

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**REDUCTION DE L'INCIDENCE DE *FUSARIUM GRAMINEARUM* SUR CEREALES (TRITICALES)
PAR APPLICATION D'AGENTS DE BIOCONTROLE ET STIMULATION DES COMMUNAUTES
FONGIQUES ENDEMIQUES**

F. LEGRAND^{1,2}, A. PICOT¹, R. LOOTEN¹, O. COR², G. BARBIER¹ & G. LE FLOCH¹

¹ Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, SFR 148 ScInBioS, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France [gaetan.lefloch@univ-brest.fr].

² Lallemand Plant Care [ocor@lallemand.com].

RÉSUMÉ

La fusariose est une maladie fongique qui affecte les productions céréalières du monde entier. L'agent pathogène le plus souvent incriminé est *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). En plus des pertes de rendements occasionnées, ce phytopathogène est capable de produire des mycotoxines présentant un grand risque pour la santé humaine et animale. L'un des leviers privilégié pour réduire l'incidence de ces toxines est une lutte chimique préventive et curative pour réduire l'inoculum et la contamination des glumes au champ. Toutefois, les études menées jusqu'à présent démontrent les limites des pratiques culturales et des fongicides utilisées et la nécessité de trouver des alternatives efficaces et en adéquation avec les objectifs du programme Ecophyto 2018. L'application d'agents de biocontrôle commercialisés et la stimulation des micro-organismes naturellement présents dans le sol et ayant une activité antagoniste vis-à-vis de *F. graminearum* présentent de ce fait un intérêt majeur.

Notre objectif est de démontrer l'efficacité de l'association d'un fongicide et d'une formulation d'agent de biocontrôle pour la réduction de l'inoculum primaire et donc de la concentration en mycotoxines dans les grains à la récolte.

Mots-clés : Contrôle biologique, *Fusarium graminearum*, mycotoxines, Prestop®, Bioreveil®.

ABSTRACT

Fusarium graminearum is the major causal agent of *Fusarium* Head Blight (FHB) of wheat and other cereals, a devastating disease responsible of yield and quality losses worldwide. It is actually able to produce a wide range of mycotoxins highly resistant to thermal and chemical treatments. Consequently, they cannot be removed from the crops and therefore, efforts to control FHB should be made before harvesting.

Various studies demonstrated the importance of cultural practices and fungicides in the management of FHB but these methods are not sufficient enough to ensure high quality grains at harvest. Thus, it is important to find effective alternatives and the use of antagonistic micro-organisms against *F. graminearum* could become one of them. We propose a two-year experiment to study the combination of a biologic control agent and a fungicide to inhibit *F. graminearum* development and reduce mycotoxin production in cereal grains.

Keywords: Biocontrol, *Fusarium graminearum*, mycotoxins, Prestop®, Bioreveil®.

INTRODUCTION

La fusariose est l'une des maladies fongiques des céréales les plus répandues [Blandino *et al.*, 2006]. Son incidence mondiale [Atoui *et al.*, 2012 ; Nazari *et al.*, 2014] et son impact sur les cultures d'importance économique [Fernandez *et al.*, 2008] en font, d'après le Centre International pour l'Amélioration du Maïs et du Blé (CYMMIT), l'une des plus menaçantes pour les récoltes et la santé humaine [Davari *et al.*, 2012].

Les deux genres fongiques principalement responsables de la fusariose, *Microdochium* et *Fusarium* [Champeil *et al.*, 2004 ; Blandino *et al.*, 2006] occasionnent chez la plante hôte une grande variété de symptômes [Pirgozliev *et al.*, 2003] affectant le rendement et la qualité des récoltes céréalières, et induisant de ce fait leur dévalorisation marchande [Windels, 1999 ; Pirgozliev *et al.*, 2003].

De plus, la plupart des espèces appartenant au genre *Fusarium* produisent des mycotoxines présentant un risque pour la santé humaine et animale [D'Mello *et al.*, 1999 ; Skrbic *et al.*, 2011 ; Armando *et al.*, 2013]. Leurs teneurs dans les grains destinés à la consommation humaine font l'objet d'une réglementation à l'échelle européenne [règlements EC No 1126/2007, No 1881/2006, No 32/2002]. Les trichothécènes du groupe B, notamment le déoxynivalenol (DON) et ses dérivés acétylés, sont les plus fréquemment retrouvées dans les céréales [Ioos *et al.*, 2004 ; Kammoun *et al.*, 2010]. Ces dernières sont majoritairement associées à *Fusarium graminearum*, l'espèce fongique la plus souvent incriminée dans la fusariose à l'échelle internationale [McMullen *et al.*, 1997 ; Kammoun *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Geng *et al.*, 2014].

