

Fusariose du maïs: évaluation de la sensibilité des variétés cultivées en Suisse

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

Renseignements: Stéphanie Schürch, e-mail : stephanie.schuerch@agroscope.admin.ch



Epi de maïs inoculé avec *Fusarium graminearum*: évaluation de l'étendue des symptômes de fusariose dans le cadre d'une étude de la sensibilité variétale. (Photo: Carole Parodi)

Introduction

Sur maïs, la fusariose des épis est une maladie fongique causée par plusieurs espèces de champignons du genre *Fusarium*. Cette maladie a des répercussions quantitatives et qualitatives sur la récolte de maïs-grain. Si les grains infectés sont petits et légers, ils seront perdus au battage, ce qui implique une perte de rendement. Si ces grains sont suffisamment gros pour être récoltés, les toxines produites par *Fusarium* sp. contaminent la récolte et réduisent sa qualité. Ces toxines ont des conséquences néfastes sur la santé des animaux qui les ingèrent. Ces effets, tels qu'affaiblissement du système immunitaire ou baisse de la fertilité, varient selon la dose ingérée et le type de système digestif. Les analyses

de maïs-grain conduites annuellement par swissgranum et Agroscope révèlent régulièrement des échantillons trop fortement contaminés pour être affouragés sans risque aux porcs (l'espèce la plus sensible).

La sévérité des attaques de fusariose et l'étendue de la contamination en mycotoxines est influencée par plusieurs facteurs qui peuvent être illustrés à l'aide du triangle épidémiologique (fig. 1). Les conditions climatiques de la floraison à la récolte jouent un rôle prépondérant. Cette forte influence du climat est confirmée par les fluctuations interannuelles des contaminations en mycotoxines révélées par les enquêtes mentionnées ci-dessus. Selon une vaste étude conduite par Arvalis Institut du végétal, une date de récolte tardive augmente le risque de contamination (Druesne 2006). Les attaques de pyrale, en blessant les tissus végétaux, facilitent les infections fongiques.

La fusariose n'est pas causée par une unique espèce de champignon, mais par une grande diversité d'espèces (Dorn *et al.* 2009). En effet, un inventaire conduit en Suisse pendant quatre ans a révélé la présence d'au moins 16 espèces de *Fusarium* sur maïs-grain. *Fusarium graminearum* et *F. verticillioïdes* sont les plus fréquemment rencontrées. Les *Fusarium* ne produisent pas tous le même spectre de toxines. Ainsi, *F. graminearum* produit essentiellement du déoxynivalénol (DON) et de la zéaralénone (ZEA), alors que *F. verticillioïdes* synthétise des fumonisines (FUM). La pression de maladie va également être influencée par la quantité d'inoculum présent sur la parcelle ou à ses abords. Les pathogènes survivent sur les pailles qui seront plus ou moins décomposées selon leur degré de broyage, le travail du sol et la fréquence du maïs et du blé dans la rotation. Les souches de *F. graminearum* peuvent infecter indifféremment le blé ou le maïs.

Le troisième acteur du triangle est la plante-hôte. Ses caractéristiques génétiques peuvent influencer la résistance opposée aux attaques des pathogènes. La résistance à *F. graminearum* et à *F. verticillioïdes* est héritée quantitativement (p. ex. Martin *et al.* 2012) et les différents travaux conduits à ce sujet montrent que cette résistance est un levier de lutte intéressant (Mesterhazy *et al.* 2012). Les sélectionneurs sont attentifs à ce caractère et testent leurs lignées et leurs hybrides soit

dans des lieux favorisant les infections, soit par inoculations artificielles. Les différences de sensibilité entre hybrides peuvent être importantes et il serait judicieux d'utiliser les plus résistants pour gérer le risque de fusariose et de contamination en mycotoxines en production commerciale.

En Suisse, les variétés recommandées par l'interprofession pour la production de maïs-grain subissent un examen poussé prenant en compte différents critères tels que le rendement, la précocité, la qualité et la résistance à la verse ainsi qu'à certaines maladies (Hiltbrunner *et al.* 2015). Toutefois, la sensibilité à la fusariose de l'épi n'était jusqu'à présent pas évaluée. Le but des travaux présentés dans cet article était de mettre au point une méthode d'inoculation artificielle permettant d'obtenir une évaluation reproductible et fiable de la résistance à la fusariose des variétés commercialisées en Suisse.

