



HAL
open science

Un outil moléculaire basé sur le séquençage haut débit pour caractériser les *Fusarium* sur céréales

Anne-Laure Boutigny, Angelique Gautier, Ryan Basler, Florian Dauthieux,
Stephen Leite, Romain Valade, Jaime Aguayo, Renaud Ioos, Valerie Laval

► To cite this version:

Anne-Laure Boutigny, Angelique Gautier, Ryan Basler, Florian Dauthieux, Stephen Leite, et al..
Un outil moléculaire basé sur le séquençage haut débit pour caractériser les *Fusarium* sur céréales.
Innovations Agronomiques, 2017, 59, pp.55-61. 10.15454/1.513785287764323E12 . hal-01675815

HAL Id: hal-01675815

<https://hal.science/hal-01675815>

Submitted on 4 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Un outil moléculaire basé sur le séquençage haut débit pour caractériser les *Fusarium* sur céréales

Boutigny A.L.¹, Gautier A.², Basler R.², Dauthieux F.², Leite S.², Valade R.³,
Aguayo J.¹, Ios R.¹, Laval V.²

¹ ANSES Laboratoire de la santé des végétaux, Unité de Mycologie, Domaine de Pixérécourt, F-54220 Malzéville

² INRA, UMR1290 BIOGER_CPP, Bât 13, Avenue Lucien Bretignière, F-78850 Thiverval-Grignon,

³ ARVALIS-Institut du végétal, Domaine AgroParisTech, Bâtiment Bioger CPP, F-78850 Thiverval-Grignon

Correspondance : anne-laure.boutigny@anses.fr

Résumé

La fusariose est une maladie des céréales causée par un complexe d'espèces du genre *Fusarium*. Elle provoque une baisse du rendement et de la qualité technologique des grains. Certaines espèces de *Fusarium* produisent des mycotoxines, métabolites secondaires toxiques, qui s'accumulent dans les grains et sont transmises le long de la chaîne de transformation agro-alimentaire. Un outil innovant a été développé permettant de dresser un inventaire exhaustif des espèces de *Fusarium* présentes dans des échantillons de céréales par l'analyse de séquences barcodes générées par séquençage haut débit. Cette approche devra permettre de détecter et gérer plus efficacement les émergences d'espèces de *Fusarium* ou toute modification de la diversité du complexe *Fusarium*.

Mots-clés: *Fusarium*, Séquençage haut débit, Metabarcoding, Blé, Orge, Fusariose, Mycotoxines.

Abstract: A molecular tool based on high throughput sequencing to characterize *Fusarium* species on cereals

Fusarium head blight is a major cereal disease caused by a complex of *Fusarium* species reducing grain yield and quality. In addition, some *Fusarium* species produce mycotoxins, toxic secondary metabolites, which accumulates in the grains and are a major health and food safety concern due to their toxicity to humans and animals. A new tool was developed for the assessment of the global *Fusarium* diversity in field samples by analysing barcode sequences generated by high throughput sequencing. This approach may be used to show changes in the composition of the *Fusarium* complex or detect the emergence of new *Fusarium* species.

Keywords: *Fusarium*, High throughput sequencing, Metabarcoding, Wheat, Barley, *Fusarium* head blight, Mycotoxin.

Introduction

La fusariose (Photo 1), est une maladie des céréales particulièrement suivie dans le cadre du dispositif national d'épidémiosurveillance. Cette maladie est causée par un complexe d'espèces des genres *Fusarium* et *Microdochium*. Elle provoque une baisse du rendement et de la qualité technologique des grains. Les champignons impliqués posent, en outre, un risque sanitaire car certaines espèces de

Fusarium sont capables de produire des mycotoxines, métabolites secondaires toxiques, qui s'accumulent dans les grains et sont transmises le long de la chaîne de transformation agro-alimentaire. Les types de mycotoxines produites dépendent des espèces de *Fusarium* présentes sur les épis.



Photo 1: Fusariose sur épis de blé.

