outcompeted the other isolate in around 75% of combinations. On the contrary, fc129 and fc337 appeared poor competitors in the 2010 experiment, with a decrease of their biomass in

all combinations tested. In the case of fg165 and fg178, the results were less clear. They appeared sometimes as good or poor competitors, depending on the couple of isolates and of the experiment. Since the variance in the amount of DNA produced by a given isolate in a spike is high and made the comparisons between treatments difficult, we considered the data differently and, for each spike, we calculated the difference between the fungal DNA of the *F. graminearum* isolate and the fungal DNA of its competitor. This allowed to remove the between-spike variance and to directly observe the competition at the spike level. Even if this varied with the experiment and the couple of isolates that was tested, the *F. graminearum* isolates produced more fungal DNA than their competitors in more than 90% of the spikes, except for fg165 and fg91. These isolates developed less in 2010 when inoculated alone and outcompeted the other isolate in 77% and 57% of the spikes, respectively, that year. In the field experiment, the results were less clear than in the greenhouse with sometimes no effect or a negative effect of the competition between the inoculated isolates on the fungal development. However, no difference between single and co-inoculations was found significant, regarding the fungal DNA.

Simpson *et al.* (2004) and Ramakrishna *et al.* (1996) found in their experiments that the toxin accumulation was often due to an increase of the fungal DNA but not to a greater toxin productivity. We then calculated the expected toxin production, based on the measured fungal DNA, and compared it to the measured production. A positive value (measured > expected) would mean that the toxin productivity was enhanced by the presence of a competitor. In the 2011 experiment, the measured toxin production was always lower than the expected production or not significantly different, whatever the isolate combination and for both DON and NIV. This result is consistent with that of Miedaner *et al.* (2004) who demonstrated that there was less toxin measured than expected in the case of competition between several isolates of *F. culmorum*. Nevertheless, in 2010, even if most isolate combinations responded as in the 2011 experiment, the situation was less clear and the toxin production sometimes increased in

the co-inoculations, especially for fg178. This result is consistent with that of Cooney *et al.* (2001) who found higher levels of toxins in rare cases of co-inoculations between *F. graminearum* and *F. avenaceum* whereas all other combinations tested produced less toxins. In the field experiment, no difference was detected between single and mixed inoculations and observation of the data do not suggest that the toxin productivity would be increased in the co-inoculated plots.

CONCLUSION

In most cases, aggressive isolates were almost unchanged in their capacity to colonize the host (fungal DNA) or a even slightly promoted, whereas poorly aggressive isolates tended to produce less or as fungal DNA against more aggressive isolates. Most of the time, a lower amount of toxins was produced in the co-inoculations than expected. However, some situations conducted to a higher toxin production but it was not repeated between the two experiments. According to our data, the DON and NIV toxins do not seem to be a key element in the competition between fungi for host colonization.

Acknowledgements

The authors are grateful to Bayer CropScience for their financial support and to the Ile de France region for their contribution to the UPLC-UV-MS/MS aquisition. They would like to thank INRA Bordeaux for the isolates supply and B. Beauzoone and M. Willigsecker for their technical help in the microbiological experiments. The PCR tools were developed by S. Elbelt.

References

- Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B, Messens K, Höfte M, Haesaert G, 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 445–458.
- Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM, 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 577–587.

- Cooney JM, Lauren DR, di Menna ME, 2001. Impact of Competitive Fungi on Trichothecene Production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 522-526.
- Hanson LE, 2010. Interaction of *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus stolonifer* causing root rot of sugar beet. *Plant Disease* **94**(5), 504-509.
- Hestbjerg H, Felding G, Elmholt S, 2002. *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology* **150**, 308-312.
- Ioos R, Belhadj A, Menez M, Faure A, 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection* **24**, 894-902.
- Lemmens M, Buerstmayr H, Krska R, Schuhmacher R, Grausgruber H, Ruckenbauer P, 2004. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 299-308.
- Liggitt J, Jenkinson P, Parry DW, 1997. The role of saprophytic microflora in the development of *Fusarium* ear blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum*. *Crop Protection* **16**(7), 679-685.
- Mc Mullen M, Jones R, Gallenberg D, 1997. Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devasting Impact. *Plant Disease* **81**(12), 1340-1348.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 63-70.
- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF, 2008. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* **76**(3), 234-240.
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN, 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* **101**, 960-969.
- Oerke EC, Meier A, Dehne HW, Sulyok M, Krska R, Steiner U, 2010. Spatial variability of *Fusarium* head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. *Plant Pathology* **59**, 671-682.
- Pan JJ, May G, 2009. Fungal-fungal associations affect the assembly of endophyte communities in maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* **58**, 668-678.
- 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**, 1225-1236.
- Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C, 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* **61**, 140-151.
- Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE, 1996. The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Additives and Contaminants* **13**(8), 939-948.
- Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW, 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease progress, fungal DNA, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* **89**, 1028-1037.
- 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. *Environmental Microbiology* **6**(1): 79-87.
- Stenglein SA, 2009. Offered review: *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* **91**(1), 25-36.

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 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 59-66.

Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* **112**, 143-154.

Xu XM, Nicholson P, Ritieni A, 2007a. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 67-71.

Xu XM, Monger W, Ritieni A, Nicholson P, 2007b. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal DNA and mycotoxin contents on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathology* **56**, 943-56.

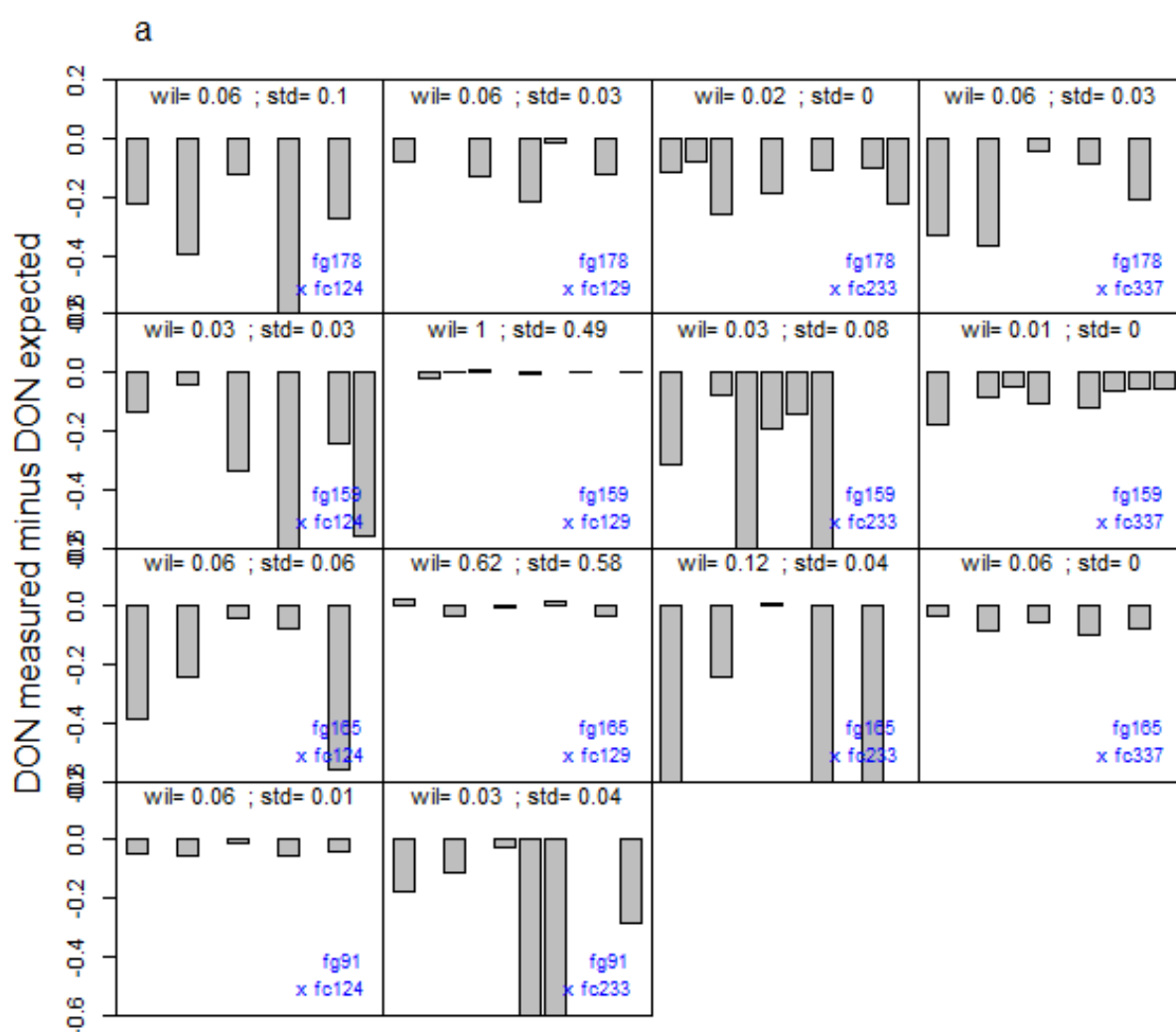
Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Monaghan S, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, 2008a. Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *European Journal of Plant Pathology* **120**, 21-34.

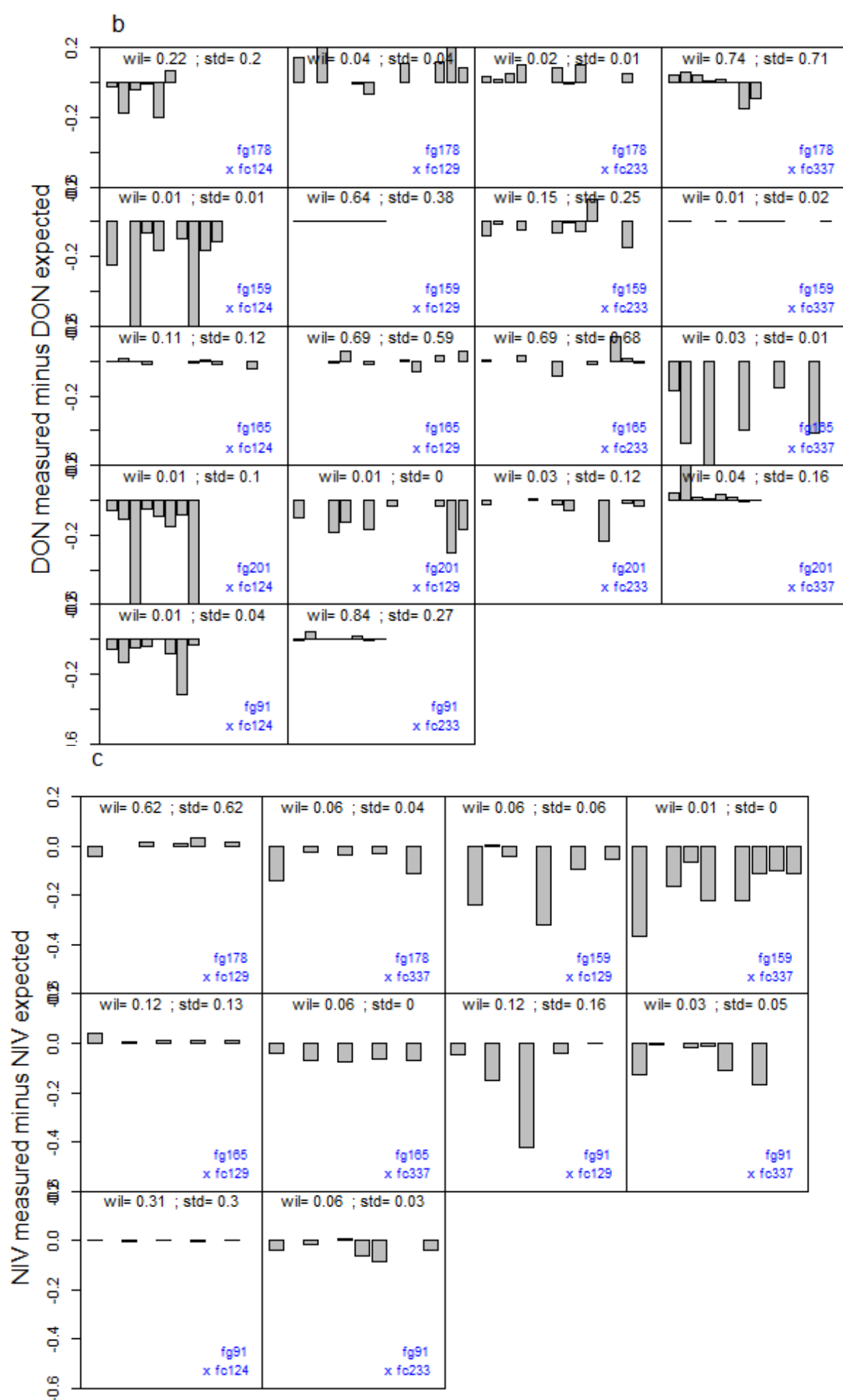
Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, Edwards SG, 2008b. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* **98**, 69-78.

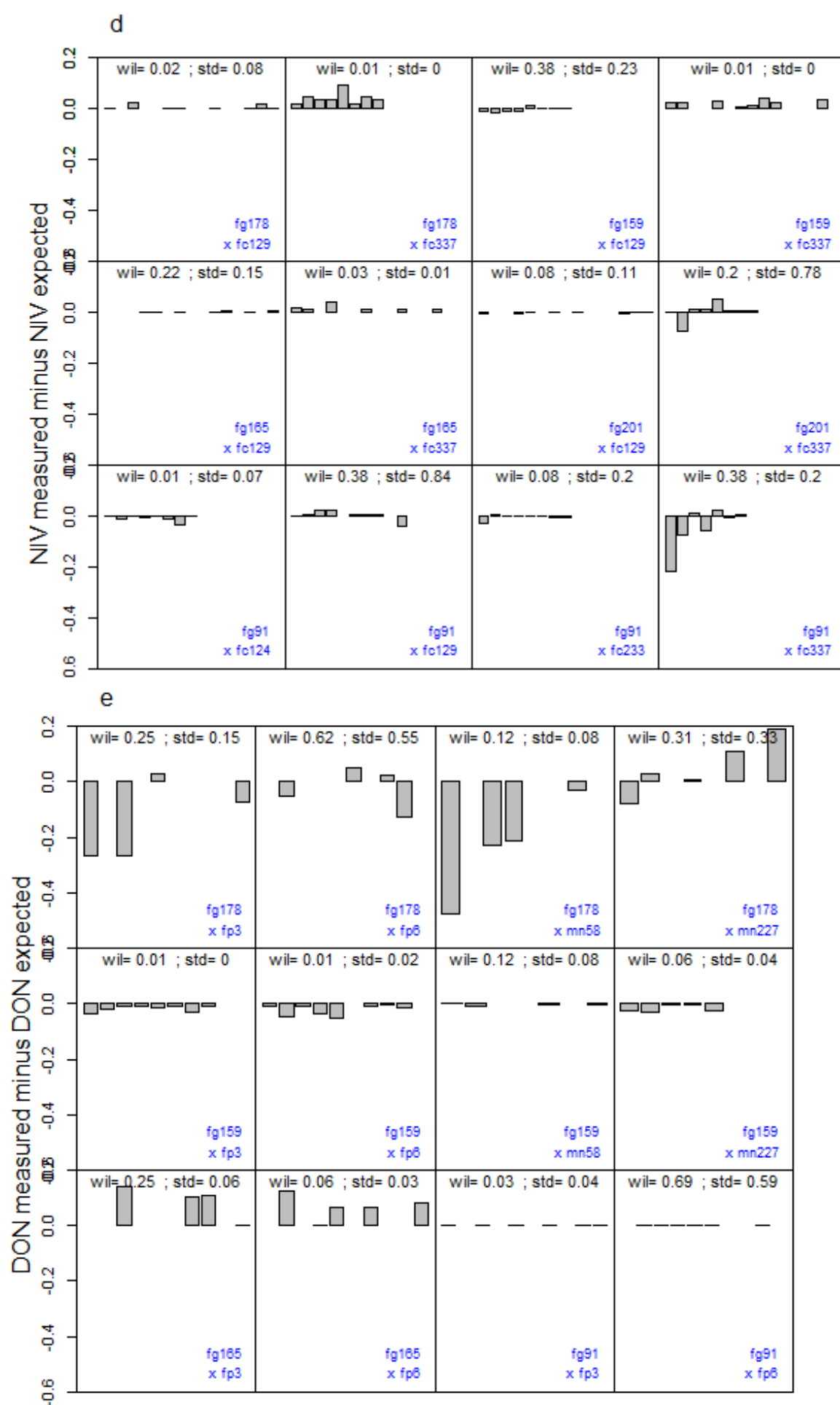
Xu XM, Nicholson P, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 83-103.

