

Ramularia collo-cygni – un nouveau champignon pathogène de l’orge

Peter Frei et Katia Gindro

Agroscope, Institut des sciences en production végétale IPV, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Peter Frei, e-mail: peter.frei@agroscope.admin.ch



Forte attaque de *Ramularia collo-cygni* sur orge de printemps (variété Célika).

Introduction

Au nord des Alpes, les grillures de l’orge sont signalées dès le début des années 90 et depuis lors ne cessent de gagner du terrain. Les symptômes foliaires apparaissent d’abord comme des petites taches nécrotiques de quelques millimètres de diamètre sur les feuilles les plus exposées à la lumière, au moment de l’épiaison (BBCH51) et après la floraison de la culture (>BBCH61). Si les condi-

tions climatiques s’y prêtent, et notamment lors d’alternance d’épisodes très ensoleillés et couverts, ces nécroses peuvent s’étendre très rapidement sur toute la surface foliaire, en provoquant la sénescence précoce de la feuille et la perte de ses fonctions photosynthétiques et métaboliques. Ce développement drastique des nécroses foliaires entraîne des chutes de rendement, sur le plan quantitatif et qualitatif, pouvant dépasser 20%.

Pendant longtemps, les grillures foliaires des céréales ont été imputées à des troubles d’ordre physiologique. A la fin du 19^e siècle, Cavara (Cavara 1892) décrit un nouveau champignon présent dans les nécroses foliaires de cultures d’orge du nord de l’Italie, qu’il nomme *Ophiocladium hordei*. Dès 1986, la présence de ce champignon est mentionnée en Suisse, puis dans tous les pays du nord des Alpes. Entre temps, *Ophiocladium hordei* a changé de nom pour s’appeler désormais *Ramularia collo-cygni*.

Les grillures de l’orge sont principalement causées par *Ramularia collo-cygni* qui produit une molécule phytotoxique, la rubelline D (Miethbauer *et al.* 2003). Mais elles peuvent aussi être dues à des stress physiologiques liés aux conditions climatiques. Il reste toutefois difficile d’attribuer la formation des nécroses à des stress biotiques ou abiotiques en l’absence de sporulation du champignon.

Depuis 2002, les grillures ont un statut officiel de maladie, assorti d’un seuil d’intervention à l’apparition des premières nécroses visibles sur les trois dernières feuilles. Le chlorothalonil a été le premier fongicide homologué en Suisse en 2003 contre les grillures. Ce contexte a motivé Agroscope à entamer des recherches afin de mieux comprendre la biologie, l’épidémiologie et la transmission de cette maladie, ou encore son implication avec des nécroses d’origine physiologique.

Résultats

Grillures physiologiques et pathologiques

Grillures dues à *Ramularia collo-cygni*

Les recherches effectuées ont déjà livré certaines données sur la biologie et le cycle de vie de *Ramularia collo-cygni* (fig. 1). Toutefois, certains points restent encore à

élucider. Ce champignon peut être considéré comme un endophyte qui se développe de façon asymptomatique dans la plante hôte. L'éventail de ses plantes hôtes est vaste et ne cesse de s'agrandir. Les principales cultures touchées sont les céréales, l'orge, le blé, le triticale, l'avoine et le maïs (Huss 2008), ainsi que de nombreuses autres graminées telles que l'orge des rats (*Hordeum murium*), le chiendent (*Agropyron repens*), le raygrass (*Lolium* sp.), le pâturin (*Poa* sp.) et l'agrostis jouet-du-vent (*Apera spica-venti*). Des essais d'infections artificielles en conditions contrôlées ont montré qu'une même souche de *R. collo-cygni* peut infecter un grand nombre de plantes hôtes différentes, sans montrer de préférence particulière.