Une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* a pu être isolée et identifiée à partir de grains de blé fusariés (Parry *et al.*, 1995). La diversité et la richesse des espèces de *Fusarium* varient en fonction de l'année, de la région, des conditions climatiques, de la variété de la plante hôte, de l'historique parcellaire et des pratiques culturales.

Afin de réduire le risque de développement de la fusariose, des traitements fongicides sont préconisés à la floraison, stade d'infection optimal des *Fusarium*. L'efficacité des traitements fongicides est variable et difficile à prédire en conditions de contamination naturelle. L'efficacité sera conditionnée par le type de molécules actives utilisé, mais aussi la méthode et le stade d'application. De plus, chacune des espèces de *Fusarium* du complexe présente une sensibilité particulière aux fongicides. La fusariose fait l'objet de traitements fongicides spécifiques et les changements de pratiques agricoles induits par le plan Écophyto pourraient modifier le complexe d'espèces associé à la fusariose. Ces changements de pratiques agricoles produisent des effets de différents ordres. Tout d'abord sur la maladie elle-même, avec par exemple l'induction de changements des symptômes observés. Une modification des pratiques d'applications de fongicides, à spectre d'action plus ou moins spécifique, pourrait aussi induire une modification significative de la dynamique et de la composition du complexe d'espèces. Par conséquent, le risque mycotoxique, la quantité de mycotoxine et la diversité de la contamination des récoltes par les mycotoxines, changeraient également.

Le réseau d'épidémiosurveillance base actuellement la surveillance de la fusariose dans les parcelles sur des observations de symptômes au champ. Cependant, associer visuellement un symptôme à une ou plusieurs espèces de *Fusarium*, même parmi les principales, reste difficile, voire impossible. L'étude de la diversité du complexe *Fusarium* est classiquement réalisée par des techniques microbiologiques. Les souches de *Fusarium* sont isolées à partir des grains de blé cultivés sur des milieux de culture adaptés, elles sont ensuite purifiées puis identifiées morphologiquement par observation de différents critères : aspect du mycélium, vitesse de croissance, forme et taille des spores, etc. (Photo 2). Cependant, la compétition entre plusieurs espèces lors de la phase d'isolement peut masquer la présence de certaines d'entre elles. De plus, l'identification morphologique des espèces de *Fusarium* exige une grande expertise qui n'est pas suffisante dans le cas de certaines espèces cryptiques de *Fusarium*, comme celles du complexe d'espèces *Fusarium graminearum*, qui ne sont pas identifiables morphologiquement.



Photo 2 : Spores (macroconidies) de *Fusarium graminearum*.

Toutefois, l'analyse de la séquence nucléotidique d'une portion du gène EF1- α présent dans le génome des champignons permet de confirmer certaines identifications morphologiques délicates. Une autre technique permettant l'étude de la diversité du complexe *Fusarium* consiste à quantifier des espèces préalablement définies par l'utilisation de tests de PCR quantitative. Cependant, l'utilisation de la PCR quantitative est limitée car elle ne permet pas de mettre en évidence des espèces non recherchées ou émergentes.

Les outils de diagnostic actuellement disponibles et utilisés par le réseau d'épidémiologie ne permettent donc que d'appréhender les évolutions des espèces majoritaires, bien connues, mais occultent les évolutions d'espèces secondaires présentant potentiellement un risque d'émergence.

Ces dernières années, le développement de technologies de séquençage à haut débit a permis d'accéder à la diversité de communautés de microorganismes (Buée *et al.*, 2009 ; Bik *et al.*, 2012) de façon beaucoup plus exhaustive. Ces techniques permettent un séquençage massif de marqueurs ADN (barcodes) utilisés pour caractériser les espèces. Le projet PYROFUS proposait de développer et de valider un outil basé sur les technologies de séquençage à haut débit, exploitant la variabilité du gène EF1- α , afin de détecter sans *a priori* l'ensemble des espèces de *Fusarium* présentes au sein d'échantillons de terrain.