Les infections naturelles sont généralement d'une sévérité trop faible et trop hétérogène, notamment quant aux espèces de *Fusarium* impliquées, pour permettre une évaluation efficace de la sensibilité variétale. Il existe différentes façons de mettre en contact le pathogène et son hôte. Pour cette recherche, deux techniques d'inoculation ont été initialement utilisées. La première consiste à injecter une suspension de spores dans le canal des soies des épis en floraison. Elle mime ainsi l'infection naturelle par les soies. La deuxième technique repose sur la blessure de quelques grains au centre de l'épi avec des pointes métalliques trempées dans une suspension de spores. Elle mime de cette manière les infections faisant suite à une blessure des grains par des insectes foreurs comme la pyrale du maïs par exemple. Dans un premier temps, la reproductibilité de la méthodologie (variabilité interannuelle) et le lien entre les symptômes visibles et les teneurs en mycotoxines ont été testés. Dans un deuxième temps, les variétés figurant sur la liste recommandée ou en voie d'inscription ont été évaluées.

Matériel et méthodes

Souches du pathogène et préparation de l'inoculum

Pour les inoculations, douze souches monospores de *F. graminearum* et six souches de *F. verticillioides* isolées de maïs suisse ont été sélectionnées (tabl. 1). Les souches ont été identifiées sur la base de leurs structures de sporulation. L'appartenance à l'espèce *graminearum* a été confirmée par observation morphologique des macroconidies issues de sporodochies produites sur Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) avec papier filtre et par séquençage d'un fragment du gène EF-1 α (O'Donnell *et al.* 1998). La virulence de

Résumé ■ La fusariose du maïs réduit la quantité et la qualité de la récolte de grain. Les mycotoxines produites par les pathogènes fongiques impliqués menacent la santé des animaux affouragés. Un des facteurs influençant la sévérité de la maladie et la teneur en toxines – et donc un levier de lutte potentiel – est le niveau de résistance de la variété cultivée. Les travaux présentés ici visaient à établir une méthodologie permettant d'évaluer cette résistance et de l'utiliser ensuite pour tester les hybrides de maïs-grain cultivés en Suisse. Une méthode procédant par inoculation artificielle des épis lors de la floraison pendant au minimum trois ans d'essai a permis d'identifier des variétés très sensibles, peu sensibles et intermédiaires. Ce classement est un outil que les maïsiculteurs peuvent utiliser lors du choix variétal pour gérer le risque de fusariose et de contamination en mycotoxines.

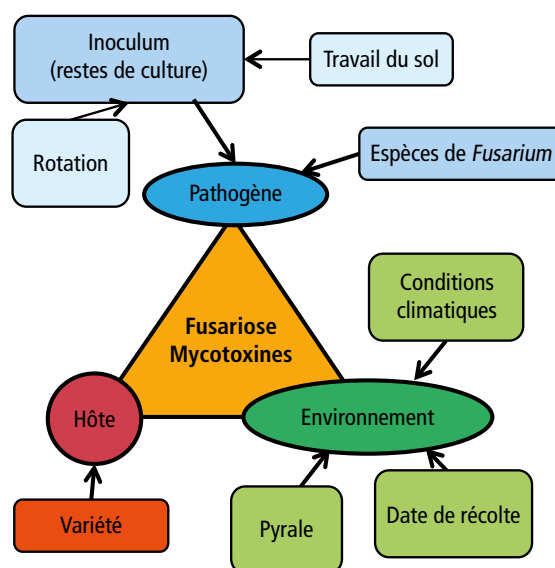


Figure 1 | De nombreux facteurs influencent potentiellement la sévérité de la fusariose sur épi ainsi que la teneur en mycotoxines du maïs.

Tableau 1 | Souches de *Fusarium* sp. utilisées pour les inoculations artificielles

N°	Espèce	N° mycothèque ¹	N° isolement	Hôte	Année	Provenance
1	<i>F. graminearum</i>	1145	127.4	blé	1992	Ependes VD
2	<i>F. graminearum</i>	1146	127.5	blé	1992	Ependes VD
3	<i>F. graminearum</i>	1147	128.1	blé	1992	Ependes VD
4	<i>F. graminearum</i>	1148	128.2	blé	1992	Ependes VD
5	<i>F. graminearum</i>	1149	129.4	blé	1992	Ependes VD
6	<i>F. graminearum</i>	1150	129.5	blé	1992	Ependes VD
7	<i>F. graminearum</i>	1151	71b3	maïs	2005	Baden AG
8	<i>F. graminearum</i>	1152	71b4	maïs	2005	Baden AG
9	<i>F. graminearum</i>	1153	82b2	maïs	2005	Baden AG
10	<i>F. graminearum</i>	1154	82b5	maïs	2005	Baden AG
11	<i>F. graminearum</i>	1155	10a2b3	maïs	2005	Baden AG
12	<i>F. graminearum</i>	1156	10a2b4	maïs	2005	Baden AG
13	<i>F. verticillioides</i>	1159	Fv07I1	maïs	2007	Goumoëns VD
14	<i>F. verticillioides</i>	1160	Fv07J3	maïs	2007	Goumoëns VD
15	<i>F. verticillioides</i>	1157	Fv07G3	maïs	2007	Goumoëns VD
16	<i>F. verticillioides</i>	1158	Fv07E1	maïs	2007	Goumoëns VD
17	<i>F. verticillioides</i>		verti3	maïs	2006	Goumoëns VD
18	<i>F. verticillioides</i>	1135	verti4	maïs	2006	Goumoëns VD