Les premiers symptômes sur l'orge apparaissent sur les feuilles exposées à la lumière entre l'épiaison et la fin de la floraison. Par temps humide, le champignon produit des spores en abondance sur la face inférieure des feuilles, sous forme de petites touffes blanches de conidophores émergeant des stomates et ne portant chacun qu'une seule spore. Au niveau microscopique, les conidophores ont la forme d'un cou de cygne, particularité qui a donné son nom au champignon (*collo-cygni* = cou de cygne). Les spores peuvent alors infecter d'autres plantes. Seule cette étape de sporulation permet d'attribuer avec certitude les symptômes de grillure à la présence du champignon. En cas de fortes attaques, des taches peuvent aussi être observées sur les barbes, les

Résumé Les grillures constituent une menace pour la culture de l'orge et mènent à d'importantes pertes de rendement sur le plan quantitatif et qualitatif. Ces symptômes peuvent être dus à un stress d'ordre physiologique, mais avant tout à la présence du champignon *Ramularia collo-cygni*. En l'absence de sporulation, ces deux types de nécrose foliaire sont pratiquement impossibles à distinguer. Afin de combattre ce pathogène, Agroscope a lancé une vaste étude pour mieux connaître sa biologie. Le champignon a été suivi par analyse moléculaire depuis les stades les plus précoces de la culture, ce qui a permis d'établir qu'il pouvait être transmis par les graines. De nouvelles formes de dissémination ont également été découvertes, dont le rôle doit encore être précisé dans l'épidémiologie et la survie du champignon. Des essais fongicides ont été réalisés avec différentes stratégies d'application. Ils ont montré que, en l'absence d'autres maladies foliaires dans la culture, un seul traitement à partir du stade BBCH37 suffit pour combattre efficacement les grillures de l'orge.

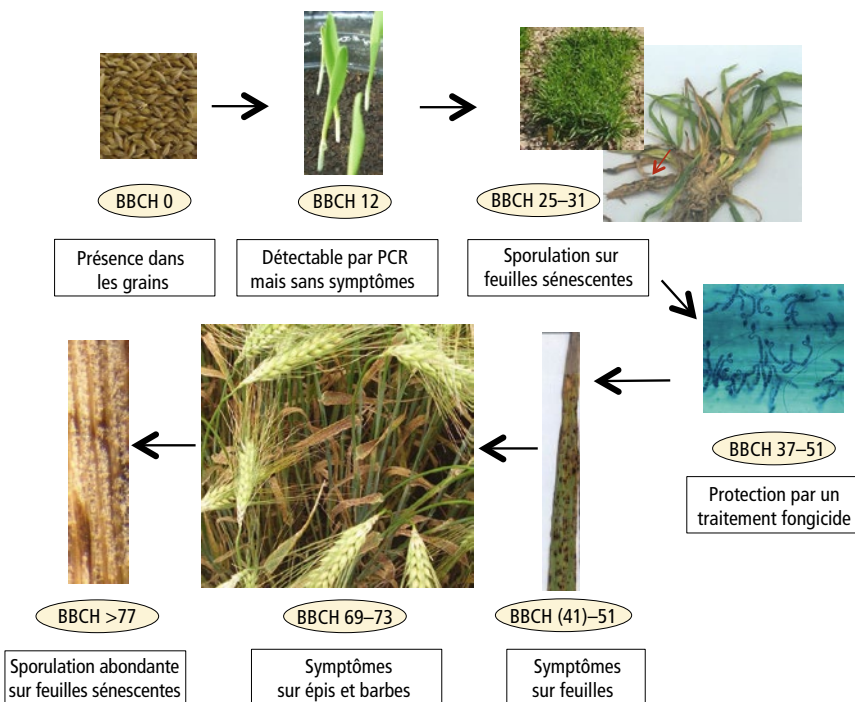


Figure 1 | Cycle de développement de *Ramularia collo-cygni* selon Walters modifié (Walters et al. 2008).