1. Méthodes

1.1 Définition et choix des amorces dans une région barcode

Le dessin des amorces était une étape clé dans la mise au point de la technique. En effet, ces amorces doivent permettre d'amplifier par PCR, avant le séquençage haut débit, le marqueur barcode sélectionné chez les espèces du genre *Fusarium*. De plus, la séquence de la région amplifiée doit permettre de discriminer les espèces de *Fusarium* entre elles. Le gène EF1- α a été sélectionné car il permet de différencier les espèces de *Fusarium* (O' Donnell *et al.*, 2000 ; O' Donnell *et al.*, 2008). Les séquences EF1- α d'espèces du genre *Fusarium* ainsi que de champignons phytopathogènes appartenant à d'autres genres ont été sélectionnées dans les bases de données spécialistes (*Fusarium*-ID, R-syst) et généralistes (NCBI) ou issus de la collection de référence de l'ANSES. Afin de prendre en compte la variabilité intra spécifique, 162 séquences EF1- α de 74 espèces ont été retenues et un arbre phylogénétique constitué. Six séquences d'espèces de *Fusarium* très divergentes ont été alignées avec des espèces appartenant à d'autres genres de champignons. Une zone d'intérêt a été ciblée et des amorces ont été dessinées permettant l'amplification spécifique des espèces du genre *Fusarium*.

Plusieurs amorces ont été définies et plusieurs protocoles d'amplification ont été testés. Le protocole optimal sélectionné a été utilisé pour vérifier la spécificité de la réaction d'amplification avec plusieurs espèces de champignons du genre *Fusarium* ou d'autres genres.

1.2 Préparation d'échantillons de référence calibrés

Afin de valider la faisabilité de l'identification d'espèces de *Fusarium* présentes dans un échantillon par séquençage haut débit, deux types d'échantillons de référence calibrés ont été préparés : des mélanges ADN témoins et des échantillons de blé artificiellement contaminés.

Cinq mélanges ADN témoins ont été préparés. Les mélanges ADN témoins 1 à 4 contenaient la même quantité d'ADN de 10 espèces de *Fusarium* et d'autres espèces fongiques. Le mélange ADN témoin 5 contenait la même quantité d'ADN de 10 espèces du complexe d'espèce *Fusarium graminearum*.

Des échantillons de blé ont été artificiellement contaminés par différentes espèces de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. langsethiae*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. subglutinans* et *F. verticillioides*) dans différentes proportions. À partir de ces échantillons de blé artificiellement contaminés, les étapes de broyage et d'extraction d'ADN ont été optimisées afin d'obtenir une qualité et des quantités d'ADN adéquates pour le séquençage haut débit. De plus, la présence des différentes espèces de *Fusarium* dans ces échantillons artificiellement contaminés a été vérifiée par PCR en temps réel en utilisant des couples d'amorces/sondes espèces spécifiques, développées précédemment.

1.3 Mise au point du protocole expérimental de séquençage haut débit

La technologie MiSeq (Illumina) disponible sur la plateforme Genotoul (INRA, Toulouse) a été sélectionnée. Les échantillons d'ADN témoins ont été amplifiés par PCR avec les amorces développées dans les conditions optimales avec 31 ou 35 cycles d'amplification. Ces échantillons de référence calibrés ont permis d'évaluer les biais d'amplification dus aux amorces et ceux introduits par le nombre de cycles PCR. Trois « runs » de séquençage haut débit ont été réalisés contenant ces échantillons d'ADN témoins permettant ainsi de vérifier la répétabilité des résultats entre les différents « runs » de séquençage et d'évaluer la performance du pipeline d'analyse bioinformatique développé.

Les échantillons de blé artificiellement contaminés ont été préparés avec différentes variétés de blé et ont été extraits plusieurs fois. Après amplification et séquençage haut débit, ils ont permis de vérifier que les espèces mises en mélanges étaient bien retrouvées indépendamment de la variété de blé et de l'extraction d'ADN. La sensibilité de la technique a également été évaluée sur les échantillons de blé artificiellement contaminés.