¹Numéro attribué à la souche dans la base de données Mycoscope disponible sous <http://mycoscope.bcis.ch>.

chacune des souches a été vérifiée par inoculation dans le canal des soies et dans les grains sur les variétés Aurélia, Birko, Goldenso, LG22.22 et Meribel cultivées en serre. Les souches sont conservées à 4 °C dans du potato dextrose broth (PDB) concentré à ¼. Les macroconidies nécessaires aux inoculations ont été produites en cultivant les souches dans un milieu liquide à base de carboxyméthylcellulose (CMC) selon la méthode de Cappellini et Peterson (1965). Les cultures ont été incubées à 24 °C avec 16 h de lumière et 8 h de nuit à 60–80% d'humidité sous agitation pendant environ sept jours. Après filtration à travers deux couches de tulle et détermination de la concentration à l'aide d'une cellule de numération jetable, une suspension (mélange des souches en concentration identique) à la concentration finale de 5 x 10⁵ spores/ml a été préparée dans de l'eau distillée stérile et conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

Hôte

Les premiers tests ont été effectués sur un set de variétés de maïs couramment cultivées. Sur la base des résultats de sensibilité obtenus, des variétés témoins ont été sélectionnées; les variétés déjà inscrites sur la liste recommandée et celles en voie d'inscription ayant passé la première année de test ont été incluses dans les essais. Chaque variété a été semée sur deux lignes de 6,7 m avec

quatre répétitions. L'itinéraire technique était identique à celui appliqué aux essais variétaux.

Techniques d'inoculation

Pour les inoculations dans le canal des soies (fig. 2A), 1,5 ml de suspension de spores a été injectée en dessus de la pointe de l'épi à l'aide d'une seringue automatique 5 à 7 jours après l'apparition des soies (floraison femelle). Les inoculations dans les grains (fig. 2B), ont été effectuées entre le stade aqueux et le début du stade laiteux 10 à 15 jours après l'apparition des soies. Les plantes inoculées étaient marquées avec un ruban plastique rouge. C'est à ces stades de développement précis que les différences de sensibilité entre hybrides sont les plus importantes. A maturité, les épis ont été dégagés des spathes et l'étendue des symptômes a été notée sur une échelle de 1 (aucun symptôme) à 7 (76–100% de la surface de l'épi atteinte) développée par Reid *et al.* (1996).

Mise en valeur

Les différences de sensibilité variétale ont été explorées avec des analyses de variance (ANOVA) effectuées à l'aide d'XLSTAT 2014. Les variétés ont été évaluées entre 2008 et 2014 sur un minimum de trois ans. Pour tenir compte de la variabilité interannuelle, la note moyenne obtenue par chaque variété a été divisée par la note

moyenne des deux variétés témoins, Birko et Severo. Cet index est ensuite multiplié par la note moyenne des deux témoins sur sept ans afin d'obtenir une note sur une échelle de 1 à 7.

Analyses des mycotoxines

En 2006, 2008 et 2009, les épis ont été battus et réduits en farine avec un moulin de laboratoire (Cyclotec 1093, Foss, Danemark) équipé d'une grille de 0,8 mm. La teneur en DON et en FUM (seulement 2009) des farines a été quantifiée à l'aide d'un test immuno-enzymatique (RIDASCREEN® FAST, R-Biopharm, Allemagne) selon les indications du fabricant. Pour environ 80 échantillons de l'essai 2006, les teneurs en DON et en ZEA ont été mesurées par HPLC (Gynkotech UVD 340S, Dionex, Suisse) après extraction des toxines avec un mélange de solvants (acétonitrile / H₂O, 84 / 16, v/v).

