

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

**EFFICACITE DE STIMULATEURS DE DEFENSE DES PLANTES CONTRE LA SEPTORIOSE ET LEURS
INTERACTIONS AVEC TROIS VARIETES DE BLE TENDRE**

C. MAUMENE¹, M.-É. ORS², A. SIAH³, G. COULEAUD¹, B. RANDOUX², P. RIGOLLE⁵, S. SELIM⁴,
P. HALAMA³ et P. REIGNAULT²

⁽¹⁾ Arvalis-Institut du Végétal – Station expérimentale, F-91720 Boigneville, France

⁽²⁾ ULCO – CS 80699, F-62228 Calais cedex, France

⁽³⁾ ISA Lille – 48 boulevard Vauban, F-59046 Lille Cedex, France

⁽⁴⁾ Lasalle-Beauvais – 19 rue Pierre Waguët, BP 30313, F-60026 Beauvais Cedex, France

⁽⁵⁾ GIE CLUB 5 – 83 avenue de la Grande Armée, F-75782 Paris Cedex 16, France

Contacts : c.maumene@arvalisinstitutduvegetal.fr ; mareva.ors@univ-littoral.fr ; ali.siah@isa-lille.fr ;
g.couleaud@arvalisinstitutduvegetal.fr ; beatrice.randoux@univ-littoral.fr ; prigolle@invivo-group.com ;
sameh.selim@lasalle-beauvais.fr ; patrice.halama@isa-lille.fr ; philippe.reignault@univ-littoral.fr

RÉSUMÉ

Les stimulateurs de défense des plantes (SDP) peuvent constituer une solution de substitution partielle ou totale aux fongicides conventionnels dans la lutte contre les maladies des plantes. Dans ce contexte, l'efficacité de protection de quatorze SDP vis-à-vis de la septoriose du blé tendre a été évaluée en conditions de laboratoire et de plein champ sur trois cultivars de niveaux de sensibilité différents. Les résultats ont mis en évidence des niveaux d'efficacité contrastés pour les SDP testés ainsi que des interactions SDP-cultivar en conditions de laboratoire et du champ. L'étude du mode d'action de trois SDP a montré que leur efficacité est liée aux réductions de la colonisation foliaire et des activités xylanase et glucanase du champignon. En revanche, aucune association n'a été constatée entre l'efficacité de protection et l'induction des activités peroxydase et phénylalanine ammonia-lyase et de l'expression de neuf gènes de défense chez la plante.

Mots-clés : Eliciteurs, septoriose, efficacité, mode d'action.

ABSTRACT

EFFICACY OF PLANT RESISTANCE INDUCERS AGAINST SEPTORIA TRITICI BLOTCH AND THEIR INTERACTION WITH THREE BREAD WHEAT CULTIVARS

Plant resistance inducers (PRI) can constitute a solution to substitute partially or totally conventional fungicides to control plant diseases. In this context, the efficacy of fourteen PRI against *Zymoseptoria tritici* blotch of soft wheat was evaluated in laboratory and field conditions on three cultivars with different susceptibility levels. Results showed different protection efficacy levels for the PRI tested and highlighted PRI-cultivar interactions in both laboratory and field conditions. The study of the mode of action of three PRI revealed that their protection efficacy is linked to reductions of leaf colonization and fungal xylanase and glucanase activities. However, no association was observed between protection efficacy and induction of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities as well as expression of ten defense genes in the plant.

Keywords: Elicitors, *Zymoseptoria tritici*, efficacy, mode of action.

INTRODUCTION

La septoriose du blé, causée par *Mycosphaerella graminicola* (forme asexuée: *Zymoseptoria tritici*), est la maladie la plus fréquente sur cette culture. Son contrôle repose essentiellement sur l'utilisation des fongicides et des ressources variétales. Bien que la résistance variétale réduise significativement la pression parasitaire au champ, la lutte chimique reste aujourd'hui le moyen le plus utilisé pour lutter contre cette maladie. Dans le contexte environnemental actuel, visant à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires conventionnels en agriculture (Ecophyto 2018, ...), la recherche de nouvelles stratégies de lutte contre les maladies des plantes est fortement encouragée. L'utilisation des stimulateurs de défense des plantes (SDP) est une solution pouvant se substituer partiellement à la lutte chimique tout en permettant d'assurer une rentabilité optimale de la culture. Le mode d'action de ces produits diffère de celui des fongicides conventionnels car ils n'agissent pas directement sur le bio-agresseur, mais ils conduisent à son inhibition *via* la stimulation des réactions de défense de la plante. La présente étude vise à étudier l'interaction SDP-cultivar sur le pathosystème blé-septoriose. Après un criblage initial de quatorze SDP, reconnus ou revendiqués comme tel, sur trois génotypes de blé tendre présentant des niveaux de sensibilité différents à la maladie, l'efficacité et le mode d'action de trois d'entre eux ont été étudiés de façon plus approfondie.

MATERIELS ET METHODES

CULTIVARS ET SDP UTILISES ET CONDITIONS D'APPLICATION

Trois cultivars de blé tendre sont utilisés: Alixan (sensible), Premio (moyennement résistant) et Altigo (résistant). Les travaux ont été conduits en conditions de laboratoire (chambre de cultures ou serre) et de terrain (champ). L'inoculation artificielle au laboratoire a été effectuée avec la souche française de *M. graminicola*, T01193.

