



**HAL**  
open science

# Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum : une approche fonctionnelle et expérimentale de l'épidémiologie végétale

Frédéric Suffert

► **To cite this version:**

Frédéric Suffert. Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum : une approche fonctionnelle et expérimentale de l'épidémiologie végétale. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud, 2015. tel-01167164v1

**HAL Id: tel-01167164**

**<https://hal.science/tel-01167164v1>**

Submitted on 23 Jun 2015 (v1), last revised 3 May 2016 (v2)

**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.



Université Paris-Sud  
Ecole Doctorale Science du Végétal

**Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum :  
une approche fonctionnelle et expérimentale  
de l'épidémiologie végétale**

Notice de travaux présentée par

**Frédéric SUFFERT**

Ingénieur de Recherches INRA

pour l'obtention du

**Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches**

Soutenue le 23 juin 2015 devant la commission d'examen composée de :

Michel DRON  
Christian CILAS  
Pascal FREY  
Anne LEGRÈVE  
Michaël CHELLE  
Christian STEINBERG

Professeur, Université Paris-Sud Orsay  
Chargé de Recherches, CIRAD Montpellier  
Directeur de Recherches, INRA Nancy  
Professeur, Université Catholique de Louvain  
Directeur de Recherches, INRA Grignon  
Directeur de Recherches, INRA Dijon

Rapporteur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Examineur



*à Muriel,  
Gabrielle, Martin et Emilie,*





## Remerciements

Ce mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches est l'occasion de dresser un bilan de ma trajectoire professionnelle et de mes activités de recherches. C'est surtout, au travers d'un exercice de style, l'occasion de faire le tri dans les questionnements qui m'ont accompagné durant ces quinze dernières années et recenser ceux qui me guideront à l'avenir. Chercheur, responsable d'équipe depuis 2013 et probablement futur directeur de thèse, je n'oublie pas que j'ai été recruté à l'INRA en tant qu'ingénieur agronome ; j'ai fierté et plaisir à le rester.

J'exprime ma gratitude à tous les collègues épidémiologistes qui ont partagé avec moi leurs idées, leurs propres questionnements, et m'ont aidé - directement ou indirectement - à faire des choix aux étapes importantes de ma carrière : Jean Pinon, Ivan Sache, Francis Rouxel, Françoise Montfort, Philippe Lucas, Serge Savary, Didier Andrivon et Christian Lannou.

Je remercie les membres du jury, Michel Dron, Christian Cilas, Pascal Frey, Anne Legrève, Michaël Chelle et Christian Steinberg, d'avoir accepté d'examiner mon mémoire, et ce faisant, enrichir mes réflexions grâce à leur regard critique et aux discussions suscitées lors de la soutenance.

*"Par hasard diriez-vous peut-être... mais souvenez-vous que dans les sciences de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés"*

Louis Pasteur, 1854

*"Le doute est un hommage que l'on rend à la vérité"*

Ernest Renan, 1861



# Sommaire

<b>1. Parcours scientifique</b>	<b>9</b>
1.1. Principales étapes de ma trajectoire professionnelle	9
1.2. Curriculum vitae	14
<b>2. Synthèse des travaux de recherche - Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum : une approche fonctionnelle et expérimentale de l'épidémiologie végétale</b>	<b>23</b>
2.1. Processus et mécanismes, au coeur de la représentation du fonctionnement d'une épidémie	28
2.2. Stratégie expérimentale pour caractériser processus et mécanismes - Le cas d'une maladie d'origine tellurique, le cavity spot de la carotte	35
2.3. Position centrale de l'inoculum primaire et processus impliqués dans la récurrence pluriannuelle des épidémies - Le cas d'une maladie aérienne, la septoriose du blé	49
2.4. Pilotage de processus épidémiques par la température à différentes échelles spatio-temporelles - Le cas de la septoriose du blé	68
<b>3. Projet de recherche et d'animation scientifique</b>	<b>76</b>
3.1. Projet de recherche individuel	76
3.2. Projet d'équipe	86
3.3. Encadrement de doctorants et formation par la recherche	97
<b>4. Références</b>	<b>99</b>
<b>5. Annexes : sélection de cinq publications</b>	<b>109</b>



# 1. Parcours scientifique

## 1.1. Principales étapes de ma trajectoire professionnelle

Ma formation généraliste d'ingénieur agronome, puis ma spécialisation en protection des cultures, m'ont orienté tôt vers les problématiques de santé végétale et une carrière scientifique mêlant approches académiques et appliquées. Loin de la région toulousaine où j'ai vécu jusqu'à l'âge de vingt ans, mes deux premières années passées à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes m'ont façonné en tant qu'ingénieur agronome, par la diversité des disciplines scientifiques enseignées et des problématiques socio-économiques abordées. Je garde de cette période intense un goût pour les "produits finis" (mon côté perfectionniste, analysant) et le besoin d'assigner à toute acte technique ou analyse scientifique un objectif précis (mon côté finaliste, contrôlant). Je tiens également de cette période mon attrait pour la terre et le monde rural en général, hors cadre strictement professionnel, que j'entretiens depuis une dizaine d'années (intérêt pour les politiques publiques agricoles, le développement rural, les investissements éthiques et solidaires, et plus récemment l'accompagnement de projets de capital-risque dans la filière bois). Mon avenir professionnel ne saurait s'affranchir des liens que j'ai tissés entre le monde de la recherche, de l'innovation et de l'agriculture, tant du côté public que privé.

Pendant l'été 1998 j'ai eu l'opportunité de réaliser un stage de pré-spécialisation dans le laboratoire de pathologie forestière de l'INRA de Nancy sous la responsabilité de Jean Pinon. J'ai travaillé quelques semaines sur la rouille du peuplier (*Melampsora larici-populina*). Ce fut mon premier contact avec la pathologie végétale. Alors que je n'avais pas totalement renoncé à m'orienter vers l'ingénierie forestière, ce choix de stage a répondu à mon souhait de travailler sur les maladies des plantes. Je m'imaginai grimper aux arbres dans les forêts pour les soigner... Cette perception idéalisée de la tâche s'est avérée bien naïve, mais cette première expérience de recherche m'a conforté dans mon choix de poursuivre en épidémiologie végétale, pour son socle épistémique, sa pluridisciplinarité et la vision holistique qu'elle promet.

J'ai réalisé en 1999 mon stage de fin d'étude au laboratoire de pathologie végétale de l'INRA de Grignon, sous la responsabilité d'Ivan Sache et de Laurent Huber. J'ai travaillé sur l'influence de la pluie sur la progression d'épidémies de rouille jaune (*Puccinia striiformis*) et de rouille brune du blé (*Puccinia triticina*). J'ai pu m'essayer à la conception de dispositifs expérimentaux plus ou moins astucieux visant à identifier et hiérarchiser les mécanismes biophysiques impliqués dans la dispersion des spores de rouille par la pluie.

J'ai été recruté en 2000 à l'INRA de Rennes dans l'équipe épidémiologie sol et systèmes de l'UMR BiO3P (actuellement IGEPP). Mon recrutement a coïncidé avec le départ de Francis Rouxel, pathologiste des cultures légumières, que le département SPE (Santé des Plantes et Environnement) avait immédiatement compensé par un contrat à durée déterminée d'un an (dont j'ai bénéficié), puis par la création d'un poste. J'ai pu mesurer les avantages, mais aussi

les inconvénients, d'une telle politique de ressources humaines. J'ai mis quelques années à définir un programme de recherche, peut-être à cause d'un profil de poste prématurément étiqueté "protection intégrée" et un peu trop inféodé aux attentes des professionnels légumiers. Après quelques errements en terme de positionnement scientifique académique, j'ai pu matérialiser mon programme par une thèse ("Épidémiologie du cavity spot de la carotte : perspectives d'application en protection intégrée"), que j'ai soutenue en juin 2006. J'ai d'autant apprécié cette première partie de mon parcours professionnel que j'avais renoncé en 1999 à me lancer dans une thèse en formation initiale, craignant de devoir enchaîner plusieurs post-docs avant de pouvoir être recruté. Etre scientifique à l'INRA était mon premier souhait, mais pas l'unique ; la précarité était un prix que je n'étais pas prêt à payer.

Entre 2000 et 2007 l'essentiel de mon activité a consisté à travailler sur le parasitisme d'origine tellurique et la protection intégrée en cultures légumières de plein champ. J'ai développé un programme de recherches sur l'épidémiologie du cavity spot de la carotte (système *Daucus carota-Pythium* spp.), dont les résultats ont été à la fois académiques et appliqués : (1) développement d'outils, de connaissances et de concepts tendant vers une approche intégrée de la protection contre les maladies telluriques ; (2) prise en compte de l'intégralité du développement d'une épidémie à différentes échelles spatio-temporelles ; (3) identification de processus et mécanismes épidémiques clés, qui, une fois démontrés expérimentalement et conceptualisés, ont permis de mieux comprendre les cinétiques épidémiques ; (4) identification de variables d'action constituant les voies d'intervention des agriculteurs pour limiter le développement des maladies.

**D**es raisons familiales m'ont conduit à faire une demande de mobilité au début de l'été 2006. Elle s'est concrétisée par mon arrivée en janvier 2007 dans l'équipe épidémiologie dans l'UMR BIOGER de Versailles-Grignon qui venait juste d'être créée. Ce changement thématique a dans un premier temps été déstabilisant, puis enrichissant. J'ai fait converger mes questionnements scientifiques vers une seule et même problématique : la diversité des processus, le rôle de l'inoculum et l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques sur le fonctionnement d'une épidémie, qu'elle se manifeste dans les compartiments tellurique, aérien, ou à l'interface entre les deux. L'équipe avait alors choisi d'orienter une partie significative de ses programmes vers l'étude des dynamiques pluriannuelles des épidémies aériennes du blé. J'ai été associé aux travaux déjà engagés par mes collègues, Ivan Sache et Henriette Goyeau, sur le rôle des repousses de blé dans la survie de la rouille brune entre deux saisons épidémiques. Parallèlement j'ai initié un programme sur la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*), notamment sur le rôle des résidus dans les phases précoces et la récurrence pluriannuelle des épidémies. Mon objectif était d'étudier leur fonctionnement à différentes échelles spatio-temporelles, en identifiant la nature et l'origine de l'inoculum et en caractérisant les mécanismes impliqués dans les contaminations les plus précoces. L'enjeu scientifique était à la fois académique (résolution d'une "boîte noire") et appliqué (acquisition de connaissances mobilisables dans des modèles de prévision et de gestion des maladies). Ce travail s'est poursuivi par la thèse de David Morais (2012-2015) dont j'ai été l'encadrant principal. En 2009, alors que les enjeux du réchauffement climatique étaient devenus plus prégnants, j'ai initié un travail sur la réponse et l'adaptation de *Z. tritici* à la température, en

collaboration avec Ivan Sache et Michael Chelle (ECOSYS). Cette thématique a pris de l'importance avec la thèse de Frédéric Bernard (2009-2012), que j'ai co-encadrée.

Au final, les recherches que je mène depuis 2007 sur le système septoriose-blé concernent principalement deux thématiques :

1. Processus épidémiques, initiation et récurrence des épidémies aériennes du blé ;
2. Réponse à la température de populations de *Z. tritici*, conséquences épidémiologiques et potentiel d'adaptation au changement climatique.

J'y reviendrai plus en détails dans la seconde partie de ce mémoire.

**Au** cours des dix dernières années de nouvelles problématiques de biosécurité ont émergé en santé végétale ; j'ai choisi d'y contribuer. Ces problématiques se sont concrétisées par des besoins d'expertise sur les risques sanitaires auxquels sont exposés les agro-écosystèmes, qu'ils résultent de menaces naturelles (épidémies émergentes), accidentelles (justifiant les mesures de quarantaine végétale), ou intentionnelles (actes de malveillance ou d'agroterrorisme). Je me suis positionné sur cette dernière thématique quelques mois après mon recrutement à l'INRA en 2001. Mon intérêt pour la question remonte à 1999, année de mon service national, que j'ai réalisé en tant que scientifique du contingent au pôle Transfert de Technologies Sensibles du Secrétariat Général de la Défense et de la Sécurité Nationale (SGDSN). J'étais alors stimulé par l'originalité de ce sujet "de niche", mais aussi par la conviction que les questions de biosécurité agricole méritaient une attention particulière de la communauté scientifique dans un contexte de mondialisation des échanges. J'ai suivi en 2006 une formation par alternance dispensée par l'Institut des Hautes Etudes de Défense Nationale (IHEDN), qui m'a sensibilisé aux enjeux de défense, de géopolitique, d'intelligence économique et de gestion de crise. J'ai obtenu par la suite une habilitation confidentiel défense (2007-2017).

J'ai développé entre 2004 et 2014 des recherches sur l'analyse des risques épidémiques pesant sur les agro-écosystèmes, en choisissant pour étude de cas la menace agroterroriste. J'ai défini cette menace comme étant l'utilisation délibérée et malveillante d'agents phytopathogènes par un individu, une organisation ou un État, dans le but de provoquer des dommages aux végétaux (cultures, arbres, denrées agricoles), voire d'affecter l'emploi qui pourrait en être fait (production, commercialisation, transformation, consommation ; Latxague et al., 2007). La relation entre l'évaluation de ce type de menace et les travaux de recherche ayant pour finalité la conception de méthodes de gestion de maladies communes n'est pas évidente. C'est au sein de deux projets financés par l'Union européenne (CropBioterror de 2004 à 2008, puis PlantFoodSec de 2011 à 2015) que j'ai relié les deux problématiques. Serait-on capable de différencier l'introduction naturelle d'un agent pathogène d'une introduction d'origine humaine, accidentelle ou intentionnelle ? La réponse est probablement "non", puisqu'à la question "Comment commence une épidémie naturelle ?" il ne peut avoir de réponse unique et définitive. Théoriquement, une seule contamination est suffisante pour déclencher une épidémie. En pratique, les choses sont plus complexes et les connaissances sur les mécanismes impliqués dans le déclenchement (ou non) d'une épidémie sont lacunaires.



J'ai contribué à concevoir des méthodes d'évaluation des risques : typologie de menaces, hiérarchisation de cultures cibles et d'organismes nuisibles, identification de critères pertinents, méthodes de quantification basées sur des schémas classiques d'Analyse de Risques Phytosanitaires (ARP). J'ai été familiarisé dès 2006 avec cette méthodologie, d'origine anglo-saxonne, et m'en suis inspiré alors qu'elle n'était pas encore opérationnelle en France. La démarche que j'ai développée avec mes collègues épidémiologistes (Ivan Sache, Jean Pinon) et sociologues (Marc Barbier, Vincent Cardon) a consisté à caractériser la diversité des menaces et des risques par une approche prospective (conception de scénarios), puis à les évaluer analytiquement. Cette méthodologie a initialement été développée dans le cadre du projet CropBioterror et a été améliorée dans PlantFoodSec (analyse de risque combinatoire probabiliste - modèle GeNIe - appliquée à l'évaluation d'une quinzaine de scénarios prospectifs) en collaboration avec Imperial College (John Holt, Adrian Leach, John Mumford) et le Laboratoire de la Santé des Végétaux de l'ANSES (Corinne Le Fay-Souloy, Bénédicte Moignot). J'anime depuis 2012 un blog d'information et de veille consacré à ce thème (*Cropbiosecurity and Agroterrorism Watch*) sur la plate-forme internet Scoop.it! (<http://www.scoop.it/t/cropbiosecurity>).

La biologie légale (*bioforensic*) appliquée aux agents phytopathogènes a pris une importance croissante dans le contexte de la biosécurité des cultures. Cette discipline consiste à s'appuyer sur des méthodes scientifiques pour mener des investigations visant à identifier l'origine d'un foyer de maladie et, le cas échéant, confondre les auteurs d'actes délictuels ou malveillants. "Tracer" un agent phytopathogène en conditions naturelles ou "remonter sa piste" constitue un défi technologique. Il est généralement nécessaire de s'appuyer sur des méthodes indirectes, d'inférence statistique ou expérimentale. Le point fort de l'épidémiologie végétale est certainement que, pour comprendre comment commence une épidémie, il est la plupart du temps possible d'expérimenter "au champ" sans risque. Les maladies les plus courantes permettent cela, à l'inverse des agents pathogènes de quarantaine ou de la menace agroterroriste dont l'étude en conditions naturelles est exclue. Pour ces raisons, la septoriose et la rouille brune du blé ont été choisies dans PlantFoodSec comme modèles d'étude génériques. La majorité des travaux menés dans l'équipe épidémiologie sur l'initiation et récurrence des épidémies provoquées par ces deux maladies a été financée par ce projet.

À la suite du départ de Christian Lannou (chef du département SPE) en 2013 j'ai accepté d'animer l'équipe épidémiologie. Ma mission inclut la coordination scientifique (orientations thématiques, choix stratégiques), administrative (suivi d'appels d'offre et élaboration de projets, investissements) et de ressources humaines (coordination du recrutement de stagiaires et non-permanents, conduite des entretiens d'activité, gestion de conflits).

Les projets de recherche de l'équipe (sur lesquels je reviendrai à la fin de ce mémoire) se répartissent actuellement en trois axes scientifiques, cohérents avec ceux que j'ai présentés lors l'évaluation de l'unité par l'AERES en 2014. Ces axes ont récemment été réactualisés et correspondent aux orientations scientifiques de l'équipe pour les cinq prochaines années : 1) processus et mécanismes centrés sur l'inoculum ; 2) réponse et adaptation des populations

pathogènes à des facteurs biotiques et abiotiques structurants ; 3) gestion durable des résistances variétales à différentes échelles spatio-temporelles.

Parmi la dizaine de projets de recherche financés auxquels j'ai participé, je souhaite insister sur trois dont j'ai été coordinateur scientifique pour l'INRA : CropBioterror (2004-2008), PlantFoodSec (2011-2016) et récemment Emphasis (2015-2018). Ces trois projets européens ont permis (et vont encore permettre) d'accompagner une partie importante des activités de l'équipe et de collaborer à l'échelle nationale (INRA, ANSES) et internationale (FERA, Université de Turin, Imperial College). J'ai acquis une expérience et des compétences qui dépassent le cadre scientifique (coordination scientifique, gestion financière, etc.).

**J'**ai développé une activité d'expertise, initialement à partir des thématiques biosécuritaires, qui rejoignent désormais des thématiques d'épidémiologie plus classiques. Je suis membre du comité d'expert spécialisé "Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux" (CES RBSV) de l'ANSES depuis 2012. Dans ce cadre, j'ai coordonné en 2013 l'expertise "Analyse de risque phytosanitaire *Plasmopara halstedii* - agent responsable de la maladie du mildiou tournesol" (présidence d'un groupe de travail *ad hoc*) ainsi qu'un avis scientifique et technique relatif à un protocole expérimental de traitement du champignon *Ceratocystis platani* (chancre coloré du platane) le long du Canal du Midi. J'ai participé en 2011 et 2012 à l'évaluation du "risque biologique pour la sécurité nationale" au sein d'une cellule interministérielle pilotée par le SGDSN. J'ai contribué en 2012 aux négociations européennes (*CBRN Advisory Group*) et internationales (*Australia Group*) en proposant une réactualisation de la liste des agents de la menace biologique. Plus récemment j'ai participé avec Samuel Soubeyrand et Astrid Cruaud à une expertise sur la "Gestion des crises sanitaires en santé végétale" commandée par le département SPE, dont le rapport a été remis début 2015. J'accorde actuellement une grande importance à ces activités d'expertise et de consultance, intellectuellement très stimulantes.

## 1.2. Curriculum vitae

### Etat civil

Frédéric Suffert

38 ans, marié, père de trois enfants

Adresse personnelle ..... 78340 Les Clayes-sous-Bois

Adresse professionnelle ..... INRA UMR1290 BIOGER  
Campus AgroParisTech  
F78850 Thiverval-Grignon

E-mail ..... frederic.suffert@versailles.inra.fr

### Parcours universitaire

- Baccalauréat scientifique, série C [1994].
- CPGE Bio Math Sup/Spé (Lycée Pierre de Fermat, Toulouse) [1996].
- Diplôme d'Ingénieur Agronome de l'ENSAR (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes), spécialisation Protection des Plantes et Environnement [1999].
- Doctorat en Sciences (ED Vie Agro Santé - AgroCampus Rennes) [2006].
- Diplôme d'Ancien Auditeur de l'IHEDN (Institut des Hautes Etudes de Défense Nationale) [2006].

### Parcours professionnel

- Scientifique du contingent, SGDSN (Secrétariat Général de la Défense et de la Sécurité Nationale) [1999-2000].
- Ingénieur de recherches 2<sup>ème</sup> classe, INRA UMR1099 BiO3P (Rennes) [2000-2007].
- Ingénieur de recherches 2<sup>ème</sup> classe, INRA UMR1290 BIOGER (Grignon) [2007-2013].
- Ingénieur de recherches 1<sup>ère</sup> classe, responsable d'équipe, INRA UMR1290 BIOGER (Grignon) [depuis 2013].

### Activités d'animation de la recherche

#### ► Animation d'équipe

Responsable de l'équipe épidémiologie des maladies aériennes du blé de l'UMR1290 BIOGER (13 permanents) [depuis 2013].

### ► Coordination de projets de recherches

- **Projet ADAR "Carotte" (Agence de Développement Agricole et Rural).** *Etude des facteurs agro-environnementaux ayant un impact sur le développement des maladies de la carotte* [2004-2006]. Co-coordonateur du partenaire INRA. Co-responsable d'un budget de 86 k€.
- **Projet innovant SPE "Inoculum Primaire" (INRA SPE).** *Polyétisme des maladies aériennes et mobilisation de l'inoculum* [2007-2009]. Principal contributeur (coordinateur I. Sache).
- **Projet FSOV "Septoriose" (Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale).** *Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par Z. tritici* [2008-2011]. Coordinateur du partenaire INRA. Co-responsable d'un budget de 57 k€.
- **Projet Européen AC "CropBioterror" (6e PCRD UE).** *Crop and food biosecurity and provision of the means to anticipate and tackle crop bioterrorism* [2004-2008]. Responsable de la tâche *Plant pathogens as agroterrorist weapons: Assessment of the threat for European agriculture and forestry* et coordinateur scientifique pour l'INRA (BiO3P Rennes, BIOGER, Pathologie Forestière Nancy, SenS Grignon). Responsable d'un budget de 115 k€.
- **Projet innovant "Changement Climatique" (INRA SPE).** *Adaptation des parasites au changement climatique : influence de la température sur les processus infectieux de Z. tritici, agent de la septoriose du blé* [2010-2012]. Principal contributeur (coordinateur I. Sache).
- **Projet Européen ReX "PlantFoodSec" (7e PCRD UE).** *Plant and food biosecurity* [2011-2015]. Responsable de la tâche *Plant disease epidemiology applied to crop biosecurity* et coordinateur scientifique du partenaire INRA-ANSES (BIOGER, BioSP Avignon, SenS Marne-la-Vallée, ANSES-LSV Angers). Responsable d'un budget de 639 k€.
- **Projet "SeptoVar" (LabEx BASC).** *Réponses de populations locales de Z. tritici aux variations spatiales de deux facteurs agro-environnementaux majeurs - température et résistance variétale - et inférence de leur potentiel d'adaptation aux changements globaux* [2014-2016]. Coordinateur du projet (BIOGER et ECOSYS Grignon, CNRS IRBI Tours, ARVALIS-Institut du Végétal). Responsable d'un budget de 20 k€.
- **Projet Européen RIA "Emphasis" (H2020 UE).** *Effective management of pests and harmful alien species - Integrated solutions* [2015-2018]. Coordinateur scientifique du partenaire INRA (BIOGER et IRHS Angers) au sein d'un consortium constitué de 21 partenaires. Responsable d'un budget de 396 k€.

### ► Encadrement de doctorants

- **R. Ben Slimane [2007-2010].** Co-encadrant d'un chapitre et membre du comité de thèse (co-directeurs de thèse : P. Bancal et M-O. Bancal). *Effets de la septoriose foliaire sur la*

*sénescence et les flux d'azote pendant le remplissage des grains chez le blé tendre. Soutenue le 15 décembre 2010.*

• **F. Bernard [2009-2012]. Co-encadrant** (directeur de thèse : M. Chelle ; second co-encadrant : I. Sache). *Sensibilité à la température des processus épidémiques à l'échelle de la feuille et du peuplement : prise en compte de la température foliaire pour modéliser une épidémie de septoriose du blé.* Bourse INRA/ARVALIS-Institut du Végétal. Soutenue le 10 décembre 2012.

• **D. Morais [2011-2015]. Encadrant principal** (directeur de thèse : I. Sache ; co-encadrante : V. Laval). *Les déterminants des phases épidémiques précoces de la septoriose du blé (Z. tritici) : quantité, efficacité et origine de l'inoculum primaire.* Bourse INRA financée par le projet PlantFoodSec. Soutenue le 2 avril 2015.

#### ▶ **Encadrement de personnel sous contrat à durée déterminée**

• **A. Mimet. CDD IE 8 mois [2006].** *Identification et hiérarchisation des facteurs liés au sol et au système de culture ayant un impact sur le développement du cavity spot dans le bassin de production de Créances (Normandie).*

• **E. Latxague. CDD IR 14 mois [2005].** *Développement d'une méthodologie d'analyse du risque lié à l'utilisation malveillante d'agents phytopathogènes en Europe.*

• **O. El Kamel. CDD IE 6 mois [2012].** *Elaboration de TPC de composantes d'agressivité de populations de Z. tritici provenant de zones contrastées par leur amplitude thermique.*

• **B. Moignot. CDD IR (ANSES) 4 mois [2013].** *Elaboration et analyse de scénarios d'agroterrorisme par une estimation combinatoire probabiliste du risque.*

• **G. Gazeau. CDD AI 3 mois [2014].** *Génotypage de descendants issus de croisements d'isolats parentaux de Z. tritici.*

• **G. Delestre. CDD AI 8 mois [2014-2015].** *Mise au point d'une méthode miniaturisée d'estimation du développement in vitro de Z. tritici en réponse à la température.*

#### ▶ **Encadrement de stagiaires**

• **E. Remy [2002].** Licence Biologie Végétale (Université de Rennes).

• **V. Boaglio [2003].** Stage de deuxième année de cycle ingénieur (Montpellier SupAgro).

• **J. Beuzelin [2003].** Licence Biologie Végétale (Université de Rennes).

• **D. Delalande [2004].** DESS Production Végétales (AgroCampus Ouest). *Quantification des processus infectieux de type secondaire à l'échelle de la racine dans le cas d'une épidémie de cavity spot de la carotte.*

• **A. Picot [2007].** DAA Protection des Plantes et Environnement (AgroParisTech). *Epidémiologie des fusarioses toxigènes du blé.* Co-encadrant.

• **M. Tliha [2008].** Master M2 Santé des Plantes. *Etude des cinétiques de développement et de sporulation de lésions provoquées par Z. tritici.*

- **R. Sekar-Lecomte [2009]**. Master 2 Sciences de la Vie et de la Santé (Université Toulouse Paul Sabatier). *Caractérisation de l'inoculum primaire de Z. tritici en relation avec la dynamique précoce d'une épidémie de septoriose du blé*. Co-encadrant.
- **D. Morais [2011]**. Master 2 Infectiologie, Microbiologie, Virologie, Immunologie (Université Paris 7). *Détection et quantification de l'inoculum primaire de Z. tritici*. Co-encadrant.
- **J. Legeay [2015]**. Master 2 Science du Végétal (Université Paris-Sud). *Variabilité des réponses à la température de populations françaises de Z. tritici*.

#### ▶ Activités d'expertises

- **Animateur du sous-groupe Santé du Végétal d'une cellule interministérielle pilotée par le SGDSN** chargée de l'analyse et l'évaluation du risque biologique pour la sécurité nationale [2010-2012].
- **Actualisation de la liste internationale des agents de la menace biologique** au niveau européen (*CBRN Advisory Group*) et international (*Australia Group*) [2011-2013].
- **Membre du CES ANSES Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux** [depuis 2012].
  - Coordination de l'expertise ANSES *Analyse de risque phytosanitaire Plasmopara halstedii - agent responsable de la maladie du mildiou tournesol* [2013-2014] ;
  - Coordination de l'avis scientifique *Analyse du protocole de lutte contre Ceratocystis platani par micro-injection de fongicides* [2014] ;
  - Validation de 21 rapports d'expertise et avis scientifiques [2012-2015].
- **Membre de la cellule sécurité DG INRA**, correspondant *Santé du Végétal* [depuis 2012].
- **Participation à une réflexion sur la gestion des crises sanitaires en santé végétale pour le département SPE** [2015].

#### ▶ Contributions significatives à l'organisation de manifestations scientifiques

- **9th International Workshop on Plant Disease Epidemiology** [2005], Landerneau. Membre du comité local d'organisation.
- **3rd European Crop Biosecurity Workshop** [2007], Paris. Organisateur.
- **8e Colloque National de la Société Française de Phytopathologie** [2012], Paris. Membre du comité local d'organisation et du comité scientifique.
- **10e Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la SFP** [2014], Aussois. Membre du comité local d'organisation et animateur d'une session.

#### ▶ Divers

Membre élu du conseil d'administration de la Société Française de Phytopathologie [2004-2015].

## Liste de travaux

### ► **Articles scientifiques** (personne encadrée soulignée)

- [A1] **Suffert F** (2005) Cadre théorique de la notion de complémentation caractérisant des stratégies de protection des cultures. *Phytoprotection* **86**: 89-92. <http://dx.doi.org/10.7202/012509ar>
- [A2] **Suffert F**, Guibert M (2007) The ecology of a *Pythium* community in relation to the epidemiology of carrot cavity spot. *Applied Soil Ecology* **35**: 488-501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.10.003>
- [A3] **Suffert F** (2007) Modelling of the kinetics of carrot cavity spot caused by a complex of pathogenic agents of the genus *Pythium* dominated by *Pythium violae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **29**: 41-55. <http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507436>
- [A4] **Suffert F**, Montfort F (2007) Demonstration of secondary infection by *Pythium violae* in epidemics of carrot cavity spot using root transplantation as method of soil infestation. *Plant Pathology* **56**: 588-594. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01566.x>
- [A5] Desprez-Loustau ML, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, **Suffert F**, Sache I, Rizzo D (2007) The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 472-480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2007.04.005>
- [A6] Latxague E, Sache I, Pinon J, Andrivon D, Barbier M, **Suffert F** (2007) A methodology for assessing the risk posed by the deliberate and harmful use of plant pathogens in Europe. *EPPO Bulletin* **37**: 427-435. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2338.2007.01118.x>
- [A7] **Suffert F**, Montfort F (2008) Pathometric relationships reveal epidemiological processes involved in carrot cavity spot epidemics. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 425-436. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-008-9309-y>
- [A8] **Suffert F**, Delalande D, Prunier M, Andrivon D (2008) Modulation of primary and secondary infections in epidemics of carrot cavity spot through agronomic management practices. *Plant Pathology* **57**: 109-121. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01708.x>
- [A9] **Suffert F**, Lucas JM (2008) Lateral roots of carrot have a low impact on alloinfections involved in a cavity spot epidemic caused by *Pythium violae*. *Journal of General Plant Pathology* **74**: 296-301. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-008-0104-6>
- [A10] **Suffert F**, Latxague E, Sache I (2009) Plant pathogens as agroterrorist weapons: Assessment of the threat for European agriculture and forestry. *Food Security* **1**: 221-232. <http://dx.doi.org/10.1007/s12571-009-0014-2>
- [A11] Gosme M, **Suffert F**, Jeuffroy MH (2010) Intensive versus low-input cropping systems: What is the optimal partitioning of agricultural area in order to reduce pesticide use while maintaining productivity? *Agricultural Systems* **103**: 110-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2009.11.002>
- [A12] **Suffert F**, Sache I, Lannou C (2011) Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**: 166-177. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02369.x>

- [A13] **Suffert F**, Sache I (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* **60**: 878-889. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02455.x>
- [A14] **Ben Slimane R**, Bancal P, **Suffert F**, Bancal M-O (2011). Localized septoria leaf blotch lesions in winter wheat flag leaf do not accelerate apical senescence during necrotrophic stage. *Journal of Plant Pathology* **94**: 543-553. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.055>
- [A15] **Bernard F**, Sache I, **Suffert F**, Chelle M (2013) The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature! *New Phytologist* **198**: 232-240. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12134>
- [A16] **Suffert F**, Sache I, Lannou C (2013) Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**: 1330-1341. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12050>
- [A17] Siou D, Gelisse S, Laval V, Repinçay C, Canalès R, **Suffert F**, Lannou C (2013). Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathology* **63**: 390-399. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12106>
- [A18] Gautier A, Marcel T, Confais J, Crane C, Kema G, **Suffert F**, Walker A-S (2014) Development of a rapid multiplex SSR genotyping method to study populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *BMC Research Notes* **7**: 373. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-7-373>
- [A19] Siou D, Gélisse S, Laval V, Repinçay C, Bourdat-Deschamps M, **Suffert F**, Lannou C (2015) Interactions between head blight pathogens: consequences on disease development and toxins production in wheat spikes. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 957-965. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02879-14>
- [A20] **Morais D**, Laval V, Sache I, **Suffert F** (2015) Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (*Septoria tritici* blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology*, sous presse. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12372>
- [A21] **Morais D**, Sache I, **Suffert F\***, Laval V (2015) Is onset of *Septoria tritici* blotch epidemics related to local availability of ascospores? *Plant Pathology*, sous presse [\*co-dernier auteur]. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12408>
- [A22] Siou D, Gélisse S, Laval V, **Suffert F**, Lannou C (2015) Mutual exclusion between fungal species of the FHB complex in a wheat spike. *Applied and Environmental Microbiology*, sous presse. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00525-15>

#### Articles en révision

- [A23] **Suffert F**, Ravigné V, Sache I (2015) Can short-term selection for fitness traits in a fungal plant pathogen be driven by seasonal changes? A case study in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*, accepté sous réserve de modifications.



### Articles en préparation

- [A24] Morais D, Laval V, Sache I, **Suffert F**. Inferring the origin of primary inoculum of *Zymoseptoria tritici* from local host adaptation of resident and immigrant populations. En préparation.
- [A25] Morais D, Duplaix C, Sache I, Laval V, **Suffert F\***, Walker A-S. Diversity and structure of *Zymoseptoria tritici* populations at a small spatiotemporal scale: overall genetic stability and sporadic signs of differentiation are not contradictory [\*co-dernier auteur]. En préparation.
- [A26] Bernard F, El Kamel O, Pincebourde S, Sache I, **Suffert F\***, Chelle M. Daily fluctuations in leaf temperature modulate the development of a foliar pathogen [\*co-dernier auteur]. En préparation.
- [A27] **Suffert F**, Delestre G, Carpentier F, Walker AS, Gazeau G, Gélisse S, Duplaix C. The best way to have a fruitful rendez-vous is to be a little late, but not too much: How co-infection timing affects the ability of *Zymoseptoria tritici* to reproduce sexually. En préparation.
- [A28] Garreta V, Soubeyrand S, Morris C, Monteil C, Moinard J, Berder J, Goyeau H, **Suffert F**, Sache I. Analyzing links between sparse observed haplotype compositions. En préparation.

### ► Chapitres d'ouvrage

- [O1] Stack J, **Suffert F**, Gullino ML (2010) Bioterrorism: A threat to plant biosecurity? In: *The role of plant pathology in food safety and food security*, Gullino ML et Strange RN (Eds), Springer, Dordrecht, 115-132. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8932-9\\_10](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8932-9_10)
- [O2] **Suffert F** (2010) Emergences épidémiologiques non-conventionnelles et analyse de risque : le cas de la biosécurité agricole et de l'agroterrorisme. In: *Les maladies émergentes. Épidémiologie chez le végétal, l'animal et l'homme*, Barnouin J et Sache I (Eds), Quae Editions, Versailles, 373-384. ISBN- 978-2-7592-0510-3
- [O3] Sache I, Roy A-S, **Suffert F**, Desprez-Loustau M-L (2011) Invasive plant pathogens in Europe. In: *Biological invasions: Economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*, Pimentel D (Eds.), CRC Press, London, 227-242. <http://dx.doi.org/10.1201/b10938-14>

### Chapitre d'ouvrage en préparation

- [O4] **Suffert F**, Lepoivre P. Chapitre VI : Société et risques - Evaluation et gestion des risques phytosanitaires, production et utilisation des savoirs. In: *Phytopathologie*, Reignault P et Lepoivre P (Eds.), De Boeck, Louvain-la-Neuve. En préparation.

### ► Articles de vulgarisation

- [V1] **Suffert F** (2002) L'épidémiologie végétale, nouvelle discipline de guerre ? Lumière sur le bioterrorisme agricole, un enjeu émergent pour la recherche agronomique. *Le Courrier de l'Environnement* **47**: 57-69.
- [V2] **Suffert F** (2003) L'utilisation volontaire d'agents phytopathogènes contre les cultures. *Phytoma* **563**: 8-12.
- [V3] **Suffert F** (2007) Cavity spot de la carotte, l'épidémiologie appliquée à la gestion des risques parasitaires. Comprendre et modéliser les mécanismes d'une maladie d'origine tellurique dans une perspective de protection intégrée. *Phytoma* **601**: 36-40.
- [V4] **Suffert F**, Barbier M, Sache I, Latxague E (2008) Biosécurité des cultures et agroterrorisme. Une menace, des questions scientifiques et une opportunité : réactiver un dispositif d'épidémiologie. *Le Courrier de l'Environnement* **56**: 67-86.
- [V5] Barbier M, Sache I, Prete G, **Suffert F** (2009) Cultures en péril ? L'affaire de tous. *Pour La Science* **65**: 110-115.

### ► Communications (orateur souligné)

*Congrès avec actes*

- [C1] Sache I, **Suffert F**, Huber L (2000) A field evaluation of the effect of rain on wheat rust epidemics. *10th International Conference on Cereal Rusts and Powdery Mildews*, 28 août au 1er septembre 2000, Budapest, Hongrie. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **35**: 273-277.
- [C2] Montfort F, Breton D, Béasse C, **Suffert F** (2005) Current research performed at INRA on soilborne diseases of carrot. *31st International Carrot Conference*, Longueuil, Canada, 11-14 septembre 2005, *Phytoprotection* **86**: 140-141.
- [C3] Gullino ML, **Suffert F**, Dehne H, Thomas J, Barker I, Gamliel A, Bonifert M, Stack J, Fletcher J, Abd-ElSalam K (2006) Crop and food biosecurity: first results of European research. *Phytopathology* **97**: S44.
- [C4] **Suffert F**, Guibert M, Montfort F (2008) Advances in the epidemiology of carrot cavity spot caused by *Pythium* sp. *9th International Congress of Plant Pathology*, 24-29 Août 2008, Torino, Italie. *Journal of Plant Pathology* **90**: 422-423.
- [C5] Gullino ML, **Suffert F**, Stack J (2008) Bioterrorism and biosecurity. *9th International Congress of Plant Pathology*, Torino, Italie, 24-29 Août 2008. *Journal of Plant Pathology* **90**: 71.
- [C6] **Suffert F**, Latxague E, Sache I (2008) Evaluation of the risk posed by the deliberate use of plant pathogens as anti-crop weapons in Europe. *9th International Congress of Plant Pathology*, 24-29 août 2008, Torino, Italie. *Journal of Plant Pathology* **90**: 65-66.

[C7] Gullino ML, Thomas J, Henry C, Dehne H, **Suffert F**, Bonifert M, Mumford J, Alpas H, Bertin A, Marelli, Gamliel, Fletcher J, Stack J Barker I, Gamliel A, Stack (2011) Plant and food biosecurity: A network of excellence funded by the European Union. *Phytopathology*, 101: S65.

*Congrès sans actes*

[C8] **Suffert F**, Guibert M, Beuzelin J (2003) Evolution intra et inter-annuelle du complexe *Pythium* spp. responsable d'une épidémie de cavity spot sur carottes et caractérisation biologique des espèces incriminées. *5e Rencontres du Groupe Oomycètes de la Société Française de Phytopathologie*, 11-12 septembre 2003, Colmar, France.

[C9] **Suffert F**, Delalande D, Montfort F (2005) Effect of cropping factors on secondary infection in a carrot cavity spot epidemic. *9th International Workshop on Plant Disease Epidemiology*, 11-15 avril 2005, Landerneau, France.

[C10] **Suffert F**, Sache I, Pinon J, Barbier M, Andrivon D (2005) Fondements scientifiques d'une caractérisation multicritère des agents phytopathogènes utilisables à des fins d'agroterrorisme. *Premières Rencontres Francophones "Invasions Biologiques et Traits d'Histoire de Vie"*, 30 juin et 1er juillet 2005, Rennes, France.

[C11] **Suffert F**, Delalande D, Montfort F (2005) Effect of three cropping factors on secondary infection in a carrot cavity spot epidemic. *31st International Carrot Conference*, Longueuil, Canada, 11-14 septembre 2005. *Phytoprotection* 86: 145-146.

[C12] Latxague E, Sache I, Pinon J, Andrivon D, Barbier M, **Suffert F** (2006) Crop biosecurity requires a specific methodology of risk assessment. *1st European Crop Biosecurity Workshop*, 15 mai 2006, Cambridge, Royaume Uni.

[C13] **Suffert F** (2006) Comprendre et modéliser le développement d'une épidémie d'origine tellurique : l'exemple du cavity spot de la carotte. *8e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes*, AFPP, 5-6 décembre 2006, Tours, France.

[C14] **Suffert F**, Sache I, Pinon J, Andrivon D, Barbier M, Latxague E (2007) A methodology for assessing the risk posed by the deliberate and harmful use of plant pathogens in Europe. *2nd European Crop Biosecurity Workshop*, 7-8 mai 2007, Budapest, Hongrie.

[C15] **Suffert F**, Guibert M, Prunier M, Montfort F (2007) Advances in epidemiology and ecology of a pathogenic *Pythium* complex. Perspectives for integrated management of carrot cavity spot. *32nd International Carrot Conference*, 7-9 septembre 2007, Arcachon, France.

[C16] Robin C, Sache I, Blancard D, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Husson C, Lung B, Moreau PA, Rizzo D, Selosse MA, **Suffert F**, Desprez-Loustau ML (2007) La dimension fongique des invasions biologiques. *2e Rencontres Francophones "Invasions Biologiques et Traits d'Histoire de Vie"*. 14-16 novembre 2007, Rennes, France.

[C17] **Suffert F** (2007). Potential use of plant pathogens in agroterrorism: Which native, emerging, or introduced pathogens may be a threat for crop biosecurity in Europe? *3rd European Crop Biosecurity Workshop*, 27-28 novembre 2007, Paris, France.

- [C18] **Suffert F** (2007). Assessment of the risk of deliberate and harmful use of plant pathogens in Europe. *3rd European Crop Biosecurity Workshop*, 27-28 novembre 2007, Paris, France.
- [C19] **Sache I**, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, **Suffert F**, Rizzo D, Desprez-Loustau ML (2008) Les champignons, petits et grands, des espèces invasives ? *6e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 14-18 janvier 2008, Aussois, France.
- [C20] **Picot A**, **Suffert F**, Gélisse S, Forget F, Atanasova-Penichon V, Pinson-Gadais L, Laval V, Gautier A, Lannou C (2008) Relationship between severity, fungal biomass and mycotoxin production in Fusarium head blight. *6e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 14-18 janvier 2008, Aussois, France.
- [C21] **Barbier M**, Sache I, **Suffert F** (2009) Crop protection expertise and agroterrorism: from matter of concerns to matter of facts. *Seminarium odbędzie się w dniu*, 15 avril 2009, IHAR Radzikowie, Pologne.
- [C22] **Suffert F** (2009) Epidémiologie de la septoriose du blé : un parasite aux multiples facettes. *Colloque Septoriose Bayer CropScience*, 31 mars 2009, Paris, France.
- [C23] **Suffert F**, Latxague E, Sache I (2009) Biosécurité des cultures et agroterrorisme : leçons à tirer d'une évaluation des risques. *7e Congrès de la Société Française de Phytopathologie*, 8-11 juin 2009, Lyon, France.
- [C24] **Sache I**, Berder J, Moinard J, Soubeyrand S, **Suffert F**, Goyeau H (2009) La récurrence interannuelle des épidémies de rouille brune du blé s'explique-t-elle à l'échelle du bassin de production ? *7e Congrès de la Société Française de Phytopathologie*, 8-11 juin 2009, Lyon, France.
- [C25] **Suffert F** (2009) Biosécurité des cultures et agroterrorisme: une évaluation des risques est-elle possible ? *Colloque AMPP sur la Gestion des risques phytosanitaires*, 9-11 novembre 2009, Marrakech, Maroc.
- [C26] **Ben Slimane R**, **Suffert F**, Jean Jacques J, Bancal P, Bancal MO (2009) Impact de la septoriose foliaire du blé sur la sénescence apicale. *8e Journées Biotechnologiques de l'Association Tunisienne de Biotechnologie*, 20-23 décembre 2009, Sousse, Tunisie.
- [C27] **Suffert F**, Bernard F, Galet N, Chelle M, Sache I, Lannou C (2011) Assessment of aggressiveness components of *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 11-14 septembre 2011, Mexico, Mexique.
- [C28] **Bernard F**, Chelle M, **Suffert F**, Sache I (2011) Is leaf temperature the actual thermal driver of *Mycosphaerella graminicola* development? *8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 11-14 septembre 2011, Mexico, Mexique.
- [C29] **Gouache G**, Hourcade D, Lebrun MH, Marcel T, Deller S, Audeon C, Goyeau H, **Suffert F**, Michelet C, Robert O, Cadot V, Kema GHJ (2011) Developing and sharing tools to bring benefits of resistance to *Mycosphaerella graminicola* to wheat growers in France: from breeding to cultivar registration and extension. *8th International Symposium on*

*Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 11-14 septembre 2011, Mexico, Mexique. Book of abstracts, p. 54.

- [C30] Sache I, Roy A-S, **Suffert F**, Desprez-Loustau M-L (2012) Une épidémie, combien ça coûte ? *9e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 16-20 janvier 2012, Aussois, France.
- [C31] Moignot B, Ouvrard F, Mouttet R, **Suffert F**, Reynaud P (2012) How to prioritize the development of diagnostic tests for plant pests based on a risk ranking tool? *QBOL/EPPO Conference on DNA barcoding and diagnostic methods for plant pests*, 21-25 mai 2012, Haarlem, Pays-Bas.
- [C32] Bernard F, Sache I, **Suffert F**, Chelle M (2012) Which temperature to simulate foliar epidemics × crop architecture interactions? *Conférence internationale Epidemiology-Canopy-Architecture (ECA)*, 1er-5 juillet 2012, Rennes, France.
- [C33] Girardin G, Gigot C, Robert C, de Vallavieille-Pope C, **Suffert F**, Saint-Jean S (2012) Effect of wheat canopy architecture and rain characteristics on septoria tritici splash-borne spores. *Conférence internationale Epidemiology-Canopy-Architecture (ECA)*, 1er-5 juillet 2012, Rennes, France.
- [C34] **Suffert F**, Sache I (2012) Adaptation saisonnière des composantes d'agressivité d'une population locale de *Mycosphaerella graminicola* - agent de la septoriose du blé - à la température hivernale et au stade phénologique de son hôte. *8e Congrès de la Société Française de Phytopathologie*, 5-8 juin 2012, Paris, France.
- [C35] **Suffert F**, Sache I, Ravigné V (2013) Les populations de *Mycosphaerella graminicola* s'adaptent-elles aux modifications saisonnières de leur environnement ? *8e Conférence du REID*, 4-6 février 2013, Bordeaux, France.
- [C36] Sache I, Berder J, Garreta V, Goyeau H, Moinard J, Soubeyrand S, **Suffert F** (2013) Récurrence interannuelle d'un champignon parasite obligatoire d'une culture annuelle. *8e Conférence du REID*, 4-6 février 2013, Bordeaux, France.
- [C37] Mumford JD, **Suffert F**, Leach AW, Holt J, Sache I, Le Fay-Souloy C, Barbier M, Hamilton RA (2013) Quantification and interpretation of risk for security, trade, food and environment. *10th International Congress of Plant Pathology*, 25-30 août 2013, Beijing, Chine.
- [C38] Sache I, Batina H, Elbelt S, Morais D, **Suffert F**, Laval V (2013) À la poursuite de la spore : élucider le déclenchement des épiphyties d'origine fongique. *MicrobAERO2013. Colloque National Microbiologie des Aérosols (MicrobAERO)*, 7-9 octobre 2013, La Bourboule, France.
- [C39] **Suffert F** (2014) *Mycosphaerella graminicola* : même les hyperactifs sexuels ont parfois besoin d'un bon entremetteur. *10e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 27-31 janvier 2014, Aussois, France.

## ► Posters

- [P1] Huber L, Sache I, Geagea L, **Suffert F**, McCartney HA (2000) Effects of rain on dispersal of wheat rust spores. *2nd European Symposium on Aerobiology*, 5-9 septembre 2000, Vienne, Autriche.
- [P2] **Suffert F**, Sache I, Huber L (2000). Effets de divers types de pluie sur la dispersion de spores de rouille jaune (*Puccinia striiformis*) et de rouille brune (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) sur blé. *6e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes ANPP*, 6-8 décembre 2000, Tours, France.
- [P3] Sache I, Cogniat E, Flura D, Geagea L, Huber L, **Suffert F** (2001) Effets de la pluie sur la progression épidémique des rouilles du blé. *5e Congrès de la Société Française de Phytopathologie*, 26-29 mars 2001, Angers, France.
- [P4] **Suffert F**, Guibert M, Prunier M, Montfort F (2002) Influence de la densité d'inoculum sur le développement d'une épidémie de cavity-spot sur carottes causées par *Pythium violae* en conditions naturelles. *4e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 13-17 mars 2002, Aussois, France.
- [P5] **Suffert F**, Guibert M (2003) Evolution d'un complexe *Pythium* responsable du cavity spot de la carotte après infestation de parcelles par *P. violae* : conséquences sur l'interprétation d'essais en plein champ. *7e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes AFPP*, 3-5 décembre 2003, Tours, France.
- [P6] **Suffert F**, Guibert M, Beuzelin J, Montfort F (2005) Ecologie d'un complexe de *Pythium* associés à la carotte : évolution de la diversité inter-spécifique après infestation d'un sol par *P. violae* - Conséquence sur l'épidémiologie du cavity spot. *6e Congrès de la Société Française de Phytopathologie*, 23-24 février 2005, Toulouse, France.
- [P7] **Suffert F**, Latxague E, Sache I, Pinon J, Andrivon D, Barbier M, Gullino ML (2005) Multicriterial characterisation of plant pathogens usable for agroterrorism prevention in Europe. *International Plant Health Risk Analysis Workshop*, 24-28 octobre 2005, Niagara Falls, Canada.
- [P8] Euzen A, Fournet S, **Suffert F**, Bissuel C (2007). Diagnosis method for assessing the influence of farming factors on carrot yield variations due to soil pathogens (fungus and nematodes). The case of Landes, south west of France. *32nd International Carrot Conference*, 7-9 septembre 2007, Arcachon, France.
- [P9] Bernard F, Chelle M, Sache I, **Suffert F**, Fortineau A, Duhamel F (2011) La température de feuille comme nouvel indicateur de développement des symptômes de septoriose du blé : le cas de la période d'incubation. *Journées de l'Ecole doctorale ABIES*, 29- 30 mars 2011, Paris, France.
- [P10] **Suffert F**, Galet N, Sache I (2011) Effect of wheat debris as source of primary inoculum on the early stages of septoria leaf blotch epidemics. *8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 11-14 septembre 2011, Mexico, Mexique. Book of abstracts, p. 80.

- [P11] Bernard F, Fortineau A, Duhamel F, Sache I, Chelle M, **Suffert F** (2011) An optimized method to study the response to temperature of *Mycosphaerella graminicola* on wheat adult plants grown in controlled conditions. *8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 11-14 septembre 2011, Mexico, Mexique. Book of abstracts, p. 66.
- [P12] Girardin G, Gigot C, Robert C, de Vallavieille-Pope C, **Suffert F**, Saint-Jean S (2011) Effect of wheat canopy architecture and rain characteristics in splash dispersal of *Mycosphaerella graminicola* pycnidiospores. *8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of Cereals*, 11-14 septembre 2011, Mexico, Mexique. Book of abstracts, p. 85.
- [P13] **Suffert F**, Sache I, Lannou C (2012) Quantification des composantes d'agressivité de *Mycosphaerella graminicola*, agent de la septoriose du blé. *9e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 16-20 janvier 2012, Aussois, France.
- [P14] Morais D, **Suffert F**, Sache I, Laval V (2012) Détection et quantification des ascospores de *Mycosphaerella graminicola* responsables de la phase précoce des épidémies de septoriose du blé. *9e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 16-20 janvier 2012, Aussois, France.
- [P15] Bernard F, Sache I, **Suffert F**, Chelle M (2012) Temperature across scales, from phylloclimate to mesoclimate: what about foliar fungal pathogen development? *8e Congrès de la Société Française de Phytopathologie*, 5-8 juin 2012, Paris, France.
- [P16] Vidal T, Gigot C, Girardin G, Robert C, de Vallavieille-Pope C, **Suffert F**, Huber L, Saint-Jean S (2014) Effet de l'architecture d'un couvert de blé et des caractéristiques pluviométriques sur la dispersion par éclaboussement de *Mycosphaerella graminicola* en conditions contrôlées. *10e Rencontres de Phytopathologie / Mycologie*, 27-31 janvier 2014, Aussois, France.
- [P17] Bernard F, El Kamel O, Fortineau A, Sache I, Chelle M, **Suffert F** (2014) Is the annual amplitude of temperatures a driving force for fungal pathogen population adaptation? *Workshop HETEROCLIM - The response of organisms to climate change in heterogeneous environments*, 10-14 juin 2014, Loches, France.
- [P18] Bernard F, El Kamel O, Fortineau A, Pincebourde S, Chelle M, Sache I, **Suffert F** (2014) The development of a fungal pathogen is affected by daily fluctuations of leaf temperature. *Workshop HETEROCLIM - The response of organisms to climate change in heterogeneous environments*, 10-14 juin 2014, Loches, France.
- [P19] Vidal T, Lusley P, Gigot C, Leconte M, **Suffert F**, de Vallavieille-Pope C, Huber L, Saint-Jean S (2015) Effects of wheat varietal resistance level and rainfall characteristics on splash dispersal of septoria tritici blotch. *APS Annual Meeting*, 1-5 août 2015, Pasadena, USA.

### ► **Rapports d'expertise** (coordinateur souligné)

- [E1] **Suffert F** (2007) Analyse de scénarios d'agroterrorisme : une approche prospective de la biosécurité des cultures. *Rapport 2004-2007 des travaux de recherche et d'expertise menés dans le cadre du projet CropBioterror*, INRA-SGDSN (rapport confidentiel), 107 p.
- [E2] **Suffert F** et al. (2014) Analyse de risque phytosanitaire *Plasmopara halstedii* - agent responsable de la maladie du mildiou tournesol. In: *Avis de l'ANSES (saisine 2012-SA-0159) et rapport d'expertise collective du CES Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux*, ANSES (rapport public), 122 p. <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/SVEG2012sa0159Ra.pdf>
- [E3] **Suffert F** et al. (2015) Avis relatif à un protocole expérimental de traitement par micro-injection de fongicides dans le cadre de la lutte contre le chancre coloré du platane (*Ceratocystis platani*) et évaluation des risques de dissémination de l'organisme nuisible lié à la mise en œuvre de cette expérimentation. In: *Avis de l'ANSES (saisine 2014-SA-0227) et rapport d'expertise collective du CES Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux*, ANSES (rapport confidentiel), 19 p.
- [E4] **Soubeyrand S**, **Suffert F**, Cruaud A (2015) Réflexion sur la gestion des crises sanitaires en santé végétale. Rapport d'expertise remis au Chef du Département SPE le 9 mars 2015, INRA (rapport confidentiel), 29 p.

### ► **Mémoires diplômants**

- [M1] **Suffert F** (1999) Effet du climat sur la progression au champ d'épidémies de rouille jaune (*Puccinia striiformis* Westend.) et de rouille brune (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. tritici) sur blé. Mémoire de DAA, AgroCampus Ouest, 30 p.
- [M2] **Suffert F** (2006) Epidémiologie du cavity spot de la carotte. Perspectives d'application en protection intégrée. Thèse de Doctorat, Agrocampus Ouest, 336 p. <http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/11/92/68/PDF/suffert-these.pdf>



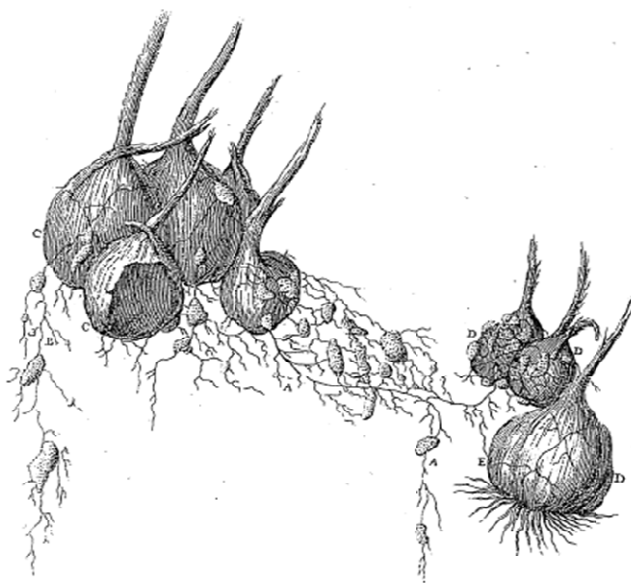
## **2. Synthèse des travaux de recherche - Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum : une approche fonctionnelle et expérimentale de l'épidémiologie végétale**

### **2.1. Processus et mécanismes, au cœur de la représentation du fonctionnement d'une épidémie**

Au 18<sup>e</sup> siècle, une maladie décime les cultures de safran (*Crocus sativus*) et plonge les familles paysannes de la région du Gâtinais dans la misère. En 1722, le jeune botaniste Henri Louis Duhamel de Monceau se voit confié le soin d'enrayer "la mort du safran". À partir d'observations il établit qu'un agent biologique infectieux en est la cause. En débarrassant des bulbes infectés de leur terre il observe la présence de fins filaments violets, qu'il suspecte d'être l'agent biologique à l'origine des symptômes, et que Prillieux (1882) identifiera plus tard comme étant le champignon parasite *Rhizoctonia violacea* (Fig. 1). Les résultats de ces travaux sont publiés en 1728 dans les Mémoires de l'Académie des Sciences (Duhamel du Monceau, 1728). L'article, redécouvert par Zadoks (1981) il y a une trentaine d'années, fait de Duhamel du Monceau le précurseur de l'épidémiologie végétale moderne (science des maladies des peuplements végétaux ; Van der Plank, 1963). Duhamel du Monceau réalise en effet une première expérience de contamination de plants sains et prouve le caractère contagieux de la maladie, qui se développe en cercle autour de plantes déjà malades [1]. Il interprète cette configuration spatiale comme étant l'expression mécaniste d'un processus physique, si on se réfère à la première partie du titre de son article ("Explication physique d'une maladie").

[1] *"Et j'ai été surpris des désordres que cause cette maladie dans les endroits qui ont le malheur d'en être affligés. Et qui ne le serait pas en effet, de voir qu'une plante attaquée d'une maladie devient meurtrière des autres de son espèce ? En avait-on jusqu'ici remarqué de contagieuses épidémiques dans les plantes ? Celle qui attaque l'oignon du safran est cependant de cette nature, puisque semblable à la peste des animaux, elle gâte les oignons voisins..."* (Duhamel du Monceau, 1728)

En s'appuyant sur ses observations et sur la généralisation du processus épidémique ainsi suspecté (contamination plante-à-plante), Duhamel du Monceau préconise d'isoler par des tranchées les plantes saines des parties des champs où se trouvent les plantes contaminées pour limiter le développement de la maladie. Ce type de pratiques culturales a été proposé depuis pour limiter le développement de foyers de maladies telluriques en systèmes légumiers ou de grandes cultures (par exemple des attaques de carottes ou de betteraves provoquées par *R. violacea*, à la polyphagie désormais reconnue).



EXPLICATION DE LA SECONDE FIGURE,  
Qui représente le Tuberoïdes & la manière dont il s'at-  
tache sur les Oignons du Safran.

- A. Le Tuberoïdes dans sa grosseur naturelle, avec ses racines violettes & velues, par l'allongement desquelles il se multiplie.
- B. Petits Gaglions, ou nouveaux Tubercules qui se forment aux extrémités & aux anastomoses de plusieurs racines.
- C. Etat du Safran dans le centre des places infectées, où il ne reste plus que les tégumens de l'Oignon dans leur forme ordinaire, la substance étant entièrement consommée par l'action du Tuberoïdes.
- D. Etat du Safran dans la partie moyenne, entre le centre & la circonférence, où les Tubercules sont attachés sur les tégumens, & où les racines du Tuberoïdes pénètrent la substance de l'Oignon, lui ont fait perdre la solidité, & l'ont rendu semblable à de la bouillie.
- E. Etat du Safran à la circonférence où les racines du Tuberoïdes n'ont encore pénétré que les tégumens de l'Oignon, sans avoir endommagé la substance.

**Figure 1** - Bulbes de safran (*Crocus sativus*) colonisés par le mycelium de *Rhizoctonia violacea*, première représentation par Duhamel du Monceau (1728) d'une contamination plante-à-plante (allo-infection) en épidémiologie végétale (d'après Zadoks, 1981).

L'approche que Duhamel du Monceau développe dans cette première étude d'épidémiologie végétale n'a été complétée qu'à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. L'étude scientifique des causes des maladies des plantes a alors été rendue possible par de nouvelles avancées épistémologiques, notamment les principes de médecine expérimentale (observation provoquée dans des conditions déterminées en vue de contrôler une hypothèse, définition de l'"expérience" selon Claude Bernard, 1865) et d'étiologie microbienne (critères destinés à établir la relation de cause à effet liant un agent pathogène et une maladie, postulats de Koch, 1876).

Il a fallu attendre le début du 20<sup>e</sup> siècle pour que des approches holistiques [2] apparaissent en épidémiologie végétale (Morstatt, 1921), intégrant des dimensions biologiques et physiques plus complètes, puis, récemment, sociétales.

[2] "A whole range of other viewpoints and orientations here come to light. To epidemiology belong questions on the influence of the weather and other environmental factors, such as the soil, migration and transportation of pathogens and their vectors ; the questions on susceptibility and resistance of varieties, from which ensues in the practical field the breeding for resistance ; on virulence of the pathogen; further on the so-called biological control ; etc.)" (Morstatt, 1921 ; traduit par Zadoks, 1976)

Les principaux facteurs qui influencent le développement d'une épidémie végétale sont classiquement représentés sous la forme d'un tétraèdre, dont les extrémités correspondent

respectivement à la plante hôte, à l'agent pathogène, aux composantes biotiques et abiotiques de l'environnement, et aux actions de l'homme, principalement les pratiques agricoles (Zadoks & Schein, 1979). Si ces composantes influencent le développement d'une épidémie dans sa globalité, c'est en réalité sur un ensemble de processus - spécifiques d'échelles d'espace (plante, parcelle, territoire) et de temps (saisons, années) - qu'elles agissent directement. Identifier et hiérarchiser ces processus est indispensable si l'on veut comprendre la façon dont différents facteurs influencent la maladie.

L'étude des processus épidémiques a pris son essor dans la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle avec l'introduction des mathématiques en épidémiologie végétale, et notamment avec la publication des travaux de Van Der Plank (1963), Waggoner (1977), puis Zadoks & Schein (1979). La démarche de modélisation la plus classique en épidémiologie végétale consiste à concevoir un modèle, en tant qu'un outil permettant de prédire le comportement d'un système peuplement hôte-population pathogène. Une première approche de la modélisation, holistique, considère qu'il n'est pas nécessaire de se focaliser sur des processus précis pour connaître le fonctionnement d'une épidémie ; la décomposition de la trajectoire du système en une série d'évènements n'est pas une finalité. Une seconde approche, déterministe, se concentre sur les processus (observés, mesurés ou seulement conceptualisés). Cette approche fait écho au constructivisme, courant de l'épistémologie qui fait reposer la connaissance sur l'idée que l'image de la réalité pour un scientifique, et les notions structurant cette image, sont le produit de son esprit en interaction avec cette réalité, et non le reflet exact de la réalité elle-même. Concrètement, cela implique d'imaginer, de créer et de formaliser des processus élémentaires qui animent le système étudié (l'épidémie telle qu'elle se déroule) afin d'en comprendre le fonctionnement. Cette démarche prend tout son sens pour des épidémies que l'on pense pilotées par plusieurs processus à différentes échelles d'espace et de temps.

Dans ces deux approches, les degrés d'agrégation des connaissances sont différents. La première approche se pose à l'échelle d'une épidémie, considérée comme un système accessible à l'observation seulement dans son ensemble, sans "dégradation" possible : il est possible de comprendre et de modéliser grâce ce que l'on prédit, à partir d'une représentation parfois empirique. La seconde approche se pose à l'échelle des processus épidémiques, de préférence accessibles à l'expérimentation : elle est basée sur la compréhension du fonctionnement mécaniste du système. La modélisation déterministe, notamment celle découlant de l'utilisation de modèles à compartiments du type SIR (*susceptible, infectious, recovered*) dont Kermack & McKendrick (1927) sont à l'origine, confère aux processus un rôle central pour comprendre la dynamique d'une épidémie, tellurique (Pfender, 1982 ; Gilligan, 1983) ou aérienne (Kranz & Rotem, 1988).

**A** ce stade de la réflexion, j'estime nécessaire d'explicitier la distinction que je fais entre "processus" et "mécanisme", qui a structuré mon approche fonctionnelle et expérimentale.

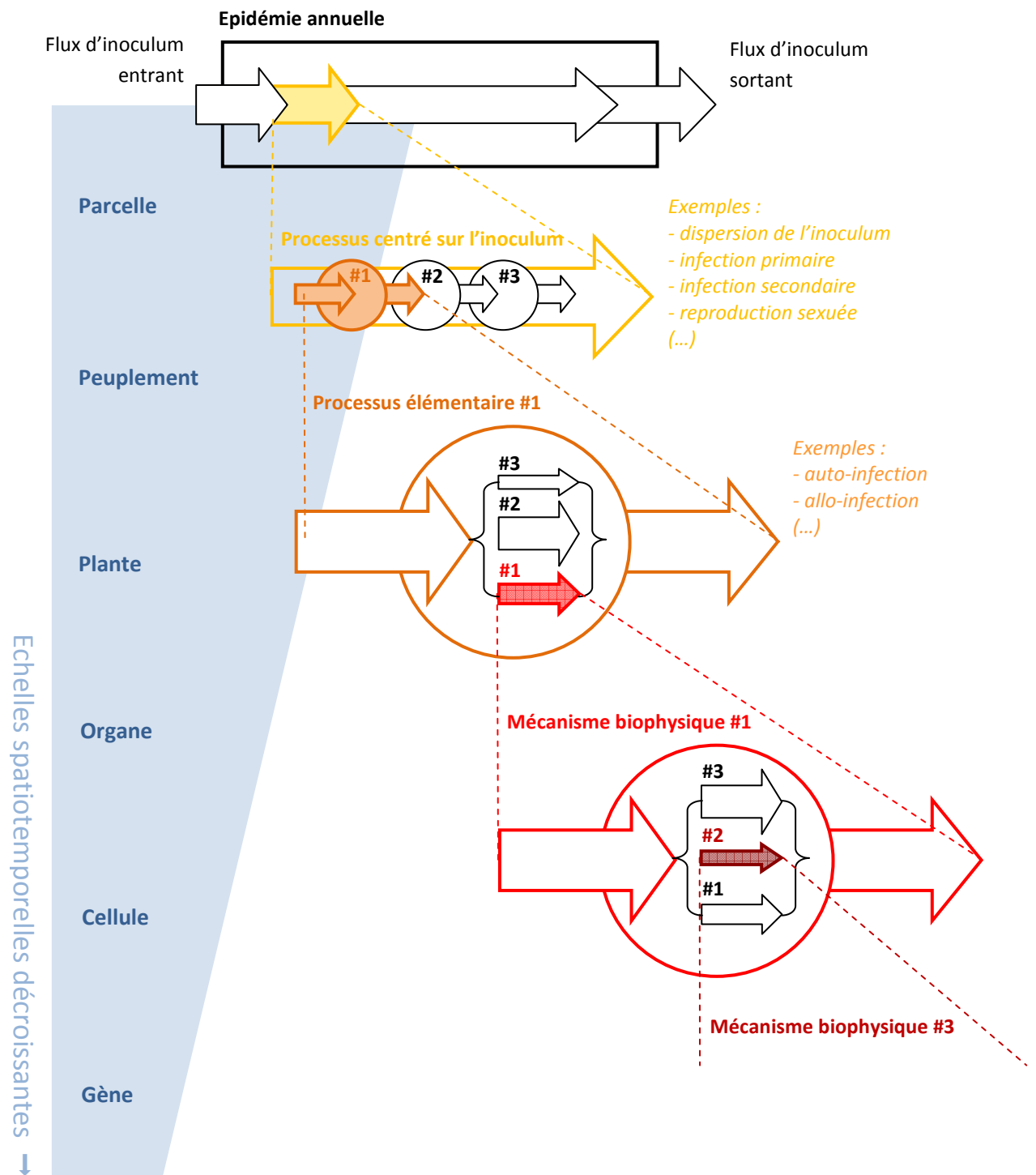
Un processus est un ensemble de phénomènes actifs et organisés dans le temps. Dans le domaine industriel (gestion de la production), c'est un ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforme des "éléments d'entrée" en "éléments de sortie". Les processus épidémiques peuvent être considérés comme les différentes étapes (au centre desquelles se

trouve l'inoculum, en tant qu'élément d'entrée et de sortie) qui conditionnent le développement de la maladie.