Les mycotoxines fusariennes sont thermiquement et chimiquement stables. Leur accumulation dans les grains constitue le principal risque sanitaire pour les céréales [Champeil *et al.*, 2004], et ceci peut se faire aussi bien avant la récolte que durant le stockage [Skrbic *et al.*, 2011]. Or il n'existe à ce jour aucun moyen efficace permettant de réduire leur quantité dans les productions céréalières après la récolte [Champeil *et al.*, 2004 ; Dalié *et al.*, 2010]. En conséquence, la lutte contre le champignon et la production de ses mycotoxines doit nécessairement se faire au champ, avant la récolte.

Le développement de la fusariose est dépendant des conditions climatiques, et de certaines pratiques culturales. En effet, un climat particulièrement humide et tempéré au moment de la floraison constitue un facteur majeur de risque [Gale *et al.*, 2002 ; Blandino *et al.*, 2006 ; Osborne & Stein, 2007]. D'autre part, les débris de la culture céréalière précédente figurent parmi les sources les plus prolifiques de propagules de *Fusarium* spp., les contaminations sont donc potentiellement plus sévères lorsqu'une céréale, particulièrement le maïs, est choisie comme précédent cultural [Lacroix, 2002 ; Osborne & Stein, 2007 ; Maiorano *et al.*, 2008]. Le travail du sol revêt également une grande importance puisque l'absence de labour laisse les résidus en surface, leur décomposition en est ralentie et les pathogènes peuvent survivre d'une année à l'autre sous forme de spores [Bailey & Lazarovits, 2003 ; Gilbert & Fernando, 2004 ; Blandino *et al.*, 2006]. Pour finir, la sensibilité de la variété céréalière cultivée peut constituer un facteur aggravant [Blandino *et al.*, 2006 ; Wegulo *et al.*, 2013].

Actuellement, la gestion de la fusariose repose principalement sur une combinaison de pratiques culturales (rotation des cultures, gestion des résidus, choix variétal) et l'utilisation appropriée de fongicides [Teich & Nelson, 1984 ; Diamond & Cooke, 2003 ; Blandino *et al.*, 2006 ; Perez *et al.*, 2008 ; Wegulo *et al.*, 2013].

Si cette stratégie permet souvent de répondre aux problèmes quantitatifs, elle n'est toutefois pas toujours corrélée à une baisse des mycotoxines [Blandino *et al.*, 2006]. En effet, comme l'ont, entre autres, démontré Bateman et ses collaborateurs dans une étude au Royaume Uni, l'efficacité des moyens de lutte est variable en fonction des années, du climat et des régions [Bateman *et al.*, 2007]. De la même manière, les fongicides, qui sont souvent présentés comme le traitement le plus efficace, ne suffisent pas toujours à réduire l'incidence de la fusariose ni à inhiber la production de mycotoxines [Zhang *et al.*, 2011]. Outre le développement de résistance chez les pathogènes et la toxicité des fongicides pour l'Homme et l'environnement [Lumsden & Locke, 1989 ; Compant *et al.*, 2005 ; Janvier *et al.*, 2007 ; Hou *et al.*, 2013], certains d'entre eux seraient susceptibles d'induire une augmentation de la concentration en mycotoxines dans les grains de céréales [Haidukowski *et al.*, 2005 ; Blandino *et al.*, 2006 ; Khan & Doohan, 2009 ; Amarasinghe *et al.*, 2013].

Le contexte agronomique actuel nécessite donc le développement d'alternatives complémentaires aux moyens existants. L'utilisation d'organismes vivants ou de leurs dérivés naturels capables de réduire des populations pathogènes est l'une des pistes actuellement étudiée [Bailey *et al.*, 2010]. En effet, les communautés microbiennes telluriques ont un rôle bénéfique sur la fertilité des sols et le bon développement des plantes [Raijmakers *et al.*, 2009 ; Maul *et al.*, 2014]. Certaines espèces pourraient être utilisées comme agents de lutte biologique en agissant selon quatre mécanismes contre les phytopathogènes : le parasitisme, l'antibiose, l'antagonisme et/ou l'induction de résistance systémique chez la plante hôte [Alabouvette *et al.*, 2006].

A ce jour et malgré de nombreuses études sur le contrôle de la fusariose par des micro-organismes, peu d'agents de lutte biologique sont disponibles sur le marché Européen [Alabouvette *et al.*, 2006]. De plus, la majorité de ces études portent sur une application de ces « biopesticides » sur les épis à l'anthèse et rares sont celles qui proposent l'utilisation de la flore tellurique comme un levier agronomique. Or, dans la mesure où la source principale d'inoculum primaire des *Fusarium* spp. provient du sol et des résidus de culture, le traitement du sol avec des agents de biocontrôle pourrait réduire la survie de cet inoculum primaire et par conséquent limiter les risques d'infection des épis.

Nous présentons dans cet article un essai terrain de protection biologique intégrée par l'utilisation d'agents de biocontrôle commercialisés (Lallemand Plant Care) dans un contexte agronomique et pédoclimatique favorable au développement de la fusariose.