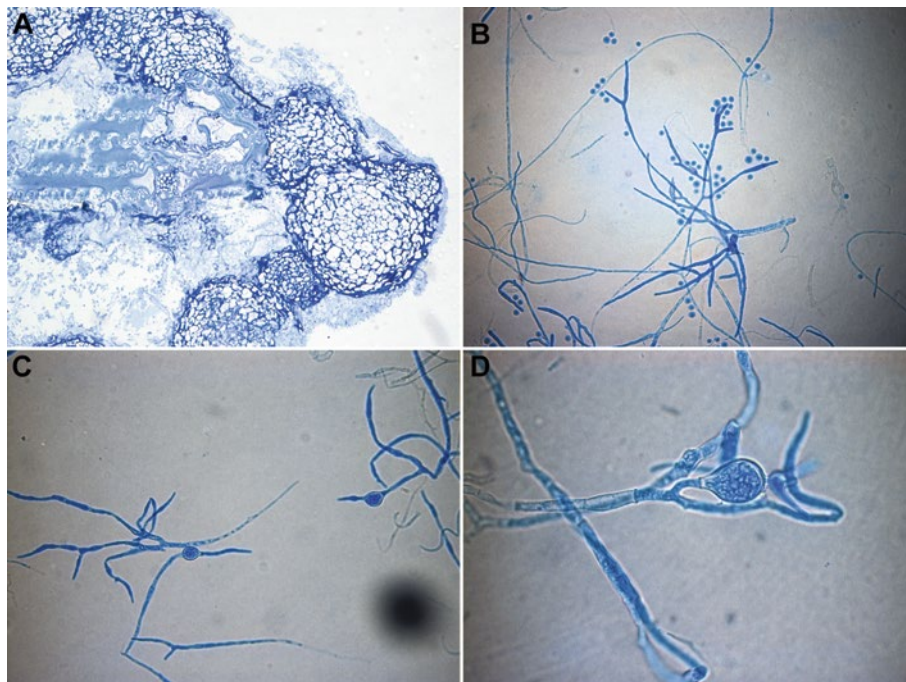


Figure 2 | Structures de dissémination de *Ramularia collo-cygni* produites sur milieu nutritif gélosé. A. Sclérotés (20–40 µm). B. Microconidies (2 µm) portées par des microconidiophores. C. Chlamydospores (6–10 µm). D. Détail de C.

graines et les gaines des feuilles au niveau de la tige. Dans de plus rares cas, les premières taches peuvent être observées sur les feuilles sénescentes à la base des plantes au printemps, aux stades fin de tallage et redressement (BBCH25 à BBCH32). Dans ce cas, ces taches sporulantes sont légèrement rougeâtres, ce qui permet d'éviter toute confusion avec les symptômes d'autres maladies connues de l'orge, telles que l'helminthosporiose (*Pyrenophora teres*), la rynchosporiose (*Rhynchosporium secalis*) et l'oïdium (*Erysiphe graminis*). Des outils moléculaires ont été adaptés pour détecter très précocement le champignon, avant même que les symptômes apparaissent (Havis *et al.* 2006; Frei *et al.* 2007). Les plantules peuvent être contaminées soit par des spores pro-

duites en automne, soit par la graine, ce qui a été démontré et confirmé en laboratoire. L'ADN du champignon a été détecté en effet dans le péricarpe, le corps farineux et l'embryon des graines. Ce fait signifierait que le champignon peut se développer en même temps que la graine germe, en colonisant progressivement les tissus de la plante au fur et à mesure que la plantule se développe. Le mycélium de *R. collo-cygni* est intercellulaire et ne détruit pas les cellules de la plante hôte. La nécrotisation de la feuille est principalement due aux toxines photodynamiques produites par le champignon. Ces molécules de la famille des rubellines (Miethbauer *et al.* 2003), une fois activées par la lumière, détruisent les membranes cellulaires. Ce

Tableau 1 | Fongicides utilisés dans les essais de traitement de l'orge contre *Ramularia collo-cygni*

Produit	Dose / ha	Matière active	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Bravo 500	1,5 l	Chlorothalonil 41,0 % (500g/l)	X						
Proline	0,8 l	Prothioconazole 25,0 % (250 g/l)	X	X	X	X	X		
Opera	1,75 l	Pyraclostrobin 12,5 % (133g/l) Epoxiconazol 4,7 % (50g/l)	X	X	X	X	X	X	X
Cherokee	2,5 l	Propiconazol 5,17 % (62,5 g/l) Cyproconazol 4,13 % (50,0 g/l) Chlorothalonil 31,0 % (375 g/l)		X					
Aviator Xpro	1,25 l	Bixafen 7,5 % (75 g/l) Prothioconazole 15,0 % (150 g/l)			X				
Bell	1,5 l	Boscalid 20,8 % (233 g/l) Epoxiconazole 6,0 % (67 g/l)	X					X	X

Tableau 2 | Rendements relatifs des essais sur orge menés à Goumoëns-la-Ville entre 2007 et 2013 selon différentes stratégies de lutte contre *Ramularia collo-cygni* (non traité = 100 %)