Au total, quatorze SDP ont été évalués sur les trois cultivars de blé en conditions de laboratoire pour leur efficacité de protection vis-à-vis de la septoriose. Pour des raisons de confidentialité, les produits ont été codés de FSOV1 à FSOV12 (Tableau I). Tous les produits ont été fournis par des sociétés privées et sont majoritairement en cours de développement. Le criblage initial a été réalisé au laboratoire avec deux doses : D1 (correspondant à la concentration d'une bouillie de 150 L/ha préparée sur la base de la dose/ha préconisée au champ) et D4 (ajustée pour apporter une quantité par feuille se rapprochant de la quantité de substance active reçue par feuille au champ dans le cadre d'une application à la dose/ha préconisée). Une dose intermédiaire, D2 ($=D1+D4/2$), a été utilisée lors des travaux ultérieurs pour quatre SDP sélectionnés (FSOV2, FSOV7, FSOV8 et FSOV10). Les SDP retenus pour l'étude du mode d'action (FSOV2, FSOV7, FSOV10) ont été testés avec D3 ($=D2+D4/2$), une dose intermédiaire entre D2 et D4. Pour les essais au champ, les SDP ont été appliqués à la dose préconisée par les fournisseurs dans les conditions du terrain (Tableau I).

Les essais au champ ont été réalisés sur trois années (2011, 2012 et 2013) avec les trois cultivars sur le site de Boigneville (Arvalis Institut du Végétal). Le choix des produits pour chaque année est basé sur les résultats de criblage en serre. Sept produits ont été testés en 2011 (FSOV1, FSOV2, FSOV6, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis et FSOV10), dix produits ou combinaisons de produits en 2012 (FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9, FSOV10, FSOV12, FSOV4+FSOV2 et FSOV4+FSOV10) et six produits ou combinaisons de produits en 2013 (FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7, FSOV8, FSOV10 et FSOV4+FSOV2Bis).

En complément, les produits FSOV7 (en 2011) et FSOV2Bis (en 2012 et 2013) ont été appliqués sur une trentaine de cultivars, afin de tester l'interaction SDP/génotype éventuelle sur un plus grand nombre de génotypes de blé. Les essais ont été reconduits chaque année sur les sites de Florimond Desprez (Cappelle-en-Pévèle), Limagrain (Verneuil l'Étang), RAGT (Prémèsques) et Syngenta (Orgerus). Pour chaque essai, le SDP a été appliqué seul au T1 dans le cadre d'une conduite fongicide dite « extensive » et comparé à une conduite « intensive » (résultats non détaillés).

Tableau I. SDP utilisés dans cette étude (*Resistance inducers used in this study*).

Produit	Nom commercial ou principe actif	Dose préconisée
FSOV1	Acibenzolar-S-Methyl (Bion®)	0,06 Kg/ha
FSOV2	Nutri-phite® Excel	3 L/ha
FSOV2Bis	LBG01F34®/Etonan®	2 L/ha
FSOV3	SDP de synthèse	1 L/ha
FSOV3Bis	SDP de synthèse	1 L/ha
FSOV4	Iodus® 2 Céréales	0,5 L/ha
FSOV6	SDP de synthèse	1 L/ha
FSOV7	Extrait de <i>Trichoderma harzanium</i>	5 L/ha
FSOV8	Extrait de microorganismes	6,75 L/ha
FSOV8Bis	Extraits de microorganismes	3,75 L/ha
FSOV9	Acides organiques	3 L/ha
FSOV10	Chitosan	15 L/ha
FSOV11	Extrait de fenugrec	1,5 kg/ha
FSOV12	Polysaccharides issus d'algues vertes	5 L/ha

ESSAIS DE PROTECTION

Le niveau de protection des SDP en conditions de la serre a été évalué sur des plantes de blé au stade quatrième feuille sortante, selon le protocole décrit par Siah *et al.* (2010a). Les produits ont été appliqués à l'aide d'un pulvérisateur manuel, 48h avant inoculation. Trois pots, organisés dans le cadre de 3 répétitions, de douze plantes chacun (36 plantes), ont été utilisés pour chaque modalité. Les essais de protection en conditions de chambre de cultures ont été réalisés sur des plantes de blé, selon les protocoles décrits par El-Chartouni *et al.* (2012) et Selim *et al.* (2014). L'efficacité (réduction des symptômes en valeur relative par rapport au témoin non traité) des produits sur les symptômes (% de surface foliaire avec nécroses ou chloroses) et la sporulation (densité de pycnides) a été mesurée sur la troisième feuille à 21 jours post-inoculation (jpi).

Les tests de protection au champ ont été réalisés dans le cadre d'essais d'évaluation de programme de protection fongicide sur la station expérimentale de Boigneville, en micro-parcelles de 21 m² (2m x 10,5m) organisées en 4 blocs de Fischer en 2011 et 2012 et en split-plot en 2013. Afin d'évaluer l'efficacité additionnelle apportée par les SDP, ceux-ci ont été intégrés dans un programme de traitements fongicides conventionnels à dose réduite, qualifié de référence basse, et comparés à trois modalités de programme de référence sans SDP: une référence haute (une pleine dose de Cherokee® (1,6 L/ha) en T1 (traitement 1) et une pleine dose de Viverda® (1 L/ha) en T2 (traitement 2), une référence intermédiaire (une pleine dose de Cherokee® au T1 et une demi-dose de Viverda® au T2) et une référence basse (une demi-dose de Cherokee® au T1 et une demi-dose de Viverda® au T2). Le T1 est appliqué au stade Z32-37 pour les années 2011 et 2012 et Z37 pour l'année 2013. Le T2 correspond au stade Z45-55 pour l'année 2012 et Z40 pour l'année 2013. Pour les modalités avec SDP, les produits ont été appliqués seuls au T0 (stade Z30) et en association avec Cherokee® demi-dose au T1. En 2011, seul le T1 a été appliqué (à la dose de 0.8 ou 1,6 L/ha de Cherokee®). Le T2 n'a pas été appliqué en raison de la trop faible pression de maladie due à la sécheresse de printemps. Lors de l'année 2012, la dose de Cherokee® a été ajustée à 0.7 ou 1,4 L/ha selon les modalités et Viverda® au T2 a été appliqué à 1 L/ha. En 2013, la dose de Cherokee® était de 0.8 ou 1.6 l/ha selon les modalités et Viverda® au T2 a été appliqué à 1L/ha également. L'intensité de la maladie a été estimée sur 4x15 plantes/modalité, toutes les une ou deux semaines, en estimant le pourcentage de surface foliaire malade sur les feuilles F1 (drapeau), F2 et F3. Le rendement (q/ha) a également été évalué pour chaque modalité.