Un mécanisme est une combinaison, un agencement de pièces ou d'organes montés en vue d'un fonctionnement d'ensemble. Le Mécanisme est également une conception philosophique qui admet qu'une classe de faits ou un ensemble de phénomènes suit le modèle des liens de cause à effet et peut être ramené à un système de déterminations mécaniques. La théorie de l'animal-machine de Descartes, qui découle de cette conception, a conduit à l'émergence d'une médecine mécaniste, puis d'une médecine expérimentale.

Chaque processus épidémique observé (ou conceptualisé) peut s'expliquer par un enchaînement de mécanismes biophysiques, identifiés comme étant les éléments constitutifs dudit processus, saisi dans son fonctionnement. Par exemple, des infections secondaires peuvent se produire à partir d'organes infectés situés sur une même plante hôte (auto-infection) ou situés sur des plantes hôtes voisines (allo-infection). Ces processus épidémiques, bien que distincts, peuvent être causés par des mécanismes identiques. Les facteurs ayant un impact sur chacun de ces deux processus peuvent ne pas être identiques. Dans le cas du cavity spot de la carotte (voir plus bas) il est par exemple probable que la distance entre racines influence fortement les allo-infections mais peu les auto-infections. A l'inverse, des mécanismes différents peuvent être les causes d'un seul et même processus. Enfin, un processus admis à une certaine échelle de temps et d'espace (parcelle agricole ou peuplement végétal) se trouve généralement être un mécanisme à une échelle inférieure (plante ou organe ; Fig. 2).

Comprendre comment fonctionne une épidémie nécessite que les processus intervenant à l'échelle spatio-temporelle considérée soient identifiés (prouvés ou suspectés, mesurés ou estimés). Il n'est toutefois pas nécessaire que les mécanismes responsables d'un ou plusieurs processus soient caractérisés dans leur ensemble. L'analyse des processus épidémiques ne doit pas être systématiquement "descendante" : la dissection du système étudié en éléments toujours plus détaillés ne permet pas forcément de mieux comprendre son fonctionnement.

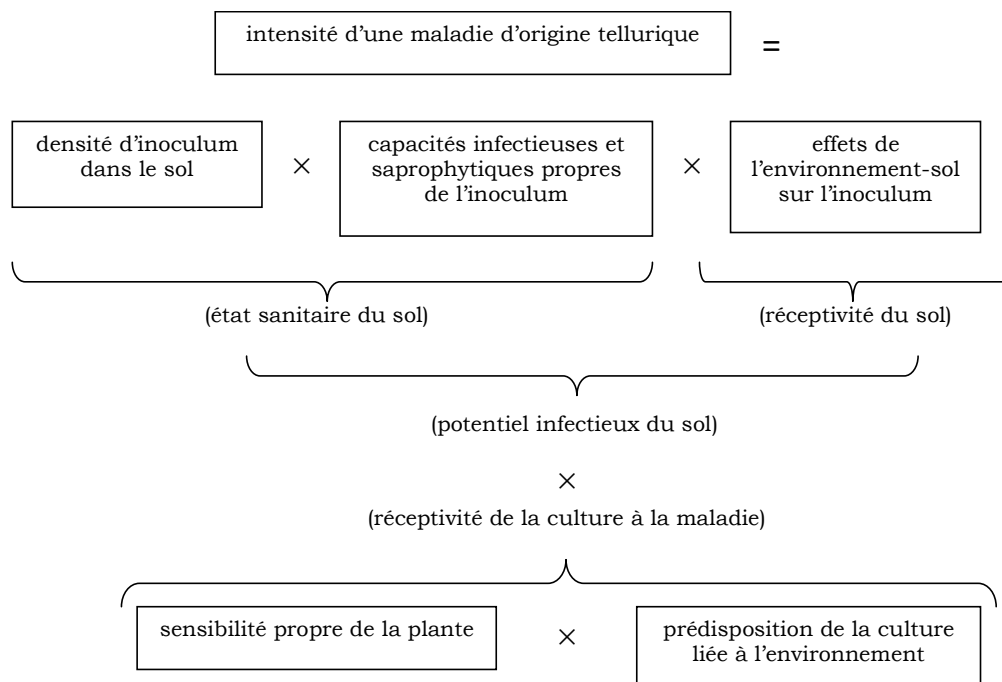


**Figure 2** - Représentation schématique de l'emboîtement de processus épidémiques et de mécanismes centré sur l'inoculum à différentes échelles.

Le principal objectif de mes travaux de recherche a été d'identifier et de hiérarchiser des processus épidémiques intervenant à différentes échelles de temps et d'espace. Pour comprendre comment certains facteurs influencent ces processus, je me suis attaché à caractériser des mécanismes explicatifs, tant dans une perspective de connaissances fondamentales qu'appliquées. La preuve de l'existence d'un processus par l'expérience (Legay, 1997) est un élément indispensable à la compréhension du fonctionnement mécaniste d'un système. La démarche de Duhamel du Monceau a consisté à partir de l'observation, en tant que phénomène de sérendipité, à formuler des hypothèses que des expérimentations confirment ensuite. Pour Merton & Barber (2006) la sérendipité fait référence à l'observation d'un fait surprenant (une donnée non-anticipée, a-normale et stratégique) qui est suivie par une abduction correcte (inférence de la meilleure explication), qui devient l'occasion du développement d'une nouvelle théorie ou l'extension d'une théorie existante. Le philosophe américain Charles Peirce [3], reconnu par son travail sur le pragmatisme comme méthode de recherche (Catellin, 2004 ; Bourcier & van Andel, 2011), considérait l'abduction comme la seule forme de raisonnement pour découvrir quelque chose de neuf :

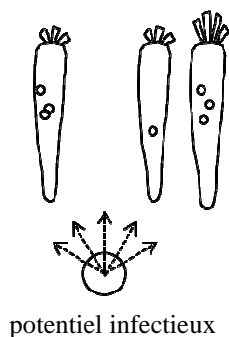
[3] *"L'induction ne peut jamais produire une idée, quel que soit son type. Et la déduction non plus. Toutes les idées de la science viennent par abduction. L'abduction consiste dans l'étude des faits et dans la conception d'une théorie pour les expliquer. L'abduction est le processus de l'imagination d'une hypothèse explicative. C'est la seule opération logique qui introduit une idée neuve quelconque ; parce que l'induction détermine une valeur, et la déduction dérive seulement les conséquences inévitables d'une hypothèse pure. La déduction prouve que quelque chose doit être. L'induction montre que quelque chose marche de facto. L'abduction suggère seulement que cela serait possible."* (Peirce, 1866 ; traduit par Bourcier & van Andel, 2011)

Duhamel du Monceau a mis pour la première fois en évidence un processus centré sur l'inoculum responsable du développement d'une épidémie (contamination plante-à-plante), sans pour autant en identifier le ou les mécanismes responsables. L'inoculum et ses "flux" sont au centre des processus épidémiques (Fig. 2). Si les processus sont accessibles par abduction, certains mécanismes le sont plus difficilement, comme les mécanismes de contamination à partir de l'inoculum tellurique chez les maladies racinaires (voir le cas du cavity spot de la carotte) ou les mécanismes impliqués dans la survie interannuelle de certains parasites biotrophes (voir le cas de la rouille brune du blé). On fait souvent référence à une "boîte noire", qui explique que certains concepts empiriques aient été développés, comme par exemple le "potentiel infectieux" d'un sol, dont la définition opérationnelle n'est basée sur aucun processus (Garrett, 1956 ; Dimond & Horsfall, 1965).



**Figure 3** - Les différentes composantes du potentiel infectieux d'un sol (d'après Rouxel, données non publiées ; Suffert, 2006).

Comme je l'ai rappelé dans l'introduction de ma thèse, le potentiel infectieux d'un sol peut être "estimé" ; mais comprendre la façon dont différents facteurs l'influence est complexe. Le potentiel infectieux n'est pas adapté à la formalisation de processus épidémiques, au centre desquels se trouve l'inoculum. On se heurte à des difficultés méthodologiques pour le caractériser et le quantifier. Le potentiel infectieux est un élément utile pour évaluer de façon empirique l'état sanitaire d'un sol à un instant donné, mais qui ne peut difficilement apporter de nouvelles connaissances sur le fonctionnement du pathosystème (Fig. 4).



**Figure 4** - Représentation du potentiel infectieux d'un sol (cas du cavity spot de la carotte).

Mon travail de recherche a concerné deux pathosystèmes très différents, l'un tellurique, *Pythium* sp.-carotte (2000-2006), et l'autre aérien, *Zymoseptoria tritici*-blé (2007-2015). J'ai considéré d'une part les apports de l'expérimentation à l'étude des processus épidémiques par des méthodes directes et indirectes, et d'autre part l'utilité de les conceptualiser (représentations mathématique, graphique, schématique et photographique).

Les infections primaires et secondaires sont respectivement responsables de l'initiation et de la progression d'une épidémie polycyclique. Il y a rarement disjonction temporelle entre les deux processus : pendant les phases précoces, il est fréquent que les infections primaires contribuent encore au développement de l'épidémie tandis que les premières infections secondaires interviennent déjà. Dans le cas d'une culture annuelle on considère que les infections primaires sont provoquées par de l'inoculum issu d'un cycle infectieux d'une précédente épidémie ("inoculum primaire"), produit sur des hôtes de la saison culturale précédente (résidus contaminés, dans le cas d'un parasite saprophyte) ou de la période d'interculture (hôte alternant ou repousses contaminées, dans le cas d'un parasite biotrophe strict). Les infections secondaires sont provoquées par de l'inoculum issu d'un cycle infectieux de la même épidémie ("inoculum secondaire"). Il résulte de ces définitions que des propagules infectieuses de même nature peuvent être fonctionnellement différentes, tantôt inoculum primaire tantôt inoculum secondaire.

## **2.2. Stratégie expérimentale pour caractériser processus et mécanismes - Le cas d'une maladie d'origine tellurique, le cavity spot de la carotte**

### **2.2.1. Le système *Pythium* sp.- *Daucus carota***

Les *Pythium* forment un complexe parasitaire constitué de plusieurs espèces pathogènes de la carotte (*Daucus carota*) et dont la composition est variable d'un bassin de production à l'autre. Ils provoquent différents types de symptômes, parmi lesquels des "taches en creux" qui entraînent des pertes de rendement liées à une dépréciation de la qualité des produits récoltés (Fig. 5). Au début des années 2000 les connaissances épidémiologiques de cette maladie étaient lacunaires (Hiltunen & White, 2002). Peu d'études avaient eu pour objectif la compréhension du fonctionnement d'une épidémie (McDonalds, 1988 ; Phelps et al., 1991), basée par exemple sur les hypothèses mécanistes classiquement développées en épidémiologie végétale (infections primaires et secondaires) et validées par la description des dynamiques spatio-temporelles de la maladie.



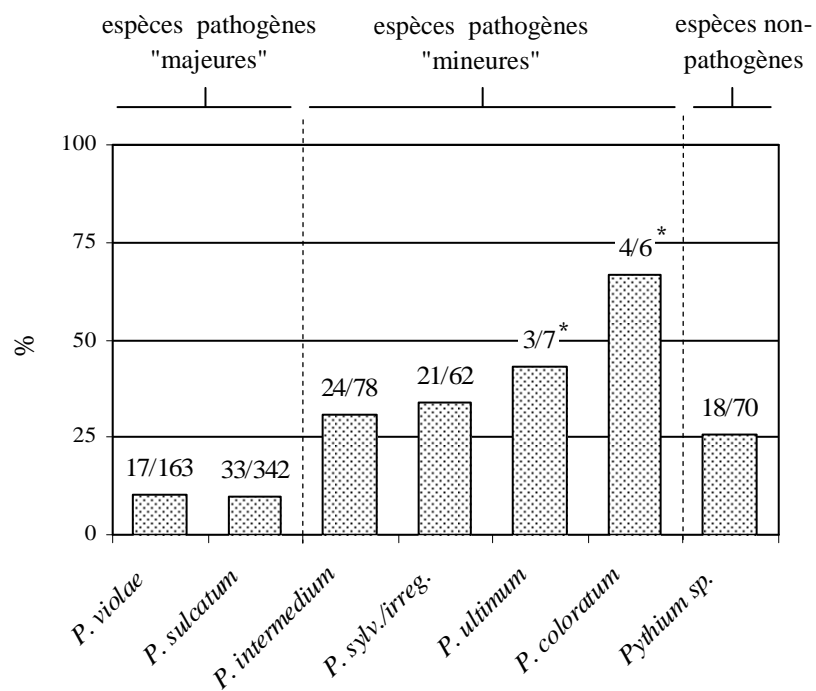


**Figure 5** - A - Microparcelles expérimentales destinées à suivre des épidémies de cavity spot (Le Rheu, 2003). B - Attaque de cavity spot provoquée par *Pythium violae*. C - Dispositif expérimental permettant de reproduire en conditions contrôlées des contaminations racine-à-racine.

Le principal objectif des recherches que j'ai menées à Rennes entre 2000 et 2006 était de caractériser les processus qui conditionnent le développement d'épidémies telluriques. Mon projet s'inscrivait dans un programme de conception et d'optimisation de méthodes de protection des cultures légumières de plein champ. Pour identifier et hiérarchiser les processus déterminant la dynamique spatio-temporelle du cavity spot de la carotte, j'ai adopté une stratégie expérimentale en plusieurs étapes, complémentaires :

1. Analyse du complexe parasitaire et identification d'un système hôte-pathogène de référence (plurispécifique) ;
2. Observation, mesure d'une épidémie (quantification de l'observation), et formalisation d'hypothèses de processus épidémiques ;
3. Expérimentation visant à démontrer l'existence desdits processus ;
4. Expérimentation visant à identifier certains mécanismes responsables de ces processus ;
5. Analyse d'effet de facteurs sur ces processus ;
6. Représentation des processus.

Dans un premier temps, s'est posée la question de la caractérisation du complexe parasitaire et le fait que la diversité d'espèces pouvait affecter les processus épidémiques à l'échelle de la racine. L'analyse de la composition d'un des complexes pendant trois années d'épidémies, complétée par la caractérisation biologique des principales espèces pathogènes, a suggéré qu'il était raisonnable de négliger les interactions entre espèces (Suffert & Guibert, 2006). Dans 10 à 15 % des cas plusieurs espèces ont été isolées en mélange à partir d'une même lésion, justifiant que l'on s'interroge sur l'importance des infections multiples dans l'analyse du développement d'une épidémie, qu'elles soient dues à des espèces "majeures" (les plus pathogènes, également les plus représentées au sein du complexe, comme *P. violae* et *P. sulcatum* ; Fig. 6) ou à des espèces "mineures" (moins pathogènes, faiblement représentées au sein du complexe, comme *P. sylvaticum-irregulare*, *P. intermedium* ou *P. coloratum*). Les espèces "mineures" ont été plus souvent isolées en mélange que les espèces "majeures", et ce de façon inversement proportionnelle à leur pouvoir pathogène, confirmant que leur capacité à initier seules une lésion était moindre.

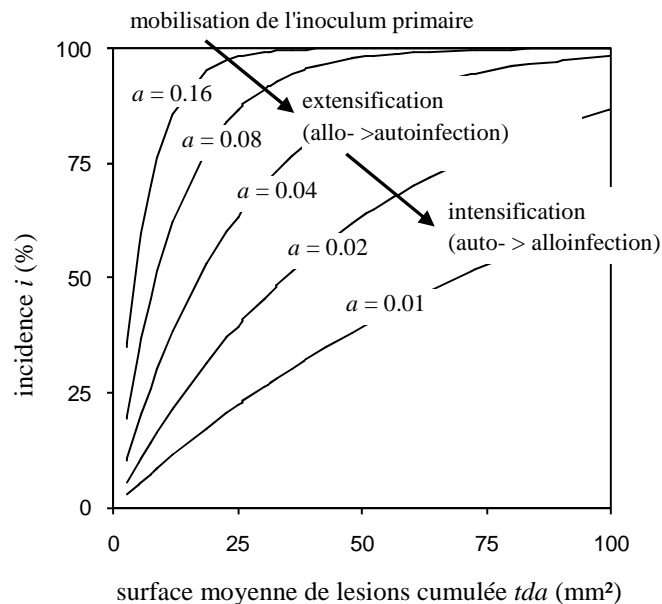


**Figure 6** - Proportion d'isolats de *Pythium* sp. isolés à partir d'une même lésion en mélange avec au moins une autre espèce (d'après Suffert & Guibert, 2006).

L'absence d'interaction entre espèces pendant la phase d'infection a suggéré que chaque complexe d'espèces *Pythium* spp., quelle que soit sa nature exacte, ne générerait pas de processus épidémiques spécifiques.

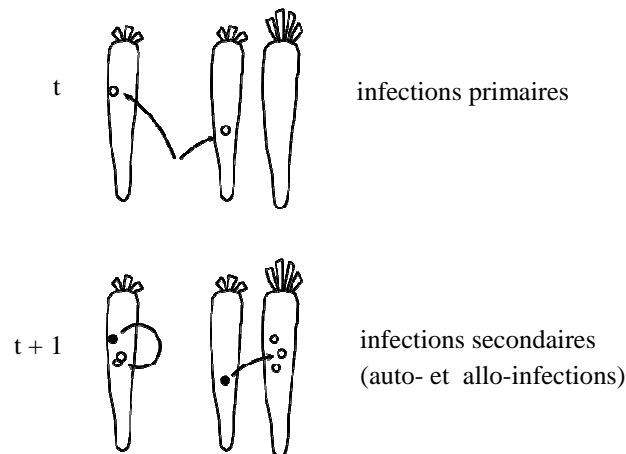
### 2.2.2. Observations, mesures et démarche abductive

La phytopathométrie s'intéresse à la quantification d'une maladie et aux relations qui peuvent exister entre différentes variables permettant de mesurer l'intensité d'une attaque (Large, 1966 ; James, 1974 ; Teng, 1983 ; Nutter et al., 1991). C'est une approche souvent négligée alors qu'elle peut apporter des informations précieuses sur la nature des processus qui pilotent une épidémie. Il existe différentes manières de quantifier une maladie : une quantité de symptômes s'exprime classiquement par sa prévalence (proportion de parcelles atteintes), son incidence (proportion de plantes malades) ou sa sévérité (quantité de surface malade à l'échelle d'une plante). J'ai remarqué, lors d'observations de lots de racines de carotte (sur un tapis de triage dans une usine à Créances en 2003 et 2004) que l'incidence et la sévérité de cavity spot n'étaient pas toujours corrélées : des racines attaquées présentaient parfois beaucoup de lésions, alors que la proportion de plantes malades était faible. L'évolution dans le temps de la taille moyenne des lésions a suggéré que leur surface s'accroissait dans le temps, et ainsi leur capacité à provoquer des infections secondaires. J'ai établi que les relations mathématiques entre différentes variables (incidence, densité de lésions, taille de lésion, surface totale de lésion) évoluaient entre le début et la fin d'une épidémie (Suffert & Montfort, 2008). J'ai mis en évidence au champ et en conditions contrôlées (sol reconstitué inoculé artificiellement) la décroissance au cours du temps de  $a(t)$ , paramètre de l'équation  $i=100(1-\exp(-a(t)tda))$  reliant de façon empirique l'incidence de maladie ( $i$ ) à la surface moyenne de lésions cumulée sur une carotte ( $tda$ ) (Fig. 7).



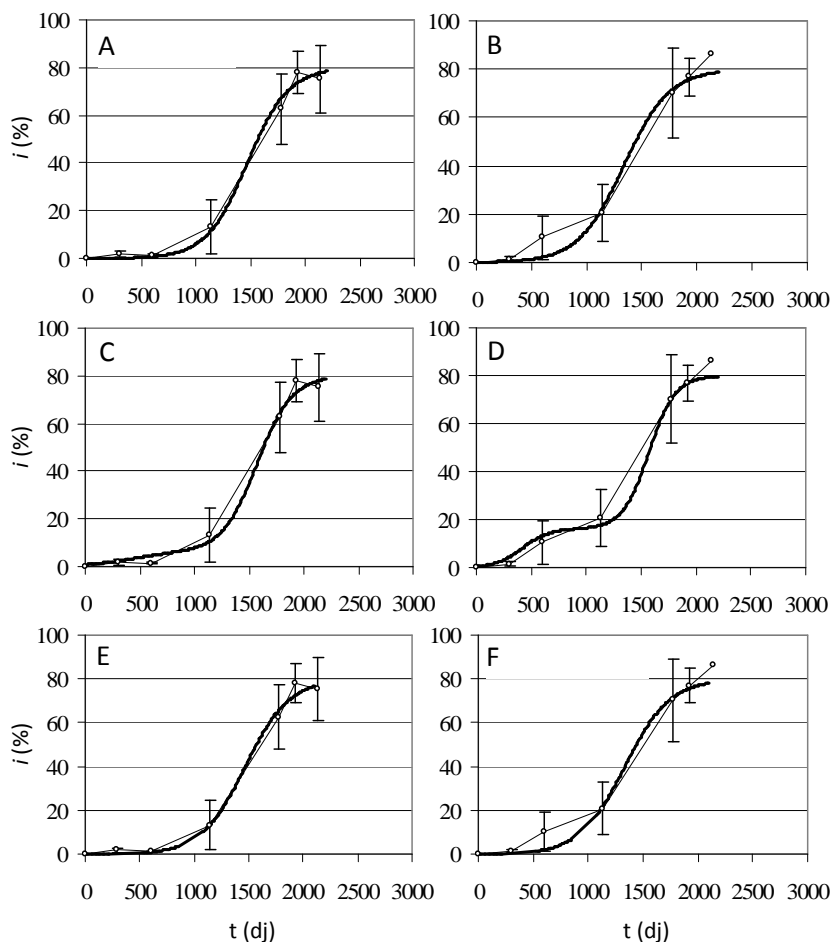
**Figure 7** - Relation empirique entre l'incidence de maladie  $i$  et la surface moyenne de lésions cumulée sur une carotte ( $tda$ ) donnée par l'équation  $i=100(1-\exp(-a(t)tda))$  où  $t$  est le temps thermique (d'après Suffert & Montfort, 2008).

Cette décroissance illustre l'intensification des symptômes à l'échelle racinaire, que pourrait expliquer les augmentations successives de la proportion d'infections primaires (mobilisation de l'inoculum présent dans le sol), d'allo-infections (contaminations racine-à-racine) et d'auto-infections (contaminations à l'échelle d'une seule et même racine) pendant une épidémie (Fig. 7). Cette interprétation est cohérente avec l'évolution de relations entre différents indicateurs métriques de maladie à deux niveaux de hiérarchisation spatiale (Hughes et al., 1997 ; Willocquet & Savary, 2004).



**Figure 8** - Représentation de deux processus épidémiques : infections primaires et infections secondaires (cas du cavity spot de la carotte).

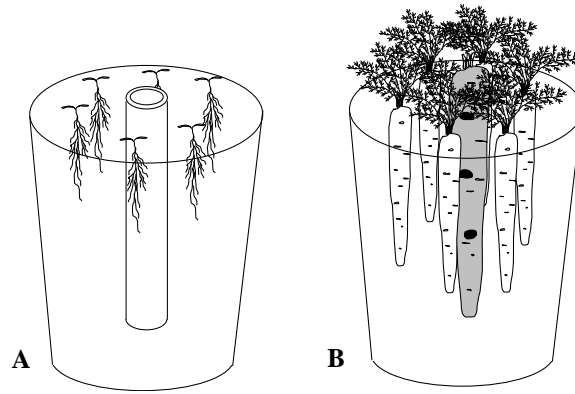
À des échelles plus larges l'observation et la mesure de l'épidémie dans son ensemble peut également donner des indications pertinentes. Dans cette perspective, j'ai contaminé artificiellement le sol de microparcelles avec du *P. violae* à des doses croissantes. L'analyse des cinétiques d'incidence obtenues pendant trois années d'expérimentation a révélé l'apparition assez précoce d'un premier plateau, pour lequel des différences dans l'intensité des attaques ont été positivement corrélées à la dose d'inoculum ; ces différences se sont atténuées en fin de cycle cultural (Suffert, 2007). Pour vérifier si l'hypothèse de l'occurrence d'infections primaires et secondaires était compatible avec la forme des courbes, j'ai ajusté aux données trois modèles, intégrant ou non la concomitance des deux processus : le modèle logistique, le modèle bi-logistique de Hau & Amorim (1993), et le modèle de Brassett & Gilligan (1988) sans décroissance temporelle de la quantité d'inoculum primaire (Fig. 9). La qualité d'ajustement des trois modèles a été correcte et n'a pas conduit à réfuter l'hypothèse de l'occurrence d'infections secondaires. Ce résultat constitue un argument supplémentaire en faveur de la nature polycyclique de la maladie.



**Figure 9** - Ajustement de modèles (A, B : logistique ; C, D : Hau & Amorim ; E, F : Brassett & Gilligan) aux cinétiques d'incidence de cavity spot ( $i$ ) obtenues après inoculation artificielles au champ en fonction des doses d'infestation par des grains d'orge colonisés par *P. violae* (A, C, E :  $50 \text{ g.m}^{-2}$ ; B, D, F :  $500 \text{ g.m}^{-2}$ ). Les points représentent les données expérimentales et les courbes le modèle ajusté à ces moyennes. L'échelle de temps ( $t$ ) est exprimée en somme de degrés-jours (d'après Suffert, 2007).

### 2.2.3. Expérimenter, pour démontrer l'occurrence de processus

L'ajustement de modèles qui simulent des courbes de progression de maladies à des données épidémiologiques (Amorim et al., 1993 ; Bailey & Gilligan, 1999 ; Pfender, 1982) donne des indications sur l'occurrence de processus épidémiques. Cela doit toutefois être étayé par des résultats d'expériences analytiques. Dans un second temps j'ai donc cherché à démontrer expérimentalement que les infections secondaires jouaient effectivement un rôle important dans la dynamique d'une épidémie.



**Figure 10** - Expérimentation en microcosme consistant à transplanter, au centre d'un peuplement de six carottes issues de semis (A), une racine de carotte préalablement inoculée avec *P. violae* (B) (d'après Suffert & Montfort, 2007).

L'approche expérimentale que j'ai imaginée a permis de reproduire en microcosmes des infections secondaires (Suffert & Montfort, 2006). La technique a consisté à transplanter une racine de carotte préalablement inoculée (nombre variable de lésions), considérée comme "source" d'inoculum, au centre d'un peuplement de six carottes issues de semis, en pot (Fig. 10). L'occurrence des allo-infections a été spécifiquement démontrée et quantifiée ; celle des auto-infections a simplement été suggérée par des observations *in situ* (nouvelles lésions apparues sur la racine source). L'intensité des attaques sur les racines cibles a été proportionnelle au nombre de point d'inoculation sur la racine source. J'ai conclu que les infections secondaires jouent un rôle important dans l'intensification (accroissement du nombre de lésions et de leur surface sur une racine déjà attaquée) et l'extensification du cavity spot (contaminations racine-à-racine).

La méthode expérimentale a ensuite été réutilisée par une société semencière néerlandaise pour tester la résistance de différentes variétés de carotte. Je m'en suis également servi pour caractériser les attributs spatio-temporels des contaminations racine-à-racine (distance seuil, forme du gradient de dispersion, temps de latence, taux d'infections secondaires, etc.) et pour mesurer l'effet de facteurs culturaux sur ces processus (voir plus bas).

#### **2.2.4. Expérimenter, pour identifier ou réfuter certains mécanismes : parallèle entre maladies telluriques (cavity spot de la carotte) et aériennes (rouilles du blé)**

Une fois établie l'existence d'un ou plusieurs processus épidémiques, en particulier les infections secondaires, se pose la question des mécanismes qui en sont à l'origine. En ce qui concerne le cavity spot de la carotte, des éléments ont laissé penser que les allo-infections étaient une conséquence directe de la croissance saprophytique du mycélium ou la libération de zoospores puis leur dissémination à partir d'une racine infectée (Martin & Loper 1999 ; Van der Plaats-Niterink 1981). Je me suis interrogé sur le fait que la présence de racines



adventives pouvait augmenter l'intensité des allo-infections : par contacts physiques entre pivots racinaires (racines adventives faisant office de "pont") ou par stimulation de la croissance saprophytique des *Pythium* via la libération d'exsudats racinaires (Estrada-Garcia et al. 1990 ; Longman & Callow 1987). J'ai testé ces hypothèses mécanistes avec un dispositif expérimental de type "rhizobox" (Fig. 11), dont le principe découle du précédent (Suffert & Montfort, 2007). L'objectif était de décorrélérer les effets des mécanismes suspectés d'accroître l'intensité des contaminations entre racines "sources" préalablement inoculées et de racines "cibles".



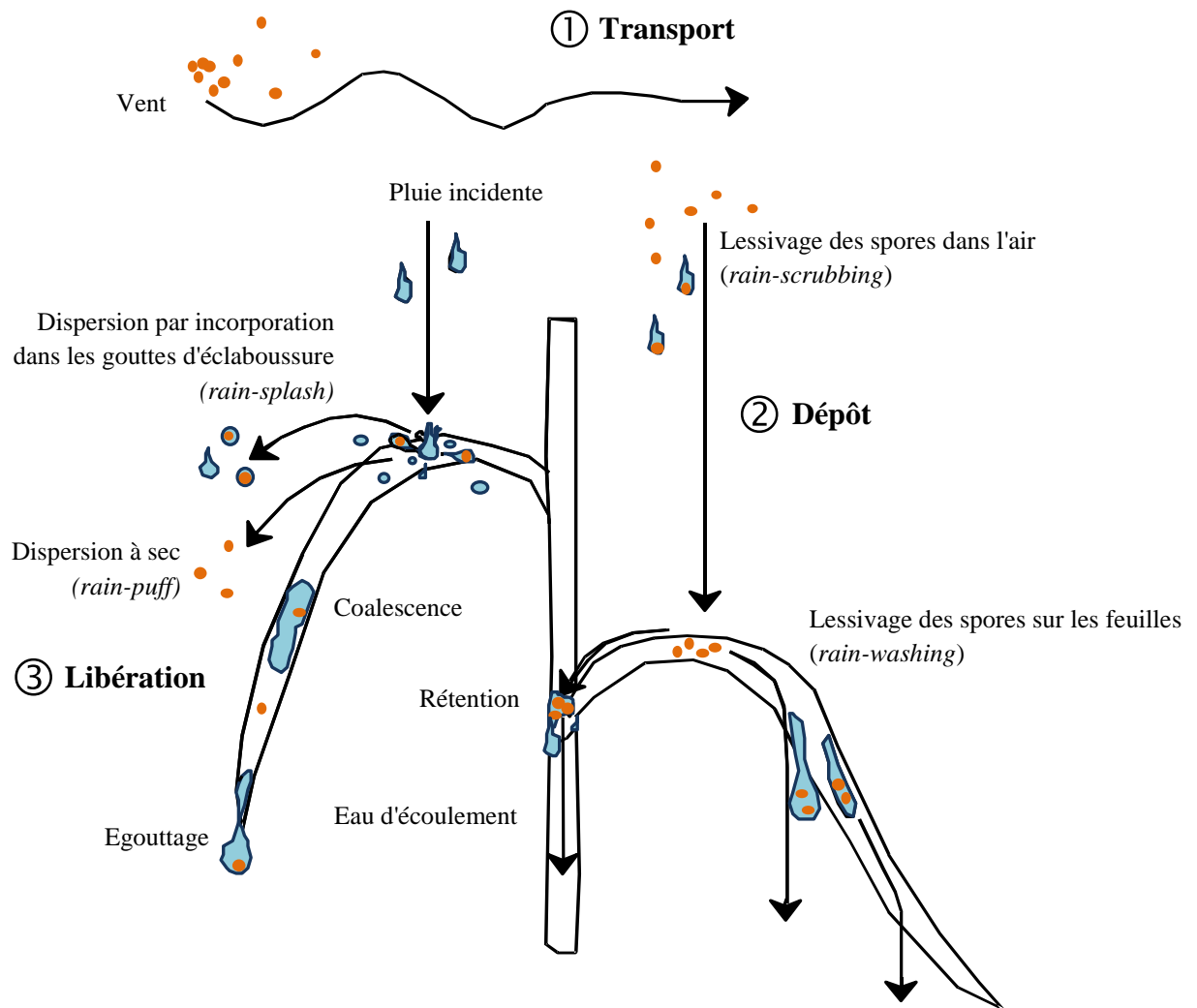
**Figure 11** - Dispositif expérimental de type "rhizobox" (A) permettant d'étudier l'effet des racelles sur les allo-infections (B). Des racines de carotte "sources", préalablement inoculées avec *P. violae*, ont été transplantées en face d'une rangée de carottes "cibles" issues de semis. Les différents traitements, comparés à des témoins (C), ont consisté à séparer les deux rangées d'une double barrière de nylon laissant passer les zoospores et le mycélium mais pas les racelles (D), à obtenir entre les deux rangées un peuplement dense de très jeunes carottes (racelles supposées avoir un effet comparable à celui de racines adventives ; E), et à combiner les deux (F ; d'après Suffert & Lucas, 2008).

La présence du filet de nylon (Fig. 11) n'a provoqué aucune diminution de l'intensité de la maladie sur les racines cibles. La croissance libre des *Pythium* dans le sol semble avoir davantage contribué à la propagation de la maladie que les contacts physiques entre les racines, mécanisme que donc j'ai écarté. La présence de jeunes racines de carottes n'a pas affecté le processus de manière significative, suggérant que la production d'exsudats est également un mécanisme à écarter. J'ai conclu que les racines adventives jouaient un rôle mineur dans l'extensification de la maladie.

Peu d'expérimentations de ce type ont conduit à des conclusions analogues chez d'autres pathosystèmes telluriques (Scott 1956 ; Crowe et Hall 1980 ; Green & Jensen, 2000). Davantage de mécanismes ont été identifiés dans le cas des maladies aériennes. La première raison est méthodologique : il est plus difficile de mettre en évidence des mécanismes qui interviennent dans le sol, un compartiment accessible seulement par des approches destructives. La seconde raison est épidémiologique : le compartiment tellurique est un environnement stable, tamponné et dans lequel la diversité de mécanismes biophysiques conceptualisables est faible. Les conditions environnementales du compartiment aérien sont plus fluctuantes (cycles nyctéméraux, cycles saisonniers, conditions météorologiques changeantes, etc.).

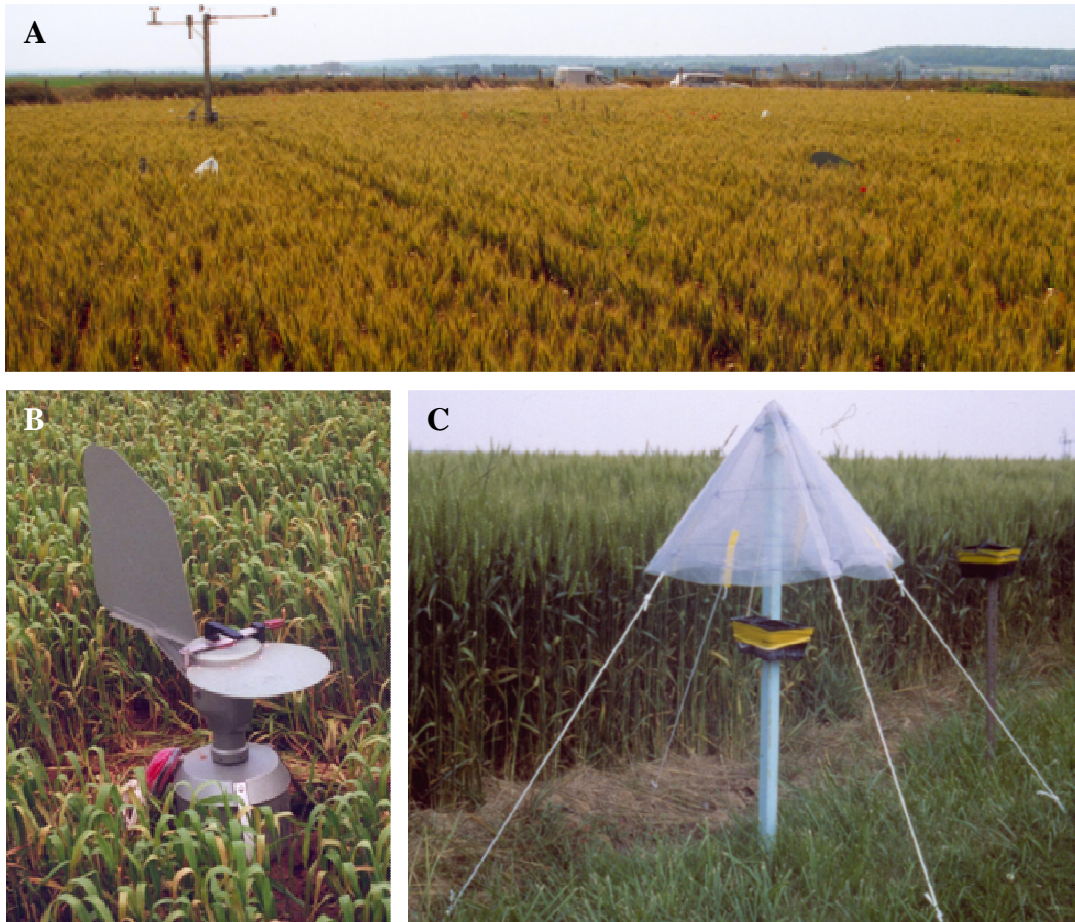
La phase de dispersion chez les épidémies aériennes se distingue de leur phase infectieuse par des interactions étroites entre les composantes biologiques et physiques du système. Différentes échelles spatiales et temporelles sont simultanément impliquées dans le processus de dispersion des spores, qui a pour principale conséquence épidémique l'extension spatiale de la maladie au cours d'une saison culturale (McCartney & Fitt, 1998). Les processus intervenant dans les contaminations par des spores sont bien connus (Gregory et al., 1959 ; Nagarajan & Singh, 1990 ; Aylor, 1990). Le rôle de la pluie et du vent sur les mécanismes impliqués dans le transport atmosphérique des spores de rouille a fait l'objet de nombreuses études expérimentales (Hisrt, 1961 ; Carter et al., 1970 ; Fitt et al., 1986 ; 1987 ; Madden et al., 1998). Dans l'équipe, des expérimentations coordonnées par Ivan Sache (Geagea et al., 1999 ; 2000) ont par exemple montré que la pluie dispersait sur de courtes distances des spores produites par des lésions sporulantes, à sec (*rain-puff*) ou par incorporation dans des gouttes d'éclaboussure (*rain-splash*). La représentation qui en découle (Fig. 12) est transposable à d'autres maladies fongiques aériennes, et notamment la septoriose, cas d'étude sur lequel je reviendrai plus bas.





**Figure 12** - Mécanismes impliqués dans les processus physiques élémentaires de dispersion (transport, dépôt et libération) contribuant au transfert de spores des rouilles du blé par l'eau liquide entre l'atmosphère et le peuplement (d'après Suffert et al., 2000).

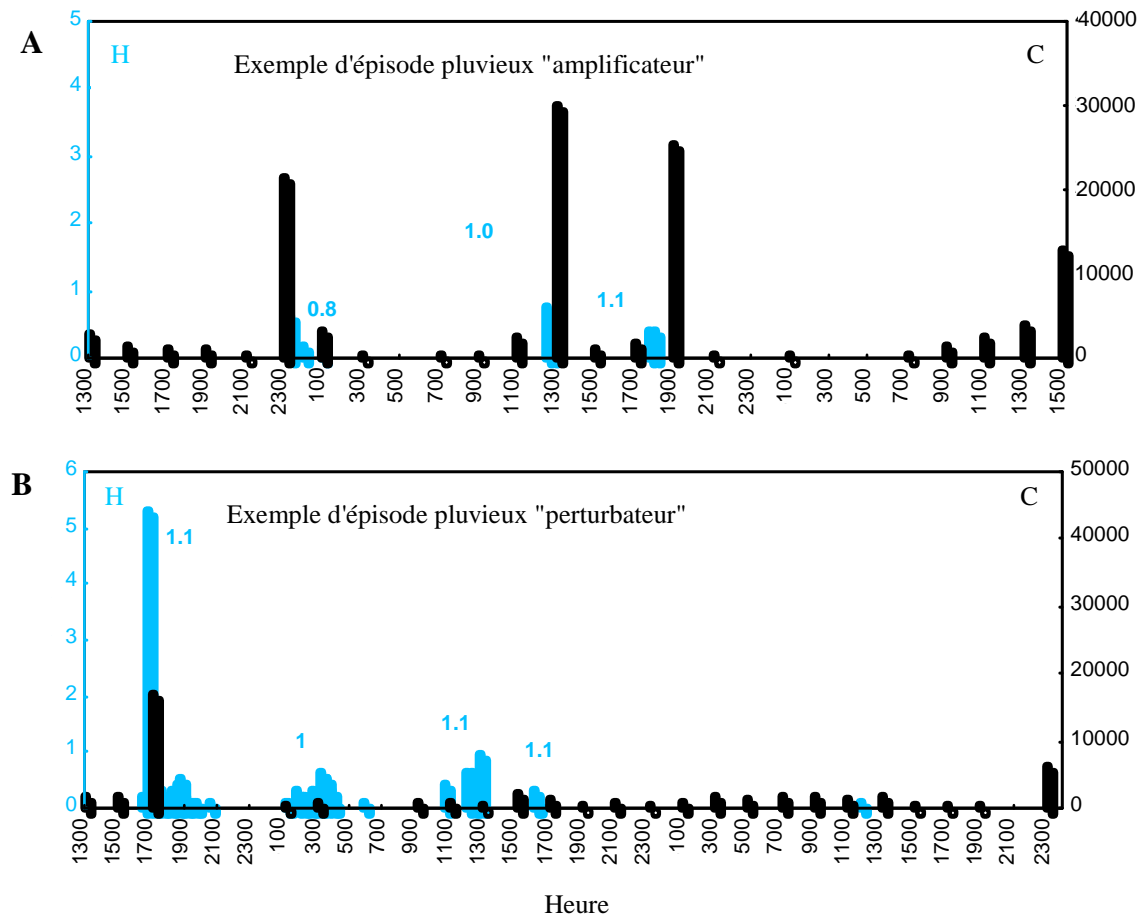
En 1999, pendant mon stage d'ingénieur, je me suis intéressé aux mécanismes impliqués dans les processus physiques élémentaires de dispersion (transport, dépôt et libération) contribuant au transfert de spores des rouilles du blé par l'eau liquide entre l'atmosphère et la plante. J'ai étudié la progression au champ de deux épidémies de rouille brune (*Puccinia triticina*) et de rouille jaune (*Puccinia striiformis*) en relation avec les variables climatiques locales.



**Figure 13** - A - Parcelle de blé expérimentale attaquée par la rouille brune (Grignon, 1999). B - Piège à spore volumétrique de type Burkard. C - Déflecteur d'eau de pluie de fabrication artisanale utilisé pour estimer l'impact des gouttes incidentes sur la contamination de plantes pièges déposées au champ (photos F. Suffert).

Parallèlement à un piégeage continu des spores au dessus du couvert végétal à l'aide un piège volumétrique Burkard (Fig. 13), j'ai acquis avec Sébastien Saint-Jean dans le cadre de sa thèse une série de données météorologiques à l'aide d'une centrale automatisée et d'un spectropluviomètre utilisés (caractérisation des épisodes pluvieux). Nous avons analysé l'influence de différentes variables climatiques (vent, pluie, humidité relative) sur l'évolution de la concentration aérienne en spores des deux rouilles. Le vent a été à l'origine de la libération périodique des spores (cycle nyctéméral), tandis que la pluie a eu des effets plus complexes à interpréter (Suffert et al., 2000). Des épisodes pluvieux de courte durée et peu intenses, que j'ai qualifiés d'"amplificateurs", ont provoqué la dispersion à sec des spores (*rain-puffing* ; Fig. 14A). A l'inverse, des épisodes pluvieux intenses ou prolongés, qualifiés de "perturbateurs", ont nettoyé l'atmosphère de ses spores par lessivage (*rain-scrubbing* ; Fig. 14B). Le dénombrement de spores présentes dans l'eau recueillie dans des collecteurs de fraction de pluie a confirmé cette interprétation. L'installation de plantes pièges au sein de la parcelle, selon des modalités permettant de les préserver de certains mécanismes de contamination, a suggéré que certaines pluies contribuaient à la dispersion des spores par

incorporation dans les gouttes d'éclaboussure (rain-splash) alors que d'autres lessivaient les feuilles (*rain-washing*). Au final les résultats obtenus ont montré que la pluie, impliquée dans les processus physiques élémentaires de dispersion (transport, dépôt et libération), était à l'origine de mécanismes épidémiques aux effets antagonistes.



**Figure 14** - Illustration des effets d'épisodes pluvieux sur la quantité de spores de rouille présentes dans l'atmosphère. A - Exemple d'effet d'épisode pluvieux "amplificateur" sur la quantité de spores de *P. tritricina* piégée (5 et 6 juin 1999). B - Exemple d'effet d'épisode pluvieux "perturbateur" sur la quantité de spores de *P. striiformis* piégées (13 et 14 juin 1999). La concentration en spores (C, en noir) est indiquée en spores.m<sup>-3</sup> par tranche de 2 h. La hauteur de pluie de précipitations (H, en bleu) est indiquée en mm par tranche de 2 h ; le diamètre moyen des gouttes (mm) lors de l'épisode pluvieux est indiqué en mm au dessus de chaque épisode (d'après Suffert et al., 2000).

### 2.2.5. Comprendre les effets de différents facteurs sur les processus épidémiques et favoriser la complémentarité de méthodes de protection à efficacité partielle

Plusieurs facteurs environnementaux et cultureux sont connus pour modifier l'influence de l'inoculum sur le développement des épidémies d'origine tellurique. Leur impact est généralement évalué en fin de cycle cultural et analysé de façon empirique : on cherche à connaître leurs effets sur un état sanitaire final (la quantité de maladie), sans forcément avoir

la possibilité de comprendre quels processus ou mécanismes ont été affectés. Leurs effets sur la dynamique de maladie à différentes phases épidémiques, sont rarement étudiés. Pendant ma thèse j'ai conduit une série d'expérimentations en microparcelles pour tester l'impact de trois facteurs (application d'un fongicide, humidité du sol modifiée par irrigation et densité de semis) sur des cinétiques de cavity spot obtenue après infestation artificielle du sol par *P. violae* (Suffert et al., 2008). J'ai aussi conduit des expérimentations en microcosmes pour tester l'influence de ces facteurs spécifiquement sur les infections secondaires. J'ai établi qu'un déficit hydrique du sol réduisait l'intensité des infections primaires (processus), mais aussi des infections secondaires (processus) en favorisant le dessèchement des lésions et la réduction de leur taille (mécanismes). J'ai montré que l'intensité des allo-infections était négativement corrélée à la densité de semis et la distance moyenne entre plantes. Enfin, j'ai établi qu'un traitement anti-oomycète diminuait à la fois l'intensité des infections primaires et secondaires.

Le fait que certains facteurs agissent sur différents processus épidémiques se succédant dans le temps mériterait d'être pris en compte dans la combinaison de méthodes de lutte complémentaires à efficacité partielle. Des méthodes se complètent lorsque leur application combinée est basée sur (ou aboutit à) un complément bénéfique (conséquence positive en terme de moyens ou de résultats ; Suffert, 2005). Le terme "complémentation" peut tour à tour signifier "complémentarité" au sens strict, "additivité", "compatibilité" ou "supplétivité", chacun de ces termes mettant l'accent sur des "objets de complémentation" de natures différentes (processus et mécanismes d'action, effets et conséquences, nature et propriétés des moyens, échelles temporelles et spatiales d'expression). A l'issue de mes travaux de thèse j'ai défini et discuté ces différents termes comme suit :

*"Des méthodes de lutte sont dites "complémentaires" lorsque leurs mécanismes d'action respectifs se complètent de façon avantageuse ou ont un effet sur des processus écologiques, biologiques ou épidémiologiques élémentaires différents. Au début d'une épidémie d'origine tellurique, une désinfection de sol réduit par exemple la densité de propagules infectieuses en diminuant notamment leur capacité de germination (mécanisme), ce qui limite la mobilisation de l'inoculum primaire (processus). Conjointement, une bonne gestion de l'irrigation peut empêcher la croissance saprophytique du mycélium dans le sol (mécanisme), généralement favorisée par une humidité excessive du sol, ce qui limite alors les possibilités d'infections secondaires (processus).*

*Des méthodes de lutte sont dites "additives" lorsque leurs effets respectifs se complètent quantitativement de façon avantageuse. Les conséquences d'une combinaison de moyens de lutte doivent être significativement supérieures à celles constatées après la mise en œuvre de chacune d'entre elles de façon individuelle. L'"additivité" peut qualifier des moyens de lutte qui se complètent lorsque appliqués à un même stade épidémiologique : leurs effets peuvent être cumulatifs, même lorsque les différents moyens agissent sur des processus épidémiques identiques,*

*c'est-à-dire qui ne sont pas "complémentaires" au sens strict. Par exemple, à un stade assez avancé d'une épidémie foliaire, une limitation de l'irrigation par aspersion au profit d'un arrosage entre les rangs et l'emploi d'un traitement fongicide adapté, mis en œuvre de façon combinée, peuvent réduire les contaminations entre plantes et donc limiter l'efficacité des infections secondaires de façon nettement plus marquée que si l'une ou l'autre des actions était pratiquée seule.*

*Des méthodes de lutte sont dites "compatibles" lorsque leurs propriétés respectives se complètent qualitativement : de par leur nature intrinsèque, ou du point de vue de l'utilisateur, elles peuvent être mises en œuvre de façon combinée, à des échelles de temps, d'espace et dans des conditions socio-économiques équivalentes.*

*Des méthodes de lutte sont dites "supplétives" lorsque les échelles temporelles ou spatiales auxquelles elles agissent se complètent quantitativement de façon avantageuse. Les conséquences d'une combinaison de méthodes de luttés sont d'autant plus prononcées que les échelles d'intervention seront différentes. Des méthodes de lutte peuvent ainsi à la fois être efficaces sur les phases polycycliques (plusieurs cycles par an) et polyétiques (à récurrence pluriannuelle) d'une épidémie." (Suffert, 2005).*

#### **2.2.6. Mobiliser des connaissances relatives à des processus épidémiques centrés sur l'inoculum à des fins d'expertise scientifique**

J'ai rédigé en 2014 pour l'ANSES (CES RBSV) un avis scientifique sur un protocole expérimental de traitement contre le chancre coloré du platane par micro-injection de fongicides. Avec le concours d'André Vigouroux j'ai mis en évidence les limites de la stratégie expérimentale qui était présentée. Nous avons proposé des améliorations en nous appuyant sur les connaissances des processus épidémiques expliquant le développement du champignon pathogène *Ceratocystis platani*. Ce champignon parasite de plaies colonise le xylème et des rayons ligneux du platane, qu'il tue quelques années seulement après l'occurrence des primo-infections (Panconesi, 1999). La maladie se transmet essentiellement d'arbre en arbre par les racines. Les premiers cas d'attaque de platanes du Canal du Midi ont été détectés en 2006 (foyer primaire de Villedubert). Depuis, l'augmentation du nombre de nouveaux foyers a suivi une progression exponentielle en aval du foyer primaire. La rapidité de cette progression s'explique par le transport de particules infectieuses par l'eau du Canal (Vigouroux & Stojadinovic, 1990), favorisée par la circulation des bateaux, la présence de nombreuses anastomoses racinaires immergées dans l'eau (Fig. 15) ainsi que les multiples blessures infligées à ces racines par l'accostage des péniches de plaisance, qui constituent autant de points d'entrée pour le parasite.



**Figure 15** - Anastomoses racinaires d'un alignement de platanes le long du Canal du Midi (photo A. Vigouroux).

Des traitements préventifs ne peuvent être testés *in situ* que sur des arbres réellement sains quoiqu'exposés à une pression d'inoculum élevée (présence d'arbres malades à proximité). Compte tenu du contexte local et de l'état des connaissances épidémiologiques sur *C. platani*, il nous est apparu impossible d'identifier avec certitude de tels arbres ; nous avons conclu que l'efficacité préventive du traitement, à la différence de son efficacité curative, ne pourrait donc pas être estimée. Notre avis repose essentiellement sur une évaluation empirique de l'occurrence d'un processus épidémique (allo-infections) et l'identification d'un mécanisme particulièrement intense dans le contexte du Canal du Midi. Cet exemple, tiré d'une démarche d'expertise et non de recherche, montre qu'il est utile prendre en compte les processus épidémiques centrés sur l'inoculum et leurs conséquences sur le développement d'une épidémie.

### **2.3. Position centrale de l'inoculum primaire et processus impliqués dans la récurrence pluriannuelle des épidémies - Le cas d'une maladie aérienne, la septoriose du blé**

#### **2.3.1. Le système *Zymoseptoria tritici*-*Triticum aestivum***

La septoriose est l'une des principales maladies foliaires du blé (*Triticum aestivum*). Elle est causée par le champignon ascomycète *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg et al., 2011). La maladie est largement répandue dans le monde, notamment en Europe de l'Ouest où les conditions climatiques tempérées sont favorables au développement du parasite. Il a pu y provoquer jusqu'à 40% de pertes de rendement (Eyal et al., 1987), mais on s'accorde pour estimer actuellement ces pertes autour de 10% sur des variétés de blé commerciales moyennement sensibles (HGCA, 2012).





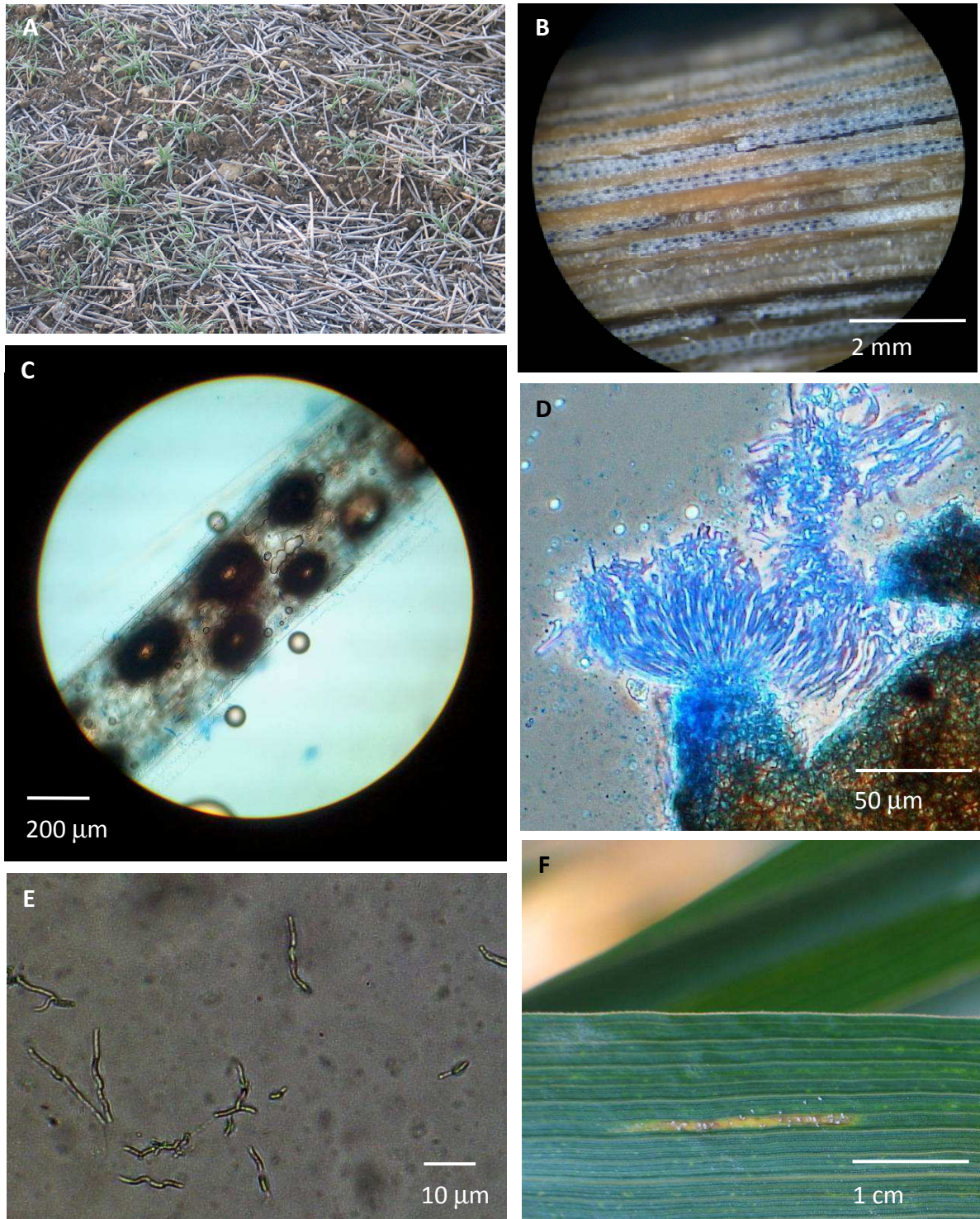
**Figure 16** - La phase asexuée de *Zymoseptoria tritici*. A - Lésion précoce sur première feuille vraie (L1) observée au champ quatre semaines après la levée (début décembre). B, C - Symptômes sur feuille L1 en cours de sénescence observés au champ pendant l'hiver (fin janvier). D - Lésions partiellement coalescentes sur feuille antépénultième (F2) observées après inoculation artificielle en serre. E - Attaque sévère de septoriose sur une parcelle agricole illustrée par l'état partiellement nécrosé des feuilles dans la partie basse du couvert. F - Pycnides matures (fructifications noires) avec exsudation de cirrhes (serpentins blancs) contenant des pycnidiospores. G - Colonies de *Z. tritici* (forme levure) obtenues après six jours de culture sur milieu PDA. H, I - Pycnides et cirrhes situées sous l'épi à la base du rachis et sur tige après inoculation artificielle (d'après la thèse de D. Morais ; photos F. Suffert).

L'inoculum (primaire et secondaire) de *Z. tritici* est un élément clé du développement des épidémies. Son rôle dans la dynamique de la maladie au printemps est connu depuis de nombreuses années. Son implication dans les phases précoces des épidémies et leur récurrence pluriannuelle, plus complexe et moins étudiée, est au cœur des travaux de recherche que je mène depuis 2007. Elle a fait l'objet d'une synthèse bibliographique (Suffert et al., 2011) et de la thèse de David Morais dont j'ai été l'encadrant principal.

Le cycle de vie asexué de *Z. tritici* est bien connu. Le champignon infecte des tissus foliaires vivants (feuilles vertes) en pénétrant par les stomates et peut survivre dans ces mêmes tissus morts ou en décomposition (chaumes et résidus). De petites nécroses foliaires portant des fructifications asexuées (pynides) apparaissent environ trois semaines après contamination (Fig. 16), ce qui fait de la septoriose une maladie dont la période de latence est considérée comme longue. Chaque pynide est capable de produire plusieurs milliers de pynidiospores (Eyal, 1971 ; Suffert et al., 2013).

Pendant la saison culturale la maladie se propage plante-à-plante (progression horizontale) et feuille-à-feuille (progression verticale) sur de courtes distances par dispersion pluviale des pynidiospores (Shaw, 1987). Lorsqu'une goutte d'eau touche un cirrhe mature, des pynidiospores se répartissent dans d'un film d'eau s'étalant à la surface de la feuille ; les éclaboussures issues de la fragmentation des gouttes incidentes incorporent alors des pynidiospores qui rejaillissent sur d'autres parties du couvert végétal et les contaminent (Rapilly, 1991). Les mécanismes biophysiques impliqués dans ce processus ont été très étudiés dans les années 90 et le sont toujours à Grignon (programmes conduits par Sébastien Saint-Jean et Laurent Huber dans l'unité ECOSYS, en collaboration avec Claude Pope). Au printemps, le développement des épidémies de septoriose d'intensifie. La vitesse de développement d'une épidémie est déterminée par le nombre de cycles de multiplication asexués (entre quatre et six), qui dépend lui-même des conditions de température (Bernard et al., 2013) et du nombre d'épisodes pluvieux (Shaw & Royle, 1993). La progression de la maladie se faisant du bas vers le haut du couvert, la capacité du blé à émettre de nouvelles feuilles avant que le parasite ne puisse les infecter (phyllochrone vs. pathochrone), détermine la capacité du couvert à "échapper" naturellement à la maladie (problématique abordée dans l'unité ECOSYS par Corinne Robert et Bruno Andrieu) ; le pathochrone correspond au nombre de phyllochrones (durée entre l'apparition de deux feuilles successives) par période de latence (Lovell et al., 1997).





**Figure 17** - La phase sexuée de *Zymoseptoria tritici*. A - Résidus de blé source d'inoculum primaire. B - Paille de blé contaminée sur laquelle sont visibles des alignements de périthèces implantés dans les espaces inter-nervaires. C - Alignement de périthèces observés au microscope optique. D - Périthèce (marron) et asques contenant des ascospores (bleu). E - Hyphes mycéliens issus de la germination d'ascospores. F - Lésion sporulante apparue après inoculation artificielle d'une feuille de blé avec des ascospores (d'après la thèse de D. Morais ; photos F. Suffert).

La forme sexuée de *Z. tritici* (ascospores) a pour la première fois été décrite en Nouvelle-Zélande (Sanderson, 1972). Elle a depuis été identifiée en France (Halama, 1996 ; Suffert & Sache, 2011) et sur tous les continents (Fig. 17). Les ascospores issues de la reproduction sexuée sont considérées comme la principale forme d'inoculum primaire. Elles se forment sur des résidus de la culture de blé de la saison n (Brown et al., 1978) et contaminent le blé de la saison n+1 dès la levée à la fin de l'automne (Suffert & Sache, 2011). Dans l'hémisphère Nord, cette période correspond généralement au pic de production des ascospores (Shaw & Royle, 1989 ; Hunter et al., 1999 ; Morais et al., 2015a). Contrairement aux pycnidiospores, les ascospores sont dispersées par le vent sur de longues distances. Elles sont produites dans des fructifications (périthèces) issues de la reproduction sexuée (croisement entre deux individus de type sexuel opposé, Mat1-1 et Mat1-2 ; Kema et al., 1996 ; Waalwijk et al., 2002).

Depuis 2007 je cherche à répondre à la question "Comment commence une épidémie à l'échelle d'une parcelle ?" Pour cela il est nécessaire d'identifier et de hiérarchiser l'ensemble des éléments qui conditionnent le "commencement" d'une épidémie : quels processus épidémiques interviennent et à quelles échelles spatio-temporelles, comment ces processus se combinent, quels mécanismes sont impliqués, par quels facteurs sont-ils influencés ? Cela nécessite également de caractériser les principaux attributs de l'inoculum primaire (nature, quantité, pathogénicité, origine) et son rôle exact dans le fonctionnement d'une épidémie (phases précoces et récurrence pluriannuelle).

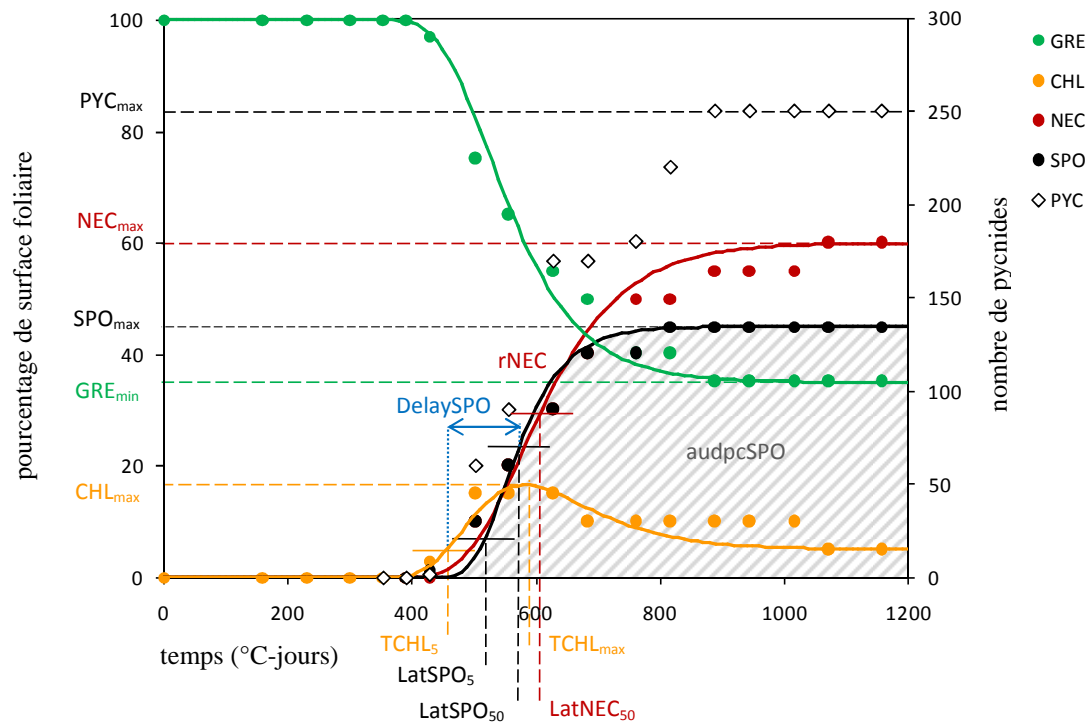
J'ai développé deux stratégies expérimentales complémentaires.

Je me suis tout d'abord appuyé sur un dispositif pluriannuel au champ (une parcelle cultivée en monoculture de blé semée en direct et une parcelle ayant un autre précédent) qui a permis :

- ▶ d'étudier la dynamique de maladie au cours des phases précoces des épidémies de septoriose ;
- ▶ d'évaluer le rôle des résidus sur le commencement et la récurrence pluriannuelle des épidémies ;
- ▶ de constituer une collection d'isolats de *Z. tritici* (> 3500) et de suivre la dynamique pluriannuelle d'une population pathogène locale (sélection locale) en fonction de différences d'origine de l'inoculum (locale vs. distante) et en tenant compte des effets de la saisonnalité (début vs. fin d'épidémie).

Je me suis ensuite appuyé sur une série d'expérimentations, essentiellement sur plantes adultes en serre, qui a permis :

- ▶ de mettre au point d'une méthode d'estimation des composantes d'agressivité de *Z. tritici* et la comparaison des profils d'agressivité de différentes sous-populations ;
- ▶ d'évaluer leur réponse à des facteurs biotique (résistance variétale) et abiotique (température) ;
- ▶ d'identifier certains déterminants de la reproduction sexuée.



**Figure 18** - Développement d'une lésion de septoriose sur une feuille drapeau de blé tendre. Les données expérimentales sont représentées par les points. Les lignes correspondent aux courbes ajustées en utilisant un modèle de Gompertz (surface verte exprimées en %, GRE ; surface chlorotique, CHL ; surface nécrotique, NEC ; surface sporulante, SPO ; nombre de pycnides, PYC). Le temps est exprimé en °C-jours, à partir de la date d'inoculation (d'après Suffert et al., 2013).

### 2.3.2. L'estimation des composantes d'agressivité chez *Z. tritici* : un pré-requis

Comme pour le cavity spot de la carotte je me suis intéressé à la façon dont mesurer une "quantité" de septoriose. J'ai caractérisé le développement de lésions pendant un cycle infectieux asexué. Une méthode d'inoculation localisée et d'analyse de la cinétique de développement d'une lésion m'a permis d'évaluer finement les composantes d'agressivité (Pariaud et al., 2009 ; Lannou, 2012) de *Z. tritici* : taille de lésions reflétant la sévérité de la maladie, période de latence, capacité de sporulation (surface sporulante, densité de pycnide, capacité de sporulation d'une pycnide). J'ai mis au point et validé cette méthode de phénotypage dans le cadre de l'évaluation de la résistance quantitative de différents cultivars de blé à la septoriose (projet FSOV Septoriose ; Suffert et al., 2013). Les feuilles de quatre cultivars de blé ont été inoculées au stade adulte avec quatre isolats de *Z. tritici*. Les surfaces chlorotique, nécrotique et sporulante, ainsi que la densité de pycnides, ont été estimés visuellement deux fois par semaine jusqu'à huit semaines après inoculation. Un modèle de Gompertz a été ajusté aux courbes décrivant la cinétique de ces différents symptômes (Fig. 18). Les corrélations entre composantes d'agressivité ont été calculées et discutées (choix de variables pertinentes). Une technique non destructive de collecte de pycnidiospores a également permis d'estimer le potentiel de sporulation d'une cohorte de pycnides et sa dynamique d'épuisement (données non publiées).