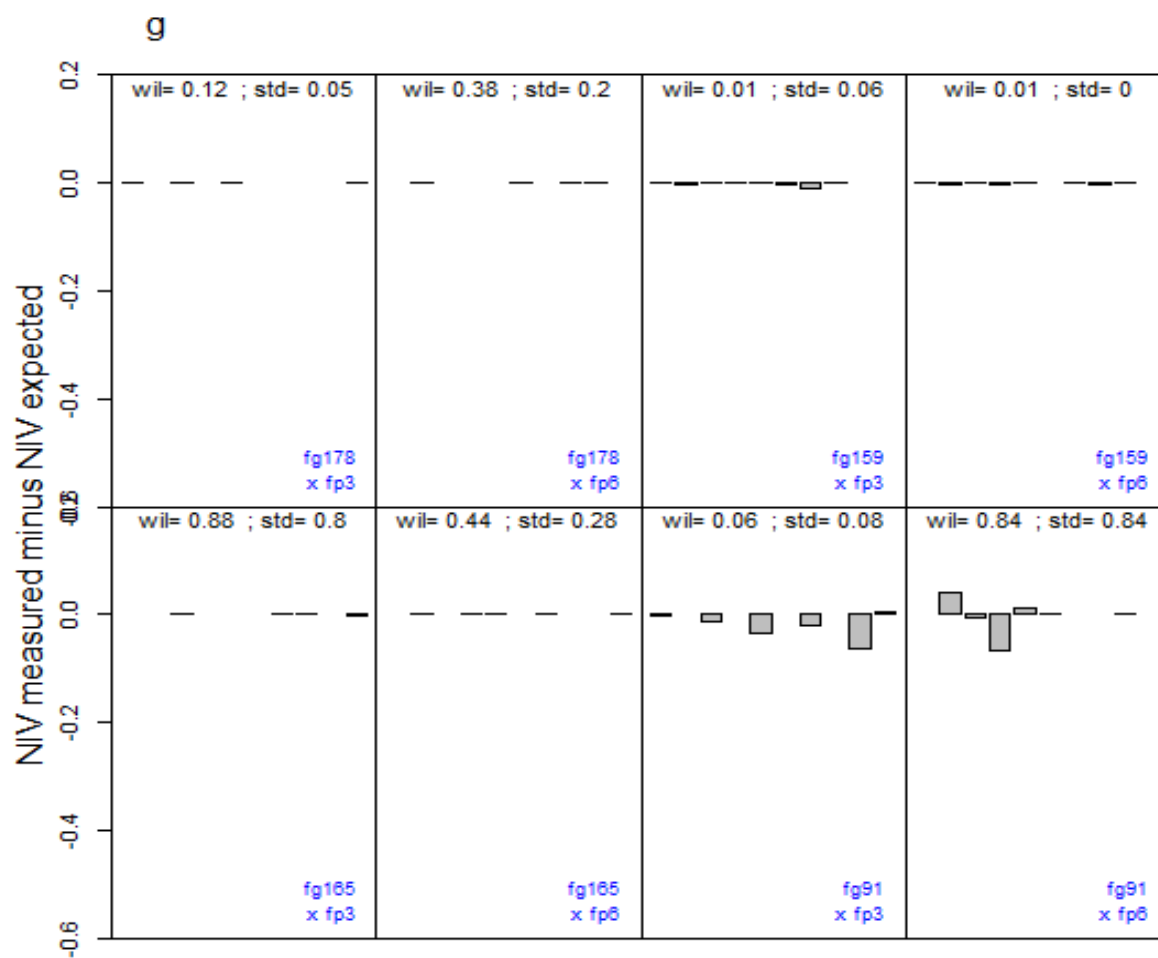
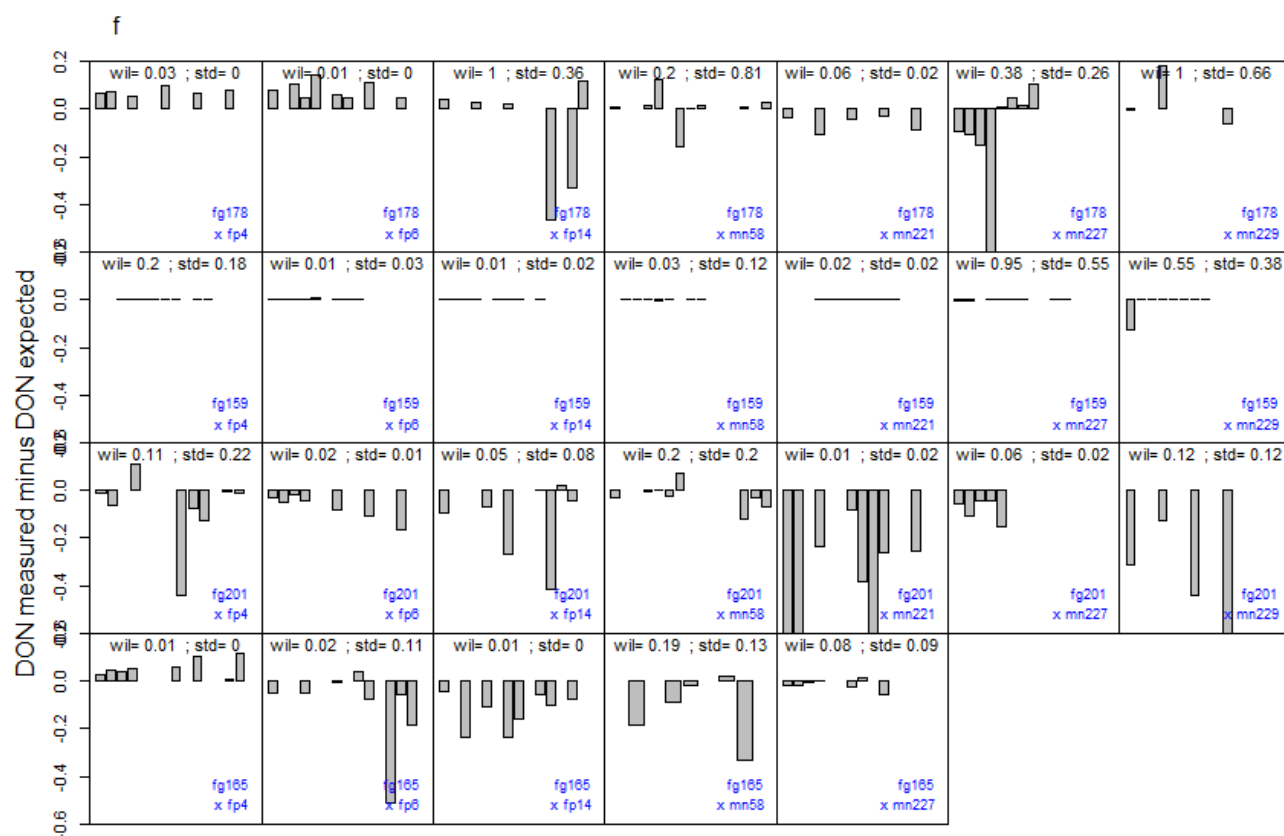
Supplementary material

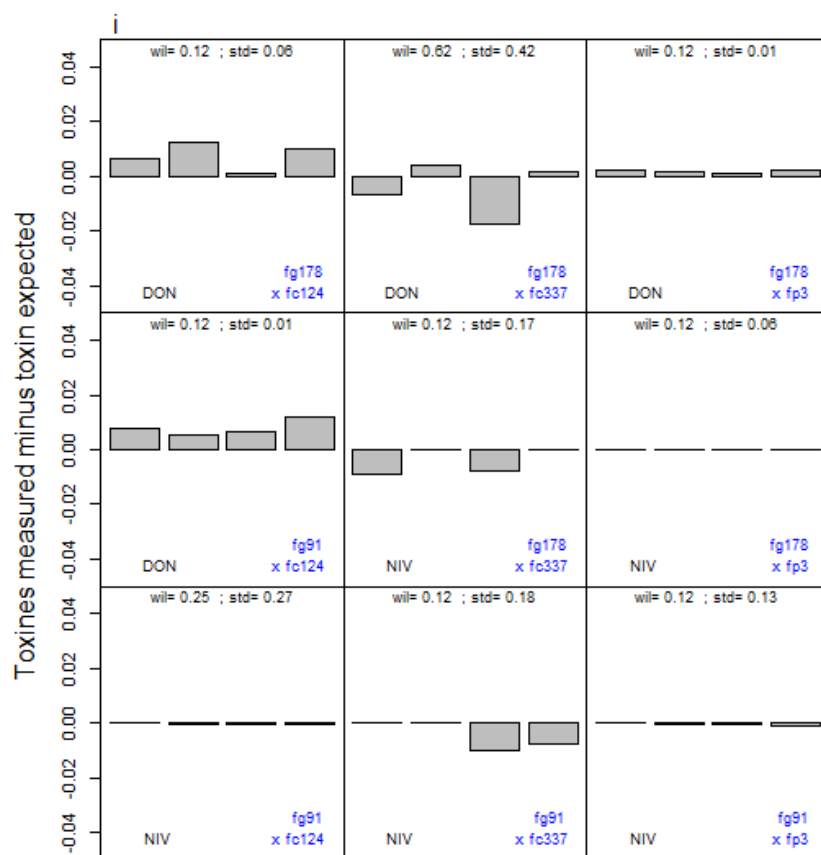
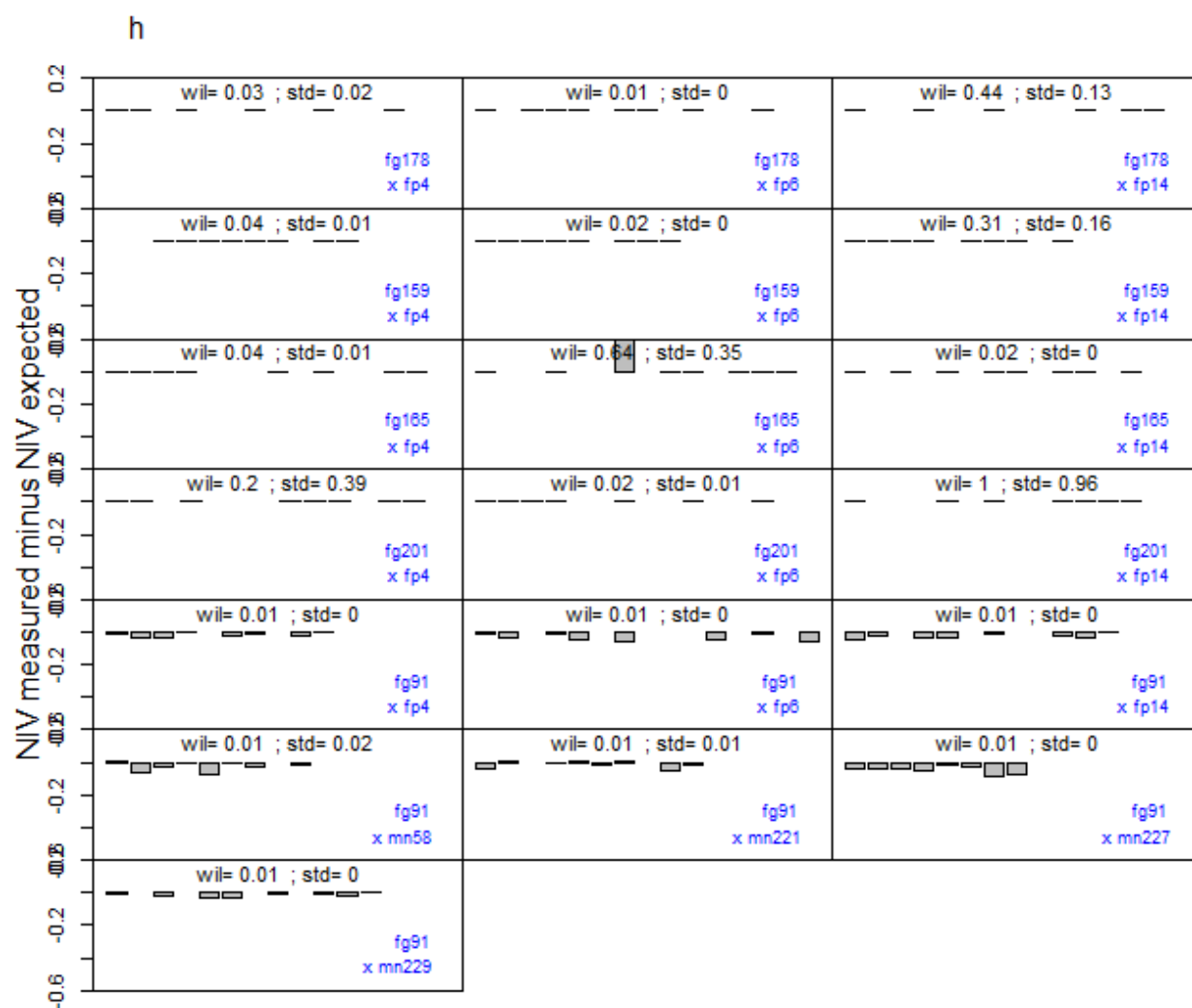
Figure 4: Measured minus expected toxin content in individual wheat spikes inoculated with different isolate combinations (a & e: DON, 2011; b & f: DON, 2010 ; c & g: NIV, 2011 ; d & h: NIV, 2010 ; i: field experiment. The pair of isolates and the p values obtained with the Wilcoxon and Student tests are indicated on each graph.