CARACTERISATION DU MODE D'ACTION DES SDP

L'éventuel effet biocide des 14 SDP sur le champignon a été évalué *in vitro* selon Siah *et al.* (2010b). L'effet sur la germination des spores a été estimé sur des boîtes de Petri. L'effet sur la croissance mycélienne a été déterminé en microplaques de 96 puits. Cinq concentrations sont utilisées pour chaque produit, obtenues par dilutions successives de 3 fois à partir de la dose D1.

L'effet *in planta* des SDP sur la germination des spores, la pénétration des feuilles et la colonisation du mésophile a été estimé à 1, 5 et 21 jpi, respectivement, avec les méthodes décrites par Siah *et al.* (2010a). Trois segments foliaires issus de pots différents sont utilisés pour chaque modalité. Cent événements cytologiques sont comptés au microscope sur chaque segment pour déterminer les pourcentages de spores germées, de tubes germinatifs donnant lieu à un événement de pénétration (stomatique et direct), de cavités sous-stomatiques colonisées et de cavités sous-stomatiques colonisées avec pycnides.

L'effet des SDP sur les enzymes de dégradation des parois cellulaires (CWDE) produites *in planta* par le champignon (xylanases et glucanases) a été évalué à 1, 5, 11, 17 et 21 jpi. Les dosages ont été effectués selon les techniques décrites par Siah *et al.* (2010a) pour l'activité xylanase et Douaiher *et al.* (2007) pour l'activité glucanase. Une biomasse de 2,5 g de feuilles, issues de pots différents (serre), a été utilisée pour chaque modalité et pour chaque répétition.

L'induction des activités peroxydase (PO) et phénylalanine ammonia-lyase (PAL) par les SDP a été quantifiée sur les trois cultivars à 12, 24, 48, 60 et 72 heures après traitement (hat) selon les méthodes de Mitchell *et al.* (1994) pour la PO et Reglinski *et al.* (1994) pour la PAL. Trois feuilles issues de pots différents (chambre de cultures) sont utilisées pour chaque modalité.

Neuf gènes de défense ont été suivis à 12, 24, 48, 60 et 72 hat pour leur niveau d'expression après application des SDP: *pr1* (pathogenesis related protein1), *chit2* (chitinase 2), *gluc* (β -1,3-glucanase), *lox* (lipoxygénase), *aos* (alène oxyd synthase), *pal* (phénylalanine ammonia lyase), *chs* (chalcone synthase), *pox2* (peroxydase 2) et *oxo* (oxalate oxydase). Les codes d'accès GenBank pour ces gènes sont HQ848391, AB029935, DQ090946, U32428, AY196004, AY005474, AY286097, X85228 et AJ556991, respectivement. Les gènes de référence utilisés sont *tub6* (β -tubuline 6) et *gapdh* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) dont les codes d'accès GenBank sont U76897 et AF251217. Six feuilles issues de pots différents (chambre de cultures) sont utilisées pour chaque modalité.

ANALYSES DES DONNEES

Les expérimentations réalisées au laboratoire sont répétées au minimum deux fois dans le temps. Les résultats sont exprimés en calculant la moyenne entre ces répétitions. Deux modalités témoins sont incluses dans les essais : une modalité témoin non traitée inoculée (nTI) utilisée pour les tests de protection, les colorations cytologiques et pour les tests CWDE et une modalité témoin non traitée non inoculée (nTnl) utilisée pour les tests CWDE et d'induction des enzymes et gènes de défense.

L'effet biocide *in vitro* des SDP a été déterminé en calculant la concentration inhibant 50 % de la germination des spores ou de la croissance mycélienne (CI_{50}). Les notations phénotypiques au champ ont été synthétisées pour chaque modalité en calculant la moyenne des AUDPC (area under disease progress curve) pour les feuilles F1, F2 et F3. La comparaison des différentes modalités pour l'ensemble des paramètres a été réalisée avec le test ANOVA de Tukey à $P = 0,05$ avec le logiciel Xlstat et avec R pour les essais terrains, sauf pour les niveaux de sporulation qui ont été comparés avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis à $P = 0,05$. L'analyse des résultats obtenus au champ a été effectuée avec le test ANOVA de Tukey à l'aide du logiciel R. La corrélation entre les différents paramètres étudiés au laboratoire a été déterminée avec le test de corrélation de Spearman à l'aide de Xlstat.