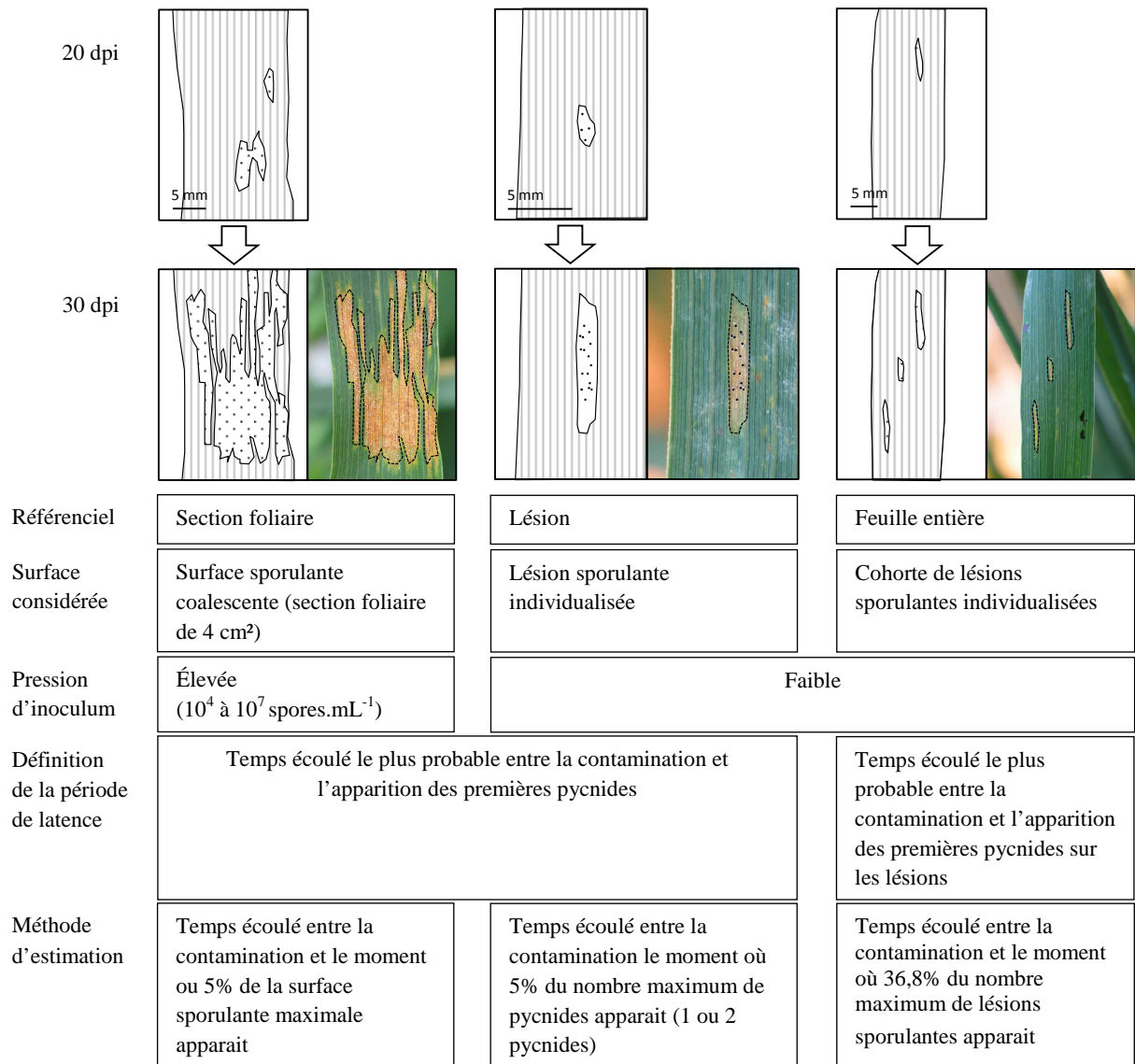
Les résultats obtenus en utilisant cette méthode en routine ont montré que la période de latence est un trait de fitness qui permet de différencier des isolats entre eux (Morais et al., en prép. ; Suffert et al., soumis). La méthode a été transférée et utilisée dans le cadre de collaborations avec des collègues de l'unité ECOSYS (Ben Slimane et al., 2011 ; Bernard et al., 2013).

La période de latence est communément définie comme l'intervalle de temps entre l'infection et le début de la phase de sporulation (Pariaud et al., 2009). Dans le cas de la septoriose du blé elle peut être estimée à l'échelle d'une lésion comme le temps écoulé entre la contamination et l'apparition de la première pycnide (Shearer & Zadoks, 1972 ; Armour *et al.*, 2004; Suffert *et al.*, 2013). Cette définition est utilisée dans deux cas :

- lorsque les conditions d'expérimentation ne permettent pas de prendre une cohorte de lésions comme référentiel (cas d'une inoculation par ascospores ; Morais et al., 2015a) par exemple lorsque la quantité de spores déposées par unité de surface foliaire est faible (proche des conditions naturelles ; Fig. 19) ;
- lorsque la quantité de spores déposées est très élevée (conditions d'expérimentation plus classiques, avec des suspensions d'inoculum comprises entre  $10^5$  et  $10^7$  pycnidiospores.mL<sup>-1</sup>) et que la zone inoculée est réduite (quelques cm<sup>2</sup>) ; dans ce second cas on peut estimer la période de latence comme le temps le plus probable (simulé) entre la contamination et l'apparition de 5% de la surface sporulante maximale (LatSPO<sub>5</sub> ; Fig. 19).

La période de latence peut aussi être estimée à l'échelle d'une feuille, lorsqu'une cohorte de lésions plutôt qu'une seule lésion peut-être prise comme référentiel. Elle est alors assimilée au temps écoulé entre la contamination et l'apparition des premières lésions sporulantes, c'est-à-dire le temps écoulé le plus probable entre la contamination et l'apparition

de la majorité des lésions présentant des pycnides (par exemple 50%, ou 37% correspondant au point d'inflexion d'une courbe de Gompertz ; Shaw, 1990 ; Lovell *et al.*, 2004 ; Zearfoss *et al.*, 2011 ; Bernard *et al.*, 2013).



**Figure 19** - Référentiel utilisé pour estimer la période de latence chez *Z. tritici*. Les surfaces sporulantes sont indiquées en blanc, chaque point noir représentant une pycnide ; dpi = nombre de jour post-inoculation.

### ***2.3.3. Attributs de l'inoculum primaire et processus impliqués dans le commencement d'une épidémie***

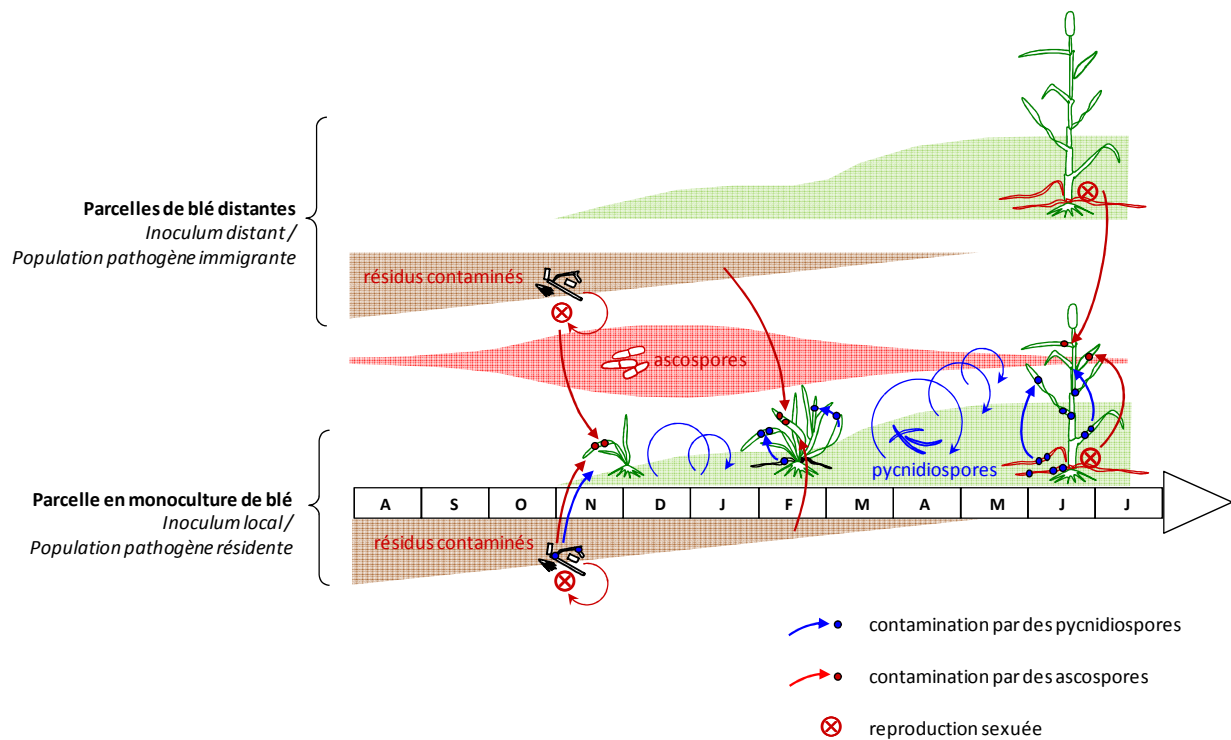
Qu'est ce que "le début" d'une épidémie ? La logique voudrait que l'on considère qu'une épidémie commence dès la première infection de tissus hôtes (par exemple au moment de la levée du blé ; Suffert & Sache, 2011) parfois plusieurs semaines avant l'apparition des tout premiers symptômes. La fin d'une épidémie annuelle coïnciderait avec la disparition des plantes hôtes, causée par leur destruction totale par la maladie (rare) ou par la récolte (très fréquent). Dans le cas d'une épidémie polycyclique, comment déterminer le passage entre les phases précoces et la phase épidémique, caractérisée par l'influence prépondérante de l'inoculum secondaire ? Je me suis concentré sur cette période charnière en m'intéressant aux flux d'inoculum. J'ai défini la période de transition entre les phases précoces et la phase épidémique par le moment où la quantité d'inoculum secondaire disponible (qui continue à s'accroître) dépasse celle d'inoculum primaire (qui diminue). A ce stade, la dynamique épidémique ne dépend plus de la quantité d'inoculum primaire.

La thèse de David Morais a été l'occasion d'identifier les principaux attributs de l'inoculum primaire, c'est-à-dire l'ensemble des éléments qui le caractérisent et peuvent influencer les processus et mécanismes déclencheurs d'une épidémie.

#### **2.3.3.1. Nature**

J'ai formalisé dans une revue bibliographique les différentes hypothèses relatives à la survie de *Z. tritici* et à la mobilisation de son inoculum (Suffert et al., 2011). On a longtemps pensé que les pycnidiospores (forme asexuée) constituaient la seule source d'inoculum primaire (Weber, 1922 ; Brokenshire, 1975). Il est désormais acquis que les infections primaires sont provoquées par les ascospores, transportées sur de longues distances par le vent, et que les infections secondaires sont provoquées par les pycnidiospores transportées par la pluie sur de courtes distances (Fig. 20). Dans le cas d'une succession blé-blé les pycnidiospores présentes sur résidus pourraient toutefois constituer une source d'inoculum primaire non négligeable (Holmes & Colhoun, 1975 ; Shaw, 1987). On peut penser qu'une parcelle cultivée en blé depuis plusieurs années et semée en direct rend possible la subsistance locale de nombreux génotypes de *Z. tritici* issus de cycles de reproduction asexuée (Zhan et al., 1998 ; Zhan & McDonald, 2013).

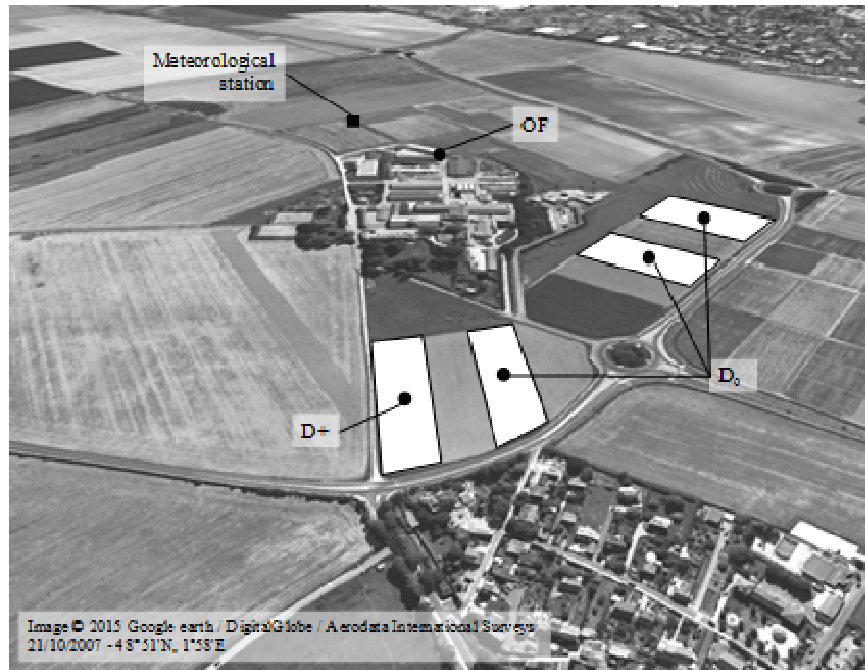




**Figure 20** - Représentation schématique de la dynamique annuelle d'une épidémie de septoriose.

J'ai mis en place à Grignon en 2007 un dispositif pluriannuel constitué de deux parcelles de blé (cv. Soissons sensible à la septoriose) aux trajectoires culturales contrastées (Fig. 21). La première parcelle, caractérisée par l'absence de résidus, est exposée chaque année à des sources distantes d'inoculum primaire, et la seconde, en monoculture de blé depuis 8 ans, présente une quantité importante de résidus contaminés agissant comme source locale d'inoculum primaire.

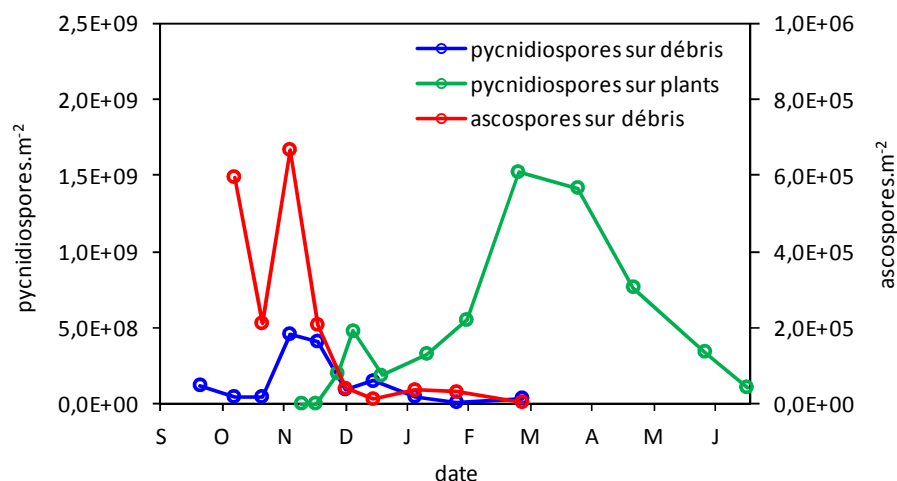
J'ai étudié l'influence locale des résidus, tout d'abord en prenant comme référentiel la "source" d'inoculum (c'est-à-dire les résidus eux-mêmes), puis la culture "cible" (c'est-à-dire le peuplement hôte, exposé à l'inoculum disponible localement). L'intérêt de cette double approche centrée sur l'inoculum était de se placer de part et d'autre du processus d'infection primaire, à une échelle locale (rarement étudiée ; Chen et al., 1994), pour estimer les contributions respectives de l'inoculum local et de l'inoculum distant. L'approche "source" a confirmé que les ascospores étaient la principale forme d'inoculum primaire (Suffert et al., 2011). La présence de résidus a eu un effet local prononcé (attaques plus précoces), qui s'est toutefois estompé en quelques semaines, probablement lorsque la mobilisation de l'inoculum distant (ascospores) est devenue supérieure à celle de l'inoculum local (pycnidiospores et ascospores).



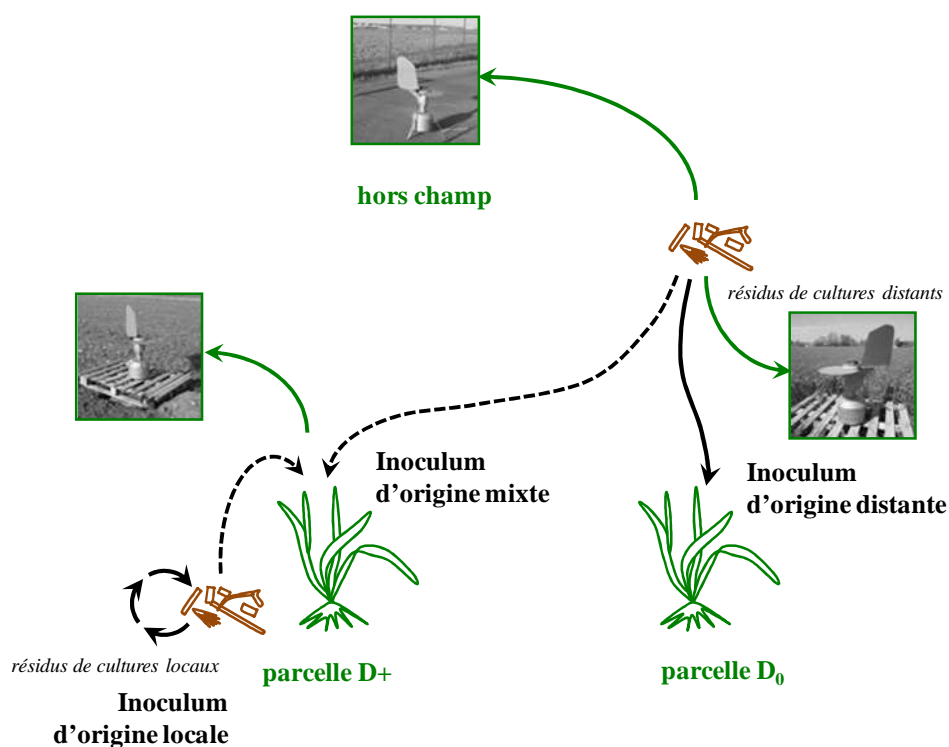
**Figure 21** - Dispositif pluriannuel constitué de deux parcelles de blé aux trajectoires culturales contrastées (2007-2015 ; Grignon). D+ : parcelle cultivée en blé depuis 2007, avec résidus non-enfouis ; D<sub>0</sub> : parcelle sans résidus (précédent autre que blé) dont la localisation change chaque année (d'après Morais et al., 2015b).

Alors que les épidémies de septoriose s'intensifient généralement entre mars et juin par multiplication asexuée, des contaminations pourraient aussi être provoquées à la fin du printemps par des ascospores produites à partir des résidus des cultures précédentes ou de feuilles sénescents de la culture de l'année (Hunter et al., 1999 ; Clinckemaillie et al., 2010 ; Fig. 20). Cette hypothèse est cohérente avec l'existence de pics de production d'ascospores en fin de saison culturale (Hunter et al., 1999 ; Bathgate & Loughman, 2001; Duvivier et al., 2013). Des observations au champ réalisées début juin attestent de la présence de lésions sur les feuilles supérieures F1 et F3-F4, mais de leur absence sur F2 (C. Maumené, Arvalis-Institut du Végétal, Boigneville, com. pers.), ce qui pourrait refléter ce processus. Des analyses génétiques portant sur des sous-populations locales de *Z. tritici* (Morais et al., en prép.) ont toutefois suggéré que le rôle des ascospores entre la fin de l'hiver et la fin du printemps était variable d'une année à l'autre. La différenciation entre les sous-populations collectées à différentes périodes épidémiques à partir de lésions foliaires a été très faible (estimée par des valeurs appariées de  $F_{ST}$  très basses - 0,016 en moyenne) ; ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus à une échelle spatiale fine par Chen et al. (1994) et Linde & McDonald (2002). Les sous-populations collectées *in planta* sont toutefois ressorties comme significativement plus différenciées certaines années (52% de paires de  $F_{ST}$  significatives en 2011-2012 contre 21% en 2009-2010). Nous avons montré que pendant l'épidémie 2011-2012 la quantité d'ascospores disponible dans l'air était très faible, comparativement à 2009-2010 (Morais et al., 2015b). Nous avons estimé que la sélection des individus les plus agressifs et la disparition des moins compétitifs pendant la saison épidémique (voir plus bas) pouvait





**Figure 22** - Cinétique annuelle de production de spores de *Z. tritici* sur une parcelle cultivée en monoculture de blé depuis plusieurs années (2009-2010, Grignon ; d'après Suffert & Sache, 2011).



**Figure 23** - Représentation schématique de l'origine des ascospores de *Z. tritici* collectées par trois pièges à spore en fonction de leur localisation (voir Fig. 21). Les pièges placés dans la parcelle D<sub>0</sub> et hors champ ont collecté des ascospores essentiellement d'origine distante ; les pièges placés dans la parcelle D+ (distante de 300 m de la parcelle D<sub>0</sub>) ont collecté des ascospores d'origine à la fois locale (D+) et distante, dans des proportions inconnues (d'après Morais et al., en prép.).

expliquer la différenciation un peu plus marquée entre les sous-populations de 2011-2012. Nous avons fait l'hypothèse que ces processus ont pu être compensés en 2009-2010 par l'arrivée d'inoculum distant pendant la phase épidémique (importante quantité d'ascospores piégées).

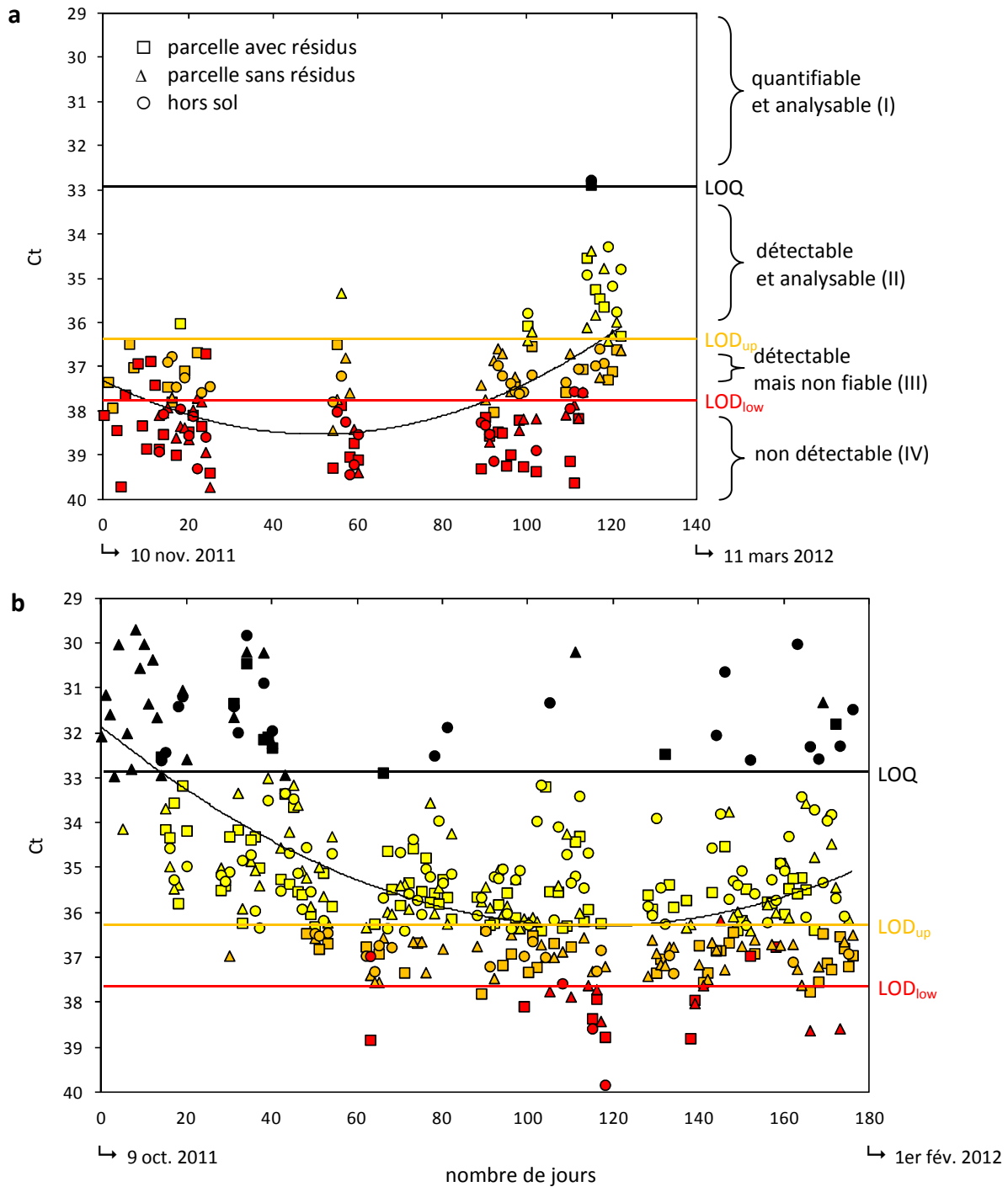
L'épidémiologie moléculaire est classiquement utilisée à des échelles régionales ou continentales pour suivre l'évolution des migrations de populations pathogènes, pour identifier les centres d'origine de maladies ou des effets fondateurs par analyses phytogéographiques. Elle est peu utilisée à des échelles spatio-temporelles fines. C'est une approche qui me semble pertinente pour comprendre comment la combinaison de différents processus centrés sur l'inoculum influencent les dynamiques épidémiques (e.g., Xhaard et al., 2012 ; Rieux et al., 2014a; 2014b).

**Au final**, représenter une épidémie annuelle de septoriose comme une série de cycles de reproduction asexués succédant à un seul cycle de reproduction sexuée serait simpliste. On ne peut assigner aux ascospores et aux pycnidiospores les rôles exclusifs d'inoculum primaire et d'inoculum secondaire, respectivement.

#### 2.3.3.2. Quantité

**Je me suis intéressé** à la quantité d'inoculum par une approche "source". J'ai estimé la quantité d'ascospores et de pycnidiospores que des résidus de blé contaminés étaient capables de produire (Suffert & Sache, 2011). La fin de la phase précoce d'une épidémie correspond en théorie au moment où la quantité d'inoculum secondaire disponible dépasse la quantité d'inoculum primaire. Cette période ne peut toutefois pas être positionnée avec précision simplement en comparant les quantités d'ascospores issues des résidus de blé et les quantités de pycnidiospores produites sur les plants de blé en croissance ; la disponibilité de chaque type de spore n'est en effet pas la même, compte tenu de mécanismes de dispersion très différents. J'ai toutefois situé cette période autour du mois de janvier (Fig. 22), qui correspond au moment où la différence de précocité d'attaque entre une parcelle avec de l'inoculum primaire (résidus contaminés sur le sol) et une parcelle sans commence à s'estomper.

L'inoculum primaire a ensuite été étudié par une approche "cible" dans la thèse de David Morais. Notre objectif était de quantifier en début d'épidémie, en s'intéressant cette fois-ci à la quantité d'ascospores disponibles au-dessus d'une parcelle de blé "cible". Plusieurs questions ont été abordées : Quelles quantités d'ascospores présentes dans l'air peuvent être détectées ou quantifiées ? Comment ces quantités varient-elles entre le début et la fin d'une épidémie ? Quels sont les effets de la présence locale de résidus sur cette quantité ? Quelle est l'influence de cette quantité sur la précocité des épidémies ? Nous avons travaillé sur deux épidémies successives (2011-2012 et 2012-2013) au sein du dispositif pluriannuel de Grignon.



**Figure 24** - Quantité d'ADN de *Z. tritici* sur des sections journalières de bandes de piégeage analysées par qPCR pour les saisons 2011-2012 (a) et 2012-2013 (b). Chaque valeur de Ct a été calculée en utilisant trois répliquas indépendants. Les échantillons provenant de trois pièges à spore différents ont été assignés à quatre classes de quantification/détection. La limite de quantification (LOQ) et les limites haute et basse de détection (LOD<sub>up</sub> and LOD<sub>low</sub>) sont représentées par les lignes horizontales de couleur (d'après Morais et al., 2015b).

La capture d'ascospores à l'aide d'un piège volumétrique couplé à une quantification de l'ADN par qPCR (Duvivier et al., 2013) a permis de quantifier l'inoculum primaire présent dans l'air au-dessus des parcelles pendant les phases épidémiques précoces. Les limites techniques de la méthode, en particulier les seuils de détection (limite basse :  $13 \pm 4$  ascospores.m<sup>-3</sup>.jour<sup>-1</sup> ; limite haute  $19 \pm 6$  ascospores.m<sup>-3</sup>.jour<sup>-1</sup>) et de quantification ( $121 \pm 40$  ascospores.m<sup>-3</sup>.jour<sup>-1</sup>), ont été déterminées et discutées (Morais et al., 2015b). Nous avons travaillé à la fois sur les quantités d'ADN fongiques moyennes de plusieurs centaines d'échantillons journaliers et sur la proportion d'échantillons affectés aux classes de détection/quantification précédemment définies (ADN non détecté, détecté, quantifiable ; Fig. 24). Cette seconde approche a été convaincante, en particulier pour les périodes temporelles (année, saison) où la majorité des échantillons se situait sous le seuil de quantification. L'ensemble des données a ainsi pu être exploité.

La première année étudiée (2011-2012) a succédé à une épidémie peu intense (2010-2011), contrairement à la seconde année (2012-2013). Des effets intra-annuels ont été mis en évidence : la quantité d'ascospores présente au début des épidémies a varié avec la saison (accroissement jusqu'au milieu de l'hiver 2012-2013, puis diminution jusqu'au printemps) et le niveau de contamination des résidus (estimé par des tests d'éjection d'ascospores). Au cours des deux années ni la présence locale de résidus contaminés ni la quantité d'inoculum au-dessus des parcelles n'ont été corrélées avec la précocité des épidémies. Nous avons montré que l'inoculum est toujours présent en quantité suffisante pour initier une épidémie, même si les attaques précoces sur les premières feuilles de blé peuvent être transitoirement un peu plus intenses en présence de résidus contaminés (Suffert & Sache, 2011). La principale conséquence de ces résultats est qu'une gestion quantitative de l'inoculum, dans les systèmes de culture céréalières actuels, n'est pas une solution réaliste : l'inoculum primaire de *Z. tritici* ne semble jamais réellement être en quantité limitante. La quantification/détection d'ascospores semble peu utile en pratique (modèles de prévision).

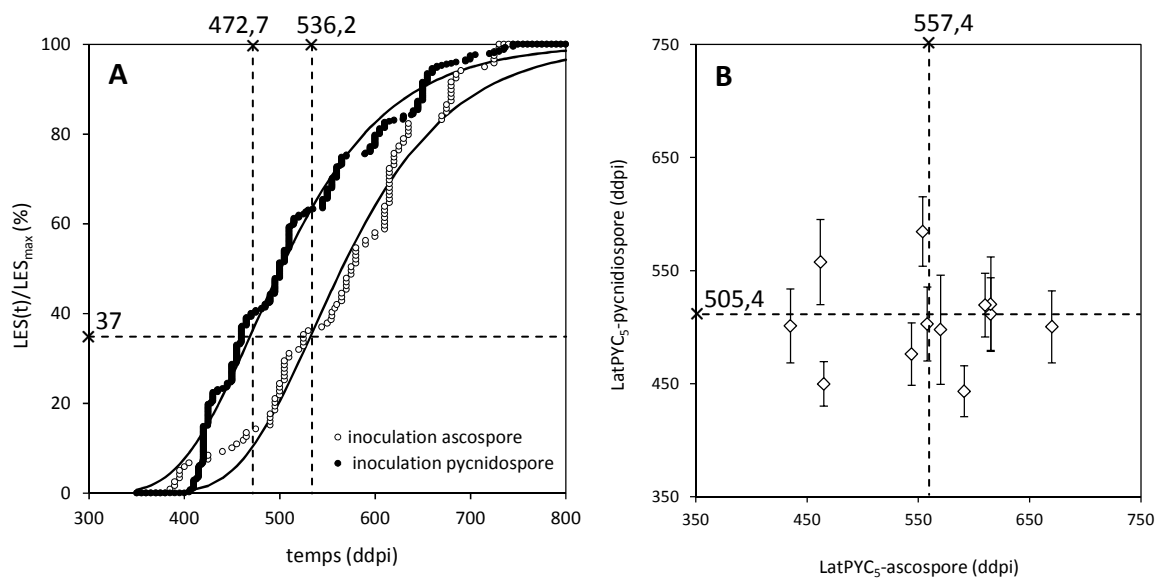
### 2.3.3.3. Efficacité d'infection et pathogénicité

L'efficacité d'infection et la pathogénicité sont deux autres attributs de l'inoculum primaire. Ils caractérisent la capacité d'une propagule infectieuse à induire plus ou moins de symptômes. Efficacité d'infection et pathogénicité dépendent du génotype des individus constituant le pool d'inoculum primaire (certains individus virulents sont plus ou moins agressifs) mais aussi de sa nature (l'infection par certains types de propagules est plus efficace que d'autres). Comme précisé plus haut, les ascospores et les pycnidiospores de *Z. tritici* peuvent être conjointement impliquées à des phases épidémiques identiques tout en étant présentes en quantité différentes. La question de leur différence d'efficacité d'infection ou de pathogénicité se pose donc assez naturellement : une ascospore et une pycnidiospore en situation d'infecter (déposées sur une feuille) "se valent-elles" ?

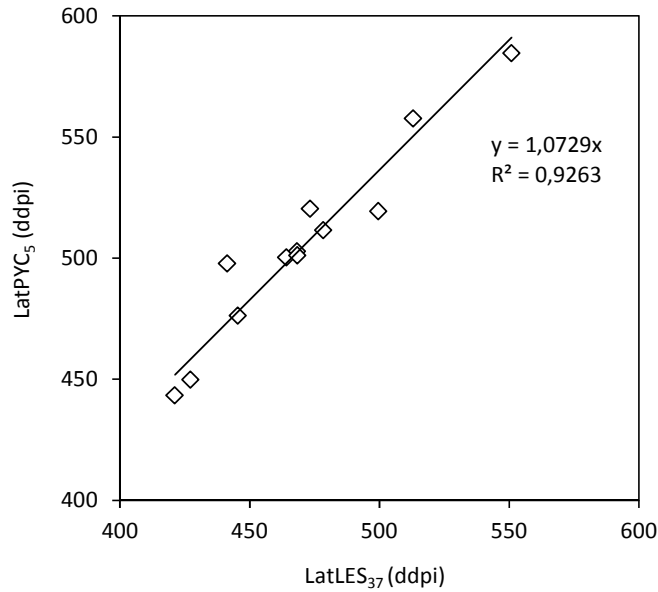
Estimer l'efficacité d'infection de spores est un défi expérimental. C'est techniquement possible pour des spores de grande taille (déjà réalisé dans l'équipe pour différents isolats de rouille brune ; Azzimonti, 2013). Pour des spores de très petite taille (ascospores) ou hyalines

(pycnidiospores) c'est en revanche très difficile avec des techniques microbiologiques classiques.

Dans la thèse de David Morais, la pathogénicité des deux types de spores a été comparée en inoculant des feuilles de blé adultes successivement avec des ascospores et des pycnidiospores. Des ascospores collectées à partir de résidus naturellement contaminés ont tout d'abord été utilisées. Des pycnidiospores issues des lésions résultant de l'inoculation par les ascospores ont ensuite servi à inoculer les feuilles d'un second lot de plantes. Le développement des lésions résultant des deux types d'infection a été suivi et les composantes d'agressivité ont été estimées. La période de latence a été évaluée de deux manières (Fig. 19) : à l'échelle d'une feuille, en analysant la cinétique d'apparition de lésions sporulantes, puis à l'échelle d'une lésion, en analysant la cinétique d'apparition de pycnides. Dans le premier cas (Fig. 25A) la comparaison a porté sur des individus différents sans que la différence ne puisse faire l'objet d'un test statistique. Dans le second cas (Fig. 25B) la comparaison a porté sur un nombre limité d'individus, mais identiques ; un test statistique s'est avéré possible, permettant de s'affranchir de la variabilité inter-individuelle (Morais et al., 2015a). Nous avons montré que la période de latence consécutive à une infection par ascospore est plus longue d'environ 60 degrés-jours (soit trois ou quatre jours au début de l'automne) qu'après une infection par une pycnidiospore (Morais et al., 2015a). Ce résultat a été obtenu avec les deux estimations de la période de latence, qui se sont révélées bien corrélées (Fig. 26).



**Figure 25** - Estimation des périodes de latence de *Z. tritici* après contaminations par des ascospores et des pycnidiospores. A -  $LatLES_{37}$  : temps écoulé entre la contamination et le moment où 37% du nombre maximum de lésions sporulantes apparaissent. B -  $LatPYC_5$  : temps écoulé entre la contamination et le moment où 5% du nombre maximum de pycnides apparaissent (d'après Morais et al., 2015a).



**Figure 26** - Corrélation entre deux estimations de la période de latence (LatPYC<sub>5</sub> et LatLES<sub>37</sub>; voir définitions Fig. 25) de 12 isolats de *Z. tritici*.

D'autres champignons ascomycètes parasites de grandes cultures (*Pyrenopeziza brassicae* et *Leptosphaeria maculans* agents pathogènes du colza, ou *Didymella rabiei* agent pathogène du pois chiche) présentent des différences de pathogénicité entre les spores sexuées et asexuées (Karolewski et al., 2002 ; Li et al., 2004 ; Trapero-Casas et al., 2007). Ces différences pourraient être dues à leur différence de taille, les spores les plus grosses ayant davantage de ressources nutritives et probablement une capacité d'infection supérieure.

La différence de période de latence entre les ascospores et les pycnidiospores pourrait avoir des conséquences significatives pendant les phases d'une épidémie où les deux types de spores sont impliquées, c'est-à-dire au commencement ou pendant les deux derniers mois de l'épidémie.

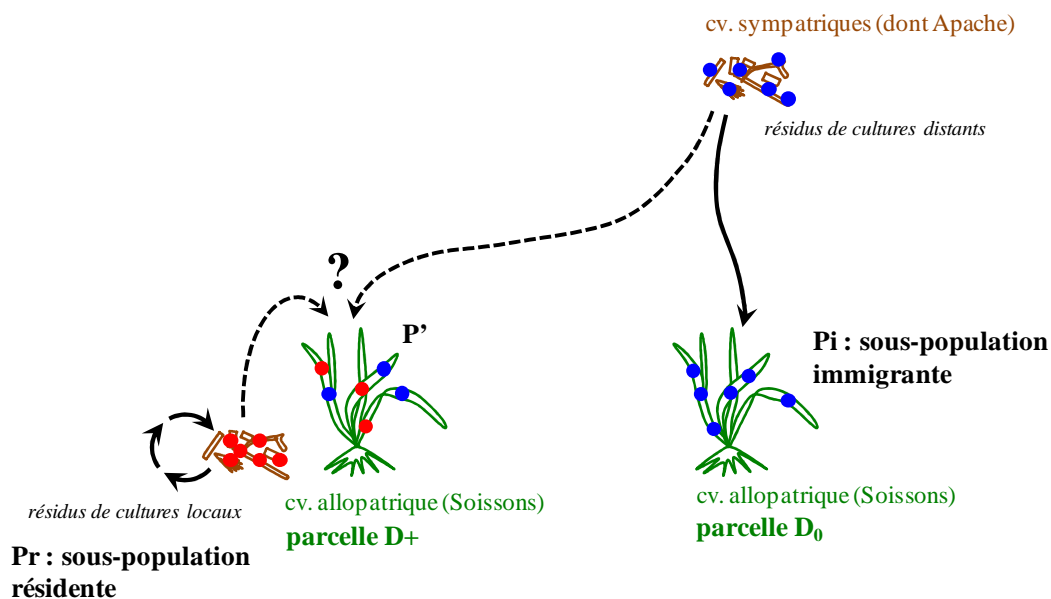
#### 2.3.3.4. Origine

**D**ans la troisième partie de la thèse de David Morais nous avons cherché à mettre en évidence des différences d'origine de l'inoculum primaire (distant vs. local). Deux stratégies complémentaires ont été retenues : l'une de génétique des populations, l'autre basée sur la comparaison de profils d'agressivité.

La première stratégie a consisté à rechercher des changements dans la structure génétique de différentes sous-populations de *Z. tritici* collectées dans les deux parcelles du dispositif expérimental de Grignon pendant trois épidémies successives (collaboration avec Anne-Sophie Walker). Nous avons utilisé une méthode de génotypage par marqueurs neutres SSR, que j'ai préalablement contribué à valider (Gautier et al., 2014). Les résultats obtenus

n'ont pas permis de distinguer différentes origines de l'inoculum primaire : aucune différence entre les sous-populations résidentes (locales) et immigrantes (distantes), ni de discontinuité génétique entre sous-populations de fin (saison n) et de début d'épidémie (saison n+1), n'a été mise en évidence. Des preuves indirectes de reproduction sexuée, tant dans la parcelle avec résidus que sans résidus, ont été obtenues : ratio entre individus de types sexuels opposés (MAT1.1 et MAT1.2) équilibré, fraction clonale (1-G/N) et estimateur du déséquilibre de liaison ( $r_D$ ) proches de zéro. La diversité génétique ( $H_e = 0,44$ ) et la richesse allélique moyenne ( $A_r = 4,06$ ) ont été très élevées, en accord avec les résultats de la littérature (Chen et al., 1994 ; Linde & McDonald, 2002). De légères différenciations chez certaines sous-populations (valeurs appariées de  $F_{ST}$ ), cohérentes avec les résultats d'épidémiologie quantitative, ont toutefois été mises en évidence (voir plus haut).

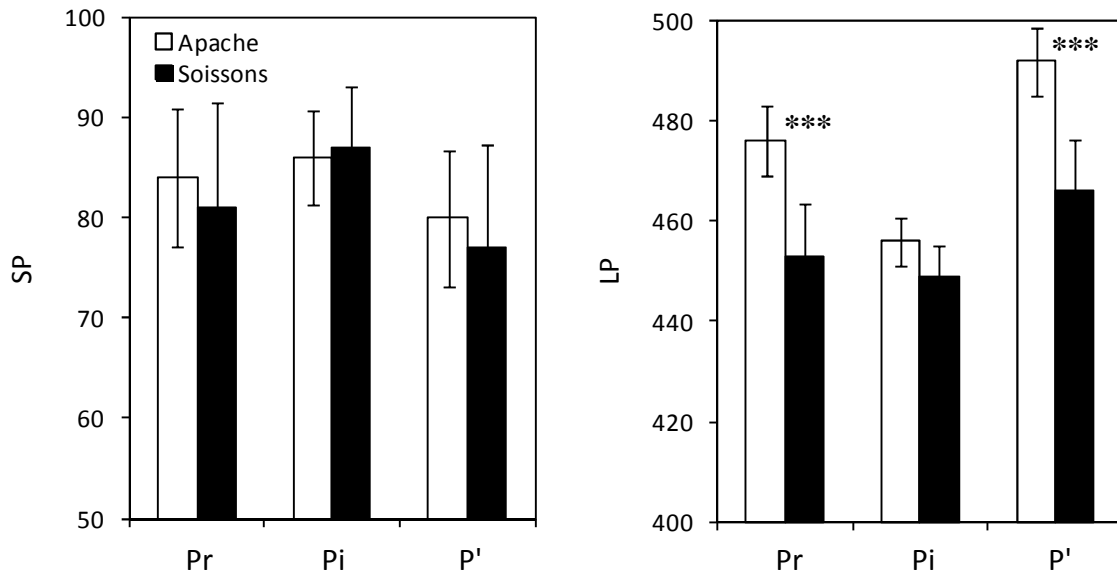
La seconde stratégie a consisté à comparer le profil d'agressivité (capacité de sporulation et période de latence) d'une sous-population de *Z. tritici* collectée en début d'épidémie dans la parcelle en monoculture de blé (P' ; Fig. 27) à celui d'une sous-population résidente (Pr) et d'une sous-population immigrante (Pi).



**Figure 27** - Représentation schématique de l'origine de sous-populations locales de *Z. tritici*. Pr : sous-population résidente constituée de 12 isolats issus d'ascospores provenant de résidus présents dans la parcelle ; Pi : sous-population immigrante constituée de 12 isolats issus de lésions foliaires provoquées par des ascospores d'origine distante ; P' : sous-population constituée de 12 isolats issus de lésions foliaires dont l'origine (distance vs. locale) est à déterminer.

Nous avons montré que les isolats de la population résidente (Pr) étaient maladaptés à un de leurs hôtes allopatriques (cv. Apache), alors que ceux appartenant à la population immigrante Pi ne l'étaient pas, malgré qu'ils ont été collectés sur leur hôte sympatrique (Fig. 28). Le profil de la population testée, plus proche de celui de la population résidente, suggère que l'épidémie

a été déclenchée majoritairement par un inoculum primaire d'origine locale. L'expérimentation a porté sur  $3 \times 12$  isolats de *Z. tritici* collectés au début de l'épidémie 2009-2010 ; elle a été répétée au printemps 2015 en utilisant des isolats issus d'autres sous-populations collectées au début de l'épidémie 2012-2013 (données en cours d'analyse).



**Figure 28** - Surface sporulante moyenne (SP, en % de la surface foliaire inoculée) et période de latence (LP, en nombre de °C-jours après inoculation) estimées pour les trois sous-populations Pr, Pi et P' de *Z. tritici* populations (voir définitions Fig. 19) sur deux cultivars (Apache and Soissons). \*\*\* :  $P < 0.001$  (Student-Newman-Keuls tests) (d'après Morais et al., en prép.).

D'un point de vue appliqué, il ressort de l'étude des principaux déterminants de l'inoculum primaire et de son implication dans les processus épidémiques qu'une gestion quantitative de l'inoculum (réduction) serait finalement difficile à mettre en œuvre et donc peu efficace. A l'inverse, sa gestion qualitative, prenant par exemple en compte l'adaptation rapide des populations pathogènes à leurs hôtes, mériterait d'être intégrée dans des stratégies de protection (alternance de variétés dans l'espace et le temps).

D'un point de vue académique, mes travaux ont également permis de discuter la définition du "début" et de la "fin" d'une épidémie, selon que l'on se place à une échelle annuelle (absence de l'hôte comme critère de début/fin) ou pluriannuelle (discontinuité de pression pathogène comme critère de début/fin, indépendamment de l'absence de l'hôte). La pérennisation et l'exploitation du dispositif pluriannuel de Grignon est exigeante en moyens humains mais permet de répondre à de nouvelles questions de recherches lorsque celles-ci apparaissent ou gagnent en pertinence.



## 2.4. Pilotage de processus épidémiques par la température à différentes échelles spatio-temporelles - Le cas de la septoriose du blé

Le transfert de concepts d'écologie (biologie thermique et écologie évolutive) vers l'épidémiologie fonctionnelle est utile pour comprendre la façon dont les processus épidémiques centrés sur l'inoculum sont pilotés, par exemple par la température, à l'échelle d'un monocycle.

En quoi l'hétérogénéité de réponse à la température des populations pathogènes contribue-t-elle à les structurer dans l'espace et le temps, à différentes échelles ? J'expose ci-dessous mes premiers éléments de réponse. Je reviendrai dessus dans la partie perspective de ce mémoire.

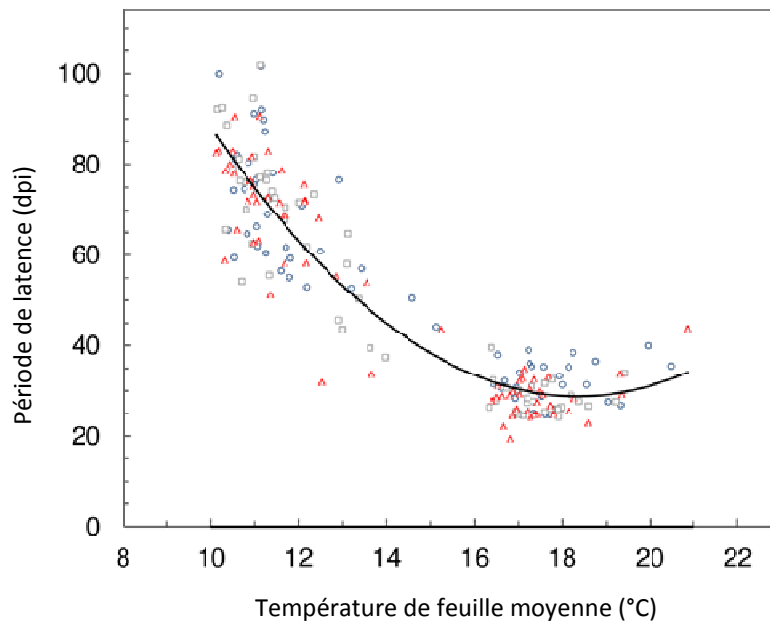
### 2.4.1. Echelle foliaire, échelle d'un monocycle

La température est un des principaux facteurs climatiques qui pilote le développement des maladies foliaires. Son influence sur le développement de *P. striiformis* (rouille jaune du blé) à différentes étapes de son cycle parasitaire et la sensibilité à la température de différents pathotypes sont étudiées dans l'équipe depuis quelques années (Mboup et al., 2012). Je m'intéresse depuis 2010 aux effets de la température sur le développement de la septoriose à l'échelle d'un monocycle. J'ai développé des approches biophysiques (collaboration avec Michaël Chelle) pour comprendre les mécanismes qui influencent la cinétique d'infection (monocycle), mais aussi populationnelles pour comprendre comment la variabilité des réponses aux fluctuations de température peut influencer les dynamiques de maladie.

Nous avons étudié la réponse à la température de *Z. tritici* en interaction avec son hôte (feuille de blé), de l'infection jusqu'à l'apparition d'une lésion sporulante. Comme les champignons parasites des feuilles se développent à la surface puis à l'intérieur des feuilles, c'est la température de feuille (*body temperature* en écologie) qui pilote leur développement. Il est établi que la température de feuille, une caractéristique du phylloclimat (Chelle, 2006) peut différer significativement de la température d'air en fonction des conditions mésoclimatiques. C'est pourtant la température d'air qui est systématiquement utilisée par les phytopathologistes. La prise en compte de la température d'air est à l'origine de deux biais : la température mesurée n'est pas celle qui est réellement perçue par l'agent pathogène et l'hétérogénéité spatiale des températures au sein du peuplement n'est pas prise en compte. Les processus épidémiologiques dont la vitesse est influencée par la température sont modélisés de façon erronée si la température prise en compte s'éloigne trop de celle de la feuille.

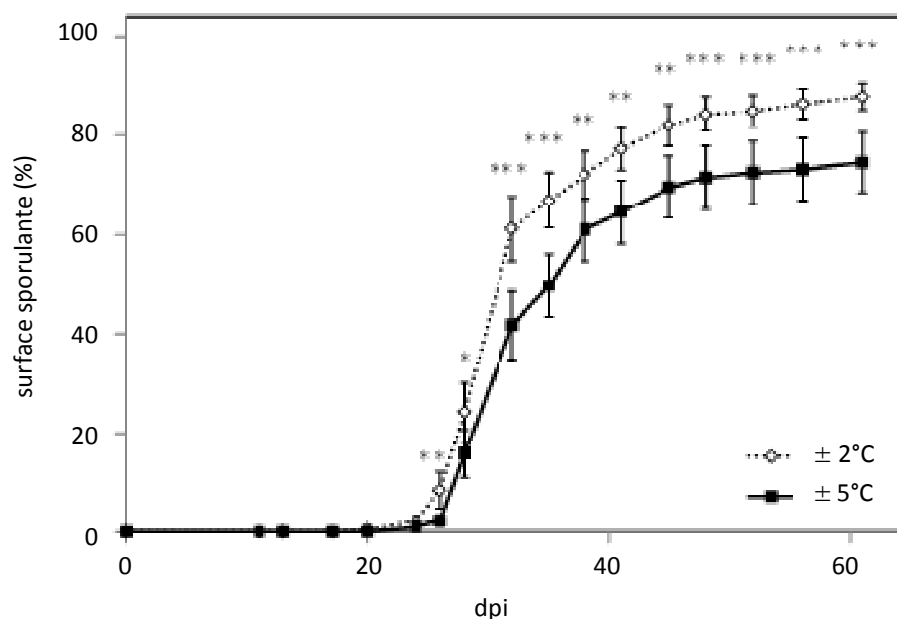
L'objectif de la thèse Frédéric Bernard était de reconsidérer la prise en compte de la température pour étudier le développement d'un champignon pathogène foliaire en combinant une approche expérimentale et de modélisation. Cela a été possible grâce à un dispositif consistant à mesurer en continu la température (modifiée via un système de forçage thermique par lampe infrarouge) d'environ 200 feuilles inoculées par *Z. tritici*. Nous avons établi la loi de réponse (courbe de performance thermique ou TPC pour *thermal performance curve* ;

Angiletta, 2006) de la période de latence (Fig. 29). Elle est non linéaire sur l'ensemble de la gamme de température testée et présente un optimum thermique à environ 18°C (Bernard et al., 2013), ce qui est cohérent avec les données disponibles dans la littérature (Shaw, 1990). L'optimum thermique de *Z. tritici* estimé *in vitro* (croissance sur milieu artificiel), c'est-à-dire en s'affranchissant de l'interaction avec le blé, est comprise entre 21 et 23°C (Zhan & McDonald, 2011 ; Legeay et al., non publié), soit 3 à 5°C de plus que sur plante.



**Figure 29** - Effet de la température moyenne de feuille sur la période de latence de trois isolats de *Z. tritici* (▲, ◻, ○) ; la courbe représente la loi de réponse (ajustement de l'ensemble des données à l'équation d'une fonction quadratique) (d'après Bernard et al., 2013).

Nous avons dans un second temps caractérisé l'impact de l'amplitude des fluctuations de la température des feuilles sur le développement des lésions. Une amplitude élevée (fluctuation journalières de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  par rapport à la moyenne, comparée à  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) a eu plusieurs effets négatifs : augmentation de la durée du cycle infectieux, diminution de la surface sporulante des lésions et de la densité de pycnides (Fig. 30 ; Bernard et al., en prép.). Les différences de cinétique de développement en fonction de l'amplitude des fluctuations n'ont été que partiellement expliquées par un effet mathématique (effet Kaufman, 1932), suggérant qu'un ou plusieurs mécanismes physiologiques pouvait chez *Z. tritici* atténuer les conséquences négatives d'amplitudes de fluctuation élevées.



**Figure 30** - Evolution temporelle de la taille moyenne des lésions foliaires provoquées par un isolat de *Z. tritici* (exprimée en % de la surface foliaire inoculée en fonction du nombre de jours après inoculation) sous deux ambiances thermiques caractérisées par des amplitudes journalières de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  et  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  autour d'une même température moyenne ( $18^{\circ}\text{C}$ ) ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , déterminés par un test de Student (d'après Bernard et al., 2013).

Les travaux de thèse de Frédéric Bernard ont été complétés par une expérimentation sur plante visant à comparer les TPC d'un nombre plus important d'isolats de *Z. tritici* ( $2 \times 9$ ) provenant deux régions françaises caractérisées par des amplitudes thermiques contrastées (Finistère et Côte-d'Or). L'objectif était également d'évaluer la variabilité inter-individuelle de la réponse à la température (données en cours d'analyse).

Il est possible d'obtenir les TPC d'un trait phénotypique particulier (vitesse de croissance ou taux de multiplication cellulaire) chez un agent pathogène cultivable tel que *Z. tritici* en se plaçant dans des conditions artificielles. Néanmoins, utiliser ensuite ces TPC pour estimer les conséquences de variations de température sur le développement d'une épidémie est une stratégie discutable. Des résultats quantitatifs obtenus *in vitro* ne peuvent être extrapolés sur plante, ne serait-ce que parce que la réponse attendue est celle de la "maladie", qui résulte de l'interaction entre la plante et l'agent pathogène.

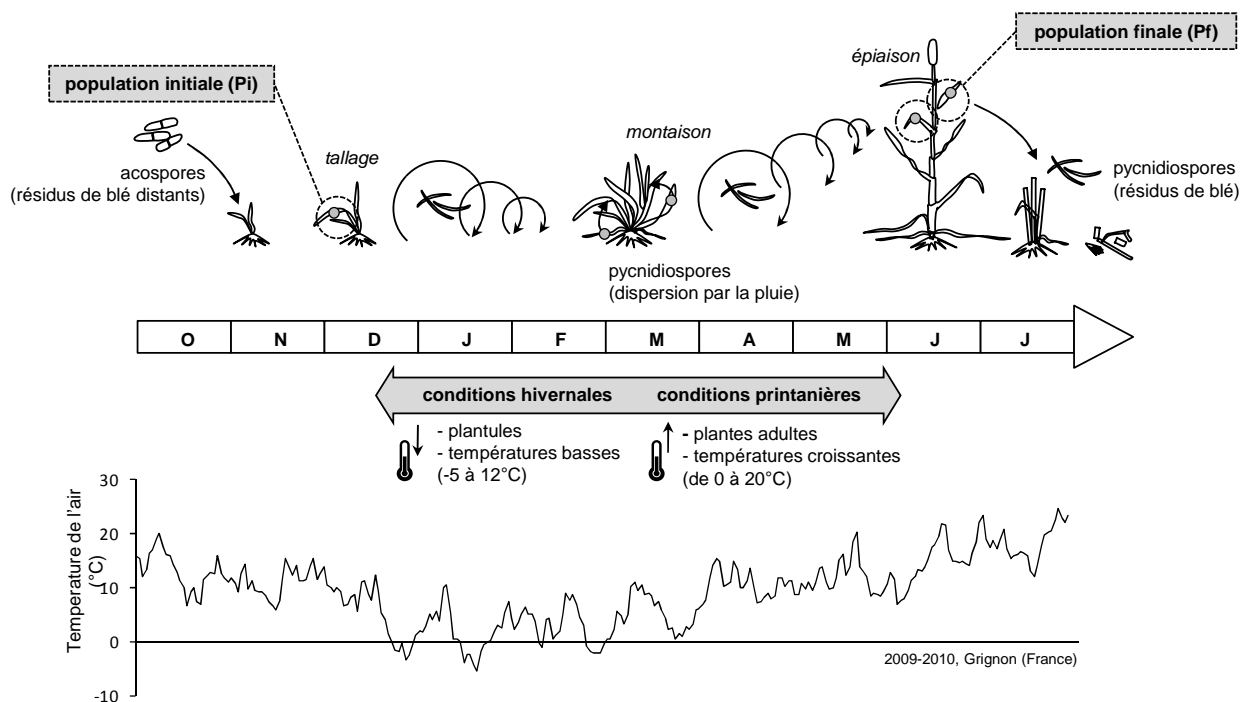
Pour estimer l'adaptation à la température il est essentiel d'identifier le trait phénotypique pertinent qui fera l'objet de la TPC ; il est intéressant qu'il s'agisse d'un trait de fitness potentiellement soumis à sélection dans les conditions naturelles. Dans le cas de *Z. tritici* la plupart des traits de fitness correspondent à des composantes d'agressivité qui ne s'expriment (et ne peuvent être estimées) que sur plante (Suffert et al., 2013).

Paradoxalement, les approches *in vitro* ont de quoi séduire : grâce à leur caractère miniaturisé elles permettent d'élaborer des TPC pour un nombre plus important d'isolats, de caractériser l'hétérogénéité de leur réponse et de tester différentes hypothèses de trajectoires sélectives : origine géographique (Zhan & McDonald, 2011) ou saisonnalité (début vs. fin d'épidémie ; Suffert et al., soumis). Il faut toutefois être conscient que le niveau de performance d'un trait artificiel estimé *in vitro* a un sens épidémiologique limité.

#### ***2.4.2. Echelle de la plante, échelle d'une épidémie polycyclique***

**P**résente chaque année dès la fin de l'automne, la septoriose est soumise à des conditions de températures contrastées d'une saison à l'autre (Suffert et al., 2011 ; Morais et al., 2015b). Je me suis intéressé aux effets de la saisonnalité sur la dynamique des épidémies. J'ai cherché à savoir si les composantes d'agressivité pouvaient évoluer à court terme au sein d'une population locale : sur la base de quels traits de vie les populations locales pourraient-elles faire l'objet d'une sélection à court terme et s'adapter ? J'ai cherché à identifier les processus épidémiques qui pouvaient être impliqués dans une telle sélection : de quelle façon les conditions hivernales puis printanières peuvent-elles piloter une cette sélection ?

Pour comprendre comment les fluctuations saisonnières de température peuvent affecter le développement des épidémies, j'ai mis en place un protocole expérimental visant à détecter certains patrons adaptatifs chez *Z. tritici* entre le début et la fin d'une épidémie. J'ai comparé en conditions contrôlées la fitness de deux sous-populations pathogènes locales (30 isolats), l'une collectée au commencement d'une épidémie (Pi, résultant d'infections primaires par des d'ascospores), l'autre collectée en fin d'épidémie (Pf, résultant d'infections secondaires par des pycnidiospores). Les composantes d'agressivité des 30 isolats ont été estimées dans les conditions environnementales (température et stade du blé) auxquelles a été successivement exposée la population pathogène Pi : conditions "printanières" sur plantes adultes (19°C, en serre) et conditions "hivernales" sur plantules (9°C, en chambre climatique) (Fig. 31).



**Figure 31** - Représentation du développement d'une épidémie de septoriose et des conditions environnementales (température d'air et stades du blé) pendant la saison culturale 2009-2010 (Grignon, France ; d'après Suffert et al., soumis).

J'ai établi que la population finale Pf était significativement plus agressive que Pi, en cohérence avec d'autres résultats de la littérature (Newton & McGurk, 1991 ; Villareal & Lannou, 2000 ; Andrivon et al., 2007 ; Le May et al., 2012). J'ai par ailleurs montré que Pf était mieux adaptée aux conditions hivernales que Pi en ce qui concerne l'intensité de la sporulation, et mieux adaptée aux conditions printanières en ce qui concerne la période de latence (Suffert et al., soumis). Ces différences, complétées par une variabilité phénotypique intra-population significativement plus faible dans Pf que dans Pi, suggèrent que les individus ayant l'intensité de sporulation la plus élevée ont été sélectionnés pendant l'hiver et que ceux ayant la période de latence la plus courte l'ont été au printemps. Cette interprétation est cohérente avec ce que l'on connaît des processus épidémiques responsables du développement d'une épidémie de septoriose : en hiver, période où la quantité d'inoculum est parfois limitante, seraient avantagés les individus produisant davantage de pycnidiospores (capacité de sporulation élevée) tandis qu'au printemps, période où la maladie monte dans le couvert, ce sont plutôt les individus capable d'achever rapidement leur cycle infectieux (période de latence plus courte) qui auraient un avantage compétitif.

Les résultats de cette étude expérimentale complètent de façon originale ceux obtenus précédemment sur plusieurs parasites foliaires des céréales dans l'équipe épidémiologie (Mboup et al., 2012) et celle de Bruce McDonald (Zhan et al., 2012 ; Stefansson et al., 2013 ; Abang et al., 2006 ; Sommerhalder et al., 2011). En l'état actuel, j'ai montré qu'un potentiel adaptatif peut s'exprimer localement à court terme (échelle intra-annuelle).

### 2.4.3. Echelle de la plante, échelle pluriannuelle

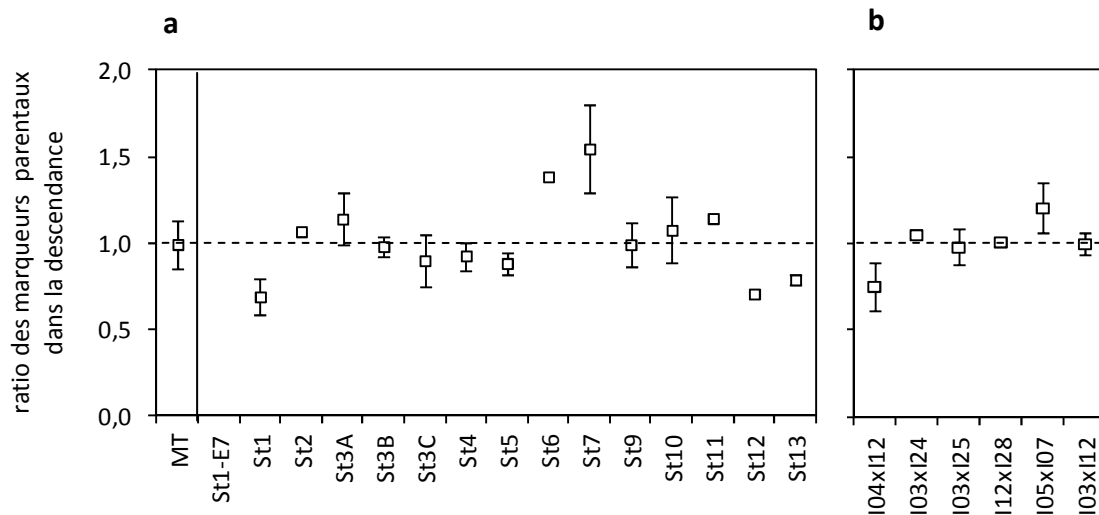
Après avoir cherché à identifier les processus épidémiques impliqués dans les dynamiques adaptatives de populations locales de *Z. tritici* à l'échelle annuelle, je me suis intéressé aux effets de l'alternance des modes de reproduction et déterminisme de la phase sexuée. Je me suis notamment interrogé sur l'existence de compromis adaptatifs (trade-offs). Il est possible qu'après la phase de sélection saisonnière, d'autres processus soient impliqués dans une "contre-sélection" pendant la période inter-épidémique (e.g., Montarry et al., 2007). J'ai cherché à mettre en évidence expérimentalement de tels compromis adaptatifs et, le cas échéant, à savoir quels processus pouvaient être impliqués.

Je n'ai pas identifié de compromis adaptatif (Suffert et al., soumis) au cours de la phase asexuée de *Z. tritici* (absence de trade-off entre la fitness du champignon sur tissus foliaires vivants et sa capacité à continuer à sporuler sur des résidus de feuille) ; la décroissance de la sporulation résiduelle sur résidus de blé a été similaire pour les isolats appartenant à la population initiale (Pi) et la population finale (Pf). J'ai alors fait l'hypothèse qu'un compromis adaptatif pouvait exister entre les phases asexuée et sexuée. Deux mécanismes pourraient être impliqués dans un tel trade-off :

Le premier mécanisme, "physique", n'est étayé par aucun résultat expérimental. Il correspond à l'expression d'un effet Allee (baisse significative du succès reproductif d'un organisme dont la densité de population est faible), qui se traduit dans le cas de *Z. tritici* par la difficulté qu'a un individu à se croiser avec un partenaire de type sexuel opposé au fur et à mesure que l'on s'élève dans le couvert et que la densité de lésions diminue. Plus la fitness d'un individu est élevée, plus celui-ci sera "monté" rapidement dans le couvert (Suffert et al., soumis), et plus la probabilité de se trouver à proximité d'un individu sexuellement compatible sera faible. Cet isolement physique est par ailleurs accentué par le fait que les étages foliaires supérieurs du couvert, susceptible d'abriter les individus ayant une fitness plus élevée que la moyenne, sont exportés en même temps que le grain lors de la moisson. Ce mécanisme aurait pour conséquence le retrait de la plupart des individus ayant été sélectionnés pendant la phase épidémique (composante d'agressivité supérieure, résistance à un fongicide, etc.).

Un second mécanisme, ayant plutôt un déterminisme "génétique", pourrait être impliqué dans un compromis adaptatif. J'ai commencé à tester cette hypothèse en comparant la capacité de 10 isolats de *Z. tritici* à faire de la reproduction asexuée (estimée sur la base de leurs composantes d'agressivité pendant un monocycle) et leur capacité à faire de la reproduction sexuée (estimée par le nombre de descendants, c'est-à-dire la quantité d'ascospores produites). Aucun trade-off n'a été mis en évidence. Si *Z. tritici* peut se multiplier de façon asexuée très facilement sur milieu de culture où il revêt une forme levure (bourgeonnement végétatif conidien), le croisement de deux isolats reste difficile (Kema et al., 1996). L'expérimentation a été possible grâce à la réussite de croisements en conditions semi-contrôlées (co-inoculation en serre puis dépôt à l'extérieur). La méthode que j'ai mise au point permet de croiser en routine des parents d'intérêt, par exemple pour combiner deux

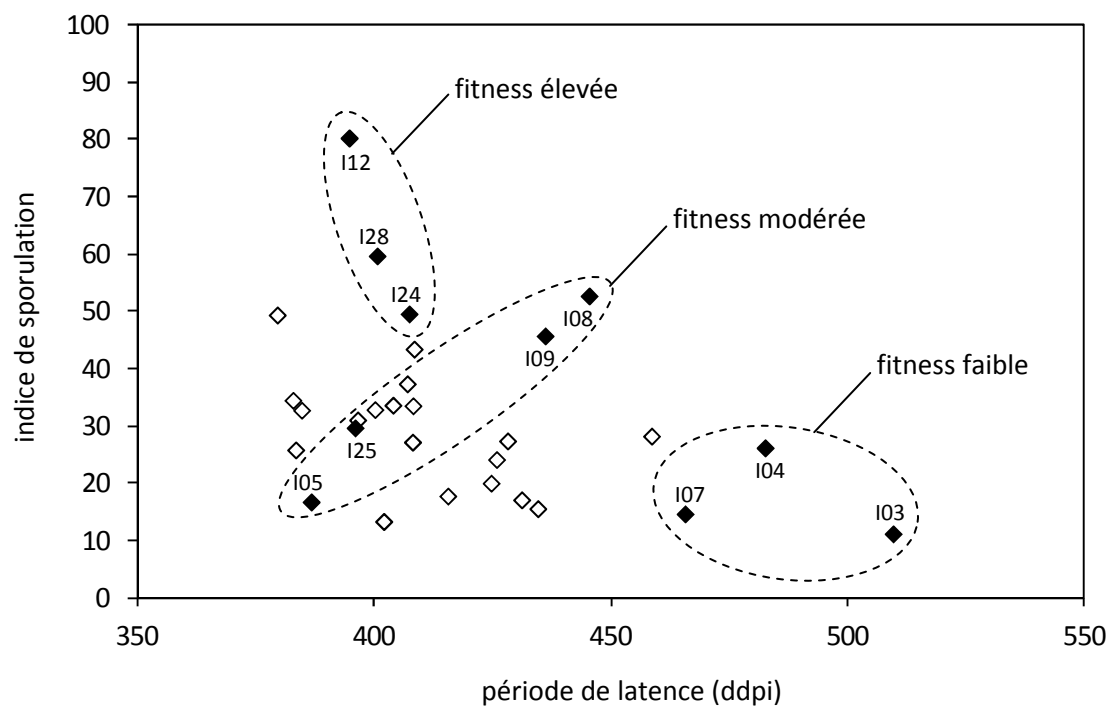
résistances à deux fongicides (collaboration avec Anne-Sophie Walker) ou pour mener des études sur le déterminisme de la résistance variétale par génétique d'association (collaboration avec Thierry Marcel). Le génotypage de  $6 \times 30$  descendants (6 croisements) en utilisant 15 marqueurs SSR (Gautier et al., 2014) a été réalisé par Gwilherm Gazeau en collaboration avec Anne-Sophie Walker. Il a permis de démontrer l'efficacité de la méthode et l'absence d'interactions avec les populations naturelles (ratio de ségrégation moyen = 1,01 ; taux de contaminations  $\leq 0.3\%$  ; Fig. 32).