	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013	
	traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH	
Produit dose	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51
Proline 0,8 l/ha	138	129	120	128	106	110	106	110	116	114				
Opera 1,75 l/ha	119	131	110	122	107	104	107	104	115	111	131	120	119	117
Bell 1,5 l/ha	129	129									123	121	120	117
Bravo 1,5 l/ha	120	112												
Cherokee 2,5 l/ha			119	122										
Aviator Xpro 1,25 l/ha					99	104								

Cellules bleu clair: augmentation statistiquement significative du rendement.

processus explique pourquoi les feuilles du haut, plus exposées à la lumière, sont les premières à présenter les symptômes typiques de taches nécrotiques brunes de quelques millimètres, oblongues et cerclées de jaune.

R. collo-cygni est difficile à isoler car cette opération n’est possible que lors de la sporulation du champignon. Les cultures mycéliennes se font essentiellement sur des milieux nutritifs gélosés tels que le PDA (*Potato Dextrose Agar*), ou sur SBA (*Straw Bran Agar*, paille et son de blé), pour la production de spores. Des observations microscopiques effectuées sur de vieilles

cultures en milieu PDA ont montré que le champignon peut produire différents types de spores telles que des chlamydo-spores, des conidies et des microconidies (fig. 2) considérées comme rares (Salamati et Raitan 2006). Sur SBA, il est possible d’observer la formation de très nombreux sclérotés de petite dimension (100 à 300 µm). Le rôle de ces différentes propagules dans le cycle épidémiologique de *R. collo-cygni* reste encore à élucider. De même, il se pourrait que les microconidies jouent le rôle de spermatie dans la formation de la structure sexuée du champignon, mais cela reste encore à démontrer.

Tableau 3 | Rendements relatifs des essais sur orge menés à Changins entre 2007 et 2013 selon différentes stratégies de lutte contre *Ramularia collo-cygni* (non traité = 100 %). Les essais 2007 et 2013 n’ont pas été récoltés à cause des conditions climatiques défavorables

	2008		2009		2010		2011		2012	
	traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH		traitement BBCH	
Produit dose	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51	37–41	45–51
Proline 0,8 l/ha	136	133	103	108	105	108	103	108		
Opera 1,75 l/ha	124	126	103	103	101	108	105	108	109	106
Bell 1,5 l/ha									100	101
Bravo 1,5 l/ha										
Cherokee 2,5 l/ha	132	135								
Aviator Xpro 1,25 l/ha			107	103						

Cellules bleu clair: augmentation statistiquement significative du rendement.

Tableau 4 | Taux d'attaque des maladies foliaires de l'orge dans les parcelles non traitées des essais sur orge à Changins (CHA) et Goumoëns-la-Ville (GIV) de 2007 à 2013 selon différentes stratégies de lutte contre *Ramularia collo-cygni*

Année	Lieu	Rhynchosporiose	Helminthosporiose	Grillures
2007	CHA	---	---	---
	GIV	Faible	Forte	Forte
2008	CHA	Très faible	Très faible	Forte
	GIV	Très faible	Très faible	Forte
2009	CHA	Très faible	Très faible	Faible
	GIV	Très faible	Très faible	Faible
2010	CHA	Très faible	Très faible	Faible
	GIV	Très faible	Très faible	Faible
2011	CHA	Très faible	Très faible	Faible
	GIV	Très faible	Très faible	Faible
2012	CHA	Très faible	Très faible	Faible
	GIV	Très faible	Très faible	Faible
2013	CHA	Très forte	Faible	Forte
	GIV	Très forte	Faible	Faible

Grillures d'origine physiologique PLS

Les taches physiologiques, aussi appelées taches de pollen, ont longtemps passé pour la cause principale du dessèchement des feuilles. Les PLS (*Physiological leaf spots*) sont des taches d'origine physiologique, ce qui signifie qu'aucun microorganisme n'est impliqué dans le développement des symptômes (Obst et al. 1995); Wu et v. Tiedemann 2002). Ces derniers peuvent être observés lors de brusques alternances entre temps couvert et fort rayonnement solaire. Durant ces rapides transitions climatiques, les stomates ne s'ouvrent pas instantanément, ce qui provoque l'accumulation très rapide de radicaux libres (radicaux d'oxygène = ROS) phytotoxiques (Obst et al. 1995).