1.4 Mise au point du pipeline d'analyse bio-informatique

Le pipeline d'analyse, basé sur le logiciel MOTHUR v.1.36 (Schloss *et al.*, 2009), a comporté différentes étapes décrites dans Boutigny *et al.* (en préparation).

1.5 Echantillons naturels

En 2014 et 2015, 65 échantillons de blé tendre, blé dur et orge ont été collectés dans différentes régions de France (Tableau 1). Ces échantillons ont été analysés à l'aide de l'outil développé dans ce projet. Six PCR indépendantes par échantillon ont été réalisées et regroupées avant séquençage afin que même les échantillons faiblement contaminés puissent être analysés, le séquençage haut débit nécessitant une quantité d'ADN minimum.

Tableau 1 : Echantillons analysés au cours de cette étude.

Code échantillon	Année	Céréale	Variété	Traitement	Précédent	Travail du sol	Département	Commune
2721	2014	blé dur	Karur	ND	toumesol	sans labour	17	Perigny
2722	2014	blé dur	Miradoux	ND	toumesol	sans labour	31	Montastruc-la-Conseillère
2723	2014	blé dur	Karur	ND	Pomme de terre	ND	45	Villamblain
2724	2014	blé dur	Plussur	ND	colza	avec labour	28	Pueyrthe
2725	2014	blé dur	Karur	ND	maïs grain	avec labour	28	Ignoville
2726	2014	blé dur	Atoudur	ND	toumesol	sans labour	31	Montesquieu-Lauragais
2727	2014	blé dur	Miradoux	ND	toumesol	sans labour	86	Falaise-Sec
2728	2014	blé dur	Tablur	ND	toumesol	sans labour	86	Thure
2729	2014	blé dur	Miradoux	ND	maïs grain	avec labour	26	Portes-Ves-Valence
2730	2014	blé dur	Miradoux	ND	colza	sans labour	45	St Cloud
2731	2014	blé dur	Plussur	ND	colza	avec labour	45	Eplades-en-Beauce
2732	2014	blé dur	Soulstur	ND	blé dur	avec labour	85	Triaise
2733	2014	blé tendre	Courtot	ND	betterave	avec labour	28	Rolsney St Denis
2734	2014	blé tendre	Acroc	ND	toumesol	semis direct	36	St Lactandin
2735	2014	blé tendre	Eudide	ND	maïs semence	semis direct	48	Mazé
2736	2014	blé tendre	Callulle	ND	colza	avec labour	72	ND
2737	2014	blé tendre	Expert	ND	betterave	avec labour	62	Norail
2738	2014	blé tendre	Rubisko	ND	maïs grain	avec labour	60	Le Mans
2739	2014	blé tendre	Paledor	ND	maïs fourrage	avec labour	29	Piomogues
2740	2014	orge	Sebastian	ND	blé tendre	avec labour	45	Tournolsis
2741	2014	orge	Sebastian	ND	colza	sans labour	76	Alvimore
2742	2014	orge	Etnoal	ND	blé tendre	sans labour	10	Fouchères
15-02425	2015	blé tendre	Bammude	M1-TEMOIN-NON-TRAITE	ND	ND	91	Bolgneville
15-02426	2015	blé tendre	Bammude	M2-PROSARO-O.5I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02427	2015	blé tendre	Bammude	M3-PROSARO-O.5I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02428	2015	blé tendre	Bammude	M4-PROSARO-O.5I+FB1139-O.5I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02429	2015	blé tendre	Bammude	M5-PROSARO-O.5I+FB1559-2.9I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02430	2015	blé tendre	Bammude	M7-FB1557-2I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02431	2015	blé tendre	Bammude	M8-FB1557-1I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02432	2015	blé tendre	Bammude	M9-FB1559-2I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02433	