**Figure 32** - Ratios moyens de ségrégation des marqueurs parentaux (SSR et type sexuel MT) pour six croisements de *Zymoseptoria tritici* (I04xI12, I03xI24, I03xI25, I12xI28, I05xI07, I03xI12) basés sur l'analyse de  $6 \times 30 \pm 1$  descendants. (a) Les ratios moyens ont été calculés pour chaque marqueur en combinant les ratios des six croisements ; (b) les ratios moyens ont été calculés pour chaque croisement en combinant les ratios de tous les marqueurs (Suffert et al., en prép.).

Cette méthode rend désormais possible l'étude des processus et mécanismes épidémiques qui conditionnent la production d'inoculum primaire. L'étude des déterminants de la reproduction sexuée et des effets de l'alternance des régimes de reproduction (sexué et asexué), est une perspective que j'aborderai dans la dernière partie de ce mémoire.

J'ai montré qu'un léger décalage dans les cinétiques d'infection des isolats parentaux (différences de période de latence de quelques jours) est plutôt bénéfique à la reproduction sexuée (analyse statistique en cours ; collaboration avec Florence Carpentier). Ce résultat a été obtenu en croisant 10 isolats parentaux (28 croisements) dont les composantes d'agressivité (capacité de sporulation et période de latence) étaient contrastées (Fig. 33). Une expérimentation complémentaire suivie par Ghislain Delestre a suggéré qu'un décalage temporel de 2 ou 3 semaines entre l'inoculation des deux parents diminue l'efficacité de la reproduction sexuée (quantité d'ascospores produites) par rapport à une inoculation concomitante.



**Figure 33** - Composantes d'agressivité de 10 isolats parentaux de *Z. tritici* (◆) impliqués dans les 28 croisements.



## 3. Projet de recherche et d'animation scientifique

J'ai choisi de distinguer mon projet de recherche propre (qui inclue l'encadrement doctoral et les collaborations scientifiques) de celui de l'équipe épidémiologie. Mes perspectives de recherche sont abordées dans la continuité directe de mon bilan scientifique.

Mon projet d'animation d'équipe intègre des aspects scientifiques, stratégiques et opérationnels, pour lesquels j'ai pris en compte à la fois le contexte de l'unité BIOGER, son écosystème proche (unités ECOSYS et EGER), et plus globalement la "culture" et le fonctionnement de l'INRA. J'ai sciemment éludé la perspective du déménagement de l'unité sur le plateau de Saclay à l'échéance de 2020.

### 3.1. Projet de recherche individuel

#### 3.1.1. *Enjeux et contexte*

Les stratégies actuelles de protection des cultures contre les agents pathogènes - déploiement de variétés résistantes et utilisation de fongicides - ont atteint leurs limites (problème de durabilité) sans toutefois être vouées à disparaître à court terme faute d'alternatives opérationnelles. Ces limites s'expliquent en partie par la réponse des populations pathogènes aux pressions de sélection auxquelles elles sont exposées. Par exemple, le pyramidage de gènes de résistance limite la durabilité de leur efficacité en favorisant l'adaptation rapide de populations pathogènes (indivus virulents et plus agressifs). De manière similaire l'utilisation de fongicides favorise l'apparition de populations résistantes. La dynamique adaptative des populations en réponse à ces pressions de sélection à l'échelle d'un cycle de culture peut être contrecarrée par des processus de contre-sélection se manifestant sur la base de compromis adaptatifs, généralement à l'intersaison (jonction entre deux épidémies). La modélisation de ces processus à des échelles spatio-temporelles larges est utilisée depuis quelques années pour évaluer la durabilité théorique de stratégies de protection. Ces compromis adaptatifs ont pourtant été rarement caractérisés expérimentalement, vraisemblablement à cause de la difficulté i) à estimer finement les lois de réponse de traits de fitness à différents facteurs, et ii) à analyser les interactions entre ces facteurs à différentes échelles d'espace (plante, peuplement, parcelle) et de temps (annuel vs. interannuel). Le développement d'une démarche d'épidémiologie fonctionnelle et expérimentale, intégrant des concepts d'écologie, peut selon moi permettre de résoudre ces difficultés.

#### 3.1.2. *Orientation générale*

Mes travaux de recherche visent à comprendre la dynamique des populations de *Z. tritici* et d'acquérir des connaissances mobilisables dans des stratégies innovantes de protection vis-à-vis de la septoriose du blé. L'objectif est de caractériser les processus et les mécanismes centrés sur l'inoculum impliqués dans la dynamique annuelle et pluriannuelle des épidémies.

Je souhaite aborder cette thématique de recherche de façon aussi générique que possible afin que les connaissances acquises puissent être transférées à d'autres pathosystèmes étudiés à l'INRA.

**D'**un point de vue disciplinaire, mon projet s'inscrit dans une approche fonctionnelle, expérimentale et quantitative de l'épidémiologie végétale.

Concrètement, il s'agit d'identifier, de conceptualiser et de caractériser les processus biologiques ou biophysiques qui sont responsables du développement d'une épidémie. La finalité n'est pas de "prédire" l'état du système hôte-pathogène ou la dynamique de maladie qui en résulte, mais de "représenter" l'épidémie de façon fonctionnelle. Il s'agit par exemple de décrire la façon dont les processus interagissent entre eux à différentes échelles spatio-temporelles (Fig. 2).

Je développerais différentes stratégies expérimentales, aux échelles adéquates, pour démontrer (preuves directes ou indirectes) l'occurrence de différents processus et mécanismes épidémiques.

Les méthodes expérimentales développées se concentreront sur les processus faisant intervenir des flux d'inoculum. Elles devront permettre de répondre à la question "Comment mesure-t-on une maladie ?" puis d'estimer les effets de différents facteurs sur les processus et mécanismes précédemment identifiés.

### ***3.1.3. Problématiques de recherche***

**L**es questions que je souhaite traiter concernent trois thématiques :

- ▶ inoculum primaire, initiation, saisonnalité et récurrence des épidémies de septoriose du blé ;
- ▶ hétérogénéité des réponses de population de *Z. tritici* à la température, conséquences sur les dynamiques épidémiques (actuelles) et potentiel d'adaptation aux fluctuations climatiques (incluant le réchauffement global) ;
- ▶ épidémiologie fonctionnelle appliquée à la biosécurité, à l'analyse de risques et à la gestion des crises en santé végétale.

#### **3.1.3.1. Inoculum primaire, initiation, saisonnalité et récurrence des épidémies de septoriose**

**J'**ai étudié à travers la thèse de David Morais la nature, la quantité, l'efficacité et l'origine de l'inoculum primaire afin de comprendre la façon dont elles influençaient les phases précoces d'une épidémie. Nous sommes arrivés à la conclusion que gérer la quantité d'inoculum, si elle devait passer par une gestion mécanique des résidus, était illusoire. Alors que les pratiques culturales simplifiées se développent, il semble impossible de généraliser l'enfouissement de la totalité des résidus à l'échelle d'un territoire. Il serait en revanche pertinent d'identifier des pratiques réduisant la survie de l'inoculum sur des résidus partiellement enfouis. Une tâche du

projet européen H2020 Emphasis (2015-2018) prévoit d'explorer les possibilités de réduction de la survie de l'inoculum par l'action de microorganismes antagonistes présent sur les résidus. La problématique sera traitée à l'échelle d'une rotation culturale classique blé-colza sur les pathosystèmes blé-septoriose et colza-phoma. La finalité est de caractériser les communautés de micro-organismes associés aux résidus de blé et colza, contaminés respectivement par *Z. tritici* et *Leptosphaeria maculans*, et d'identifier des agents de biocontrôle potentiels ayant une action pendant la phase inter-épidémique. La première partie de ce travail fera l'objet d'une thèse (que j'ai prévu de diriger et qui sera co-encadrée par Valérie Laval et Matthieu Barret, en collaboration avec Marie-Hélène Balesdent ; début en septembre 2015). L'analyse de la diversité microbienne associée aux résidus se fera par metabarcoding/métagénomique et par des isollements microbiologiques classiques. La seconde partie de ce travail consistera à choisir différentes espèces de champignons et de bactéries et à tester leur action sur la reproduction sexuée et la survie de *Z. tritici* et *L. maculans*.

Peu d'information sont disponibles sur les microorganismes qui colonisent les résidus de blé et de colza, cohabitent avec *L. maculans* et *Z. tritici*, et les relations trophiques qui existent entre eux (Pascault et al., 2010). A ma connaissance, et à de rares exceptions près (Ramarathnam & Fernando, 2006), aucun agent de biocontrôle (BCA) n'a encore été isolé des résidus de ces deux espèces végétales. L'activité antagoniste de quelques microorganismes vis-à-vis de *Z. tritici* ou *L. maculans* (Chakraborty et al., 1994 ; Ramarathnam & Fernando, 2006 ; Hammoudi et al., 2012) a été testée *in planta* pendant la phase parasitaire biotrophe (sur l'agent pathogène lorsqu'il infecte la plante), mais pas pendant la phase saprophyte (sur l'agent pathogène lorsqu'il croît, fait sa reproduction sexuée ou survit sur résidus de culture).

Trois types d'effets des BCA sur l'inoculum et les infections primaires devront être considérés :

- ▶ effets directs sur la production d'inoculum primaire : effet antagoniste ou fongistatique de BCAs sur les structures fongiques libérant des spores (sexuées ou asexuées) à partir des résidus, se traduisant par une réduction de la quantité ou de la disponibilité de l'inoculum ;
- ▶ effets indirects sur la production d'inoculum primaire : décomposition par des BCAs des résidus supportant les structures fongiques parasitaires ;
- ▶ effets directs sur les infections primaires : effet antagoniste ou fongistatique des BCAs sur l'infection des tissus hôtes (culture de l'année) par des spores pendant les phases épidémiques précoces.

Les différentes étapes, impliquant des scientifiques des unités BIOGER et IRHS, seront les suivantes :

1) Comparaison de la diversité microbiologique des résidus de blé et de colza par des approches de métagénomique (séquençage) et métatranscriptomique (RNAseq) ; analyses (barcoding des gènes ITS et 16S) réalisées en utilisant des résidus collectés pendant trois années, à trois périodes de l'année (de la fin de l'été à la fin de l'hiver), dans trois rotations parcellaires (blé-blé, blé-colza, colza-blé) à Grignon.

- 2) Isolements microbiologiques et création d'une collection de référence, constituée d'une centaine d'espèces (bactéries et champignons) dont certaines auront été pré-identifiées lors de tests de confrontation avec *Z. tritici* et *L. maculans*.
- 3) Analyse des interactions (antagonisme, hyperparasitisme, etc.) entre une dizaine d'espèces cultivables et *Z. tritici* et *L. maculans*, *in vitro* puis sur résidus contaminés artificiellement ; identification et caractérisation d'espèces d'intérêt, à tester en tant que BCAs potentiels.
- 4) Analyse des effets de traitements fongicides sur la capacité de reproduction sexuée et sur la survie de *Z. Tritici* et *L. maculans* sur les résidus de culture et sur la microflore associée.

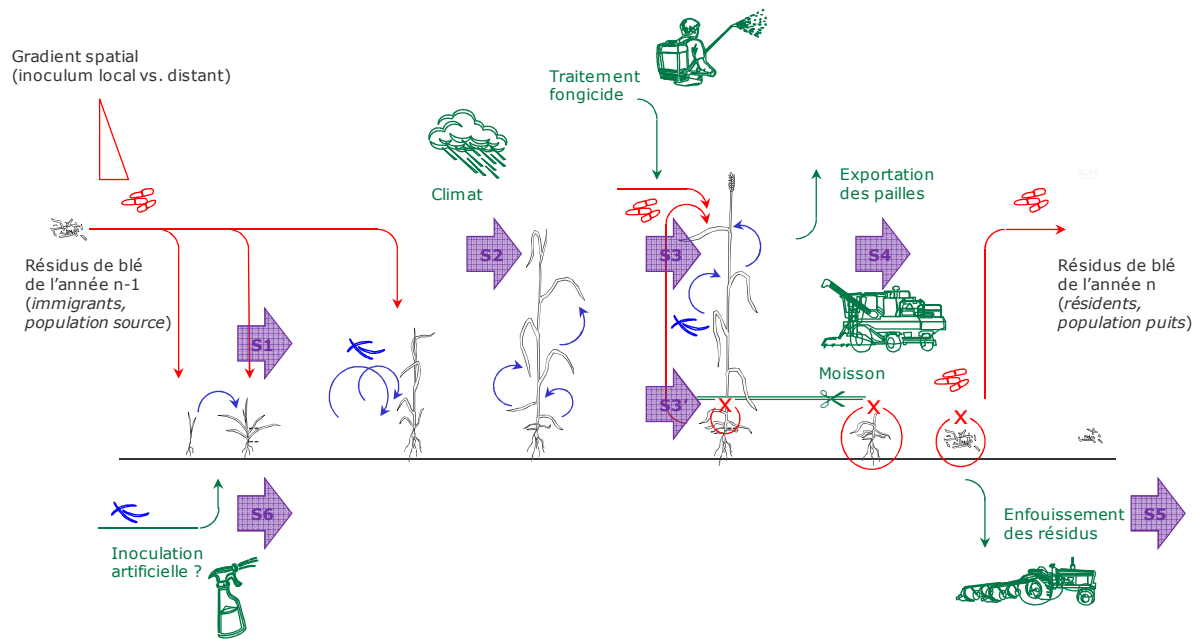
**L**e niveau de résistance de l'hôte et sa nature (résistance qualitative et résistance quantitative) ont surtout été étudiés pendant la phase asexuée (biotrophe) de *Z. tritici*. Il est probable que la résistance variétale ait un effet spécifique sur la reproduction sexuée, c'est-à-dire sur la production de périthèces et d'ascospores. Je souhaite tester l'hypothèse selon laquelle, à sévérité d'attaque équivalente sur feuille ou sur tige, la nature d'une résistance peut influencer la capacité qu'ont deux isolats compatibles à se croiser. Un tel effet, s'il était avéré, confirmerait d'une part que l'utilisation des résistances mérite d'être raisonnée en prenant en compte l'ensemble du cycle de vie de *Z. tritici* et, d'autre part, que la phase sexuée peut jouer un rôle dans l'adaptation locale à un cultivar, comme l'ont suggéré les résultats obtenus par David Morais dans sa thèse. Thierry Marcel a prévu d'engager des travaux sur ce sujet, auquel je m'associerai. Ces travaux pourraient être réalisés dans le cadre d'un appel d'offre national (CTPS ou FSOV, impliquant des sélectionneurs et des scientifiques de l'UMR Génétique Quantitative et Évolution du Moulon) ou international (projet H2020, partenariat France-Tunisie ou France-Mexique impliquant le CIMMYT), éventuellement via une thèse CIFRE. Nous souhaiterions comparer l'effet de peuplements hôtes génétiquement hétérogènes constitués de variétés-populations (variétés de pays et variétés rustiques en mélange) et de peuplements hôtes génétiquement homogènes (variétés commerciales) sur la réponse adaptative de *Z. tritici*.

**M**es autres perspectives de recherche, sur la thématique "saisonnalité et récurrence des épidémies", s'articulent autour de deux questions :

- ▶ Quelle est l'influence quantitative et qualitative de l'alternance des phases de reproduction asexuée et sexuée sur la récurrence pluriannuelle des épidémies de septoriose ?
- ▶ Comment prendre en compte/exploiter les processus de sélection et contre-sélection qui interviennent à l'échelle d'une année dans des stratégies de protection ?

Comprendre comment les populations fongiques se développent (i.e., quels individus sont sélectionnés et contre-sélectionnés) dans des conditions environnementales changeantes est essentiel. Je pense qu'il est possible d'exploiter cette connaissance pour réduire l'impact des maladies sur les agrosystèmes (Fig. 34). Pour cela, il est nécessaire d'étudier les conséquences des effets des fluctuations saisonnières et de l'alternance des régimes de reproduction. Je souhaite m'appuyer sur des approches expérimentales déjà mises en œuvre

dans l'équipe (compétition/sélection en conditions naturelles) ou plus innovantes (par exemple, réplique de dynamiques épidémiques en conditions semi-controlées).



**Figure 34** - Processus épidémiques et pratiques agricoles à l'origine de dynamiques de sélection et contre-sélection dans une épidémie annuelle de septoriose.

S1 = pression de sélection pluriannuelle par la variété hôte (effet "filtre variétal" ; adaptation des populations aux variétés locales) ; S2 = pression de sélection intra-annuelle sur des traits de fitness en réponse aux fluctuations de l'environnement (stade phénologique de l'hôte, température, conditions d'humidité et pluviométrie) ; S3 = pression de sélection par les traitements fongicides dans la partie supérieure du couvert (effet pendant la phase biotrophe sur la proportion d'individus résistants) ; S4 = pression de contre-sélection par l'exportation du compartiment supérieur (suppression des individus ayant fait l'objet des pressions de sélection S2 et S3) ; S5 = pression de contre-sélection par la survie sur les résidus contaminés (trade-offs entre reproduction clonale et reproduction sexuée) ; S6 = pression de contre-sélection via l'introduction artificielle d'isolats sensibles au fongicide utilisé ou peu virulents sur le cultivar utilisé l'année n+1.

### 3.1.3.2. Hétérogénéité des réponses de population de *Z. tritici* à la température et conséquences épidémiques

**J**e poursuivrai mes travaux sur la réponse de *Z. tritici* à la température, et de façon plus générale sur le pilotage de processus épidémiques par la température. Je mènerai ces recherches en collaboration avec Michaël Chelle (ECOSYS). J'ai choisi les orientations suivantes : i) passer de l'échelle de l'individu à celui de la population ; ii) m'intéresser aux conséquences épidémiques l'hétérogénéité de réponse à la température de populations plutôt qu'à leurs causes (déterminisme génétique/génique), étudiées par ailleurs dans l'équipe EGIP (Anne Génissel) et à l'ETH Zürich (Daniel Croll et Bruce McDonald) ; iii) m'intéresser au

potentiel d'adaptation au changement climatique, en intégrant des concepts d'écologie et de biologie thermique.

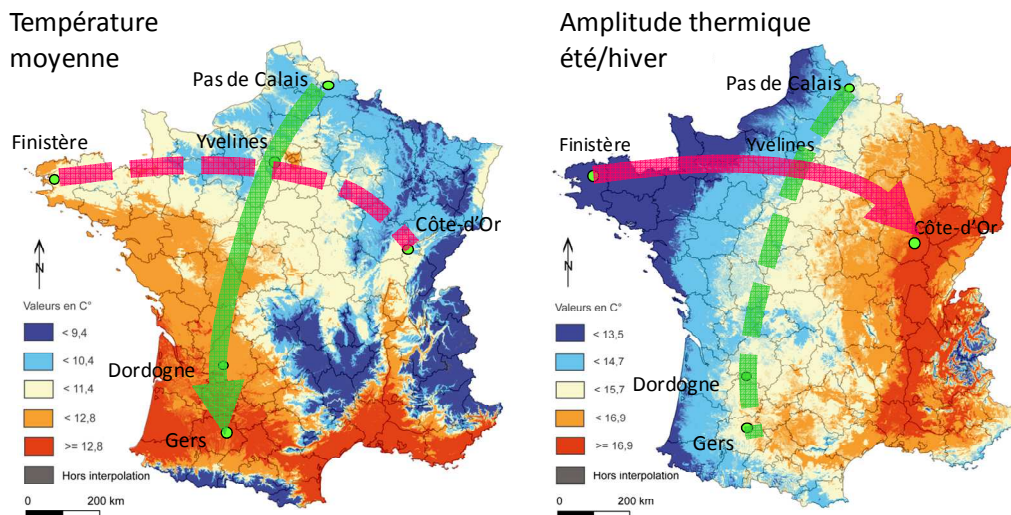
Mon objectif est d'estimer le potentiel adaptatif de populations de *Z. tritici* à des fluctuations climatiques se manifestant à différentes échelles spatio-temporelles, globales (réchauffement) mais aussi locales (variations saisonnières). Contrairement au nombre de revues bibliographiques sur l'impact du changement climatique sur les maladies des plantes, le nombre d'études expérimentales est assez limité (Chakraborty, 2013). Je pense que cette situation est la conséquence de difficultés à concevoir des expérimentations novatrices, à l'interface entre épidémiologie, écologie et micrométéorologie. Trois défis génériques sont à relever (Rohr et al., 2010): i) concevoir de meilleurs modèles pour relier les données de terrain aux expérimentations ; ii) prendre en compte les effets de la variabilité climatique, en s'intéressant à la variance (en plus de la moyenne), aux effets des fluctuations (Scherm *et al.*, 1994) et à la saisonnalité (Koelle *et al.*, 2005; Altizer *et al.*, 2006; Pascual & Dobson, 2005; Hamelin *et al.*, 2011; Donnelly *et al.*, 2013) ; iii) identifier les tendances générales et les principes de la physiologie thermique des champignons parasites foliaires.

Pour prédire la réponse d'une population pathogène au réchauffement climatique, des données biologiques sur son adaptation à la température, son potentiel évolutif, et les liens entre les deux sont nécessaires (Zhan & McDonald, 2013a, 2013b; Stefansson *et al.*, 2013). Le système blé-*Z. tritici* est particulièrement adapté à cette démarche : la septoriose est une maladie agronomiquement importante, largement répandue et nuisible sous des climats variés ; les populations pathogènes ont une diversité génétique et phénotypique importante, à toutes les échelles, leur conférant un potentiel adaptatif élevé. L'adaptation peut être définie comme une optimisation phénotypique en réponse à la sélection, qui augmente la fitness de ces phénotypes dans certaines conditions environnementales par rapport à d'autres phénotypes. Elle est donc à la fois une situation que l'on peut observer et décrire et un processus que l'on peut suivre. J'ai choisi de caractériser la "situation" d'adaptation et de m'intéresser aux conséquences des réponses (actuelles ou futures), en termes de processus (moteurs de la sélection).

La première étape (descriptive) de ma démarche consiste à caractériser l'hétérogénéité des réponses des populations pathogènes aux variations spatio-temporelles de la température. Des travaux préalables conduits *in vitro* ont mis en évidence des sensibilités à la température différentes chez des populations de *Z. tritici* collectées à l'échelle mondiale (Zhan & McDonald, 2011). J'ai montré que les variations saisonnières de température peuvent sélectionner les individus ayant de meilleurs traits de fitness à l'échelle d'une année (Suffert et al., soumis), que *Z. tritici* est plastique vis-à-vis de la température (Bernard et al., 2013) dont les fluctuations journalières doivent être prises en compte (Bernard et al., en prép.). L'étude expérimentale qu'ont menée récemment Ghislain Delestre et Jean Legeay (stagiaire Master2, 2015) a consisté à établir *in vitro* les TPC d'une soixantaine d'isolats (taux de multiplication en milieu liquide YPD sur microplaques). Aucun patron d'adaptation n'a été mis en évidence entre le Nord et le Sud de la France (gradient croissant de températures moyennes annuelles; Fig. 35) ni entre l'Est et l'Ouest (gradient croissant d'amplitudes thermiques annuelles). Il est

vraisemblable que l'hétérogénéité de réponse à l'échelle populationnelle se manifeste plutôt à deux échelles spatio-temporelles "extrêmes" :

- ▶ à une échelle mondiale, s'expliquant par des flux de gène finalement limités entre continents (ne semble pas être le cas à l'échelle de la France) ;
- ▶ à une échelle locale à court terme, dès lors que la dynamique temporelle est prise en compte, s'expliquant par la sélection des isolats les plus adaptés aux conditions climatiques successives.



**Figure 35** - Gradient de température annuelles moyennes structurant l'échantillonnage de populations françaises de *Z. tritici*.

La seconde étape (fonctionnelle) de la démarche consiste à évaluer les conséquences de l'hétérogénéité de réponse à la température des populations pathogènes sur le développement d'une épidémie. L'objectif est d'arriver à passer de l'échelle du monocycle à celui d'une épidémie polycyclique. Les difficultés que j'ai identifiées concernent :

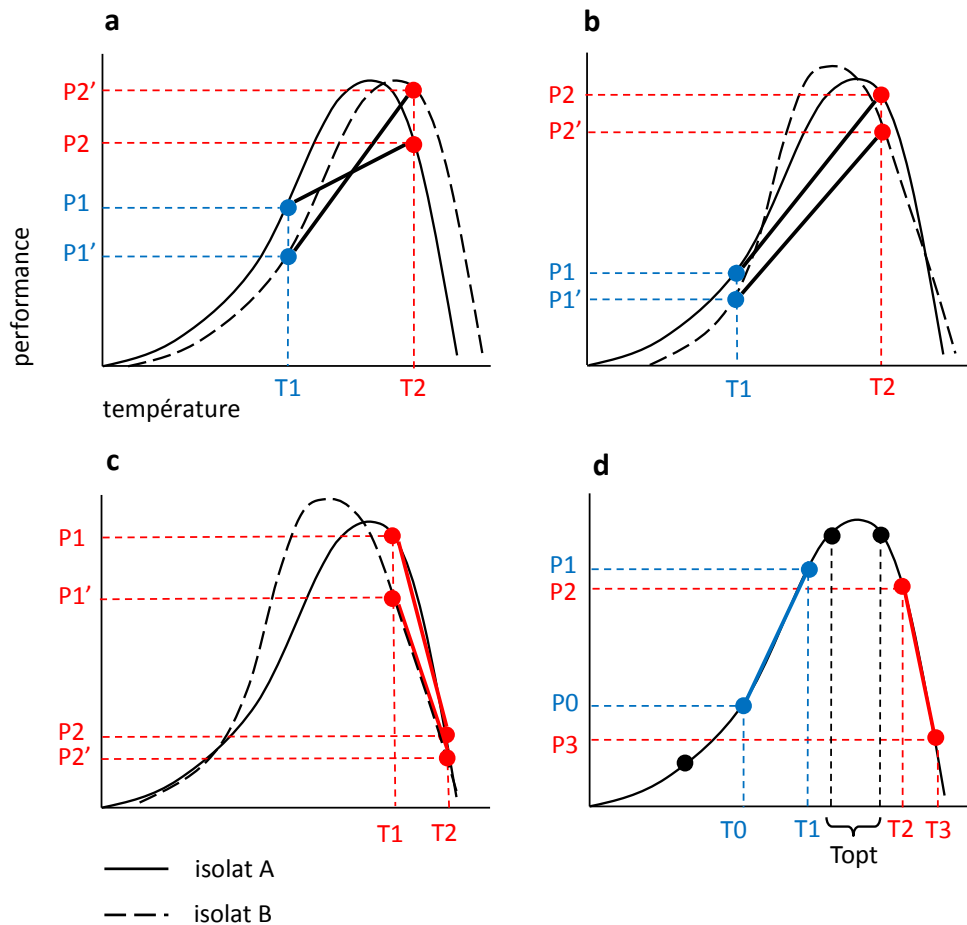
- ▶ le choix de critères permettant de comparer des TPC et la sensibilité à la température de différents individus ;
- ▶ la stratégie d'échantillonnage permettant de travailler avec des populations (réelles ou recrées) fortement hétérogènes dans leur réponse à la température ;
- ▶ la mise au point d'une méthode expérimentale (*in planta* en serre vs. *in planta* au champ ; processus monocyclique vs. processus polycyclique).

Il sera en outre nécessaire de tenir compte du fait que l'adaptation à la température peut être caractérisée de plusieurs manières :

- ▶ en comparant des "performances thermiques" *in planta* (en se basant sur différentes composantes d'agressivité) ou *in vitro* (en se basant sur un taux de multiplication cellulaire).

Par exemple, en comparant P1 à P1' puis P2 à P2' (Fig. 36a) on constate que la performance au froid de l'isolat A est plus élevée que celle de l'isolat B, alors que sa performance au chaud est plus faible ; l'isolat A est donc plus adapté au froid que l'isolat B.

► en comparant des "sensibilités à la température", estimée par le ratio entre des performances estimées à différentes températures *in vitro* ou *in planta*. Par exemple, en comparant les pentes  $(P2-P1)/(T2-T1)$  et  $(P2'-P1')/(T2-T1)$  (Fig. 36b), quasiment identiques, on conclue que la sensibilité à la température de l'isolat A est similaire à celle de l'isolat B.



**Figure 36** - Exemples de courbes de réponse à la température théoriques de *Zymoseptoria tritici*.

En pratique la sensibilité à la température peut être estimée en utilisant seulement deux températures (e.g., Zhan & McDonald, 2011) ; compte tenu de la non-linéarité des TPC, leur position par rapport à l'optimum thermique doit toutefois être connue. Le fait que les deux températures choisies se trouvent de part et d'autre de l'optimum peut poser problème dans l'interprétation des résultats. Par exemple, la comparaison des pentes  $(P2-P1)/(T2-T1)$  et  $(P2'-P1')/(T2-T1)$  (Fig. 36a) pourraient conduire à conclure de manière erronée que l'isolat A a une sensibilité à la température plus faible que l'isolat B, alors que seul leur optimum thermique diffère légèrement. Pour cette raison il semble pertinent de dissocier l'estimation de

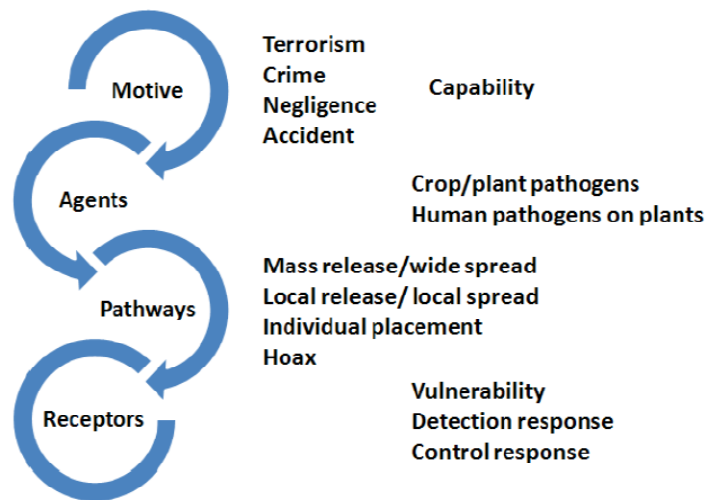


la sensibilité aux températures basses de celle de la sensibilité aux températures hautes, dont on peut imaginer qu'elle diffèrent d'un isolat à l'autre ou d'une population à l'autre. Par exemple, la comparaison des pentes  $(P2-P1)/(T2-T1)$  et  $(P2'-P1')/(T2-T1)$  (Fig. 36c) permet de conclure que la sensibilité au chaud de l'isolat A est plus élevée que celle de l'isolat B. Cette façon de procéder nécessite d'avoir une bonne estimation de l'optimum thermique et donc d'avoir mesuré expérimentalement la performance à plusieurs températures (entre 5 et 7 ; Fig. 36d), ce qui permet/nécessite *de facto* d'établir une TPC complète en utilisant d'un modèle adapté (Angilletta, 2006).

**J'**ai déposé avec Michaël Chelle (ECOSYS) un sujet de thèse à l'appel 2015 de l'école doctorale ABIES ("Hétérogénéité des réponses à la température de populations françaises de *Z. tritici* et inférence de leur capacité à s'adapter à des environnements fluctuants"). Les questions auxquelles la thèse devra répondre sont les suivantes : Quelle est la variabilité des lois de réponse à la température de populations de *Z. tritici* collectées à différentes échelles spatio-temporelles (sensibilité individuelle vs. polymorphisme intra-population) ? Quelles sont les conséquences épidémiologiques de cette variabilité sur les dynamiques actuelles de maladie à différentes échelles spatio-temporelles (différences entre bassins de production et effet des fluctuations saisonnières) ? Dans un premier temps il s'agira d'établir *in vitro* la variabilité des lois de réponses à la température de populations pathogènes, tant à l'échelle de l'individu (différences d'optima thermiques et de sensibilité) que de la population (variabilité entre individus). Dans un second temps il s'agira d'estimer les conséquences épidémiologiques (sur les dynamiques de maladie) de cette variabilité et la façon dont une population locale s'adapte à court terme à différentes variations de température. Il est prévu d'étudier expérimentalement l'influence des conditions de températures (moyennes et amplitudes) sur le développement de lésions en conditions contrôlées à l'échelle monocyclique, puis en conditions naturelles à l'échelle polycyclique (compétition au champ entre isolats).

### 3.1.3.3. Epidémiologie appliquée à l'analyse de risques et à la gestion des crises en santé végétale

**Je** poursuivrai mes activités de recherche sur le thème de la biosécurité, que j'ai jusqu'à présent pu valoriser correctement (Latxague et al., 2006 ; Desprez-Loustau et al., 2007 ; Suffert et al., 2008 ; 2009 , Stack et al., 2010 ; Suffert, 2010 ; Sache et al., 2011). Il me semble utile de rappeler que la connaissance des processus épidémiques est utile à l'évaluation des risques phytosanitaires. La manière dont cette connaissance alimente les outils d'évaluation est en soi une activité de recherche cindynique (discipline qui étudie les risques, dangers et situations de crise, en prenant en compte les aspects à la fois techniques, humains et organisationnels). La conception de méthodes d'évaluation des risques en santé végétale, mêlant expertises biologiques et travail de modélisation, est un positionnement de niche (exemple d'interaction avec l'Imperial College et le Laboratoire de la Santé des Végétaux de l'ANSES ; Fig. 37).



**Figure 37** - Cadre général de l'analyse des risques pour la biosécurité *Motive-Agent-Pathway-Receptor* ; extrait du rapport d'étape PlantFoodSec "Report covering the representation of environmental, biological and social impacts of agroterrorism").

J'ai récemment participé avec Samuel Soubeyrand et Astrid Cruaud à une réflexion sur la gestion des crises sanitaires en santé végétale. Le rapport que nous avons remis au département SPE propose un aperçu de la gestion des crises sanitaires en santé végétale telle qu'elle est menée aujourd'hui par les pouvoirs publics et expose comment l'INRA pourrait contribuer à cette gestion en structurant et exploitant mieux son potentiel. Cette réflexion nous a conduit à proposer des actions à conduire pour que l'institut soit plus réactifs face à ces crises et plus visibles dans ses contributions :

- ▶ sollicitation de personnes ressources pour développer une vision amont de l'action du département SPE dans le cadre des crises sanitaires, en interaction avec les acteurs officiellement en charge de la gestion des crises sanitaires ;
- ▶ mise en place d'équipes de réaction (*response teams*) ;
- ▶ encouragement à développer des projets de recherche sur la prédiction des crises et leur impact ;
- ▶ construction de "boîte à outils" constituée de modèles et d'outils statistiques associés.

La première action qui a été retenue est la constitution d'une cellule permanente de gestion des crises sanitaires, à laquelle j'ai accepté de participer. L'objectif de cette cellule est d'agrèger les compétences nécessaires (systématique, modélisation, épidémiologie, etc.), avec deux objectifs à court terme : i) faire un audit de crises passées et ii) constituer une preuve de concept de notre capacité de réponse (*Xylella fastidiosa*).

## 3.2. Projet d'équipe

### 3.2.1. Etat des lieux et évolution récente des contours de l'équipe

L'équipe épidémiologie ("épidémiologie des maladies aériennes du blé") est constituée de 13 permanents. Elle réunit 6 scientifiques porteurs de projets (1 DR, 1 CR, 2 IR, 1 PR, 1 MC), 2 assistants ingénieurs et 5 techniciens. Elle bénéficie actuellement de l'appui d'un IE (Julie Berder) et d'un AI (Ghislain Delestre) sous contrat à durée déterminée (financement assuré pour 2 ans). L'équipe accueille généralement entre 1 et 3 doctorants et entre 2 et 3 stagiaires de Master2 chaque année. Ses contours ont fait l'objet d'importants changements au cours des trois dernières années. Florence Carpentier (MC AgroParisTech) et Thierry Marcel (CR INRA) ont rejoint l'équipe respectivement en 2011 et 2013. Christian Lannou (DR INRA), actuellement Chef du Département SPE, l'a quittée en 2013. Ivan Sache (ex-CR INRA) a changé d'employeur (PR AgroParisTech) tout en restant rattaché à l'équipe. Avec deux enseignants-chercheurs, le collectif est davantage tourné vers l'enseignement et cela a redynamisé les liens entre l'INRA et AgroParisTech, mais l'équipe souffre désormais d'un déficit de chercheurs. De prime abord elle semble bien pourvue en personnel technique qualifié (TR-AI). Des demandes de mobilité (en cours), en anticipation du déménagement de l'unité BIOGER sur le plateau de Saclay à l'échéance de 2020, laissent malheureusement présager un déficit de compétences techniques en épidémiologie expérimentale, notamment sur les rouilles du blé.

Au cours des dix dernières années l'équipe a investi dans la génétique des populations et la compréhension de leur adaptation à la plante hôte. Ces dernières années ont également été marquées par le développement d'une compétence théorique en modélisation, par l'aboutissement de projets sur la résistance quantitative et sa gestion durable à l'échelle du paysage, par la montée en puissance des travaux sur la septoriose, et un arrêt de ceux sur la fusariose. Cette évolution c'est accompagnée d'un développement de collaborations nationales avec MIA à Jouy (Hervé Monod,) et BioSP à Avignon (Samuel Soubeyrand) et internationales Rothamsted Research (Franck van den Bosch) en ce qui concerne l'épidémiologie théorique et la modélisation, avec l'Université d'Aarhus (M. Hovmøller) pour l'analyse des populations de rouille jaune, avec ECOSYS à Grignon (Michaël Chelle, Corinne Robert, Sébastien Saint-Jean, Laurent Huber) pour les effets des conditions climatiques sur les dynamiques épidémiques, et avec l'Université de Turin (Maria-Lodovica Gullino) et Imperial College (John Mumford) pour la biosécurité et l'analyse des risques phytosanitaires.

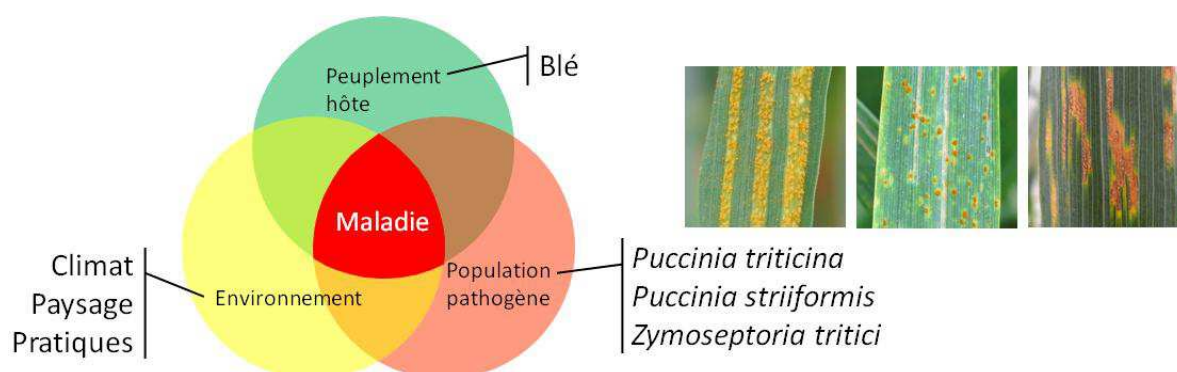
Le bilan scientifique de l'équipe a été évalué positivement lors la dernière évaluation AERES (2013). Son ancrage à des problématiques appliquées, avec la participation de plusieurs scientifiques à des activités d'expertise ou en tant que partie prenante dans des projets finalisés impliquant des partenaires professionnels, a été jugé très pertinent.

### 3.2.2. Stratégie scientifique

La compréhension du développement des épidémies en système de grandes cultures par une approche pluridisciplinaire (biologie, génétique, agronomie, écologie, modélisation) est le principal objectif de recherche de l'équipe et s'articule autour de trois questions :

- ▶ Quelles dynamiques spatio-temporelles ?
- ▶ Quels facteurs d'influence ?
- ▶ Quels principes et moyens de gestion ?

La finalité de nos travaux est réellement de répondre à ces questions, qui sont bien plus que de simples questionnements rhétoriques. La définition de questions de recherche précises fait partie intégrante de notre démarche scientifique. La tentation de se poser de "mauvaises" questions, au prétexte que les réponses seraient méthodologiquement "utiles", doit être minimisée. Cela passe par la réaffirmation l'épidémiologie végétale se nourrit de questions conceptuelles, de l'analyse critique de ses propres méthodes et du renouvellement de sa culture épistémologique.



**Figure 38** - Représentation schématique des supports de recherche de l'équipe épidémiologie.

Les thématiques scientifiques de l'équipe sont structurées selon trois axes :

- ▶ Axe 1 - "Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum" - Caractérisation des processus et mécanismes centrés sur l'inoculum conditionnant le développement et la récurrence des épidémies à différentes échelles spatio-temporelles.
- ▶ Axe 2 - "Réponse et adaptation des populations pathogènes à des facteurs biotiques et abiotiques structurants" - Conséquences épidémiologiques de l'adaptation des populations

pathogènes à des facteurs biotiques et abiotiques structurants (hôte/résistance variétale, température).

▶ Axe 3 - "Gestion durable des résistances variétales à différentes échelles spatio-temporelles" - Gestion durable des résistances variétales, de la caractérisation des mécanismes d'interactions plante-champignon (échelle du gène) à l'évaluation de stratégies de déploiement (mélanges variétaux à l'échelle d'une parcelle et alternance spatio-temporelle de variétés à l'échelle d'un territoire).

#### 3.2.2.1. Axe 1 - "Processus et mécanismes centrés sur l'inoculum"

Ce premier axe correspond en grande partie à mon projet de recherche individuel. L'objectif est de caractériser les processus et mécanismes centrés sur l'inoculum conditionnant le développement et la récurrence des épidémies à différentes échelles spatio-temporelles.

#### 3.2.2.2. Axe 2 - "Réponse et adaptation des populations pathogènes à des facteurs biotiques et abiotiques structurants"

Ce second axe de recherche s'intéresse aux facteurs biotiques et abiotiques qui structurent les populations pathogènes du blé, tels que la sélection par l'hôte, les facteurs climatiques (température), ou le régime de reproduction (asexué vs. sexué). Il concerne les rouilles et la septoriose. Les collaborations avec des biophysiciens (unité ECOSYS de Grignon, partenaire historique de l'équipe) et des généticiens des populations et évolutionnistes (unités INRA URGV du Moulon, CIRAD BGPI de Montpellier et INRA IAM de Nancy) devront être pérennisées.

Les populations clonales de *P. triticina* sont structurées par l'espèce hôte (blé dur / blé tendre) et par les variétés présentes dans le paysage cultivé. L'étude de cette structuration à l'échelle du territoire national se poursuivra. Par ailleurs le choix a été fait de tester l'hypothèse de l'émergence d'une sous-population inféodée au blé dur par saut d'hôte depuis le blé tendre, en datant la divergence de ces deux sous-populations à l'aide de marqueurs SNPs (données en cours d'interprétation par Henriette Goyeau).

L'analyse de la structure de populations françaises de *Z. tritici* (initiée dans l'équipe par Thierry Marcel) sera complétée par l'étude de la répartition du pouvoir pathogène (virulence, agressivité) dans ces mêmes populations. Ces données devraient permettre de comprendre comment les populations de *Z. tritici* s'adaptent aux résistances quantitatives du blé, à déterminisme très fréquemment polygénique. Nous chercherons également à identifier les caractères phénotypiques (symptômes, transcripts, métabolites) liés à ces adaptations. Une collaboration a été engagée avec ECOSYS (implication de Thierry Marcel dans l'encadrement de la thèse de Thomas Simon dirigée par Corinne Robert). L'identification des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène par des approches à l'échelle du génome (étude GWAS, projet ANR Gandalf) se poursuivra par l'étude de leur rôle dans la capacité reproductive du champignon (fitness), leur spécificité dans les interactions avec le blé, et leur distribution dans les populations pathogènes.

Un des objectifs de l'équipe est d'identifier les échelles spatiales et temporelles auxquelles les populations pathogènes s'adaptent et de prendre en compte les processus adaptatifs pour estimer les effets des changements climatiques globaux. L'importance de la thématique "adaptation à la température" est donc amenée à croître, de par les questions génériques qu'elle implique et les outils méthodologiques déjà développés.

L'étude de la réponse de populations de *Z. tritici* à la température et des processus de sélection saisonniers qui lui sont associés sera menée en collaboration avec nos collègues de l'unité ECOSYS.

Les travaux menés depuis plusieurs années sur l'adaptation de la rouille jaune (*P. striiformis*) à la température par Claude Pope et Marc Leconte se poursuivront. L'objectif est de comprendre l'avantage sélectif de souches invasives d'origine exotique (l'une agressive et tolérante aux hautes températures, l'autre multivirulente) par rapport aux souches appartenant à deux groupes génétiques locaux, l'un spécifique de la région tempérée (Nord de la France) et l'autre spécifique de la région méditerranéenne (Tunisie). L'avantage sélectif d'isolats placés en compétition sous deux régimes climatiques différenciés sera évalué en même temps qu'une étude d'association à l'échelle du génome, entre les caractères épidémiques et les polymorphismes extraits de génomes (collaboration avec Jérôme Enjalbert de l'URGV, Bochra Bahri de l'Université de Tunis, et de Anne Génissel et Lilian Gout de l'équipe EGIP).

### 3.2.2.3. Axe 3 - "Gestion durable des résistances variétales à différentes échelles spatio-temporelles"

Les recherches développées dans ce troisième axe servent à concevoir des modes de gestion à la fois efficaces et durables des variétés résistantes. Le changement d'échelle est en soi une problématique de recherche récurrente au sein de l'équipe. Les approches vont du gène au paysage : de l'étude de mécanismes à l'échelle de la plante (comprendre pourquoi une résistance est structurellement plus durable qu'une autre) à l'analyse des impacts à l'échelle d'un peuplement ou d'un territoire (comprendre pourquoi la façon d'utiliser et de déployer une résistance la rend plus durable).

L'étude des interactions entre les populations hôtes et les populations pathogènes à des échelles variées et complémentaires est une des spécificités de l'équipe. Trois questions ont été identifiées comme prioritaires : Quel est l'impact des pressions de sélection exercées par les résistances quantitatives de la plante sur l'évolution des traits de vie des champignons phytopathogènes ? Quels mécanismes biologiques et moléculaires sont impliqués dans les résistances quantitatives des plantes à leurs champignons pathogènes ? Quel est l'impact du degré de spécificité d'une résistance aux individus d'une même espèce phytopathogène sur sa durabilité ? Des approches de génétique et de génomique sont par exemple menées par Thierry Marcel afin d'identifier, sur le modèle blé-*Z. tritici*, les gènes impliqués dans l'interaction, qu'il s'agisse de gènes de résistance/sensibilité de la plante hôte ou des gènes du pouvoir pathogène du champignon.

La gestion durable des résistances est un des principaux enjeux des travaux de l'équipe. Comment réintroduire un niveau efficace de diversité fonctionnelle dans les cultures, à l'échelle de la parcelle comme de la région ? Comment intégrer la résistance quantitative dans les stratégies de gestion ? Cette thématique est réellement transversale : elle est partagée par Henriette Goyeau (rouille brune), Claude Pope (rouille jaune), Thierry Marcel (septoriose), mais aussi Ivan Sache qui s'oriente vers la gestion des épidémies à l'échelle du paysage et l'analyse de la diversité fonctionnelle. Florence Carpentier développe des approches de modélisation et d'inférence statistique sur cette même thématique (projets Gester et Fondu ; collaboration avec les unités INRA MIA de Jouy et d'Avignon). Un projet de thèse co-encadré par Anne-Sophie Walker et Florence Carpentier permettra de faire le lien entre gestion durable des résistances variétales à l'échelle du territoire et gestion de l'apparition des résistances aux fongicides.

En complément de ces programmes traitant des aspects théoriques de la gestion des résistances, nous nous attacherons à caractériser l'efficacité et la durabilité de moyens de lutte génétique, afin de proposer des solutions concrètes et des données pour valider les stratégies de gestion identifiées. Ces travaux portent d'une part sur le rôle des peuplements hôtes diversifiés à l'échelle de la parcelle pour freiner le développement des épidémies, et d'autre part sur la caractérisation de sources de résistance quantitative. Les travaux menés sur l'efficacité des associations variétales vis-à-vis de la septoriose en collaboration avec ECOSYS (Sébastien Saint-Jean, Laurent Huber ; thèse de Christophe Gigot) se poursuivent en tenant compte de l'architecture du couvert (thèse de Tiphaine Vidal).

### **3.2.3. Stratégie opérationnelle**

#### 3.2.3.1. Positionnement vis-à-vis de l'extérieur

Le positionnement vis-à-vis de l'extérieur (hors équipe et hors unité) repose sur les quatre objectifs suivants :

- ▶ positionner l'équipe sur des thématiques où la concurrence nationale et internationale est modérée, où les possibilités de coopération existent, et où ses compétences sont clairement reconnues (analyse de dynamique épidémiques polycycliques ; expérimentations impliquant des compétitions entre isolats ; décorrélation et quantification de processus épidémiques ; suivi de populations de *P. triticina*, *P. striiformis*, *Z. tritici* ; caractérisation de virulences et analyse des interactions entre populations hôtes et pathogènes ; maîtrise de la reproduction sexuée ; évaluation des risques en santé végétale) ;
- ▶ être reconnu par l'INRA comme une équipe d'épidémiologie végétale de référence, capable de faire le lien entre des approches expérimentales (épidémiologie des maladies du blé, suivis de populations pathogène, stratégie de déploiement de résistances variétales) et de modélisation à différentes échelles spatio-temporelles ;
- ▶ collaborer à l'échelle de l'unité en priorité via des co-encadrement de thèses ;

▶ être scientifiquement moteur sur la thématique "agroécologie" en intensifiant les collaborations avec les unités ECOSYS et EGER de Grignon via des approches réellement pluridisciplinaires (épidémiologie, bioclimatologie, agronomie agroécologie).

### 3.2.3.2. Réaffirmation des fondements "expérimentaux" de l'épidémiologie végétale

L'intérêt de développer des approches expérimentales quantitatives en épidémiologie fonctionnelle doit être réaffirmé. Certaines activités stratégiques nécessitent un niveau de technicité élevé qui doit être entretenu. Les trois principales approches que j'ai choisi de mettre en avant et de défendre sont les suivantes :

1) Recentrer une partie des activités scientifiques de l'équipe autour d'un observatoire des populations pathogènes du blé

Le suivi et la caractérisation de la structure des populations de champignons pathogènes du blé (rouille jaune, rouille brune, et plus récemment septoriose) à différentes échelles constitue la base des recherches de l'équipe sur la durabilité des résistances variétales du blé, l'analyse de la résistance quantitative et l'évolution des populations d'agents pathogènes. Les suivis populationnels sont une activité de référence de l'équipe depuis plus de 15 ans, qui remplit un double objectif : i) alimenter des programmes de recherche nationaux et internationaux, grâce à la production d'un corpus de données et d'une collection de matériel biologique extrêmement riche de par leur continuité temporelle; ii) répondre à la demande de connaissances actualisées sur les populations hôte et pathogène (Arvalis, GEVES, CTPS, sélectionneurs, instituts techniques, firmes phytosanitaires) et de matériel biologique. La convergence de ces deux objectifs, contribution à la recherche académique et appui à la filière, s'est par exemple traduite dans la thèse de Julien Papaïx : l'analyse des données de virulence de l'agent pathogène et de résistance de l'hôte, conjointement avec les données d'ARVALIS sur les niveaux de maladies observés en France, a produit des résultats innovants et a conforté nos travaux de modélisation de stratégies de gestion de la résistance à l'échelle du paysage.

L'expertise internationalement reconnue de l'équipe dans le phénotypage des virulences et des résistances aux rouilles repose actuellement sur trois personnes (Henriette Goyeau, Claude Pope, Marc Leconte). Leur départ programmé d'ici 2019-2020 entraînera la perte complète de cette expertise. La pérennisation de nos compétences passe par la création d'une collection de référence et une base de données associée (en cours d'élaboration) ; nos activités de suivi populationnels devront en parallèle être restructurées et recentrées autour d'un observatoire des populations pathogènes du blé (demande de poste IE en 2015).

2) Développer des approches expérimentales polycycliques en serre

Je souhaite que l'équipe dispose à moyen terme d'un dispositif en serre permettant de développer des approches expérimentales polycycliques. Il s'agirait d'un dispositif permettant

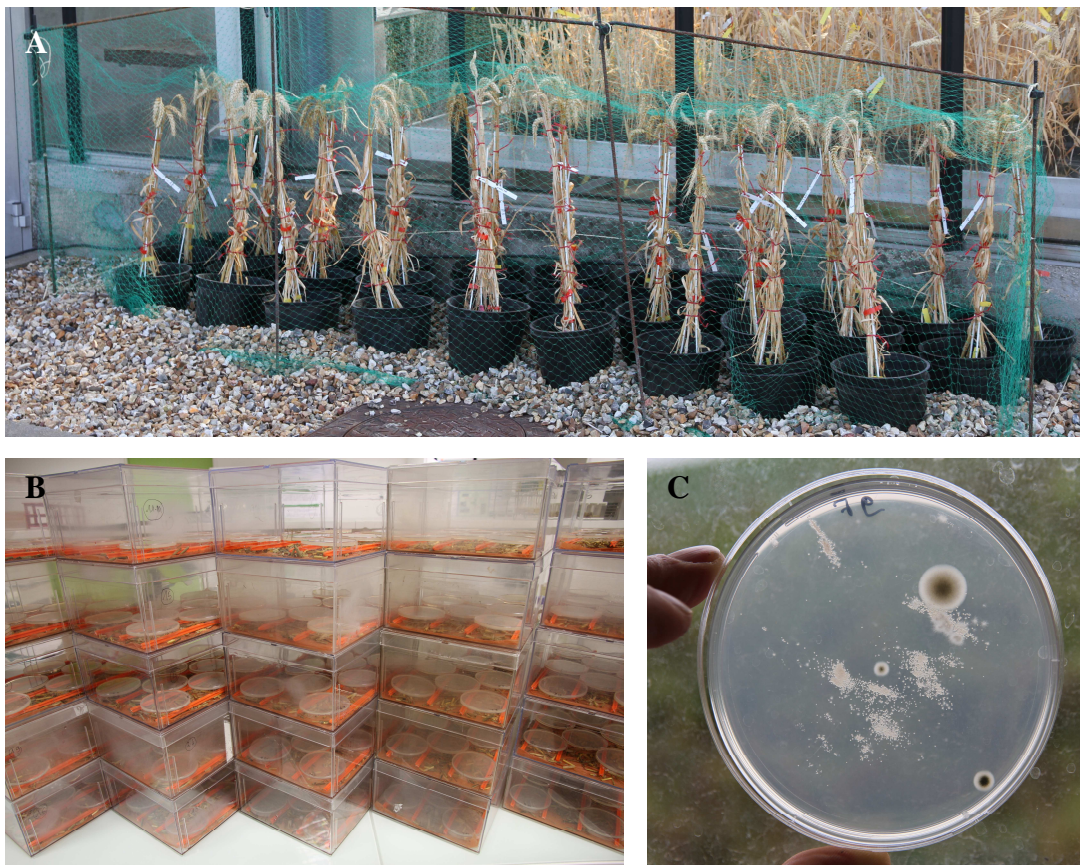


de générer sur un peuplement de blé des infections secondaires à partir de lésions sporulantes (processus de dispersion pluviale et incubation sous atmosphère humide). Cela permettrait de reproduire une épidémie à partir d'une population initiale (constituée d'isolats sélectionnés pour leur traits de vie et mis en compétition) et d'analyser les conséquences de leur hétérogénéité de réponse à certains facteurs (variété, température, etc.) à l'abri de contaminations extérieures. Des expérimentations de type mark-release-recapture ont été développées au champ sur des populations de *Z. tritici* (Zhan et al., 1998 ; Zhan & McDonald, 2013), mais le suivi d'individus "marqués" est relativement contraignant.

3) Développer les capacités de l'équipe à réaliser des croisements chez les trois espèces modèles étudiées

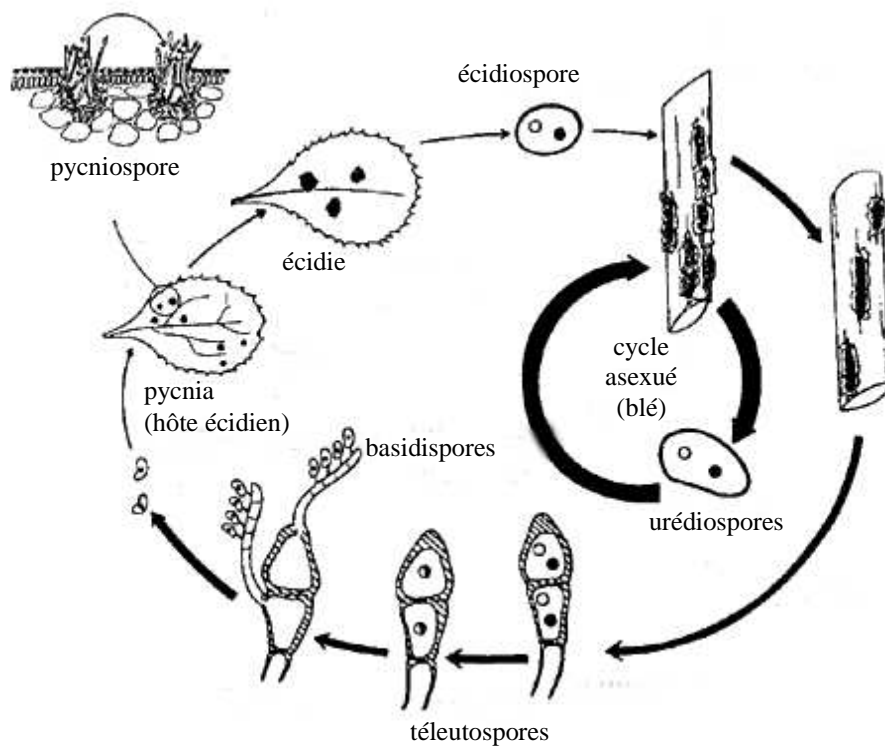
**L**a reproduction sexuée joue un rôle clef dans la dynamique des épidémies, la structure des populations et la capacité d'adaptation des trois espèces modèles étudiées dans l'équipe.

Dans le cas de *Z. tritici* la reproduction sexuée est à l'origine de processus épidémiques ayant un impact important sur la récurrence pluriannuelle des épidémies. La capacité à réaliser des croisements, désormais pratiqués en routine, offre des perspectives de recherches intéressantes.



**Figure 39** - A - Plants de blé co-inoculés avec des isolats parentaux de *Z. tritici* placés à l'extérieur pour favoriser la production et la maturation de périthèces. B - Dispositif de collecte d'ascospores à partir de résidus de blé. C - Colonies de *Z. tritici* apparues sur milieu PDA quelques jours après l'éjection des ascospores (photos F. Suffert).

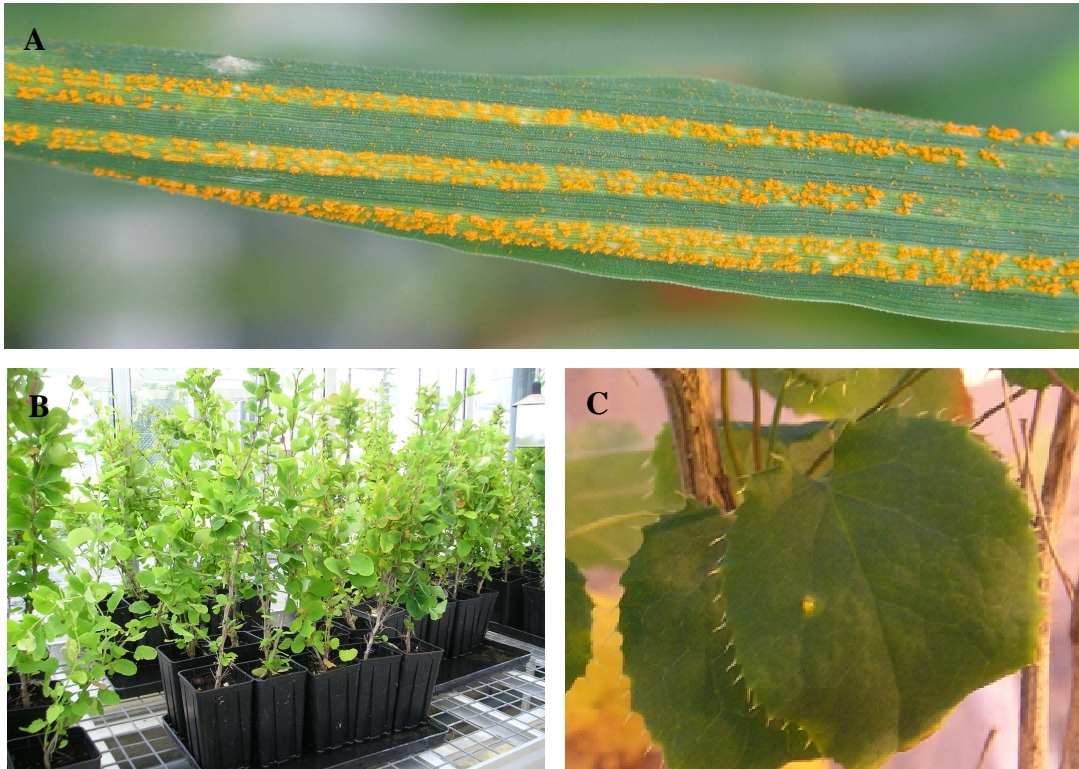
A l'inverse, la reproduction sexuée semble ne jouer aucun rôle fonctionnel dans l'épidémiologie de la rouille jaune et brune en Europe, dont la survie est principalement assurée par les repousses de blé (Fig. 40). L'hôte alternant de *P. triticina* (*Thalictrum speciosissimum*) est connu depuis plusieurs décennies et la phase sexuée a été mise en évidence en conditions naturelles (D'Oliveira & Samborski, 1964). Chez *P. striiformis*, un gradient de diversité a été décelé entre la Chine, l'Asie du Sud, le Moyen Orient, le Bassin Méditerranéen, et l'Europe de l'Ouest à la fois pour les marqueurs moléculaires et la production de téléutospores impliquées dans la reproduction sexuée (Ali et al., 2014). D'autres signes de recombinaison (fraction clonale plus faible, taux d'hétérozygotie plus élevé, absence de déséquilibre de liaison), suggèrent que la reproduction sexuée pourrait jouer un rôle dans la zone himalayenne ; l'hypothèse selon laquelle cette zone serait un centre de diversité pour la rouille jaune a été formulée par Sajid Ali pendant sa thèse. L'hôte alternant de *P. striiformis* a été identifié il y a seulement quelques années (*Berberis vulgaris* ; Jin, 2010). La reproduction sexuée a pu être réalisée en conditions contrôlées, mais n'a jamais été mise en évidence en conditions naturelles.



**Figure 40** - Cycle biologique générique, adapté au cas de la rouille jaune (*Puccinia striiformis* ; hôte écidien : *Berberis vulgaris*) et de la rouille brune du blé (*Puccinia triticina* ; hôte écidien : *Thalictrum speciosissimum*) (d'après Roelfs et al., 1992).

Des croisements sont pratiqués chez *P. triticina* depuis plusieurs années par deux équipes dans le monde (Yehoshua Anikster, Tel Aviv, Israël ; Jim Kolmer, St. Paul, USA) et chez *P. striiformis* par trois équipes (Yehoshua Anikster, Tel Aviv, Israël ; Jim Kolmer, St.

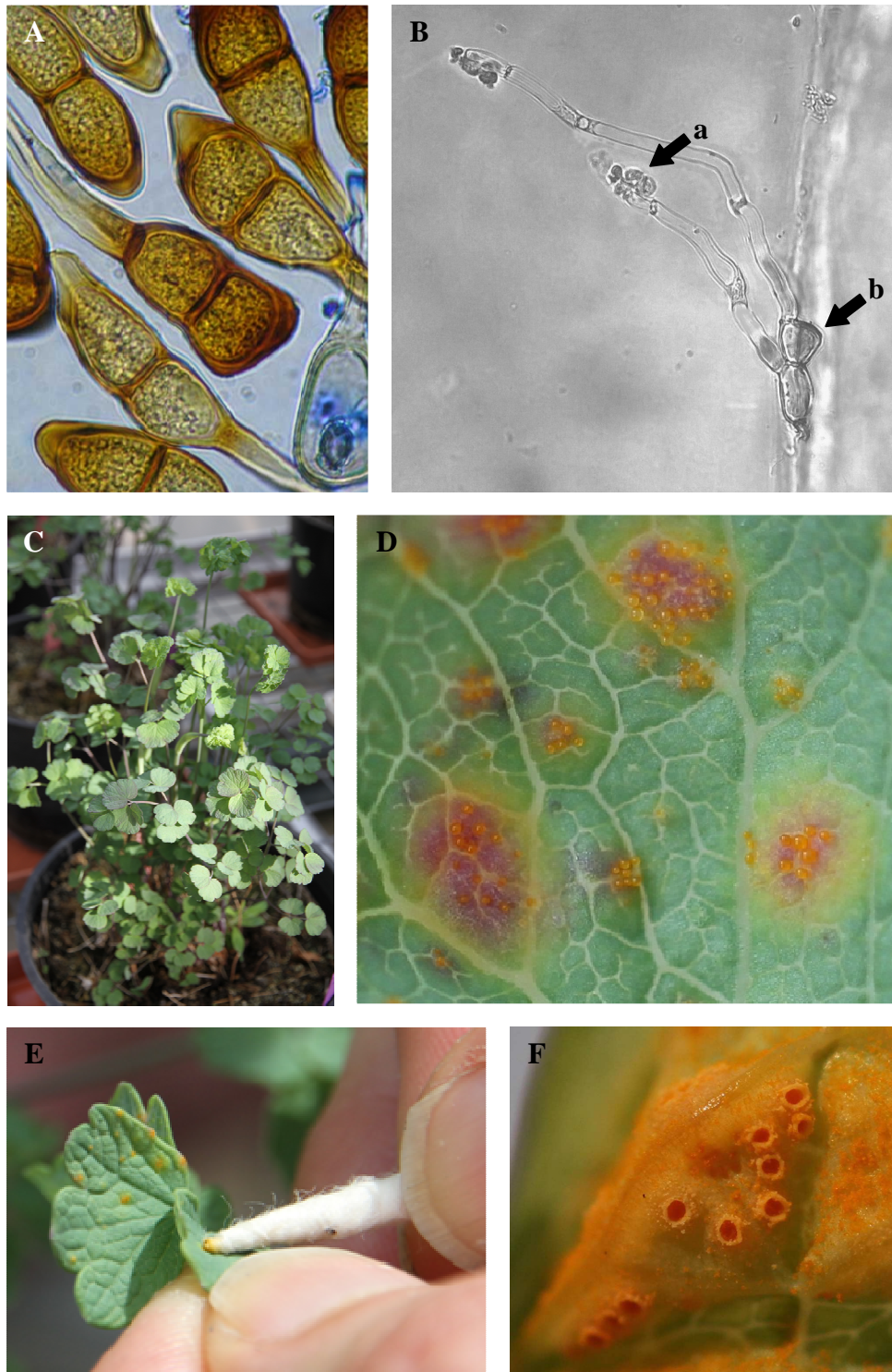
Paul, USA ; Mogens Hovmøller, Aarhus, Danemark). J'ai incité Marc Lecomte (Fig. 41) et Henriette Goyeau (Fig. 42) à renouveler leurs tentatives de croiser *P. triticina* et *P. striiformis* ; la réussite récente des premières étapes est très encourageante.