RESULTATS

EFFICACITE DE PROTECTION DES SDP EN CONDITIONS DE LABORATOIRE

Aucun SDP n'a montré une efficacité significative avec la dose D4. En revanche, six produits (FSOV2, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9 et FSOV10) ont montré à des doses plus élevées des efficacités de protection significatives vis-à-vis de la septoriose, à la fois sur les symptômes et la sporulation. FSOV9 a présenté *in vitro* un effet biocide direct très élevé, avec des CI_{50} de 0,003 mL/L pour la germination des spores et 0,009 mL/L pour la croissance mycélienne. Ces doses étant nettement plus élevées que celles utilisées lors des essais de protection au laboratoire (20, 11 et 6 mL/L pour D1, D2 et D3, respectivement), ce produit a ainsi été écarté pour la suite des travaux. Pour les autres produits, FSOV8 et FSOV8Bis n'ont montré aucun effet biocide direct, alors que FSOV2 et FSOV7 ont présenté des effets faibles et très faibles, respectivement. FSOV3, FSOV3Bis et FSOV10 ont montré des effets relativement élevés avec la dose D1. FSOV1 a malgré tout été conservé pour la suite de l'étude en raison de sa faible activité directe à D2 et D3 (résultats non présentés).

Afin de vérifier l'effet dose sur l'efficacité des SDP, les produits FSOV2, FSOV7, FSOV8 et FSOV10 ont été criblés avec trois doses décroissantes (D1, D2 et D3) sur les trois cultivars, avec l'utilisation d'une référence fongicide conventionnelle (Opus®). Les résultats ont mis en évidence un effet dose pour les quatre produits ainsi que pour le fongicide utilisé (Tableau II). La dose D1 a été la plus efficace sur les trois cultivars, alors que la dose D3 a été la moins efficace. La dose D2 a présenté des efficacités intermédiaires sur les trois cultivars. Le produit FSOV8 a présenté des niveaux d'efficacité avec D1 moins importantes que lors des essais préliminaires. Cela pourrait-être dû au lot ou au manque de stabilité biochimique du produit, dans la mesure où ce produit est d'origine naturelle.

Tableau II. Pourcentage de réduction des symptômes en serre sur les trois cultivars après traitement avec le fongicide Opus®, FSOV2, FSOV7, FSOV8 et FSOV10 à D1, D2 et D3. (*Percentage of symptom reductions in greenhouse on three cultivars after treatment with the fungicide Opus®, FSOV2, FSOV7, FSOV8 and FSOV10 at doses D1, D2 et D3*).

	Alixan			Pemio			Altigo		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Opus®	99	93	7	99	86	13	99	99	20
FSOV2	79	63	2	73	67	9	15	38	10
FSOV7	96	94	8	96	93	34	97	95	25
FSOV8	0	18	0	27	3	12	39	14	0
FSOV10	70	20	0	88	40	6	44	38	12

EFFICACITE DE PROTECTION DES SDP AU CHAMP

En 2011, la pression septoriose a été faible à l'échelle nationale. Peu de différences ont ainsi pu être observées entre les différentes modalités testées. Seul FSOV10, sur le cultivar Alixan, a induit une efficacité significativement supérieure à celle de la référence basse¹.

En 2012, la pression de la maladie a été significative sur les trois cultivars. En considérant l'ensemble des cultivars, en particulier l'AUDPC sur l'étage foliaire F2, mais également le rendement, seule la combinaison FSOV2+FSOV4 s'est statistiquement distinguée de la référence basse¹. En revanche, FSOV2, FSOV7, FSOV8Bis et FSOV10+FSOV4, appliqués également en association avec les fongicides, ont présenté des niveaux de rendement statistiquement supérieurs à la référence basse sur le cultivar Alixan uniquement. FSOV2Bis, FSOV4 et FSOV9, appliqués seuls (sans être associés à un traitement

¹ Les SDP sont intégrés dans un programme de traitement qualifié de référence basse pour évaluer leur effet additionnel.

conventionnel), n'ont produit aucune efficacité. Pour l'année 2012, le dispositif expérimental mis en place n'était pas adapté pour tester statistiquement l'interaction génotype-SDP.

FSOV7 ayant par ailleurs (hors du cadre de ce projet) obtenus des résultats insuffisants, FSOV2Bis a été rétenu pour les essais réalisés en 2012. FSOV2bis était en effet le seul SDP parmi les SDP d'intérêt à pouvoir être utilisé sans autorisation de distribution pour expérimentation. Il a donc été appliqué sur un plus grand nombre de cultivars : aucune interaction SDP-cultivar significative n'a été observée. Seules des différences entre les conduites culturales extensive et intensive ont été détectée (résultats non présentés).

En 2013, la pression septoriose a été significative et a permis d'évaluer l'efficacité des SDP sur chacun des cultivars et de tester l'interaction SDP-cultivar. Les données AUDPC pour les trois dernières feuilles, mais également date par date pour chacune des feuilles, ont été traitées en split-plot. Les résultats ont mis en évidence des effets « cultivar » et « traitement » significatifs pour la plupart des variables analysées. Pour mieux apprécier la structure des interactions, les taux de réduction de l'AUDPC de chaque SDP par rapport à la référence basse ont été calculés pour chaque variété et pour chaque étage foliaire (Tableau III).

Tableau III. Variation de l'AUDPC au champ sur les différents étages foliaires et du rendement (Rdt) en % par rapport à la référence basse (en gras et grisé les réductions significatives à $P = 0,05$ et en gras les augmentations significatives à $P = 0,05$). (AUDPC variation at the field scale on different leaf layers and yield (Rdt) in % relative to the "reference basse". In fat-gray significant reductions at $P = 0.05$ and in fat significant increases at $P = 0.05$).