L'impact des agents de biocontrôle sur la fusariose sera déterminé par un suivi des communautés fongiques du sol au cours de la saison culturale et sera corrélé aux composantes de rendement classiques et à la production de toxines dans les grains. En complément de cet essai terrain conduit sur la saison culturale 2014-2015 des essais *in vitro* et en mesocosmes permettront de préciser les modes d'actions des agents de biocontrôle utilisés.

MATERIEL ET MÉTHODE

Afin de tester cette approche de lutte biologique un essai au champ, répété sur deux années successives, a été mis en place. Cet essai a nécessité le choix et la préparation d'une parcelle agricole, l'apport d'un inoculum pathogène ainsi que le choix et le dosage de formulations commercialisées par un industriel.

1- Préparation de l'inoculum

En raison de la faible contamination en fusariose des récoltes de maïs de la campagne 2013/2014, il a été indispensable d'apporter un inoculum pathogène de façon artificielle. Pour cela, des isolats de *F. graminearum* ont été sélectionnés à partir de grains de blé de la campagne 2013/2014 du nord de la France selon une méthode modifiée de Mourelas *et al.*, 2014 et Ios *et al.*, 2004.

a) Isolement et identification d'isolats de *Fusarium graminearum*

Les grains de blés ont été désinfectés par trempage de 4 min dans une solution de NaClO à 2% suivi de deux rinçages de 5 minutes à l'eau distillée stérile. La flore fongique a été identifiée après 8 jours d'incubation des grains à température ambiante sur milieu PDA additionné de trois antibiotiques [Streptomycine Sulfate Sal. : $6,86 \cdot 10^{-5}$ mol/L, Pénicilline G Potassium Sal. : $1,34 \cdot 10^{-4}$ mol/L ; Chlortétracycline hydrochloride : $9,70 \cdot 10^{-5}$ mol/L ; Sigma Aldrich] selon ses caractéristiques morphologiques micro et macroscopiques [Leslie & Summerell, 2006].

Six isolats identifiés comme appartenant à l'espèce *F. graminearum* ont été sélectionnée après isolement.

Afin de confirmer l'identité de ces souches, la région Internal Transcribed Spacer (ITS) et le facteur d'élongation alpha (EF1 α) ont été séquencés. Les ADN ont été extraits à l'aide d'un kit d'extraction

(FastDNA®SPIN Kit, MP Biomedicals). Les régions ITS et EF1 ont été amplifiées par PCR à partir d'1µL d'ADN à 40ng/µL, dans un volume de réaction de 25µL composé de 1x de tampon, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.025U/µL de Taq et de 0.4µM des amorces ITS4 et d'ITS5 [White *et al.*, 1990] et 0.2µM des amorces EF1f et EF1r [O'Donnell *et al.*, 2004] respectivement pour ITS et EF1 (séquences des amorces présentées Tableau 2). La région ITS est amplifiée par une dénaturation de 5' à 95°C, suivi de 30 cycles de 1' à 95°C, 1' à 55°C, 1' à 72°C, puis une élongation de 10' à 72°C. Le facteur d'élongation est amplifié par une dénaturation de 5' à 95°C, suivi de 30 cycles de 1' à 95°C, 1'30 à 62°C, 1' à 72°C, puis une élongation de 5' à 72°C. Après séquençage, les contigs des 2 régions ont été confrontés à la base de données NCBI, par blast, pour confirmer l'identification des souches retenues.

b) Étude du potentiel toxigènes des isolats de *F. graminearum*

Le potentiel toxigènes des 6 isolats a été étudié pour les mycotoxines suivantes : Déoxynivalénol (DON), 15-Acétyle-Déoxynivalénol (15-AcDON), 3- Acétyle-Déoxynivalénol (3-AcDON), Nivalénol (NIV), Zéarlénone (ZEA) et Fusarénone X (F-X).

Pour ce faire, un protocole modifié de Kokkonen et ses collaborateurs a été mis en place [Kokkonen *et al.*, 2010].

Des grains de blé tendre rincés à l'eau ont été stérilisés 20 minutes à 120°C dans de l'eau distillée [75g grain/60mL eau]. Après refroidissement, chaque lot de grains a été inoculé avec 5 disques (Ø 7 mm) des cultures sur PDA âgées de 7 jours et incubé 10 jours dans une étuve à 25°C. Les 6 mycotoxines ont été dosées sur les grains de blé après séchage durant 4 jours à 70°C. Les analyses ont été réalisées par LC/MS par un organisme accrédité COFRAC (Capinov, laboratoire d'analyse de Triskalia).