**Figure 41** - A - Symptômes de rouille jaune (*Puccinia striiformis*) sur feuille de blé (photo F. Suffert). B - Plants de *Berberis vulgaris*, hôte écidien de *P. striiformis* (photo M. Lecomte). Pycnia de *P. striiformis* sur feuille de *B. vulgaris* (photo M. Lecomte).

La maîtrise des croisements chez les trois espèces modèles étudiées constituerait une avancée méthodologique majeure. Cela permettrait de comprendre la façon dont se structurent les populations pathogènes et comment elles peuvent s'adapter, à une échelle large, à leur environnement et au déploiement de variétés résistantes. Ces compétences donneraient une visibilité supplémentaire à l'équipe au niveau international.





**Figure 42** - A - Téléutospore de *Puccinia triticina* (photo D. Blancard). B - Téléutospore germée (a) et basidiospores (b). C - *Thallictrum speciosissimum*, hôte écidien de *P. triticina*. D - Pycnia sur feuille de *T. speciosissimum*. E - Croisement de deux pycnia. F - Ecidies sur feuille de *T. speciosissimum* (photos F. Suffert et H. Goyeau).

### **3.3. Encadrement de doctorants et formation par la recherche**

L'HDR valide la capacité d'un scientifique à former "à la recherche par la recherche" un autre (jeune) scientifique, que celui-ci se destine ou non au métier de chercheur.

L'encadrant, qu'il soit ou non le directeur de thèse, doit aider son doctorant à comprendre et à s'approprier son sujet de thèse, qui évoluera généralement entre la première et la deuxième année. Il doit l'aider dans cette démarche et accepter cette évolution, qui illustre l'autonomie et la maturité scientifique du doctorant. L'encadrant doit également aider le doctorant à maîtriser le raisonnement, les méthodes et les outils nécessaires au bon déroulement de la thèse. Il doit l'inviter à se questionner face à ses résultats, à chercher et trouver, y compris à l'extérieur, l'aide dont il aura besoin pour mener à bien son projet.

J'ai une conception plutôt responsabilisante et libérale de l'encadrement d'un doctorant, qui peut être amené à percevoir son encadrant comme une sorte de "mentor" ; je pense que ce dernier doit rester avant tout un "manager", position d'autant plus marquée qu'il est également responsable d'équipe.

Je considère qu'un double contrat lie le doctorant à son encadrant :

- ▶ un contrat "administratif", car l'encadrant est le supérieur hiérarchique et le représentant direct de l'employeur (cas le plus fréquent), chargé de faire respecter des obligations professionnelles et des règles éthiques ;
- ▶ un contrat moral, par lequel le doctorant et l'encadrant ont réciproquement une obligation de moyens (activité de recherche) et de résultats (formation dispensée par l'encadrant sous couvert de l'école doctorale). J'estime que les efforts du doctorant et de l'encadrant, de part leurs intérêts réciproques, doivent être corrélés : idéalement, chacun est implicitement amené à aligner l'intensité de ses propres efforts sur celui de l'autre, dans une perspective "gagnant-gagnant".

Pour qu'une thèse soit fructueuse, je pense qu'il est nécessaire de :

#### **▶ Proposer un "bon sujet" et permettre son évolution**

Il s'agit de proposer à un doctorant un projet de recherche cadré, centré sur une question scientifique (enjeux et objectifs clairs), avec une stratégie opérationnelle réaliste. Définir un "bon sujet", susceptible d'évoluer, est donc la première étape à accomplir. Le sujet doit être novateur et original, doit contenir un élément fort de recherche, c'est-à-dire contribuer à l'avancement des connaissances en épidémiologie végétale ; il doit surtout permettre au doctorant de développer un projet professionnel et conduire, au terme de trois ans, à la rédaction d'un manuscrit et d'au moins un ou deux articles scientifiques. Le sujet doit être compréhensible et abordable pour un étudiant de niveau Master2, mais il doit permettre une évolution rapide aux limites, voire au-delà, des connaissances actuelles.

### ► Lorsque le sujet et le contexte s'y prêtent, privilégier les co-encadrements

Une thèse peut être encadrée par deux, voire trois scientifiques. Le co-encadrement se justifie lorsque le sujet demande des compétences et expertises variées, lorsque la thèse se fait en cotutelle ou lorsque l'un des deux encadrants ne possède pas son HDR. Un co-encadrement bien pensé est très bénéfique dès lors que les co-encadrants se connaissent bien, s'apprécient et sont capables d'ajuster leur l'ascendant respectif sur le doctorant de façon à ce qu'au final le style de management coïncide avec sa personnalité et sa façon de travailler.

En épidémiologie végétale, compte tenu du caractère pluridisciplinaire de nombreux sujets de thèse, il est fréquent de faire appel à un co-encadrant statisticien, modélisateur, biophysicien, généticien des populations, écophysiologiste ou écologue. Ce type de fonctionnement est très profitable, tant pour le projet de thèse lui-même que pour la vie scientifique de l'équipe. Dans l'équipe épidémiologie la plupart des thèses ont été co-encadrées et je souhaite que cela continue. Les deux thèses dans lesquelles je me suis impliqué étaient co-encadrées ; les prochaines le seront également.

### ► Adapter les modalités d'encadrement et son style de management au couple sujet-doctorant

Compte tenu de la difficulté à attirer des étudiants formés à l'épidémiologie végétale et du caractère imprévisible de l'octroi d'une bourse de thèse, il peut arriver qu'un couple sujet-doctorant se forme non pas sur un critère d'excellence mais par "opportunisme" (difficile de renoncer à un projet de thèse lorsqu'on a un financement et un étudiant...). Dans pareille situation, arriver à adapter son style de management au couple sujet-doctorant est un gage de réussite. La thèse sera-t-elle très cadrée et pilotée en mode "projet" ? Est-il nécessaire au contraire de laisser une très grande autonomie au doctorant ? Ces questions doivent être posées au début et évoluer pendant la thèse.

## 4. Références

- Abang MM, Baum M, Ceccarelli S, Grando S, Linde CC, Yahyaoui A, Zhan J, McDonald BA (2006) Differential selection on *Rhynchosporium secalis* during parasitic and saprophytic phases in the barley scald disease cycle. *Phytopathology* **96**: 1214-1222.
- Ali S, Gladioux P, Leconte M, Gautier A, Justesen AF, Hovmøller MS, Enjalbert J, de Vallavieille-Pope C (2014) Origin, migration routes and worldwide population genetic structure of the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*. *PLoS Pathogen* **10**: e1003903.
- Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P (2006) Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* **9**: 467-484.
- Amorim L, Bergamin Filho A, Hau B (1993) Analysis of progress curves of sugarcane smut on different cultivars using functions of double sigmoid pattern. *Phytopathology* **83**: 933-936.
- Andrivon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbière R, Achbani E, Pelle R, Ellissèche D (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**: 338-343.
- Angilletta MJ (2006) Estimating and comparing thermal performance curves. *Journal of Thermal Biology* **31**: 541-545.
- Armour T, Viljanen-Rollinson SLH, Chng SF, Butler RC, Jamieson PD, Zyskowski RF (2004) Examining the latent period of Septoria tritici blotch in a field trial of winter wheat. *New Zealand Plant Protection* **57**: 116-120.
- Aylor DE (1990). The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 73-92.
- Azzimonti G, Lannou C, Sèche I, Goyeau H (2013) Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathology* **62**: 970-981.
- Bailey DJ, Gilligan CA (1999) Dynamics of primary and secondary infection in take-all epidemics. *Phytopathology* **89**: 84-91.
- Ben Slimane R, Bancal P, Suffert F, Bancal M-O (2011). Localized septoria leaf blotch lesions in winter wheat flag leaf do not accelerate apical senescence during necrotrophic stage. *Journal of Plant Pathology* **94**: 543-553.
- Bernard C (1865) Introduction à la médecine expérimentale. Paris.
- Bernard F, Sèche I, Suffert F, Chelle M (2013) The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature! *New Phytologist* **198**: 232-240.
- Bourcier D, van Andel P (2011) La sérendipité, le hasard heureux. Hermann, Paris.
- Brassett PR, Gilligan CA (1988) A model for primary and secondary infection in botanical epidemics. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz* **95**: 352-360.
- Brokenshire T (1975) Wheat debris as an inoculum source for seedling infection by *Septoria tritici*. *Plant Pathology* **24**: 202-207.
- Brown JS, Kellock AW, Paddick RG (1978) Distribution and dissemination of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter in relation to the epidemiology of speckled leaf blotch of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **29**, 1139-1145.
- Carter MV, Yap ASJ, Pady SM (1970) Factors affecting uredospore liberation in *Puccinia antirrhini*. *Australian Journal of Agricultural Research* **21**: 921-925.
- Catellin (2004) L'abduction : une pratique de la découverte scientifique et littéraire. *Hermès* **39**: 179-185.

- Chakraborty BN, Chakraborty U, Basu K (1994) Antagonism of *Erwinia herbicola* towards *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease of *Brassica napus*. *Letters in Applied Microbiology* **18**: 74-76.
- Chakraborty S (2013) Migrate or evolve: options for plant pathogens under climate change. *Global Change Biology* **19**: 1985-2000.
- Chelle M (2005) Phylloclimate or the climate perceived by individual plant organs: what is it? How to model it? What for? *New Phytologist* **166**: 781-790.
- Chen RS, Boeger JM, McDonald BA (1994) Genetic stability in a population of a plant pathogenic fungus over time. *Molecular Ecology* **3**: 209-218.
- Clinckemaillie A, Dedeurwaerder G, Duvivier M, Moreau JM, Legrève A (2010) Presence of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* and occurrence of sexual reproduction during the growing season in Belgium. *Phytopathology* **100**: S26-S26.
- Crowe FJ, Hall DH (1980) Vertical distribution of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and host root systems relative to white rot of onion and garlic. *Phytopathology* **70**: 70-73.
- D'Oliveira BD, Samborski DJ (1966) Aecial Stage of *Puccinia recondita* on Ranunculaceae and Boraginaceae in Portugal. In: Macer RC et Wolfe MS (Eds.), *Proceedings of the First European Brown Rust Conference*, UK, pp. 133-150.
- Desprez-Loustau ML, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F, Satche I, Rizzo D (2007) The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 472-480.
- Dimond AE, Horsfall JG (1965) The theory of inoculum. In: *Ecology of soil-borne plant pathogens*. Baker KF et Snyder WC, University of California Press, USA.
- Duhamel du Monceau HL (1728) Explication physique d'une maladie qui fait périr plusieurs plantes dans le Gastinois et particulièrement le safran. *Mémoires de l'Académie Royale* 100-112.
- Duvivier M, Dedeurwaerder G, De Proft M, Moreau JM, Legreve A (2013) Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *European Journal of Plant Pathology* **137**: 325-241.
- Estrada-Garcia T, Ray TC, Green JR (1990) Encystment of *Pythium aphanidermatum* zoospores is induced by root mucilage polysaccharides, pectin and a monoclonal antibody to a surface antigen. *Journal of Experimental Botany* **41**: 693-699.
- Eyal Z (1971) The kinetics of pycnospore liberation in *Septoria tritici*. *Canadian Journal of Botany* **49**: 1095-1099.
- Fitt BDL, Gregory PH, Todd AD, McCartney HA, McDonald OC (1987) Spore dispersal and plant disease gradients: a comparison between two empirical models. *Journal of Phytopathology* **118**: 227-242.
- Fitt BDL, Walklate PJ, McCartney HA, Bainbridge A, Creighton NF, Hirst JM, Macey ME, Legg BJ (1986) A rain tower and wind tunnel for studying the dispersal of plant pathogens by rain and wind. *Annals of Applied Biology* **109**: 661-671.
- Garrett SD (1956) *Biology of root-infecting fungi*. Cambridge University Press, London.
- Gautier A, Marcel T, Confais J, Crane C, Kema G, Suffert F, Walker A-S (2014) Development of a rapid multiplex SSR genotyping method to study populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *BMC Research Notes* **7**: 373.
- Geagea L, Huber L, Satche I (1999) Dry-dispersal and rain-splash of brown (*Puccinia recondita* f.sp *tritici*) and yellow (*P. striiformis*) rust spores from infected wheat leaves exposed to simulated raindrops. *Plant Pathology* **48**: 472-482.
- Geagea L, Huber L, Satche I, Flura D, McCartney HA, Fitt BDL (2000) Influence of simulated rain on dispersal of rust spores from infected wheat seedlings. *Agricultural and Forest Meteorology* **101**: 53-66.



- Gilligan CA (1983) Modeling of soilborne pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **21**: 45-64.
- Green H, Jensen DF (2000) Disease progression by active mycelial growth and biocontrol of *Pythium ultimum* var. *ultimum* studied using a rhizobox system. *Phytopathology* **90**: 1049-1055.
- Gregory PH, Guthrie EJ, Bunce ME (1959) Experiments on splash dispersal of fungal spores. *Journal of General Microbiology* **20**: 328-354.
- Halama P (1996) The occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici* in France. *Plant Pathology* **45**: 135-138.
- Hamelin FM, Castel M, Poggi S, Andrivon D, Mailleret L (2011) Seasonality and the evolutionary divergence of plant parasites. *Ecology* **92**: 2159-2166.
- Hammoudi O, Salman M, Abuamsha R, Ehlers RO (2012) Effectiveness of bacterial and fungal isolates to control *Phoma lingam* on oilseed rape *Brassica napus*. *American Journal of Plant Sciences* **3**: 773-779.
- Hau B, Amorim L, Bergamin Filho A (1993) Mathematical functions to describe disease progress curve of double sigmoid pattern. *Phytopathology* **83**: 928-932.
- HGCA (2012) *Septoria tritici* in winter wheat. Topic sheet 113, accessible on: [http://www.hgca.com/media/178045/ts113\\_septoria\\_tritici\\_in\\_winter\\_wheat.pdf](http://www.hgca.com/media/178045/ts113_septoria_tritici_in_winter_wheat.pdf)
- Hiltunen LH, White JG (2002) Cavity spot of carrot (*Daucus carota*). *Annals of Applied Biology* **141**: 201-223.
- Hirst JM (1961) The aerobiology of *Puccinia graminis* uredospores. *Transactions of the British Mycological Society* **44**: 138-139.
- Holmes SJI, Colhoun J (1975) Straw-borne inoculum of *Septoria nodorum* and *S. tritici* in relation to incidence of disease on wheat plants. *Plant Pathology* **24**: 63-66.
- Hughes G, McRoberts N, Madden LV, Gottwald TR (1997) Relationships between disease incidence at two levels in a spatial hierarchy. *Phytopathology* **87**: 542-550.
- Hunter T, Coker RR, Royle DJ (1999) The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* **48**: 51-57.
- James WC (1974) Assessment of plant disease and losses. *Annual Review of Phytopathology* **12**: 27-48.
- Jin Y (2010) Role of the alternate host *Berberis* spp. in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. *Euphytica* **179**: 105-108.
- Karolewski Z, Evans N, Fitt BDL, Todd AD, Baierl A (2002) Sporulation of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot) on oilseed rape (*Brassica napus*) leaves inoculated with ascospores or conidia at different temperatures and wetness durations. *Plant Pathology* **51**: 654-665.
- Kaufmann O (1932) Einige Bemerkungen über den Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Entwicklungsdauer und Streuung bei Insekten und seine graphische Darstellung durch Kettenlinie und Hyperbel. *Zoomorphology* **25**: 353-361.
- Kema GHJ, Verstappen ECP, Todorova M, Waalwijk C (1996) Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* **30**, 251-258.
- Kermack WO, McKendrick AG (1927) A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society of London* **115**: 700-721.
- Koch R (1876) Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*". *Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **2**: 277-310.
- Koelle K, Pascual M, Yunus M (2005) Pathogen adaptation to seasonal forcing and climate change. *Proceedings of the Royal Society of London B* **272**: 971-977.

- Kranz J et Rotem J (1988) Experimental techniques in plant disease epidemiology. Springer-Verlag, Berlin.
- Lannou C (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 319-338.
- Large EC (1966) Measuring plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **4**: 9-28.
- Latxague E, Sache I, Pinon J, Andrivon D, Barbier M, Suffert F (2007) A methodology for assessing the risk posed by the deliberate and harmful use of plant pathogens in Europe. *EPPO Bulletin* **37**: 427-435.
- Le May C, M Guibert, Leclerc A, Andrivon D, Tivoli B (2012) A single, plastic population of *Mycosphaerella pinodes* causes ascochyta blight on winter and spring peas (*Pisum sativum*) in France. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 8431-8440.
- Li H, Krishnapillai S, Barbeti MJ, Kuo J (2004) Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *Journal of General Plant Pathology* **70**: 261-269.
- Linde CC, Zhan J, McDonald BA (2002) Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* **92**: 946-955.
- Longman D, Callow JA (1987) Specific saccharide residues are involved in the recognition of plant root surfaces by zoospores of *Pythium aphanidermatum*. *Physiological Molecular Plant Pathology* **30**: 139-150.
- Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, van den Bosch F (2004) Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* **53**, 170-181.
- Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Royle DJ, Coker RR (1997) Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* **46**: 126-138.
- Madden LV, Wilson LL, Ntahimpera N (1998) Calibration and evaluation of an electronic sensor for rainfall kinetic energy. *Phytopathology* **88**: 950-959.
- Martin FN, Loper JE (1999) Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 111-181.
- Mboup M, Bahri B, Leconte M, de Vallavieille-Pope C, Kaltz O, Enjalbert J (2012) Genetic structure and local adaptation of European wheat yellow rust populations: the role of temperature-specific adaptation. *Evolutionary Applications* **5**: 341-352.
- McCartney HA, Fitt BDL (1998) Dispersal of foliar fungal plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial pattern. In: Jones DG (Dir.) *The epidemiology of plant diseases*, Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas, pp. 138-160.
- McDonald MR (1994) Cavity spot of carrot (*Pythium* spp.): etiology, epidemiology and control. University of Guelph, Canada.
- Merton RK, Barber E (2006) The travels and adventures of serendipity: A study in sociological semantics and the sociology of science. Princeton University Press, USA.
- Montarry J, Corbière R, Andrivon D (2007) Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Functional Ecology* **21**: 603-610.
- Morais D, Laval V, Sache I, Suffert F (2015a) Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (*Septoria tritici* blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology*, sous presse.
- Morais D, Sache I, Suffert F, Laval V (2015b) Is onset of *Septoria tritici* blotch epidemics related to local availability of ascospores? *Plant Pathology*, sous presse.
- Morstatt H (1921) Zur Ausbildung für den Pflanzenschutzdienst. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **31**: 89-94.

- Nagarajan S, Singh DV (1990) Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 139-153.
- Newton AC, McGurk L (1991) Recurrent selection for adaptation of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* to partial resistance of barley. *Journal of Phytopathology* **132**: 328-338.
- Nutter FW, Teng PS et Shokes FM (1991) Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* **75**: 1187-1188.
- Panconesi A (1999) Canker stain of plane trees: a serious danger to urban plantings. *Journal of Plant Pathology* **81**: 3-15.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C (2009) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**, 409-424.
- Pascual N, Cécillon L, Mathieu O, Hénault C, Sarr A, Lévêque J, Farcy P, Ranjard L, Maron, PA (2010) In situ dynamics of microbial communities during decomposition of wheat, rape, and alfalfa residues. *Microbial Ecology* **60**: 816e828.
- Pascual M, Dobson A (2005) Seasonal patterns of infectious diseases. *PLoS Medicine* **2**: e5.
- Pfender WF (1982) Monocyclic and polycyclic root diseases: distinguishing between the nature of the disease cycle and the shape of the disease progress curve. *Phytopathology* **72**: 31-32.
- Pfender WF (1982) Monocyclic and polycyclic root diseases: distinguishing between the nature of the disease cycle and the shape of the disease progress curve. *Phytopathology* **72**: 31-32.
- Phelps K, White JG, Henn AJ (1991) Studies on the frequency distribution of *Pythium*-induced cavity spot of carrots. *Annals of Applied Biology* **119**: 21-30.
- Prillieux E (1882) Sur la maladie des safrans nommée la Mort. *Compte rendu hebdomadaire de séance de l'Académie des Sciences* **94**: 1734-1737.
- Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Gohari AM, Mehrabi R, Crous PW (2011) *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia* **26**: 57-69.
- Ramarathnam R, Fernando WGD (2006) Preliminary phenotypic and molecular screening for potential bacterial biocontrol agents of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of canola. *Biocontrol Science and Technology* **16**: 567-582
- Rapilly F (1991) L'épidémiologie en pathologie végétale: mycoses aériennes. Editions Quae, France.
- Rieux A, Soubeyrand S, Bonnot F, Klein EK, Ngando JE, Mehl A, Ravigné V, Carlier J, Lapeyre de Bellaire L (2014) Long-distance wind-dispersal of spores in a fungal plant pathogen: Estimation of anisotropic dispersal kernels from an extensive field experiment. *PLoS ONE* **9**: e103225.
- Rohr JR, Ruiz-Moreno D, Thomas MB, Paull SH, Dobson A, Kilpatrick AM, Pascual M, Raffel TR (2010) Toward a general theory for how climate change will affect infectious disease. *Bulletin of the Ecological Society of America* **91**:467-473.
- Sache I, Roy A-S, Suffert F, Desprez-Loustau M-L (2011) Invasive plant pathogens in Europe. In: *Biological invasions: Economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*, Pimentel D (Eds.), CRC Press, London, 227-242.
- Sanderson FR (1972) A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. *New Zealand Journal of Botany* **10**: 707-709.
- Scherm H, van Bruggen AHC (1994) Global warming and nonlinear growth: how important are changes in average temperature? *Phytopathology* **84**: 1380-1384.
- Scott MR (1956) Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. II. The spread of white rot from plant to plant. *Annals of Applied Biology* **44**: 584-589.

- Shaw MW (1987) Assessment of upward movement of rain splash using a fluorescent tracer method and its application to the epidemiology of cereal pathogens. *Plant Pathology* **36**: 201-213.
- Shaw MW (1990) Effects of temperature, leaf wetness and cultivar on the latent period of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Plant Pathology* **39**, 255-268.
- Shaw MW, Royle DJ (1989) Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology* **38**, 35-43.
- Shearer BL, Zadoks JC (1972) The latent period of *Septoria nodorum* in wheat. 1. The effect of temperature and moisture treatments under controlled conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **78**, 237-247.
- Sommerhalder RJ, McDonald BA, Mascher F, Zhan J (2011) Effect of hosts on competition among clones and evidence of differential selection between pathogenic and saprophytic phases in experimental populations of the wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 188.
- Stack J, Suffert F, Gullino ML (2010) Bioterrorism: A threat to plant biosecurity? In: *The role of plant pathology in food safety and food security*, Gullino ML et Strange RN (Eds), Springer, Pays-Bas, pp. 115-132.
- Stefansson TS, McDonald BA, Willi Y (2013) Local adaptation and evolutionary potential along a temperature gradient in the fungal pathogen *Rhynchosporium commune*. *Evolutionary Applications* **6**: 524-534.
- Suffert F (2005) Cadre théorique de la notion de complémentation caractérisant des stratégies de protection des cultures. *Phytoprotection* **86**: 89-92.
- Suffert F (2007) Modelling of the kinetics of carrot cavity spot caused by a complex of pathogenic agents of the genus *Pythium* dominated by *Pythium violae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **29**: 41-55.
- Suffert F (2010) Emergences épidémiologiques non-conventionnelles et analyse de risque : le cas de la biosécurité agricole et de l'agroterrorisme. In: *Les maladies émergentes. Épidémiologie chez le végétal, l'animal et l'homme*, Barnouin J et Sache I (Eds), Quae Editions, Versailles, 373-384.
- Suffert F, Barbier M, Sache I, Latxague E (2008) Biosécurité des cultures et agroterrorisme. Une menace, des questions scientifiques et une opportunité : réactiver un dispositif d'épidémiologie. *Le Courrier de l'Environnement* **56**: 67-86.
- Suffert F, Delalande D, Prunier M, Andrivon D (2008) Modulation of primary and secondary infections in epidemics of carrot cavity spot through agronomic management practices. *Plant Pathology* **57**: 109-121.
- Suffert F, Guibert M (2007) The ecology of a *Pythium* community in relation to the epidemiology of carrot cavity spot. *Applied Soil Ecology* **35**: 488-501.
- Suffert F, Latxague E, Sache I (2009) Plant pathogens as agroterrorist weapons: Assessment of the threat for European agriculture and forestry. *Food Security* **1**: 221-232.
- Suffert F, Lucas JM (2008) Lateral roots of carrot have a low impact on alloinfections involved in a cavity spot epidemic caused by *Pythium violae*. *Journal of General Plant Pathology* **74**: 296-301.
- Suffert F, Montfort F (2007) Demonstration of secondary infection by *Pythium violae* in epidemics of carrot cavity spot using root transplantation as method of soil infestation. *Plant Pathology* **56**: 588-594.
- Suffert F, Montfort F (2008) Pathometric relationships reveal epidemiological processes involved in carrot cavity spot epidemics. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 425-436.
- Suffert F, Sache I (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* **60**: 878-889.
- Suffert F, Sache I, Huber L (2000) Effets de divers types de pluie sur la dispersion de spores de rouille jaune (*Puccinia striiformis*) et de rouille brune (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) sur blé. 6e *Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes ANPP*, Tours, France.

- Suffert F, Sache I, Lannou C (2011) Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**: 166-177.
- Suffert F, Sache I, Lannou C (2013) Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**: 1330-1341.
- Teng PS (1983) Estimating and interpreting disease intensity and loss in commercial fields. *Phytopathology* **73**: 1587-1590.
- Trapero-Casas A, Navas Cortes JA, Jimenez Diaz RM (1996) Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for *Ascochyta* blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 237-245.
- Van der Plaats-Niterink AJ (1981) Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* **21**: 1-224.
- Van der Plank JE (1963) Plant diseases: epidemics and control. New York.
- Vigouroux A, Stojadinovic B (1990) Possibilités d'infection du platane par *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* après contamination de l'eau où se développent des racines blessées. *European Journal of Forest Plant Pathology* **20**: 118-121.
- Villareal LMMA, Lannou C (2000) Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* **90**: 1300-1306.
- Waalwijk C, Mendes O, Verstappen ECP, de Waard MA, Kema GHJ (2002) Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biology* **35**: 277-286.
- Waggoner PE (1977) Contribution of mathematical models to epidemiology. *Annals of the New York Academy of Sciences* **287**: 191-206.
- Weber G (1922) Septoria diseases of wheat. *Phytopathology* **12**: 537-585.
- Wilocquet L, Savary S (2004) An epidemiological simulation model with three scales of spatial hierarchy. *Phytopathology* **94**:883-891
- Xhaard C, Barres B, Andrieux A, Bousset L, Halkett F, Frey P (2012) Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Molecular Ecology* **21**: 2383-2398.
- Zadoks JC (1981) Mr. Duhamel's 1728 treatise of the violet roor rot of saffron crocus : "Physical explanation of a disease that pershes several plants in the Gastinois, and saffron in particular". *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* **81**: 1-29.
- Zadoks JC, Schein RD (1979) Epidemiology and plant disease management. Academic Press, New York.
- Zearfoss AD, Cowger C, Ojiambo PS (2011) A degree-day model for the latent period of *Stagonospora nodorum* blotch in winter wheat. *Plant Disease* **95**, 561-567.
- Zhan J, McDonald BA (2011) Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **20**: 1689-1701.
- Zhan J, McDonald BA (2013) Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 131-153.
- Zhan J, McDonald BA (2013) Field-based experimental evolution of three cereal pathogens using a mark-release-recapture strategy. *Plant Pathology* **62**: 106-114.
- Zhan J, Mundt CC, Hoffer ME, McDonald BA (2002) Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 634-647.
- Zhan J, Mundt CC, McDonald BA (1998) Measuring immigration and sexual reproduction in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **88**: 1330-1337.

## 5. Annexes : sélection de cinq publications

Suffert F, Latxague E, Sache I (2009) Plant pathogens as agroterrorist weapons: Assessment of the threat for European agriculture and forestry. *Food Security* **1**: 221-232.

Suffert F, Sache I (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* **60**: 878-889.

Suffert F, Sache I, Lannou C (2013) Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**: 1330-1341.

Bernard F, Sache I, Suffert F, Chelle M (2013) The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature! *New Phytologist* **198**: 232-240.

Morais D, Laval V, Sache I, Suffert F (2015) Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (*Septoria tritici* blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology*, sous presse.



# Plant pathogens as agroterrorist weapons: assessment of the threat for European agriculture and forestry

Frédéric Suffert · Émilie Latxague · Ivan Sache

Received: 26 November 2008 / Accepted: 3 February 2009  
© Springer Science + Business Media B.V. & International Society for Plant Pathology 2009

**Abstract** Malevolent use of plant pathogens in an act of agroterrorism represents a potential threat for European agriculture and forestry. We investigated the risk of agroterrorism *sensu lato*, which is raising debates among the community of plant pathologists. In the absence of a previous unambiguous definition of agroterrorism we characterized the risk for Europe by taking into account the multiplicity of the threat, of the perpetrator's objectives, and of potential *modus operandi*. To this end, we have applied a three-step methodology involving: (1) the building of a list of candidate pathogens, (2) a scenario-based exploration of potential agroterrorist acts, and (3) the design of a risk evaluation scheme (RES), derived from the standard pest risk analysis (PRA). We adopted a congruent risk assessment strategy consisting of coupling the foresight exercise (assignment of nine key pathogens extracted from

the list to nine scenarios and comparison of different intrinsic criteria) to the analytical assessment (application of the RES to the nine key pathogens and qualitative analysis resulting in a pentagonal star plot representing risk profiles). Analysis was performed by non-experts on the selected diseases, and thus enabled a comparison between crops or pathogens on the basis of the characterization of the threat. The risk, considered in its hybrid dimension (both factual because it refers to crop protection and an effective stake, and also irrational because it refers to bioterrorism, a vague and unobservable concept) was characterized exhaustively for the selected plant pathogens and the success of a malevolent act appeared to be much more uncertain than believed. However, agroterrorism should be considered as a plausible threat, potentially more important by the consequences of the securitization of the concept, which could imply disruption of regulations and trade, than by direct damaging consequences on European crops. There is probably not a single short-list of threatening pathogens: different pathogens would be most threatening for different purposes, for different perpetrators, and for different target crops.

F. Suffert · I. Sache  
INRA, UMR1290 BIOGER-CPP, Biologie et Gestion des Risques en Agriculture—Champignons Pathogènes des Plantes,  
78850 Thiverval-Grignon, France

F. Suffert (✉) · I. Sache  
AgroParisTech, UMR1290 BIOGER-CPP,  
78850 Thiverval-Grignon, France  
e-mail: fsuffert@grignon.inra.fr

É. Latxague  
INRA, UMR1099 BiO3P, Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes,  
35653 Le Rheu, France

É. Latxague  
Agrocampus Rennes, UMR1099 BiO3P,  
35653 Le Rheu, France

É. Latxague  
INRA, UAR1241 Prospective, 147 rue de l'Université,  
75007 Paris, France

**Keywords** Agroterrorism · Anti-crop bioweapons, Crop biosecurity · Foresight · Plant pathogens · Risk assessment

## Introduction

Crop biosecurity, defined as “protecting a state from invasive plant pathogens” (Brasier 2008) is mostly assured by regulations and quarantine measures. The International Plant Protection Convention (IPPC 2004) has in its charge the global harmonization of phytosanitary measures set up



by National Plant Protection Organisations to prevent accidental introductions of invasive exotic plant pests (Schrader and Unger 2003). Regional Plant Protection Organisations, such as the European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO 2007), acting as a regional umbrella organisation, aim at improving the harmonization of quarantine protocols. While most exotic invasive plant pests have been either accidentally introduced or passively spread by wind currents, little attention has been paid until recently to the possible, deliberate use of plant pathogens as agroterrorist weapons against crops and forests (Anderson et al. 2004; Desprez-Loustau et al. 2007). Excluding attacks against livestock and wildlife, we will further consider agroterrorism *sensu lato* as the intentional use, as well as the threat or simulation of use of plant pathogens by any individual or group in order to cause direct damage to crops or forests, or to indirectly affect the agricultural sector.

Agroterrorism is not a new issue. For ages, wars have targeted agriculture, mostly by trashing or burning crops and forests, as a means of depriving the enemy of food supply, repel colonists or subjugate rebel populations. More recently, biological anti-crop warfare has been state-sponsored in some of the biggest European countries between 1920 and 1940. Around the Second World War, the main belligerent countries developed research programmes on biological anti-crop agents targeting staple crops, for instance potatoes (with late blight caused by the Oomycete *Phytophthora infestans* and the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*) and rice (with brown spot and rice blast, caused by the fungi *Cochliobolus miyabeanus* and *Magnaporthe grisea*, respectively) (Table 1; Madden and Wheelis 2003; Suffert 2003). After the Second World War, several countries continued to conduct research on plant pathogens as anti-crop weapons. The main researched agents were *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, the cause of wheat black rust (Table 1; Line and Griffith 2001), *M. grisea* and *P. infestans* (Table 1; Madden and Wheelis 2003). While the countries that signed the Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) in 1972 officially stopped their biological warfare programs, a new cycle of concern over the possible use of biological anti-crop weapons began in the late 1980s, based on the knowledge that several “rogue” countries were trying to acquire such weapons. Following the First Gulf War, United Nations Special Commission’s inspections have revealed that Iraq had expressed an interest in acquiring the military capacity to destroy Iranian crops and that progress had been made with regard to research and development in the weaponization of wheat smut fungi (*Tilletia caries* and *T. tritici*) and aflatoxin-producing strains of the fungus *Aspergillus* (Table 1; Whitby 2002). Additionally, there have been sporadic, unverified allegations that states or militant organizations have either used plant pathogens

against crops or threatened to use them (Table 1; Junior 2006; Zilinskas 1999). More recently, evidence found in caves in Afghanistan suggested interest by Islamic militants in the weaponization of wheat rust (Fletcher et al. 2006). Unlikely allegation of deliberate introduction of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) in European maize fields in the 1990s could not be completely rejected since population genetics demonstrated the occurrence of multiple transatlantic introductions of the pest (Table 1; Miller et al. 2005). In the 1990s, the United Nations Drug Control Program supported anti-coca and anti-poppy programs in Andean and Central Asian countries, respectively (Table 1; Jelsma 2001). Strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxyli* (Connick et al. 1998) and *Pleospora papaveracea* (O’Neill et al. 2000) with increased pathogenicity have been selected but were officially never used. The status of these biocontrol agents as biowarfare agents is evidently controversial (Suffert et al. 2008).

Awareness for biosecurity has increased over the last decade owing to growing trade, travel, transportation, and tourism, the “four T’s” components of globalization (Waage and Mumford 2007). A relatively minor issue until the last decade, agroterrorism emerged in the scientific literature after 1997 (Suffert et al. 2008). According to Ole Wæver’s securitization theory, crop biosecurity and agroterrorism should be considered as “securitized” issues (Buzan et al. 1998). They have become specific fields of research, with a corpus of dedicated articles (e.g., Cupp et al. 2004; Byrne 2007; Khetarpal and Gupta 2007), journals (e.g., “International Journal of Rural Crime”, and “Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science”), reviews (e.g., Madden and Wheelis 2003; Suffert 2003), textbooks (e.g., Whitby 2002; Gullino et al. 2008) and conferences (e.g., the symposium on “Plant Pathology’s role in anti-crop bioterrorism and food security” held by the American Phytopathological Society in 1999, and the annual “International Symposium of Agroterrorism” held since 2005 in the USA).

Agroterrorism as warfare has been deemed “low-tech, high impact” (Wheelis et al. 2002). Only a few methods aimed at a comprehensive assessment of agroterrorism have been proposed (Madden and Wheelis 2003; Schaad et al. 2006). In a previous article, Latxague et al. (2007) have set up a three-step methodology for assessing this risk in Europe involving: (1) the building of a list of candidate pathogens, (2) a scenario-based investigation of potential agroterrorist acts, and (3) the design of a risk assessment scheme. Since this methodology remained to be tested with “real” cases, the objective of the present article is to apply this methodology to potential, worthy of belief, cases of agroterrorism, and then to discuss the relevance of agroterrorism as a scientific issue regards to the results obtained for the risk assessment of selected plant pathogens.

**Table 1** Reports of agroterrorist threats *sensu lato* in the 20th century (after Suffert et al. 2008)

Plant pathogens	Target crop	Year	Target area	Origin <sup>a</sup>	Type of acts <sup>b</sup>	Threat evaluation <sup>c</sup>	References
<i>Puccinia triticina</i>	Wheat	1950	USA	Soviet Union	BW2	++	Whitby 2002
		1950	Soviet Union	US	BW2	++	
<i>Puccinia graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	Wheat	2000	USA, Europe	Afghanistan (al-Qaeda)	BT1	+	Fletcher et al. 2006
		1950	USA	Soviet Union	BW2	++	Line and Griffith 2001
		1950	Korea	US	BW2	++	Whitby 2002
<i>Tilletia tritici</i>	Wheat	1980	Iran	Iraq	BW2	++	Whitby 2002
<i>Tilletia laevis</i>	Wheat	1980	Iran	Iraq	BW2	++	Whitby 2002
<i>Aspergillus</i> sp. (aflatoxin)	Wheat	1980	Iran	Iraq	BW2	++	Whitby 2002
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	Rice	1940	Japan	USA	BW2, BT1	+	Whitby 2002
<i>Magnaporthe grisea</i>	Rice	1940	Japan	USA	BW2	++	Madden and Wheelis 2003
		1940	Japan	USA	BW2	++	Madden and Wheelis 2003
		1940	China	Japan	BW2	++	
		1950	?	Soviet Union	BW2	+	
<i>Phytophthora infestans</i>	Potato	1940	Germany	France	BW2	++	Madden and Wheelis 2003
		1950	?	USA, Canada	BW2	++	Suffert 2003
		1950	?	Soviet Union	BW2	++	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Potato	1940	France	Germany	BW2	+	Madden and Wheelis 2003, Suffert 2003
<i>Puccinia melanocephala</i>	Sugarcane	1940	Germany	UK	BW2	+	
<i>Peronospora hyoscyami</i>	Tobacco	1970	Cuba	USA	BW2	-	Zilinskas 1999
f.sp. <i>tabacina</i>		1970	Cuba	USA	BW2	-	Zilinskas 1999
<i>Hemileia vastatrix</i>	Coffee	1950	Guatemala	USA	BW2	-	Suffert et al. 2008
<i>Crinipellis perniciososa</i>	Cacao	1980	Brazil	?	BW2	-	Junior 2006
<i>Diabrotica virgifera</i>	Maize	2000	Europe	?	BC3	-	Miller et al. 2005, Suffert et al. 2008
<i>Pleospora papaveracea</i>	Opium poppy	1990	Central Asia (Afghanistan)	UNDCP <sup>4</sup> , US, UK, Uzbekistan	BW3	++	Jelsma 2001
<i>Fusarium oxysporum</i>	Coca	2000	Andean Countries (Columbia)	US, Columbia	BW3	++	Jelsma 2001
f.sp. <i>erythroxyli</i>							
<i>Melampsora larici-populina</i>	Larch	1990	Europe (France, UK)	Eco-warriors	BT2	-	Suffert et al. 2008

<sup>a</sup> Countries considered as potential state-sponsors (or harboring perpetrators) known or suspected to have been involved in anti-crop programs or agroterrorist acts

<sup>b</sup> *BW* biowarfare, *BT* bioterrorism, *BC* biocrime (see Table 2)

<sup>c</sup> ++ Established threat (officially demonstrated), + probable threat (with limited evidence), - unverified, alleged threat (without significant evidence)

<sup>d</sup> United Nations International Drug Control Program

## Methods

We present here only a brief outline of the rationale of the methodology developed by Latxague et al. (2007). In a first step (1), a list of 50 candidate pathogens representing potential agroterrorist threats to the European agriculture and forest was compiled. This list was delivered to the European Commission at the end of the EU project “CropBioterror” and kept confidential for security reasons. It includes not only nonindigenous and quarantine pathogens, but also endemic pathogens with specific characteristics such as mycotoxinogenic ability, high potential of mutation and hybridization and records of highly pathogenic exotic strains. In a second step (2), three kinds of acts were considered (international, state-sponsored biowarfare; non-governmental bioterrorism; and individual or corporate biocrime) and their socio-economical consequences characterized by a “foresight” approach, which consists in carrying explorative studies developing views of future options, and then choosing between them (Major et al. 2001). In a third step (3), the standard pest risk analysis (PRA) scheme, originally used to decide whether an organism should be listed on quarantine lists (EPPO 2007), was dramatically modified into a risk evaluation scheme (RES) to account for the specificity of the agroterrorist threat.

Here, nine different, non-overlapping scenarios of agroterrorist attacks were developed considering a key pathogen taken from the aforementioned list of 50 candidate pathogens, combining the nature of the acts and their potential consequences. For each scenario, a plant pathologist (J. Pinon for forest pathogens, I. Sache for cereal pathogens, and F. Suffert for the other pathogens) puts himself in the shoes of the perpetrator: he defined a tangible target (Table 2), selected the most appropriate pathogen from the list, and wrote a four to six pages essay (hereafter, scenario) describing the imagined agroterrorist act and its expected consequences. Considered as foresight tools for materializing the agroterrorist threat, the scenarios were kept confidential for evident security reasons. The three sections of the scenarios: “Synopsis” (*modus operandi* and expected consequences), “Justification” (geopolitical context and perpetrators’ motivations), and “Feasibility” (perpetrators’ ability to succeed and technical constraints) were substantiated with information extracted from relevant published and gray literature (i.e., body of materials that cannot be found easily through conventional systems of publication, bibliographic control, or acquisition by subscription agents). The nine key pathogens are *Tilletia indica* (the wheat Karnal bunt fungus), *Phytophthora infestans* (the potato late blight Oomycete) and *Pleospora papaveracea* (a potential opium poppy mycoherbicidal fungus) as

**Table 2** A classification of agroterrorist acts and matching plant pathogens selected for the risk evaluation scheme (RES)

Type of scenario		Key pathogens <sup>a</sup>
<b>Biowarfare</b>		
BW1	Attack by a country on the agricultural sector of another country. The aim of the attacker is to block commercial imports of the targeted products and prevent their entry into its national market or to enhance its own exports.	<i>Tilletia indica</i> (Ti)
BW2	Attack by a country on the agricultural production of another country, in order to weaken the targeted country by reducing its domestic food supplies. This action could be undertaken before a military intervention or replace it.	<i>Phytophthora infestans</i> (Pi)
BW3	Use of biological agents by a country to eradicate illicit crops in another country (e.g., drug cultivation).	<i>Pleospora papaveracea</i> (Pp)
<b>Bioterrorism</b>		
BT1	Terrorist attack targeting food crops. The use of the agent may have negative impacts on human or animal health.	<i>Fusarium graminearum</i> (Fg)
BT2	Attack against crops or planted trees by ecowarriors who want to carry out a radical ecological action.	<i>Mycosphaerella populorum</i> (Mp)
BT3	Terrorist attack aimed at damaging a crop or a tree species that belongs to the national heritage.	<i>Ceratocystis fagacearum</i> (Cf)
<b>Biocrime</b>		
BC1	Attack by activists or farmers groups against the production of a competing country.	<i>Xylella fastidiosa</i> (Xf)
BC2	Isolated attack by an individual working in the crop protection field, looking for recognition, or revenge upon a colleague or an institution.	<i>Puccinia triticina</i> (Pt)
BC3	Deliberate use of a plant pathogen by a private company. The aim would be to render farmers dependant on specific cultivars or plant protection products.	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> (Pp)

<sup>a</sup> Extracted from the list of 50 candidate plant pathogens delivered to the European Commission in the final report of the “CropBioterror” EU project

biowarfare agents, *Fusarium graminearum* (a grain-infecting, toxinogenic fungus), *Mycosphaerella populorum* (the poplar stem canker fungus) and *Ceratocystis fagacearum* (the oak wilt fungus) as bioterrorism agents, and *Xylella fastidiosa* (the grapevine Pierce's disease bacterium), *Puccinia triticina* (the wheat brown rust fungus) and *Phakopsora pachyrhizi* (the soybean rust fungus) as biocrime agents. The nine scenarios involving these nine pathogens were then ranked for specific features and salient components consistently highlighted in the literature on agroterrorism: diversity of impacts (on production, trade, society), interest for perpetrator to claim the attack, availability of technical means (origin of the scientific information and inoculum), possible contamination by aircraft (considered as a classical *modus operandi*), and potential countermeasures (early detection, control measures available).

The RES, which includes five sections (importance of the target crop, ease of use of the pathogen, epidemic potential of the pathogen, obstacles to swift and effective response to an attack, and potential global or regional consequences of an attack), was applied to the nine key pathogens selected for building the scenarios. Each section was scored on the [0–10] integer scale, using a series of qualitative and quantitative intermediate criteria as an aid to the overall assessment, detailed by Latxague et al. (2007). Each of the sections of the RES was plotted on a circumradius of a pentagon. The resulting pentagonal star plot was designed as a single multidimensional representation of the risk profile. While features and components of the scenarios were considered as non-exhaustive results (because they are selected examples, completed for only a given plant pathogen), the risk profiles, which quantify the risk associated to a given pathogen without specifying the perpetrators' objectives, were considered as exhaustive results (because they are completed taking into account each of the nine potential scenarios). The most important outcome, as usable and understandable by other risk assessors, the risk profile was summarized by an aggregated risk ( $R$ ) computed for the stakeholders' sake. Such a score should be considered as a secondary product of the risk assessment rather than its main result. The aggregated risk ( $R$ ) was calculated as the ratio of the area delimited by the variables' star to the total area of the pentagonal envelop of the plot as follows:

$$R = \frac{1}{n} \left( \left( \sum_{i=1}^{n-1} r_i \times r_{i+1} \right) + r_n \times r_1 \right)$$

where  $r_i$  is the  $i$ th variable of the RES and  $n=5$ .

A critical feature of risk assessment is the evaluation the level of uncertainty encountered all along the assessment process. Communication of uncertainty contributes to

transparency and may also be used for further identification of research priorities. In a PRA process, the panel of experts shall identify uncertainties related to the potential of entry, establishment and economic impact of a pest (EPPO 2007). In the present analysis, the risk assessor described the sources of uncertainty and the effects that the uncertainties may have on the risk assessment for each key pathogen. The main sources of uncertainty are missing, incomplete, inconsistent, or conflicting data (according to the scientific publications used) and controversial data or subjectiveness of analysis (according to the risk assessor). The degree of uncertainty ( $u$ ) (scored on the [0–10] integer scale) was estimated in a final section of the RES.

## Results

The 50 candidate pathogens include 35 fungi and oomycetes, nine bacteria and phytoplasmas and six viruses. Staple food crops represent the majority of the targets (24), followed by forest trees (11), industrial and market crops (ten), and orchard trees (five; Latxague et al. 2007). In 32 out of the 50 cases, direct crop loss is expected following an attack, while trade would be disrupted in 38 out of the 50 cases. Wider, indirect socio-economical consequences, such as poisoning of animals and humans, heritage and environmental loss or psychological negative effect on populations, are expected in 28 cases. The "top list" of the pathogens expected to cause together direct crop loss, trade disruption and indirect socio-economical consequences includes 14 pathogens. The list, however, does not claim to rank the pathogens according to the threat they represent for agriculture and forestry, since it does not consider either the feasibility of the malevolent act nor the reaction capacity after such an act. In addition, the list has been restricted to European crops, while agroterrorist attacks on non-European crops, such as rubber tree, coffee or cocoa, could also cause indirect but significant socio-economical damages to Europe.

The specific features and salient components of the nine analyzed scenarios are highlighted in Table 3. An act of agroterrorism requires a series of human choices based on the expected economical and psychological effects of the act, its technical feasibility and the reaction capacities, which would eventually decide the success of the attack. In contrast, the "success" of an accidental or weather-driven introduction of a quarantine pathogen mostly depends on the reaction (here, interception, early detection, eradication) capacities of the bodies in charge of plant protection. A mixed situation occurred in the few documented or suspected cases of deliberate introductions of a pathogen that failed because the pathogen escaped while expected to remain confined. For example, the emergence of tobacco

**Table 3** Main features of nine examples of scenarios of agroterrorism (Table 2) scored using the qualitative scale: – low, + median, ++ high

Type of scenario (see Table 2)	BW1	BW2	BW3	BT1	BT2	BT3	BC1	BC2	BC3
Pathogen	<i>Ti</i>	<i>Pi</i>	<i>Pp</i>	<i>Fg</i>	<i>Mp</i>	<i>Cf</i>	<i>Xf</i>	<i>Pt</i>	<i>Pp</i>
Impact on:									
Production <sup>a</sup>	–	+	+	–	+	+	++	–	++
Trade <sup>b</sup>	++	–	–	–	+	+	–	–	–
Society <sup>c</sup>	–	+	–	++	+	++	+	–	+
Interest for perpetrator to claim the attack	–	–	–	+	+	+	–	–	–
Technical means									
Information on the Internet	–	–	–	+	++	+	–	–	–
Information from scientific publications (academic knowledge)	–	+	+	+	–	+	–	+	+
Strains collected from mycotheca	+	+	+	+	–	–	+	+	–
Contamination by aircraft	+	–	+	–	–	–	–	–	–
Probable countermeasures									
Early detection	+	–	+	+	+	–	+	–	+
Control measures available	+	+	–	+	–	+	+	+	–

<sup>a</sup> Yield losses<sup>b</sup> Trade affected by phytosanitary measures such as import restrictions or embargoes<sup>c</sup> Consequences on animal and human health, heritage and environment losses, or panic and psychological effects on civilian populations

blue mold in Europe, caused by the oomycete *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*, following its importation for research purpose in the United Kingdom and its unnoticed escape from greenhouses (Klinkowski 1961), can be used to explore or evaluate what happens in case of a successful agroterrorist attack. A key feature is the perpetrator's choice of the target crop and of the weapon pathogen, which will strongly depend on the expected effect of the attack. Instead of selecting the potentially most dangerous pathogens (the aforementioned "top list"), we have attempted to consider the perpetrator's point of view first. Table 3 shows that the nine scenarios represent a combination of different levels of direct crop loss, trade disruption and indirect socio-economical consequences. In these scenarios, the extreme situations are bioterrorism involving a quarantine pathogen targeting forests (BT3), with high potential level of direct crop loss, trade disruption and socio-economical consequences vs. biocrime involving individual revenge (BC2), with limited crop loss if any, no trade disruption and no significant socio-economical consequences (unless the epidemic runs out of control beyond the perpetrator's expectations). Pathogens with low effect on crop yield could be use for agroterrorism, provided they might disrupt trade via quarantine establishment (BW1) or produce toxins threatening human and animal health (BT1).

The main practical problem for the perpetrator is to gather the scientific and, mostly, technical information required for a successful act. For example, analyzing the black rust research program developed in the USA during

the Cold War, Line and Griffith (2001) have pointed out that the dissemination of the pathogen was not the most critical problem and was not worth the effort made to set up innovative tools such as "feather bombs" or birds dusted with spores. Being able to increase and stockpile the inoculum in amounts required for a successful attack, which is usually not known, can be more difficult, as well as obtaining the inoculum from a public or private strain depository. Technical information on increase and storage of viable inoculum is, in most case, widely available on the Internet (with a reliability sometimes difficult to assess) and in scientific publications available in general or specialized libraries. Therefore, there are successive critical steps in the acquisition of knowledge; failure in attaining one of these steps would result in the abortion of the whole agroterrorist attack. In the state-sponsored biowarfare scenarios (BW) and corporate biocrime scenarios (BC3), there are no limitations of that kind. Other forms of malevolent acts, involving either individuals of terrorist groups, will require either the cooperation of scientists (scenario BC2 has a depraved scientist as the perpetrator) or the phishing of information in a roundabout way, and a certain level of laboratory and field skill. Agroterrorism has often been presented as easy (Rogers et al. 1999; Wheelis et al. 2002), but the scenario analysis led us to conclude that the success of a malevolent act might be much more uncertain than believed. Weather-driven or accidental introductions of quarantine plant-pathogens have such strong consequences on production and trade that is it often implicitly considered that the crisis result from a single, successful introduction,



without considering the number of “attempts” required for a successful establishment of the pathogen.

The defeat of an agroterrorist attack seems to depend on the early detection of the pathogen and setup of countermeasures, as is the case for the eradication of quarantine pathogens (Schaad et al. 2003). Here again, this has to be modulated according to the perpetrators’ expectations. A mass, state-sponsored biowarfare attack (BW1-3) should operate on a large scale, with several inoculation sites or an inundative approach in order to render ineffective the countermeasure system set up by the target country. Biocrime acts (BC1-3), operating on smaller scale, would be expected to avoid early detection and immediate eradication of the pathogen. Bioterrorist attacks (BT1-3) in contrast, should be “advertised” by the perpetrators in order to increase psychological confusion and disorganise the countermeasure system; such acts will probably target crops for which protection measures against the pathogen are difficult to implement or inefficient in order to even increase the perception of the threat.

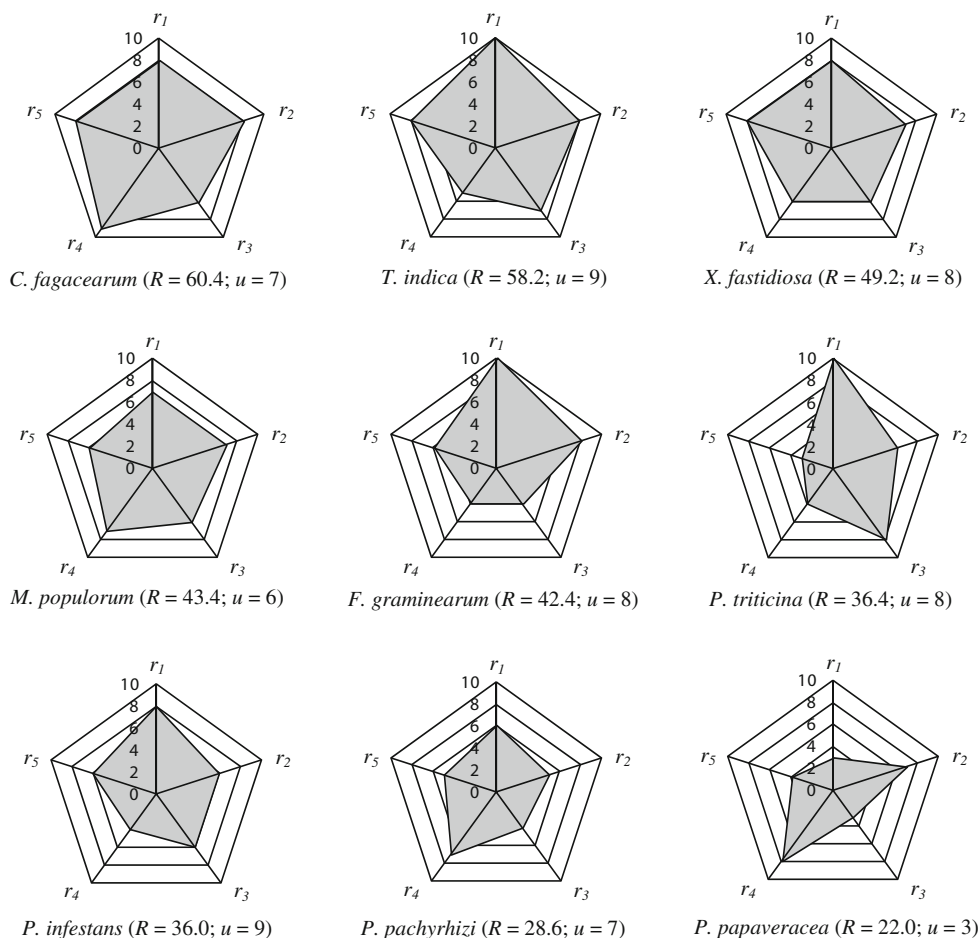
The risk profiles set up for the nine selected pathogens are presented as pentagonal star plots, together with the risk aggregated scores, on Fig. 1. For example, the risk

aggregated score  $R=36.0$  assigned to *P. infestans* was calculated as  $R=(r_1 \times r_2 + r_2 \times r_3 + r_3 \times r_4 + r_4 \times r_5 + r_5 \times r_1)/5$ , with  $r_1=8$ ,  $r_2=6$ ,  $r_3=6$ ,  $r_4=4$ , and  $r_5=6$ . The highest aggregated risk score was assigned to *C. fagacearum* ( $R=60.4$ ) while the lowest one was assigned to *P. papaveracea* ( $R=22.0$ ). Regarding the individual components of the risk profile,  $r_1$  (importance of the target crop) was maximal for wheat and maize and minimal for soybean and poppy (for Europe);  $r_2$  (ease of use of the pathogen) was higher for the saprotrophic pathogens, in most cases easy to grow on artificial medium, than for the biotrophic pathogens, in most cases not cultivable on artificial medium;  $r_3$  (epidemiological potential) was maximal for airborne pathogens already established in Europe and adapted to the local environment and minimal for soilborne pathogens and exotic pathogens expected not to adapt easily to the European weather conditions;  $r_4$  (obstacles to swift and effective response to an attack) was maximal for pathogens unfamiliar to plant inspection services because they are either not present on the European territory yet or not accessible to quick detection methods (e.g., fungi attacking trees in mountainous, isolated areas); and  $r_5$  (potential

**Fig. 1** Risk profile, completed by risk aggregated score and degree of uncertainty, as the result of the risk evaluation scheme (RES) for the nine selected plant pathogens. The five sections (scored on the [0–10] integer scale) of the RES are: importance of the target crop ( $r_1$ ), ease of use of the pathogen ( $r_2$ ), epidemic potential of the pathogen ( $r_3$ ), obstacles to swift and effective response ( $r_4$ ), potential global or regional consequences ( $r_5$ ). The risk aggregated score  $R$  is given by the equation

$$R = \frac{1}{n} \left( \left( \sum_{i=1}^{n-1} r_i \times r_{i+1} \right) + r_n \times r_1 \right)$$

with  $n=5$ . The degree of uncertainty  $u$  (scored on the [0–10] integer scale) is an empirical assessment of the quality and quantity of scientific information available for completing the RES



global or regional consequences of an attack) was maximal for quarantine or regulated pathogens.

## Discussion

Grown on large and often patchy areas, crops and forests cannot be entirely monitored and protected. Academic scientists and government stakeholders have started to reconsider the vulnerability of agro-ecosystems to plant pathogens used as anti-crop weapons because of the socio-economical significance of crops and forests (Rogers et al. 1999; Foxwell 2001; Madden and Wheelis 2003; Khetarpal and Gupta 2007). Crop biosecurity has become a subject of widespread concern, capitalized on the recent focus on emerging plant diseases (Anderson et al. 2004) and the world-wide, increasing interest in PRA for commodity trade regulation (Schrader and Unger 2003). Not specifically addressed until 1997 (Suffert et al. 2008), the agroterrorism issue was considered as even more critical in the USA after 2001. The 2002 US Agricultural Bioterrorism Protection Act had a worldwide impact on foreign operators that exported food or feed to the US: crop biosecurity has provided a new field for cooperation and standard practices at a regional scale, but agroterrorism prevention has also become an indirect potential obstacle to trade at the transnational level. Given this context, the constitution of a new bio-geopolitical order, of which agroterrorism is a component, is based on scientific discourses that incorporate economic and diplomatic components to phytosanitary measures and PRA schemes (Suffert et al. 2008); this parallels the incorporation of the specificities of the European agriculture between 1878 and 1929, into the international phytopathological conventions (Castonguay 2005). The lack of a consensual definition of agroterrorism, probably due to the recent interest in this topic, explains why the agroterrorist threat for European crops and forests was not exhaustively assessed by appropriate methods. Unverified allegations (Table 1) and alarmist papers (Rogers et al. 1999; Wheelis et al. 2002) did not favor the recognition of agroterrorism as the real threat which we believe it is. More controversially, we also believe that agroterrorism was sometimes treated as a buzzword in scientific literature since the beginning of the 2000s, and used by some crop protection scientists for the sake of fund-raising (Schwägerl 2005).

Risk assessment methods available in the literature, derived from population dynamic approaches (Madden and Van den Bosch 2002; Nutter 2004) are based on published epidemiological knowledge either on expert knowledge, regarding a specific crop (e.g., potato; Schaad et al. 2006), a pathogen group, or a research field (e.g., bacteriology; Young et al. 2008). Madden and Wheelis

(2003) have designed a probabilistic method allowing, for a given plant pathogen, the computation of a global risk index. The index is the product of the probabilities of single events required for a successful agroterrorist attack (pathogen introduction, disease establishment, spread, damage and lack of control measures). Schaad et al. (2006) have applied a method based on an analytic hierarchy process to eight potato pathogens. Both approaches provide quantitative information (a global risk index), rather than qualitative information (a risk profile). In the probabilistic method, intermediate probabilities (*A*, probability that the pathogen will be deliberately introduced; *E*, probability of initial disease establishment; *S*, probability of spread from the initial established focus of disease; *H*, probability of the introduced disease causing major economic damage; *C*, probability of practically controlling or containing the disease) (Madden and Wheelis 2003) are assessed and multiplied to build the risk index. However, the product of probabilities, among whom some are probably extremely low (e.g., *A*), is not informative nor educational for risk assessment in general, because this does not show which components are high and which are low. The analytic hierarchy process is a general methodological approach for eliciting information from experts and is based on a set of prioritized and qualitatively assessed (high, mean, low) criteria (Schaad et al. 2006). While emphasis was put on the overall expected economic consequences of agroterrorist acts, the specific rating system did not consider the perpetrators' objectives, which precisely determine the nature of the threat. The proposed risk index did not explicitly enough take into account indirect economical consequences (trade disruption, scarcity), which are a specific feature of the agroterrorist issue (Turvey et al. 2003; Waage and Mumford 2007). In spite of the involvement of pathogens' experts, this method also appears much more as a theoretical exercise, of course very interesting, than a tool directly transferable to stakeholders, even if the rating system proposed by Schaad et al. (2006) was used once by banana growers (Ploetz 2008). In such approaches, the risk may be overestimated for a plant pathogen well-known to many experts in the assessment group.

The principle of transparency requires that every user of a risk assessment method can understand and reproduce the process, check the data used, adapt the method to specific situations, and re-evaluate previous outputs. Thus, the risk profile should be consistently substantiated and not purely based on expert judgment. Based on the scientific knowledge contained in ten scientific papers (if available), our method can be applied by non-experts on particular diseases or crops, thus authorizing a comparison between crops or pathogens with limited bias, on the basis on a complete threat characterization taking into account the

perpetrators' objectives and expected consequences. Additionally, we should note that scientific information on a well-known pathogen will be probably more accessible to perpetrators, which may increase the risk, while the potential of early detection of the pathogen and setup of countermeasures will be higher, which may decrease the risk. The method generates a risk aggregated score together with a risk profile, which are necessary to understand the magnitude of the risk and to propose the most suitable countermeasures.

Because no anticrop agroterrorist act involving plant pathogens (excluding *de facto* human food poisoning) has ever been demonstrated, a prediction of the nature, the target crop, the pathogen introduced, and the perpetrator of "the most likely act" targeting crops is impossible. Our foresight approach was aimed at exploring the diversity of the potential scenarios, which are descriptions of possible, future issues. They consist of a list of conditions and assumptions, pertaining to potential attacks, and a list of rules. Used to derive the consequences of known and assumed future conditions, the rules are more or less formalized. Therefore the only subjective aspect of scenario studies is the choice of rules and conditions. While these particular choices can be questioned, the general validity of the deductive process is much less questionable. Previous assessment methods failed to consider the multiple facets of the risk represented by a given pathogen. Focused on regulated pathogens and relevant eradication measures, and on the direct crop loss, these methods did not explicitly take into account indirect economical consequences.

Forest and less anthropized (natural) ecosystems biosecurity deserves consideration as a full-fledged issue in a lot of countries (Cochrane and Haslett 2002). Mass destruction of food crops by the introduction of an exotic plant pathogen seems highly improbable in most advanced industrialised countries, where malevolent use of plant pathogens would more likely have a high social and economic impact. Some plant pathogenic fungi produce mycotoxins, which may potentially affect the human or cattle health. According to scenario BW1, these pathogens should be considered as a non-negligible threat for Europe, although most of them are already a recurrent cause of disease, such as *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* on wheat, and *Penicillium expansum* on apples. Nevertheless, Russell and Paterson (2006) did not consider mycotoxin-producing fungi as serious anti-crop agents because of the low production of mycotoxins and the availability of detection methods. Based on biotechnical considerations, this opinion disregarded the potential psychological effects of a malevolent contamination of food on the population. A deliberate introduction of a plant pathogen may cause significant public panic and a loss of confidence in a segment or the whole of the food chain,

seriously affecting niche sectors of European agriculture (e.g., organic farming). Additionally, a perpetrator with limited technical and scientific skills would increase the probability of success of his act by using simple intimidation or blackmail rather than attempting to contaminate his target: fear would have sufficient repercussions on trade and economy (Turvey et al. 2003; Waage and Mumford 2007).

When presenting here the results of a risk assessment of agroterrorism for Europe, we are aware that the consequences of assembling scientific knowledge and activities in this field of research need to be carefully considered, not only because research facilities are vulnerable to attack, but also because they could constitute entry points for perpetrators. While we may wonder whether the risk of agroterrorism has not increased over the last decade only because the problem has been raised, we disagree with Young et al. (2008) who appear to look at agroterrorism narrowly (causing "terror" *sensu stricto*). The capacity of European countries to prevent an act of agroterrorism requires the involvement of all parties interested in crop biosecurity, who are expected to consider the multiplicity of threats and to collaborate to implement countermeasures if required. This could include the support of the scientific community to additional regulations dealing with candidate pathogens. However we agree here with Young et al. (2008) that regulation in terms of national security may not be the most relevant approach to control pathogens fulfilling the proposed criteria for a biological weapon. Certainly failing to recognize the potential threat and being more concerned about maintaining complete freedom of research could result in major problems. In case of use of plant pathogen as anticrop weapon, an efficient response strategy would require to identify the source, the introduction method and time, and the perpetrators. Use of modern molecular-based detection technologies for early detection and identification of plant pathogens (Schaad et al. 2003) improves our ability to flag the emergence of "suspicious" epidemics (Waage and Mumford 2007; Suffert et al. 2008). We approve notably the establishment of a nationwide diagnostic network by the USA (Stack et al. 2006). Classic epidemiological methodology needs to be coupled with forensics, which is the application of scientific methods in the investigation of possible violations of the law, where scientific knowledge and technology provide evidence in both criminal and civil matters (Fletcher et al. 2006). Nevertheless, in two thirds of our scenarios, perpetrators would conceal their action, while claiming it would be efficient in one third of cases (Table 3). In this second case, a prevention strategy and countermeasures based exclusively on "early detection" would be inopportune and ineffective regards to the specific features of the scenario.



Every country member of the World Trade Organisation (WTO) has the right to impose import restrictions to protect the health of crops and forests, as long as no unfair discrimination or hidden trade barriers are created, and can decide which level of protection is appropriate for itself. Under the Sanitary and Phytosanitary Agreement (WTO 1995), import restrictions should be “technically” justified (i.e., “justified on the basis of conclusions reached by using an appropriate pest risk analysis or, where applicable, another comparable examination and evaluation of available scientific information”; IPPC 2004; Heather and Hallman 2008). Higher standards than those of the relevant international organisations are permissible only if justified “scientifically” according to an objective risk analysis. Precautionary measures lacking objective rationale should be allowed only temporarily, in emergency cases. In this context, we cannot exclude that a country, in bad faith, could consider that the probability of a “deliberate introduction” is temporarily high and that “agroterrorism” is a realistic pathogen entrance pathway, and use this threat as a technical justification to impose protectionist measures. It is also conceivable that a country clandestinely introduces a quarantine pathogen in a lot imported from another country to justify import restrictions and to protect its indigenous market. The global context of food crisis and the recurring difficulties in WTO negotiations caused by disagreement on rules governing agricultural trade make plausible the biogeopolitical justification of some BW scenarios.

The community of plant pathologists seems to be divided, between, on the one hand, those considering the agroterrorist threat as doubtful (Young et al. 2008), and, on the other hand, those claiming that deliberate introduction of plant pathogens may constitute a threat serious enough to justify a scientific risk assessment (Madden and Wheelis 2003; Schaad et al. 2006; Suffert et al. 2008). The perception as to what a nation might consider an international threat, and what proper responses to it may be, is strongly influenced by cultural and political attitudes and by the historical perspective of that country (Suffert et al. 2008). Our opinion is that the level of risk is probably intermediate, but clearly more complex in its nature than perceived by some plant pathologists: agroterrorism is a real threat, potentially more important by the consequences of the securitization of the concept (Buzan et al. 1998; Waage and Mumford 2007), which could imply disruption of regulations and trade, as well as set up of new trade barriers, than by direct damaging consequences on crops. Whatever the opinion that scientists and stakeholders have about the “reality” of the threat, their reaction must be careful: risk assessment methods should be appropriate (transparent and reproducible) and scientific activity in Europe should not be

inhibited by specific regulations (censure of scientific knowledge, restriction of exchanges of scientific material and scientists) (Pasquali 2006; Young et al. 2008).

**Acknowledgments** This work has been supported by the European Commission (6th PCRD grant, contract CT-2004-6403) in the framework of the EU project “CropBioterror”. We thank Jean Pinon and Marc Barbier for their scientific contribution. The content of the present article only reflects the opinion of its authors, and not the opinions of either the European Commission or INRA.