CHAPITRE 4 :

INTERACTIONS AMONG SPECIES
OF THE FHB COMPLEX IN A
WHEAT SPIKE



Après avoir mis en évidence dans le chapitre précédent l'existence d'interactions entre souches qui vont avoir un impact principalement sur l'équilibre de ces souches dans les grains ainsi que sur les quantités de toxines qu'elles produisent, une nouvelle question se pose : les souches sont-elles en compétition lors des premières étapes du cycle infectieux, c'est-à-dire pour l'infection (interaction favorable ou défavorable à la germination des spores et / ou à la pénétration des hyphes dans les tissus végétaux) ou bien sont-elles en compétition pour la colonisation de l'épi (exclusion ou chevauchement des souches entre elles) ?

Pour répondre à cette nouvelle problématique, nous avons réalisé des inoculations ponctuelles des mêmes souches utilisées dans le chapitre précédant, avec une souche d'une espèce dans la partie supérieure de l'épi et une deuxième souche d'une espèce différente dans la partie inférieure. Ce type d'inoculation permet à chaque souche de s'établir en toute égalité dans l'épi et nous affranchit donc d'un effet interaction sur l'établissement de chaque souche. Ainsi, avec cette méthode, les champignons entrent en compétition uniquement pour la colonisation de l'épi.

L'analyse fractionnée de ces épis (partie haute, médiane et basse) a permis dans un premier temps d'identifier le mouvement des souches au sein de l'épi et dans un deuxième temps d'étudier et d'identifier les interactions mises en évidence dans le chapitre précédent.

Interactions among species of the FHB complex in a wheat spike

Siou D.¹, Gélisse S.¹, Laval V.¹, Lannou C.¹

¹ INRA, UR1290 BIOGER, F-78850 Thiverval-Grignon

Submitted to Applied and Environmental Microbiology

Abstract

Fusarium head blight (FHB) is one of the most damaging diseases on wheat. Its consequences are significant yield losses and toxin accumulation in grains.

Fungal pathogens responsible of FHB include 2 genera of Ascomycetes: *Microdochium* with 2 species (*majus* and *nivale*) and *Fusarium* (toxin producers) from which *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. poae* are the most common species and were chosen for these experiments. Field studies and surveys show that 2 or more species can co-exist within a same field, on the same plant or on the same spike. In this study, we investigated the movement of fungi in the spikes and how the concomitant presence of 2 species on the spike influences this movement in the whole spike. To study these interactions, 12 well characterized strains representing the 5 species cited above, were inoculated locally alone or in pairs by placing a drop of spore suspension inside a single spikelet, one strain above the other, towards the middle of the spike. The spikes were then cut into three parts (top, medium and bottom) and the fungal biomass was measured in each and estimated by Q-PCR. Isolates inoculated alone progressed in the whole spike but some of them developed better in the lower part. In co-inoculations, the strains competed for the spike colonization only since initial infection occurred at different places. In that case, the presence of a fungus in the lower part of the spike tended to impair the development of the other in the upper part, suggesting a competitive interaction.

Key words: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. Nivale*, *Fusarium* Head Blight, species interactions.

Introduction

FHB is a potentially very damaging wheat disease, present in most wheat-growing areas and caused by a species complex (Leonard & Bushnell, 2003; Xu & Nicholson, 2009). The main species present in Europe are *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *Microdochium majus* and *M. nivale* (Ioos *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). Disease surveys have shown that several of the FHB-causing species are commonly found in the same field, especially when the climatic conditions are favourable to the disease, and that co-infection of the same spike by two or three species is frequent (Bottalico & Perrone, 2002; Audenaert *et al.*, 2009, Xu & Nicholson, 2009). How these species interact on the host plant is however still poorly understood.

Interactions among *Fusarium* species have been identified as competitive in most cases. Simpson *et al.* (2004) studied interspecific interactions between *F. culmorum* and the two *Microdochium* species on wheat seedlings and *in vitro*. They showed that *F. culmorum* was a better competitor and inhibited the development of *Microdochium spp.* When *M. majus* was well established in the host, however, it was able to co-suppress *F. culmorum*. In a very detailed analysis of interactions among isolates of four FHB species, Xu *et al.* (2007) found that in most cases, the interaction was competitive, leading to a reduction in fungal biomass in co-inoculations, compared to single-isolate inoculations. Interestingly, they measured a dramatic increase in mycotoxin productivity in the co-inoculations. A general trend in these studies is that the species with the selective advantage does not colonize significantly more the host than when inoculated alone (no advantage is provided by the presence of the other species) but the species with the selective disadvantage grow more poorly in the presence of the competitor than when infecting alone (Xu & Nicholson, 2009). In a study of FHB species competition on wheat (Siou *et al.*, in prep.) we found that, in most cases, aggressive isolates were slightly or not affected by the presence of another strain in the same wheat spike, whereas less aggressive isolates tended to be outcompeted in co-inoculations. Such

competitive interactions seem to occur at the intra-specific level as well. Miedaner *et al.* (2004) investigated interactions among four strains of *F. culmorum* on rye in field epidemics and found that co-inoculations of several isolates led to a reduced disease severity.

Interactions among species of the FHB complex can however be synergistic in certain situations. In a field experiment on maize, Reid *et al.* (1999) found that *F. verticillioides* can grow faster than *F. graminearum* in the maize ear, and they attributed this advantage to a more favourable temperature. They also found that the fungal biomass was higher in ears inoculated with both *F. graminearum* and *F. verticillioides* than in ears inoculated with *F. verticillioides* alone. With the same pathosystem, Picot *et al.*, (2012) showed that previous contamination of maize ears by *F. graminearum* facilitates subsequent infections by *F. verticillioides*, whereas *F. graminearum* is out-competed in mixed inoculations. Positive interactions among FHB species are sometimes suggested by population surveys. For instance, Xu *et al.* (2008) performed a population survey at the scale of four European countries and observed that the frequencies of several FHB species on wheat were positively correlated. They however note that this may result from a similar response to climatic conditions rather than from synergistic effects.

The studies on FHB species competition reviewed above were based on global inoculations of the wheat spike (e.g. spray inoculations). In the field, however, spike inoculations are likely to result from single-spore inoculations or at least from the contamination by a few spores. Zeller *et al.* (2003) estimate that *F. graminearum* produces between two and three infections per spike during an epidemic in a wheat field, even though much more spores are deposited. In such conditions, the output of the competition between two isolates results both from their capacity for host infection and from their capacity for spike colonization. A limitation of spray inoculation is that they do not allow the expression of differences in the colonization capacity of the strains (Argyris *et al.*, 2005; Puri & Zhong 2010; Gosman *et al.*, 2010). To go further in the understanding of the FHB species interactions, we focused on isolate competition for spike

colonization by using single floret inoculations. With this method the local establishment of each isolate was independent (i.e. there was no competition for initial infection) and the isolates were only competing for spike colonisation. We investigated how the concomitant presence of *F. graminearum* and another of the FHB species influenced their development in the spike. We compared the development of *F. graminearum* strains alone or in competition with *F. culmorum*, *F. poae* and *M. nivale* after local inoculations of individual wheat spikes. The fungal biomass of each species was evaluated by quantitative PCR.

Materials and methods

Plant material

A greenhouse experiment was carried out in 2010 and replicated in 2011. Seeds of winter wheat cv. Royssac, considered to be highly susceptible to FHB, were sown in Jiffy peat pots and kept for two weeks under greenhouse conditions for seedling emergence. Seedlings were vernalized in a growth chamber for 8 weeks at 8°C with a 10 h light period and a 14 h dark period. Then, they were individually transplanted into pots filled with 1 L of commercial compost (Klasmann Peat Substrat 4; Klasmann France SARL, France), with two g of slow-release fertilizer (Osmocote Exact 16-11-11 N-P-K 3MgO Te). Pots were placed in a greenhouse compartment at 15-20°C and under a 15-hr-day photoperiod. During plant growth, natural daylight was supplemented with 400-W sodium lights between 6:00 a.m and 9:00 p.m. Plants were fertilized with Hydrokani C2 (Hydro Agri Spécialités, France) at a 1:100 dilution rate. In each pot, only the main tiller was maintained. The flowering date of each spike was recorded as the beginning of anthesis.

The plants were sprayed with Metrafenone (Flexity® at 1 mL L⁻¹; Bayer CropScience, Germany) and Lambda-cyhalothrine (Karaté® Zéon at 0.2 mL L⁻¹; Syngenta Agro S.A.S., France) as a preventive measure to control powdery mildew (*Blumeria graminis*) and insects, respectively. These fungicides were tested before the experiment and have no effect on FHB.

Fungal material

The fungal isolates used in the experiments are described in table 1. The *F. graminearum* and the *F. culmorum* isolates were provided by F. Forget (INRA Bordeaux, France), the *F. poae* isolates were provided by Bayer CropScience and the *Microdochium* were provided by A. S. Walker (INRA Versailles-Grignon, France). They all originate from field sampling in France. For spore production, the isolates were grown in Petri dishes on PDA (potato dextrose agar, 39 g L⁻¹) at 19°C and kept in the light during three days. For *Fusarium*, four mycelial plugs were then transferred in 250mL of CMC medium with continual shaking. After three days, the medium was filtered through cheesecloth to collect the spores. For *Microdochium*, fungi were transplanted twice in Petri dishes with PDA and kept at 19°C in the light during five days. Five mL of sterile water were then added in the Petri dish to collect the spores. For each isolate, a spore suspension in sterile distilled water was adjusted to a concentration of 2.10^4 conidia.mL⁻¹ using a Malassez cell. The suspensions were then stored at 4°C until they were used for inoculation, which took place within the same day. After inoculation a few microliters of each spore suspension was deposited on PDA to check for spore viability.

Experimental design and inoculation procedure

This experiment was conducted twice in September – October 2010 and in April – May 2011 with the same cultivar and using the same protocols of inoculation, disease assessment and toxin analyses. *F. graminearum* isolates were inoculated in competition with one of the other isolates (*F. culmorum* isolates only in 2010 and each isolate of *F. culmorum*, *F. poae* and *M. nivale* in 2011). The isolates used in each trial are indicated in table 1. In addition, each of these isolates was inoculated alone in order to evaluate their aggressiveness level. For each treatment (i.e. isolate or isolate combination), two pots with four spikes (2010, 8 replicates) or five pots with two spikes (2011, ten replicates) were inoculated. The pots were randomized in the greenhouse. In previous experiments, we did not detect a tiller effect within the same pot. This

Table 1: isolates of *Fusarium* spp. used in the experiments

Code	Species	Chemotype ^b	Aggressiveness ^c	2010 ^d	2011 ^d
<i>F. graminearum</i> isolates ^a					
fg91	<i>F. graminearum</i>	NIV	++	-	x
fg159	<i>F. graminearum</i>	DON	+	-	x
fg165	<i>F. graminearum</i>	DON	++	x	-
fg178	<i>F. graminearum</i>	DON	+++	x	x
Other isolates ^a					
fc124	<i>F. culmorum</i>	DON	+++	-	x
fc233	<i>F. culmorum</i>	DON	+++	-	x
fc129	<i>F. culmorum</i>	NIV	++	x	x
fc337	<i>F. culmorum</i>	NIV	+++	x	x
fp3	<i>F. poae</i>	NIV	+	-	x
fp6	<i>F. poae</i>	NIV	+	-	x
mn224	<i>M. nivale</i>	-	-	-	x
mn227	<i>M. nivale</i>	-	-	-	x

^a : *F. graminearum* was confronted to isolates of other species, depending on the year. For each pair of isolates, two treatments were performed with *F. graminearum* as the challenger (inoculated above the other isolate) or as the competitor (inoculated below). In addition, each isolate was inoculated alone in order to evaluate its aggressiveness level.

^b: main toxin produced.

^c: Average aggressiveness as measured on wheat spikes in a greenhouse in different experiments

^d: year of experiment.

was tested again in this experiment and since no effect was found, all the spikes were considered as independent replicates.

In these trials, we compared the development of a challenger isolate inoculated in the upper part of a spike in the presence or absence of a competitor in the lower part. *F. graminearum* was either the challenger or the competitor, and was confronted to isolates of the other species as indicated in table 1. Each spike was inoculated at anthesis. A spikelet situated at about two third of the spike (from the basis) was marked with a permanent pen. The competitor isolate was inoculated in a floret of the marked spikelet and the challenger isolate was inoculated three spikelets above. In single inoculations, the isolates were inoculated at the same position along the spike as the challenger isolate in mixed inoculations. Five microliters of the macroconidial suspension were deposited in each inoculated floret. After the inoculation, the spikes were enclosed during three days in a transparent polyethylene bag sealed to maintain 100% relative humidity and promote infection.

Disease assessment

The spikes were observed from 5 days after inoculation (appearance of first symptoms) to 25 days after inoculation. The number of spikelets with FHB symptoms was visually assessed thrice a week. The percentage of diseased spikelets on each spike was calculated and the dynamics of appearance of symptomatic spikelets on each spike was characterized by the Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC). The AUDPC was scaled by the number of days of observation, which slightly differed among the spikes.

The actual level of spike colonization by the fungi was assessed by quantitative PCR, the amount of fungal DNA being commonly considered as proportional to the fungal biomass (Nicolaisen *et al.*, 2008). For each sample, the fungal DNA was expressed relatively to the plant DNA in the same sample. In 2010, the spikes were harvested at maturity and divided into three

parts: the lower part, including the spikelet inoculated with the competitor isolate (or non inoculated in single inoculations), the middle part containing two spikelets between the two inoculation points, and the upper part containing the spikelet inoculated with the challenger isolate. Since it was apparent that the fungal growth was mainly downwards along the spike (see Results section) and that competition between both isolates occurred in the middle and lower parts of the spike, the procedure was simplified in 2011. In this trial, the part of the spike above the inoculation point of the challenger isolate was discarded and the rest was analysed as a whole. For a better comparison of both trials, the amount of fungal DNA measured in the entire spikes in 2010 was cumulated. The data presented below thus describe the amount of fungal DNA, relative to the plant DNA, of both the challenger and the competitor isolates, the challenger being inoculated above the competitor.

Detection and quantification of fungal DNA

In 2010, the kernels were separated from the chaff, ground with a mixer mill (MM 400, Retsch[®], France) and stored for DNA quantification. In 2011, the entire lower part (kernels + chaff) was ground and analysed. DNA quantification was realized as described in the annexe 2.

Statistical analyses

Variance analyses (ANOVA) were used to identify potential sources of variability (experiment, species, isolate, presence / absence of a competitor) that may influence the development of an isolate. In 2010 the difference in fungal DNA between the three parts of spikes was tested by an ANOVA analysis. Multiple mean comparisons were done with Tukey's HSD tests. Residuals distribution was checked for linearity and variance homogeneity.