		FSOV2	FSOV2Bis	FSOV7	FSOV8	FSOV10	FSOV2Bis + FSOV4
Alixan	F1	-11	+8	-2	+2	-30	+44
	F2	-10	-3	+2	+5	-31	+18
	F3	-25	-28	-17	+4	-34	-8
	Rdt	+1,5	+1,1	-0,8	+0,9	+2,0	-1,1
Premio	F1	-25	-22	-9	-2	-36	+67
	F2	-23	-12	-36	-8	-39	-8
	F3	0	+1	-23	-5	-25	-9
	Rdt	+1,9	+1,5	+1,2	-0,1	+0,8	+0,6
Altigo	F1	-47	-34	-49	-34	-71	-4
	F2	-27	-28	-35	-18	-46	-16
	F3	-21	-18	-24	-20	-34	-15
	Rdt	+1,0	+1,7	+1,8	+1,6	+2,3	+0,5

Dans l'ensemble, le cultivar Altigo a présenté la plus forte réponse aux SDP, suivie d'Alixan puis Premio (Tableau III). Pour ce qui est des produits, FSOV10 a été le plus régulier sur l'efficacité par rapport à la référence basse, particulièrement sur Altigo et Alixan. L'association FSOV2Bis + FSOV4 n'a présenté aucune efficacité significative sur les trois cultivars (Tableaux III).

Les efficacités de FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7 et FSOV8 semblent pour une part cultivar-dépendantes (Tableau III). Sur l'étage foliaire F1, ces quatre produits apportent une protection significative par rapport à la référence basse uniquement sur Altigo. Ce résultat indique, dans les conditions du champ, la présence d'interactions SDP-cultivar entre ces produits et les cultivars utilisés. Aucun effet marqué des SDP sur le rendement n'a été constaté.

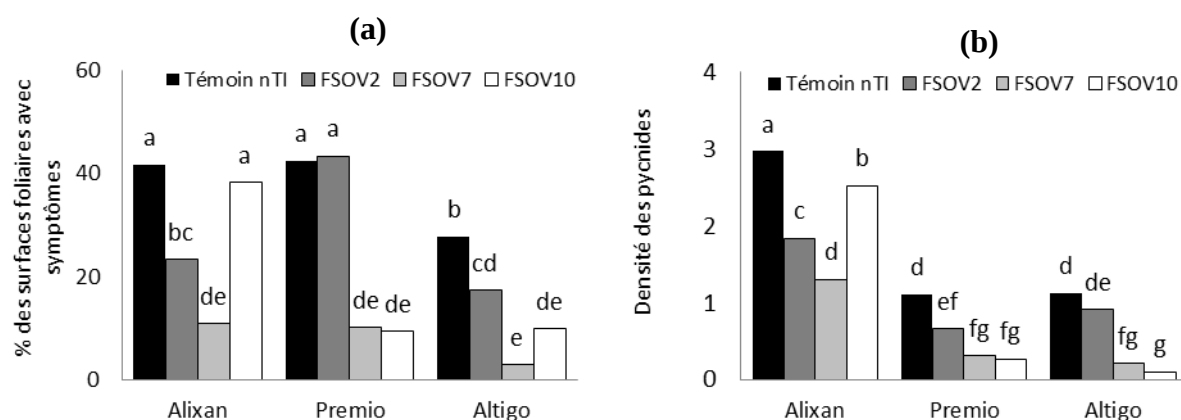
Pour les quatre expérimentations de 2013 réalisées avec FSOV2Bis sur un plus grand nombre de cultivars, la pression de maladie a été particulièrement faible et/ou tardive. La protection fongicide appliquée au T2 avec Viverda 1 L/ha semble avoir « lissé » les effets potentiels de la protection SDP appliquée au T0 et en association au T1.

Les efficacités observées en conditions contrôlées à des stades jeunes de la céréale et dans les conditions du champ au stade adulte ne sont pas corrélées, sans qu'il soit possible d'en définir les causes précises. Notons que dans le cas des résistances variétales à *Zimoseptoria tritici* les observations au stade jeune et au stade adulte ne sont pas corrélées.

CARACTERISATION DES INTERACTIONS SDP-CULTIVAR DANS LES CONDITIONS DE LA SERRE

Après les travaux de criblage, trois SDP (FSOV2, FSOV7 et FSOV10) sont sélectionnés et étudiés avec la dose D3 pour leur interaction avec les trois cultivars et pour leurs modes d'action. Dans les conditions de serre, FSOV7 a significativement réduit la maladie (symptômes et sporulation) sur les trois cultivars, alors que FSOV2 l'a nettement réduit sur seulement Alixan et Altigo et FSOV10 sur seulement Premio et Altigo (Figure 1). Ces résultats valide la présence d'interactions SDP-cultivar entre certains SDP et génotypes de blé étudiés et confirme de surcroit que l'efficacité observée pour FSOV10 à la dose utilisée est due à un effet de stimulation des défenses de la plante et non pas à un effet direct sur le champignon. Les trois produits présentent globalement des effets comparables sur les symptômes et la sporulation (Figure 1). Ces observations ne sont pas entièrement cohérentes avec les données acquises au champ. On observe par exemple une réduction de symptômes au champ pour FSOV10 sur toutes les variétés que l'on ne confirme pas en conditions de serre.