## References

- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19(10):535–544
- Brasier CM (2008) The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol* 57 (5):792–808
- Buzan B, Wæver O, de Wilde J (1998) Security: a new framework for analysis. Lynne Rienner, Boulder, UK
- Byrne R (2007) Horizon scanning rural crime—agroterrorism an emerging threat to UK agriculture? *International Journal of Rural Crime* 1:62–78
- Castonguay S (2005) Biorégionalisme, commerce agricole et propagation des insectes nuisibles et des maladies végétales : les conventions internationales phytopathologiques. *Ruralia* 16/17:137–152
- Cochrane H, Haslett D (2002) Deliberate release—what are the risks? *NZ J For* 47(2):16–17
- Connick WJ, Daigle DJ, Pepperman AB, Hebbar KP, Lumsden RD, Anderson TW, Sands DC (1998) Preparation of stable, granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. *Biol Control* 13(2):79–84
- Cupp OS, Walker DE, Hillison J (2004) Agroterrorism in the US: key security challenge for the 21st century. *Biosecurity and Bio-terrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 2(2):97–105
- Desprez-Loustau ML, Robin C, Buée M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F et al (2007) The fungal dimension of biological invasions. *Trends Ecol Evol* 22(9):472–480
- EPPO (2007) PM 5/3 (3) Decision-support scheme for quarantine pests. [http://www.eppo.org/QUARANTINE/Pest\\_Risk\\_Analysis/PRA\\_intro.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Pest_Risk_Analysis/PRA_intro.htm). Accessed 23 January 2008
- Fletcher J, Bender C, Budowle B, Cobb WT, Gold SE, Ishimaru CA et al (2006) Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2):450–471
- Foxwell J (2001) Current trends in agroterrorism (antilivestock, anticrop, and antisoil bioagricultural terrorism) and their potential impact on food security. *Stud Confl Terror* 24:107–129
- Gullino ML, Fletcher J, Gamliel A, Stack J (2008) Crop biosecurity: assuring our global food supply. Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Heather NW, Hallman GJ (2008) Agricultural warfare and bioterrorism using invasive species. In: Heather NW, Hallman GJ (eds) *Pest management and phytosanitary trade barriers*. CABI, Wallingford, UK, pp 1–13
- IPPC (2004) Pest risk analysis for quarantine pests, including analysis of environmental risks and living modified organisms. International Standard for Phytosanitary Measures no. 11. <ftp://ftp.fao.org>

[org/docrep/fao/008/y5874e/y5874e00.pdf](http://org/docrep/fao/008/y5874e/y5874e00.pdf). Accessed 23 January 2008

- Jelsma M (2001) Vicious circle: the chemical and biological war on drugs. <http://www.tni.org/archives/jelsma/viciouscircle-e.pdf>. Accessed 23 January 2008
- Junior P (2006) Terrorismo biológico. *Veja* 1961:60–63
- Khetarpal RK, Gupta K (2007) Plant biosecurity in India—status and strategy. *Asian Biotechnology and Development Review* 9 (2):83–107
- Klinkowski M (1961) Blue mould (*Peronospora tabacina* Adam). *Dtsch Landwirtschaft* 12:229–239
- Latxague E, Sache I, Pinon J, Andrivon D, Barbier M, Suffert F (2007) A methodology for assessing the risk posed by the deliberate and harmful use of plant pathogens in Europe. *EPPO Bull* 37(2):427–435
- Line RF, Griffith CS (2001) Research on the epidemiology of stem rust of wheat during the Cold War. In: Peterson PD (ed) *Stem rust of wheat: from ancient enemy to modern foe*. APS, St. Paul, MN, USA, pp 83–118
- Madden LV, Van Den Bosch F (2002) A population-dynamics approach to assess the threat of plant pathogens as biological weapons against annual crops. *BioScience* 52(1):65–74
- Madden LV, Wheelis M (2003) The threat of plant pathogens as weapons against US crops. *Annu Rev Phytopathol* 41:155–176
- Major E, Asch D, Cordey-Hayes M (2001) Foresight as a core competence. *Futures* 33(2):91–107
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S et al (2005) Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* 310(5750):992
- Nutter FW (2004) Crop biosecurity and safety of grain based foods. International Quality Grains Conference Proceedings, 19–22 July 2004, Indianapolis, USA. <http://cobweb.ecn.purdue.edu/~grainlab/IQGCI/proc/pdf/nutter.pdf>. Accessed 23 January 2008
- O'Neill NR, Jennings JC, Bailey BA, Farr DF (2000) *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, destructive seedborne pathogens and potential mycoherbicides for *Papaver somniferum*. *Phytopathology* 90(7):691–698
- Pasquali M (2006) Biosecurity research and agroterrorism: are there ethical issues at stake? In: Kaiser M, Lien ME (eds) *Ethics and the politics of food*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp 203–206
- Ploetz RC (2008) Assessing threats that are posed by destructive banana pathogens. *Acta Horticulturae* (in press). [http://www.aebe.ec/data/files/DocumentosPDF/Capacitacion/2008/Ploetz\\_sketch\\_Guayaquil\\_2008.pdf](http://www.aebe.ec/data/files/DocumentosPDF/Capacitacion/2008/Ploetz_sketch_Guayaquil_2008.pdf)
- Russell R, Paterson M (2006) Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycol Res* 110(9):1003–1010
- Rogers P, Whitby S, Dando M (1999) Biological warfare against crops. *Sci Am* 280(6):70–75
- Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD (2003) Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu Rev Phytopathol* 41:305–324
- Schaad NW, Abrams J, Madden LV, Frederick RD, Luster DG, Damsteegt VD et al (2006) An assessment model for rating high-threat crop pathogens. *Phytopathology* 96(6):616–621
- Schrader G, Unger JG (2003) Plant quarantine as a measure against invasive alien species: the framework of the International Plant Protection Convention and the plant health regulations in the European Union. *Biological Invasions* 5(4):357–364
- Schwägerl C (2005) La recherche sur le bioterrorisme ne mérite pas tant d'argent. *Courrier International* 752:56
- Stack J, Cardwell K, Hammerschmidt R, Byrne J, Loria R, Snover-Clift K et al (2006) The National Plant Diagnostic Network. *Plant Dis* 90(2):128–136
- Suffert F (2003) L'utilisation volontaire d'agents phytopathogènes contre les cultures. L'agroterrorisme et ses conséquences sur notre approche de la lutte contre les maladies des plantes. *Phytoma* 563:8–12
- Suffert F, Barbier M, Sache I, Latxague E (2008) Biosécurité des cultures et agroterrorisme. Une menace, des questions scientifiques et une opportunité : réactiver un dispositif d'épidémiologie. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* 56:67–86
- Turvey CG, Mafoua E, Schilling B, Onyango B (2003) Economics, hysteresis and agroterrorism. Canadian Agricultural Economics Society Annual Meeting, July 27–30, 2003, Montreal, Canada. <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/18186/1/wp030011.pdf>. Accessed 23 January 2008
- Waage JK, Mumford JD (2007) Agricultural biosecurity. *Philos Trans R Soc Lond B* 363:863–876
- Wheelis M, Casagrande R, Madden LV (2002) Biological attack on agriculture: low-tech, high-impact bioterrorism. *Bioscience* 52 (7):569–576
- Whitby S (2002) *Biological warfare against crops*. Palgrave, Basingstoke, UK
- WTO (1995) The WTO agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures. SPS Agreement. [http://www.wto.org/english/tratop\\_e/sps\\_e/spsagr\\_e.htm](http://www.wto.org/english/tratop_e/sps_e/spsagr_e.htm). Accessed 23 January 2008
- Young JM, Allen C, Coutinho T, Denny T, Elphinstone J, Fegan M et al (2008) Plant-pathogenic bacteria as biological weapons—real threats? *Phytopathology* 98(10):1060–1065
- Zilinskas RA (1999) Cuban allegations of biological warfare by the United States: assessing the evidence. *CRC Crit Rev Microbiol* 25(3):173–227



**Dr. Frédéric Suffert** is a research plant pathologist for the French National Institute of Agricultural Research (INRA). He received his M.S. in crop protection in 1999 and a Ph.D. in plant pathology in 2006 from the National High School for Agronomy, Rennes, France. From 2000 to 2007 he conducted research at INRA Rennes on the epidemiology of soil borne diseases with emphasis on cavity spot of carrot. Additionally, he was co-chairman of the European Concerted Action Project, “CropBioterror”, a crop biosecurity project, and followed a course at the Institute of Higher Studies on National Defense in 2006. Since 2007 he has been working at INRA Versailles-Grignon on the quantitative epidemiology of leaf blotch of wheat, caused by *Mycosphaerella graminicola*, with particular reference to the spread of primary inoculum.



**Émilie Latxague** has a scientific background in plant protection and environment. In 2005, after graduating from the French National High School for Agronomy in Rennes, she was involved in the European Concerted Action Project, “CropBioterror”, and participated in the development of a methodology to assess the risks associated with the deliberate use of crop pathogens. She now belongs to a second European Project (ENDURE Network of Excellence), as the project manager of a foresight study envisaging contrasting scenarios for crop protection in Europe in 2030. This involves travel throughout Europe in order to discuss and identify research priorities for the future in collaboration with several European research institutes.



**Dr. Ivan Sache** is a research plant pathologist for the French National Institute of Agricultural Research (INRA). He received his M.S. in 1986 and his Ph.D. in 1991, both in plant pathology, from the National Agricultural Institute of Paris-Grignon (today, Agro-ParisTech). His research interests are quantitative epidemiology and modeling of airborne plant diseases, mainly those of cereals. He was co-chairman of an INRA multidisciplinary programme on emerging diseases in plants, animals and humans from 2003 to 2006 and served as the President of the French Society of Phytopathology from 2004 to 2007.

## Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe

F. Suffert\* and I. Sache

INRA, UR1290 BIOGER-CPP, F-78850 Thiverval Grignon, France

The contribution of wheat debris to the early stages of septoria leaf blotch epidemics was assessed in a 3-year field experiment. First lesions were detected very early (December) in the case of an early sowing (mid-October), showing that the first contamination could occur as soon as the seedlings emerge. The tested debris management options (chopped debris, removal of debris followed by tillage, or tillage in absence of debris) had a strong effect, although transient, on the epidemic dynamic: the more debris present on the soil surface, the more severe initial disease was. The magnitude of differences between treatments differed substantially between years. The relative production of pycnidiospores and ascospores was measured on the chopped debris. Peaks in pycnidiospore and ascospore production coincided in October–November. Both types of spores can be involved as primary inoculum in north-west European conditions. The local amount of pycnidiospores available on debris in the field, estimated per square metre, was 1000-fold the local ascospore production. Moreover, inoculum production was quantified on debris exposed to different environmental conditions. Autumnal conditions, characterized by moderate temperature with alternating wet and dry periods, were favourable for the production of both pycnidiospores and ascospores, as shown by the high inoculum production on debris exposed to field or outdoor conditions. By late autumn, the canopy became the most important source of pycnidiospores, and this period, characterized by the decreasing role of debris as a local source of inoculum compared to distant potential sources, can be considered as the end of the early epidemic stages.

**Keywords:** ascospore, debris, *Mycosphaerella graminicola*, primary inoculum, pycnidiospore, *Triticum aestivum*

### Introduction

Septoria leaf blotch, caused by *Mycosphaerella graminicola*, is one of the most damaging diseases of winter wheat worldwide. In less intensive wheat cropping systems, more and more popular in Western Europe, perspectives of disease management mostly rely on fungicide timing, cultivar choice and sowing date (Jordan & Hutcheon, 1999). Wheat debris management was identified as a factor controlling *M. graminicola* primary inoculum (Eyal *et al.*, 1987); accordingly, direct drilling and minimum tillage must influence disease development. Jordan & Allen (1984) showed that the development of barley net blotch (caused by *Pyrenophora teres*) was delayed and limited in ploughed areas compared to direct-drilled areas. Eyespot in wheat (caused by *Pseudocercospora herpotrichoides*) was decreased by incorporating straw (Jenkyn *et al.*, 2001). Such an effect was not so clearly, or only marginally, reported in septoria leaf blotch (Suffert

*et al.*, 2011). In some studies (e.g. Schuh, 1990), disease was assessed late in the season when, most probably, several infection cycles had already occurred; it can be assumed that the potential effect of crop debris, acting as a local source of primary inoculum, was blurred by the massive input of pycnidiospores acting as a local source of secondary inoculum. The build-up and overseasoning of inoculum involves various fungal (ascospores, pycnidiospores, mycelium) and plant (wheat seeds, stubble and debris; wheat volunteers; other grasses) material, as reviewed by Suffert *et al.* (2011). Among the potential mechanisms explaining year-to-year disease transmission and the onset of epidemics, primary infection by wind-blown ascospores released from pseudothecia borne by wheat debris is the most significant, assuming that local inoculum can be neglected (Sanderson & Hampton, 1978; Scott *et al.*, 1988; Hunter *et al.*, 1999; Eriksen & Munk, 2003). Shaw & Royle (1989) investigated the quantitative contribution of local and distant sources of inoculum using wheat seedlings as a biological trap. When protected from airborne inoculum (enclosed in tents), seedlings placed in a field previously sown with wheat (thus exposed to local inoculum) exhibited a much lower disease severity than seedlings left unprotected; the same result was obtained with seedlings kept away from

\*E-mail: fsuffert@grignon.inra.fr



local inoculum. Endogenous sources of inoculum for a given plot will also act as exogenous sources for neighbouring plots; no study appears to have considered explicitly that distant inoculum (ascospores) can be more abundant than local inoculum at the plot scale after a certain date. Some studies suggested that debris can also release a significant amount of pycnidiospores acting as local primary inoculum, especially in dry areas or where the sexual stage was not detected (Brokenshire, 1975; Djerbi, 1977; Obaedo *et al.*, 1999; Abrinbana *et al.*, 2010). The data collected by Eriksen & Munk (2003) suggested that during spring and to the end of June, only a few ascospores were produced in the crop and the majority of inoculum present during this period was pycnidiospores. No other studies have estimated the relative contribution of ascospores and pycnidiospores from local debris to first lesions.

The goal of the present study was to assess the contribution of crop debris and the relative importance of different types of inoculum to the early stages of septoria leaf blotch epidemics. In a 3-year field experiment, disease development was quantified as soon as wheat seedlings emerged and during the following winter period. The experimental treatments involved three debris management options: chopped debris, removed debris, or absence of debris. Production of ascospores and pycnidiospores was further quantified on debris exposed to different environmental conditions.

## Materials and methods

### Experimental design

A field experiment was carried out from 2007 to 2010 at the Grignon experimental station (Yvelines, France; 48°51'N, 1°58'E, 130 m a.s.l., 600 mm annual 30-year average rainfall). The soil type is an Orthic Luvisol with 250 g clay, 550 g silt and 200 g sand kg<sup>-1</sup> in the topsoil (total CaCO<sub>3</sub>: 21%; organic matter: 30 g kg<sup>-1</sup>, total nitrogen: 1.6 g kg<sup>-1</sup>, pH H<sub>2</sub>O: 8.2). A 40- × 100-m plot, cropped with winter wheat during the 2006–07 season, was divided after harvest into two contiguous, 20- × 100-m subplots (Table 1). In the first subplot (CD),

straw was chopped at harvest (mid-July) and left on the soil surface, and debris were chopped and partially buried to a depth of 10 cm with a disc harrow 6 weeks later (late September). In the second subplot (RD), straw was removed at harvest (mid-July), debris were chopped as in the first subplot then buried a second time and ploughed to a depth of 15–20 cm using a chisel cultivator just before subsequent wheat sowing (mid-October). During the second (2008–09) and third (2009–10) seasons, an additional plot previously cultivated with either maize (M) in 2008–09 or oilseed rape (OR) in 2009–10 was sown with wheat and used as a control plot, that is without wheat debris. Wheat cv. Soissons, moderately susceptible to septoria leaf blotch (resistance rating 5) was sown in mid-October (early in the season, wheat being generally sown in the area from the end of October to mid-November) at a sowing density of 225 seeds m<sup>-2</sup> with an Amazone seed drill. The wheat crop emerged 10–15 days after sowing (Table 1). Subsequent crop management was performed according to locally recommended practices, except that no fungicide was applied.

There were no noticeable differences in crop development, plant vigour and size between treatments. Wheat density, estimated on 10 December 2009 as 200 plants m<sup>-2</sup> in CD, 198 plants m<sup>-2</sup> in RD, and 213 plants m<sup>-2</sup> in C, was considered stable throughout the cropping season. During the three seasons, powdery mildew (*Blumeria graminis*) and leaf rust (*Puccinia triticina*) were hardly observed in the plots; tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) severely attacked the crop in late 2009–10.

An automatic weather station (Enerco 516i; Cimel Electronique) located *c.* 500 m from the plots recorded hourly air temperature at a height of 2 m, and rainfall. The thermal time *t*, expressed in degree-days, was calculated, starting from the sowing date, by summing the daily mean air temperature using a 0°C base temperature.

### Disease assessment

Disease was assessed at six sampling dates in 2007–08, 10 sampling dates in 2008–09, and 13 sampling dates in 2009–10, twice or thrice monthly at the beginning of the epidemics (autumn and winter) and thereafter monthly

**Table 1** Synopsis of the field experiment: previous crop, wheat debris management and tillage practices during the three seasons

Debris management <sup>a</sup>	2007–08		2008–09			2009–10		
	RD	CD	RD	CD	M	RD	CD	OR
Preceding crop (year <i>n</i> – 1)	Wheat	Wheat	Wheat	Wheat	Maize	Wheat	Wheat	Oilseed rape
Ante-preceding crop (year <i>n</i> – 2)	Maize	Maize	Wheat	Wheat	Barley	Wheat	Wheat	Barley
Harvest	19 July	19 July	24 July	24 July	6 Oct.	28 July	28 July	17 July
Straw chopped and left on the soil	–	19 July	–	24 July	–	–	28 July	–
Stubble buried to a depth of 10 cm	29 Aug.	29 Aug.	11 Sep.	11 Sep.	–	14 Sep.	14 Sep.	–
Preceding crop debris ploughed	16 Oct.	–	14 Oct.	–	16 Oct.	13 Oct.	–	19 Oct.
15–20 cm deep								
Sowing	16 Oct.	16 Oct.	17 Oct.	17 Oct.	17 Oct.	19 Oct.	19 Oct.	19 Oct.
Seedling emergence	31 Oct.	31 Oct.	30 Oct.	30 Oct.	30 Oct.	31 Oct.	31 Oct.	31 Oct.

<sup>a</sup>RD: removed wheat debris; CD: chopped wheat debris; M: maize debris (traces); OR: oilseed rape debris (traces).

during the epidemic phase (spring) (Table 2). At each sampling date, five plants were randomly collected in five 1-m<sup>2</sup> quadrats per plot and washed from soil particles. Disease intensity (incidence and severity) was assessed on the leaves of the main (M), first (T1) and second tillers (T2) of each plant. The leaf layers of the different tillers were identified according to their emergence order (L1 is the first leaf, L2 the second, etc.).

For a given layer, disease incidence was estimated as the percentage of leaves with visible symptoms. Severity was estimated as the average percentage of necrotic leaf area covered by pycnidia using a diagrammatic scale (1%, 2%, 3% and 5%, then 10%, 15%, 20% until 100%). Leaf area covered by pycnidia was considered a more accurate estimate of disease severity than necrotic

**Table 2** Wheat leaf layers attacked by septoria leaf blotch but still partially green on main (MT), first (T1) and second tillers (T2) at each sampling date during three seasons of experiments. For example, '3-5' means that layers 1 and 2 are completely senescent and that layers 3, 4 and 5 have at least one leaf neither completely senescent nor completely healthy, among the 3 × 25 plants sampled in RD (removed debris), CD (chopped debris) and M (maize debris traces)/OR (oilseed rape debris traces) plots

Date	°C-days <sup>a</sup>	MT	T1	T2
Season 2007-08				
16/10/2007	0			
14/01/2008	533	1-3		
05/02/2008	668	1-3	1	
03/03/2008	850	3-5	1-2	1
04/04/2008	1066	4-6	2-4	2-3
22/04/2008	1205	5-7	3-5	2-4
21/05/2008	1624	9-11	7-9	6-8
Season 2008-09				
17/10/2008	0			
26/11/2008	331			
12/12/2008	376	1-2		
18/12/2008	390	1-2		
14/01/2009	449	1-2		
30/01/2009	511	1-2		
11/02/2009	541	1-3		
24/02/2009	598	1-4	1	1
10/03/2009	675	3-4	1-2	1
30/03/2009	825	3-4	1-2	1-2
28/04/2009	1161	4-6	2-4	2-4
Season 2009-10				
19/10/2009	0			
12/11/2009	233			
19/11/2009	315			
24/11/2009	378	1-2		
30/11/2009	427	1-2		
08/12/2009	487	1-2		
22/12/2009	516	1-2		
14/01/2010	559	1-4		
03/02/2010	620	1-5	1-2	1-2
01/03/2010	728	2-5	1-3	1-2
31/03/2010	936	4-5	1-4	1-4
28/04/2010	1222	6-8	5-7	4-6
03/06/2010	1673	10	8	7
24/06/2010	2020	11-12	10-11	8-10

<sup>a</sup>°C-days: degree-days post sowing, base 0°C.

area because natural senescence is particularly rapid on basal leaves and necrotic lesions caused by other leaf-spotting fungi (e.g. *Py. tritici-repentis* and *Phaeosphaeria nodorum*) interfere with septoria leaf blotch assessment (Blixt *et al.*, 2010).

In the early stages of the epidemics, the first lesions were detected on seedlings using a monocular magnifying glass swept along each leaf (Fig. 1a). During the second- (26 November and 12 December 2008) and third-season experiments (19 November and 24 November 2009), early, putative symptoms were systematically confirmed by plating *M. graminicola* on agar medium. Wheat leaves with putative lesions were placed on wet filter paper in a plastic box kept at room temperature (18–22°C) for 24 h to promote the exudation of cirrhi (Gough & Lee, 1985). A cirrus from a single pycnidium per lesion was transferred to a Petri dish containing PDA (potato dextrose agar 39 g L<sup>-1</sup>) and then streaked across the agar surface with a sterile glass rod to separate individual spores. Plates were incubated for 2 days at 18°C in the dark to promote yeast-like growth of the fungus.

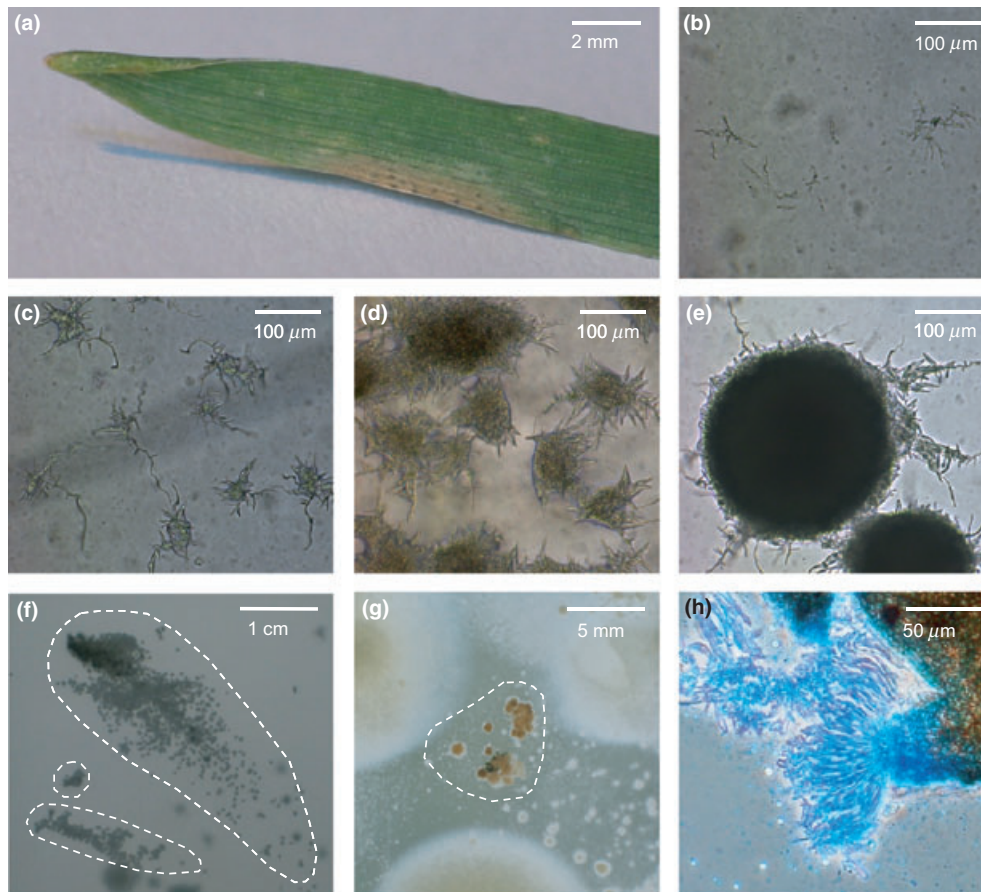
#### Characterization of wheat debris on the soil surface

The distribution in length and weight of wheat debris after the different stubble treatments and tillage practices was compared between the RD and CD plots during the second- (17 November 2008) and third-season experiments (4 November 2009). All visible debris on the soil surface were collected from four randomly selected quadrats (30 × 30 cm), pooled and immersed into water for 15 min to promote the sedimentation of soil particles. The floating pieces of debris were sieved and drained on filter paper, and manually split into nine length classes (≤ 2 cm, > 2–3 cm, > 3–4 cm, > 4–5 cm, > 5–7.5 cm, > 7.5–10 cm, > 10–15 cm, > 15–20 cm, > 20 cm). Pieces in each length class were counted and weighed before (fresh weight) and after oven desiccation at 55°C for 48 h (dry weight). To assess the change of debris surface density in RD and CD, debris were collected again twice during the third-season experiment (10 December 2009 and 3 February 2010) and treated as described above.

#### Quantification of inoculum on wheat debris and leaves

##### *Pycnidiospore and ascospore production on wheat debris*

Wheat straw was collected at the soil surface from four randomly selected quadrats in the CD plot just after harvest at the end of the second experimental season (28 July 2009) and stored under an open farm shed (hereafter referred to as 'sheltered conditions'). Wheat debris still present on the soil surface in the CD plot was collected from four randomly selected quadrats on 29 October 2009 (2 weeks after debris had been ploughed to a depth of 15–20 cm; Table 1), split in six plastic grill boxes and weathered as follows. Two boxes were stored outdoors, partially exposed to rainfall and



**Figure 1** (a) Early septoria leaf blotch lesion on first basal wheat leaf. (b–g) *Mycosphaerella graminicola* colonies resulting from ascospore germination and conidiation on PDA after (b) 24 h, (c) 48 h, (d) 4 days, (e) 6 days, (f) 8 days and (g) 12 days. Dashed line (f–g) delimits a cluster of colonies. (h) *M. graminicola* pseudothecium (brown) and asci containing ascospores (blue) collected on wheat sheath debris.

wind ('outdoor conditions'). The four other boxes were stored in a laboratory room, two of them being wetted twice a month by spraying with 1 L water ('indoor wetted conditions') and the other two being kept untreated ('indoor non-wetted conditions'). The room air temperature was monitored with a thermohygrometer. An additional batch of debris, considered as the control, was kept at  $-15^{\circ}\text{C}$  in a freezer ('frost conditions'); such conditions were expected to retain debris and inoculum in excellent condition.

Moisture content (MD) of debris placed in the different environmental conditions, except frozen conditions, was calculated every 3 weeks as:

$$\text{MD} = \frac{\text{WW} - \text{DW}}{\text{WW}} \times 100$$

where WW is the wet weight (g) and DW the dry weight (g) after oven desiccation at  $55^{\circ}\text{C}$  for 48 h.

Production of pycnidiospores and ascospores was measured every 3 weeks from October 2009 to March 2010 on debris either directly collected from the CD plot (field conditions) or placed in conditions as described above.

**Pycnidiospore production.** Debris (20 g fresh weight) from outdoor conditions, sheltered conditions, indoor wetted conditions, indoor non-wetted conditions, and frost conditions, and 40 g debris from field conditions, was placed on a wet filter paper in moist chambers (plastic boxes  $24 \times 36$  cm), water-sprayed with an Ecospray and incubated for 18 h at room temperature ( $18$ – $22^{\circ}\text{C}$ ) to promote the exudation of cirrhi. The debris was then immersed in 1 L sterile water in an Erlenmeyer flask and mechanically shaken for 5 min. The average concentration of pycnidiospores in 10 replicate samples of each suspension was estimated with a haemocytometer (Malassez cell). The number of pycnidiospores released by 1 g dry debris (pycnidiospore release index, PRI) was calculated. The field pycnidiospore density was estimated as the number of pycnidiospores produced per gram of debris multiplied by the dry weight of debris per square metre.

**Ascospore production.** Debris from field conditions, outdoor conditions, sheltered conditions, indoor wetted conditions, indoor non-wetted conditions, and frost conditions was cut into 1-cm fragments and kept at  $18^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Seven grams of debris fragments were evenly spread

on wet filter paper in two moist boxes (24 × 36 cm). In each box, eight Petri dishes (90 mm in diameter) containing PDA medium were placed upside down 1 cm above the debris. The boxes were placed for 6 h at 18°C in the dark; thereafter Petri dishes were closed and incubated in the same conditions.

After 24 h, mature ascospores ejected onto the Petri dishes germinated with one or two hyphae extending terminally, followed by lateral hyphae, as described by Halama (1996) (Fig. 1b). Ascospores produced yeast-like colonies consisting of numerous conidia with short hyphae (Fig. 1c,d). Six days later, longer hyphae emerged from the colony margin (Fig. 1e). Colonies appearing as a cream-coloured, slimy, convoluted heap, as described by Scott *et al.* (1988) were indistinguishable from those growing on PDA from pycnidiospores collected in the field. Ten days later, colonies developed black stroma-like structures as described by Halama (1996).

Distribution of colonies on Petri dishes was clustered. Each colony was visually assigned to a cluster (Fig. 1f,g) and the number of colonies was counted under a microscope (× 200 magnification) 3, 5 and 7 days after ascospore collection. Using a binocular microscope, several pseudothecia similar to those described by Halama (1996) were detected on a leaf sheath above which a high density of colonies had appeared. Pseudothecia were collected with a sterile needle, crushed and examined microscopically by mounting them in water and lactophenol-cotton blue. Asci and ascospores were found (Fig. 1h). Accordingly, it was assumed that a colony resulted from the germination of a single ascospore, and that a cluster appeared just above active pseudothecia from which several ascospores had been ejected.

A pseudothecia index (PI), assumed to be proportional to the amount of active pseudothecia borne by 1 g dry debris, was calculated as:

$$PI = \frac{C}{dw}$$

where  $C$  is the average number of clusters per Petri dish and  $dw$  is the dry weight of debris exposed to a Petri dish:

$$dw = DW \cdot \frac{\pi \cdot r^2}{x \cdot y}$$

where  $DW = 7$  g (dry weight of debris spread in a moist box),  $r = 4.5$  cm (radius of a Petri dish),  $x = 24$  cm and  $y = 36$  cm (width and length of the box, respectively).

An ascospore release index (ARI), equal to the number of ascospores released per gram of dry debris, was calculated as:

$$ARI = \frac{1}{dw} \sum_{i=1}^C n_i$$

where  $n_i$  is the number of colonies in cluster  $i$ .

#### *Pycnidiospore production on wheat plants*

Pycnidiospore production was assessed on the 25 plants sampled in the RD, CD, M and OR plots used for disease assessment during the second (2008–09) and third experiment (2009–10). Plant total fresh weight (roots excluded) was measured. All leaves (including basal senescent leaves if any) and stems were placed on a wet filter paper in a moist box (24 × 36 cm) and incubated for 18 h at room temperature (18–22°C). Leaves and stems were then immersed in sterile water (0.1–3 L, depending on the quantity of leaves) in an Erlenmeyer flask and mechanically shaken for 5 min.

The number of pycnidiospores was assessed as the average concentration of five replicate samples of each suspension estimated with a haemocytometer (Malassez cell). The field pycnidiospore density was estimated as the number of pycnidiospores produced per plant multiplied by the plant density measured on 2 December 2008 and 10 December 2009, respectively.

## Results

### Characterization of wheat debris on the soil surface

Debris collected in November was mainly composed of tiller and leaf sheath fragments because such parts decomposed less rapidly than leaf blades (Scott *et al.*, 1988). The debris surface density recorded in 2008 and 2009–10 was higher in the CD than in the RD plot (Table 3). In the 2009–10 season, debris surface density decreased over time in both these plots, the decrease being sharper in the CD plot. Accordingly, the ratio of debris surface density between CD and RD decreased from 2.4 in November 2009 to 1.5 in February 2010.

Debris coverage in the CD plot from November 2009 to April 2010 was estimated using a linear regression taking into account results of the three debris collections (4 November 2009, 10 December 2009, 3 February 2010):  $y = ax + b$ , where  $x$  is thermal time (expressed in °C-days post-sowing) and  $y$  is the debris surface density ( $\text{g m}^{-2}$ ), with  $a = -0.17$  and  $b = 237.5$  ( $R^2 = 1.000$ ) in RD, and  $a = -0.68$  and  $b = 616.5$  ( $R^2 = 0.999$ ) in CD.

The CD plot was covered by smaller pieces of debris, whereas the RD plot contained longer pieces: 90% of the pieces of debris in CD had a length  $\geq 4$  cm (2008) or

Plot	Date			
	17/11/2008 (277°C-days)	4/11/2009 (174°C-days)	10/12/2009 (507°C-days)	3/02/2010 (620°C-days)
RD ( $\text{g m}^{-2}$ )	59.2	207.8	151.1	131.7
CD ( $\text{g m}^{-2}$ )	143.9	497.6	275.6	193.3
Ratio CD/RD	2.4	2.4	1.8	1.5

**Table 3** Debris surface density in the removed debris (RD) and chopped debris plots (CD) assessed during the 2008–09 and 2009–10 seasons



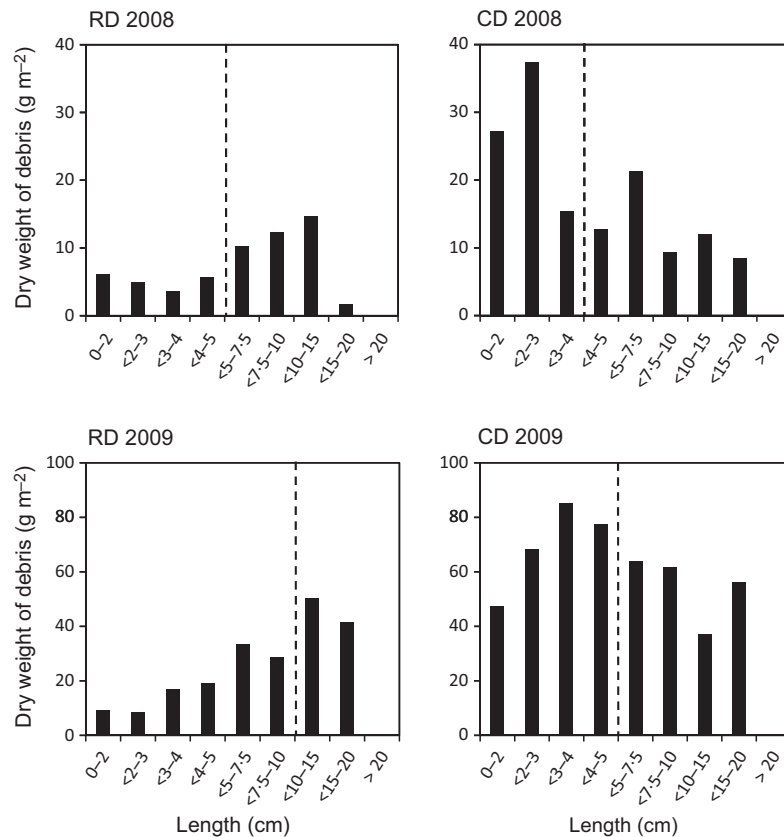
$\geq 5$  cm (2009), while 90% in RD had a length  $\geq 5$  cm (2008) or  $\geq 7.5$  cm (2009) (Fig. 2). The impact of the debris management in CD (straw chopped and spread out on the soil in mid-July and debris ploughed to a depth of 15–20 cm) on its distribution in length and weight was high, and more pronounced in 2009–10 than in 2008–09.

Mean daily air temperature in the field ranged from 5 to 19°C from September to December 2009 and from –6 to 9°C from December 2009 to February 2010. Mean daily room air temperature (indoor wetted and non-wetted conditions) ranged from 17 to 21°C. Average debris moisture content was high (57.9%) in field conditions, moderate (20.3%) in indoor wetted conditions, and low (15.8%, 15.2% and 15.0%, respectively) in sheltered, indoor non-wetted, and outdoor conditions.

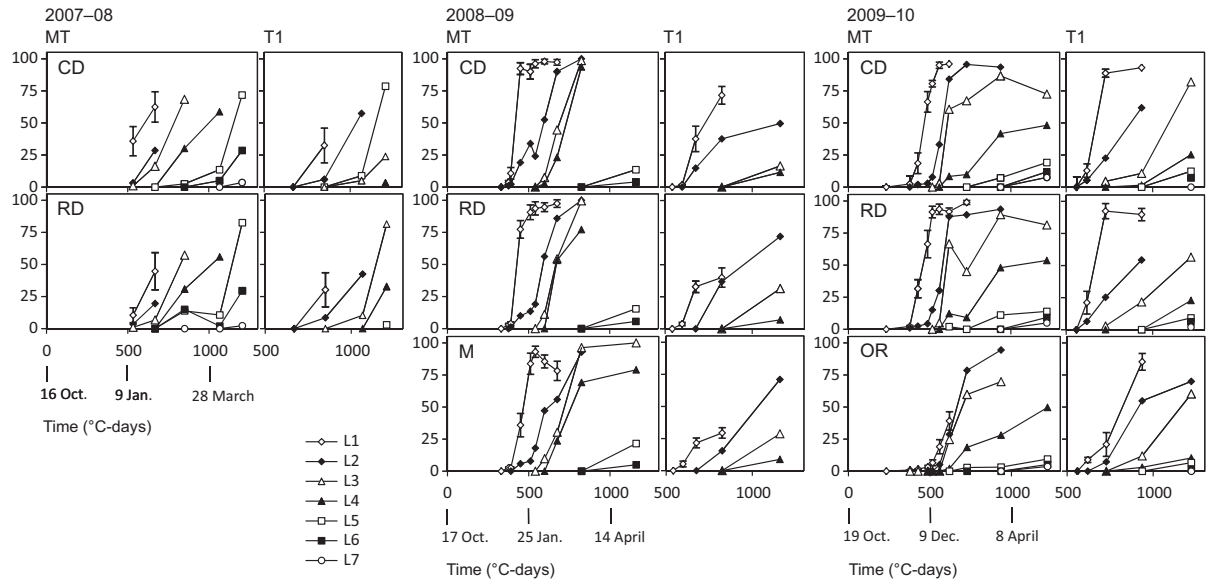
### Effect of wheat debris as local source of inoculum on epidemic development

In the three seasons, the early disease symptoms consisted of small typical lesions (Fig. 1a), sometimes bearing only one pycnidium; disease severity ranged from 1% to 3%. At each sampling date, disease intensity at the tiller scale was estimated on one to five leaf layers, excluding the totally senescent and totally healthy lay-

ers (Table 2). During the 2007–08 season, the first observation of the crop was made on 14 January 2007 (533°C-days post-sowing, i.e. 416°C-days after seedling emergence; Table 2). Disease incidence on the main tiller (MT) was already very high (100% on L1, 40% on L2 and < 5% on L3 in CD; 80% on L1, 10% on L2 and < 5% on L3 in RD; data not shown). Disease severity on MT-L1 was moderate (35% in CD and 10% in RD; Fig. 3). During the following seasons, the first sampling was performed earlier, when wheat plants were still entirely healthy. During the 2008–09 season, no disease was found on 26 November and the first symptoms were detected on 12 December (376°C-days post-sowing, i.e. 263°C-days after seedling emergence). Disease incidence was already high (90% on L1 and 10% on L2 in CD; 5% on L1 in RD; 15% in M; data not shown). Disease severity on MT-L1 was low (< 5% in CD, RD and M; Fig. 3). During the 2009–10 season, no disease was found on 12 November and the first symptoms were detected on 24 November 2009 (378°C-days post-sowing, i.e. 245°C-days after seedling emergence). Disease incidence was moderate (50% on L1 in CD; 55% on L1 and < 5% on L2 in RD; < 5% in OR; data not shown). Disease severity on MT-L1 was low (< 5% in CD, RD and OR; Fig. 3).



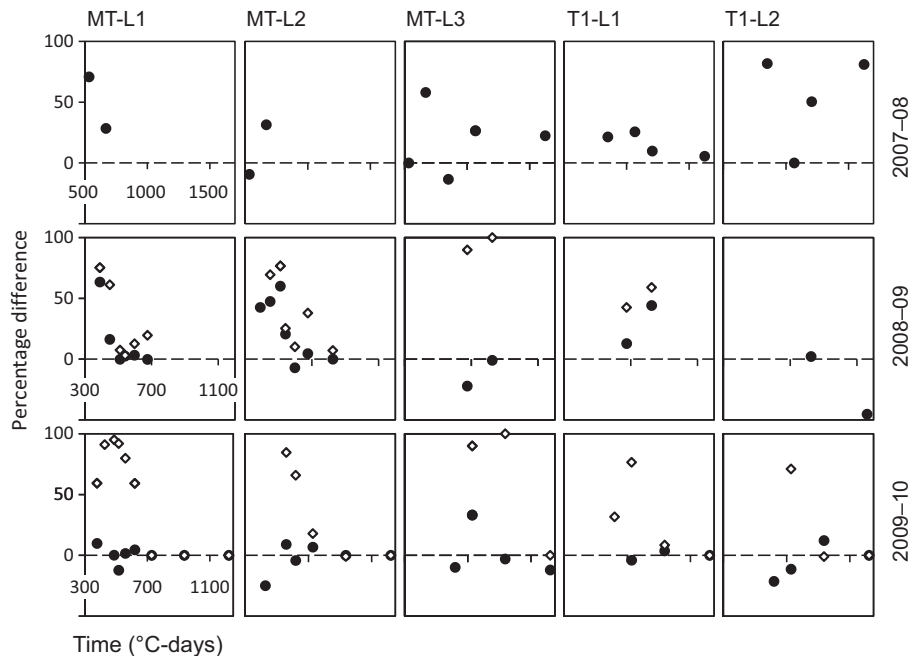
**Figure 2** Distribution in length and weight of wheat debris collected in removed debris (RD) and chopped debris plots (CD) in autumn 2008 (17 November) and 2009 (4 November). Dashed line is positioned at the ninth decile, i.e. the class above which 10% of the longest debris (in number) are assigned.



**Figure 3** Wheat leaf area covered by pycnidia of *Mycosphaerella graminicola* (disease severity) on leaf layers L1 to L7 of main tiller (MT) and first tiller (T1) in chopped debris (CD), removed debris (RD), maize (M) and oilseed rape plots (OR) during three seasons of field experiments (2007–08, 2008–09, 2009–10). Standard deviation (vertical bars) is shown only on first leaves of MT and L1 for the sake of clarity; standard deviation on the other leaves is in the same range (5–10% of mean).

In the three seasons, the percentage differences in disease severity between the CD plots and the M/OR plots were 30–100% on the five leaves from 300 to 800°C-days and then decreased to zero (Fig. 4; black dots). In 2007–

08 and 2008–09, percentage differences in disease severity between the CD plots and the RD plots were 0–80% on the five leaves from 300 to 800°C-days and then decreased to zero (Fig. 4; white diamonds). In 2009–10,



**Figure 4** Percentage difference in disease severity between chopped debris (CD) and removed debris (RD) plots in 2007–08, 2008–09 and 2009–10 (solid points) and between CD plot and M (maize) plot in 2008–09 or OR (oilseed rape) plot in 2009–10 (open diamonds). Disease severity was assessed on leaves MT-L1, MT-L2, MT-L3 (main tiller), and T1-L1, T1-L2 (first tiller).

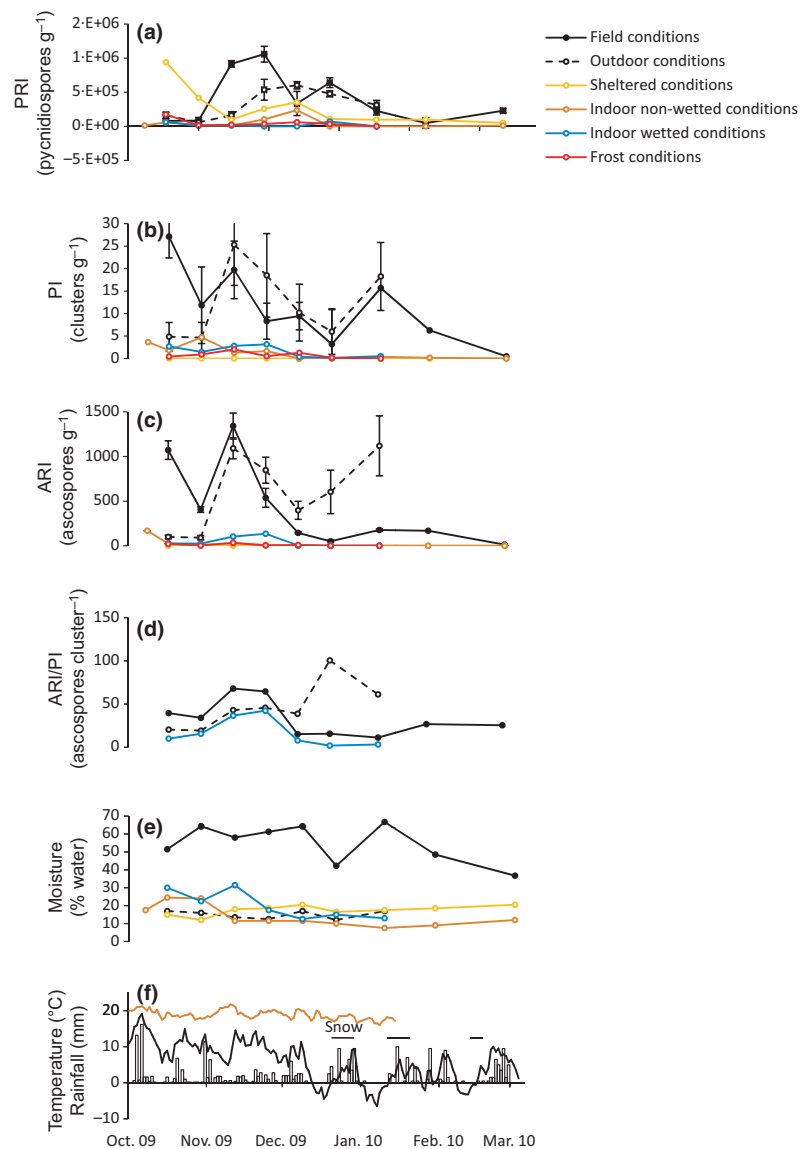
percentage differences were low and even negative. Similar results were obtained when considering disease incidence (data not shown).

#### Pycnidiospore and ascospore production on wheat debris exposed to different environmental conditions

The amount of pycnidiospores available on debris collected from the field peaked in early November 2009 ( $10^6$  pycnidiospores  $g^{-1}$ ; Fig. 5a); moisture content of the debris was high (60%; Fig. 5e) as a result of mild and rainy weather conditions (Fig. 5f). The amount of pycnidiospores on debris exposed to outdoor conditions was lower than in the field and peaked in early December 2009 ( $5 \times 10^5$  pycnidiospores  $g^{-1}$ ; Fig. 5a). The amount of pycnidiospores on debris exposed to sheltered or indoor non-wetted conditions was even lower, but still

higher than production on debris exposed to indoor wetted or frozen conditions.

The amount of active pseudothecia on debris collected from the field, which was estimated by the number of clusters of *M. graminicola* colonies on Petri dishes, decreased from September to December, peaked again in early January and then decreased to hardly measurable levels in March (Fig. 5b). Production of ascospores on debris collected from the field peaked in early November 2009 (1300 ascospores  $g^{-1}$ ; Fig. 5c) and sharply decreased in November (*c.* 150 ascospores  $g^{-1}$ ); few ascospores were then produced until March. Production of ascospores on debris exposed to outdoor conditions was similar to that on debris left in the field in November and December, and then increased until early January, when it was similar to the peak recorded in early November. Production of ascospores on debris exposed to sheltered,



**Figure 5** Quantification of *Mycosphaerella graminicola* pycnidiospore and ascospore production on wheat debris exposed to different environmental conditions during the early stages of a septoria leaf blotch epidemic (September 2009 to March 2010). (a) Pycnidiospore release index (PRI). (b) Pseudothecia index (PI). (c) Ascospore release index (ARI). (d) Ratio ARI/PI. (e) Moisture content of debris (% water). (f) Mean daily air temperature ( $^{\circ}C$ ; curves) and daily rainfall (mm; histogram). Vertical bars represent standard deviation.

indoor wetted, and indoor non-wetted conditions was consistently low throughout the experiment ( $< 100$  ascospores  $g^{-1}$ ). The number of ascospores liberated by a pseudothecium during a single experimental release event, which is proportional to the ratio ARI/PI, evolved similarly for field, outdoor, and indoor wetted conditions in October and November (Fig. 5d). The ratio ARI/PI peaked in early November (50–60 ascospores on average), then decreased on debris collected from the field ( $< 20$  ascospores after late November), while it continued to increase on debris exposed to outdoor conditions (50–100 ascospores  $g^{-1}$  from early December to January).

During the early stages of the epidemics (October–February), the peaks in pycnidiospore and ascospore production coincided; the amount of pycnidiospore produced by 1 g debris was 500- to 1000-fold the ascospore production. This ratio increased to 10 000-fold during the epidemic stage (March).

#### Effect of wheat debris management on pycnidiospore production in the field

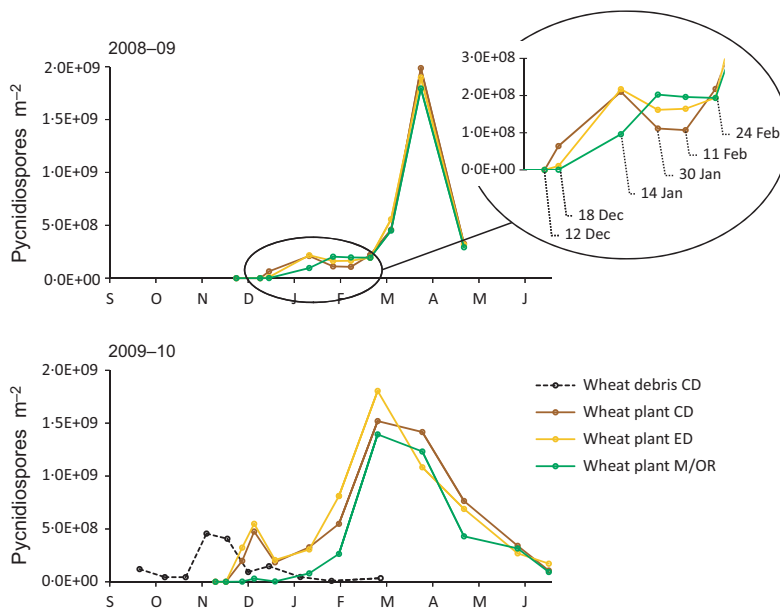
Pycnidiospore production on wheat plants started on 18 December 2008 in the three field plots, coinciding with the detection of first symptoms; production was high but remained below  $2 \times 10^8$  spores  $m^{-2}$  until late February, and then peaked in late March ( $2 \times 10^9$  spores  $m^{-2}$ ) (Fig. 6). At the end of April, pycnidiospore production decreased to the amount observed in December–February. From mid-December 2008 to late February 2009, differences in the number of pycnidiospores produced were observed among the CD, RD and M plots. Until 14 January, pycnidiospore production was higher in the CD and RD plots than in the M plot ( $6 \times 10^7$ ,  $10^7$  and  $5 \times 10^5$  spores  $m^{-2}$ , respectively, on 18 December). No statistical test was performed because pycnidiospore

production was assessed using the same spore suspension. On 14 January, pycnidiospore production was equivalent in the CD and RD plots, and still higher than in the M plot. From late January to mid-February 2009, pycnidiospore production was higher in M than in RD (respectively  $2 \times 10^8$  vs.  $1.6 \times 10^8$  spores  $m^{-2}$ ), and higher in RD than in CD ( $10^8$  spores  $m^{-2}$ ). Later on, pycnidiospore production was equivalent in the three plots.

Pycnidiospore production on wheat plants started on 30 November 2009 in the three field plots, coinciding with the detection of first symptoms; production peaked on 8 December in the CD and RD plots, whilst it remained very low in the OR plot. From late November 2009 to early January 2010, pycnidiospore production decreased in the CD and RD plots. Later on, pycnidiospore production resumed in a similar pattern in the three plots and peaked in March ( $1.5 \times 10^9$  spores  $m^{-2}$ ). By the end of November 2009, more pycnidiospores were collected from wheat plants ( $> 2 \times 10^8$  pycnidiospores  $m^{-2}$ ) than on debris ( $< 10^8$  pycnidiospores  $m^{-2}$ ) and the canopy became the most important source of pycnidiospores in CD and RD plots.

#### Discussion

In the 3 years of the experiment, epidemics began very early during the crop season (late November to mid-December) in the case of an early sowing (mid-October). This finding is consistent with the early field detection of disease in the UK (Shaw & Royle, 1989) during the 1985–86 and 1986–87 seasons. During the 2007–08 season, the first symptoms were observed when disease incidence on the main tiller was already very high; however, in all probability, the epidemic had begun late December or early January. During the 2008–09 and 2009–10 seasons, the first symptoms occurred *c.* 250°C-days after



**Figure 6** Quantification of *Mycosphaerella graminicola* pycnidiospore production in the field in chopped debris (CD), removed debris (RD), maize (M) and oilseed rape plots (OR) during the early stages of septoria leaf blotch epidemics on wheat. Numbers of pycnidiospores produced on wheat residues left on soil surface (primary inoculum) (2009–10) were distinguished from those produced on wheat plants (secondary inoculum) (2008–09, 2009–10).

seedling emergence; 330°C-days after seedling emergence, disease incidence lesions on the first leaves reached 100%. Such time spans are similar to the minimal latent period assessed in different conditions (Armour *et al.*, 2004; Lovell *et al.*, 2004; Viljanen-Rollinson *et al.*, 2005), while an increase in latent period was even observed at low temperatures (< 4.3°C), perhaps reflecting a physiological trade-off in which ability to grow fast at high temperatures is sacrificed for ability to grow fast at low temperatures (Shaw, 1990). This supports the occurrence of the first contamination by *M. graminicola* as soon as the first leaf emerges.

The quantity of wheat debris remaining on the soil affected the availability of *M. graminicola* inoculum and the earliness and severity of first infections (Fig. 4). Debris acting as the local source of primary inoculum had a strong, although transient, effect on the early stages of epidemics. The effect, detected on first leaves, vanished after 700°C-days (mid-March). At a given sampling date from November to March, this effect similarly decreased with increasing leaf layer, vanishing beyond the fifth leaf. Shaw & Royle (1989) found little difference in disease severity between first and second wheat by late autumn; there was no remaining effect by the spring. In barley net blotch caused by *Py. teres*, however, Jordan & Allen (1984) found an effect of straw disposal and cultivation method (plough versus direct drill) on early disease incidence and severity comparable to the findings here.

Crop debris can modify the soil local microclimate (Sharratt *et al.*, 1998; Hatfield & Prueger, 2004) and the phylloclimate (temperature perceived by the plant; Chelle, 2005), especially during winter. A 1°C difference on seedling leaves located close to the soil in the CD plot compared to the M or OR plots would have increased the thermal time scale by 40°C-days in 2008–09 and by 25 in 2009–10 at the occurrence of first symptoms. Such a temperature effect as an accelerator of early epidemic development could partially explain the percentage differences in disease severity in the different plots.

A simple method was designed to assess ascospore production on wheat debris in laboratory conditions. The decrease in the ratio ARI/PI on debris collected from the field after mid-December could be interpreted as the partial exhaustion of pseudothecia (Fig. 5d). Assuming that the number of 'clusters' was proportional to the number of fertile pseudothecia before this date, it was estimated that a pseudothecium could release 40–70 ascospores (maximum) per collection event, which is consistent with the estimates given by Eriksen & Munk (2003). Ascospores (maximum *c.* 10<sup>3</sup> spores g<sup>-1</sup> per collection event) and pycnidiospores (maximum *c.* 10<sup>6</sup> spores g<sup>-1</sup> per collection event) were released from wheat debris collected in the field from September to March. Peaks in ascospore and pycnidiospore potential production coincided in November, when wheat seedlings emerged. This result is consistent, firstly with those obtained by Scott *et al.* (1988), who showed that the number of pseudothecia on wheat debris peaked in December–January and declined to a low level thereafter, whilst the number of pycnidia

declined to zero by December, and also with the seasonal pattern of ascospore trapping of Hunter *et al.* (1999) and Eriksen & Munk (2003).

The present results confirm that both types of *M. graminicola* spores can be involved as primary inoculum in Western European conditions. This is consistent with the fact that regional or climatic conditions can modify the relative importance of the different forms of inoculum involved in the early stage of septoria leaf blotch epidemics (Suffert *et al.*, 2011). As estimated in laboratory conditions, the pycnidiospore pool was 1000-fold the ascospore pool; the method used allowed estimation of the ascospore and pycnidiospore amounts available at a given time, but their actual liberation (instantaneous versus cumulated production) in field conditions was not addressed. Ascospores have a dispersal advantage over pycnidiospores because they are carried away over long distances during relatively dry periods, when dispersal of pycnidiospores is limited. Like pycnidiospores produced on green leaves during spring, pycnidiospores produced on wheat debris can be dispersed by rain-splash over short distances (Holmes & Colhoun, 1975) and could act as a significant local primary inoculum source in stubble-sown wheat fields.

Autumnal field conditions (temperature 5–15°C), characterized by alternating wet and dry periods, were favourable to the production of both pycnidiospores and ascospores; constant high moisture content of debris was not required, as shown by the production of ascospores in outdoor conditions. Warm (indoor wetted or non-wetted conditions) or constant dry (sheltered) conditions did not increase sporulation. Such conditions were also reported as favourable for pycnidial production in *Ph. nodorum* (Scharen, 1966; Harrower, 1974). Dry and freezing conditions should be considered only as controls and cannot be compared with field and outdoor conditions, because no new pycnidia were formed on debris incubated in a moist chamber at room temperature (18–22°C) for 18 h.

Late November can be considered as the end of the early epidemic stages. First, the canopy becomes at that time the most important source of pycnidiospores, rather than crop debris, and pycnidiospores act as secondary rather than primary inoculum (Fig. 6). Similar seasonal variations in sources of primary inoculum were reported for *Rhynchosporium secalis* on winter barley (Davis & Fitt, 1992). The decrease of the number of pycnidiospores on crop debris was caused both by the decay of debris (Table 3) and by the decomposition of pycnidiospores (Brokenshire, 1975) and of pycnidia by soil microorganisms (Baker, 1969). Secondly, debris in distant plots must have been then the most important source of ascospores, the production of which peaked in November (Fig. 5). Shaw & Royle (1989) demonstrated that ascospores act as remote, airborne inoculum.

During the winter period, as expected, the development of the epidemic slowed down. From late January to late February 2009, spore production on plants that had been infected early (in the CD plot, and then in the RD plot) became, unexpectedly, lower than on plants that



had been infected later (in the M plot) (Fig. 6). First, most of the leaves where the earliest lesions had appeared became totally or partially senescent, were detached on the soil, and were, therefore, not collected for the quantification of pycnidiospore production, although still producing pycnidiospores. Secondly, the earliest, oldest lesions, when incubated in moist chambers, were probably exhausted, while the latest, youngest lesions continued to sporulate.

Reducing the quantity of wheat debris on the soil surface over the autumn and winter months has been suggested as a means of protecting the next crop from early disease attacks (e.g. Yarham & Norton, 1981; Jordan & Allen, 1984; Jenkyn *et al.*, 1994). For some cereal diseases, especially septoria leaf blotch, this proposal is not fully supported by research results, which are quite inconsistent (Eyal *et al.*, 1987; Schuh, 1990; Sutton & Vyn, 1990; Bailey *et al.*, 2001; Gilbert & Woods, 2001). These reports assessed the effects of crop rotations and tillage at different periods, mostly late epidemic stages, when several infection cycles had already occurred. However, experiments performed by Shaw & Royle (1989) during the early epidemic stages *sensu stricto* did not rule out local sources of primary inoculum for seedlings (wheat debris); the apparently negligible effects of cropping history argue for a major role of distant source of primary inoculum. The present study showed that wheat debris can act as a source of primary inoculum (both ascospores and pycnidiospores), and that debris management can reduce the local amount of primary inoculum. The decrease in primary inoculum delayed the disease dynamics during the winter period; later on, disease progress resumed because of the input of inoculum of remote origin (ascospores). Accordingly, management of wheat debris at the plot scale cannot be expected to decrease final disease severity and yield loss. Such a decrease, however, is likely to be obtained by limiting primary inoculum on a larger scale, considering that local inoculum sources in a given plot will also act as inoculum sources for distant plots. Defining the scale relevant for management by cropping practices requires a better knowledge of the rate at which concentrations of viable ascospores decline with distance from a source.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant of the INRA Plant Health and Environment Division. We thank Nathalie Galet for technical assistance and Christophe Montagnier (INRA Experimental Unit, Thiverval-Grignon) for crop management.

## References

- Abrinbana M, Mozafari J, Shams-bakhsh M, Mehrabi R, 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology* **59**, 829–38.
- Armour T, Viljanen-Rollinson SLH, Chng SF, Butler RC, Jamieson PD, Zyskowski RF, 2004. Examining the latent period of *Septoria tritici* blotch in a field trial of winter wheat. *New Zealand Plant Protection* **57**, 116–20.
- Bailey KL, Gossen BD, Lafond GP, Watson PR, Derksen DA, 2001. Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: univariate and multivariate analyses. *Canadian Journal of Plant Science* **81**, 789–803.
- Baker CJ, 1969. *Studies on L. nodorum Müller and S. tritici Desm. on Wheat*. Exeter, UK: University of Exeter, PhD thesis.
- Blixt E, Olson Å, Lindahl B, Djurlle A, Yuen J, 2010. Spatiotemporal variation in the fungal community associated with wheat leaves showing symptoms similar to stagonospora nodorum blotch. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 373–86.
- Brokenshire T, 1975. Wheat debris as an inoculum source for seedling infection by *Septoria tritici*. *Plant Pathology* **24**, 202–7.
- Chelle M, 2005. Phylloclimate or the climate perceived by individual plant organs: what is it? How to model it? What for? *New Phytologist* **166**, 781–90.
- Davis H, Fitt BDL, 1992. Seasonal changes in primary and secondary inoculum during epidemics of leaf blotch (*Rhynchosporium secalis*) on winter barley. *Annals of Applied Biology* **121**, 39–49.
- Djerbi M, 1977. Épidémiologie du *Septoria tritici* Rob. et Desm. Conservation et mode de formation de l'inoculum primaire. In: *Travaux dédiés à Georges Viennot-Bourgin*. Paris, France: Société Française de Phytopathologie, 91–101.
- Eriksen L, Munk L, 2003. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 253–9.
- Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM, Ginkel MV, 1987. *The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico City, Mexico: CIMMYT.
- Gilbert J, Woods SM, 2001. Leaf spot diseases of spring wheat in southern Manitoba farm fields under conventional and conservation tillage. *Canadian Journal of Plant Science* **81**, 551–9.
- Gough FJ, Lee TS, 1985. Moisture effects on the discharge and survival of conidia of *Septoria tritici*. *Phytopathology* **75**, 180–2.
- Halama P, 1996. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici* in France. *Plant Pathology* **45**, 135–8.
- Harrower KM, 1974. Survival and regeneration of *Leptosphaeria nodorum* in wheat debris. *Transactions of the British Mycological Society* **63**, 527–33.
- Hatfield JL, Prueger JH, 2004. Microclimate effects of crop debris on biological processes. *Theoretical and Applied Climatology* **54**, 47–59.
- Holmes SJI, Colhoun J, 1975. Straw-borne inoculum of *Septoria nodorum* and *S. tritici* in relation to incidence of disease on wheat plants. *Plant Pathology* **24**, 63–6.
- Hunter T, Coker RR, Royle DJ, 1999. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* **48**, 51–7.
- Jenkyn JF, Gutteridge RJ, Jalaluddin M, 1994. Straw disposal and cereal diseases. In: Blakeman JP, Williamson B, eds. *Ecology of Plant Pathogens*. Wallingford, UK: CAB International, 285–300.
- Jenkyn JF, Christian DG, Bacon ETG, Gutteridge RJ, Todd AD, 2001. Effects of incorporating different amounts of straw on growth, diseases and yield of consecutive crops of winter wheat

- grown on contrasting soil types. *Journal of Agricultural Science* **136**, 1–14.
- Jordan VWL, Allen EC, 1984. Barley net blotch: influence of straw disposal and cultivation methods on inoculum potential, and on incidence and severity of autumn disease. *Plant Pathology* **33**, 547–59.
- Jordan VWL, Hutcheon JA, 1999. Disease management in less-intensive, integrated wheat systems. In: Lucas JA, Bowyer P, Anderson MH, eds. *Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems*. Cambridge, UK: CABI Publishing, 263–72.
- Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, Van den Bosch F, 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* **53**, 170–81.
- Obaedo H, Mamluk OF, Bayaa B, 1999. Determination of primary sources of infection of septoria leaf blotch on wheat in Syria. *Arab Journal of Plant Protection* **17**, 49–59.
- Sanderson FR, Hampton JG, 1978. Role of the perfect states in the epidemiology of the common septoria diseases of wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**, 277–81.
- Scharen AL, 1966. Cyclic production of pycnidia and spores in dead wheat tissue by *Septoria nodorum*. *Phytopathology* **56**, 580–1.
- Schuh W, 1990. Influence of tillage systems on disease intensity and spatial pattern of septoria leaf blotch. *Phytopathology* **80**, 1337–40.
- Scott PR, Sanderson FR, Benedikz PW, 1988. Occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici*, on wheat debris in the UK. *Plant Pathology* **37**, 285–90.
- Sharratt BS, Benoit GR, Voorhees WB, 1998. Winter soil microclimate altered by corn residue management in the northern Corn Belt of the USA. *Soil and Tillage Research* **49**, 243–8.
- Shaw MW, 1990. Effects of temperature, leaf wetness and cultivar on the latent period of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Plant Pathology* **39**, 255–68.
- Shaw MW, Royle DJ, 1989. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology* **38**, 35–43.
- Suffert F, Sache I, Lannou C, 2011. Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–77.
- Sutton JC, Vyn TJ, 1990. Crop sequences and tillage practices in relation to diseases of winter wheat in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* **12**, 358–68.
- Viljanen-Rollinson SLH, Marroni MV, Butler RC, Deng Y, Armour T, 2005. Latent periods of septoria tritici blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection* **58**, 256–60.
- Yarham DJ, Norton J, 1981. Effects of cultivation methods on disease. In: Jenkyn JF, Plumb RT, eds. *Strategies for the Control of Cereal Disease*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 157–66.

## Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants

F. Suffert\*, I. Sache and C. Lannou

UR1290 BIOGER-CPP, INRA, F-78850, Thiverval-Grignon, France

*Septoria tritici* blotch, caused by *Mycosphaerella graminicola*, is a major foliar disease of wheat. The quantitative traits of pathogenicity are not comprehensively described in this pathosystem. The objective of this study was to identify and quantify the most relevant variables to describe traits of aggressiveness. Four wheat cultivars were inoculated in a greenhouse with four isolates. Inoculation was performed on a limited surface of the two uppermost leaves of adult plants. The dynamics of chlorotic, necrotic and sporulating areas were assessed twice a week. Pycnidia were counted at the same time. A Gompertz model was fitted to the resulting curves. Parameter combinations with easily interpreted biological relevance were examined further as descriptors of aggressiveness. Within each category of descriptor, those which were the most pairwise correlated and which explained the largest part of the variance were retained: incubation and latent period, development rate of sporulating area, maximal sporulating area, pycnidial density, and sporulation capacity. Correlations between these variables were discussed, assuming they reflect biological relationships between the corresponding aggressiveness quantitative traits. It is suggested that the selected variables, providing a good measure of *M. graminicola* fitness, can be used to estimate quantitative resistance of wheat to *septoria tritici* blotch, to characterize differences between wheat genotypes and to estimate the pathogen's fitness on its host and to estimate the pathogen's aggressiveness.

**Keywords:** latent period, lesion development, pycnidiation, quantitative resistance, *Septoria tritici*, sporulation capacity

### Introduction

*Septoria tritici* blotch, caused by the ascomycete fungus *Mycosphaerella graminicola* (proposed new name *Zymoseptoria tritici*; Quaedvlieg *et al.*, 2011), is a major foliar disease in many wheat-growing areas worldwide. Most recent attention has focused on qualitative interactions between *M. graminicola* and its host, i.e. complete resistance that follows a gene-for-gene relationship (Arraiano *et al.*, 2001; Czembor *et al.*, 2010; Ghaffary *et al.*, 2011). The description of quantitative interactions is still fragmentary and the source of much discussion (Chartrain *et al.*, 2004; Risser *et al.*, 2011), whether it is for applied purposes (e.g. developing quantitative resistance in breeding programmes) or more fundamental research (e.g. understanding the genetic basis of host defence mechanisms). Moreover, whilst quantitative traits of aggressiveness have been well characterized for rust and mildew pathogens, this is not the case for *M. graminicola*. This study undertakes an in-depth investigation of the quantitative traits of *M. graminicola*–wheat interaction with the aim of identifying those that are both measurable and of biological significance.