Ces molécules, en détruisant les membranes des cellules, provoquent ainsi des nécroses sur les feuilles exposées. L'interaction des ROS et des rubellines produites par *R. collo-cygni* mène à une déstructuration progressive des membranes et de l'intégrité cellulaires, et ainsi à la réduction drastique de la capacité photosynthétique des feuilles (Miethbauer et al. 2003).

Lutte contre les grillures

Sensibilité variétale

Pour le moment, aucune différence de sensibilité n'a été décrite entre les variétés d'orge de printemps et d'orge d'automne. Le seul changement observé est la période

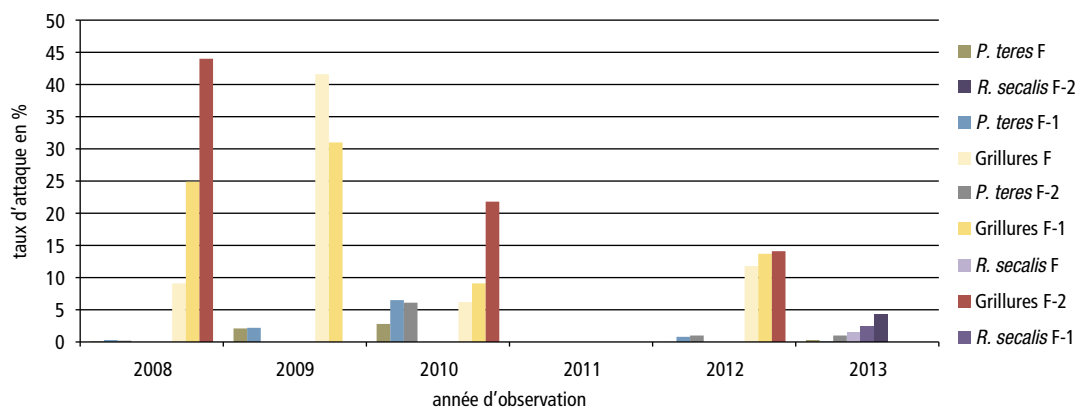


Figure 3 | Taux d'attaque, moyenne en % de la surface foliaire atteinte de 50 feuilles par étage foliaire des différentes maladies foliaires de l'orge dans les essais non traités à Changins (BBCH 69-73). *P. teres*: *Pyrenophora teres* (helminthosporiose); *R. secalis*: *Rhynchosporium secalis* (rhynchosporiose); grillures: *Ramularia collo-cygni* (ramulariose). F: feuille étendard; F-1: deuxième feuille; F-2: troisième feuille.

d’apparition des grillures, liée à la précocité des variétés. Les grillures apparaissent toujours à la fin de la floraison, et se manifestent ainsi plus tôt chez les variétés hâtives. Une trentaine de variétés européennes d’orge de printemps et d’automne ont été semées chaque année (2006–2009) sur différents sites de cinq pays européens, l’Allemagne, l’Autriche, le Danemark, l’Ecosse et la Suisse, dont deux sites en Suisse romande (Nyon et Goumoëns-la-Ville). Vu la grande différence de précocité entre les variétés, ces essais ont été contrôlés trois fois durant la période de culture (BBCH51, 69 et 83). La synthèse des observations (BBCH 51 à BBCH 83) montre que toutes les variétés sont plus ou moins sensibles aux grillures causées par *R. collo-cygni*.

Essais fongicides

Dans le cadre des essais d’homologation d’Agroscope (2007 à 2013), deux programmes de traitement ont été évalués. Une première série a été traitée au stade BBCH37 (apparition de la feuille étendard) ou au seuil d’intervention défini pour les maladies foliaires (apparition des premières grillures sur les trois dernières feuilles); une autre série a été traitée à partir du stade BBCH45 (gonflement de la gaine de la feuille étendard), en privilégiant le positionnement d’un unique traitement à la limite du dernier stade autorisé BBCH51 (début épiaison, barbes apparentes). Chaque année, des essais randomisés (4 répétitions par procédé, variété Plaisant) ont été menés sur les domaines d’Agroscope à Changins (CHA) et Goumoëns-la-Ville (GIV). Les par-

celles d’une surface de 9 m² ont été traitées au pulvérisateur à dos (300 l/ha) avec les produits présentés dans le tableau 1. Un suivi épidémiologique a été effectué chaque année dans les parcelles non traitées et les résultats publiés sur le site www.agrometeo.ch, rubrique grandes cultures / orge.