Figure 1. Efficacité de protection en serre de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur les symptômes (a) et la sporulation (b) à 21 jpi sur les trois cultivars. Les moyennes taguées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Tukey à $P = 0.05$. (*Protection efficacy in the greenhouse of FSOV2, FSOV7 and FSOV10 on symptoms (a) and sporulation (b) at 21 dpi on the three cultivars. Averages tagged with common letter are not significantly different according to the Tukey test at $P=0.05$.*)



L'EFFICACITE DE PROTECTION EST LIEE A LA COLONISATION, MAIS PAS A LA GERMINATION ET LA PENETRATION

Aucun produit n'a montré *in planta* d'effet direct sur la germination des spores, à l'exception de FSOV10 qui a légèrement réduit le taux de spores germées sur Premio et Altigo (Tableau IV). Ce résultat corrobore l'effet biocide partiel décelé *in vitro* pour ce produit. Logiquement aucune corrélation entre la germination des spores et l'efficacité de protection n'a été détectée ($r = 0,13$). Par ailleurs, la pénétration des feuilles par le champignon a été influencée par les produits. Le taux de pénétration (%SGP) a été significativement diminué par FSOV2 et FSOV7 sur Alixan et par FSOV10 sur Premio (Tableau IV), mais ces diminutions ne présentent pas de corrélation avec l'efficacité de protection ($r = 0,36$). Concernant la colonisation (% CC) des tissus foliaires, un effet marqué sur celle-ci a été observé chez les trois cultivars pour au moins un des produits : FSOV7 (Tableau IV). Dans l'ensemble, les niveaux de protection les plus élevés correspondent aux niveaux de colonisation les plus faibles (Figure 1, Tableau IV). L'analyse de corrélation a confirmé cette tendance et a montré une forte association entre le taux de colonisation et l'efficacité de protection ($r = 0,81$). Notez également que le taux de

colonisation des cavités stomatiques avec pycnides n'est pas étroitement corrélée au taux de colonisation des cavités stomatiques. La formation des pycnides semble par exemple plus lente sur Altigo que sur les deux autres variétés même en l'absence de traitement.

Tableau IV. Effet de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur le processus infectieux du champignon sur les trois cultivars. Les moyennes d'une même colonne taguées avec une lettre commune se sont pas significativement différentes avec le test de Tukey à $P = 0.05$. (*FSOV2, FSOV7 and FSOV10 effect on the infectious process of the fungus on the three cultivars. Averages from the same column tagged with common letter are not significantly different according to the Tukey test at $P=0.05$*).

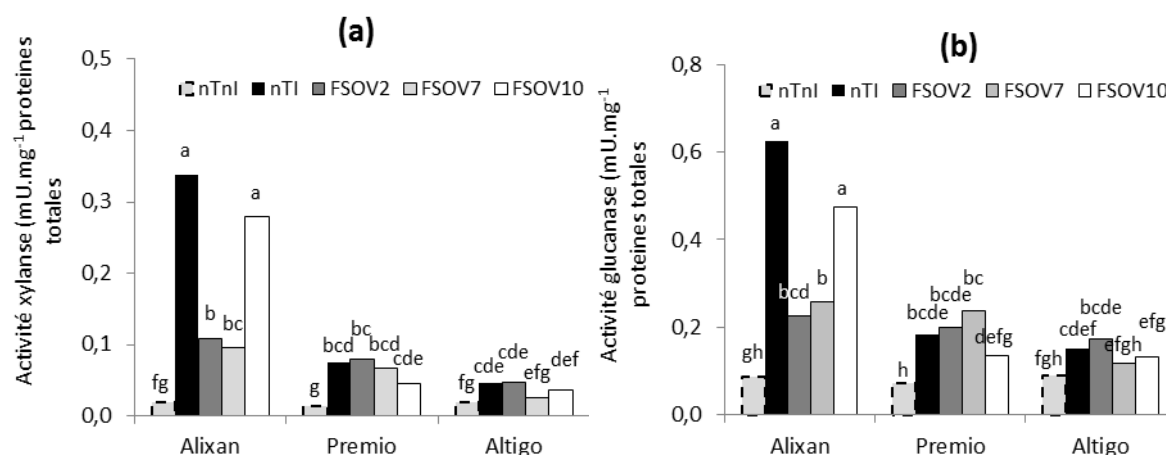
		% SG	% SGP	% CC	% CCP
Alixan	nTI	69 ^{abc}	53 ^{ab}	79 ^a	19 ^{abc}
	FSOV2	72 ^{ab}	35 ^{cd}	77 ^{ab}	12 ^{abc}
	FSOV7	73 ^a	33 ^{cd}	55 ^{bcd}	13 ^{abc}
	FSOV10	59 ^{abc}	41 ^{abcd}	76 ^{abc}	25 ^a
Premio	nTI	71 ^{ab}	55 ^a	72 ^{abc}	24 ^{ab}
	FSOV2	58 ^{abc}	44 ^{abc}	68 ^{abc}	13 ^{abc}
	FSOV7	66 ^{abc}	44 ^{abc}	31 ^{ef}	4 ^c
	FSOV10	53 ^c	38 ^{bcd}	33 ^{def}	7 ^{bc}
Altigo	nTI	73 ^a	39 ^{abcd}	73 ^{abc}	5 ^c
	FSOV2	68 ^{abc}	53 ^{ab}	53 ^{cde}	4 ^c
	FSOV7	70 ^{abc}	33 ^{cd}	28 ^f	4 ^c
	FSOV10	55 ^{bc}	25 ^d	40 ^{def}	3 ^c

SG: spores germées; SGP: spores germées donnant lieu à un événement de pénétration; CC: cavités stomatiques colonisées; CCP: cavités stomatiques colonisées avec pycnides; nTI, témoin non traité inoculé.