Aggressiveness, that is to say the quantitative component of pathogenicity, is often separated into elementary

traits that reflect a biological function, such as infection efficiency, latent period, lesion size, lesion growth rate, sporulation capacity and infectious period (Van der Plank, 1963; Pariaud *et al.*, 2009). The experimental assessment of such traits requires methodological approaches that correspond to the pathosystem under study (Lannou, 2012). Moreover, some aggressiveness traits are directly reflected in a single observation (e.g. disease severity), whilst others need to be estimated by aggregation of temporal data (e.g. latent period).

In *M. graminicola* the assessment of traits such as latent period (Bouami *et al.*, 1996; Leyva-Mir *et al.*, 2009) or spore production (Eyal & Brown, 1976; Simon & Cordo, 1997) is complex. For each of these traits, different measurements are possible and some may be more informative than others. Moreover, the measurements of different traits may give redundant information when they are highly correlated. The most informative traits must then be carefully chosen, whether it is for measuring quantitative resistance, or pathogen adaptation to host or environment.

Kema *et al.* (1996b) have described the different phases of the infection cycle of *M. graminicola* on wheat seedlings under optimal conditions. Leaf penetration occurs within 3 days of inoculation. The fungus then develops without symptoms for 10–14 days. Necrotrophic feeding begins as disease symptoms appear, and from this point on, the growth of the fungus accelerates.

\*E-mail: frederic.suffert@versailles.inra.fr



Chlorosis is the first visible symptom followed by necrosis. The necrotrophic phase involves the development of the asexual sporulation organs, called pycnidia.

In research investigating interactions between *M. graminicola* isolates and wheat cultivars under greenhouse or field conditions, two variables have been mainly used to assess disease severity on a leaf: the area of necrotic tissue (e.g. Bouami *et al.*, 1996; Cowger *et al.*, 2000; Czembor *et al.*, 2010) and the area covered by pycnidia (e.g. Chartrain *et al.*, 2004; Arraiano & Brown, 2006). Disease can be assessed at a sole time point or as the area under the disease progress curve (AUDPC). Variables characterizing the dynamics of the different processes (such as spore production or lesion development) were seldom assessed, in contrast to studies on biotrophic pathogens such as wheat rusts (Shaner, 1983; Robert *et al.*, 2004). The assessment of the pycnidial density (number of pycnidia  $\text{cm}^{-2}$ ; Eyal & Brown, 1976; Simon & Cordo, 1997; Leyva-Mir *et al.*, 2009) and of the spore production (number of pycnidiospores produced by a single pycnidium; Eyal, 1971; Gough, 1978; Jeger *et al.*, 1984) was in limited use.

The objective of this investigation was to establish a phenotyping approach for assessing the development of *M. graminicola* lesions throughout a complete asexual cycle and to identify the most informative traits of aggressiveness for comparing *M. graminicola* isolates. To this end, an experiment was carried out, based on a combination of *M. graminicola* isolates  $\times$  wheat cultivars. Different variables were measured and the most relevant for describing *M. graminicola* aggressiveness were selected. Finally, the correlation between those variables was evaluated.

## Materials and methods

### Plant material

A greenhouse experiment, set up in 2008–2009 and replicated in 2009–2010, involved the inoculation of four popular French wheat cultivars with four *M. graminicola* isolates. The experiment involved adult wheat plants having similar maturities. Seeds of cv. Apache, Soissons, Caphorn and Koreli were sown on 5 December 2008 (first replicate) and on 4 December 2009 (second replicate) in Jiffy peat pots kept for 2 weeks under greenhouse conditions to promote seedling emergence. Cultivars Apache and Soissons are considered to be moderately susceptible to septoria tritici blotch (resistance rating 5 on a 1–10 scale of decreasing susceptibility; Arvalis-Institut du Végétal/CTPS), while cvs Caphorn and Koreli are considered to be moderately resistant (resistance rating 6 and 7, respectively). Apache has resistance genes *Stb4* and *Stb11* (Ghaffary *et al.*, 2011), Caphorn and Koreli share *Stb6* (T. Marcel, BIOGER-CPP, INRA, Thiverval-Grignon, France, personal communication), while an *Stb* gene is still undetermined in Soissons.

Seedlings were vernalized in a growth chamber for 7 (Apache, Soissons) or 8 (Koreli, Caphorn) weeks at 8°C with a 10 h light period ( $30\text{--}40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and a 14 h dark period. Afterwards, seedlings were transferred back to the greenhouse and left to acclimatize for 1 week. Then, seedlings were transplanted into individual pots filled with 1 L commercial compost (Klasmann Peat Substrat 4; Klasmann France SARL). Four

grams of slow-release fertilizer (Osmocote Exact 16-11-11N-P-K 3MgO Te) were added.

Plants were sprayed with Spiroxamine (Aquarelle SF at  $2 \text{ mL L}^{-1}$ ; Bayer CropScience) as a preventive measure to control powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), 5 weeks before inoculation at the latest. Moreover, plants were fertilized with Hydrokani C2 (Hydro Agri Spécialités), at a 1:100 dilution rate (total of 10 mL per plant) poured in the pot saucers 4, 5 and 7 weeks after transplantation. During plant growth, natural daylight was supplemented with 400 W sodium vapour lamps between 06:00 h and 21:00 h. A cooling system kept the air temperature below 20°C during the 15 h light period ( $300\text{--}600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and above 12°C during the 9 h dark period. During growth, plants were thinned to three stems per pot.

The air temperature in the greenhouse was automatically recorded every 15 min using a ventilated sensor (Greenhouse Humidity and Temperature Sensor type 224.401; RAM). The thermal time  $t$ , expressed in degree-days, was calculated, starting from the sowing date, by summing the daily mean air temperature using a 0°C base temperature.

### Fungal material

The inoculum was obtained from stock conidial suspensions of four *M. graminicola* isolates stored at  $-80^\circ\text{C}$  in a sterile 1:1 glycerol–water solution. Three of them were isolated from typical septoria tritici blotch lesions on leaves of cv. Soissons collected in 2008 in Grignon (Yvelines, France; isolate INRA08-FS0001 and INRA08-FS0002) and in Le Rheu (Ille-et-Vilaine, France; isolate INRA08-FS0003). For the sake of simplicity, the isolates will be hereafter referred to as FS1, FS2 and FS3, respectively. The fourth isolate was the reference isolate IPO323 (Kema & van Silfhout, 1997; Goodwin *et al.*, 2011). All four isolates share the specific avirulence genes *Avr-Stb4* and *Avr-Stb11* that match resistance genes in cv. Apache (T. Marcel, personal communication). In addition, IPO323 (Brading *et al.*, 2002) and FS1 (T. Marcel, personal communication) carry *Avr-Stb6* that matches the resistance gene in cvs Caphorn and Koreli.

Subcultures were grown in Petri dishes containing PDA (potato dextrose agar,  $39 \text{ g L}^{-1}$ ) at 18°C and kept in the dark for 5 days. Conidial suspensions were prepared by first flooding the surface of the 5-day-old cultures with sterile distilled water and then by scraping the agar surface with a sterilized glass rod to release conidia. Suspensions were calibrated to  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  using a Malassez counting chamber. Two drops of surfactant (Tween 20; Sigma) were added to the suspensions to ensure adequate coverage of the inoculated leaf surface.

### Experimental design and inoculation procedure

The experiment was set up as a randomized block design (four blocks, 128 pots), with the isolate (FS1, FS2, FS3 and IPO323), the wheat cultivar (Apache, Soissons, Caphorn and Koreli) and the spore collection (spores collected or not collected) as factors. Inoculations were carried out on 14 April 2009 and 27 April 2010 between wheat growth stages Z50 (first head spikelet visible) and Z59 (head fully emerged; Zadoks *et al.*, 1974). The conidial suspensions were applied to the median part of the leaf, along a 25 mm long section of the adaxial face of the flag leaf (F1) of the main tiller. A watercolour round paintbrush (French size #18, bristle length 25 mm; Auchan) was used to apply the suspension, using a square plastic frame ( $25 \times 25 \text{ mm}$ ) to delimit the surface of inoculation. Because leaf width varies by

cultivar, inoculated surfaces ranged from 350 to 450 mm<sup>2</sup>. The inoculated side of the leaf was immediately turned over to avoid any running of the inoculum suspension and enclosed in a transparent polyethylene bag containing a small amount of distilled water, thereafter sealed to maintain high humidity to promote infection. Bags were removed after 72 h and pots were arranged in a randomized block design, eight per saucer. A preliminary test comparing three durations of incubation (48, 72, 96 h) in polyethylene bags showed that 72 h was enough.

The sporulation capacity of each lesion was assessed by collecting spores on a weekly basis over 7 weeks, from the appearance of first pycnidia until total leaf senescence. The first collection was made 20 days post-inoculation (dpi) in 2009 and 28 dpi in 2010. Pycnidiospores were collected by placing the inoculated leaf surface in a 25 mm diameter tube containing 10 mL water and softly sweeping the area covered by pycnidia with a paintbrush. To avoid cross-contamination, a paintbrush was assigned to each isolate and rinsed in water after each collection. The inoculated surfaces were then dried using a paper towel to prevent smudging and avoid subsequent lesion expansion by secondary infection. The total number of spores produced weekly by a given lesion was estimated as the average spore concentration of three samplings of each washing suspension assessed with a Malassez counting chamber.

### Preliminary validation of experimental conditions

A preliminary experiment, divided into three trials, was performed on adult wheat plants of cv. Apache in 2008 to test and optimize the inoculation procedure, the method of analysis of the lesion development, and the method of assessment of the sporulation capacity (Table S1; Fig. S1). The inoculation procedure, using either an atomizer or a paintbrush, had no significant effect on the lesion development. Accordingly, the paintbrush, which prevents smudging and allows neater lesions to be obtained, was used in all subsequent experiments. The variables characterizing lesion development were not significantly different between the two leaf layers (F1, F2), but variables characterizing disease severity differed when measured on F1 and F2. No significant interaction was observed between leaf layer and other factors. Only F1 was used in all subsequent experiments. The inoculum dose ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) had a significant effect on all measured variables with, for most of them, a threshold effect when inoculum concentration exceeded  $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>. Previously reported field studies and trials under controlled conditions used much higher concentrations ( $10^6$ – $10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>, except Shaw, 1990). Due to the threshold effect, the range in quantitative response for many aggressiveness traits might be reduced for such high concentrations. Moreover, high concentrations are not representative of field conditions (estimated to be  $3 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> per droplet for *Phaeosphaeria nodorum*, the cause of wheat glume blotch disease; Brennan *et al.*, 1985). Accordingly,  $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> was considered as the optimal concentration for maximizing differences in disease expression and used in all subsequent experiments.

### Definition and assessment of aggressiveness variables

#### Sequence of symptoms and lesion development

Disease severity was visually assessed twice a week as the percentage of the inoculated leaf surface (1, 2, 3 and 5%, then increments of 5% up to 100%) which presented the following symptoms: chlorosis (the percentage of chlorotic area, CHL), necrosis (the

percentage of necrotic area, NEC, including both sporulating and non-sporulating area), and visible pycnidia (the percentage of sporulating area, SPO) at the time of observation  $t$ . Here, the diseased area will be named 'lesion' for the sake of simplicity, although it is actually the result of the coalescence of several single lesions caused by multiple concomitant infection events. Chlorosis and necrosis of leaf margins not associated with pycnidia or outside the inoculated surface were excluded from the assessment, as such symptoms may be caused by natural senescence. As long as the apical senescence did not merge with the disease symptoms, the percentage of the inoculated surface which remained green (GRE) was estimated by subtracting chlorotic and necrotic areas from the total inoculated surface. Using a hand lens (magnification  $\times 10$ ), the number of pycnidia (PYC) was visually estimated as the sum of pycnidia present on the adaxial and abaxial face of the inoculated surface. Disease severity was assessed every 3–4 days by the same experimenter from the time of inoculation until leaf senescence (15 and 17 assessments, from late April to mid-June, in 2009 and 2010, respectively).

A preliminary inspection of the data confirmed that disease progress curves of septoria tritici blotch are asymmetrical (Shaw, 1990). Correspondingly, the Gompertz equation was selected to fit the symptom curves (Berger, 1981).

NEC( $t$ ), the percentage of necrotic area at the time of observation  $t$ , was modelled as follows:

$$NEC(t) = NEC_{\max} \exp(-B_{NEC} e^{-r_{NEC}t})$$

where NEC<sub>max</sub> is the maximum percentage of necrotic area, r<sub>NEC</sub> is the necrotic area development rate and B<sub>NEC</sub> is a position parameter.

SPO( $t$ ), the percentage of sporulating area at the time of observation  $t$ , was modelled using the same equation and characterized by the variables SPO<sub>max</sub> and rSPO.

GRE( $t$ ), the percentage of the inoculated leaf surface which remained healthy at the time of observation  $t$ , was modelled as:

$$GRE(t) = 100 - GRE_{\min} \exp(-B_{GRE} e^{-r_{GRE}t})$$

where GRE<sub>min</sub> is the minimum percentage of green area.

Equations of NEC( $t$ ), SPO( $t$ ) and GRE( $t$ ) were fitted to the observed values, excluding the time points when the disease was not yet recorded, as well as the points when the disease had already reached its maximum level.

CHL( $t$ ), the percentage of chlorotic area at the time of observation  $t$ , was calculated as:

$$GRE(t) = 100 - CHL(t) - NEC(t)$$

Sequence of symptoms and lesion development over the assessment period were summarized through the computation of areas under disease progress curves (AUDPC) using the fit of the different symptom curves.

#### Incubation and latent periods

Incubation period can be defined as the interval between inoculation and the appearance of first symptoms (Van der Plank, 1963). Chlorosis, the first expression of the infection visible to the naked eye, is a transitory symptom. In this investigation, the time elapsed from inoculation to the appearance of first chlorosis (TCHL<sub>5</sub>), based on the threshold CHL = 5%, and the time elapsed from inoculation to the maximum percentage of chlorotic area (TCHL<sub>max</sub>), were retained as two practical definitions of incubation period. Alternative definitions of incubation

period, the time elapsed from inoculation to 5% of maximum necrotic area  $NEC_{max}$  ( $LatNEC_5$ ) and the time elapsed from inoculation to 50% of  $NEC_{max}$  ( $LatNEC_{50}$ ), were also retained.

Latent period was defined in septoria tritici blotch as the interval between inoculation and the first appearance of pycnidia (Shearer & Zadoks, 1972). In this case, because the accuracy of the disease dynamic measurement was not based on a high number of infected leaves (four replicates per treatment), but on the high number of assessment time points (15 and 17), latent period ( $LatSPO_5$ ) was estimated for a given leaf as the time elapsed from inoculation to 5% of the maximum percentage of area covered by pycnidia  $SPO_{max}$ .  $LatSPO_{50}$ , defined as the time elapsed from inoculation to 50% of  $SPO_{max}$ , was also retained.

Incubation and latent periods, expressed in thermal time, were calculated for each leaf from the fitted Gompertz models of  $SPO(t)$  and  $CHL(t)$ .

The parameter DelaySPO, defined as the time elapsed from the appearance of first chlorosis ( $TCHL_5$ ) to  $LatSPO_{50}$ , corresponds to the delay between the first visible symptoms and the peak of pycnidiation.

### Spore production

The number of pycnidia produced on a lesion ( $PYC_{max}$ ) was estimated as the maximal count of pycnidia, usually reached just before the leaf became entirely senescent. The pycnidial density ( $PYC_{dens}$ ) was calculated as the surface density of pycnidia of the sporulating area ( $PYC_{max}/SPO_{max}$ ). The total number of pycnidiospores produced by a lesion was calculated by summing the number of spores produced weekly by one lesion from the first to the last collection. To calculate the average spore production per pycnidium ( $nbSPO$ ), the total number of spores produced by a lesion was divided by  $PYC_{max}$ .

### Data analysis

Eighteen variables were defined and categorized according to biological functions (Table 1): incubation ( $CHL_{max}$ ,  $TCHL_5$ ,  $TCHL_{max}$ ), latency ( $LatNEC_5$ ,  $LatNEC_{50}$ ,  $LatSPO_5$ ,  $LatSPO_{50}$ ), lesion development ( $rNEC$ ,  $rSPO$ , DelaySPO), disease severity ( $GRE_{min}$ ,  $NEC_{max}$ ,  $SPO_{max}$ ,  $audpcNEC$ ,  $audpcSPO$ ), pycnidiation ( $PYC_{max}$ ,  $PYC_{dens}$ ) and sporulation capacity ( $nbSPO$ ). Because variables within the same category are intrinsically cor-

**Table 1** Definition and categorization of 18 aggressiveness variables

Category	Variable		Definition	References
Incubation	Maximum chlorotic area	$CHL_{max}$	Maximum percentage of chlorotic area	Bouami <i>et al.</i> , 1996
	Incubation period	$TCHL_5$	Time elapsed from inoculation to $CHL(t) = 0.05$ (first signs of chlorosis)	
		$TCHL_{max}$	Time elapsed from inoculation to $CHL(t) = CHL_{max}$	
Latency		$LatNEC_5$	Time elapsed from inoculation to $NEC(t) = 0.05 \times NEC_{max}$ (first signs of necrosis)	Bouami <i>et al.</i> , 1996; Lovell <i>et al.</i> , 2004; Viljanen-Rollinson <i>et al.</i> , 2005; Leyva-Mir <i>et al.</i> , 2009
		$LatNEC_{50}$	Time elapsed from inoculation to $NEC(t) = 0.5 \times NEC_{max}$	
	Latent period	$LatSPO_5$	Time elapsed from inoculation to $SPO(t) = 0.05 \times SPO_{max}$ (appearance of first pycnidia)	
		$LatSPO_{50}$	Time elapsed from inoculation to $SPO(t) = 0.5 \times SPO_{max}$	
Lesion development	Necrosis development rate	$rNEC$	Necrotic area development rate	Parker <i>et al.</i> , 2004
	Sporulation development rate	$rSPO$	Sporulating area development rate	
		DelaySPO	Time elapsed from $TCHL_5$ to $LatSPO_{50}$	
Disease severity	Minimum green area	$GRE_{min}$	Minimum percentage of green area	Bouami <i>et al.</i> , 1996; Kema <i>et al.</i> , 1996a; Cowger <i>et al.</i> , 2000; Czembor <i>et al.</i> , 2010
	Maximum necrotic area	$NEC_{max}$	Maximum percentage of necrotic area	
	Maximum sporulating area	$SPO_{max}$	Maximum percentage of area covered by pycnidia	
	Area under the necrotic area progress curve	$audpcNEC$		
	Area under the sporulating area progress curve	$audpcSPO$		
Pycnidiation	Maximum number of pycnidia	$PYC_{max}$		Eyal & Brown, 1976; Simon & Cordo, 1997; Leyva-Mir <i>et al.</i> , 2009
	Pycnidial density	$PYC_{dens}$	$PYC_{dens} = PYC_{max}/SPO_{max}$	
Sporulation capacity	Spore production	$nbSPO$	Average number of pycnidiospores produced by a pycnidium	Gough, 1978; Simon & Cordo, 1997

related, correlations were estimated and used as first criterion to select the variables considered as the most informative for each category (those which were the most pairwise correlated). In parallel, the percentage of variance explained by the cultivar and isolate factors, and their interaction, were estimated for each of the 18 variables and used as secondary criterion; the variables which explained the larger part of the variance were selected because they potentially account well for the genetic variability of aggressiveness. In a second step, correlations between the selected variables (for each category) were assessed. These correlations were assumed to reflect biological relationships (positive or negative) between traits of the host–pathogen interaction. Correlation tests and ANOVA were performed with the S-PLUS 6.0 software (Lucent Technologies, Inc.).

## Results

### Lesion development

In many compatible interactions, chlorosis, characterized by small light-green or yellow spots covering 1–3% of the inoculated surface, was observed very early, usually at 15–23 dpi (300–450 degree-days). With time, these chlorotic spots increased in size, became more homogeneous, progressively coalesced, and then turned yellow. The visual assessment of the chlorotic area became difficult when it reached a maximum of 20–30% of the inoculated surface (Fig. 1a).

The first signs of necrosis (brown, dry and senescent tissue) were usually visible at 18–28 dpi (350–500 degree-days), when the chlorotic area was around 10–15%, i.e. on average 3–6 days after the first chlorotic spots. Necrosis (LatNEC<sub>5</sub>) was well established a few days (about 50 degree-days) before the peak in chlorotic area (TCHL<sub>max</sub>). The necrotic area increased and reached its maximum (NEC<sub>max</sub>), usually 50–100%, at 40–55 dpi (800–1000 degree-days), while the chlorotic area reached a peak (TCHL<sub>max</sub>) at 25–35 dpi (450–650 degree-days) and then decreased (Figs 1a & 2).

Because disease did not cover the whole inoculated surface due to the development of the apical senescence, SPO<sub>max</sub> was usually lower than 100%. In compatible interactions, first pycnidia appeared concomitantly to the first necroses. In some cases (e.g. FS3 × Caphorn), the first pycnidia appeared within still green or chlorotic tissues, and the area surrounding these pycnidia turned into small necrotic spots 24–48 h later. In such interactions, pycnidia appeared quickly in comparison to the development rate of other symptoms. After 700–800 degree-days the necrotic area was usually not entirely covered by pycnidia, especially on the outer edge of the lesion (Fig. 2); late differences between NEC and SPO were most likely due to natural senescence.

### Effect of cultivars and isolates

Lesion development was significantly affected by the host, the pathogen and their interaction (Fig. 3). The first chlorotic spots appeared earlier on Apache, Caphorn and Soissons in 2009, and earlier in Caphorn than on Apache

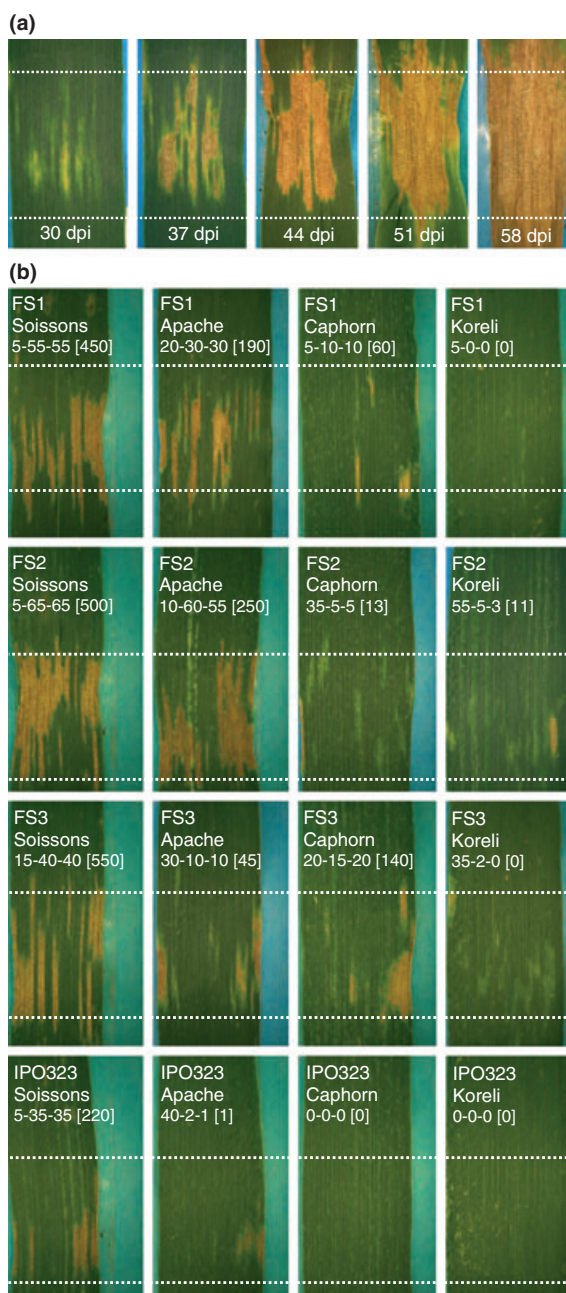


Figure 1 Symptoms of septoria tritici blotch on a wheat flag leaf. (a) Cultivar Apache inoculated with *Mycosphaerella graminicola* isolate FS3. (b) Four cultivars (Soissons, Apache, Caphorn, Koreli) inoculated with four isolates (FS1, FS2, FS3, IPO323); disease was visually assessed at  $t = 35$  days post-inoculation (dpi) and is presented as follows: CHL( $t$ ) – NEC( $t$ ) – SPO( $t$ ) [PYC( $t$ )] (see Table 1 for definitions of variables). Dotted lines delimit the inoculated leaf surface (350–450 mm<sup>2</sup>). Inoculation was carried out with a paintbrush and the inoculum dose =  $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>.

in 2010 (Table 2). Differences in the incubation period (TCHL<sub>5</sub>) between isolates were highly significant in 2010. The necrosis development rate (rSPO) ranged between 0.14 and 0.16% per degree-day for Soissons



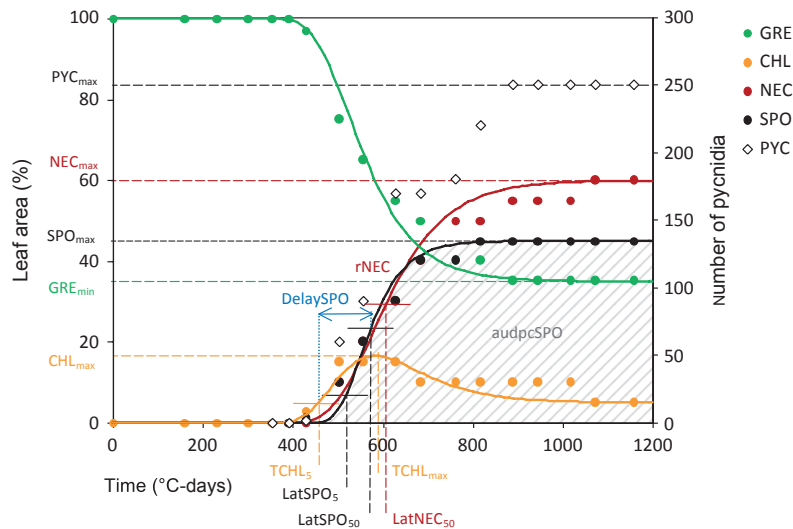


Figure 2 Development of a septoria tritici blotch lesion on a wheat flag leaf. Points indicate the experimental data (2010 experiment, isolate FS1 × cv. Apache, inoculation with paintbrush, without spore collection, block c). Lines correspond to the fitted curves (green area, GRE; chlorotic area, CHL; necrotic area, NEC; sporulating area, SPO, expressed in %; and number of pycnidia, PYC). Time is expressed in degree-days, starting from the sowing date. See Table 1 for definitions of variables.

and Caphorn in 2009 and 2010 and for Apache in 2010, while it was significantly higher for Koreli. Differences in rSPO between isolates were not significant, except for isolate FS3 in 2010.

The latent period (LatSPO<sub>5</sub>) ranged between 450 and 570 degree-days for Soissons, Apache and Caphorn, whilst it was significantly longer for Koreli: first pycnidia appeared on average 320 degree-days later. DelaySPO ranged between 190 and 280 degree-days for Soissons, Apache and Caphorn, whilst it was longer for Koreli. Differences in DelaySPO were significant between isolates.

The differences in SPO<sub>max</sub> and audpcSPO between cultivars and isolates were significant (Table 2). The pycnidial density (PYC<sub>dens</sub>) was also significantly different between cultivars and isolates: in 2010 PYC<sub>dens</sub> on Soissons was 1.5 times higher than on Apache and Caphorn, and three times higher than on Koreli. PYC<sub>dens</sub> was the lowest in the cases of Koreli and IPO323 during the second experiments (2010). This was due to the late start in lesion development, which was limited when the apical senescence merged with the inoculated surface. The sporulation capacity, estimated by the average number of spores produced by a single pycnidium (nbSPO), ranged from 4000 to 8500 spores per pycnidium (Table 2). On Koreli the pycnidia appeared too late to allow an accurate estimation of the spore production. Differences were significant between cultivars and isolates in the 2009 experiment but not in 2010.

Because of cultivar × isolate interactions, means of the different aggressiveness variables were compared for each cultivar separately. Interactions were significant in 11 of the 18 variance analyses (Table 2); interactions were significant for latent period (LatSPO<sub>5</sub> and LatNEC<sub>50</sub>) and DelaySPO both in the 2009 and 2010 experiments. Other significant interactions were only established in the 2010 experiment. Cultivar Koreli and isolate IPO323 were responsible for the largest contribution to these interactions. When isolate IPO323 was excluded from the analysis of the 2010 experiment, the cultivar × iso-

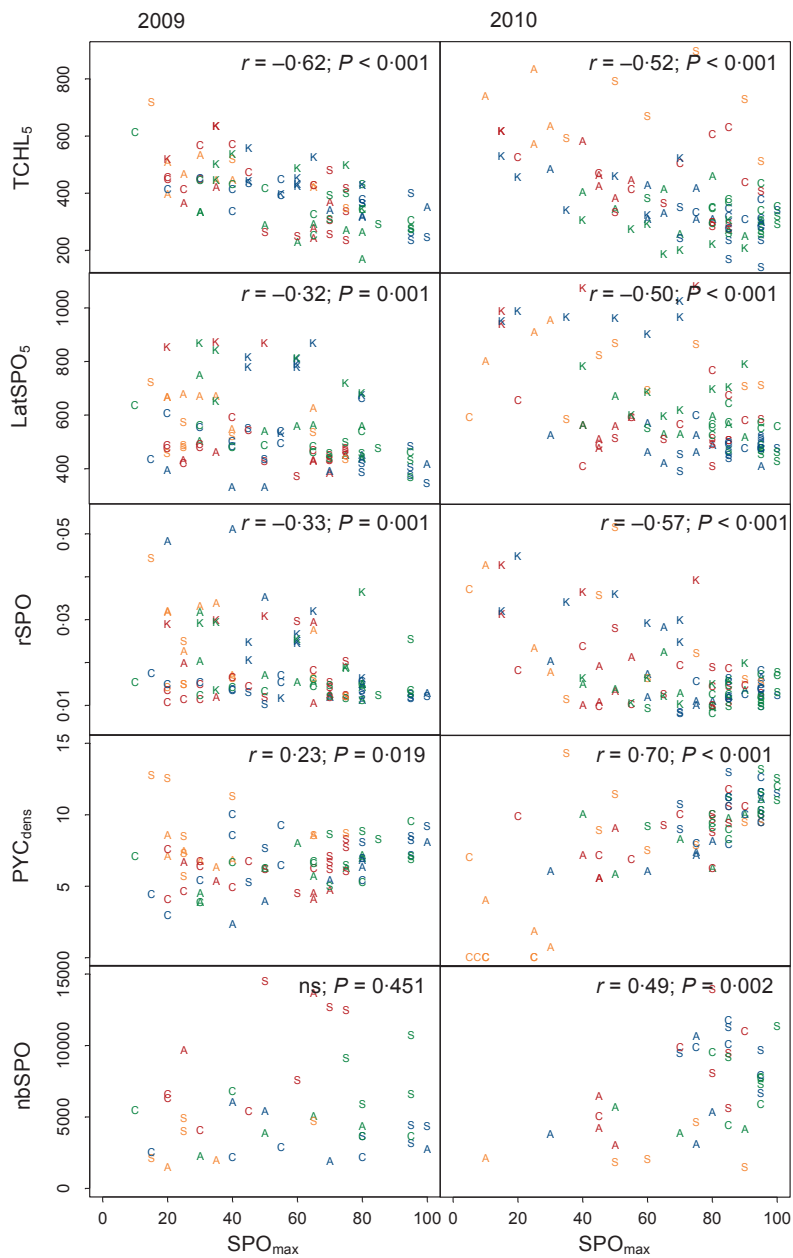
late interaction for SPO<sub>max</sub> and audpcSPO were no longer significant. The other contributions to the cultivar × isolate interaction for latent period were moderate and can be assigned to cvs Apache and Soissons, and isolates FS2 and FS3: in the 2009 and 2010 experiments, LatSPO<sub>5</sub> and LatSPO<sub>50</sub> on Apache were significantly longer for isolate FS3 than FS2, while there was no difference on Soissons. Similar results were obtained for DelaySPO. In contrast, nbSPO on Soissons was significantly higher for isolate FS3 than FS2, while there was no difference on Apache.

#### Selection of variables most relevant for describing aggressiveness

Because variables within the same category of biological function (Table 1) are intrinsically correlated, a selection was made using two criteria. The first selection was based on the coefficient of correlation among those variables. This led to the selection of TCHL<sub>5</sub>, LatSPO<sub>5</sub>, rSPO, SPO<sub>max</sub> and PYC<sub>dens</sub>, which were the best correlated with all other variables in the same category. The coefficient of correlation ranged from 0.64 to 0.98 in 2009 and from 0.84 to 0.99 in 2010 with all *P* values <0.01 (data not shown). The second criterion was the part of the variance explained by the cultivar, the isolate and their interaction (Table 3). This led to the selection of the same variables, except SPO<sub>max</sub>. These five variables, along with nbSPO, were considered as the most informative for assessing aggressiveness traits in *M. graminicola*.

The correlations among the six selected variables are listed in Table 3. Correlations between incubation (TCHL<sub>5</sub>) and latent period (LatSPO<sub>5</sub>) were, as expected, positive and high. Correlations between latent period and lesion development rate (rSPO) were also positive and high; the later the first symptom, the higher its development rate. Correlations between disease severity (SPO<sub>max</sub>) and incubation or latent period were negative;

**Figure 3** Plots of maximum sporulating area ( $SPO_{max}$ , in %) against five other relevant aggressiveness quantitative traits of four *Mycosphaerella graminicola* isolates on four cultivars (second set of experiments 2009 and 2010): incubation period ( $TCHL_5$ , in degree-days); latent period ( $LatSPO_5$ , in degree-days); sporulating area development rate ( $rSPO$ ); maximum pycnidial density ( $PYC_{dens}$ ); sporulation capacity ( $nbSPO$ , in number of spores per pycnidium). Each data point is one replicate of an isolate  $\times$  cultivar interaction. Letters (A, S, C, K) indicate the cultivars (Apache, Soissons, Caphorn and Koreli, respectively) and colours correspond to the isolates (red for FS1, blue for FS2, green for FS3 and yellow for IPO323).



the earlier the first signs of a lesion (chlorosis or necrosis), the greater the sporulating area ( $SPO_{max}$ ). Correlations between pycnidiation ( $PYC_{dens}$ ) or sporulation ( $nbSPO$ ) and incubation ( $TCHL_5$ ) or latent period ( $LatSPO_5$ ) were negative. Therefore, the earlier the first symptoms (chlorosis or necrosis), the higher the final density of pycnidia, and the higher the single-pycnidium spore production.

Figure 3 displays correlations between  $SPO_{max}$ , one of the most used aggressiveness variables in the literature (Table 1), and the five other variables taken to be the most relevant. Table 4 is a simplified version of Table 2 and confirms that the six selected variables provide the complementary information needed to characterize the

different isolates and cultivars (isolate IPO323 and cv. Koreli were excluded from this table because of their low aggressiveness and susceptibility, respectively). For example, isolate FS1 presented a shorter latent period and a higher sporulation capacity but a lower pycnidiation than FS3 on Apache, while  $SPO_{max}$  was low for both isolates. Inversely,  $SPO_{max}$  was different between FS1 and FS3 on Caphorn while the other aggressiveness variables, except  $TCHL_5$ , were similar. Whatever the given variable, the overall aggressiveness of FS2 and FS3 was similar on the three cultivars. Taken trait by trait, the aggressiveness of both isolates was similar on Soissons but differences between several traits existed on Apache and Caphorn.

**Table 2** Mean values of selected aggressiveness variables for each wheat cultivar and *Mycosphaerella graminicola* isolate (2009 and 2010 replicates)

Category	Variable <sup>a</sup>	Year	Cultivar				Isolate				Cultivar × isolate interaction		
			Soissons	Apache	Caphorn	Koreli	P <sup>b</sup>	FS3	FS2	FS1	IPO323	P <sup>b</sup>	P <sup>b</sup>
Incubation	TCHL <sub>5</sub>	2009	351.9a <sup>c</sup>	345.9a	421.5a	482.1b	<0.001	358.3ab	386.3ab	405.2a	471.2b	<0.001	0.308
		2010	367.0ab	427.8a	388.4b	362.6ab	0.005	307.7a	331.9b	435.8c	692.9bc	<0.001	<0.001
Latency	LatSPO <sub>5</sub>	2009	456.4a	505.8a	510.6a	773.9b	<0.001	553.8a	528.0a	504.3a	578.9b	<0.001	0.001
		2010	539.4a	570.7a	551.4a	856.5b	<0.001	571.2a	588.3ab	619.5c	770.6bc	<0.001	<0.001
	LatNEC <sub>50</sub>	2009	578.8a	602.4a	647.2a	815.3b	<0.001	655.7a	634.6a	636.2a	655.2b	<0.001	0.001
		2010	669.8a	691.9a	678.2a	900.1b	<0.001	697.8a	697.4ab	722.1b	828.8ab	<0.001	<0.001
Lesion development	rSPO	2009	0.0154a	0.0225b	0.0142a	0.0247b	<0.001	0.0175a	0.0187a	0.0170a	0.0235a	0.057	0.429
		2010	0.0150a	0.0165a	0.0151a	0.0259b	<0.001	0.0131a	0.0180b	0.0186b	0.0261b	<0.001	<0.001
	DelaySPO	2009	188.6ab	243.2ac	190.5b	535.7c	<0.001	284.9a	237.3ab	196.6bc	172.9c	<0.001	0.001
		2010	277.0a	251.3a	259.7a	528.4b	<0.001	382.4a	347.8a	250.5b	131.5c	<0.001	0.002
Disease severity	SPO <sub>max</sub>	2009	66.0a	52.0b	43.5c	48.6c	<0.001	61.0a	60.8a	47.2b	35.0c	<0.001	0.452
		2010	80.3a	52.6b	63.7c	51.8b	<0.001	79.0a	72.9a	54.7b	34.7c	<0.001	0.002
	audpcSPO	2009	24451a	16623b	12705c	4737d	<0.001	17793a	18590a	14863a	6654b	<0.001	0.212
		2010	34360a	20640b	26082b	9308c	<0.001	32242a	31312a	18195b	6000c	<0.001	0.004
Pycnidiation	PYC <sub>dens</sub>	2009	7.7a	6.3b	6.3a	2.5c	<0.001	5.7a	5.9a	4.9b	8.4a	<0.001	0.677
		2010	10.4a	6.8b	7.6b	4.0c	<0.001	9.4a	7.9b	6.8b	4.8c	<0.001	<0.001
Sporulation capacity	nbSPO	2009	6854a	4793b	4236c	ns	0.001	5535a	3393b	9216c	3120b	<0.001	0.012
		2010	7427a	4700a	8415a	ns	0.011	6923a	8249a	7614a	2363a	0.005	0.841

<sup>a</sup>See Table 1 for definitions of variables.

<sup>b</sup>P value associated with the analysis of variance. Sources of variation are 'cultivar' (Apache, Soissons, Caphorn, Koreli), 'isolate' (FS1, FS2, FS3, IPO323), 'spore collection' (yes, no) and 'block' (a, b, c, d). Effect of spore collection and block was not significant ( $P > 0.05$ ). None of the interactions tested in the model was significant ( $P > 0.05$ ), except cultivar × isolate interactions for several aggressiveness variables.

<sup>c</sup>Data followed by different lower case letters indicate significant differences between means ( $P < 0.01$ ). ns, not significant.

**Table 3** Correlation between categorized aggressiveness variables (2009 and 2010 replicates)

Category	Aggressiveness variable <sup>a</sup>	% of variance explained by cv + iso (2009/2010)	% of variance explained by all factors and interactions <sup>b</sup> (2009/2010)	Coefficient of correlation <sup>c</sup> (2009/2010)						
				TCHL <sub>5</sub>	LatSPO <sub>5</sub>	rSPO	SPO <sub>max</sub>	PYC <sub>dens</sub>	nbSPO	
Incubation	CHL <sub>max</sub>	81.8/88.4	98.3/97.8							
	TCHL <sub>5</sub>	81.2/90.6	97.2/99.2	1/1						
	TCHL <sub>max</sub>	80.2/92.6	98.1/99.1	0.84/0.76						
Latency	LatNEC <sub>5</sub>	90.7/92.8	99.1/99.4	0.66/0.61						
	LatNEC <sub>50</sub>	89.0/86.5	99.1/99.1	0.67/0.57						
	LatSPO <sub>5</sub>	91.4/95.8	99.2/99.5	<b>0.61/0.59</b>	1/1					
	LatSPO <sub>50</sub>	89.3/94.0	99.0/99.3	0.62/0.55	0.98/0.98					
Lesion development	rNEC	76.9/73.9	97.8/98.1	0.50/0.52	0.68/0.65					
	rSPO	63.7/83.5	95.4/98.2	<b>0.38/0.49</b>	<b>0.42/0.71</b>	1/1				
	DelaySPO	84.9/92.2	97.3/99.0	-0.31/-0.54	<u>0.56/0.33</u>	ns/ns				
Disease severity	GRE <sub>min</sub>	80.3/92.4	98.0/99.1	0.72/0.62	0.47/0.62	ns/0.60				
	NEC <sub>max</sub>	80.2/91.1	97.3/98.8	-0.66/-0.57	-0.41/-0.64	ns/-0.63				
	SPO <sub>max</sub>	69.8/86.2	97.3/98.6	<u>-0.62/-0.52</u>	<u>-0.32/-0.50</u>	<u>-0.33/-0.57</u>	1/1			
	audpcNEC	81.4/88.8	98.7/99.7	-0.73/-0.61	-0.72/-0.77	ns/-0.61	0.74/0.83			
	audpcSPO	83.5/91.1	98.5/99.1	-0.72/-0.60	-0.70/-0.76	-0.37/-0.62	0.83/0.84			
Pycnidiation	PYC <sub>dens</sub>	86.5/92.8	98.5/99.5	ns/-0.39	<u>-0.48/-0.78</u>	<u>-0.32/-0.58</u>	<b>0.23/0.70</b>	1/1		
	PYC <sub>max</sub>	78.1/94.1	97.6/99.2	-0.60/-0.49	<u>-0.56/-0.71</u>	-0.41/-0.57	0.86/0.88	0.64/0.90		
Sporulation capacity	nbSPO	88.3/75.3	98.5/98.9	ns/-0.52	<u>-0.39/-0.56</u>	ns/ns	ns/0.49	ns/0.47	1/1	

<sup>a</sup>See Table 1 for definitions of variables. The selected variables (in bold) are those which were the most pairwise correlated within the same category: TCHL<sub>5</sub>, LatSPO<sub>5</sub>, rSPO, SPO<sub>max</sub> and PYC<sub>dens</sub>. Only the correlations between these variables (by column) and the 18 others (by line) are presented.

<sup>b</sup>cv + iso + collect + block + (cv × iso) + (cv × collect) + (cv × block) + (iso × collect) + (iso × block) + (collect × block).

<sup>c</sup>Underlined correlations are presented in scatter plots (Fig. 3), with a distinction between cultivar and isolates; ns, not significant ( $P > 0.01$ ).

**Table 4** Overview of the aggressiveness variables of three *Mycosphaerella graminicola* isolates (FS1, FS2, FS3) assessed on wheat cv. Apache (A), Soissons (S) and Caphorn (C)

Category	Aggressiveness variable <sup>a</sup>	Isolate <sup>b</sup>								
		FS1			FS2			FS3		
		A	S	C	A	S	C	A	S	C
Incubation	TCHL <sub>5</sub>	+	+	--	+	++	-	++	+	+
Latency	LatSPO <sub>5</sub>	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Lesion development	rSPO	+	+	+	++	--	+	+	-	+
Disease severity	SPO <sub>max</sub>	--	+	--	+	++	+	-	++	+
Pycnidiation	PYC <sub>dens</sub>	--	+	-	-	++	+	+	++	-
Sporulation capacity	nbSPO	++	++	+	+	+	+	-	+	+

<sup>a</sup>See Table 1 for definitions.

<sup>b</sup>The variable is noted + or - when it contributes to increasing or decreasing the aggressiveness of the pathogen, respectively. Large effects are denoted by ++ or --.

## Discussion

The approach proposed in this study made it possible to quantitatively characterize the development of septoria tritici blotch lesions on adult wheat plants throughout a complete infection cycle. The approach includes procedures for inoculation, symptom assessment and data analysis to extract relevant aggressiveness variables.

The method is based on the analysis of the temporal dynamics of lesion growth, as opposed to a sole time point assessment. All the aggressiveness variables provided information about differences between isolates or cultivars. The direct quantification of only four symptoms (CHL, NEC, SPO, PYC), completed by spore counting (nbSPO), led to the estimation of eighteen variables. Curve fitting allowed variable estimation



without the burden of daily observations, as shown for latent period by Shaner (1980). The high number of time point assessments was compensated by the low number of required replicates. Four replicates were enough to identify differences among isolates or cultivars. These differences were consistent from one experiment to another, indicating a good repeatability of the measurements. The interest of the approach is to assess concomitantly a complete set of aggressiveness traits, rather than selecting one a priori as in many studies (Table 1).

NEC is the easiest symptom to assess visually: the outline of necrosis is neater than chlorosis, while the detection of pycnidia, which can require a hand lens, is not necessary. NEC<sub>max</sub> would be a highly relevant aggressiveness trait provided that the whole necrotic area is actually caused by *M. graminicola*. However, disease lesions may coalesce with natural apical senescence, especially when lesions appear near the leaf end (Ben Slimane *et al.*, 2012). As the presence of pycnidia is the only unequivocal symptom of septoria tritici blotch, SPO<sub>max</sub> should be preferred, especially under field conditions, although the part of explained variance was smaller than for NEC<sub>max</sub>. Although NEC<sub>max</sub> and SPO<sub>max</sub> are the variables most commonly used to characterize wheat–*M. graminicola* interaction, other variables are informative and should also be considered.

Latent period is usually taken to be the time necessary for a population of lesions, grown under the same conditions, to sporulate (Lovell *et al.*, 2004). Because the appearance of septoria tritici blotch lesions is not completely synchronous (Shaw, 1990), and to limit the number of replicates, latent period was assessed here as the time by which SPO reaches a given percentage of SPO<sub>max</sub> (5 or 50%). Obtained from the SPO equation, LatSPO<sub>5</sub> and LatSPO<sub>50</sub> are strongly dependent. LatSPO<sub>5</sub> was retained, being closer to the original definition of latent period (Van der Plank, 1963). Under field conditions, the latent period cannot be assessed because the date of contamination is often unknown. An alternative could be to measure DelaySPO, the delay between the observation of the first symptoms and the peak of pycnidiation, which is fairly correlated with LatSPO<sub>5</sub> (Table 3).

The number of spores produced by a pycnidium (nbSPO) differed between isolates and cultivars (Table 2). From only two collection events, Gough (1978) established that pycnidia released 2–2.5 times more spores in moderately resistant and susceptible cultivars than in resistant cultivars. The method used in the present study, requiring 5–6 collection events as in the case of Eyal's (1971), probably allows a more realistic estimation of the average sporulation capacity of a pycnidium. Moreover, pycnidia are not homogeneous in age. Taking into account the dynamics of pycnidium cohorts would improve the estimation of sporulation capacity. The variation in the quantity of pycnidia and spores between isolates and cultivars suggests that spore production is a variable of interest when seeking to characterize aggressiveness.

Infection efficiency, defined as the ratio of the number of lesions to the number of deposited spores, is an important aggressiveness trait (Lannou, 2012). It was not assessed in the present study because it requires controlling the number of spores deposited on the leaf (Azzimonti *et al.*, 2013), which is technically very difficult with *M. graminicola*.

The identification of the variables considered as the most informative per category of biological function is one of the main results of this study. TCHL<sub>5</sub> (incubation period), LatSPO<sub>5</sub> (latent period), rSPO (sporulating area development rate), SPO<sub>max</sub> (maximum sporulating area), PYC<sub>dens</sub> (pycnidial density) and nbSPO (spore production) were selected among 18 variables as the most relevant for describing aggressiveness, based on their capacity to best represent the other variables of the same category and on their capacity to discriminate isolates and cultivars.

Because septoria tritici blotch epidemics are the consequence of several embedded infection cycles (Lovell *et al.*, 1997), they can be highly impacted by a small variation in one of the six selected aggressiveness traits investigated at the single monocycle scale. LatSPO<sub>5</sub>, which could appear in an estimate of the pathochron (the number of phyllochrons per latent period; Beresford & Royle, 1988), and SPO<sub>max</sub>, PYC<sub>dens</sub> or nbSPO, which reflect the amount of secondary inoculum, can highly impact the potential for the disease to build up on upper leaves. From an epidemiological point of view, the most useful aggressiveness variables are LatSPO<sub>5</sub>, SPO<sub>max</sub> and nbSPO, because they provide complementary information (Table 4). While PYC<sub>dens</sub> and SPO<sub>max</sub> are moderately correlated, these two aggressiveness traits, as well as rSPO and LatSPO<sub>5</sub>, show differences between isolates and cultivars (Table 4).

Significant positive correlations were found in this study between several aggressiveness traits of *M. graminicola*, extending the range of already reported correlations, for example between necrotic area and pycnidium number (Eyal *et al.*, 1985), latent period, necrotic area and density of pycnidia (Bouami *et al.*, 1996), and sporulation capacity and density of pycnidia (Simon & Cordo, 1997). Oddly enough, no negative correlation was identified, while trade-offs between aggressiveness traits are common in a wide range of pathosystems (Pariaud *et al.*, 2009; Lannou, 2012). This result does not necessarily mean that such trade-offs do not exist in *M. graminicola*; rather, the experimental design was not intended to reveal them because biological material consisted only of four isolates and because the presence of resistance factors in the host could mask the expression of trade-offs.

Cultivar × isolate interactions were found for most aggressiveness variables. Significant interactions were identified between two virulent isolates (FS2 and FS3) and two susceptible cultivars (Apache and Soissons). Both significant interactions (e.g. Cowger & Mundt, 2002) and the absence of interaction (e.g. Van Ginkel & Scharen, 1988) between isolates of *M. graminicola* and

wheat cultivars have previously been reported. The occurrence of cultivar × isolate interactions confirms that the assessment of several variables, rather than a single one, is necessary, if the aggressiveness of an isolate or the resistance level of a wheat cultivar is to be accurately characterized.

The approach proposed in this study is recommended to accurately measure quantitative traits of aggressiveness in *M. graminicola*. Such a measurement is required for instance to accurately characterize the level of quantitative resistance of wheat cultivars, to more fully characterize pathogen response to environment and host factors, and to better assess differences in aggressiveness of *M. graminicola* isolates within a pathogen population.

The approach detailed in this study can be useful for characterizing partial resistance and identifying QTL in controlled conditions. Plants need examining only twice a week, based on a continuous thermal scale. The accurate assessment of aggressiveness quantitative traits of *M. graminicola* by phenotyping on adult wheat plants can be seen as complementary to seedling (Czembor *et al.*, 2010; Ghaffary *et al.*, 2011) or detached (Arraiano & Brown, 2006) leaf tests, which make it possible to carry out high-throughput phenotyping, but are not adapted for detecting low-effect resistance QTLs at the adult plant stage.

From another point of view, research carried out to characterize *M. graminicola*–wheat interactions and defence mechanisms requires the accurate assessment of the transitions between the absence of symptoms, the chlorotic phase, the necrotic phase, and the appearance of the first pycnidia (e.g. Keon *et al.*, 2007). Such transition periods are short when compared to the overall time scale of disease dynamics and they are not easily quantifiable. To relate gene expression to specific symptoms or symptom transition, these periods must be accurately characterized.

The approach proposed in this study can also be useful for the study of *M. graminicola* quantitative adaptation to its host (Cowger *et al.*, 2000) or to its environment, including temperature (Zhan & McDonald, 2011), atmospheric gas emission (Shaw *et al.*, 2008), light intensity and relative humidity (Shaw, 1991). Such studies have to include different fitness traits that can be assessed by the selected aggressiveness variables. The fact that a host effect as well as a host–isolate interaction has been easily identified for several of these variables suggest that they could provide a good measure of the fitness of *M. graminicola* in different conditions.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant 2009–2011 of the Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale en blé tendre (FSOV) *Évaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par M. graminicola*. The authors are grateful to Nathalie Galet, Christian Lepoulennec and Majed Tliha for their technical assistance, Dr Thierry Marcel for

helpful discussion about *M. graminicola*–wheat interactions, and Dr Suzette Tanis-Plant for discussions and editorial advice in English. The authors thank the anonymous reviewers for both general and specific comments on the manuscript.

## References

- Ahmed HU, Mundt CC, Hoffer ME, Coakley SM, 1996. Selective influence of wheat cultivars on pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). *Phytopathology* **86**, 454–8.
- Arraiano LS, Brown JKM, 2006. Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology* **55**, 726–38.
- Arraiano LS, Brading PA, Brown JKM, 2001. A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. *Plant Pathology* **50**, 339–46.
- Azzimonti G, Lannou C, Sache I, Goyeau H, 2013. Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathology*. doi: 10.1111/ppa.12029.
- Ben Slimane R, Bancal P, Suffert F, Bancal MO, 2012. Localized septoria leaf blotch lesions in winter wheat flag leaf do not accelerate apical senescence during the necrotrophic stage. *Journal of Plant Pathology* **94**, 543–53.
- Beresford RM, Royle DJ, 1988. Relationships between leaf emergence and latent period for leaf rust (*Puccinia hordei*) on spring barley, and their significance for disease monitoring. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **95**, 361–71.
- Berger RD, 1981. Comparison of the Gompertz and logistic equations to describe plant disease progress. *Phytopathology* **71**, 716–9.
- Bouami Fe, Jlibene M, Mazouz H, 1996. Partial resistance and interaction in the *Triticum aestivum*–*Septoria tritici* association. *Al Awamia* **95**, 29–38.
- Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ, Brown JKM, 2002. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici blotch pathogen. *Phytopathology* **92**, 439–45.
- Brennan RM, Fitt BDL, Taylor GS, Colhoun J, 1985. Dispersal of *Septoria nodorum* pycnidiospores by simulated rain and wind. *Journal of Phytopathology* **112**, 291–7.
- Chartrain L, Brading PA, Widdowson JP, Brown JKM, 2004. Partial resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* **94**, 497–504.
- Cowger C, Mundt CC, 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**, 624–30.
- Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC, 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* **49**, 445–51.
- Czembor PC, Radecka-Janusik M, Mankowski D, 2010. Virulence spectrum of *Mycosphaerella graminicola* isolates on wheat genotypes carrying known resistance genes to septoria tritici blotch. *Journal of Phytopathology* **159**, 146–54.
- Eyal Z, 1971. The kinetics of pycnospore liberation in *Septoria tritici*. *Canadian Journal of Botany* **49**, 1095–9.
- Eyal Z, Brown MB, 1976. A quantitative method for estimating density of *Septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. *Phytopathology* **66**, 11–4.
- Eyal Z, Scharen AL, Huffman MD, Prescott JM, 1985. Global insights into frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **75**, 1456–62.
- Ghaffary SMT, Faris JD, Friesen TL *et al.*, 2011. New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 125–42.
- Goodwin SB, Ben M'Barek S, Dhillon B *et al.*, 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genetics* **7**, e1002070.

- Gough FJ, 1978. Effect of wheat host cultivars on pycnidiospore production by *Septoria tritici*. *Phytopathology* **68**, 1343–5.
- Jeger MJ, Jones DG, Griffiths E, 1984. Sporulation of *Septoria nodorum* (and *S. tritici*) on spring wheat cvs Kolibri and Maris Butler in relation to growth stage, plant part and time of season. *Annals of Applied Biology* **104**, 31–9.
- Kema GHJ, van Silfhout CH, 1997. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat–*Mycosphaerella graminicola* pathosystem III. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* **87**, 266–72.
- Kema GHJ, Annone JG, Sayoud R, van Silfhout CH, van Ginkel M, de Bree J, 1996a. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat–*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* **86**, 200–12.
- Kema GHJ, Yu D, Rijkenberg FHJ, Shaw MW, Baayen RP, 1996b. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* **86**, 777–86.
- Keon J, Antoniw J, Carzaniga R *et al.*, 2007. Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **20**, 178–93.
- Lannou C, 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 319–38.
- Leyva-Mir SG, Gilchrist-Saavedra LI, Huerta-Espino J, Villaseñor-Mir HE, 2009. Effect of the interaction of isolates of *Septoria tritici* Rob. ex. Desm. inoculated into different genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.), in the latency period. *Revista Mexicana de Fitopatología* **26**, 15–20.
- Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Royle DJ, Coker RR, 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* **46**, 126–38.
- Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, van den Bosch F, 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* **53**, 170–81.
- Mojerlou S, Safaie N, Alizadeh A, Khelghatibana F, 2009. Study of latent period and interactions between different *Septoria tritici* genotypes and different wheat cultivars and lines in greenhouse. *Trakia Journal of Sciences* **7**, 7–17.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**, 409–24.
- Parker SR, Welham S, Paveley ND, Foulkes J, Scott RK, 2004. Tolerance of septoria leaf blotch in winter wheat. *Plant Pathology* **53**, 1–10.
- Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ *et al.*, 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia* **26**, 57–69.
- Risser P, Ebmeyer E, Korzun V, Hartl L, Miedaner T, 2011. Quantitative trait loci for adult-plant resistance to *Mycosphaerella graminicola* in two winter wheat populations. *Phytopathology* **101**, 1209–16.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, 2004. Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and septoria tritici blotch. *Phytopathology* **94**, 712–21.
- Shaner G, 1980. Probits for analyzing latent period data in studies of slow rusting resistance. *Phytopathology* **70**, 1179–82.
- Shaner G, 1983. Growth of uredinia of *Puccinia recondita* in leaves of slow- and fast-rusting wheat cultivars. *Phytopathology* **73**, 931–5.
- Shaw MW, 1990. Effects of temperature, leaf wetness and cultivar on the latent period of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Plant Pathology* **39**, 255–68.
- Shaw MW, 1991. Interacting effects of interrupted humid periods and light on infection of wheat leaves by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*). *Plant Pathology* **40**, 595–607.
- Shaw MW, Bearchell SJ, Fitt BDL, Fraaije BA, 2008. Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytologist* **177**, 229–38.
- Shearer BL, Zadoks JC, 1972. The latent period of *Septoria nodorum* in wheat. 1. The effect of temperature and moisture treatments under controlled conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **78**, 237–47.
- Simon MR, Cordo CA, 1997. Inheritance of partial resistance to *Septoria tritici* in wheat (*Triticum aestivum*): limitation of pycnidia and spore production. *Agronomie* **17**, 343–7.
- Van der Plank JE, 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. New York, USA: Academic Press.
- Van Ginkel M, Scharen AL, 1988. Host–pathogen relationships of wheat and *Septoria tritici*. *Phytopathology* **78**, 762–6.
- Viljanen-Rollinson SLH, Marroni MV, Butler RC, Deng Y, Armour T, 2005. Latent period of *Septoria tritici* blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection* **58**, 256–60.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF, 1974. A decimal code for growth stages of cereals. *Weed Research* **14**, 415–21.
- Zhan J, McDonald BA, 2011. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **20**, 1689–701.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Figure S1** Effect of inoculation procedure on selected aggressiveness variables.

**Table S1** *P* values associated with the analysis of variance for selected aggressiveness variables performed in order to test and optimize experimental conditions.

# The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature!

Frédéric Bernard<sup>1,2</sup>, Ivan Sache<sup>3</sup>, Frédéric Suffert<sup>3</sup> and Michaël Chelle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1091 EGC, F-78850, Thiverval-Grignon, France; <sup>2</sup>ARVALIS – Institut du Végétal, F-91405, Orsay, France; <sup>3</sup>INRA, UR1290 BIOGER, F-78850, Thiverval-Grignon, France

Author for correspondence:

Michaël Chelle

Tel: +33 1 30 81 55 31

Email: chelle@grignon.inra.fr

Received: 31 October 2012

Accepted: 6 December 2012

New Phytologist (2013) 198: 232–240

doi: 10.1111/nph.12134

**Key words:** fungal pathogen, latent period, *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*), phylloclimate, reaction norm, temperature, thermal performance curve, wheat (*Triticum aestivum*).

## Summary

- The thermal performance curve is an ecological concept relating the phenotype of organisms and temperature. It requires characterization of the leaf temperature for foliar fungal pathogens. Epidemiologists, however, use air temperature to assess the impacts of temperature on such pathogens. Leaf temperature can differ greatly from air temperature, either in controlled or field conditions. This leads to a misunderstanding of such impacts.
- Experiments were carried out in controlled conditions on adult wheat plants to characterize the response of *Mycosphaerella graminicola* to a wide range of leaf temperatures. Three fungal isolates were used. Lesion development was assessed twice a week, whereas the temperature of each leaf was monitored continuously.
- Leaf temperature had an impact on disease dynamics. The latent period of *M. graminicola* was related to leaf temperature by a quadratic relationship. The establishment of thermal performance curves demonstrated differences among isolates as well as among leaf layers.
- For the first time, the thermal performance curve of a foliar fungal pathogen has been established using leaf temperature. The experimental setup we propose is applicable, and efficient, for other foliar fungal pathogens. Results have shown the necessity of such an approach, when studying the acclimatization of foliar fungal pathogens.

## Introduction

Among climatic variables, temperature is a major driving force in physiological processes affecting the development of living organisms (Belehradec, 1926; Campbell & Norman, 1998). The biological processes involved in development are driven by the organism's temperature; in ecology this is termed 'body temperature' (Brown *et al.*, 2004; Huey & Kingsolver, 2011). Although widely used by ecologists in the study of ectotherm organisms, the concept of body temperature has been largely ignored by agronomists and epidemiologists. For fungal pathogens that develop mainly onto and into leaves, the body temperature is the leaf temperature (i.e. the temperature they actually perceive; Lovell *et al.*, 2004).

Plants attempt to maintain a leaf temperature equilibrium, which would make metabolic functions operate at nearly optimal temperatures (Helliker & Richter, 2008). For a leaf at equilibrium, the amount of energy that enters via solar radiation and ambient heat is equal to that which exits the leaf through heat loss, scattered light and transpired water. If the leaf is not at equilibrium with its environment, the leaf temperature will change until equilibrium is achieved. Equilibrium for leaves is usually attained in < 1 min (Linacre, 1966; Kitano *et al.*, 1983). The energy budget equation of a single leaf (Gates, 1980) can be expanded to:

$$\text{Absorbed radiation} = \text{Re-radiation} + \text{Convection} + \text{Transpiration} \quad \text{Eqn 1}$$

where re-radiation depends on leaf temperature, convection depends on the temperature gradient between leaf and air, and transpiration depends on the gradient of vapor pressure between leaf and air, which in turn depends on the leaf and air temperatures.

In order to characterize the climate of a leaf within a plant population, Chelle (2005) defined the 'phylloclimate'. Phylloclimate is characterized by a high temporal and spatial variability owing to heterogeneity of microclimatic conditions (wind, radiation, humidity and air temperature) mainly generated by the canopy architecture. Because of the leaf energy balance (Eqn 1), phylloclimate differs from local microclimate, which corresponds to the climate at the scale of a layer (canopy). Microclimate itself differs from the regional climate (mesoclimate) occurring around a given canopy (Lhomme, 1995), because of the complex interaction between the energy fluxes and the canopy structure. Often mesoclimatic variables used are those measured by the network of weather stations.

Moreover, the difference between air and leaf temperatures depends on the enclosure used for experiments (Linacre, 1964; Smith, 1978; Weng & Liao, 2001). For the same air



temperature, the difference in leaf temperature between field and controlled environment can be  $>3^{\circ}\text{C}$  (De Boeck *et al.*, 2012). In addition, the growing environment in a controlled growth chamber or a glasshouse usually has a nonuniform spatial pattern of air temperature (Potvin *et al.*, 1990; Demrati *et al.*, 2007) and of leaf temperature (Kichah *et al.*, 2012). These patterns consistently differ from the pattern in the field.

Thermal performance curves (TPCs), which comprise a special case of reaction norm for phenotypic traits related to fitness, are used to assess the response of organismal development to temperature (Kingsolver *et al.*, 2004; Schulte *et al.*, 2011). These curves have recently re-emerged as a central tool in ecological studies. Thermal performance curves provide objective estimates of optimal temperature, ‘performance breadth’ (the range of temperature with high performance; Huey & Stevenson, 1979; Gilchrist, 1995; Angilletta *et al.*, 2002) and ‘tolerance zone’ (the temperature range of survival of the organism; Jobling, 1981; Huey & Kingsolver, 1989). These curves are strongly nonlinear (Angilletta, 2006).

The difference between air and leaf temperatures combined with the nonlinearity of TPCs leads to errors when using air temperature to estimate the development of organisms onto or into leaves (Helmuth *et al.*, 2010; Pincebourde & Woods, 2012). This has already been reported for insects (Pincebourde *et al.*, 2007; Potter *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011) but not for foliar fungal pathogens. Such studies of such pathogens have only considered air temperature, regardless of the growing system (field, glasshouse, controlled growth chamber).

The aim of this study is to quantify the effect of leaf temperature on the development of a foliar fungal pathogen using a TPC-based approach. To this end, we grew adult wheat plants in a controlled growth chamber or in a glasshouse and inoculated their leaves with the fungus *Mycosphaerella graminicola*. During the course of infection, we measured the temperature of each leaf and assessed disease on the same leaf. The data were used to establish the TPC for the latent period (generation time). The fungus *Mycosphaerella graminicola* is the causal agent of the septoria tritici blotch (STB) disease on wheat. Present wherever wheat is grown, and developing throughout the wheat growing season, this pathogen is exposed to a wide range of temperatures. Thermal adaptation, achieved through both phenotypic plasticity and genetic differentiation, has been demonstrated for *M. graminicola* grown on artificial media (Zhan & McDonald, 2011). The effect of air temperature on the development of *M. graminicola* on wheat leaves is well-known (Hess & Shaner, 1987; Shaw, 1990; Magboul *et al.*, 1992; Chungu *et al.*, 2001), but experiments addressing the effect of leaf temperature have not yet been reported.

## Materials and Methods

### Plant material

Wheat (*Triticum aestivum* L. cv Apache) seeds were sown in Jiffy peat pots (Jiffy Strip Planter; Stange, Norway). Two weeks after sowing, when coleoptiles emerged, plants were vernalized in a

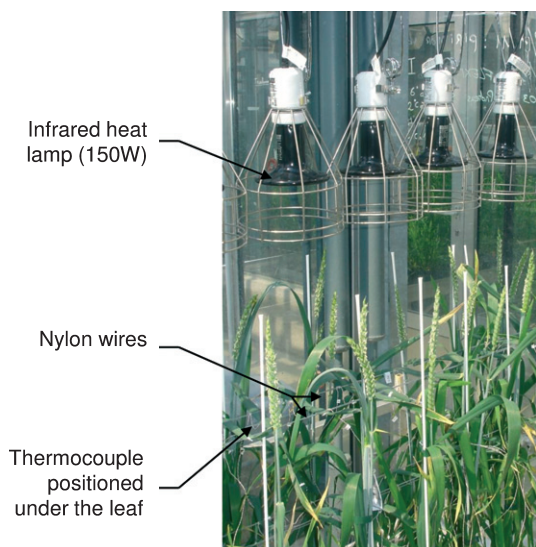
controlled growth chamber (Strader, Pellouailles-les-Vignes, France), equipped with HPI-T PLUS lamps (400 W; Philips Electronics NV, Amsterdam, the Netherlands) for 8 wk at  $6^{\circ}\text{C}$  with a 10-h light period and a 14-h dark period. Seedlings were subsequently transplanted into 1-l pots filled with commercial potting soil mixed with 5 g of fertilizer (Osmocote Exact; Scotts, Heerlen, Netherlands). Plants were sprayed with spiroxamine (Aquarelle SF at  $2\text{ ml l}^{-1}$ ; Bayer CropScience, Lyon, France) as a preventive measure to control powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Plants were then separated into two groups, placed either in a glasshouse or in a controlled growth chamber. Plants were grown under long-day conditions (15 h : 9 h, day : night). The average air temperature measured above plants was  $11.4^{\circ}\text{C}$  in the controlled growth chamber and  $18.4^{\circ}\text{C}$  in the glasshouse. Throughout the experiment, tillers were eliminated weekly to a final count of only three stems per plot.