Deux essais ont dû être abandonnés à Changins à la suite d’une forte attaque du virus de la jaunisse nani-sante (2007) et de la tempête de grêle du 21 juin 2013. Sur les sept années d’expérimentation, cinq essais de Goumoëns-la-Ville ont fourni des rendements significativement supérieurs au témoin non traité, avec un gain maximal de 38 % en 2007 (tabl. 2). À Changins en revanche, le rendement n’a été amélioré par le traitement qu’une seule fois, et de peu, en 2008 (tabl. 3). Ces résultats s’expliquent par la pression des différentes maladies foliaires de l’orge, résumées dans le tableau 4, et par le taux de grillures présent dans les essais (fig. 3 et 4).

Conclusions

En dépit des nouvelles connaissances acquises sur la biologie et l’épidémiologie de *Ramularia collo-cygni*, ainsi que des outils moléculaires développés pour détecter très tôt le pathogène, plusieurs questions restent encore ouvertes pour assurer une lutte plus ciblée. Cela importe d’autant plus que la transmission peut se faire d’une culture à l’autre par la semence et que le champignon est présent dans l’embryon de façon latente. Les facteurs

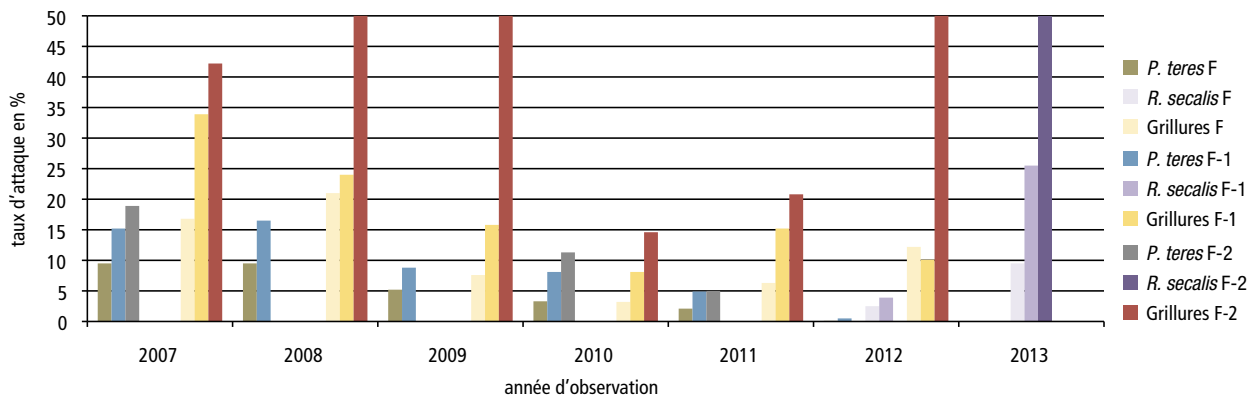


Figure 4 | Taux d’attaque, moyenne en % de la surface foliaire atteinte de 50 feuilles par étage foliaire des différentes maladies foliaires de l’orge dans les parcelles non traitées à Goumoëns-la-Ville (BBCH 69-73). *P. teres*: *Pyrenophora teres* (helminthosporiose); *R. secalis*: *Rhynchosporium secalis* (rynchosporiose); grillures: *Ramularia collo-cygni* (ramulariose) et PLS (physiological leaf spots). F: feuille étendard; F-1: deuxième feuille; F-2: troisième feuille.

physiologiques qui ont permis le passage de l'état d'endophyte à l'état de pathogène ne sont pas connus mais ont été déterminants pour la propagation du champignon et ses conséquences sur les rendements. Une étude en Allemagne a montré que *R. collo-cygni* était déjà présent dans les semences en 1960 (Hess M., communication personnelle). De même, le rôle exact de la toxine produite par le champignon, notamment dans sa virulence sur l'orge, doit encore être élucidé.