Résultats et discussion

Sévérité de la fusariose

Suite aux inoculations avec *F. graminearum* dans le canal des soies, la sévérité de la fusariose était significativement différente entre les 15 variétés testées pendant les années 2008 à 2010, ($F_{14, 2093} = 56,1$; $p < 0,0001$; fig. 3). La sévérité était plus élevée suite aux inoculations dans les grains avec ce même pathogène (fig. 4) et là aussi l'effet de la

variété était significatif ($F_{14, 1673} = 46,7$; $p < 0,0001$). Par contre, cette même technique d'inoculation utilisée avec *F. verticillioides* a généré des symptômes nettement moins sévères (fig. 5). Les différences entre variétés étaient moins fortes, mais néanmoins significatives ($F_{14, 1597} = 19,4$; $p < 0,0001$). *F. verticillioides* est généralement considéré comme un pathogène moins agressif que *F. graminearum* (p. ex. Reid *et al.* 2002). Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que les variétés cultivées en Suisse se distinguent au niveau de leur sensibilité variétale à la fusariose. Le facteur «variété» expliquait une part significative de la variabilité observée, mais les différences entre années d'essai étaient également significatives. Ceci indique que malgré des inoculations étroitement contrôlées au niveau du stade d'inoculation, de la quantité d'inoculum et de l'espèce de *Fusarium*, l'impact des conditions climatiques sur le développement du pathogène et sur la résistance des variétés joue un rôle important. En conséquence, pour obtenir une évaluation reproductible de la sensibilité d'une variété, celle-ci doit être testée pendant au moins trois ans.

Mycotoxines

Les teneurs en mycotoxines mesurées suite aux inoculations étaient très élevées par rapport à celles observées suite à des infections naturelles. Les teneurs en DON étaient fortement corrélées à la sévérité de la fusariose >

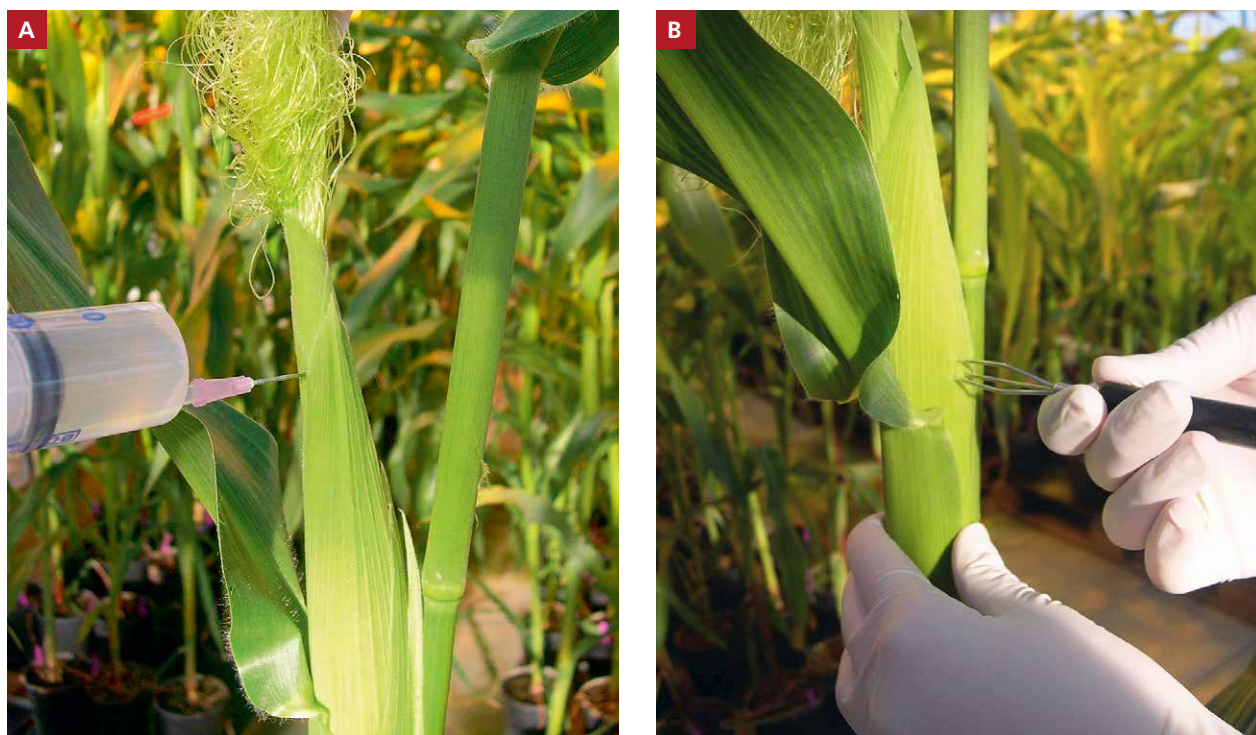


Figure 2 | Inoculations des épis de maïs par injection d'une suspension de spores dans le canal des soies (A) ou par perforation des grains à l'aide de pointes métalliques préalablement immergées dans la suspension (B). (Photo: Fabio Mascher, Agroscope)