Une analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel XLSTAT. L'analyse de variances (ANOVA) a été utilisée pour tester l'effet souche sur la production de mycotoxines. Les différences significatives entre souches ont ensuite été déterminées avec le test de Tukey. Le seuil de significativité était fixé à 0,05.

c) Production de l'inoculum

L'isolat présentant le potentiel toxigène le plus fort (chénotype DON/15-AcDON) a été sélectionné pour produire l'inoculum pathogène selon une méthode inspirée de Khan *et al.*, 2004.

Des grains de maïs rincés à l'eau distillée ont été placés dans des fioles de Roux et recouverts d'eau distillée durant une nuit. Après élimination de l'eau, deux cycles de stérilisation de 20 min à 121°C ont été appliqués à 24 h d'intervalle.

Les grains de maïs refroidis ont ensuite été inoculés à raison de 10 disques de cultures par lot de 300 g de grains, et placés 7 jours en incubation à 25°C.

Les grains de maïs enrobés de mycélium de *F. graminearum* ont ensuite été conditionnés en sachet pour une utilisation immédiate.

2- Agents de biocontrôle

Lors de cet essai, deux formulations commercialisées ont été testées. La formulation Prestop® est à base du champignon *Gliocladium catenulatum* J1446 et est efficace contre *Botrytis cinerera* et d'autres phytopathogènes comme *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* et *Fusarium* [données Lallemand Plant Care].

La formulation Bioreveil® quant à elle, est une spécialité à base de levures stabilisées et d'oligosaccharides. Elle stimule l'activité des micro-organismes telluriques et produit un effet starter sur les cultures [données Lallemand Plant Care].

Ces deux formulations sont épandues le même jour, 6 jours après le semis, à une dose 10 kg/ha.

3- Conduite de l'essai terrain

L'essai terrain a débuté en Novembre 2014, pour la campagne 2014/2015, et sera répété en 2015/2016.

La parcelle expérimentale se situe en Bretagne (département 22) et a une surface totale de 1728 m². La disposition choisie a permis d'obtenir 4 blocs représentant 4 répétitions, chacun étant divisé en 8 microparcelles de 9 x 3 m correspondant aux 8 modalités testées dans l'essai et présentées dans le Tableau 1. Une bande de terre non cultivée borde les 4 blocs et les sépare les uns des autres.

Les 8 modalités ont été randomisées au sein de chaque bloc.

Afin de se placer dans des conditions simulant un précédent maïs, des résidus de cannes de cette graminée ont été épandus avant le semis à raison de 500 kg/ha. Des grains de maïs recouverts de mycélium de la souche de *F. graminearum* sélectionnée précédemment ont également été épandus sur l'ensemble de la parcelle (10 g/m², 24 h avant le semis) pour garantir la présence d'un isolat de *F. graminearum* sélectionné, identifié et producteur de mycotoxines.

Le choix du semis s'est porté sur le triticale de la variété Bellac, pour sa sensibilité forte à *F. graminearum* [Arvalis – Institut du végétal]. Les grains sont enrobés de l'insecticide Gaucho 350® et du fongicide Rédigo® [Bayer] afin de protéger les semences et les plantules. Le semis est effectué à une densité de 250 g/m².

Les 2 formulations microbiennes sont épandues en même temps une semaine après le semis.

Au moment de la floraison, le fongicide Kestrel® [Bayer], un mélange de prothioconazole (160 g/L) et de tebuconazole (80 g/L), sera appliqué à la dose usuelle de 0,5 L/ha.

Tableau 1 :

Modalités testées lors de l'essai terrain. Chaque modalités est répétée 1 fois par bloc.

Treatments applied for the eight different trials. Each treatment was tested in 4 plots.

MODALITES	TRAITEMENTS
Modalité 1	Témoin contaminé par des cannes et des grains de maïs
Modalité 2	Prestop® + Bioreveil® + Fongicide à la floraison
Modalité 3	Prestop® + Bioreveil®
Modalité 4	Bioreveil® + Fongicide à la floraison
Modalité 5	Prestop® + Fongicide à la floraison
Modalité 6	Bioreveil®
Modalité 7	Prestop®
Modalité 8	Fongicide à la floraison

5) Suivi de la diversité microbienne tellurique

a- Echantillonnage

Au cours de cet essai, différents échantillonnages sont réalisés pour permettre le suivi de la diversité microbienne tellurique bactérienne et fongique au cours du temps.

Pour chaque micro-parcelle, cinq prélèvements sont effectués : aux quatre coins de la micro-parcelle et au centre.

Ces échantillons sont ensuite rassemblés, homogénéisés, les débris sont éliminés et la terre est tamisée à 2 mm puis de nouveau homogénéisée et conditionnée en 3 sachets correspondant à un triplicata et conservés à 4°C. Des aliquots de terre sont également conservés dans des piluliers à – 20°C.

Le premier prélèvement a été réalisé avant le semis, le second sera effectué au stade premier nœud et le dernier sera effectué à la récolte.