2015	blé tendre	Bammude	M10-FB1557-3.7I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02434	2015	blé tendre	Bammude	M11-FB1559-2.9I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02435	2015	blé tendre	Bammude	M12-FB1554-1.9I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02436	2015	blé tendre	Bammude	M13-FB1558-4I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02437	2015	blé tendre	Bammude	M14-FB1559-2.9I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-02438	2015	blé tendre	Bammude	M15-FB1560-3.7I+Z61	ND	ND	91	Bolgneville
15-00948	2015	blé tendre	PR22R68	M8 bis FB 1550 O.5kg Z61 puis FB15500.5kg T2 + T1	ND	ND	34	Bergerac
15-00949	2015	blé tendre	PR22R68	M4 PROSARIO O.5I + FB 1139 O.5I Z61	ND	ND	34	Bergerac
15-00950	2015	blé tendre	PR22R68	M6 - FB 1555 2% T2 - 3 à 4 jours	ND	ND	34	Bergerac
15-00951	2015	blé tendre	PR22R68	M5 PROSARIO O.5I + FB 1559 2.9I Z61	ND	ND	34	Bergerac
15-00952	2015	blé tendre	PR22R68	M1-TEMOIN-NON-TRAITE	ND	ND	34	Bergerac
15-00953	2015	blé tendre	PR22R68	M3 PROSARIO O.5I Z61	ND	ND	34	Bergerac
15-00954	2015	blé tendre	PR22R68	M2 PROSARIO O.5I Z61	ND	ND	34	Bergerac
15-00955	2015	blé tendre	PR22R68	M9bis	ND	ND	34	Bergerac
15-00956	2015	blé tendre	PR22R68	M7bis	ND	ND	34	Bergerac
15-05155	2015	orge	Sebastian	M1-TEMOIN NON TRAITE	ND	ND	91	Bolgneville
15-05156	2015	orge	Sebastian	M2-AVIATOR XPRO O.5I Z59-61	ND	ND	91	Bolgneville
15-05157	2015	orge	Sebastian	M3-PROSARO 1I Z48	ND	ND	91	Bolgneville
15-05158	2015	orge	Sebastian	M4-AVIATOR XPRO O.5I Z59-61	ND	ND	91	Bolgneville
15-05159	2015	orge	Sebastian	M5-PROSARO 1I Z59-61	ND	ND	91	Bolgneville
15-05160	2015	orge	Sebastian	M6-PROSARO O.5I+Z48 PUIS PROSARO O.5I Z59-61	ND	ND	91	Bolgneville
15-05161	2015	orge	Sebastian	M7-UBRAX O.5I+ACANTO O.2I Z48 puis PROSARO O.5I Z59-61	ND	ND	91	Bolgneville
15-05351	2015	orge	KWS Irina	M1-TEMOIN NON TRAITE	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05352	2015	orge	KWS Irina	M2-AVIATOR XPRO O.5I Z48	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05353	2015	orge	KWS Irina	M3-PROSARO 1I Z48	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05354	2015	orge	KWS Irina	M4-AVIATOR XPRO O.5I Z59-61	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05355	2015	orge	KWS Irina	M5-PROSARO 1I Z59-61	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05356	2015	orge	KWS Irina	M6-PROSARO O.5I Z48 PUIS O.5I Z59-61	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05359	2015	orge	KWS Irina	M7-UBRAX O.5I+ACANTO O.2I Z48 puis PROSARO O.5I	ND	ND	78	Limetz Villiez
15-05426	2015	orge	Sebastian	PRENOUVÉLON-SEBASTIAN-TRAITE	ND	ND	41	Prénoeuillon
15-05427	2015	orge	KWS Irina	PRENOUVÉLON-KWS Irina-TRAITE	ND	ND	41	Prénoeuillon
15-05428	2015	orge	RST Planet	PRENOUVÉLON-RST Planet-NON TRAITE	ND	ND	41	Prénoeuillon
15-05429	2015	orge	Sebastian	PRENOUVÉLON-SEBASTIAN-NON TRAITE	ND	ND	41	Prénoeuillon
15-05430	2015	orge	KWS Irina	PRENOUVÉLON-KWS Irina-NON TRAITE	ND	ND	41	Prénoeuillon
15-05431	2015	orge	RST Planet	PRENOUVÉLON-RST Planet-TRAITE	ND	ND	41	Prénoeuillon