L'EFFICACITE DE PROTECTION EST LIEE A LA REDUCTION DES ACTIVITES CWDE FONGIQUES

L'impact des SDP sur les activités xylanase et glucanase du champignon a été étudié sur les trois cultivars. La production de ces activités sur les témoins non traités inoculés débute à 17 jpi, au moment du basculement du parasite vers la phase nécrotrophe (résultats non présentés). Le taux de ces activités augmente ensuite jusqu'à 21 jpi, avec une cinétique qui coïncide avec la sporulation. Une production marquée de ces activités a été obtenue seulement sur Alixan (Figure 2), due probablement à son niveau de sensibilité et donc de sporulation plus élevé. Seuls les produits efficaces (FSOV2 et FSOV7) ont réduit les activités sur ce cultivar (Figure 1, Figure 2). Une corrélation élevée entre la réduction de ces activités et l'efficacité de protection, en particulier sur la sporulation, a été mise en évidence ($r = 0,64$ pour l'activité xylanase et $r = 0,72$ pour l'activité glucanase).

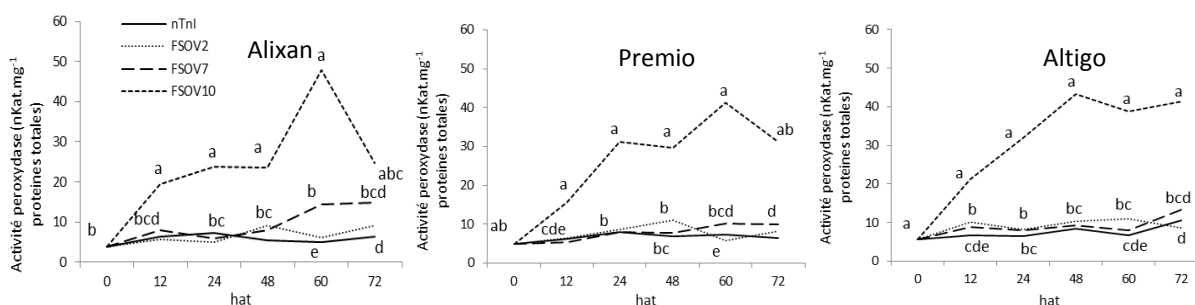
Figure 2. Effet de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur les activités xylanase (a) et glucanase (b) à 21 jpi sur les trois cultivars. nTnl : témoin non traité non inoculé. nTI : témoin non traité inoculé. Les moyennes marquées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey à $P = 0.05$. (*FSOV2, FSOV7, et FSOV10 effect on xylanase (a) and glucanase (b) activities at 21 dpi on the three cultivars. nTnl : untreated and non inoculated control. nTI : untreated and inoculated control. Averages tagged with common letter are not significantly different according to the Tukey test at $P=0.05$*).



LES ACTIVITES PO ET PAL NE SONT PAS CORRELEES AVEC L'EFFICACITE DE PROTECTION

L'induction de la PO et la PAL par les trois SDP a été suivie lors des premières heures après traitement, en conditions non inoculées. Seul FSOV10 a induit la PO (Figure 3). L'induction de cette activité prend effet de façon très précoce, dès 12 heures après traitement (hat). Toutefois, aucune corrélation n'a été obtenue entre l'induction de cette activité et l'efficacité de protection. Pour la PAL, FSOV10 est également le SDP qui a induit les quantités les plus élevées de cette enzyme. Comme pour la PO, aucune association entre l'induction de la PAL et l'efficacité de protection n'a été observée (résultats non présentés).

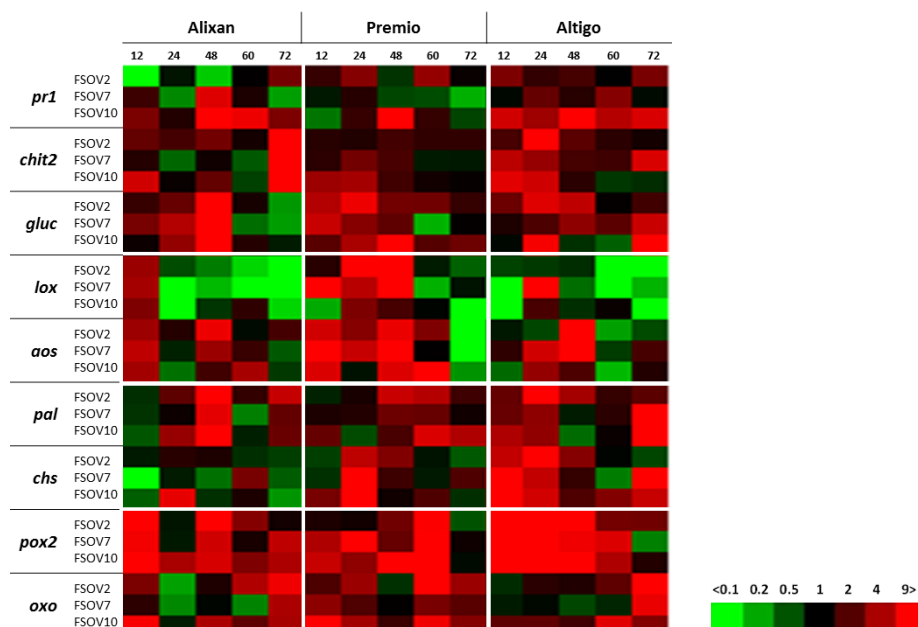
Figure 3. Induction de l'activité peroxydase (PO) chez les trois cultivars après traitement avec FSOV2, FSOV7 et FSOV10 en conditions non inoculées. nTnl, témoin non traité non inoculé. Les moyennes par hat marquées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey à $P = 0.05$. (*Induction peroxydase (PO) activity on the three cultivars after treatment with FSOV2, FSOV7 and FSOV10 in non-inoculated conditions. nTnl, untreated non inoculated control. Averages from hat tagged with common letter are not significantly different according to the Tukey test at $P=0.05$.*)