En ce qui concerne la lutte, les fongicides autorisés mis à disposition sont efficaces. Les essais d'Agroscope ont montré qu'une seule application après le stade

BBCH37 suffit en général à limiter le développement du champignon. Si la parcelle n'est pas atteinte avant le stade BBCH37 par des attaques massives de rhynchosporiose, helminthosporiose, oïdium ou rouille naine, cet unique traitement qui protège la feuille étendard s'avère efficace. Quand la pression de ces maladies est importante avant le stade BBCH37, un traitement spécifique est alors conseillé. ■

Riassunto

Ramularia collo-cygni, un nuovo patogeno fungino dell'orzo

Essendo causa di cali significativi di resa, sia sul piano quantitativo che qualitativo, le bruciature fogliari rappresentano una seria minaccia per le colture di orzo. Benché gli stessi sintomi possano anche essere dovuti a uno stato di stress di natura fisiologica, le cause sono da ricercare in primo luogo nella presenza del fungo *Ramularia collo-cygni*. In mancanza della sporulazione, tuttavia, è praticamente impossibile distinguere tra questi due tipi di necrosi fogliare. Per combattere questo patogeno, Agroscope ha avviato un ampio studio volto ad approfondire le conoscenze sulla sua biologia. Grazie a un monitoraggio del fungo fin dalle primissime fasi della coltivazione per mezzo di un esame genetico-molecolare, è stato possibile scoprire che la trasmissione può avvenire attraverso i semi. Sono state poi individuate anche altre modalità di diffusione, pur restando ancora da chiarire quale ruolo svolgano sul piano epidemiologico e della sopravvivenza del fungo. Una serie di test fungicidi, realizzati mettendo in atto differenti strategie d'applicazione, ha dimostrato che, in assenza di altre malattie fogliari nella coltivazione, un unico trattamento a partire dalla fase BBCH37 è del tutto sufficiente per risolvere con efficacia il problema delle bruciature fogliari dell'orzo.

Summary

Ramularia collo-cygni, a new pathogenic fungus of barley

Leaf spot constitutes a threat to barley cultivation, leading to significant quantitative and qualitative yield losses. Although these symptoms can be due to physiological stress, they are primarily caused by infestation with the *Ramularia collo-cygni* fungus. In the absence of sporulation, these two types of leaf necrosis are practically impossible to tell apart. In order to control the pathogen *Ramularia collo-cygni*, Agroscope has launched a major study to learn more about its biology. The fungus was monitored by molecular analysis from the earliest stages of cultivation, allowing us to ascertain that it can be transmitted by seed. New forms of transmission of the disease have also been discovered whose roles in the epidemiology and survival of the fungus have yet to be determined. Fungicide trials have been conducted with different application strategies. These have shown that, in the absence of other leaf diseases in the crop, a single treatment from the BBCH 37 (flag-leaf) stage onwards is sufficient for the effective control of barley leaf spot.

Key words: *Ramularia collo-cygni*, biology, barley, fungicides.

Bibliographie

- Cavara F., 1892. Ueber einige parasitische Pilze auf dem Getreide. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* **III**, 16–25.
- Frei P., Gindro K. G., Richter H. & Schürch S., 2007. Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barley necrotic leaf spots. *Journal of Phytopathology* **155**, 281–8.
- Havis N., Oxley S. J. P., Piper S. R. & Langrell S. R. H., 2006. Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiology Letters* **256**, 217–23.
- Huss H., 2008. Die Sprenkelkrankheit nun auch auf Mais. *Der Pflanzenarzt* **11–12**, 6–7.
- Miethbauer S., Heiser I. & Liebermann B., 2003. The phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni* produces Biologically active Rubellins on infected barely leaves. *Journal of Phytopathology* **151**, 665–8.
- Obst A., Baumer M. & Huber G., 1995. Nichtparasitär bedingte Blattverbräunungen bei Gerste- ein Problem mit zunehmender Bedeutung. *Gesunde Pflanzen* **74**, 308–14.
- Salamati S. & Raitan L., 2006. *Ramularia collo-cygni* on spring barley, an overview of its biology and epidemiology. Proceedings, 1 European *Ramularia* Workshop Göttingen, 19–35.
- Walters D., Havis N. & Oxley S. P., 2008. *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. *FEMS Microbiology Letters* **279**, 1–8.
- Wu Y-X & von Tiedemann A., 2002. Evidence for oxidative stress involved in physiological leaf spot formation in winter and spring barley. *Phytopathology* **145**, 145–55.