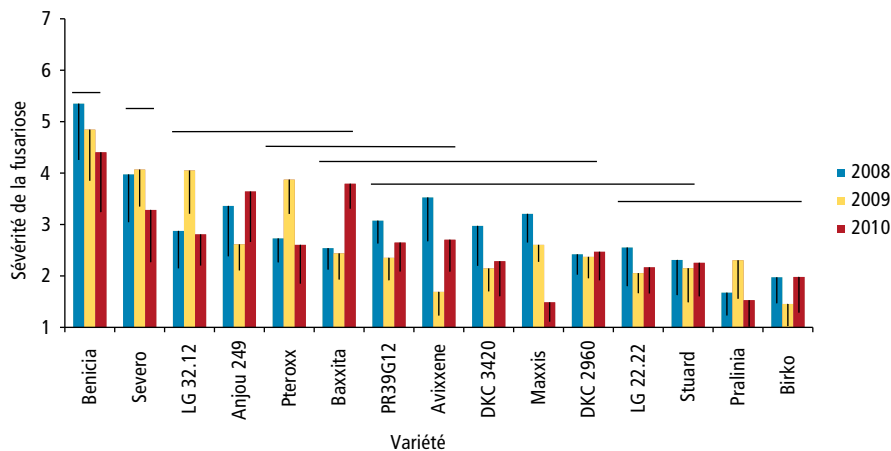


Figure 3 | Sévérité de la fusariose de 15 variétés de maïs-grain inoculé avec *F. graminearum* dans le canal des soies en 2008, 2009 et 2010 (moyenne et erreur type; les moyennes jointes par une même ligne horizontale ne sont pas significativement différentes).

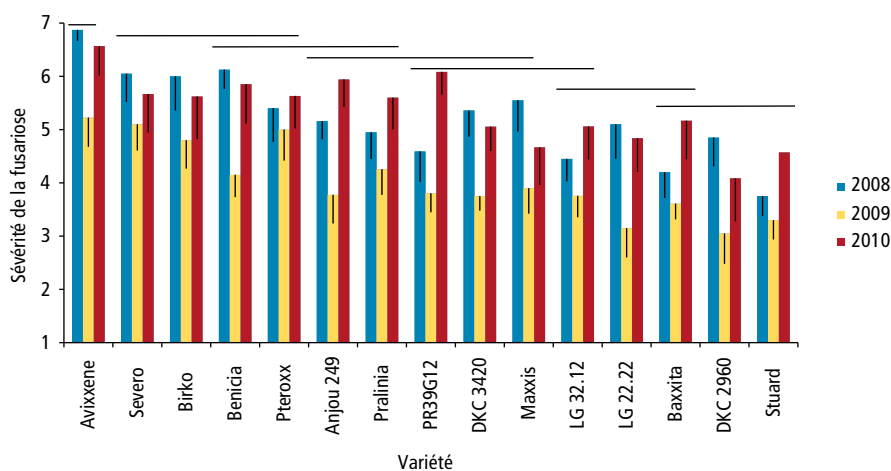


Figure 4 | Sévérité de la fusariose de 15 variétés de maïs-grain inoculé avec *F. graminearum* dans les grains en 2008, 2009 et 2010 (moyenne et erreur type; les moyennes jointes par une même ligne horizontale ne sont pas significativement différentes).

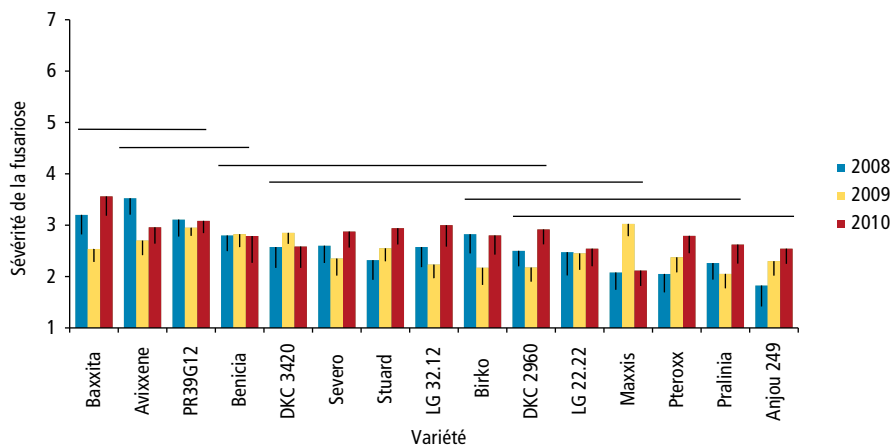


Figure 5 | Sévérité de la fusariose de 15 variétés de maïs-grain inoculé avec *F. verticillioides* dans les grains en 2008, 2009 et 2010 (moyenne et erreur type; les moyennes jointes par une même ligne horizontale ne sont pas significativement différentes).