LES NIVEAUX D'INDUCTION DES DIX GENES DE DEFENSE NE SONT PAS CORRELEES AVEC L'EFFICACITE DE PROTECTION

Tous les produits ont induit l'expression des gènes étudiés sur les trois cultivars, mais le niveau d'expression, ainsi que le moment de l'induction, dépendent grandement du produit et du cultivar considéré (Figure 4). Les profils d'expression des gènes *pox2* et *pal* (codant pour une PO et une PAL, respectivement) ne semblent pas suivre les profils d'activité enzymatique obtenus pour la PO et la PAL (Figure 3, Figure 4). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la PO et la PAL sont des activités enzymatiques déterminées par plusieurs gènes, dont l'expression globale est mesurée par le dosage d'activé. Alors que dans le cadre de ce travail, l'expression d'un seul gène a été étudiée. Par ailleurs, aucune liaison entre le profil d'expression des gènes et l'efficacité de protection ne peut être constatée (Figure 1, Figure 4).

Figure 4. Expression relative des neuf gènes de défense étudiés sur Alixan, Premio et Altigo après traitement avec FSOV2, FSOV7 et FSOV10 en conditions non inoculées. Les chiffres indiquent l'heure après traitement. (*Relative expression of nine defense genes studied on Alixan, Premio and Altigo after treatment with FSOV2, FSOV7 and FSOV10 in non inoculated conditions. Numbers indicate timing after treatment*).



DISCUSSION

Ce projet a permis d'étudier pour la première fois le fonctionnement des SDP sur le pathosystème blé-septoriose. Sur les quatorze SDP criblés en conditions de laboratoire sur les trois cultivars, seuls six présentent des efficacités significatives, et dose-dépendantes, vis-à-vis de la maladie. Certains produits ont été écartés de l'étude à cause de leur forte activité biocide directe, comme FSOV9, qui a présenté un niveau d'effet direct comparable à celui des fongicides conventionnels. Une irrégularité d'efficacité a été observée pour certains produits, comme FSOV8, due probablement à son principe actif d'origine naturelle, potentiellement instable. Au champ, aucun SDP appliqué seul n'a montré une quelconque efficacité. Seuls ceux associés à un traitement fongicide ont parfois apporté un complément d'efficacité, mais le plus souvent non significatif statistiquement.

Les résultats ont décelé des interactions SDP-cultivar significatives à la fois en serre et au champ. En serre, ces interactions ont été marquées pour FSOV2 et FSOV10, alors qu'au champ, elles l'ont été pour FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7 et FSOV8 principalement sur l'étage foliaire F1. Ces résultats soulignent l'importance du choix variétal pour évaluer l'activité de nouveaux candidats ou pour lutter contre la septoriose du blé.

CONCLUSION

La caractérisation du mode d'action de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 a montré que l'efficacité de ces produits est fortement corrélée à certains paramètres caractérisant le développement du champignon comme la colonisation du mésophile, la sporulation et la production de CWDE (xylanases, glucanases et protéases). En revanche, l'efficacité de ces SDP en contexte non infectieux ne semble pas être associée, ni à l'éllicitation des activités PO et PAL, ni à l'expression des gènes *pr1*, *chit2*, *gluc*, *lox*, *aos*, *pal*, *chs*, *pox2* et *oxo* chez le blé. L'absence d'activité biocide directe associée à une efficacité *in planta* pour FSOV2 et FSOV7 à D3 suggère cependant que leur efficacité est due à une stimulation de réactions de défense de la plante qu'il reste à caractériser. Pour FSOV10, son efficacité pourrait être liée à un double

effet (direct et indirect), susceptible d'expliquer les résultats plus réguliers observés au champ sous certaines conditions. Les travaux engagés sur ce pathosystème ont permis de souligner la complexité des interactions en jeu et invite à une caractérisation complémentaire du mode d'action des trois produits sélectionnés pour identifier les voies de défense associées à leur efficacité.

REMERCIEMENTS

Ces travaux sont réalisés dans le cadre du projet FSOV SDP-Septo, cofinancé par le groupement national interprofessionnel des semences et plants (GNIS), France.

BIBLIOGRAPHIE

El-Chartouni L., Randoux B., Duyme F., Renard-Merlier D., Tisserant B., Bourdon N., Pillon V., Sanssené J., Durand R., Reignault Ph. and Halama P. (2012). Correlation of cytological and biochemical parameters with resistance and tolerance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Plant Biology*, 14, 11-21.

Douaiher M.N., Nowak E., Dumortier V., Durand R., Reignault P., Halama P., (2007) *Mycosphaerella graminicola* produces a range of cell wall-degrading enzyme activities *in vitro* that vary with the carbon source. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 71-79.

Mitchell H.J., Hall J.L., Barber M.S. (1994) Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology*, 104, 551-556.

Reglinski T., Lyon G.D., Newton A.C. (1994) Assessment of the ability of yeast-derived elicitors to control barley powdery mildew in field. *New Phytologist*, 101, 1-10.

Selim S., Roisin-Fichter C., Andry J.B., Bogdanow B. and Sambou R. (2014) Real-time PCR to study the effect of timing and persistence of fungicide application and wheat varietal resistance on *Mycosphaerella graminicola* and its sterol 14 α -demethylation-inhibitor-resistant genotypes. *Pest Management Science*, 70, 60-69.

Siah A., Deweer C., Duyme F., Sanssené J., Durand R., Halama P., Reignault Ph. (2010a). Correlation of *in planta* endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology*, 59, 661-670.

Siah A., Deweer C., Morand E., Reignault Ph., Halama P. (2010b) Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection*, 29, 737-743.