ND : données non disponibles

2. Résultats

2.1 Choix des amorces

Plusieurs combinaisons d'amorces de PCR ont été définies à partir du gène EF1- α . Les amorces PYROFUS-EF1-F2 et PYROFUS-EF1-R3 ont finalement été sélectionnées, sur la base de la qualité du produit de PCR et de leur affinité pour le genre *Fusarium*. Ces amorces amplifient une région barcode de 640 pb (paire de bases) au sein du gène EF1- α . Tout comme la combinaison finalement retenue, aucun des couples d'amorces dessinés et évalués n'a toutefois permis l'amplification exclusive de la région cible chez le genre *Fusarium*. Les séquençages ont confirmé une amplification aspécifique des champignons *Zymoseptoria tritici*, *Leptosphaeria maculans*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Phaeoacremonium mortoniae*, *Epicoccum nigrum*, *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*. Cependant, les

séquences de ces espèces étant relativement divergentes de celles du genre *Fusarium*, elles pourront facilement être écartées lors de la phase d'analyse bio-informatique.

2.2 Résultats obtenus avec les échantillons de référence calibrés

L'analyse des séquences a finalement été faite sur une portion d'EF1- α de 200 pb, correspondant à la séquence « forward ». En effet, la mauvaise qualité des séquences « reverse » n'a pas permis de fusionner les séquences issues des deux directions de séquençage.

Le processus d'analyse a permis de retrouver les séquences barcodes de toutes les espèces de *Fusarium* ajoutées dans les mélanges ADN témoins 1, 2, 3 et 4. Les mêmes résultats ont été obtenus indépendamment des répétitions, du nombre de cycle de PCR ou du « run » de séquençage, démontrant la répétabilité des résultats.

Dans le mélange ADN témoin 5 contenant 10 espèces du complexe *Fusarium graminearum*, l'outil n'a permis de mettre en évidence que 3 espèces sur les 10 normalement présentes: *F. acaciae*, *F. cortaderiae* et *F. meridionale*. Toutes les autres séquences étaient assignées à *F. graminearum* par manque d'un niveau suffisant de polymorphisme pour être mise en évidence par le pipeline d'analyse bio-informatique utilisé.

Le processus d'analyse a permis de retrouver toutes les espèces de *Fusarium* dans les échantillons de blé artificiellement contaminés. Les résultats étaient reproductibles indépendamment de la variété de blé, des répétitions et des extractions d'ADN. L'outil a permis de détecter les différentes espèces de *Fusarium* contaminantes jusqu'à un niveau d'un seul grain de blé contaminé en mélange dans 10 000 grains sains.

2.3 Évaluation de l'outil sur des échantillons issus de parcelles d'agriculteurs

L'utilisation de ce nouvel outil a permis de mettre en évidence la présence de 17 espèces différentes de *Fusarium* dans les échantillons de blé tendre, blé dur et orge (Figure 1). *F. graminearum* et *F. poae* sont présentes dans la majorité des échantillons. Certaines espèces de *Fusarium* sont spécifiquement détectées dans l'orge : *Fusarium thapsinum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium redolens*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium mahasenii* ou dans le blé : *Fusarium proliferatum*.