(inoculation dans les grains: en 2006: $R^2 = 0,54$; 2008: $R^2 = 0,85$; 2009: $R^2 = 0,77$; inoculation dans le canal des soies: 2006: $R^2 = 0,81$; 2008: $R^2 = 0,78$; 2009: $R^2 = 0,70$; fig. 6). Pour les épis inoculés avec *F. verticillioides*, les teneurs en FUM étaient moins fortement corrélées aux notes de fusariose (2009: $R^2 = 0,3$), probablement aussi parce que la fourchette d'expression des symptômes était plus étroite que pour les autres procédés. Suite aux inoculations avec *F. graminearum*, les teneurs en DON et en ZEA étaient significativement corrélées (fig. 7). Les fortes corrélations observées ont montré que l'évaluation de la sensibilité variétale pouvait se faire sur la base des symptômes visibles sur les épis et ne requérait pas une analyse systématique des mycotoxines.

Techniques d'inoculation et stratégie d'évaluation

Certaines variétés ont réagi de façon relativement différente aux deux techniques d'inoculation utilisées pour *F. graminearum*, ce qui pourrait révéler différents types de résistance. Une des techniques se contente de mettre les spores en contact avec les soies (inoculation dans le canal des soies) et permet d'observer la résistance à l'initiation de l'infection. L'autre (inoculation dans les grains) fait appel à une blessure préalable des tissus et mesure vraisemblablement la résistance à la propagation de l'infection. Suite à ces observations et vu qu'au nord des Alpes les infections de fusariose sur épi faisant suite aux attaques de pyrales sont relativement rares, notamment grâce à la lutte biologique à l'aide de trichogrammes, il a été décidé de ne tester la sensibilité des variétés destinées à ces régions qu'à l'aide d'inoculations dans le canal des soies. Les variétés adaptées à la culture au sud des Alpes ont de plus été inoculées dans les grains avec *F. verticillioides* vu la fréquence de ce pathogène ainsi que des attaques de pyrale du maïs dans cette région. Les résultats obtenus après 2010 n'ont pas permis de détecter de différences de sensibilité à *F. verticillioides* parmi ces variétés. Ces tests ont donc été suspendus.

Pour les inoculations dans le canal des soies avec *F. graminearum*, les variétés Severo et Birko ont été retenues comme témoins très sensible et peu sensible, respectivement. Jusqu'en 2014, la sensibilité de 36 variétés a été évaluée (fig. 8). Trois groupes sont identifiables: un groupe de variétés très sensibles avec une note moyenne autour de 4 (10–25% de la surface de l'épi est atteinte), un groupe intermédiaire et un groupe peu sensible avec une note avoisinant 2 (1–3% de la surface atteinte). Il y a une faible tendance pour les variétés plus précoces à être plus sensibles.

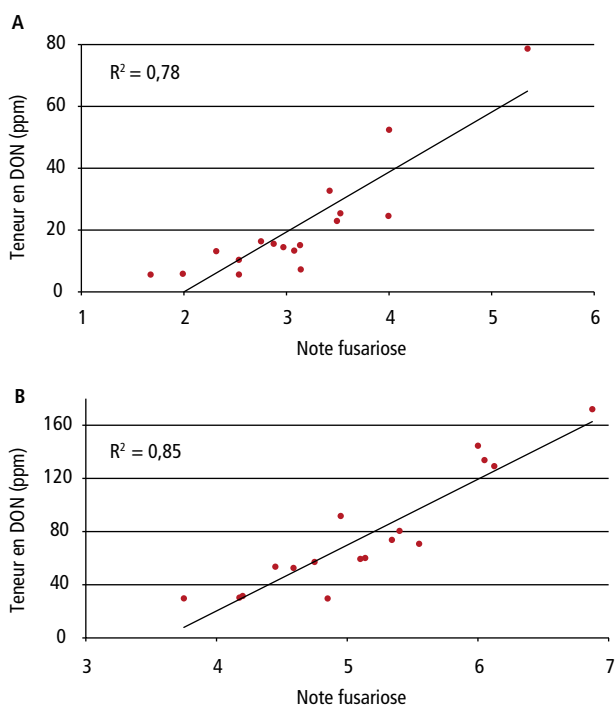


Figure 6 | Corrélation entre la sévérité des symptômes de fusariose (note) et la teneur en DON d'épis de maïs de 17 variétés inoculés avec *Fusarium graminearum* dans le canal des soies (A) ou dans les grains (B) en 2008.