Results

Visual assessment of disease severity

Here we compare the visual development, as denoted by AUDPC, of each isolate when inoculated alone. All isolates produced visible symptoms, with AUDPC values significantly different from zero (Student's test, $p < 0.05$), except fp3, mn224 and mn227, which often remained restricted to the inoculated spikelet. The analysis of variance (table 2) showed a significant effect of the isolate, originating from lower AUDPC values for *F. poae* and *M. nivale* isolates compared to the *F. graminearum* and the *F. culmorum* isolates.

Spike colonisation by the fungus

Data from the single inoculations of the 2010 experiment were used to explore the spike colonization by *F. graminearum* and *F. culmorum*. For each isolate we compared the amount of fungal DNA quantified in the upper, middle and lower part of the spike. A first result is that fungal DNA was found for each isolate in all three parts of the spike, with values significantly above zero (Fig. 1). Either there was no significant difference between the three spike sections or the lower part contained more fungal biomass. This means that the fungus was able to colonize the whole spike. Both *F. graminearum* isolates produced a higher fungal biomass in the lower part (Fig. 1a & 1b), indicating a clear tendency to grow downward along the spike. This was less clear for the *F. culmorum* isolates, for which the fungal biomass was found not significantly different in the three spike sections (Fig. 1c & 1d). No single inoculations were done in the lower part of the spikes. However, over the whole dataset, we never found a situation in which the fungal biomass of the isolate inoculated in the lower part of the spike was detected at a value significantly different from zero in the upper part. Note however that for these spikes, a competitor was present in the upper part.

Table 2: Experiment (2010 and 2011) and isolate effects on the disease severity as denoted by AUDPC, in single inoculations. The isolates are indicated in table 1.

Source of variance	Df	MS	F-value	p-value
AUDPC				
Isolate (A) ^a	11	0.637	25.41	< 0.001 ***
Exp (B) ^b	1	0.264	10.55	0.001 **
A x B	2	0.0653	2.61	0.078
Residuals	131	0.025		

^a: challenger : isolate inoculated in the upper part of the spikes

^b: year of experiment

Signification codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

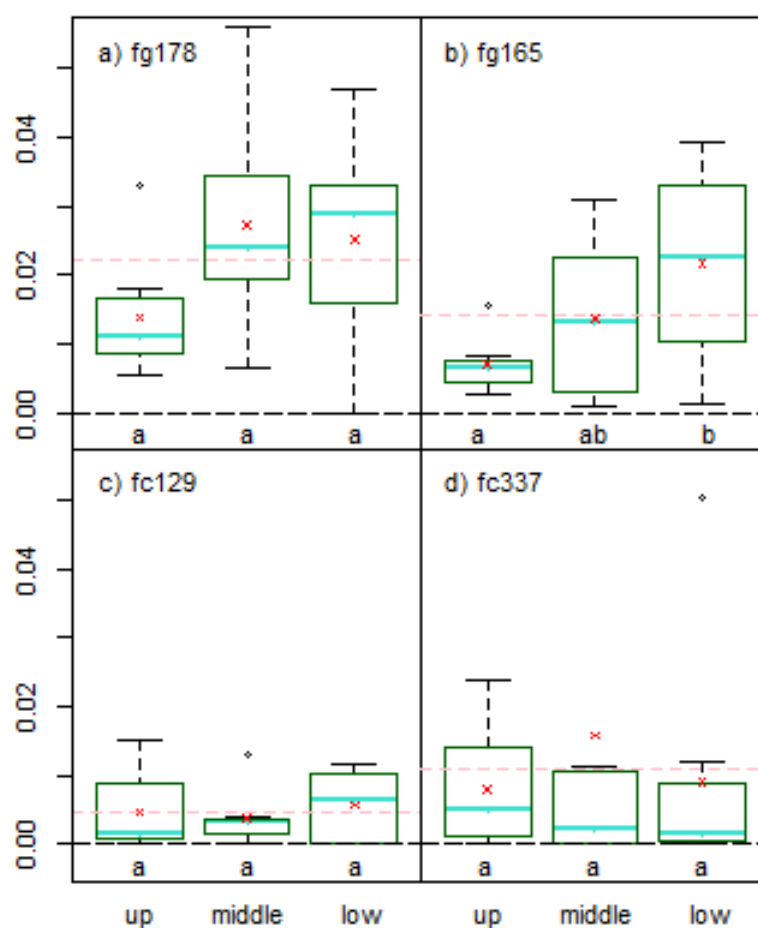


Figure 1: Fungal biomass (ng.ng⁻¹ of plant DNA) in the upper, middle and lower sections of wheat spikes inoculated with *F. graminearum* or *F. culmorum* in the 2010 experiment. The isolates were inoculated in a single floret of the upper section. Thick line within each boxplot: median value; cross: mean values; dashed line across each graph: overall mean value. Letters indicate significant differences among mean values for each isolate (Tukey's HSD test). For fg178, the fungal biomass in the upper section was found significantly different when the outlier (open circle) was removed.

Effect of the presence of a competitor on spike colonization

Here, we compare the development of a challenger isolate inoculated either alone or above a competitor in the same spike. In a first variance analysis (Table 3), we evaluated the effect of the isolate (either the challenger or the competitor) within each experiment. In these analyses, the "competitor" factor included the single inoculations, i.e. a level for which the competitor was actually absent. In 2010, only the competitor effect was significant but the multiple mean comparisons did not allow separating the different treatments. In 2011, both main effects and the interaction were significant, indicating that the output of the competition was dependent on both isolates and on their interaction. The 2011 dataset was further explored by considering each isolate separately, either as a competitor or a challenger (Table 4). Despite apparent tendencies, it was difficult to draw general conclusions from this analysis. The presence of a competitor reduced the development of the challenger isolate but the difference in measured fungal DNA was often not significant. Inversely, the challenger isolate did not seem to have an effect on the development of the competitor isolate (i.e. there was no significant difference in the competitor development when confronted to different challengers). The development of isolate fg178 (as a challenger) was significantly reduced when it was confronted to fc124, fc233 and fp3. The same effect was observed for fc124 (with fg91 and fg178 as competitors), fc233 (with fg178 and fg91 as competitors) and fc337 (with fg91 and fg159 as competitors).

Within-spike competition between isolates

Since the variance in the amount of DNA produced by an isolate in a given spike was high and made the comparisons between treatments difficult, we considered the data differently and, for each spike, we plotted the amount of challenger DNA vs. the amount of competitor DNA (Fig. 2). This allowed to remove the effect of the between-spike variance and to directly relate the respective biomasses of the challenger and the competitor in each spike. In order to analyse these data, we considered a threshold in the development of the competitor isolate and

Table 3: Effect of the challenger isolate and the competitor isolate on the fungal biomass of the challenger. In this analysis, the competitor effect includes the single inoculations (treatments in which the challenger was inoculated alone). Separate analysis are presented for the 2010 and the 2011 experiments.

Source of variance	Df	MS	F-value	p-value
2010 experiment				
Challenger (A) ^a	3	0.003	2.10	0.107
Competitor (B) ^b	4	0.005	3.57	0.010 **
A x B	4	0.003	2.03	0.098
Residuals	83	0.001		
2011 experiment				
Challenger (A) ^a	10	0.020	21.60	< 0.001 ***
Competitor (B) ^b	11	0.005	5.55	< 0.001 ***
A x B	37	0.002	1.98	< 0.001 ***
Residuals	411	0.001		

a: challenger : isolate inoculated in the upper part of the spikes

b: competitor : isolate inoculated in the lower part of the spikes

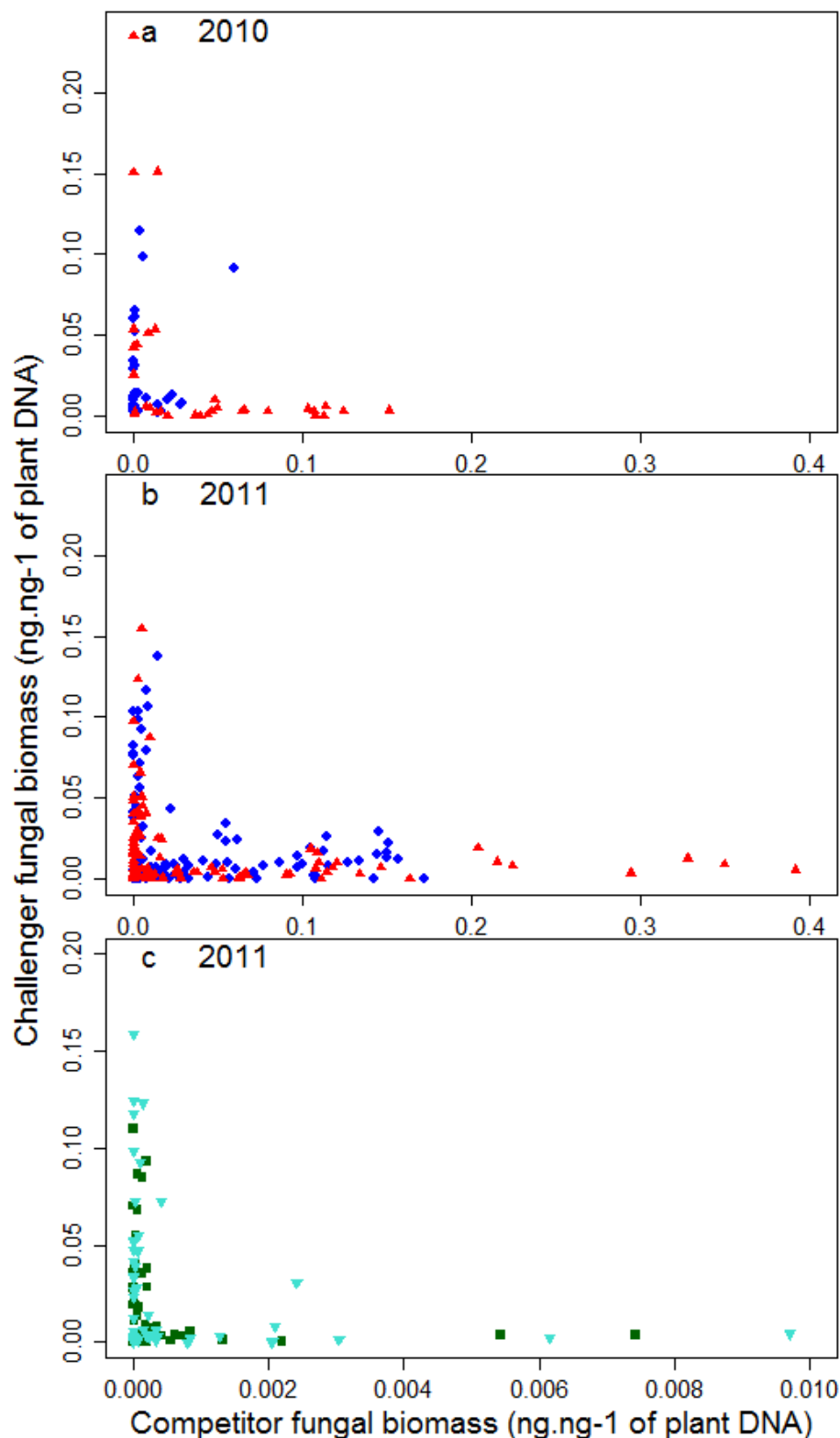
Signification codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Table 4: Means values for the fungal DNA quantified in wheat spikes inoculated with different isolates of *Fusarium* and *Microdochium* in 2011. a: fungal DNA of the *F. graminearum* isolates in single inoculations (SI) and in mixed inoculations (as challenger or as competitor); b: fungal DNA of the other isolates in single inoculations (SI) and mixed inoculations (b). Letters indicate significant differences among mean values in a same line (Tukey HSD tests).

a		<i>F. culmorum</i>				<i>F. poae</i>		<i>F. nivale</i>		SI
<i>F. graminearum</i>		fc124	fc129	fc233	fc337	fp3	fp6	mn224	mn227	
Challenger	fg91	0.015	0.016	0.017	0.038	0.025	0.021	0.019	0.020	0.078
		a	a	a	a	a	a	a	a	a
	fg159	0.005	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.002
		a	a	a	a	a	a	a	a	a
	fg178	0.033	0.061	0.020	0.059	0.030	0.049	0.072	0.062	0.114
Competitor		b	ab	b	ab	b	ab	ab	ab	a
	fg91	0.015	0.031	0.060	0.036	0.037	0.045	0.036	0.130	-
		a	ab	ab	ab	ab	ab	ab	b	-
	fg159	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	-
		a	a	a	a	a	a	a	a	-
	fg178	0.105	0.121	0.063	0.123	0.123	0.084	0.075	0.116	-
		a	a	a	a	a	a	a	a	-

b		<i>F. graminearum</i>			SI
Other		fg91	fg159	fg178	
Challenger	fc124	0.022	0.067	0.013	0.094
		a	ab	a	b
	fc129	0.012	0.007	0.007	0.013
		a	a	a	a
	fc233	0.021	0.020	0.003	0.056
		ab	ab	a	b
	fc337	0.009	0.009	0.014	0.031
		a	a	ab	b
	fp3	0.000	0.000	0.000	0.001
Competitor		a	a	a	a
	fp6	0.000	0.000	0.000	0.000
		a	a	a	a
	mn224	0.000	0.001	0.000	0.000
		a	b	a	a
	mn227	0.000	0.001	0.001	0.000
		a	a	a	a
	fc124	0.115	0.052	0.079	-
		a	a	a	-
Competitor	fc129	0.040	0.015	0.008	-
		a	a	a	-
	fc233	0.064	0.036	0.020	-
		a	a	a	-
	fc337	0.036	0.018	0.013	-
		a	a	a	-
	fp3	0.000	0.001	0.000	-
		a	a	a	-
	fp6	0.000	0.002	0.000	-
Competitor		a	a	a	-
	mn224	0.001	0.001	0.000	-
		a	a	a	-
	mn227	0.002	0.000	0.000	-
		a	a	a	-

Figure 2: Fungal biomass of the challenger isolate ($\text{ng} \cdot \text{ng}^{-1}$ of plant DNA) expressed as a function of the fungal biomass of the competitor isolate in the 2010 (a) and 2011 (b & c) experiments. Fig. 3a and 3b show the competition between *F. graminearum* and *F. culmorum*; 3c shows the competition between *F. graminearum* and *F. poae* or *M. nivale*. The challenger isolates were inoculated in a single floret above the competitor isolates. Circles: *F. graminearum* as a challenger and *F. culmorum* as a competitor; triangles: *F. culmorum* as a challenger and *F. graminearum* as a competitor; squares: *F. graminearum* as a challenger and *F. poae* as a competitor; reversed triangles: *F. graminearum* as a challenger and *M. nivale* as a competitor. Note that the X-axis scale in 3c is different from that in 3a and 3b.



we compared the development of the challenger isolate when the competitor was above or below this threshold. The threshold was set at 5% of the maximal values of the fungal biomass of the competitor isolates, which was around 0.04 ng.ng^{-1} of plant DNA. A variance analysis development threshold of the competitor (Table 5). The challenger x threshold interaction revealed that not all isolates were equally affected by the presence of a well-developed competitor, but Fig. 2 clearly shows that this interaction does not change the general conclusion that the challenger isolate was able to colonize the spike to a large extent only when the competitor was poorly developed.

In order to take into account large differences in aggressiveness among the species, we did the analysis again without the poorly aggressive *F. poae* and *M. nivale* isolates. The main effects were similar, with a lower influence of the experiment, and only the challenger x threshold interaction remained significant (data not shown). We then performed again the same analysis while removing isolate fg159, characterized by a low aggressiveness, and keeping only aggressive isolates. Then, only the challenger effect and the threshold effect remained significant, confirming that the presence of a well-developed competitor thwarts the colonization by a challenger isolate and indicating that not all isolates are equally good challengers. It seems however that even poorly aggressive isolates have an influence on the development of a challenger. Fig. 2c shows that the presence of *F. poae* and *M. nivale* in the lower part of the spike could affect the development of *F. graminearum* since no high values (above 0.04 ng.ng^{-1} of plant DNA) of fungal DNA concentration (except one) was found in the spikes in which either *F. poae* or *M. nivale* were present above a certain level ($5.10^{-3} \text{ ng.ng}^{-1}$ of plant DNA). The number of spikes with a sufficient development of those competitors was too low for a formal analysis but Fig. 2c shows a clear separation of the data.

Table 5: Variance analyses: effects of the challenger isolate, the competitor isolate, the threshold in the competitor isolate development, and the experiment on the fungal biomass of the challenger isolate.

Source of variance	Df	MS	F-value	p-value
All isolates				
Challenger (A) ^a	11	0.016	16.39	< 0.001 ***
Competitor (B) ^b	12	0.004	4.29	< 0.001 ***
Threshold (C) ^c	1	0.052	51.39	< 0.001 ***
Exp (D) ^d	1	0.007	7.05	0.008 **
A x B	40	0.001	1.23	0.160
A x C	10	0.003	2.74	0.003 **
A x D	2	0.003	3.35	0.036 *
B x C	6	0.002	2.31	0.033 *
B x D	3	0.002	1.75	0.156
C x D	1	0.003	2.98	0.085
Residuals	477	0.001		
Without <i>F. poae</i> isolates, <i>M. nivale</i> isolates and fg159				
Challenger (A) ^a	6	0.009	5.02	< 0.001 ***
Competitor (B) ^b	7	0.005	2.84	0.007
Threshold (C) ^c	1	0.071	40.99	< 0.001 ***
Exp (D) ^d	1	0.010	5.90	0.016
A x B	13	0.001	0.80	0.656
A x C	5	0.002	1.00	0.419
A x D	2	0.003	1.93	0.147
B x C	6	0.002	0.93	0.477
B x D	3	0.002	1.01	0.390
C x D	1	0.004	2.36	0.126
Residuals	224	0.002		

a: challenger : isolate inoculated in the upper part of the spikes

b: competitor : isolate inoculated in the lower part of the spikes

c: factor characterising the poor/great development of the competitor

d: 2010 or 2011 experiment

Signification codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Discussion

The point inoculation method consisting in depositing a spore suspension into a single spikelet is a technique often used for measuring the variety resistance to the disease spread within the head (Argyris *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2001). Associated with quantification by qPCR, it allowed investigating the competition for spike colonisation after local infection by two different species. Conversely to massive inoculations of the spike, as often done in competition studies, it allowed separating the colonization capacity of the competing isolates from their infection efficiency. As in field epidemics spike infection usually results from contamination by a single spore or a few spores, our approach better reflects the kind of interaction that is likely to occur in natural conditions.

Argyris *et al.* (2005) describe two kinds of disease progression in spikes: the local development of the fungus around the inoculation point (i.e. within the inoculated floret) and the colonization of the entire spike, with a marked tendency to progress towards the spike basis. Based on such observations, resistance type I has been defined as resistance to initial infection and resistance type II as resistance to spike colonization (Schroeder & Christensen, 1963). In our experiment, we used a single cultivar that is rated as susceptible to FHB and for which aggressive isolates were able to colonize the entire spike. Schroeder & Christensen (1963) suggested that the clogging of vascular tissue in the rachis above the point of inoculation causes the head to ripen prematurely, so that even kernels not directly infected are shrivelled because of a shortage of water and nutrients. This can explain the tendency for downward colonization in FHB. This also reinforces the interest of working with accurate quantification techniques, compared to visual symptom observations.

Within the *F. graminearum* species, fg159 appeared poorly aggressive and poorly competitive against all *F. culmorum* strains, with low values of AUDPC and fungal DNA, illustrating the variability between isolates of a same species. *F. poae* or *M. nivale* also appeared poorly aggressive, with the amount of fungal DNA up to 40 times lower than those observed for the

Fusarium isolates. Even if these species were bad competitors, they seemed to reduce the development of *F. graminearum* isolates, at least when they were able to colonize the spike beyond the inoculated floret.

Having established in the 2010 experiment that the fungi progression is not symmetrical in the spike but preferentially downwards, we focused on the competing capacity of a challenger isolate when progressing in that direction and encountering a competing isolate. The most striking result was that the challenger isolate was able to colonize the spike only when the competitor was poorly developed. This did not depend on the species. Whether the competitor was a *F. graminearum* or a *F. culmorum* did not change the output of the competition. Even when the competitor was a poorly aggressive isolate, its presence in the lower part of the spike still had an effect on the challenger development (see Fig. 2c).

Gosman *et al.* (2009) showed that following point inoculation, the disease progression differs for DON and NIV chemotypes. Symptoms induced by the DON producers spread rapidly through the spike, whereas the spread of symptoms is slower for the NIV chemotype. In our study, DON-producing isolates could be less aggressive (i. e. fg159) and could produce a lower AUDPC than NIV-producing isolates. Our study was not based on a large enough number of individuals to draw conclusion at the species or chemotype scale. This only suggests a large variability in quantitative traits among isolates within a species and within a chemotype.

To conclude, in this experiment we illustrated that FHB fungi preferentially develop downward along the spikes. We also observed that this spread was limited when another fungus was present below the initial infection point, resulting in a decrease in the total fungal biomass of the challenger isolate and an exclusion of both fungi in the spikes.

Acknowledgements

The authors are grateful to Bayer CropScience for their financial support and to the Ile de France region for their contribution to the UPLC-UV-MS/MS acquisition. They would like to thank INRA Bordeaux for the isolates supply, M. Dufresne for her help in the methodological developments, B. Beauzoune and M. Willigsecker for their technical support. The PCR tools were developed by S. Elbelt.

References

- Argyris J, TeKrony D, Hershman D, VanSanford D, Hall M, Kennedy B, Rucker M, Edge C, 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Science* **45**, 626–634.
- Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B, Messens K, Höfte M, Haesaert G, 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 445–458.
- Gilbert J, Abramson D, McCallum B, Clear R, 2001. Comparison of canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia* **153**, 209–215.
- Gosman N, Srinivasachary, Steed A, Chandler E, Thomsett M, Nicholson P, 2010. Evaluation of type I *Fusarium* head blight resistance of wheat using non-deoxynivalenol-producing fungi. *Plant Pathology* **59**, 147–157.
- Ioos R, Belhadj A, Menez M, Faure A, 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection* **24**, 894–902.
- Leonard KJ, Bushnell WR, 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 63–70.
- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF, 2008. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* **76**(3), 234–240.
- Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C, 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* **61**, 140–151.
- Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW, 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* **89**, 1028–1037.
- Schroeder HW, Christensen JJ, 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **53**, 831–838.
- 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. *Environmental Microbiology* **6**(1): 79–87.
- Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM,

Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* **112**, 143-154.

Xu XM, Nicholson P, Ritieni A, 2007. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 67-71.

Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mule G, Hornok 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**, 69-78.

Xu XM, Nicholson P, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 83–103.



DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



A. Picot

Discussion générale

Ce travail de thèse a été réalisé dans le but de mieux comprendre l'épidémiologie du complexe fusarien. La caractérisation des souches, l'étude des stades de sensibilité du blé à la fusariose ainsi que les interactions entre souches, à partir d'expérimentations en conditions contrôlées, ont permis de mettre en évidence des éléments clés nécessaires à la compréhension du développement épidémique de cette maladie en condition de culture. Ces éléments sont synthétisés et discutés de façon plus générale dans cette dernière partie.

1. Liens entre traits de vie et sévérité sur épi

La caractérisation des souches réalisée dans la première partie de cette thèse avait pour but de mettre en évidence des traits de vie des champignons illustrant leur capacité à se développer ou à produire des toxines et d'identifier les meilleurs indicateurs de risque de fusariose ou de toxines dans la récolte. A partir de cela, les mesures réalisées *in vitro* ne se sont pas révélées de bons indicateurs de ce qui se passe *in vivo* avec de mauvaises corrélations entre traits de vie et variables de sévérité. Ces incohérences entre résultats *in vitro* et *in vivo* ont été illustrées par d'autres travaux (Alvarez *et al.*, 2010 ; Nopsa, 2010) et confirment l'impossibilité de caractériser l'agressivité des souches à partir de données obtenues au laboratoire sans réelle interaction plante – pathogène – environnement.

2. Les *F. poae* et *Microdochium*, des champignons un peu à part

La caractérisation des souches *in vitro* et *in vivo* nous a permis de classer les champignons du genre *Microdochium* et de l'espèce *F. poae* un peu à part puisque toutes ces souches testées se sont révélées nettement moins agressives tant dans leur développement sur épi et sur grains avec de faibles AUDPC, PMG ou biomasses que dans leur production de toxines pour les *F. poae*. Une difficulté supplémentaire concernant l'inoculation de *Microdochium* a également été mise en évidence puisque l'inoculation par spray de ces champignons n'induit pas de maladie. Les différents essais d'inoculations nous ont donc conduits à réaliser des

inoculations par injection d'une goutte de suspension de spores dans les fleurs à l'aide d'une seringue et avec blessure des épillets. Avec cette méthode, il nous a été possible d'observer et quantifier le développement du champignon dans l'épi et ainsi le confronter aux autres souches de manière équitable pour l'étude des interactions entre espèces (chapitre 3). La présence récurrente et croissante de ces espèces en conditions de culture au champ nous amène à réfléchir sur les caractéristiques qui leur permettent de se maintenir malgré leur faible agressivité apparente et les difficultés rencontrées pour les inoculer de façon artificielle. Plusieurs hypothèses concernant l'inoculum, le rôle des toxines ou encore le choix variétal pourraient peut-être apporter des éléments d'explication à ces observations.

Peu d'études s'intéressent aux *F. poae* et aux *Microdochium* qui sont pourtant retrouvés chaque année en proportion non négligeable. Les résultats que nous avons obtenus ouvrent la porte à de nouvelles investigations sur l'épidémiologie de ces agents pathogènes.

3. Indicateurs d'agressivité et de production de toxines

Les corrélations étudiées entre les différentes variables de sévérité ont permis de valider le choix de l'AUDPC comme indicateur de l'agressivité des souches (Chapitre 1). Cette variable s'est révélée bien corrélée aux mesures sur grains (PGS, PMG, biomasse fongique et toxines) et reflète les conséquences du développement des souches sur le rendement et la qualité sanitaire du blé. Cependant, parmi toutes les mesures réalisées pour caractériser le développement de la fusariose sur épi, la biomasse fongique reste significativement l'indicateur le plus stable, quelles que soient les conditions d'expérimentations, de la production de toxines dans les grains en serre et au champ.

4. Fenêtre de sensibilité validée mais avant et après, rien n'est impossible...

Les analyses de grains réalisées à partir d'épis inoculés en serre à différentes dates pré et post floraison confirment que la fenêtre de sensibilité du blé à la fusariose est centrée autour de la floraison. Elles montrent également que l'impact sur le rendement est maximal dès la sortie des premières anthères. C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir une bonne protection des épis

dès le début de la floraison pour limiter les pertes de rendement. Il est à noter également que des souches agressives sont capables d'induire de fortes infections même lorsqu'elles sont inoculées avant la floraison mais avec, toutefois, une efficacité d'infection plus faible. Des inoculations encore plus précoces, à épiaison par exemple, pourraient également être testées pour une estimation plus précise de la fenêtre de sensibilité. Les quantités de biomasse fongique et de toxines obtenues pour les inoculations aux stades plus tardifs illustrent la possibilité des champignons à infecter la plante à ces stades et donc se développer si les conditions redeviennent favorables à leur développement (Cowger *et al.*, 2009).

Cette expérimentation a également permis de mettre en évidence une « période de transition », comprise entre 8 et 18 jours après la sortie des premières anthères, pendant laquelle la sensibilité à la fusariose diminue fortement. Afin d'affiner cette période de transition il serait nécessaire de réaliser cette expérimentation sur un nombre de dates d'inoculations plus important et centrées sur la floraison et le début de la formation des grains. Une identification plus précise du stade des plantes selon l'échelle de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974) serait également à envisager afin de mieux caractériser les éléments nécessaires au développement de la maladie et de transposer plus facilement ces résultats aux conditions de culture au champ.

5. Des interactions entre souches influencent leur développement mais les résultats sont variables selon le couple de souches et d'une année à l'autre

L'effet de l'année d'expérimentation a été mis en évidence dans chacune des expérimentations réalisées dans ce travail de thèse. En inoculations simples, cet effet ne modifie pas ou peu le classement des souches. En co-inoculations, les résultats d'une interaction entre 2 souches peuvent être totalement inversés d'une année sur l'autre rendant difficile leur interprétation. Cependant, les souches peu agressives sont dans la plupart des situations négativement impactées par la présence de souches agressives sur leur développement et donc leur production de toxines. D'autres souches, à l'inverse, se sont

révélées bonnes compétitrices quelle que soit l'année avec une influence négative sur leur compétiteur. Enfin, dans la plupart des cas, l'effet positif, négatif ou nul dépend de l'année et du couple mis en jeu dans l'interaction.

6. Les interactions entre champignons sont plutôt défavorables ou n'ont aucun effet sur les quantités de toxines produites

D'après les différents travaux sur les toxines et leurs rôles dans le cycle des *Fusarium*, ces molécules semblaient être impliquées dans la pathogénicité des champignons avec un rôle de facilitation de leur progression dans l'hôte et on émet également l'hypothèse d'un rôle dans la compétition avec d'autres microorganismes (Xu *et al.*, 2009). La diminution ou la constance des quantités de toxines produites lors des co-inoculations testées comparées aux simples inoculations infirment cette implication des toxines dans la compétition avec d'autres microorganismes. Par contre, la bonne corrélation entre la biomasse fongique et les quantités de toxines produites renforce l'hypothèse d'une implication des toxines dans le pouvoir pathogène et la virulence des souches, avec une facilitation de la colonisation de l'hôte par ces molécules (Harris *et al.*, 1999) et donc une participation à l'agressivité des champignons.

Les fusariotoxines n'étant cependant pas indispensables à l'initiation de la maladie, de nouvelles investigations concernant d'autres composés comme les enzymes de dégradation des parois ((Schwarz *et al.*, 2002) ou composantes physiologiques comme le pH (Picot *et al.*, 2012) seraient nécessaires pour mieux comprendre les processus d'infection.

7. Migration des champignons dans l'épi et compétition pour la colonisation

Les champignons infectant l'épi sont connus pour avoir une croissance préférentielle vers les épillets inférieurs de l'épi où les tissus sont plus riches en eau (Argyris *et al.*, 2005). Peu de travaux illustrent ce phénomène, c'est pourquoi nous avons souhaité vérifier ces informations. Les résultats montrent en effet la présence de tous les champignons testés dans la totalité de l'épi et une croissance importante de certains dans la partie basse de l'épi malgré le fait que l'inoculation soit dans la partie haute de l'épi. Des études complémentaires sont malgré tout à

envisager avec des inoculations ponctuelles des champignons seuls dans le bas de l'épi afin de vérifier qu'ils ne montent que très peu, même en l'absence d'un compétiteur dans la partie supérieure.

Les analyses d'épis inoculés avec deux souches ont illustré de façon plus nette les compétitions entre souches. Ainsi, le développement du champignon inoculé dans la partie inférieure de l'épi empêche systématiquement la progression vers le bas du champignon inoculé dans la partie supérieure. Par contre, si le champignon inoculé dans la partie inférieure ne se développe pas ou peu, son compétiteur peut alors se développer dans la totalité de l'épi. Ces résultats reflètent les difficultés rencontrées par les champignons lors de compétitions dans leur colonisation de l'épi ; les champignons seraient donc davantage en compétition pour la colonisation de l'épi plutôt que lors du processus primaire d'infection. Cette observation reste cependant à confirmer en conditions d'épidémie au champ.

Perspectives

1. Etude des mécanismes d'infection de *Microdochium*

Les champignons du genre *Microdochium* sont difficiles à inoculer et n'induisent pas de maladie lors d'inoculations par spray. Hors, dans la nature l'inoculum arrive en partie par le vent ; cette méthode d'inoculation devrait donc illustrer ce mécanisme et induire de la maladie. N'étant pas parvenus à les inoculer de cette façon (ni en serre, ni au champ), il serait intéressant d'étudier les mécanismes d'infection de ces champignons par des études de microscopie et de les comparer aux résultats obtenus sur *F. graminearum* par Brown *et al.* (2010) de manière à identifier les différences entre les *Fusarium* et *Microdochium* et ensuite mettre au point une méthode d'inoculation efficace, commune aux 2 genres et nécessaire pour comparer les champignons entre eux et étudier la façon dont ils interagissent ensemble.

2. Etude de l'inoculum primaire

Une étude de l'inoculum primaire de *Fusarium* / *Microdochium* disponible au stade de sensibilité permettrait d'évaluer un risque potentiel d'épidémie. Pour cela, l'analyse de bandes de piégeage de spores (à l'aide de pièges Burkard par exemple) pourrait être envisagée de manière à identifier au champ les sources et nature d'inoculum (ascospores ou microconidies), les proportions de chaque espèce ou encore la date et la durée des pics d'envol de spores (Suffert *et al.*, 2010). Reis *et al.* (1988) ont identifié que 98% des spores collectées dans les pièges sont des ascospores ; si la majorité de l'inoculum induisant la fusariose est constituée d'ascospores, de nouvelles méthodes de production des spores et d'inoculations seraient à envisager mettant en jeu cette nouvelle forme d'inoculum.

3. Protection au champ

A partir des résultats obtenus des expérimentations autour de la fenêtre de sensibilité du blé ainsi que des interactions entre champignons, il serait intéressant de coupler ces modalités avec différents programmes de protection.

Une première expérience pourrait comprendre une application au stade épiaison, à floraison (sortie des premières anthères), ou encore au début de la formation des grains, en serre et au champ de manière à coupler la fenêtre de sensibilité de plante à l'efficacité de l'application.

Un deuxième programme fongicide pourrait croiser les résultats de pièges à spores à une protection fongicide ciblée sur ces dates de pic d'envol où le risque d'une épidémie semblerait maximal. Dans une étude préalable, Caron *et al.* (2007) ont identifié ces pics de libération des spores au cours d'un cycle cultural et l'observation de vols de spores après la floraison pourrait impliquer une application fongicide plus tardive qui pourrait optimiser la protection de la culture.

L'identification précise des espèces présentes pourrait également permettre de choisir la matière active optimale au contrôle de la maladie. En effet, les travaux de Simpson *et al.* (2001) soulignent les différences de sensibilité des champignons responsables de la fusariose

aux deux matières actives principales, les triazoles et les strobilurines. Depuis, de nouvelles résistances à ces produits et de nouvelles substances chimiques sont apparues. De nouveaux tests d'efficacité sont donc à réaliser de manière à établir un état des lieux des solutions contre la fusariose disponibles aujourd'hui. Il est également nécessaire d'évaluer l'efficacité de ces produits sur l'ensemble des espèces du complexe fusarien qui, comme démontré dans cette thèse, ont des caractéristiques épidémiologiques différentes et donc potentiellement des sensibilités aux fongicides différentes.

4. Cohabitation des champignons sur un épi

Les expérimentations visant à étudier les interactions entre espèces nous ont clairement montré la compétition des champignons pour la colonisation des épis. Les espèces responsables de la fusariose des épis ont des optima de croissance différents, notamment au niveau de la température et de l'humidité (Xu & Nicholson, 2009 ; Doohan *et al.*, 2003). A partir de cela, il serait intéressant d'étudier les résultats de compétition entre espèces réalisées à différentes modalités de température et d'humidité, relativement aux optima de chaque espèce.

Yin *et al.* (2011), ont décrit les premières étapes de l'infection de racines de bananiers par *F. oxysporum* à l'aide d'une souche marquée à la GFP (Green Fluorescent Protein). Cette technique permet de visualiser directement le champignon dans les tissus de la plante par fluorescence. L'utilisation combinée de 2 souches fluorescentes de couleur différente pourrait mettre en évidence, par des observations microscopiques les mécanismes de cohabitation des champignons dans l'épi, s'ils s'excluent ou se chevauchent.

Enfin, nous avons mis en évidence les différences entre souches dans leurs temps d'infection et de colonisation des épis. Audenaert *et al.* (2009) ont réalisé des inoculations séquentielles mettant en évidence l'efficacité de souches de *F. poae* en tant que pathogène secondaire, c'est-à-dire profitant d'une première infection pour se développer. Ce type de colonisation a été observé par Picot *et al.* (2012) avec un effet facilitateur de l'inoculation préalable de *F.*

graminearum sur le développement de *F. verticillioides* sur épis de maïs. Des inoculations séquentielles à partir de notre matériel fongique permettraient donc de laisser les pathogènes peu agressifs se développer avant l'inoculation de pathogènes plus agressifs. D'un autre côté, une première inoculation par un agent pathogène agressif permettrait de fragiliser les tissus de la plante par et donc de faciliter l'implantation du deuxième agent pathogène moins agressif.

5. Effet variétal ?

Pour simplifier la lecture des résultats, nous avons utilisé dans l'ensemble de nos expérimentations une seule variété très sensible à la fusariose des épis. Mesterhazy *et al.* (1999) et Gilbert *et al.* (2001) ont montré que les plantes ayant un génotype résistant à la maladie accumulent moins de toxines que les génotypes sensibles. A partir de cela, il serait essentiel de tester d'autres variétés de blé plus ou moins sensibles à la fusariose afin de généraliser l'ensemble des résultats obtenus avec notre variété sensible.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats met en évidence l'importance de considérer la grande variabilité des réponses observées lors de l'étude de cette maladie, notamment les différentes espèces impliquées dans le complexe fusarien, la diversité des souches qui les composent ainsi que les différences observées entre années. Si l'agressivité des souches peut être illustrée par la progression des champignons sur épi, le meilleur indicateur de la quantité de toxines dans la culture reste la biomasse fongique (plus précise et plus spécifique). Malgré tout, d'autres facteurs sont nécessaires à considérer pour comprendre l'évolution de la maladie comme le stade de développement de la plante ou encore la cohabitation avec d'autres champignons sur l'épi.

Ces travaux apportent donc des éléments de discussion nouveaux et impliquent de nouvelles questions de recherche concernant la protection des plantes, les mouvements des champignons et toxines dans les épis, leur mise en place, d'autres facteurs pouvant modifier

leur équilibre ou encore les mécanismes mis en jeu par les champignons pour cohabiter sur un même épi ou à l'échelle de la parcelle.

Références

- Alvarez CL, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V, 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology* **158**, 173–181.
- Argyris J, TeKrony D, Hershman D, VanSanford D, Hall M, Kennedy B, Rucker M, Edge C, 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Science* **45**, 626–634.
- Brown NA, Urban M, Van De Meene AML, Hammond-Kosack KE, 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat spikes. *Fungal biology* **114**, 555–571.
- Caron D, Malavergne D, Dupon de Dinechin L, 2007. Impact des facteurs agro-environnementaux sur le niveau d'inoculum et la cinétique de dissémination des ascospores de *Gibberella zeae*. Colloque Fusariotoxines des Céréales Arcachon, 11-13 september 2007.
- Cowger C, Patton-Özkurt J, Brown-Guedira G, Perugini L, 2009. Post-anthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology* **99**, 320–327.
- Gilbert, J., Abramson, D., McCallum, B., Clear, R. 2001. Comparison of canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia* **153**: 209–215.
- Harris LJ, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P, Butler G, Young JC, Weston G, Proctor RH, Hohn TM, 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant disease* **83**, 954–960.
- 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 Breeding* **118**, 97–110.
- Nopsa JFH, 2010. *Fusarium* head blight: winter wheat cultivar responses and characterization of pathogen isolates. Lincoln, Nebraska: University of Nebraska, PhD thesis.
- Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C, 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* **61**, 140–151.
- Reis EM, 1990. Effects of rain and relative humidity on the release of ascospores on the infection of wheat heads by *Gibberella zeae*. *Fitopatologia Brasileira* **15**, 339–343.
- Simpson DR, Weston GE, Turner JA, Jennings P, Nicholson P, 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 421–431.
- Suffert F, Sache I, Lannou C, 2010. Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–177.
- Xu XM, Nicholson P, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 83–103.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, 1974. A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* **14**, 415–421.



ANNEXES



A. Picot

ANNEXE 1 : Sporulation et conservation

Au début des expérimentations, deux questions se sont posées concernant la conservation des souches utilisées pour les expérimentations et concernant la production de spores pour les inoculations en serre et au champ.

Conservations des souches

Afin d'assurer la pérennité des souches utilisées chaque année pour les expérimentations et éviter toute dérive génétique liée à des repiquages successifs, il a été nécessaire de mettre en place un protocole de conservation des souches. En effet, avant ces mises au point, les souches mères étaient stockées à 4°C sous forme de mycélium sur milieu gélosé, méthode qui ne garantit pas la constance génétique des souches et qui ne permet pas une conservation à long terme puisque les souches risquent de se déshydrater et donc mourir.

Nous avons à partir de cela testé 2 méthodes de conservation couramment utilisées en microbiologie : sous forme de cubes de mycélium sur gélose dans des tubes Eppendorf (faciles à stocker) dans de l'eau glycérolée à 20% placés à -20°C ou -80°C. A -20°C, la reprise des souches après repiquage n'est pas de 100% et la totalité des souches de *M. spp* n'a pas repris, c'est pourquoi nous avons préféré utiliser le stockage à -80°C après quoi 100% des repiquages repartent.

Production et conservations des spores

A partir des résultats obtenus des premières expérimentations en serre, nous avons mis en évidence des différences d'agressivité entre deux expérimentations pour une même souche. Les inoculations étaient alors réalisées par spray de suspensions de spores préparées quelques semaines avant et congelées dans l'eau jusqu'à l'inoculation. Connaissant l'impact de la congélation sur les cellules (augmentation de la pression osmotique et éclatement des cellules par rupture des membranes cellulaires), nous avons alors effectué différents tests afin de

quantifier l'impact de la congélation sur nos suspensions de spores. Le problème mis en avant dans cette annexe a été de produire des spores de toutes nos souches, viables et en quantités suffisantes pour nos inoculations en serre mais aussi au champ.

Pour répondre à cette problématique, nous avons mis au point une première méthode de détermination de la viabilité d'une suspension de spores en calculant son taux de germination par comptage au microscope des spores germées et non germées sur un milieu de culture PDA. A l'aide de cette méthode, nous avons ensuite testé différents modes de conservation des spores : en suspension à concentration identique à l'inoculation (2.10^4 spores.mL⁻¹) ou très concentrée (10^6 spores.mL⁻¹), dans de l'eau ou de l'eau glycérolée (20%), à température ambiante, 4°C ou -20°C et pendant 3 mois avec des mesures du taux de germination toutes les semaines.

Les résultats obtenus montrent que la congélation réduit considérablement le taux de germination de 30 à 100% quelque soit le mode de conservation. De plus, le glycérol est un inhibiteur de la germination des spores et, même si en utilisant ce liquide les spores n'éclatent pas et restent intactes, peu de spores germent sur milieu de culture. Nous avons donc, suite à cela utilisé uniquement des spores fraîches récoltées du jour et diluées dans l'eau pour réaliser nos inoculations.

Un nouveau problème est donc apparu qui a été de produire ces spores de manière fiable, en quantité suffisante et en un temps court précédant l'inoculation. La méthode utilisée au préalable de production de spores sur des boîtes de culture de PDA permettait d'obtenir des spores en quantités suffisantes pour les inoculations réalisées en serre mais pas au champ. Egalement, certaines souches ne sont pas stables dans leur production de spores avec cette méthode et ne produisaient que du mycélium. Nous avons donc échangé ce milieu de culture solide contre un milieu de culture CMC (carboxyméthylcellulose) liquide nous permettant d'obtenir de grandes quantités de spores (de l'ordre de 10^{10} spores.mL⁻¹) en très peu de temps (moins d'une semaine) et de manière très fiable. Les très faibles quantités de mycélium

produites dans ce milieu permettent de directement filtrer et quantifier les suspensions obtenues.

Une exception à cette méthode concerne les *Microdochium* qui ne sporulent pas dans ce type de milieu. Nous sommes donc restés aux conditions initiales de production de spores pour ces souches (repiquage sur milieu de culture PDA et récolte par grattage de la surface sporulant avec une pipette et de l'eau).

ANNEXE 2 : Extraction et quantification d'ADN fongique par Q-PCR

Protocole d'extraction d'ADN de grains de blé pour une quantification des champignons des genres *Fusarium* et *Microdochium* par PCR quantitative. Mis en place par l'équipe BIOGER-SYST, unité BIOGER-CPP, INRA de Versailles-Grignon. Juin 2010

Extraction d'ADN utilisant le kit DNeasy Plant Mini Kit

Prélever environ 50 mg de farine et les déposer dans un tube de 1.5 mL. Ajouter 400 µL de buffer AP1 et homogénéiser par vortex et sonication pendant 2 minutes. Ajouter 4 µL de RNase et 4 µL de protéinase K (20 mg.mL⁻¹). Vortexer vigoureusement puis incubé pendant 1h à 65°C en mélangeant par inversion très régulièrement et par vortex à environ 30 min. Déposer 750 µL de tampon AP3/Ethanol dans le tube de 2 mL. Ajouter 260 µL de buffer AP2 au lysat, vortexer et incubé 10 min dans la glace. Centrifuger 5 min à 14 000 rpm. Transférer le surnageant dans la colonne QIAshredder (de couleur lilas). Centrifuger 2 min à 14 000 rpm. Transférer le surnageant passé à travers la colonne dans un nouveau tube sans pipeter les débris. Mélanger par pipetage au tampon AP3/Ethanol. Déposer 650 µL du mélange dans une colonne DNeasy (blanche). Centrifuger pendant 1 min à 8000 rpm et jeter le liquide qui est passé. Répéter les étapes 11 et 12 avec le reste de l'échantillon. Placer la colonne DNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 mL, ajouter 500 µL de tampon AW/Ethanol à la colonne DNeasy. Centrifuger 1 min à 8000 rpm. Jeter le liquide passé dans le tube. Ajouter 500 µL de tampon AW/Ethanol à la colonne DNeasy. Centrifuger 2 min à vitesse maximale afin de sécher la membrane. Transférer la colonne DNeasy dans un tube de 1.5 mL ou 2 mL (non fourni). Déposer au centre de la membrane 50 µL de tampon AE. Incuber à température ambiante pendant 5 min puis centrifuger 1 min à 8000 rpm pour éluer. Répéter les étapes 21 à 23. L'extrait obtenu est ensuite dosé au spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK)) (aire le blanc avec le tampon

de reprise) et conservé à 4°C pour une courte durée de stockage et à -20°C pour une longue durée de stockage. Pour la quantification de l'ADN, chaque extrait est dilué à 20 ng. mL⁻¹ avec de l'eau ultra pure.

Quantification par Q-PCR. Les quantités d'ADN de champignon et de blé sont estimées par PCR quantitative (Q-PCR) par amplification du gène EF1 α . L'utilisation de paires d'amorces et de sondes spécifiques de chaque espèce étudiée permettent d'optimiser la spécificité et la sensibilité du test. Les amorces et sondes, achetées chez Eurogentec (Seraing, Belgium), ont été dessinées au préalable à l'aide du programme OLIGO v. 6.0 et les sondes à l'aide du logiciel Primer ExpressTM, version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les sondes utilisées sont toutes marquées par la technologie Taqman® avec un désactivateur FAM/TAMRA.

La PCR en temps réelle est réalisée sur un total de 25 μ L comprenant 6.25 μ L de mix PCR à une concentration finale de 1X (MasterMix avec ROX et Uracil N Glycosylase (UNG), Eurogentec Angers, France), 300 nM de chaque amorce (sens et anti-sens), 100 nM de sonde et 5 μ L d'extrait d'ADN. La quantification de l'ADN fongique est standardisée par la quantification de l'ADN de plante par Q-PCR NA avec un système d'amorces reconnaissant le gène EF1 α de plante et avec la technologie sybergreen décrite par Nicolaisen *et al.* (2008). Pour la quantification de la plante, la PCR en temps réelle est réalisée sur un total de 25 μ L comprenant 6.25 μ L de mix PCR à une concentration finale de 1X (MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, Angers, France), la même concentration de chaque amorce et 5 μ L d'extrait d'ADN dilué 1:10.

Chaque réaction PCR est réalisée en duplicata (2 répétitions) pour les échantillons et en triplicata pour les échantillons utilisés pour réaliser les courbes standards. Les réactions PCR sont faites sur l'ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dans Applied Biosystem, plaques de 96 puits. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une étape initiale de 2 min à 50°C; 95°C pendant 10 min; 40 cycles de 15s

à 95°C et 60s à 62°C (60°C pour *F. poae*). L'ADN est quantifié à partir des courbes standards d'ADN de *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus*, *M. nivale* ou plante extraits de cultures pures et de grains de blé non contaminés. Chaque courbe standard est réalisée à partir d'une série de dilutions au dixième de 1 à 1.10^{-3} ng.μL⁻¹ pour l'ADN fongique et de 5 à 5.10^{-3} ng.μL⁻¹ pour l'ADN de plante. Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel AB SDS2.2.2 (Applied Biosystem). Les efficacités de la Q-PCR obtenues doivent être comprises entre 90 et 100%. La quantité d'ADN fongique est enfin calculée à partir du nombre de cycles nécessaires à atteindre le seuil de fluorescence (Cycle threshold, Ct) décrit par la courbe standard ; ces valeurs sont normalisées par les quantités d'ADN de plantes obtenues. Ainsi, l'ADN fongique, aussi appelé biomasse fongique est estimé en ng d'ADN de champignon par ng d'ADN de plante (ng.ng⁻¹ d'ADN de plante).

ANNEXE 3 :

Extraction et quantification de mycotoxines (DON et NIV) par UPLC-UV/MSMS

Le principe de cette méthode est d'extraire un maximum de trichothécènes B, toxines produites par les champignons du genre *Fusarium*, présentes dans des farines de blé tendre d'hiver inoculées par ces mêmes champignons. Les solutions standard de toxines ont au préalable été achetées chez Sigma Chemical Company. L'eau utilisée pour l'extraction et l'UPLC a été purifiée dans un Milli-Q® Integral Water Purification System (EMD Millipore, Billerica, MA, U.S.A). Tous les produits chimiques et solvants utilisés sont spécifiés HPLC, sauf le méthanol utilisé pour l'UPLC qui est spécifié LCMS (Carlo Erba, Val-de-Rueil, France). 7 toxines majeures ont été considérées : le Nivalénol (NIV), le Déoxynivélol (DON), les 3 et 15 – Acétyldéoxynivalénol (3 et 15 – ADON), la Zéaralénone (ZEA) et les toxines T2 et HT2.

Extraction des toxines. Tout d'abord, prélever environ 1g de farine à l'aide d'une spatule et les déposer dans un tube Falcon de 50 mL (noter le poids de la farine et du tube + bouchon, ils seront nécessaires pour les calculs de concentration après le dosage des toxines). Noter les bouchons et les remplacer par un film d'aluminium percé de trous (réalisés avec une aiguille fine) puis lyophiliser les farines. Quand la lyophilisation est terminée, remettre le bouchon sur les tubes et les peser de manière à calculer le taux d'humidité de la farine. Préparer un mélange d'ACN/ eau, 84/16, et en verser 6 mL sur la farine. Placer les tubes sur l'agitateur à l'horizontal et laisser agiter à moyenne vitesse pendant 1h30 de manière à ce que toute la farine soit bien homogénéisée avec l'ACN/eau. Il est nécessaire de bien serrer les tubes Falcon afin d'éviter toute fuite (fréquente si le serrage n'est pas suffisant). Centrifuger ensuite les tubes à vitesse maximale (9500 g) pendant 10 min et prélever 4 mL de surnageant sans prendre de farine. Les déposer dans un tube de 5 mL en polypropylène (ou en verre) et les

évaporer sous vide (SpeedVac). Programmer le SpeedVac à 45°C pendant les 2 premières heures (évaporation de l'acétonitrile) et 60°C (évaporation de l'eau) jusqu'à la fin de l'évaporation. L'évaporation sous vide évite l'oxydation à l'air des toxines (qui pourrait perturber les analyses en masse) et la température d'accélérer l'évaporation des 16% d'eau.

Lorsqu'il ne reste plus qu'un dépôt sec dans le fond du tube (au bout de 24h environ), y verser 200 µL de MeOH et soniquer pendant 5 à 10 min (jusqu'à dissolution du dépôt). Y ajouter ensuite 800 µL d'eau up, soniquer de nouveau 10 min et transférer la solution obtenue dans un tube Eppendorf. Centrifuger pendant 10 min à 15000g, prélever 200 µL sans pipeter les débris et les déposer dans un vial pour analyser en UPLC-UV/MSMS. Si les échantillons sont très concentrés, les diluer dans un mélange MeOH/eau, 20/80 après la dernière centrifugation. Le tube Eppendorf est ensuite stocké à -20°C pour des analyses ultérieures.

Conditions UPLC-MS-MS. L'analyse UPLC-MS des extraits de toxines a été réalisée sur l'Acquity ultra-performance liquid chromatograph (UPLC) couplé à un spectromètre de masse (MS) en tandem TQD (Waters Corp., Milford, MA, USA). Le contrôle du système et l'analyse des données ont été effectués par l'intermédiaire du logiciel Masslynx 4.1 (Waters). Les toxines sont séparées par chromatographie à l'aide de la colonne EC 100/2 NUCLEODUR C18 Gravity de Macherey-Nagel GmbH & Co (Düren, Allemagne) (100 mm × 2 mm i.d., 1.8 µm taille des particules) à un flux de 0.33 mL/min. La colonne est maintenue à 30°C et les échantillons à 10°C. 10 µL de chaque extrait sont injectés ; l'aiguille et la boucle d'injection sont rincées avec 200 µL de méthanol puis 600 µL de méthanol-eau (5:95, v/v). Les phases mobiles utilisées sont : A, l'eau ; et B, le méthanol, contenant tous deux 5 mM d'acétate d'ammonium. Les conditions du gradient sont précisées dans le tableau 1. Le spectromètre de masse est géré en ionisation par électrospray (ESI negative ion mode) sous le mode multiple-reaction monitoring (MRM). Les paramètres influençant le signal ont été préalablement optimisés individuellement et pour chaque composé par infusion continue dans le MS d'une solution standard diluée à 10 µg.mL⁻¹ dans de l'acétonitrile. Les valeurs

Tableau 1: Conditions du gradient d'élution utilisé pour la séparation des mycotoxines par UPLC.

Time (min)	%A	%B
1	95	5
7	15	85
7.30	0	100
10.30	0	100
10.40	95	5
12.40	95	5

Tableau 2: Transitions MRM et paramètres optimisés correspondants pour chaque mycotoxine analysée

Analyte	Mode d'ionisation	Transitions	Voltage du cône (V)	Energie de collision (eV)
NIV	ES-	371.16>281.13	18	15
		371.16>311.18		10
DON	ES-	355.10>59.00	19	30
		355.10>295.00		9
ADON	ES-	397.05>59.1	22	10
		397.05>134.93		12
HT2	ES+	442.22>215.12	22	17
		442.22>263.11		17
T2	ES+	484.26>245.10	22	15
		484.26>305.13		14
ZEA	ES-	317.30>131.12	45	30
		317.30>175.17		22

optimisées sont les suivantes : voltage du capillaire, 3 kV ; températures de la source et de désolvatation, 120 et 450°C, respectivement ; nitrogène, obtenu à partir d'air pressurisé dans un générateur de nitrogène (Zefiro 35 LC-MS, F-DBS, Villejust, France) utilisé pour le gaz du cône et de désolvatation à 50 et 600 L/h, respectivement; argon (99.9999% de pureté, Air Liquide) utilisé comme gaz de collision à une pression de $2.5 \cdot 10^{-3}$ mbar dans la cellule de collision (T-Wave). Les temps de rétention varient entre 0.125 et 0.3 s et ont été choisis pour obtenir au moins 15 points par pic. Les transitions MRM de chaque composé et les paramètres optimisés correspondants (voltage du cône et énergie de collision) sont regroupés dans le tableau 2.

La comparaison entre les temps de rétention et des signaux de l'UPLC-MSMS obtenus dans les échantillons et ceux des standards permet l'identification des molécules cibles. Pour chaque analyse, 2 signaux MSMS, correspondants aux deux transitions principales, sont traités : le plus abondant étant utilisée pour quantifier les molécules et l'autre pour confirmer leur identité. Les solutions standards contenant un mélange des différentes molécules sont diluées à des concentrations de 0.002 à 5 mg.L⁻¹. Les résultats ainsi obtenus sont convertis en mg.g⁻¹ de farine sèche par l'équation suivante :

Concentration en toxines = $([X \times V \times DF \times 6/4] / DW)$ avec X la concentration donnée par le logiciel en mg.L⁻¹, V le volume final de l'extrait (0.001 L), DF le facteur de dilution et DW le poids sec de farine extrait. La valeur 6/4 correspond aux 4 mL prélevés des 6 mL d'acétonitrile-eau ajoutés à la farine pour l'extraction. Les limites de détection et quantification pour chaque toxine sont $< 2 \cdot 10^{-6}$ mg.g⁻¹.

Références bibliographiques

Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR, 1998. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology* **45**, 217-224.

Alvarez CL, Somma S, Moretti A, Fernandez Pinto V, 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology* **158**, 173–181.

Alvarez CL, Somma S, Proctor RH, Stea G, Mulè G, Logrieco AF, Fernandez Pinto V, Moretti A, 2011. Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins* **3**, 1294-1309.

Andersen AL, 1948. The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. *Phytopathology* **38**, 595-611.

Argyris J, TeKrony D, Hershman D, VanSanford D, Hall M, Kennedy B, Rucker M, Edge C, 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Science* **45**, 626–634.

Arsan MR, Eraky Amal MI, 2011. Aggressiveness of certain *Fusarium graminearum* isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production. *Plant Pathology* **10**(1), 36-41.

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. *Journal of Phytopathology* **147**, 577-590

Audenaert K, Van Broeck R, Bekaert B, De Witte F, Heremans B, Messens K, Höfte M, Haesaert G, 2009. *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 445–458.

Bai G, Shaner G, 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease* **78**, 760–766.

Bai GH, Desjardins AE, Plattner RD, 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**, 91–98.

Bottalico, A. Perrone, G. 2002. Toxinogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grains cereals in Europe, *European Journal of Plant Pathology* **108**, 667-673.

Boussac N, Le Lamer O, Bertrand R, Rousselin X, 2012. *Les marchés de FranceAgriMer : Bilan céréalier & oléo-protéagineux / Campagne 2011-2012 - Perspectives 2012-2013*. Montreuil-sous-Bois, France : FranceAgriMer : Établissement national des produits de l'agriculture et de la mer.

Boutigny AL, Ward TJ, Van Coller GJ, Flett B, Lamprecht SC, O'Donnell K, Viljoen A, 2011. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology* **48**(9), 914-20.

Brennan JM, Fagan B, Van Maanen A, Cooke BM, Doohan FM, 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 577–587.

Brown NA, Urban M, Van De Meene AML, Hammond-Kosack KE, 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat spikes. *Fungal biology* **114**, 555-571.

Burlakoti RR, Estrada RJ, Rivera VV, Boddada A, Secor GA, Adhikari TB, 2007. Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology* **97**, 835-841.

Caron D, 1993. Les Fusarioses. Dans *Maladies des blés et orges* : ITCF, ed., 30-39.