La tarière permet un prélèvement sur une profondeur de 20 cm et un diamètre de 10 cm. La masse d'un échantillon de terre a été estimé à 762,45 g $\pm$ 87,84 g à partir de 20 prélèvements.

b- Analyses moléculaires

Le kit Machery Nagel NucleoSpin kit for Soil (REF 740780.250) est utilisé pour extraire l'ADN microbien en triplicata pour chaque échantillon composite à partir des prélèvements conservés à -20°C. La concentration et la qualité du matériel génétique sont estimées au Nanodrop.

Deux PCR indépendantes permettent d'amplifier l'ADN bactérien et fongique en se basant respectivement sur la région V3 de l'ADNr 16S et ITS (amorces Tableau 2).

Le mix PCR a été préparé comme suit pour l'amplification de la région V3, pour 25 μ L : 5 μ L de Tampon GoTaq Flexi 5X, 2 μ L de MgCl₂ 25mM, 1,25 μ L de chaque amorce 10 μ M, 2 μ L de dNTP 10 μ M et 0,25 μ L de Taq Polymérase 5U/ μ L. Le programme appliqué est constitué d'une première phase de 5 min à 94°C puis de 35 cycles [30 s à 95°C ; 30 s à 57°C ; 30 s à 72°C] et se termine par 10 min à 72°C.

Pour la région ITS2, le mix a été préparé comme suit pour 25 μ L : 5 μ L de Tampon GoTaq Flexi 5X, 2 μ L de MgCl₂ 25mM, 0,4 μ L de chaque amorce 10 μ M, 0,5 μ L de dNTP 10 μ M et 0,125 μ L de Taq Polymérase 5U/ μ L. Le programme appliqué est constitué de 35 cycles [1 min à 94°C ; 1 min à 57°C ; 1 min à 72°C].

Une analyse en composantes principales permet d'étudier les différents profils obtenus et d'évaluer l'évolution de la diversité microbienne au cours du temps et de comparer les différentes modalités.

Tableau 2 :

Séquences des amorces utilisées pour étudier la diversité tellurique des échantillons de sol et pour identifier les isolats de *F. graminearum*.

List of primers used in the PCR and sequencing experiments.

Amorces		Séquence
Région V3	W34-NED	5'-TTACCGCGGCGTGCTGGCAC-3'
	W49	5'-AGGTCCAGACTCCTACGGC-3'
Région ITS	ITS5	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Région ITS 2	ITS 3	5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
	ITS 4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Facteur	EF1 α F	5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGACTCA-3'
d'élongation	EF1 α R	5'-TGGAGATACCAGCCTCGAAC-3'

6) Composantes de rendement et dosage de toxines

Le poids de mille grains et le nombre d'épis au m² seront calculés pour évaluer le rendement et l'impact des différents traitements sur les récoltes. Un suivi du développement de la fusariose et sa sévérité ainsi qu'une analyse des mycotoxines sur les grains récoltés seront également réalisés par modalité pour étudier l'incidence de la maladie et les niveaux de contaminations en mycotoxines en fonction des différents traitements (voir paragraphe 1b).

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Pouvoir toxigène des isolats de *F. graminearum*

Le profil toxigène des isolats a été évalué par dosage de mycotoxines appartenant au groupe B des trichothécènes et de la zéaralénone, principalement associées à *F. graminearum*. Ces mycotoxines sont fréquemment retrouvées dans les céréales et constituent un risque pour la santé humaine et animale [Kamoun *et al.*, 2010 ; Saengtienchai *et al.*, 2014].

Pour effectuer cette étude, des grains de blé stérilisés ont été inoculés avec les différents isolats puis analysés après 10 jours d'incubation à 25°C. Les grains ont conservé un pourcentage d'humidité moyen de 78,72 % $\pm$ 3,48 sur toute la durée de l'expérimentation. Ces deux paramètres ont été choisis afin de se placer dans des conditions optimales de température et d'humidité pour la production de mycotoxines.

Le résultat des analyses est présenté dans le Tableau 3.

Une contamination en DON et ZEA a été observée pour tous les échantillons au temps 0, y compris le témoin négatif (résultats non présentés). Les valeurs observées ne sont toutefois pas significativement différentes les unes des autres. Par ailleurs, la contamination en ZEA n'est pas retrouvée chez le témoin après 10 jours d'incubation. Ces résultats suggèrent une contamination initiale des grains de blé utilisés. Toutefois, cette contamination est inférieure aux limites maximales fixées par la réglementation CE No 1126/2007 pour le blé tendre non transformé (destiné à l'alimentation animale), soit moins de 1250 µg/kg pour DON et 100 µg/kg pour ZEA.

Aucune autre mycotoxine que DON et ZEA n'a été détectée dans le témoin négatif au temps 0 ni après 10 jours d'incubation.

Etant donné que le chémotype 15-AcDON est majoritaire en Europe Centrale [Reynoso *et al.*, 2011], un intérêt particulier a été porté aux isolats produisant la mycotoxine DON et son dérivé acétylé 15-AcDON. Le test de Tukey associé à l'analyse des variances a permis de confirmer que l'isolat A produit significativement plus de ces deux mycotoxines que les 5 autres isolats après 10 jours d'incubation.

La production de mycotoxine ZEA a également été observée pour l'ensemble des isolats. Mais d'après l'analyse des variances et le test de Tukey, les concentrations déterminées pour les 6 isolats ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

Cette première partie a permis d'évaluer le profil toxigène de 6 isolats de *F. graminearum* et de sélectionner l'isolat A pour la production d'inoculum.

Elle a également permis de mettre une fois de plus en évidence la variabilité des chémotypes retrouvés chez l'espèce *F. graminearum* [Benyon *et al.*, 2000 ; Kammoun *et al.*, 2010].

Tableau 3 :

Concentrations des mycotoxines (mg/kg) analysées dans les grains de blé inoculés avec les 6 isolats de *F. graminearum* et après 10 jours d'incubation à 25°C (moyenne du triplicata).

Mean concentrations (µg/Kg) of the mycotoxins measured in wheat grains inoculated with 6 different strains of F. graminearum at 25°C after 10 days of incubation.

Espèce	Isolats	Mycotoxines							
		DON		15-AcDON		3-AcDON		ZEA	NIV
<i>F. graminearum</i>	A	8,24	<i>a</i>	17,00	<i>a</i>	0,04	10,20	-	-
	B	0,98	<i>c</i>	0,84	<i>b</i>	-	6,42	-	-
	C	1,47	<i>b, c</i>	2,05	<i>b</i>	-	2,87	-	-
	D	0,12	<i>d</i>	-	<i>b</i>	-	7,66	8,28	0,91
	E	1,29	<i>b, c</i>	1,91	<i>b</i>	0,12	4,78	-	-
	F	2,09	<i>b</i>	3,87	<i>b</i>	-	6,77	-	-
Témoin négatif		0,02	<i>d</i>	-	<i>b</i>	-	-	-	-

Abréviation : DON : Déoxynivalénol, 15-AcDON : 15-Acétyle-Déoxynivalénol, 3-AcDON : 3-Acétyle-Déoxynivalénol, NIV : Nivalénol, ZEA : Zéarlénone, F-X Fusarénone X

- = non détecté / not detected

a, b, c, d = Groupe significativement différents les uns des autres / significantly ($p < 0,05$) different groups

2) Diversité microbienne de la parcelle

Des prélèvements de terre effectués 24 h avant le semis et avant tout traitement ont été réalisés pour permettre l'étude de la diversité microbienne du sol au temps T0 et de son évolution au cours du temps par comparaison à 2 autres temps de prélèvement.

Après extraction de l'ADN et amplification des régions V3 de l'ADNr 16S bactérien et ITS2 pour les champignons, les amplicons ont été analysés en CE-SSCP (*Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism*). Cette méthode permet de séparer les amplicons simple brin en fonction de la conformation qu'ils adoptent en conditions non dénaturantes et ainsi de différencier les différentes espèces représentées dans un échantillon. Elle présente l'avantage d'être reproductible et sensible ainsi que d'être utilisable à haut débit [Zinger et al, 2006].

Une analyse globale de la parcelle a été réalisée par l'étude de 12 des 28 lots de la parcelle, ceci ayant pour but d'estimer l'homogénéité de la flore tellurique de la surface agricole.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales et montrent une bonne homogénéité de la parcelle, à la fois pour la flore fongique et la flore bactérienne.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans cet article sont des résultats préliminaires d'un essai terrain qui sera conduit sur deux années consécutives. Le contexte agronomique et pédoclimatique favorable au développement de la fusariose a été délibérément recherché afin de proposer une solution intégrée et alternative à la lutte chimique directement applicable par les producteurs de céréales en Bretagne.

Le champignon *Gliocladium catenulatum* souche J1446 (également connu sous le nom de *Clonostachys rosea* f. *catenulata*), apporté au moyen de la formulation Prestop®, est connu pour ses capacités antagonistes [Chatterton et al., 2008].

Cette souche a démontré son efficacité dans la lutte contre *Botrytis*, *Phytium* et *Rhizoctonia* mais principalement lors de cultures en serre [McQuilken et al., 2001].

Son utilisation lors d'un essai terrain à grande échelle est une première mais nous pensons qu'en limitant son action au niveau des résidus de culture, source principale d'inoculum pathogènes de *F. graminearum*, il serait en mesure de réduire l'inoculum de départ et donc à terme l'incidence de la fusariose et la production de mycotoxines. La formulation Bioréveil® vient quant à elle en support « prébiotique ». En effet, certaines levures ont des caractéristiques de PGPA (*Plant Growth Promoting Agent*) et sont de ce fait capables d'inhiber le développement de pathogènes, de produire des phytohormones et des sidérophores ainsi que de contribuer à la biodisponibilité de certains minéraux [Amprayn et al., 2012 ; Yurkov et al., 2012].

La stimulation des communautés fongiques endogènes constitue une voie innovante de l'optimisation des fonctions de l'écosystème sol cultivé. Le recours aux services rendus par la biodiversité microbienne pour le développement de systèmes de production est une voie prometteuse de recherche pour atteindre les objectifs de réduction de l'emploi de produits phytosanitaires et d'engrais chimiques.

REMERCIEMENTS

Le projet Rhisotox est labellisé par le pôle de compétitivité Valorial et est financé par la Région Bretagne. Nous remercions la coopérative agricole bretonne Triskalia pour son aide dans la réalisation

des essais terrain (filiale Caliance) et les analyses des mycotoxines (filiale Capinov), et plus particulièrement Madame Catherine Perhirin et MM. Benoit Camus, Dominique Blanchard, Thierry Oboyet et Jean Luc Hardy.

BIBLIOGRAPHIE

Amprayn, K.-O., Rose, M. T., Kecskés, M., Pereg, L., Nguyen, H. T., Kennedy, I. R. - 2012. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology* 61, 295–299.

Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M., Cavaglieri, L. R. - 2013. In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology* 161, 182–188.

Alabouvette, C., Olivain, C. & Steinberg, C. - 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114, 329–341.

Amarasinghe, C. C., Tamburic-Ilincic, L., Gilbert, J., Brûlé-Babel, A. L. & Fernando, W. G. D. - 2013. Evaluation of different fungicides for control of *Fusarium* Head Blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*.

Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M. & Lebrihi, A. - 2012. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *International Journal of Food Microbiology* 154, 59–65.

Bailey, K. L. & Lazarovits, G. - 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil & Tillage Research* 72, 169–180.

Bailey, K. L., Boyetchko, S. M. & Längle, T. - 2010. Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides.

Bateman, G. L., Guttridge, R. J., Gherbawy, Y., Thomsett, M. A. & Nicholson, P. - 2007. Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. *Plant Pathology* 56, 604–615.

Benyon, F. H. L., Burgess, L. W. & Sharp, P.J. - 2000. Molecular genetic investigations and reclassification of *Fusarium* species in sections *Fusarium* and *Roseum*. *Mycological Research* 104, 1164–1174.

Blandino, M., Minelli, L. & Reyneri, A. - 2006. Strategies for the chemical control of *Fusarium* Head Blight: effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. *European Journal of Agronomy* 25, 193–201.

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.

Chatterton, S., Jayaraman, J. & Punja, Z. K. - 2008. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control* 46, 267–278.

Commission Regulation (EC) No 1126/2007

Commission Regulation (EC) No 1881/2006

Commission Regulation (EC) No 32/2002

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. & Barka, E. A. - 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4951-4959.

D'Mello, J. P. F., Placinta, C. M. & Macdonald, A.M.C. - 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183-205.

Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., Richard-Forget, F. - 2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins : a review. *Food Control* 21, 370-380.

Davari, M., van Diepeningen, A. D., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M., Najafzadeh, M. J., van der Lee, T. A. J. & de Hoog, G. S. - 2012. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). *Journal of Microbiological Methods* 89, 63-70.

Diamond, H. & Cooke, B. M. - 2003. Preliminary studies on biological control of the *Fusarium* ear blight complex of wheat. *Crop Protection* 22, 99-107.

Fernandez, M. R., Huber, D., Basnyat, P. & Zentner, R. P. - 2008. Impact of agronomic practices on populations of *Fusarium* and other fungi in cereal and noncereal crop residues on the Canadian Prairies. *Soil & Tillage Research* 100, 60-71.

Gale, L. R., Chen, L.-F., Hernick, C.A., Takamura, K. & Kistler, H. C. - 2002. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in Eastern China. *Ecology and Population Biology* 92, 1315-1322.

Geng, Z., Zhu, W., SU, H., Zhao, Y., Zhang, K.-Q. & Yang, J. - 2014. Recent advanced in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and âthogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Giberella zeae*). *Biotechnology Advances* 32, 390-402.

Gilbert, J. & Fernando, W. G.D. - 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26, 464-472.

Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pascaldi, D., Campagna, C. & Visconti, A. - 2005. Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 191-198.

Hou, Y., Zheng, Z., Xu, S., Chen, C. & Zhou, M. - 2013. Prtoteomic analysis of *Fusarium graminearum* treated by the fungicide JS399-19. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 86-92.

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.

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T. & Steinberg, C. - 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1-23.