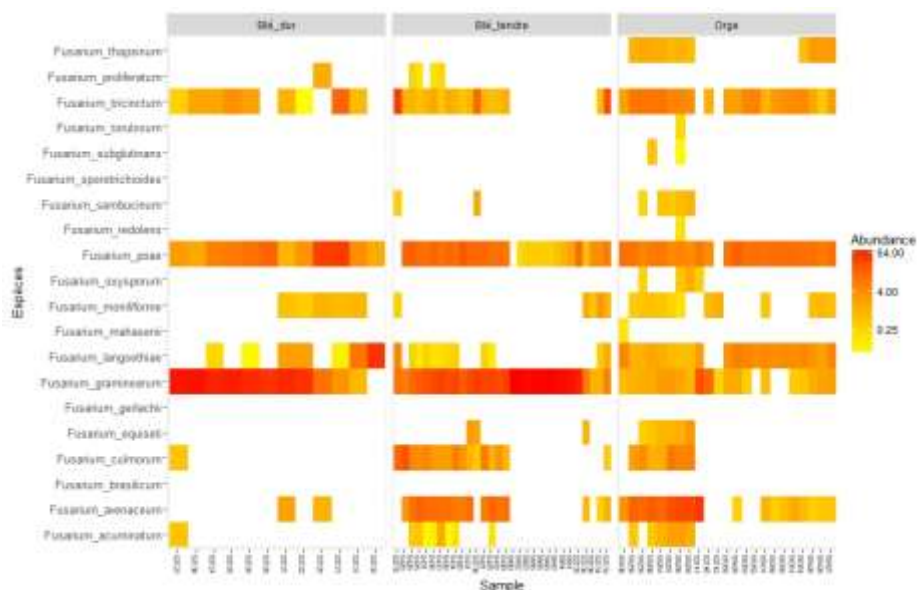


Figure 1 : Analyse de la diversité des espèces de *Fusarium* dans des échantillons de champs collectés dans le cadre de cette étude.

Conclusion

Ce nouvel outil a mis à profit le polymorphisme d'une région particulière du gène EF1- α et la puissance des techniques de métagénomique pour permettre une approche beaucoup plus fine de la diversité des taxa du genre *Fusarium* contaminants des échantillons de céréales. L'avantage de cet outil est de pouvoir appréhender la diversité du complexe *Fusarium* sans *a priori*, contrairement aux techniques classiquement utilisées en biologie moléculaire (tests PCR ou PCR en temps réel) qui recherchent dans les échantillons des portions d'ADN d'espèces connues. En outre, il s'affranchit des problèmes de compétitions et d'identification morphologique délicate des espèces rencontrés en isolement mycologique. Trois espèces du complexe *Fusarium graminearum* ont ainsi pu être distinguées: *F. cortaderiae*, *F. meridionale* et *F. acaciae*.

La mise à disposition de cet outil permettra de mener des études épidémiologiques sur la diversité du complexe *Fusarium* sur céréales en France. Il détectera et gèrera aussi plus efficacement les émergences d'espèces de *Fusarium* ou toute modification de la prévalence des espèces impliquées et donc du risque toxigène associé. Son utilisation devrait participer, à moyen terme, à l'adoption de nouvelles stratégies en matière d'utilisation de produits phytopharmaceutiques et de pratiques agricoles.

Remerciements : Le projet PYROFUS a bénéficié d'un financement de l'ONEMA, dans le cadre du plan d'action national Écophyto et de l'appel à projets de recherche Pour et Sur le Plan Ecophyto (PSPE).

Références bibliographiques

- Boutigny A.-L., Gautier A., Basler R., Dauthieux F., Leite S., Aguayo J., Valade R., Ios R., Laval V. Metabarcoding targeting EF1 region to assess *Fusarium* diversity on cereals (article en préparation).
- Bik H.M., Porazinska D.L., Creer S., Caporaso J.G., Knight R., Thomas W.K., 2012. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 27,234-244.
- Buée M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R.H., Uroz S., Martin F., 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184, 449-456.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7905-7910.
- O'Donnell K., Ward T.J., Abera D., Kistler H.C., Aoki T., Orwig N., Kimura M., Bjørnstad Å., Klemsdal S.S., 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1514-1522.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology* 44, 207-238.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F., 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL)