

ÉVALUATION AU CHAMP DE LA RESISTANCE DU BLE A LA FUSARIOSE DE L'EPI

Jean-Yves Morlais¹, Maxime Trotter¹

La fusariose présente partout où les céréales sont cultivées, atteint les inflorescences et les grains en formation. Le risque associé à cette maladie est toujours présent et largement corrélé aux conditions climatiques, plus précisément aux conditions de pluie et d'humidité qui surviennent autour de la floraison des céréales. Les pertes de rendement en grain peuvent atteindre 30 à 70% dans le cas d'attaques exceptionnellement graves.

Ce n'est pas tant la baisse de rendement engendrée par la maladie qui pose problème (les grains échaudés sont éliminés au battage) mais la qualité des grains d'un point de vue technologique et sanitaire. En effet, les grains fusariés engendrent une perte de la valeur technologique puisque le développement du champignon, à l'intérieur même du grain, a une incidence sur de nombreux critères de qualité de la farine (force, ténacité, gonflement) se traduisant par des qualités boulangère et pastière moindres. D'autre part, le souci majeur posé par la fusariose est la présence de mycotoxines dans les grains infectés.

On peut trouver plus de 17 espèces répertoriées sur les céréales. Les plus fréquentes appartiennent à l'ancien complexe des *Fusarium roseum* de la classification de Messiaen et Cassini. Ce sont : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense* et *F. sporotrichioides*.

Les deux espèces les plus fréquentes sur le blé en France, *F. graminearum* et *F. culmorum*, sont les plus utilisées pour réaliser des tests de résistance en conditions contrôlées et au champ. Actuellement l'espèce la plus fréquente sur le blé est *F. graminearum* mais le classement des variétés de blé pour leur résistance aux principales espèces de *Fusarium* est relativement stable. Comme les spores de *F. culmorum* sont beaucoup plus faciles à produire au laboratoire que celles de *F. graminearum*, beaucoup de tests de comportement de génotypes de blé sont réalisés avec *F. culmorum*. Les méthodes de production d'inoculum sont différentes pour ces 2 espèces.

1. PRODUCTION D'INOCULUM ET CONTAMINATION

1.1. *Fusarium culmorum*

La multiplication du champignon pour produire l'inoculum doit se faire à partir d'une souche pure. Il est préférable qu'elle soit caractérisée pour son agressivité et la production de mycotoxines.

1.1.a. Multiplication

La multiplication se fait sur grains d'orge. Une fiole de Erlenmeyer de 250 ml permet de produire environ 5 litres d'inoculum final à la concentration de 10⁶ spores/ml.

- Dans chaque fiole de 250 ml, mettre un volume de grain d'orge (30 ml) et le même volume d'eau du robinet. Fermer les flacons avec du coton cardé et couvrir d'un papier sulfurisé maintenu avec un élastique.

- Stériliser deux fois : 20 minutes à 105 °C pour ne pas faire éclater les grains, puis 1 heure à 120 °C en laissant refroidir 24 heures entre les deux stérilisations pour permettre une imbibition complète des grains.

¹ UMR INRA – Agrocampus Rennes APBV, BP35327, 35653 Le Rheu, France

- Après avoir laissé refroidir, déposer en condition stérile (sous une hotte à flux lumineuse ou auprès d'un bec Bunsen) un fragment de culture pure de l'isolat choisi dans chaque flacon.
- Laisser incubé à température ambiante et à la lumière naturelle jusqu'à ce que tous les grains soient colonisés et qu'il y ait sporulation (environ 1 mois).
- Au début de la culture, agiter pour fragmenter le mycélium, assurer une colonisation rapide de l'ensemble des grains et éviter la prise en masse (2 à 4 fois à 48 h d'intervalle)

Après un mois environ, on peut extraire les spores par lavage et filtration sur mousseline. La suspension de spores pourra être utilisée immédiatement comme inoculum après dilution à la concentration voulue ou être congelée en suspension très concentrée ($>10^8$ spores/ml) qui pourra être conservée au moins 3 mois à -20°C . Il est pratique de conditionner l'inoculum en sachets correspondant aux quantités pouvant être utilisées en une journée en fonction des essais mis en place. Les spores de *Fusarium* sédimentent rapidement. La mesure des concentrations ainsi que la préparation des aliquotes doivent être réalisées à partir d'une suspension agitée en permanence.

1.1.b. Contamination au champ par pulvérisation d'une suspension de spores

La quantité de symptômes formés varie beaucoup avec le stade physiologique de l'épi au moment de la contamination. Elle passe par un pic à la floraison et devient quasi nulle à partir du stade aqueux du grain. Il est donc très important de contaminer tous les géotypes au même stade de développement. Nous réalisons nos contaminations début floraison.

- Repérer dans la journée les parcelles arrivant à floraison (minimum 10 % des épis ayant les étamines sorties par parcelle) avec une marque de couleur différente par jour de contamination.

- Sortir du congélateur des sachets d'inoculum concentré correspondant à la quantité d'inoculum nécessaire pour les parcelles à contaminer dans la journée et les laisser à température ambiante jusqu'à décongélation. Un litre d'inoculum final permet de contaminer environ 5 m². L'inoculum décongelé ne se recongèle pas.

- Ajouter la quantité d'eau nécessaire à la dose pour avoir la concentration finale voulue.

Lorsque la dilution est faite, utiliser l'inoculum dans les heures qui suivent.

- Irriguer pendant 20 mn avec un débit de 6 mm / heure avant de contaminer et après la contamination pendant 10 mn si le temps est desséchant puis tous les deux jours s'il ne pleut pas.

- Pulvériser l'inoculum sur les géotypes repérés dans la journée de préférence le soir si le climat est sec, la quantité apportée 200 ml / m² correspond au début du ruissellement.

1.2. *Fusarium graminearum*

1.2.a. Multiplication

Pour *F. graminearum* il y a deux possibilités pour produire de l'inoculum.

La production de conidiospores de *F. graminearum* étant difficile et dépendante de l'isolat, il est plus facile de produire des ascospores anémophiles au champ, soit en épandant sur le sol des grains contaminés par un isolat de *F. graminearum* (on obtient généralement de périthèces puis des ascospores en 3 semaines à un mois), soit en déposant en janvier février entre les lignes de blé des chaumes de maïs (ceux-ci produiront des périthèces et des ascospores). Dans le premier cas, la production de grains contaminés est analogue à celle de *F. culmorum*, sur grains d'orge ou de maïs ; mais on n'observe rarement une sporulation *in vitro*. Dans ce second cas, on ne contrôle pas la souche de *F. graminearum*. On aura donc une population de géotypes de *F. graminearum*.

Il est possible de produire des conidiospores dans un milieu liquide à base de haricot mungo. Faire bouillir 40 grammes de haricot mungo dans un litre d'eau pendant 20 minutes. Filtrer et stériliser le filtrat dans des boîtes de Roux. Après refroidissement ensemencer avec un explant d'une culture de *F. graminearum*. Après deux à trois semaines la concentration de la culture peut varier de 10^5 à 10^6 spores /ml. Le résultat dépend beaucoup de l'isolat de *F. graminearum*. Les spores peuvent être conservées comme celles de *F. culmorum*.

1.2.b. Contamination au champ

Les grains d'orge ou de maïs contaminés par *F. graminearum* sont produits comme pour la production de spores de *F. culmorum*, mais dans les fioles de Erlenmeyer de cinq ou six litres. Les grains sont sortis des flacons juste avant leur utilisation et épandus directement sur le sol de la parcelle au stade gonflement de la culture. Une quantité de 1,5 kg de grains permet de contaminer environ 60 m². Répéter l'opération toutes les semaines pendant trois à quatre semaines selon les écarts de floraison attendus entre les génotypes à tester.

Pour assurer une bonne production de périthèces, il est nécessaire de maintenir le sol humide en irriguant par aspersion durant 20 mn avec un débit minimum de 6 mm / heure après l'épandage puis tous les jours ou deux jours s'il ne pleut pas selon l'humidité ambiante.

Quelle que soit l'origine des tiges de maïs, la probabilité qu'elles soient contaminées par *F. graminearum* est forte. Il faut les prélever après la récolte du maïs grain, les conserver à l'extérieur et les placer dans les parcelles à contaminer entre les lignes de blé en janvier ou février. Il est important d'irriguer pour maintenir le sol humide à partir de la mi-montaison si le climat est sec. La notation de la précocité de floraison a lieu tous les 2 jours. Une marque de couleur différente est attribuée à chaque génotype à chaque passage. Les symptômes sont notés à temps constant après la floraison qui est le stade le plus sensible.

2. NOTATION DES SYMPTOMES.

Les symptômes sur épi ne permettent pas de distinguer les espèces de *Fusarium*. L'échelle de notation est donc identique quelle que soit l'espèce ou l'isolat de *Fusarium*.

Pour des tests de sélection, nous réalisons des notations visuelles selon une échelle de 1 à 9 (Figure 1). On estime le pourcentage d'épillets attaqués par la maladie en intégrant l'ensemble des épis de la parcelle. Il faut noter à temps constant après la contamination dans le cas de dépôt de spores sur l'épi ou à temps constant à partir de la floraison si la contamination est faite sur le sol pour tenir compte des différences de précocité entre les génotypes.

Nous réalisons une première notation 350°C jours après la contamination de la variété ce qui nous permet d'estimer la contamination primaire et une seconde à 450°C jours pour évaluer la progression de la maladie de fleur en fleur. Les variations de luminosité peuvent introduire un effet jour de notation. Pour les limiter, nous notons toujours avec la lumière du soleil dans le même sens par rapport au notateur (dans le dos de préférence).

Pour certains tests d'analyse génétique ou de méthodologie, nous réalisons des notations plus précises (et plus coûteuses) :

- Estimation de la proportion d'épis fusariés

Compter sur 50 à 100 épis, selon la précision souhaitée, le nombre d'épis ayant au moins un épillet fusarié. Un épillet est considéré comme fusarié lorsqu'au moins deux fleurs sont desséchées par la fusariose (Figure 2).

- Estimation du nombre d'épillets fusariés par épi.

Compter sur 50 ou 100 épis le nombre d'épillets desséchés par la fusariose pour chacun des épis.

Dans tous ces cas il est important de ne pas choisir les épis, mais de les prendre au hasard.



Figure 1 : *Échelle de notation des symptômes de fusariose de 1 à 9*

Figure 2 : *Epillet fusarié*