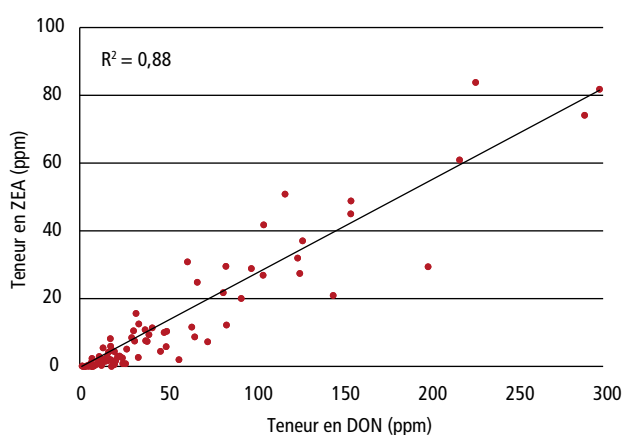


Figure 7 | Corrélation entre la teneur en ZEA et en DON de 80 échantillons de farine issus d'épis de maïs inoculés artificiellement avec *Fusarium graminearum* en 2006.

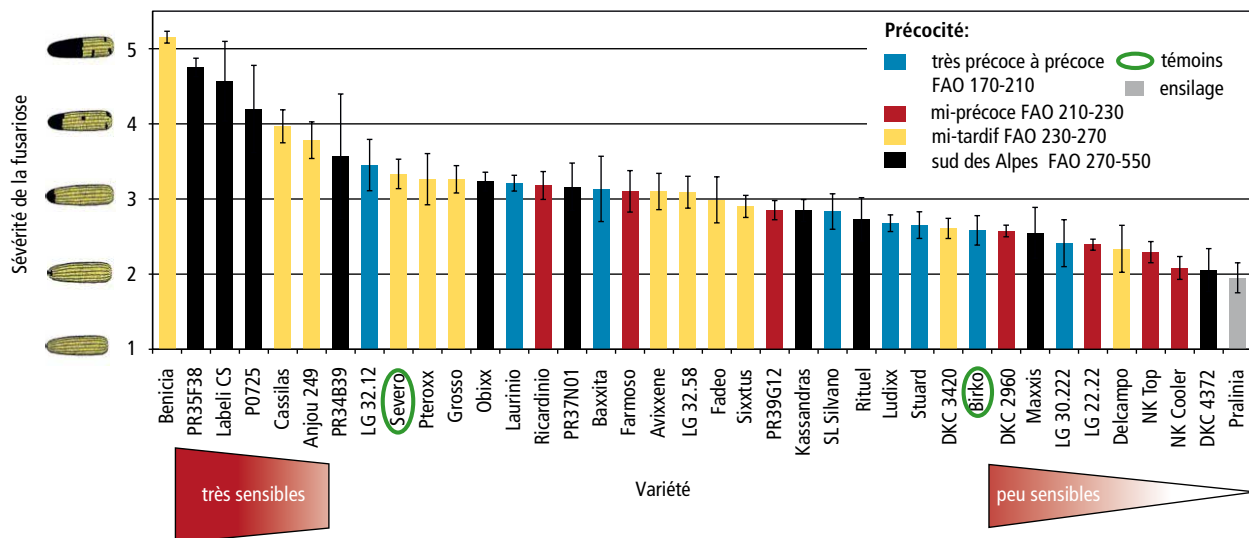


Figure 8 | Sévérité moyenne sur trois ans relative aux témoins (+/- erreur type) des variétés de maïs-grain inoculées dans le canal des soies avec *F. graminearum* entre 2008 et 2014 (épis de l'échelle de notation tirés de Reid et al. (1996)).

Afin d'explorer le lien entre la sensibilité observée suite aux inoculations et celle qui s'exprime au champ suite aux infections naturelles, de nombreuses notations ont été effectuées dans les essais variétaux entre 2008 et 2014. Toutefois, la fréquence et la sévérité des infections naturelles étaient trop faibles et trop variables pour comparer ces deux sets de données.