Caron D, Malavergne D, Dupon de Dinechin L, 2007. Impact des facteurs agro-environnementaux sur le niveau d'inoculum et la cinétique de dissémination des ascospores de *Gibberella zeae*. Colloque Fusariotoxines des Céréales Arcachon, 11-13 september 2007

Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* **166**, 1389-1415.

Christ DS, Gödecke R, von Tiedemann A, Varrelmann M, 2011. Pathogenicity, symptom development, and mycotoxin formation in wheat by *Fusarium* species frequently isolated from sugar beet. *Phytopathology* **101**, 1338-1345.

Cooney JM, Lauren DR, di Menna ME, 2001. Impact of Competitive Fungi on Trichothecene Production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 522-526.

Covarelli L, Beccari G, Steed A, Nicholson P, 2012. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant Pathology* Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02600.x.

Cowger C, Patton-Özkurt J, Brown-Guedira G, Perugini L, 2009. Post-anthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology* **99**, 320-327.

Cowger C, Arrellano C, 2010. Plump kernels with high deoxynivalenol linked to late *Gibberella zeae* infection and marginal disease conditions in winter wheat. *Phytopathology* **100**, 719-728.

Cumagun CJR, Bowden RL, Jurgenson JE, Leslie JF, Miedaner T, 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* **94**, 520-526

D'Mello JPF, Macdonald AMC, Postel D, Dijksma WTP, Dujardin A, Placinta CM, 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 741-751

Del Ponte EM, Fernandes JMC, Bergstrom GC, 2003. *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated at developmental stages from flowering through grain maturation. In: Canty SM, Lewis J, Siler L, Ward RW, eds. Proceedings of the National *Fusarium* Head Blight Forum, 2002. Erlanger, KY, 129-132.

- Del Ponte EM, Fernandes JMC, Bergstrom GC, 2007. Influence of growth stage on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology* **155**, 577-581.
- Desjardins AE, Proctor RH, Bai GH, McCormick SP, Shaner G, Buechley G, Hohn TM, 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**, 775-781.
- De Wolf ED, Madden LV, Lipps PE, 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology* **93**, 428-435.
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM, 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 755-768.
- Fernando WGD, Paulitz TC, Seaman WL, Dutilleul P, Miller JD, 1997. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology* **87**, 414-421.
- Fox EM, Howlett BJ, 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 481-487.
- Gilbert J, Abramson D, McCallum B, Clear R, 2001. Comparison of canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia* **153**, 209-215.
- Gilbert J, Woods SM, Kromer U, 2008. Germination of ascospores of *Gibberella zeae* after exposure to various levels of relative humidity and temperature. *Phytopathology* **98**, 504-508.
- Gosman N, Srinivasachary, Steed A, Chandler E, Thomsett M, Nicholson P, 2010. Evaluation of type I *Fusarium* head blight resistance of wheat using non-deoxynivalenol-producing fungi. *Plant Pathology* **59**, 147-157.
- Goswami RS, Kistler HC, 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* **5**(6), 515-525.

Goswami RS, Kistler HC, 2005. Pathogenicity and *in planta* mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* **95**, 1397-1404

Gourdain E, Rosengarten P, 2011. Effects of infection time by *Fusarium graminearum* on ear blight, Deoxynivalenol and Zearalenon production in wheat. *Plant Breeding and Seed Science* **63**, 67-76.

Guenther J, Trail F, 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, **97**(1), 229-237.

Guo, X. W., Fernando, W. G. D., and Seow-Brock, H. Y. 2008. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. *Plant Disease* **92**, 756-762.

Hallen-Adams HE, Wenner N, Kulda GA, Trail F, 2011. Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* **101**(9), 1091-1096.

Hanson LE, 2010. Interaction of *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus stolonifer* causing root rot of sugar beet. *Plant Disease* **94**(5), 504-509.

Harris LJ, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P, Butler G, Young JC, Weston G, Proctor RH, Hohn TM, 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant disease* **83**, 954-960.

Hestbjerg H, Felding G, Elmholt S, 2002. *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology* **150**, 308-312.

Hart LP, Pestka JJ, Liu MT, 1984. Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **74**, 1415-1418.

Ichinoe M, Kurata H, Sugiura Y, Ueno Y, 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(6), 1364-1369.

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.

Ioos R, Belhadj A, Menez M, Faure A, 2005. The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection* **24**, 894-902.

Jennings P, Coates ME, Turner JA, Chandler EA, Nicholson P, 2004. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathology* **53**, 182–190.

Lacey J, Bateman GL, Mirocha CJ, 1999. Effects of infection time and moisture on development of spike blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology* **134**, 277–283.

Le Bail M, Verger P, Doré T, Fourbet JF, Champeil, A, Ioos R, Leblanc JC, 2005. Simulation of consumer exposure to deoxynivalenol according to wheat crop management and grain segregation: Case studies and methodological considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **42**, 253–259.

Lemmens M, Buerstmayr H, Krska R, Schuhmacher R, Grausgruber H, Ruckebauer P, 2004. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 299–308.

Leonard KJ, Bushnell WR, 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, U.S.A.: APS Press.

Liddell CM, 2003. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. Pages 35-43 in: *Fusarium* head blight of wheat and barley. K. J. Leonard and W. R. Bushnell, eds. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.

- Liggitt J, Jenkinson P, Parry DW, 1997. The role of saprophytic microflora in the development of *Fusarium* ear blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum*. *Crop Protection* **16**(7), 679-685.
- Liu W, Elen ON, Sundheim L, Langseth W, Skinnes H, 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* **103**(7), 589-595.
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ, 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* **3**, 802-814.
- Mc Mullen M, Jones R, Gallenberg D, 1997. Scab of wheat and barley: A Re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* **81**(12), 1340-1348.
- Meeley RB, Johal GS, Briggs SP, Walton JD, 1992. A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell* **4**, 71-77.
- 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 Breeding* **118**, 97-110.
- Miedaner T, 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* **116**, 201-220.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 63-70.
- Mirocha CJ, Abbas HK, Windels CE, Xie W, 1989. Variation in Deoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, and Zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **55**(5), 1315-1316.
- Muthomi JW, Oerke EC, Dehne HW, Mutitu EW, 2002. Susceptibility of Kenyan wheat varieties to head blight, fungal invasion and deoxynivalenol accumulation inoculated with *Fusarium graminearum*. *J. Phytopathology* **150**, 30-36.

- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF, 2008. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* **76**(3), 234-240.
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D, 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. *Physiological and molecular plant pathology* **53**, 17-37..
- Nielsen LK, Jensen JD, Nielsen GC, Jensen JE, Spliid NH, Thomsen IK, Justesen AF, Collinge DB, Jørgensen LN, 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* **101**, 960-969.
- Nopsa JFH, 2010. *Fusarium* head blight: winter wheat cultivar responses and characterization of pathogen isolates. Lincoln, Nebraska: University of Nebraska, PhD thesis.
- O'Donnell K, Ward TJ, Aberra D, Kistler HC, Aoki T, Orwig N, Kimura M, Bjørnstad A, Klemsdal SS, 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 1514–1522.
- Oerke EC, Meier A, Dehne HW, Sulyok M, Krska R, Steiner U, 2010. Spatial variability of *Fusarium* head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. *Plant Pathology* **59**, 671-682.
- Osborne LE, Stein JM, 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 103– 108.
- Pan JJ, May G, 2009. Fungal-fungal associations affect the assembly of endophyte communities in maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* **58**, 668-678.
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L, 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* **44**, 207–238.
- 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**, 1225-1236.

Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL, 2004. Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease* **88**, 724-730.

Picot A, Hourcade-Marcolla D, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Richard-Forget F, Lannou C, 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* in maize ears and consequences for fungal development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* **61**, 140-151.

Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G, 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* **47**(5), 927-931.

Proctor RH, Desjardins AE, McCormick SP, Plattner RD, Alexander NJ, Brown DW, 2002. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 691-698.

Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE, 1996. The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Additives and Contaminants* **13**(8), 939-948.

Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW, 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* **89**, 1028-1037.

Reis EM, 1990. Effects of rain and relative humidity on the release of ascospores on the infection of wheat heads by *Gibberella zeae*. *Fitopatologia Brasileira* **15**, 339-343.

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

Schroeder HW, Christensen JJ, 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **53**, 831-838.

- Scoz LB, Astolfi P, Reartes DS, Schmale DG, Moraes MG, Del Ponte EM, 2009. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. *Plant Pathology* **58**, 344–351.
- Schwarz PB, Jones BL, Steffenson BJ, 2002. Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **60**(3), 130-134.
- Simpson DR, Weston GE, Turner JA, Jennings P, Nicholson P, 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 421-431.
- 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. *Environmental Microbiology* **6**(1), 79–87.
- Snijders CHA, Perkowski J, 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* **80**, 566-570.
- Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga H, Tóth B, Varga J, O'Donnell K, 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 1191-1204.
- Stenglein SA, 2009. Offered review: *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* **91**(1), 25-36.
- Strange RN, Majer JR, Smith H, 1974. The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **4**, 277–290.
- Sutton JC, 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**, 195–209.
- Suffert F, Sache I, Lannou C, 2010. Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166-177.

Trail F, 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology* **149**(1), 103-110.

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 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 59-66.

Vogelgsang S, Sulyok M, Hecker A, Jenny E, Krska R, Schuhmacher R, Forrer HR, 2008. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 265–276.

Wagacha JM, Muthomi JW, 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* **26**, 877-885.

Walter S, Nicholson P, Doohan FM, 2010. Research review: Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* **185**, 54–66.

Wang JH, Ndoye M, Zhang JB, Li HP, Liao YC, 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* **3**, 1020-1037.

Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Brennan JM, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Giczey G, Tatnell J, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* **112**, 143-154.

Xu XM, Nicholson P, Ritieni A, 2007a. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 67-71.

Xu XM, Monger W, Ritieni A, Nicholson P, 2007b. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal DNA and mycotoxin contents on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathology* **56**, 943–56.

Xu XM, Parry DW, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Edwards SG, Cooke BM, Doohan FM, Monaghan S, Moretti A, Tocco G, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, 2008a. Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *European Journal of Plant Pathology* **120**, 21-34.

Xu XM, Nicholson P, Thomsett MA, Simpson D, Cooke BM, Doohan FM, Brennan J, Monaghan S, Moretti A, Mule G, Hornok L, Beki E, Tatnell J, Ritieni A, Edwards SG, 2008b. Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* **98**, 69-78.

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

Yoshida M, Nakajima T, 2010. Deoxynivalenol and nivalénol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology* **100**, 763-773.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, 1974. A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. *Weed Research* **14**, 415-421.

Le complexe des maladies des épis et des feuilles supérieures du blé tendre et du blé dur. <http://www.bayer-agri.fr/dossier/cereales-le-point-sur-la-protection-de-lepi-2012/protection-de-lepi-linnovation-prosaror-veille-au-grain/>.

Le blé : Une culture indispensable. http://www.univlehavre.fr/enseign/fst/projets/alternative_desherbages/cultures/cult_bl%E9.html.

DEVELOPPEMENT EPIDEMIQUE DE LA FUSARIOSE DES EPIS DE BLE ET CONSEQUENCES DES INTERACTIONS ENTRE ESPECES DU COMPLEXE FUSARIEN

La fusariose de l'épi est une des maladies les plus importantes du blé. Elle est causée par un complexe d'espèces dont les plus courantes sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus* et *M. nivale*. Ces champignons infectent les épis de blé au moment de la floraison mais l'impact de contaminations tardives sur les grains est peu compris. De plus, deux ou trois espèces sont susceptibles de co-infecter un même épi, ce qui pourrait modifier leur développement et leur production de toxines dans l'épi. Pour étudier ces problématiques, plusieurs isolats appartenant aux espèces citées ont été caractérisés selon leurs traits de vie et leur agressivité sur épi. Nous avons ensuite étudié le développement de souches de *Fusarium* inoculées 3 jours avant ou 0, 8, 18 ou 28 jours après la sortie des premières anthères. Les niveaux de maladie et toxines se sont révélés maximum autour de la floraison. La date d'inoculation semble conditionner la sévérité de la maladie et influencer le développement des souches. Des contaminations précoces et tardives seraient malgré tout possibles avec des isolats agressifs, ce qui ouvre la possibilité de telles infections au champ. Dans une deuxième expérimentation, nous avons étudié la compétition entre *F. graminearum* et les autres espèces (*F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus* et *M. nivale*). Les réponses se sont avérées variables ; néanmoins, les souches agressives ne sont pas influencées ou légèrement favorisées par la présence d'un compétiteur alors que les souches peu agressives sont défavorisées par la présence de souches agressives. La production de toxines est, dans la plupart des cas, restée stable ou a diminué en co-inoculations par rapport aux inoculations simples. Dans une dernière expérimentation nous avons étudié la compétition entre souches associée à leurs mouvements dans l'épi. Inoculés seuls, les champignons progressent dans la totalité de l'épi alors que la présence d'un second champignon empêche leur développement, ce qui suggère une interaction compétitive entre eux. Cette étude apporte de nouveaux éléments nécessaires à la compréhension de l'épidémiologie de ces agents pathogènes et des niveaux de contamination à l'échelle du champ.

Mots - clé : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus*, *M. nivale*, blé, mycotoxines, biomasse fongique, interactions, date d'inoculation

EPIDEMIC DEVELOPMENT OF *FUSARIUM* HEAD BLIGHT ON WHEAT AND CONSEQUENCES OF INTERACTIONS BETWEEN SPECIES WITHIN THE *FUSARIUM* COMPLEX

FHB is a potentially very damaging wheat disease, present in most wheat-growing areas and caused by a species complex from which *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus* and *M. nivale* are the most common. These fungi may infect wheat spikes at flowering but infections at late stages of kernel development are poorly understood. Moreover, disease surveys have shown that co-infection of the same spike by two or three species is frequent and could modify their development in spikes. To investigate these questions, several isolates of the species cited above were characterised for their life traits and aggressiveness on spikes. We then investigated the development of *Fusarium* isolates inoculated on wheat spikes 3 days before or 0, 8, 18 and 28 days post anthers extrusion. The highest disease and toxin levels were found around anthesis. The inoculation date appeared to condition the disease severity and to influence the isolates development. Early or late contaminations were however possible with aggressive isolates, which suggest the possibility of such infections in field. In a second experiment, we studied the competition between *F. graminearum* and the other species (*F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus* and *M. nivale*). The responses were variable; nevertheless, aggressive isolates were most of the time unchanged in their development or even promoted whereas less aggressive isolates were reduced against more aggressive ones. The toxin levels were generally unchanged or they decreased in co-inoculations compared to single inoculations. In a last experiment, we investigated the isolate competition and the movement of fungi in the spikes. Alone, isolates progressed in the whole spike whereas the presence of another fungus impaired their development, suggesting a competitive interaction. This study contributes to our understanding of these pathogens epidemiology and provides new elements for a better understanding of the contamination of wheat kernels at the field level.

Key words: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *M. majus*, *M. nivale*, wheat, mycotoxins, fungal biomass, interactions, infection timing