Kammoun, L. G., Gargouri, S., Barreau, C., Richard-Forget, F. & Hajlaoui, M. R. - 2010. Trichothecenechemotypes of *Fusariumculmorum* infecting wheat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology* 140, 84-89.

Khan, M. R. & Doohan, F. M. - 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of whezt and barley and associated mycotoxin contaùination of grain. *Biological Control* 48, 42-47.

Khan, N. I, Schisler, D. A., Boehm, M. J., Lipps, P.E. & Slininger, P. J. - 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control* 29, 245–255.

- Meri Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P. & Jestoi, M. - 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 143, 17–25.
- Lacroix, M. - 2002. Maladies des céréales et de la Luzerne : Diagnostic dépistage prévention. Club des sols du Témiscouata. Agriculture, Pêcherie et Alimentation Québec.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. - 2006. The *Fusarium* Laboratory. Manual. Blackwell Publishing Ltd, Iowa.
- Lumsden, R. D. & Locke, J. C. - 1989. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology* 79, 361-366.
- Maiorano, A., Blandino, M., Reyneri, A. & Vanara, F. - 2008. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Protection* 27, 182–188.
- Maul, J. M., Buyer, J. S., Lehman, R. L., Culman, S., Blackwood, C. B., Roberts, D. P., Zasada, I. A. & Teasdale, J. R. - 2014. Microbial community structure and abundance in the rhizosphere and bulk soil of a tomato cropping system that includes cover crops. *Applied Soil Ecology* 77, 42–50.
- McMullen, M., Jones, R. & Gallenberg, D. - 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81, 1340-1348.
- McQuilken, M. P., Gemmel, J. & Lahdenperä, M.-L. - 2001. *Gliocladium catenulatum* as a Potential Biological Control Agent of Damping-off in Bedding Plants. *Journal of Phytopathology* 149, 171-178.
- Mourellos, C. A., Malbran, I., Balatti, P. A., Ghiringhelli, P. D. & Lori, G. A. - 2014. Gramineous and non-gramineous weed species as alternative hosts of *Fusarium graminearum*, causal agent of *Fusarium* Head Blight of wheat, in Argentina.
- Nazari, L., Patteri, E., Terzi, V., Morcia, C. & Rossi, V. - 2014. Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. *Food Microbiology* 39, 19-26.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., Sanche, S., Geiser, D. M., Juba, J. H., van Burik, J.-A., H., Padhye, A., Anaissie, E. J., Francesconi, A., Walsh, T. J. & Robinson, J. S. - 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5109–5120.
- Osborne, L. E. & Stein, J. M. - 2007. Epidemiology of *Fusarium* Head Blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119, 103-108.
- Perez, C., Dill-Macky, R. & Kinkel, L. L. - 2008. Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. *Plant Soil* 302, 53-69.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C. & Jenkinson, P. - 2003. Strategies for the control of *Fusarium* Head Blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 731-742.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. - 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341-361.
- Reynoso, M. M., Ramirez, M. L., Torres, A. M. & Chulze, S. N. - 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 444–448.

- Saengtienchai, T., Poapolathep, S., Isariyodom, S., Ikenaka, Y., Ishizuka, M. & Poapolathep, A. - 2014. Toxicokinetics and tissue depletion of Fusarenon-X and its metabolite nivalenol in piglets. *Food and Chemical Toxicology* 66, 307–312.
- Skrbic, B., Malachova, A., Zivancev, J., Veprikova, Z. & Hajslova, J. - 2011. *Fusarium* mycotoxins in wheat samples harvested in Serbia: a preliminary survey. *Food Control* 22, 1261-1267.
- Teich, A. H. & Nelson, K. - 1984. Survey of *Fusarium* Head Blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. *Canadian Plant Disease Survey* 64, 11-13.
- Wegulo, S. N., Bockus, W. W., Hernandez Nopsa, J. F., Peiris, K. H. S. & Dowell, F. E. - 2013. Integration of fungicide application and cultivar resistance to manage *Fusarium* Head Blight in wheat. In : *Fungicides – Showcases of integral plant disease Management from around the world*.
- Windels, C. E. - 1999. Economic and social impact of *Fusarium* Head Blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *91st Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Montreal, Quebec, Canada*, 5 pp.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., et Taylor J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual. (Innis N., Gelfand D., Sninsky J., et White T. Eds.) Academic Press, New York. pp. 315-322.
- Yurkov, A. M., Kemler, M. & Begerow, D. - 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology* 5, 24-35.
- Zhang, L., Luo, P., Ren, Z. & Zhang, H. - 2011. Controlling fusarium head blight of wheat (*Triticum aestivum* L.) with genetics. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2, 263-270.
- Zinger, L. Gury, J., Giraud, F., Krivobok, S., Gielly, L., Taberlet, P. & Geremia, R. A.- 2006. Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism. Methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial Ecology* 54, 203-216.