Conclusions

Par rapport aux céréales à paille, les variétés de maïs sont nombreuses et ont parfois une courte durée de vie. Ce fort taux de renouvellement est une contrainte majeure lors de l'examen de la sensibilité variétale à la fusariose qui doit se faire sur un minimum de trois ans d'essai et qui représente une forte charge de travail. Ainsi, entre 2005 et 2014, pas moins de 90 variétés sont entrées en phase de test. Au final, les données sur trois ans sont disponibles pour 36 variétés, les autres variétés ayant été abandonnées soit parce qu'elles n'ont pas été admises sur la liste recommandée, soit parce qu'elles ont été retirées du marché entre temps.

En revanche, cette recherche a permis de mettre au point une méthodologie fiable pour évaluer la sensibilité à la fusariose et a montré que cette sensibilité varie parmi les variétés de maïs cultivées en Suisse. Le choix variétal est donc un levier à disposition des maïsiculteurs pour gérer le risque de fusariose et de contamination en mycotoxines. Vu qu'il est également important de récolter le plus tôt possible, la variété choisie devra impérativement appartenir à un groupe de précocité adapté à la région de culture.

Remerciements

L'auteur tient à remercier vivement les nombreuses personnes qui ont collaboré à ce projet. Leurs multiples contributions ont incontestablement été décisives pour mener à bien cette recherche.

Riassunto

Fusariosi del mais: valutazione della sensibilità delle varietà coltivate in Svizzera

La fusariosi del mais fa diminuire la quantità e la qualità del raccolto di semi. Le micotossine prodotte dai patogeni fungini coinvolti minacciano la salute degli animali foraggiati. Uno dei fattori che influenzano la gravità della malattia e il tenore di tossine, e di conseguenza un potenziale strumento di lotta, è il livello di resistenza della varietà coltivata. I lavori qui presentati mirano a sviluppare una metodologia che permetta di valutare questa resistenza e di sfruttarla in seguito per testare gli ibridi di mais da granella coltivati in Svizzera. Un metodo, messo in atto tramite inoculazione artificiale delle spighe al momento della fioritura per almeno tre anni di sperimentazione, ha permesso di identificare delle varietà molto sensibili, poco sensibili e intermedie. Tale classificazione si rivela uno strumento utile per i coltivatori di mais al momento di scegliere la varietà per tenere sotto controllo il rischio di fusariosi e di contaminazione da micotossine.

Summary

Fusarium infection in maize: evaluating the susceptibility of varieties cultivated in Switzerland

Gibberella and fusarium ear rot of maize reduce grain yield qualitatively and quantitatively. Mycotoxins produced by the fungal pathogens that are responsible of these two diseases are a health threat for the animals fed with contaminated maize. One factor affecting disease severity and mycotoxin content, and therefore a potential management tool, is the susceptibility of the cultivated variety. This study aimed at establishing a methodology to evaluate this resistance level and then use is to test grain maize hybrids grown in Switzerland. A method using artificial inoculation of the ears at female flowering during at least three experimental years allowed to identify very susceptible, less susceptible and intermediate varieties. This ranking is a tool that maize growers may use while choosing a variety to manage the risk of Gibberella ear rot and of mycotoxin contamination.

Key words: *Fusarium*, *Zea mays*, ear rot, resistance, mycotoxins.

Bibliographie

- Cappellini R. A. & Peterson J. L., 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* **57**, 962–966.
- Dorn B., Forrer H. R., Schürch S. & Vogelgsang S., 2009. Fusarium species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection. *European Journal of Plant Pathology* **125** (1), 51–61.
- Druesne C., 2006. Dossier mycotoxines – Les actions de prévention: limiter le cumul des facteurs de risque au champ. *Perspectives agricoles* **324**, 28–35.
- Hiltbrunner J., Buchmann U., Collaud J. F., Pignon P. & Bertossa M., 2015. Liste recommandée des variétés de maïs pour la récolte 2015. *Recherche Agronomique Suisse* **6** (2).
- Martin M., Dhillon B. S., Miedaner T. & Melchinger A. E., 2012. Inheritance of resistance to Gibberella ear rot and deoxynivalenol contamination in five flint maize crosses. *Plant Breeding* **131** (1), 28–32.
- Mesterhazy A., Lemmens M. & Reid L. M., 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. *Plant Breeding* **131** (1), 1–19.
- O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E. & Ploetz R. C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **95**, 2044–2049.
- Reid L. M., Hamilton R. I. & Mather D. E., 1996. Screening maize for resistance to Gibberella ear rot. In: Technical Bulletin Eastern Cereal and Oilseed Research Centre. Agriculture and Agri-Food Canada
- Reid L. M., Woldemariam T., Zhu X., Stewart D. W. & Schaafsma A. W., 2002. Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**, 162–167.