### Fungal material and leaf inoculation

Three isolates of *M. graminicola*, aggressive to wheat cv. Apache (Suffert *et al.*, 2013), were used: INRA08-FS0001 (isolate 1), INRA08-FS0002 (isolate 2) and INRA08-FS0003 (isolate 3). Isolates 1 and 2 were isolated in France in 2008 from a wheat field located in Grignon ( $48^{\circ}50'43''\text{N}$ ,  $+1^{\circ}56'45''\text{E}$ ); isolate 3 was isolated the same year from a wheat field located in Le Rheu ( $+48^{\circ}5'54''\text{N}$ ,  $-1^{\circ}47'52''\text{E}$ ). Grignon and Le Rheu are under mid-latitude continental and true temperate maritime climates, respectively. Inoculation was performed at growth stage 39 (Zadoks *et al.*, 1974) when the flag leaf was fully emerged, as described in detail by Suffert *et al.* (2013). Each leaf was inoculated with a single isolate. Conidia suspensions were prepared the day of inoculation by flooding the surface of 5-d-old culture on Petri dishes with water and then scraping the potato dextrose agar (PDA) surface with a glass rod to release conidia. Concentration was adjusted to  $10^5$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ . Three drops (0.15 ml) of Tween 20 (Sigma-Aldrich) were added to 50 ml of inoculum solution to prevent drift of inoculum. The suspension was applied with a paintbrush over a length of 25 mm on penultimate (F2) and flag (F1) leaves of the main tiller. Inoculated leaves were enclosed in a transparent polyethylene bag for 72 h, which was moistened with distilled water to provide optimal humidity conditions for infection. Once infection was completed, to avoid lighting artifacts, inoculated leaves were maintained horizontally with nylon wires at the height of each leaf layer (Fig. 1). The number of inoculated leaves for each enclosure, leaf rank and isolate is given in Table 1.

### Leaf temperature measurements

The temperature of each leaf was measured with thin T-type thermocouples (diameter 0.2 mm) positioned under the leaf in contact with the inoculated area. Each thermocouple was connected to a datalogger (Campbell Scientific, North Logan, UT, USA) that recorded leaf temperature every 20 s, averaged over 15 min. Owing to the high number of leaves, five dataloggers were used. The contact of thermocouples with leaves was checked



**Fig. 1** Close-up of the experimental setup in the glasshouse. Wheat (*Triticum aestivum*) leaves (F1 (flag leaves) and F2 (second leaves) of the main tiller) inoculated with *Mycosphaerella graminicola* were maintained horizontally with nylon wires. The range of leaf temperature was increased using various densities of black infrared heat lamps (150 W) positioned 40 cm above the leaves. Leaf temperatures were measured by thermocouples positioned under the leaves in contact with the inoculated areas.

**Table 1** Number of wheat (*Triticum aestivum*) leaves inoculated with three *Mycosphaerella graminicola* isolates

Location	Growth chamber		Glasshouse	
	F1	F2	F1	F2
<i>INRA08-FS0001</i> (isolate 1)	17	19	12	20
<i>INRA08-FS0002</i> (isolate 2)	18	16	8	20
<i>INRA08-FS0003</i> (isolate 3)	14	20	9	18

F1, flag leaves; F2, second leaves.

three times a week. The thermocouples were calibrated before and after the experiment. To avoid bias from using multiple dataloggers, the temperature of a single brass block was measured continuously by each datalogger. Temperature data homogenization was performed based on brass block temperature measurements and on results of pre- and post-experiment calibrations. The range of leaf temperature was increased, without altering light incidence, using black infrared heat lamps (ceramic heat emitter 150 W; Hagen, Baie d'Urfé, QC, Canada) positioned in groups of three lamps above 33% of the leaves and five lamps above 33% of the leaves. No lamp was positioned above the remaining leaves.

### Lesion development

From 12 d to 78 d post-inoculation (dpi), the development of lesions on each leaf was assessed every 2–4 d. The proportions of the inoculated area covered by chlorosis, necrosis and pycnidia (spore-bearing organs) were estimated visually

by the same assessor. In the following text, we call the temporal progress of chlorotic and necrotic areas 'disease dynamics' and the temporal progress of the area covered by pycnidia 'sporulating area dynamics'. Disease assessment ended when the leaf apical senescent area coalesced with the diseased area.

### Curve fitting and disease assessment

**Lesion and sporulating areas** We denoted the maximum percentage of the inoculated area covered by chlorosis and necrosis together as  $LES_{\max}$  and the maximum percentage of the inoculated area covered by spores as  $SPO_{\max}$ . For each leaf, a Gompertz growth curve (Hunt, 1982) was fitted to the sporulating area dynamics,  $SPO(t)$ .

$$SPO(t) = SPO_{\max} \times e^{(c \times e^{(d-t)})} \quad \text{Eqn 2}$$

In this equation  $c$  is the growth rate at the inflection point, and  $d$  is the time (in dpi) at inflection point.

**Incubation and latent periods** Incubation period, the time needed for lesions to appear, was defined as the time to reach 50% of leaves with visible lesions (Johnson, 1980; Shaw, 1986; Douaiher *et al.*, 2007). Latent period, LP, the time needed for a generation of the pathogen, was defined as the time elapsed from inoculation to 37% of  $SPO_{\max}$ , assessed from the sporulation area fitted curve (Suffert *et al.*, 2013). The value of 37% corresponds to the ordinate at the point of inflection of Gompertz curve (Winsor, 1932). Incubation and latent period were expressed in dpi. Once the latent period had been determined for all leaves, a quadratic function (Eqn 3) was fitted to the relationship between leaf temperature and latent period:

$$LP(T_l) = LP_{\min} + Curv \times (T_l - T_{l,opt})^2 \quad \text{Eqn 3}$$

$LP_{\min}$  is the minimal latent period at optimal leaf temperature ( $T_{l,opt}$ ),  $Curv$  is a shape parameter and  $T_l$  is the mean leaf temperature during the experiment.

**Establishment of thermal performance curves** As proposed by Shaw (1990), we expressed the performance as the inverse of the latent period. Eqn 4 corresponds to the TPC of *M. graminicola* latent period to leaf temperature.

$$TPC(T_l) = 1 / (LP_{\min} + Curv \times (T_l - T_{l,opt})^2) \quad \text{Eqn 4}$$

**Analysis of leaf layer effect on latent period** Because of the unequal distribution of mean leaf temperatures between flag leaves (F1) and second leaves (F2), the analysis of leaf layer effect was performed on the subsample that included all the leaves having a mean leaf temperature between 17.0°C and 17.5°C. For this temperature range, mean leaf temperature for F1 ( $n=12$ ) and F2 ( $n=12$ ) groups is equal ( $P=0.44$ ).

## Statistical analysis

Disease curve fitting and subsequent statistical analysis were performed using R statistical software v. 2.12.1 (R Development Core Team, 2010). Mean leaf temperatures ranged from 10.1°C to 16.4°C in the controlled growth chamber and from 16.3°C to 20.9°C in the glasshouse. For the sake of clarity, the disease dynamics was analysed by grouping leaves in classes according to their mean leaf temperature. Hence, leaves were grouped in five classes of equal amplitude: C1 from 10.1°C to 12.3°C ( $n=83$ ), C2 from 12.3°C to 14.4°C ( $n=17$ ), C3 from 14.4°C to 16.6°C ( $n=12$ ), C4 from 16.6°C to 18.7°C ( $n=69$ ), and C5 from 18.7°C to 20.9°C ( $n=10$ ). Hereafter, C1<sub>L</sub>, C2<sub>L</sub>, C3<sub>L</sub>, C4<sub>L</sub>, and C5<sub>L</sub> will refer to leaves having mean leaf temperatures in classes C1, C2, C3, C4 and C5, respectively.

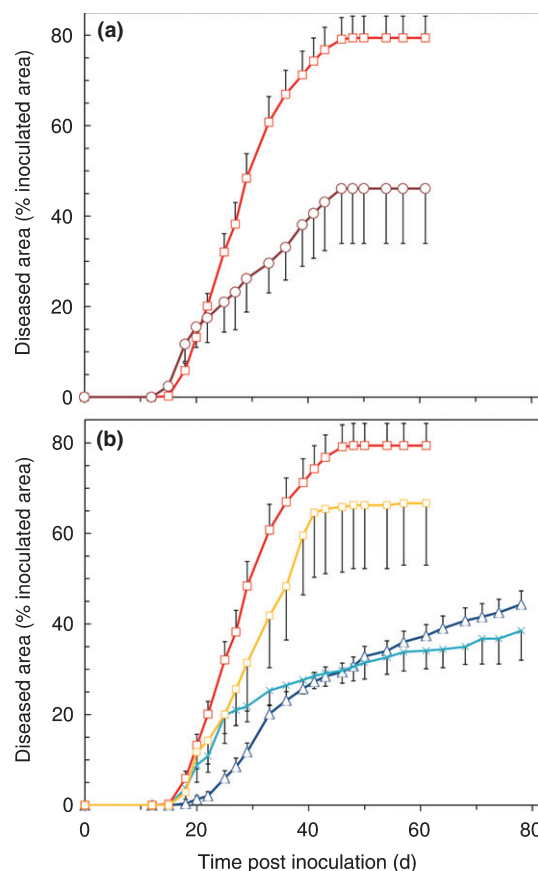
## Results

### Disease dynamics

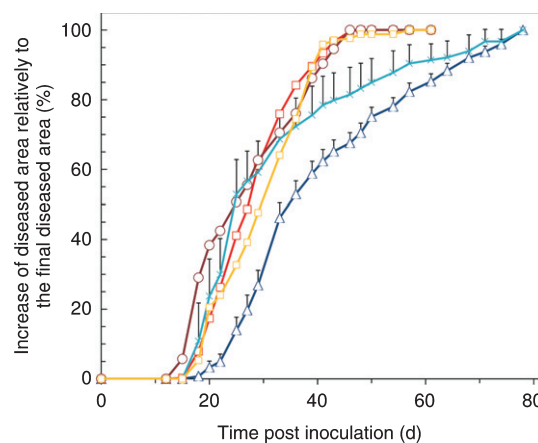
Lesions appeared on all inoculated leaves except for five leaves, which were excluded from the dataset. Disease assessment was carried out until 61 dpi on C3<sub>L</sub>, C4<sub>L</sub> and C5<sub>L</sub> and until 78 dpi on C1<sub>L</sub> and C2<sub>L</sub>, depending on leaf senescence and disease dynamics. The first visible lesions (Fig. 2a) appeared 15 dpi on C4<sub>L</sub> and C5<sub>L</sub>, with, respectively, 17% and 70% of the leaves having visible lesions (chlorosis and/or necrosis areas). The occurrence of the first lesions was delayed until 18 dpi for 13%, 71% and 67% of C1<sub>L</sub>, C2<sub>L</sub> and C3<sub>L</sub>, respectively (Fig. 2b). The incubation period lasted 15 d on C5<sub>L</sub>, 18 d on C2<sub>L</sub>, C3<sub>L</sub>, and C4<sub>L</sub>, and 25 d on C1<sub>L</sub>. The incubation period was delayed by 10 dpi between leaves of the two extreme leaf temperature classes (C1 and C5).

Lesions developed more slowly on C1<sub>L</sub> than on other leaf classes (Fig. 2b). Differences between mean diseased area on C1<sub>L</sub> compared with C3<sub>L</sub>, C4<sub>L</sub>, and C5<sub>L</sub> remained highly significant from 15 dpi to 78 dpi. Lesions developed similarly on C2<sub>L</sub> and C3<sub>L</sub> until 27 dpi. From 29 dpi to the end of the disease assessment period, lesions on C2<sub>L</sub> developed more slowly to reach a disease level similar to C1<sub>L</sub>. Disease dynamics was similar on C3<sub>L</sub> and C4<sub>L</sub> throughout most of the experiment. Confidence intervals of C3<sub>L</sub> were large because of the low number of leaves ( $n=12$ ), which prevented demonstration of differences between C3<sub>L</sub> and C4<sub>L</sub>, except from 27–36 dpi, a time span that corresponds to lesion expansion. The mean area of lesions developed on the hottest leaves (C5<sub>L</sub>) increased significantly more rapidly than on C4<sub>L</sub> from 15 dpi to 18 dpi (Fig. 2a). Lesions then developed similarly until 22 dpi. Finally, from 25 dpi to the end of the disease assessment period (61 dpi for both classes), lesion development was higher on C4<sub>L</sub> than on C5<sub>L</sub>. The leaf temperature class C4, from 16.6°C to 18.7°C, appeared to be the optimal range for the development of *M. graminicola* in our experimental conditions.

We expressed the normalized disease dynamic as the increase in the lesion area (covered by chlorosis and necrosis) relative to the final lesion area (LES<sub>max</sub>) (Fig. 3). The differences in



**Fig. 2** Disease dynamics (percentage of the inoculated area) of *Mycosphaerella graminicola* on wheat (*Triticum aestivum*) leaves in five leaf temperature classes. (a) Optimal and supraoptimal leaf temperature classes C4 (squares) and C5 (circles). (b) Optimal and suboptimal leaf temperature classes C1 (triangles), C2 (crosses), C3 (yellow squares), and C4 (red squares). Error bars are confidence interval (95%), for the sake of clarity, only one-half of the error bars are shown.



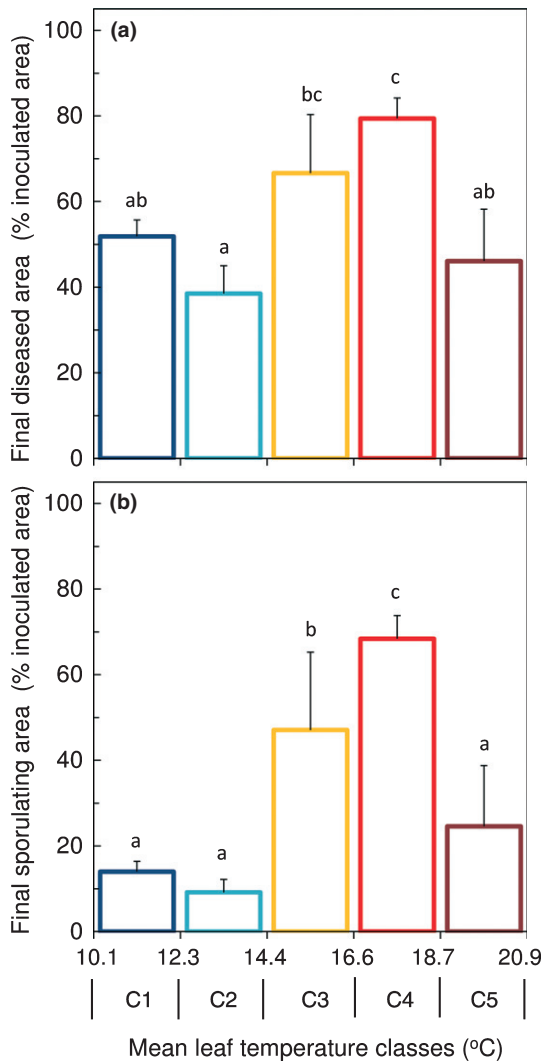
**Fig. 3** Normalized disease dynamics of *Mycosphaerella graminicola* on wheat (*Triticum aestivum*) leaves in five leaf temperature classes: C1 (triangles), C2 (crosses), C3 (yellow squares), and C4 (red squares), and C5 (circles). Error bars are confidence intervals (95%); for the sake of clarity, only one-half of each error bar is shown.

normalized disease dynamics between leaf temperature classes were less marked (Fig. 3) than for absolute disease dynamics (Fig. 2). Lesions on C5<sub>L</sub> developed first and more rapidly than

on other classes ( $P < 0.001$ ), then normalized disease dynamics were similar for  $C_{3L}$ ,  $C_{4L}$  and  $C_{5L}$ . Normalized disease dynamics on  $C_{2L}$ ,  $C_{3L}$  and  $C_{4L}$  were similar until 36 dpi. From 39 dpi to 61 dpi, normalized disease dynamics were slower on  $C_{2L}$  and similar on  $C_{3L}$  and  $C_{4L}$ . Finally, from 64 dpi to 82 dpi, normalized disease dynamics were similar on  $C_{1L}$  and  $C_{2L}$ . Before 64 dpi, normalized disease dynamics were slower on  $C_{1L}$  than on other classes ( $P < 0.03$ ).

The  $LES_{max}$  depended greatly on the leaf temperature classes (Fig. 4a). The leaves of the two lowest classes and the highest class ( $C_1$ ,  $C_2$ , and  $C_5$ ) had the lowest  $LES_{max}$  (38.5% to 51.9% of the inoculated area). The  $LES_{max}$  was higher on  $C_{4L}$  (79.4%) than on leaves of previously cited classes ( $P < 0.001$ ). Class  $C_{3L}$  had an intermediate final diseased area that was significantly different only from that of  $C_{2L}$  ( $P \leq 0.005$ ).

Differences in  $SPO_{max}$  between classes were even more marked than for  $LES_{max}$  (Fig. 4b). As for  $LES_{max}$ ,  $SPO_{max}$  was also



**Fig. 4** (a) Final diseased area ( $LES_{max}$ ) and (b) sporulating area ( $SPO_{max}$ ) on wheat (*Triticum aestivum*) leaves infected by *Mycosphaerella graminicola* in five mean leaf temperature classes. Values are means  $\pm$  confidence interval (95%); letters represent significant differences by Student's *t*-test ( $P \leq 0.05$ ).

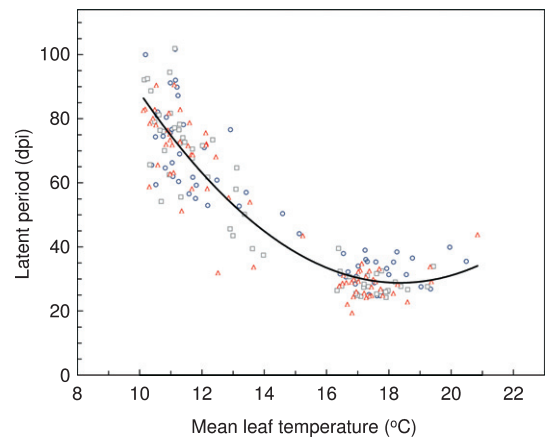
maximal on leaves in the optimal temperature class ( $C_{4L}$ : 68.4%,  $P < 0.003$ ). Classes  $C_{1L}$  (14.0%),  $C_{2L}$  (9.2%) and  $C_{5L}$  (24.6%) had the lowest  $SPO_{max}$  ( $P < 0.034$ ). On  $C_{3L}$ ,  $SPO_{max}$  was intermediate (47.1%) and significantly different from other classes. The ratio  $SPO_{max} : LES_{max}$ , which represents the proportion of the diseased area developing spores, was lower for  $C_{1L}$  (0.27),  $C_{2L}$  (0.24) and  $C_{5L}$  (0.53) than for  $C_{4L}$  (0.86) and  $C_{3L}$  (0.71).

### Latent period

Latent period ranged from 19 dpi to 102 dpi (Fig. 5): from 19 dpi to 90 dpi for isolate 1, from 24 dpi to 102 dpi for isolate 2 and from 25 dpi to 102 dpi for isolate 3. The variability of the response of the latent period to leaf temperature was higher at low leaf temperature: at leaf temperature between 10°C and 12°C, latent period varied between 51 dpi and 102 dpi while at leaf temperature from 17°C to 19°C, latent period varied between 23 dpi and 39 dpi. For the three isolates studied, the latent period decreased with increasing mean leaf temperature, reached a minimum and eventually increased slightly beyond 20°C. From Eqn 3, a minimal latent period of 28.8 dpi was reached for a temperature of 18.4°C.

### Between-isolates variability

The TPCs of the three isolates tested suggested a differential response of *M. graminicola* isolates to leaf temperature (Fig. 6). The fit of Eqn 4 to the data, which describes the performance of latent period of *M. graminicola* depending on mean leaf temperature, was highly significant for the three isolates ( $R^2$  from 0.83 to 0.89, Table 2). The values of parameter *Curv* for isolates 1 and 2 were not significantly different ( $P = 0.35$ ) from each other but differed from the value for isolate 3 ( $P < 0.001$ ). The values of the other two parameters were different for the three isolates ( $P < 0.02$ , Table 2). Consequently, each isolate has its own TPC. The optimal mean leaf temperatures calculated from the TPCs



**Fig. 5** Effect of mean temperature of wheat (*Triticum aestivum*) leaves on the latent period (number of days post-inoculation (dpi) to reach 37% of final sporulating area) of three isolates of *Mycosphaerella graminicola* (triangles) isolate 1, (squares) isolate 2, (circles) isolate 3. The curve represents the fitting of Eqn 2 to the data pooled for the three isolates.



**Table 2** Fitting of Eqn 4 to thermal performance curves (TPCs) obtained for three isolates of *Mycosphaerella graminicola*

Isolates	Parameters				
	<i>n</i>	LP <sub>min</sub> (dpi)	Curv (dpi °C <sup>-2</sup> )	T <sub>l,opt</sub> (°C)	R <sup>2</sup>
Isolate 1	61	28.0 ± 1.6 (a)	0.90 ± 0.16 (a)	18.1 ± 0.7 (a)	0.88
Isolate 2	62	26.9 ± 2.2 (b)	0.86 ± 0.20 (a)	18.5 ± 0.9 (b)	0.89
Isolate 3	68	31.1 ± 2.5 (c)	0.72 ± 0.19 (b)	18.9 ± 1.2 (c)	0.83
Isolates pooled	191	28.8 ± 1.2	0.85 ± 0.11	18.4 ± 0.5	0.86

Eqn 4:  $TPC(T_l) = 1/(LP_{min} + Curv \times (T_l - T_{l,opt})^2)$ . LP, latent period (dpi); LP<sub>min</sub>, minimum latent period at optimal temperature (dpi); T<sub>l</sub>, mean wheat (*Triticum aestivum*) leaf temperature (°C); T<sub>l,opt</sub>, optimal mean leaf temperature (°C); dpi, days post-inoculation. Values are means ± SD. Letters represent significant differences of parameter values between isolates by Student's *t*-test ( $P \leq 0.05$ ).

were 18.1, 18.5 and 18.9°C for isolates 1, 2 and 3, respectively. The optima were significantly different between isolates ( $P < 0.02$ ). Latent period at optimal mean leaf temperature was 28.0, 26.9 and 31.1 dpi for isolates 1, 2 and 3 respectively (Table 2).

### Effect of leaf layer on latent period

The latent period was significantly longer on F1 leaves ( $31.9 \pm 3.4$  dpi) than on F2 leaves ( $27.1 \pm 3.7$  dpi) at mean leaf temperature between 17.0°C and 17.5°C ( $P = 0.004$ ). The latent period was up to 4 d longer on F1 leaves than on F2 leaves.

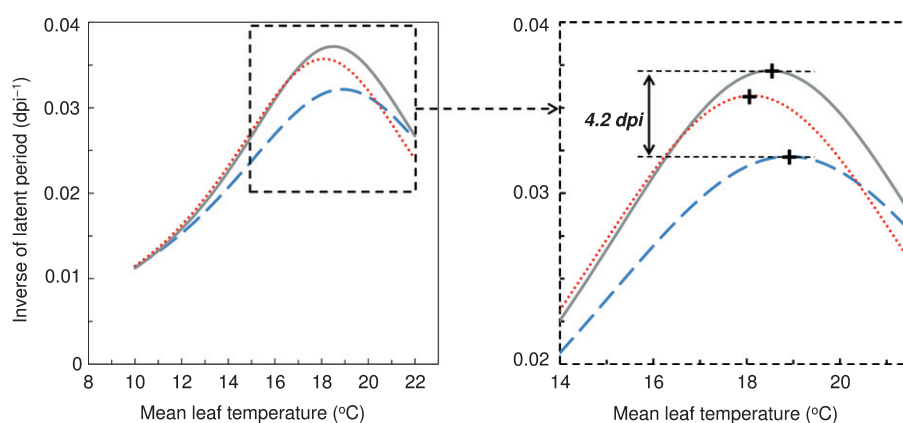
## Discussion

To the best of our knowledge, we have established the first thermal performance curve (TPC) of a foliar fungal pathogen using the temperature actually perceived by the fungus, which is the temperature of the infected leaf. The previously published TPCs (Maziero *et al.*, 2009; Milus *et al.*, 2009) were based on the air temperature, which is an unreliable indicator of the leaf temperature. This may lead to erroneous results and interpretations, as shown by ecologists studying trees (Helliker & Richter, 2008), insects (Potter *et al.*, 2009) and intertidal organisms (Helmuth

*et al.*, 2010). In parallel to our study, Bonde *et al.* (2012) studied the effect of temperature fluctuations on a foliar fungal pathogen, measuring simultaneously leaf and air temperatures in controlled growth chambers. In their specific experiments, they have found that leaf and air temperatures in their controlled growth chambers were nearly equal, concluding that the use of air temperature was relevant. Their results were probably an exception, as it has been largely proved that uncontrolled environmental variations in controlled growth chambers and glasshouses generate an heterogeneous pattern of air temperature (Potvin *et al.*, 1990; Demrati *et al.*, 2007) and leaf temperature (Kichah *et al.*, 2012). To ensure that no effect of such heterogeneities occurs when establishing TPC, we propose the necessity of measuring the temperature actually perceived by foliar pathogens, that is, the temperature of each individual diseased leaf. In this study, we continuously measured the temperature of 191 wheat leaves to establish the TPC of *M. graminicola* characterizing its latent period.

The methodology we set up is relevant for studies on other foliar fungal pathogens. Wherever the experiment is carried out (controlled growth chamber, glasshouse or field) the temperature measured will be the body temperature of fungus. This setup has allowed the generation of TPCs for a wide range of leaf temperatures (from 10.1°C to 20.9°C) using infrared heat lamps. Achieving such a range of leaf temperature necessitated only two experiments in controlled growing environments, which were set up with two different air temperatures. To obtain the same results for air temperature would have required several experiments (one for each air temperature). Moreover, as the use of infrared heat lamps can modify the humidity and the vapor–air pressure gradient between substomatal cavities and atmosphere (Amthor *et al.*, 2010), we avoided possible artifacts by having well-watered plants during our experiments. This followed the conclusion of Wall *et al.* (2011), who found that no effect on gas exchange or water relations was associated with the infrared warming lamps when a supplemental irrigation minimized plant-to-air water vapor pressure differences between infrared-warmed and non-warmed plots. Such a methodology will have to be applied to field conditions to take into account its specificity regarding the leaf energy budget, especially the fluctuating feature of its terms (air temperature, radiation, wind, etc.).

**Fig. 6** Thermal performance curves (TPC) for latent period of three *Mycosphaerella graminicola* isolates infecting wheat (*Triticum aestivum*) leaves: (red dotted line) INRA08-FS0001 (isolate 1), (solid grey line) INRA08-FS0002 (isolate 2), and (dashed blue line) INRA08-FS0003 (isolate 3). Latent period is the number of dpi (days post-inoculation) to reach 37% of final sporulating area; +, optimal mean leaf temperatures determined for each isolate (see Table 2 for parameter values).



The optimal mean leaf temperature for the latent period of *M. graminicola* varied significantly between 18.1°C and 18.9°C, depending on isolates, in our experimental conditions (Fig. 6, Table 2). The reported optimal air temperature for the latent period of *M. graminicola* varies between 15°C and 25°C, both in field (Shaw, 1990; Lovell *et al.*, 2004) and controlled conditions (Hess & Shaner, 1987; Shaw, 1990; Magboul *et al.*, 1992). However, optimal temperatures obtained with air temperature and leaf temperature should not be compared directly, as the difference between the two temperatures varies, depending on the growing conditions through the leaf energy budget (Eqn 1). A similar increase in latent period as observed by us for supraoptimal temperatures has been previously described for *M. graminicola* (Shaw, 1990) and *Phytophthora infestans* (Andrade-Piedra *et al.*, 2005), but using air temperature.

Latent period was significantly longer on flag leaves (F1) than on second leaves (F2) at equal leaf temperature. By contrast, Shaw (1990), also experimenting in controlled growth chambers, found a longer latent period on F2. The difference between Shaw's result and ours illustrates the possible error in the interpretation of results when measuring air temperature instead of leaf temperature for foliar fungal epidemics studies. As F2 leaves are lower than F1 leaves inside the canopy, they are further from the light sources and can be shaded by F1 leaves and stems and thus receive less light irradiance. Thus, in a controlled growth chamber, leaf temperature is higher on F1 leaves than on F2 leaves for a given air temperature. As a consequence of the higher leaf temperature, latent period on F1 leaves, if deduced from air temperature measurements, is reduced. This may explain the results observed by Shaw. The difference of latent period we have observed between F1 and F2 leaves at equal leaf temperatures may be explained by other factors known to influence fungal development, such as morphology, age and physiology of the leaves (Lovell *et al.*, 2004). Further experiments are required, involving inoculation on other leaf layers submitted to temperature ranges consistent with the wheat growth stage, including for example the lowest leaf layers at seedling stage under winter conditions.

Formulating the TPC of latent period as a function of leaf temperature should improve the models of plant disease epidemics. Indeed, as pointed out by Shaw (1990), the relationship between temperature and latent period of *M. graminicola* is not linear (Fig. 5). Thus, regarding the range of temperature perceived by the fungal pathogen, latent period cannot be summarized as a single thermal time-value, although this is commonly done in experimental studies (Thomas *et al.*, 1989; Lovell *et al.*, 2004) and models (O'Callaghan *et al.*, 1994; Audsley *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2008). Moreover, leaf temperature instead of air temperature and related TPCs ought to be considered when simulating the interaction between canopy architecture and foliar fungal epidemics (Pangga *et al.*, 2011). Admittedly, leaf temperature may appear less easily accessible to measurement than air temperature. However, it can be indirectly estimated by providing soil–vegetation–atmosphere transfer (SVAT) models with data recorded by standard weather stations. These models, such as CUPID (Norman, 1979), dynamically simulate the

temperature of each leaf layer. A similar approach allowed the simulation of the leaf wetness duration (LWD), another climatic variable that drives foliar fungal epidemics, whose estimation was preferred to direct measurement of air humidity that introduced some artifacts into epidemics models (Dalla Marta *et al.*, 2005).

The sensitivity of physiological and ecological traits of fungi to temperature has been widely studied (Dell *et al.*, 2011). Some studies have measured the TPCs of different fungi for a wide range of temperatures (Shaw, 1990; Fargues *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 2005) but never for foliar pathogens while measuring the leaf temperature. We have found that the TPCs of *M. graminicola* for latent period based on leaf temperature varied significantly between the three isolates (Table 2). The identification of diverse TPCs for each isolate is a characterization of *M. graminicola* phenotypic plasticity. Measuring the growth on artificial media of *M. graminicola* isolates sampled from five host populations in four locations, Zhan & McDonald (2011) have shown a local adaptation of the fungus, concluding that temperature is a selective agent responsible for the adaptation of *M. graminicola*. In contrast to the method of Zhan & McDonald (2011), who studied the adaptation of the fungus to air temperature in agar medium, our device made it possible to study the effect of temperature on the fungus development while accounting for its interactions with the leaf physiology. To identify and quantify the thermal adaptation of *M. graminicola*, a greater number of isolates should be grown on living leaves. This should require the use of adult plant leaves to consider the physiological aspects of the plant–pathogen interaction (Wang *et al.*, 2009; Diamond & Kingsolver, 2012). Finally, TPCs are known to have great potential for predicting the responses of populations or species to climate change, as they can be incorporated into mechanistic models of response of organisms to climate change (Schulte *et al.*, 2011). Here, we have made a first step toward a new way for the study of the adaptation of *M. graminicola* (and other foliar fungal pathogens) to climate change.

## Acknowledgements

We thank Fabrice Duhamel, Alain Fortineau and Nathalie Galet for technical assistance, Robert Faivre (INRA, Toulouse, France) for statistical advice and Sylvain Pincebourde (CNRS, Tours, France) for helpful discussions on physical ecology. We are also grateful to Prof. Vince P. Gutschick (New Mexico State University, Las Cruces, USA) for his critical reading of the manuscript. This study was funded by INRA ('Plant Health and Environment' and 'Environment and Agronomy' Divisions) and ARVALIS – Institut du Végétal.

## References

- Amthor JS, Hanson PJ, Norby RJ, Wullschlegler SD. 2010. A comment on 'Appropriate experimental ecosystem warming methods by ecosystem, objective, and practicality' by Aronson and McNulty. *Agricultural and Forest Meteorology* 150: 497–498.
- Andrade-Piedra JL, Hijmans RJ, Forbes GA, Fry WE, Nelson RJ. 2005. Simulation of potato late blight in the Andes. I: Modification and parameterization of the LATEBLIGHT model. *Phytopathology* 95: 1191–1199.

- Angilletta MJ. 2006. Estimating and comparing thermal performance curves. *Journal of Thermal Biology* 31: 541–545.
- Angilletta MJ, Niewiarowski PH, Navas CA. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology* 27: 249–268.
- Audsley E, Milne A, Paveley N. 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. *Annals of Applied Biology* 147: 161–172.
- Behrdradek J. 1926. Influence of temperature on biological processes. *Nature* 118: 117–118.
- Bonde MR, Nester SE, Berner DK. 2012. Effects of daily temperature highs on development of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean. *Phytopathology* 102: 761–768.
- Brown JH, Gillooly JF, Allen AP, Savage VM, West GB. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85: 1771–1789.
- Campbell GS, Norman JM. 1998. *An introduction to environmental biophysics, 2nd edn*. New York, NY, USA: Springer-Verlag.
- Chelle M. 2005. Phylloclimate or the climate perceived by individual plant organs: what is it? How to model it? What for? *New Phytologist* 166: 781–790.
- Chungu C, Gilbert J, Townley-Smith F. 2001. *Septoria tritici* blotch development as affected by temperature, duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. *Plant Disease* 85: 430–435.
- Dalla Marta A, Magarey RD, Orlandini S. 2005. Modelling leaf wetness duration and downy mildew simulation on grapevine in Italy. *Agricultural and Forest Meteorology* 132: 84–95.
- De Boeck HJ, De Groote T, Nijfs I. 2012. Leaf temperatures in glasshouses and open-top chambers. *New Phytologist* 194: 1155–1164.
- Dell AI, Pawar S, Savage VM. 2011. Systematic variation in the temperature dependence of physiological and ecological traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108: 10591–10596.
- Demrati H, Boulard T, Fatnassi H, Bekkaoui A, Majdoubi H, Elattir H, Bouirden L. 2007. Microclimate and transpiration of a greenhouse banana crop. *Biosystems Engineering* 98: 66–78.
- Diamond SE, Kingsolver JG. 2012. Host plant adaptation and the evolution of thermal reaction norms. *Oecologia* 169: 353–360.
- Douaiher MN, Nowak E, Durand R, Halama P, Reignault P. 2007. Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall-degrading enzymes produced *in vitro*: the importance of xylanase and polygalacturonase. *Plant Pathology* 56: 79–86.
- Fargues J, Maniania NK, Delmas JC, Smits N. 1992. Influence of temperature on *in vitro* growth of entomopathogenic hyphomycetes. *Agronomie* 12: 557–564.
- Gates DM. 1980. *Biophysical ecology*. New York, NY, USA: Springer-Verlag.
- Gilchrist GW. 1995. Specialists and generalists in changing environments – 1. Fitness landscapes of thermal sensitivity. *American Naturalist* 146: 252–270.
- Helliker BR, Richter SL. 2008. Subtropical to boreal convergence of tree-leaf temperatures. *Nature* 454: 511–514.
- Helmuth B, Broitman BR, Yamane L, Gilman SE, Mach K, Mislan KAS, Denny MW. 2010. Organismal climatology: analyzing environmental variability at scales relevant to physiological stress. *Journal of Experimental Biology* 213: 995–1003.
- Hess DE, Shaner G. 1987. Effect of moisture and temperature on development of septoria tritici blotch in wheat. *Phytopathology* 77: 215–219.
- Huey RB, Kingsolver JG. 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends in Ecology & Evolution* 4: 131–135.
- Huey RB, Kingsolver JG. 2011. Variation in universal temperature dependence of biological rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108: 10377–10378.
- Huey RB, Stevenson RD. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms – discussion of approaches. *American Zoologist* 19: 357–366.
- Hunt R. 1982. *Plant growth curves the functional approach to plant growth analysis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Jobling M. 1981. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology* 19: 439–455.
- Johnson DA. 1980. Effect of low temperature on the latent period of slow and fast rusting water wheat *Triticum aestivum* genotypes. *Plant Disease* 64: 1006–1008.
- Kichah A, Bournet P-E, Migeon C, Boulard T. 2012. Measurement and CFD simulation of microclimate characteristics and transpiration of an *Impatiens* pot plant crop in a greenhouse. *Biosystems Engineering* 112: 22–34.
- Kingsolver JG, Izem R, Ragland GJ. 2004. Plasticity of size and growth in fluctuating thermal environments: comparing reaction norms and performance curves. *Integrative and Comparative Biology* 44: 450–460.
- Kitano M, Eguchi H, Matsui T. 1983. Analysis of heat balance of leaf with reference to stomatal responses to environmental factors. *Biotronics* 12: 19–27.
- Lhomme JP. 1995. Modélisation du microclimat végétal en relation avec l'épidémiologie. In: Savary S, ed. *Modélisation en protection des cultures*. Paris, France: ORSTOM, 73–80.
- Linacre ET. 1964. A note on a feature of leaf and air temperatures. *Agricultural Meteorology* 1: 66–72.
- Linacre ET. 1966. *Resistances impeding the diffusion of water vapour from leaves and crops*. PhD thesis, London University, London, UK.
- Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, Van den Bosch F. 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53: 170–181.
- Magboul AM, Geng S, Gilchrist DG, Jackson LF. 1992. Environmental influence on the infection of wheat by *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 82: 1407–1413.
- Maziero JMN, Maffia LA, Mizubuti ESG. 2009. Effects of temperature on events in the infection cycle of two clonal lineages of *Phytophthora infestans* causing late blight on tomato and potato in Brazil. *Plant Disease* 93: 459–466.
- McLean MA, Angilletta MJ, Williams KS. 2005. If you can't stand the heat, stay out of the city: thermal reaction norms of chitinolytic fungi in an urban heat island. *Journal of Thermal Biology* 30: 384–391.
- Milus EA, Kristensen K, Hovmoller MS. 2009. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology* 99: 89–94.
- Norman JM. 1979. Modeling the complete crop canopy. In: Barfield BJ, Gerber JF, eds. *Modification of the aerial environment of plants*. St Joseph, MI, USA: American Society of Agricultural Engineers, 249–277.
- O'Callaghan JR, Dahab MH, Hossain AHMS, Wyseure GCL. 1994. Simulation of *Septoria tritici*-winter wheat interactions. *Computers and Electronics in Agriculture* 11: 309–321.
- Pangga IB, Hanan J, Chakraborty S. 2011. Pathogen dynamics in a crop canopy and their evolution under changing climate. *Plant Pathology* 60: 70–81.
- Park J-J, Park KW, Shin K-I, Cho K. 2011. Evaluation and comparison of effects of air and tomato leaf temperatures on the population dynamics of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) in cherry tomato grown in greenhouses. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 29: 420–432.
- Pincebourde S, Sinoquet H, Combes D, Casas J. 2007. Regional climate modulates the canopy mosaic of favourable and risky microclimates for insects. *Journal of Animal Ecology* 76: 424–438.
- Pincebourde S, Woods HA. 2012. Climate uncertainty on leaf surfaces: the biophysics of leaf microclimates and their consequences for leaf-dwelling organisms. *Functional Ecology* 26: 844–853.
- Potter K, Davidowitz G, Woods HA. 2009. Insect eggs protected from high temperatures by limited homeothermy of plant leaves. *Journal of Experimental Biology* 212: 3448–3454.
- Potvin C, Lechowicz MJ, Bell G, Schoen D. 1990. Spatial, temporal, and species-specific patterns of heterogeneity in growth chamber experiments. *Canadian Journal of Botany* 68: 499–504.
- R Development Core Team. 2010. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Robert C, Fournier C, Andrieu B, Ney B. 2008. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology* 35: 997–1013.
- Schulte PM, Healy TM, Fangué NA. 2011. Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. *Integrative and Comparative Biology* 51: 691–702.

- Shaw MW. 1986. Effects of temperature and leaf wetness on *Pyrenophora teres* growing on barley cv. Sonja. *Plant Pathology* 35: 294–309.
- Shaw MW. 1990. Effects of temperature, leaf wetness and cultivar on the latent period of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Plant Pathology* 39: 255–268.
- Smith WK. 1978. Temperatures of desert plants – another perspective on adaptability of leaf size. *Science* 201: 614–616.
- Suffert F, Sache I, Lannou C. 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology*, in press.
- Thomas MR, Cook RJ, King JE. 1989. Factors affecting development of *Septoria tritici* in winter wheat and its effect on yield. *Plant Pathology* 38: 246–257.
- Wall GW, Kimball BA, White JW, Ottman MJ. 2011. Relations of spring wheat under full-season infrared v *Biology* 17: 2113–2133.
- Wang Y, Bao Z, Zhu Y, Hua J. 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22: 498–506.
- Weng J, Liao T. 2001. Effect of microclimate on leaf temperature of two subalpine grassland plants in Tachia area. *Journal of the Experimental Forest of National Taiwan University* 15: 95–107.
- Winsor CP. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 18: 1–8.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415–421.
- Zhan J, McDonald BA. 2011. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* 20: 1689–1701.





# Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves

D. Morais<sup>a</sup>, V. Laval<sup>a</sup>, I. Sache<sup>b</sup> and F. Suffert<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR1290 BIOGER, F-78850 Thiverval-Grignon, and <sup>b</sup>AgroParisTech, UMR1290 BIOGER, AgroParisTech, F-78850 Thiverval-Grignon, France

*Zymoseptoria tritici* ascospores and pycnidiospores are considered the main forms of primary and secondary inoculum, respectively, in septoria tritici blotch epidemics. The pathogenicity of the two types of spores of the same genotypic origin were compared through a two-stage inoculation procedure in controlled conditions. Adult wheat leaves were inoculated with ascospores collected from field sources, yielding 119 lesions; pycnidiospores collected from 12 lesions resulting from these ascospore infections were then used for inoculation. Lesion development was assessed for 5 weeks; latent period, lesion size, and pycnidium density were estimated for different isolates. The latent period was calculated as the maximum likely time elapsed between inoculation and either the appearance of the majority of the sporulating lesions (leaf scale) or the appearance of the first pycnidia (lesion scale). The latent period was significantly longer (c. 60 degree-days, i.e. 3–4 days) after infection with ascospores than with pycnidiospores. No difference was established for lesion size and density of pycnidia. A comparison with other ascomycete fungi suggested that the difference in latent period might be related to the volume of spores and their ability to cause infection. Fungal growth before the appearance of lesions may be slower after inoculation with an ascospore than with a pycnidiospore. The mean latent period during the very beginning of epidemics, when first lesions are mainly caused by ascospores, may be longer than during spring, when secondary infections are caused by pycnidiospores. Disease models would be improved if these differences were considered.

**Keywords:** ascospore, Gompertz function, latent period, *Mycosphaerella graminicola*, pycnidiospore, wheat

## Introduction

The ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici* (formerly known as *Mycosphaerella graminicola*, anamorph *Septoria tritici*; Quaedvlieg *et al.*, 2011) causes septoria tritici blotch, a foliar disease of wheat (*Triticum aestivum*) found in most wheat-growing areas worldwide. In western Europe, the disease was reported to induce up to 30–40% crop loss when the upper leaves are severely infected (Eyal *et al.*, 1987). The difference between treated (with azole fungicides) and untreated yields was recently estimated as 10% on average for varieties moderately susceptible to septoria tritici blotch in UK conditions (HGCA, 2012). Disease epidemics are initiated by airborne sexual ascospores, mainly produced during the intercrop period (after harvest in summer and autumn) on infested wheat debris, which are considered the main primary inoculum (Shaw & Royle, 1989; Hunter *et al.*, 1999; Suffert *et al.*, 2011). The disease is clonally propagated among wheat plants during the growing season by pycnidiospores, which are splash-dispersed over short distances and act as the main secondary inoculum. However, ascospores and pycnidiospores can be jointly involved in the same stages of the epidemic development.

Indeed, in a wheat monoculture system, when infested debris is not completely buried, both pycnidiospores and ascospores can initiate the epidemic (Suffert & Sache, 2011; Suffert *et al.*, 2011). Moreover, in spring, secondary infections can be induced by ascospores (Clinckemaillie *et al.*, 2010; Duviolier *et al.*, 2013) released either from old, still infectious debris located in distant plots or from infested wheat plants located in the same plot. Field reports of infection of the uppermost (F1) and lowermost green leaves (F3–F4), but healthy middle leaves (F2) (C. Maumené, Arvalis-Institut du Végétal, Boigneville, France, personal communication), could be explained by a greater susceptibility of expanding leaves and also by the aforementioned secondary infection by ascospores. The pre-eminence of one type of spore has been explained by contrasting distances of dispersal (Shaw, 1987; Shaw & Royle, 1989) and by different amounts of the spores during the epidemic build-up (Eriksen *et al.*, 2001; Suffert & Sache, 2011), but rarely by differences in pathogenicity between sexual and asexual spores, as measured, for example, by the number of sporulating lesions they induce (Karolewski *et al.*, 2002; Trapero-Casas & Kaiser, 2007).

In fungi with an alternating reproduction regime, the comparison of the pathogenicity of spore types is experimentally challenging. In *Z. tritici* the production and handling of large amounts of ascospores is cumber-

\*E-mail: frederic.suffert@versailles.inra.fr

some in artificial conditions (Kema *et al.*, 1996). Asexual spores (conidia) produced from yeast-like mycelium grown in liquid or solid culture media were used to inoculate wheat plants (e.g. Cowger & Mundt, 2002; Leyva-Mir *et al.*, 2008; Suffert *et al.*, 2013) rather than spores produced on infected leaves. Whether conidia produced *in vitro* and conidia produced *in planta* (hereafter called pycnidiospores for the sake of clarity) have the same pathogenicity has not yet been tested. Finally, ascospores and pycnidiospores of the same genotype are required to perform a valid comparison, due to the high genetic diversity of *Z. tritici* populations (Linde *et al.*, 2002).

A first important component of pathogenicity of *Z. tritici* is sporulation (Suffert *et al.*, 2013), assessed through the measurement of maximum sporulating area (e.g. Arraiano & Brown, 2006), pycnidium density (e.g. Simon & Cordo, 1997) and sporulation capacity (Eyal, 1971). A second important component of pathogenicity in *Z. tritici* is latent period (Suffert *et al.*, 2013), which reflects the pathogen's generation time. Latent period is usually defined as the time interval between infection and the onset of sporulation from that infection (Pariaud *et al.*, 2009); in the case of septoria tritici blotch, it is the time elapsed between infection and the appearance of first pycnidia (Shearer & Zadoks, 1972). When a population of lesions rather than a single lesion is considered, as usual in experimental studies, the latent period is estimated, at the scale of a leaf, as the maximum likely time elapsed between inoculation and the appearance of the majority of the sporulating lesions (Shaw, 1990; Lovell *et al.*, 2004; Zearfoss *et al.*, 2011), or, at the scale of a lesion, as the maximum likely time elapsed between inoculation and the appearance of the first pycnidia (Armour *et al.*, 2004; Suffert *et al.*, 2013).

The objective of this study was to compare the pathogenicity of sexual and asexual spores of *Z. tritici* of similar genotypes, following infection of adult wheat leaves, by assessing the sporulation and latent period of the infections.

## Materials and methods

### Fungal material

Two plots were sown 300 m apart with wheat cv. Soissons (moderately susceptible to septoria tritici blotch; rated 5 on a 1–10 scale of decreasing susceptibility, Arvalis Institut du Végétal-CTPS) in autumn 2011 at the Grignon experimental station (France, 48°51'N, 1°58'E). Soil and weather characteristics, as well as cropping systems, have been described elsewhere (Suffert & Sache, 2011). The first plot (D+) had been grown by direct drilling and so contained wheat debris. The debris, hardly infested after a mild disease epidemic the previous season, constituted a weak source of ascospores (Suffert & Sache, 2011). The second plot (D<sub>0</sub>), grown with oilseed rape the previous season, did not contain any wheat debris.

Airborne *Z. tritici* ascospores were caught in March and April 2012 using three 7-day recording volumetric Burkard spore traps (Burkard Manufacturing Co.) placed 0.7 m above the soil

surface in plot D<sub>0</sub>, in plot D+ (Fig. 1a) and out of the field (Fig. 1b). The traps were operated at a flow rate of 10 L min<sup>-1</sup>. The collecting surface of part of the Melinex tape was covered with a thin layer of petroleum jelly (Vaseline) before sampling (Fig. 1c), while the other part of the tape was not covered (Table 1).

Wheat debris was collected on 28 March 2012 from the plot D+ and from a wheat field (cv. Soissons) grown at the Versailles experimental station (France, 48°48'N, 2°04'E); at this location, disease was more severe the previous year than in Grignon (M. Leconte, INRA, Thiverval-Grignon, France, personal communication). The debris were placed in laboratory conditions in two plastic grill boxes and sprayed with a small amount of water to induce the moisture change required to trigger the ejection of ascospores. Boxes were covered by a plastic bag connected to the trap aperture (Fig. 1d), in order to maximize the amount of collected ascospores. Different methods of trapping were used: Melinex tapes or glass slides, either covered or not with petroleum jelly, were placed in a 7-day and 24-h volumetric Burkard spore trap, respectively (Table 1). The traps were operated at a flow rate of 10 L min<sup>-1</sup>.

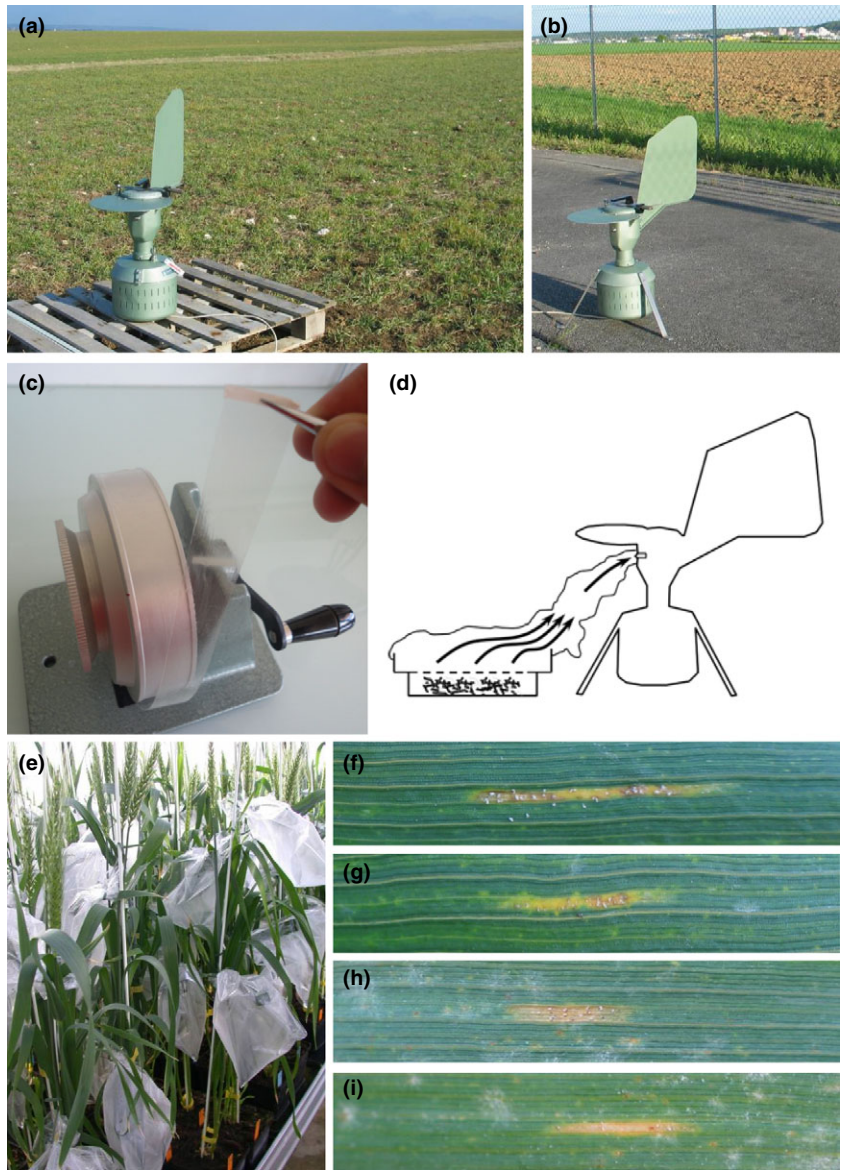
Throughout the collection period, the Melinex tape and glass slides were kept for a few days at -20°C to limit ascospore decay or germination. Finally, 10 different samples corresponding to 10 ascospore trapping events were obtained during a 3-week period (Table 1).

### Plant material

Two batches of wheat adult plants, cv. Soissons, were grown in two greenhouse compartments for subsequent inoculation. The two batches were sown in Jiffy peat pots on 7 December 2011 and 9 January 2012, respectively. Seedlings were vernalized for 7 weeks at 8°C with a 10 h light period and a 14 h dark period. Afterwards, seedlings were transferred back to the greenhouse and left to acclimatize for 1 week. Plants were then transplanted into 1.1 L pots filled with 1 L commercial compost (Peat Substrat 4; Klasmann) and fertilized with 5 g Osmocote Exact (16N:11P:11K+ 3MgO + Te). Plants were also sprayed at the seedling stage with Spiroxamine (Aquarelle SF at 2 mL L<sup>-1</sup>; Bayer Crop Science) as a classical preventive measure to control powdery mildew (*Blumeria graminis*; Suffert *et al.*, 2013). The delay between treatment and inoculation was 6 weeks, for both ascospores and pycnidiospores. In addition, plants were fertilized twice with a commercial nutrient solution (1 L Hydrokani C2) diluted 1/100 and applied in the pot saucers 5 and 7 weeks after seedling transplantation and supernumerary tillers were cut from each plant to keep only 3 stems. During plant growth, natural daylight was supplemented with 400 W sodium lamps to obtain 9 h dark/15 h light, the greenhouse compartment temperature being kept under 20°C during the light period and above 12°C during the dark period. In each greenhouse compartment the air temperature was recorded every 15 min and the thermal time *t*, expressed in degree-days post inoculation (ddpi), was calculated by summing the daily mean air temperatures, starting from the inoculation dates and using 0°C as the base temperature.

### Inoculation with ascospores

The day before inoculation, 10 ascospore suspensions corresponding to the 10 aforementioned ascospore trapping events were prepared, according to the type of support (Melinex tape or glass slide) and to the presence or absence of petroleum jelly.



**Figure 1** Experimental design used to compare the pathogenicity of ascospores and pycnidiospores of *Zymoseptoria tritici*. (a) Burkard spore trap placed in wheat monoculture plot (D+) with wheat debris (Grignon). (b) Burkard spore trap placed out of field 300 m apart (Grignon). (c) Melinex tape wound around the periphery of the rotating drum of the Burkard spore trap. (d) Collection of ascospores from wheat debris. Boxes of debris were covered by a plastic bag connected to the Burkard spore trap aperture in order to maximize the amount of collected ascospores. (e) Inoculated leaves enclosed in a bag to promote infection. (f–i) *Septoria tritici* blotch lesions after inoculation with ascospore suspensions.

Samples on Melinex tape were cut into sections, each matching a daily trapping. Each tape section was placed in a conical tube containing 10 mL water and 130 mg glass beads (4.5 mm diameter; Deutscher). The tubes were manually shaken for 1 min. The tape sections covered with petroleum jelly were placed in a 65°C water bath for 5 min and centrifuged at 7000 g for 5 min to remove the ascospores from the tape. Glass slides covered with petroleum jelly were placed in a conical tube containing 10 mL water then placed in a 65°C water bath for 5 min and centrifuged at 5000 g for 5 min. The contents of the tubes corresponding to the same trapping event (Table 1) were gathered and kept for a day at 4°C to limit ascospore decay or germination.

Prior to inoculation, two drops of surfactant (Tween20; Sigma) were added to the spore suspensions to ensure adequate coverage of the inoculated leaf surface. On 17 April 2012, each spore suspension was applied using a paintbrush along the adaxial face of the upper leaf (F1) of the two main tillers of five

plants (10 leaves) of the first batch of plants. Each leaf was then enclosed for 72 h in a transparent bag (Fig. 1e), slightly wetted to maintain a high humidity and promote infection (Suffert *et al.*, 2013).

### Inoculation with pycnidiospores

Twelve lesions were selected out of the 119 that had appeared after inoculation with ascospores (Fig. 1f–i) as a source of pycnidiospores (see Table 1 and Results). All 12 lesions originated from ascospores trapped from debris of plot D+, either on Melinex tape without petroleum jelly (8/12) or on glass slides (4/12), in order to know the origin of the inoculum (local pathogen population) and so increase the reproducibility of the experiment. On 28 May 2012, after the last assessment of lesions caused by ascospore infection (see below), pycnidiospores were collected from each of the 12 selected lesions by placing the leaf in a 25 mm diameter tube containing 10 mL



**Table 1** Origin of the 10 *Zymoseptoria tritici* inoculum sets used in the investigation

Location	Origin of sampling	Support	Petroleum jelly	Collect duration (days)	Period (2012)	No. asc. <sup>a</sup>	No. pyc. <sup>b</sup>	Isolates <sup>c</sup>
Outside <sup>d</sup>	Out of field (Grignon)	Melinex tape	No	7	28/03 to 03/04	14		
			Yes	14	13/03 to 26/03	12		
	Plot D <sub>0</sub> (Grignon) <sup>e</sup>	Melinex tape	No	7	28/03 to 03/04	7		
			Yes	14	13/03 to 26/03	16		
	Plot D+ (Grignon) <sup>f</sup>	Melinex tape	No	14	06/04 to 12/04 and 28/03 to 03/04	8		
Yes			14	13/03 to 26/03	16			
Inside <sup>g</sup>	Debris from plot D+ (Grignon)	Melinex tape	No	10	04/04 to 09/04 and 06/04 to 09/04	15	8	FS3307, FS3309, FS3344, FS3346, FS3356, FS3357, FS3385, FS3386
			Yes	2	04/04 to 06/04	12	4	FS3306, FS3314, FS3327, FS3359
	Debris from wheat plot (Versailles)	Melinex tape	No	6	10/04 to 15/04	7		
			Glass slide	Yes	2	02/04 to 04/04	12	

<sup>a</sup>Total number of leaf lesions appeared after inoculation with the ascospore suspension.

<sup>b</sup>Total number of leaf lesions selected for the subsequent inoculation with the pycnidiospore suspension.

<sup>c</sup>Code of the 12 *Z. tritici* isolates that were inoculated both as ascospore and pycnidiospore type.

<sup>d</sup>Location of the Burkard spore trap.

<sup>e</sup>Plot without wheat debris (oilseed rape as previous crop).

<sup>f</sup>Plot with debris (wheat monoculture since 2007).

<sup>g</sup>Trapping device placed above debris (Fig. 1c,d).

water and softly sweeping the area covered by pycnidia with a paintbrush. Each pycnidiospore suspension was then immediately applied, using a paintbrush, along the adaxial face of the upper leaf (F1) of the main tiller of four plants (12 × 4 leaves) of the second batch. Each leaf was then enclosed for 72 h in a transparent bag, as performed previously for the inoculation with ascospores.

### Assessment of pathogenicity components

Disease symptoms were assessed by the same assessor twice a week from 350 to 710 ddpi, from 11 May to 28 May 2012 for ascospore inoculation (seven assessments) and from 18 June to 4 July 2012 for pycnidiospore inoculation (eight assessments). The sporulating lesions, neither spatially aggregated nor coalescent, could be counted individually (maximum three lesions per leaf after ascospore inoculation; maximum 26 lesions per leaf after pycnidiospore inoculation). The length and width of each lesion were assessed visually using a ruler graduated in increments of 0.5 mm. The number of pycnidia borne by each lesion was counted with a hand lens (×10 magnification).

The maximum size of a lesion (SIZE<sub>max</sub>, mm<sup>2</sup>) was calculated as the product of its length and width.

A Gompertz function (Berger, 1981) was fitted to the number of pycnidia PYC(*t*) recorded on each lesion (Suffert *et al.*, 2013):

$$PYC(t) = PYC_{max} \exp(-B_{PYC} e^{-r_{PYC} t}) \quad (1)$$

where PYC<sub>max</sub> is the maximum number of pycnidia reached at the end of the assessment period, *r*<sub>PYC</sub> is a rate parameter, *B*<sub>PYC</sub> is a position parameter, and *t* is the time of observation expressed in degree-days post inoculation (ddpi). The density of pycnidia (PYCdens) was then calculated as:

$$PYC_{dens} = \frac{PYC_{max}}{SIZE_{max}} \quad (2)$$

The latent period was assessed using two complementary methods. First, LatPYC<sub>5</sub>, the time elapsed from inoculation to the appearance of 5% of the maximum number of pycnidia

**Table 2** Analysis of variance to test the effect of the origin of the inoculum (Grignon or Versailles) and of the presence or absence of petroleum jelly on the trapping support on the latent period (LatPYC<sub>5</sub>) assessed for 119 *Zymoseptoria tritici* isolates inoculated as ascospores on wheat cv. Soissons

Factor	d.f.	Sum of squares	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
Origin	1	3879.8	3879.8	0.503	0.48
Petroleum jelly	1	271.9	271.9	0.035	0.85
Origin × petroleum jelly	1	9323.4	9323.4	1.209	0.27
Residual	115	886 976.2	7712.8		

**Table 3** Analysis of variance to test the effect of spore type (ascospores vs pycnidiospores) on lesion size (SIZE<sub>max</sub>), pycnidium density (PYCdens), and latent period (LatPYC<sub>5</sub>) of 12 *Zymoseptoria tritici* isolates inoculated on wheat cv. Soissons

Variable	Factor	d.f.	Sum of squares	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
SIZE <sub>max</sub>	Spore type	1	73.5	73.5	2.58	0.12
	Residual	22	627.8	28.5		
PYCdens	Spore type	1	0.90	0.90	1.67	0.21
	Residual	22	11.90	0.54		
LatPYC <sub>5</sub>	Spore type	1	15 975.9	15 975.9	4.70	0.04
	Residual	22	74 816.1	3400.7		

( $PYC_{max}$ ), was calculated using Eqn (1) for each lesion induced either by ascospores or pycnidiospores of each isolate.  $PYC_{max}$  ranged from 20 to 80, so  $LatPYC_5$  was considered a good indicator of the time elapsed between inoculation and the appearance of the 1–4 earliest pycnidia. Secondly, a Gompertz growth curve was fitted to the total number of sporulating lesions  $LES(t)$  (i.e. lesions for which  $PYC(t) \geq 0.05 \times PYC_{max}$ ) assessed on several leaves:

$$LES(t) = LES_{max} \exp(-B_{LES} e^{-r_{LES} t}) \quad (3)$$

where  $LES_{max}$  is the maximum number of lesions,  $r_{LES}$  is a rate parameter, and  $B_{LES}$  is a position parameter.

$LatLES_{37}$ , the time elapsed from inoculation to  $1/e \approx 36.8\%$  of  $LES_{max}$  (inflection point of a Gompertz function), was calculated using Eqn (3). This method could not be used after asco-

spore inoculation because each individual was unique and caused only one lesion.

### Data analysis

$SIZE_{max}$ ,  $PYC_{dens}$  and  $LatPYC_5$  were estimated after ascospore inoculation for each of the 119 isolates, based on the assessment of a single lesion (no replication), and after pycnidiospore inoculation by mean values calculated from the assessment of all the lesions induced by each of the 12 selected isolates (Table 1).

For the ascospore inoculation,  $LatLES_{37}$ , calculated using the 119 lesions, was an average estimate of the latent period for 119 different isolates. For the pycnidiospore inoculation,  $LatLES_{37}$  was estimated first for a given isolate (among the 12 selected isolates), and secondly for the whole population using all the data corresponding to the 12 isolates.

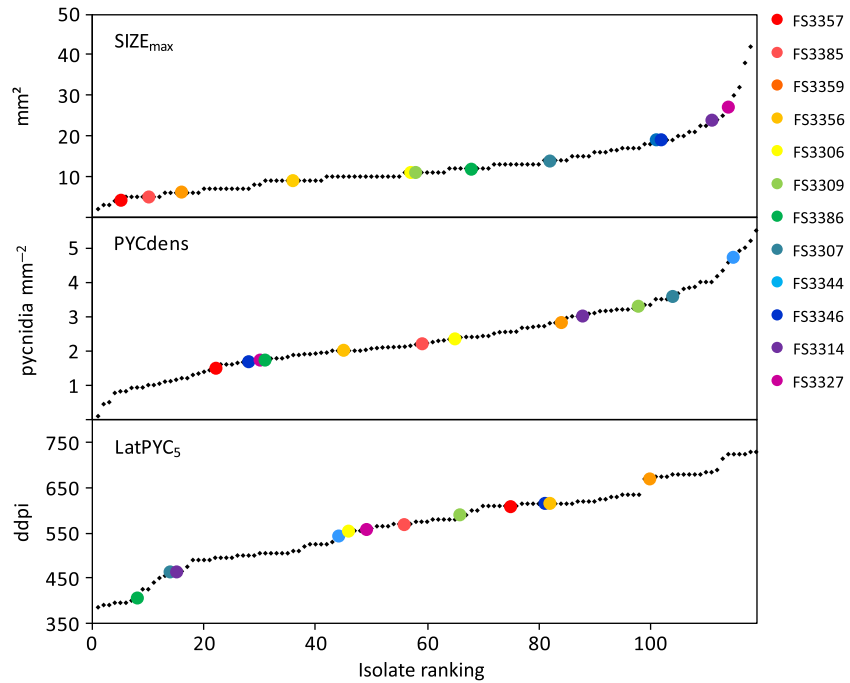


Figure 2 Distribution of lesion size ( $SIZE_{max}$ ), pycnidium density ( $PYC_{dens}$ ) and latent period ( $LatPYC_5$ ) of the 12 *Zymoseptoria tritici* isolates assessed after ascospore inoculation of adult wheat leaves; ddpi, degree days post inoculation.

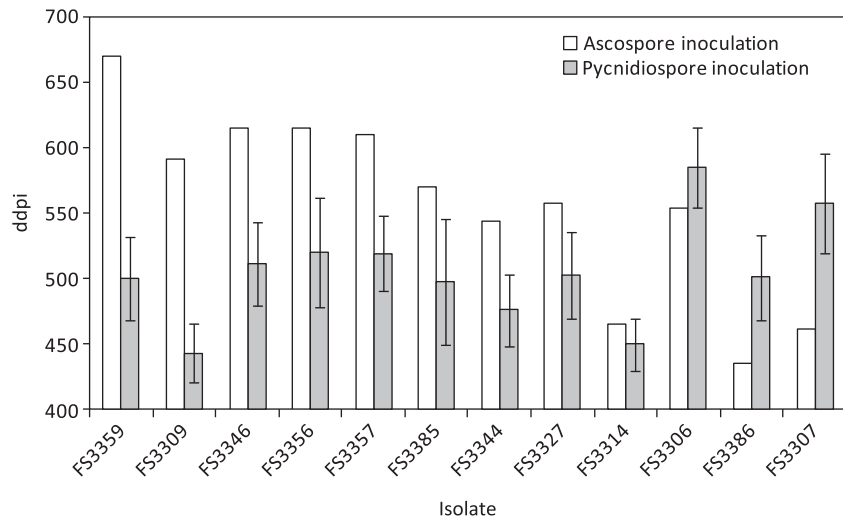


Figure 3 Latent period ( $LatPYC_5$ ) of 12 *Zymoseptoria tritici* isolates assessed after ascospore (white columns) and pycnidiospore (grey columns) inoculations on adult wheat leaves. Isolates are ranked in descending order of difference between  $LatPYC_5$  assessed for ascospore inoculation and  $LatPYC_5$  assessed for pycnidiospore inoculation; vertical bars represent standard deviation; ddpi, degree days post inoculation.

The effects of petroleum jelly (with or without) and the origin of inoculum (Versailles, Grignon) on the latent period for the ascospore inoculation were tested in an analysis of variance (ANOVA; Table 2). For LatPYC<sub>5</sub> assessed on 119 isolates, the variance was partitioned into sources attributable to the presence of petroleum jelly (J) and the origin (O), according to the model:

$$Y_{joi} = M + J + O + \varepsilon \quad (4)$$

where  $Y_{joi}$  is the value of the latent period of isolate  $i$ , for the presence or not of petroleum jelly  $j$ , for the origin  $o$ , and  $\varepsilon$  is the error term.

The effect of the type of spore on the three pathogenicity components (SIZE<sub>max</sub>, PYCDens, and LatPYC<sub>5</sub>) was tested in an ANOVA (Table 3). For each component assessed on 12 isolates, the variance was partitioned into sources attributable to the type of spore (S), according to the model:

$$Y_{si} = M + S + \varepsilon \quad (5)$$

where  $Y_{si}$  is the value of the pathogenicity component  $Y$  of isolate  $i$ , for type of spore  $s$ , and  $\varepsilon$  is the error term.

## Results

The inoculation of 100 wheat leaves with 10 ascospore suspensions yielded 119 lesions (Fig. 1f–i). One hundred lesions were induced by ascospores trapped from wheat debris at Grignon (against 19 from wheat debris at Versailles) and 68 were trapped using petroleum jelly (against 51 without) (Table 1). The inoculation of 12 × 4 wheat leaves with the 12 pycnidiospore suspensions yielded 425 lesions; each of the 12 isolates induced between 12 and 26 lesions. The distribution of SIZE<sub>max</sub>, PYCDens, and LatPYC<sub>5</sub> for the 119 lesions obtained after ascospore inoculation is shown in Figure 2; pathogenicity components of the 12 isolates selected from the 119 assessed after ascospore inoculation, fell quite evenly within that distribution.

LatPYC<sub>5</sub> calculated for the 119 lesions obtained after ascospore inoculation was not significantly affected either by the use of petroleum jelly (567.2 ddpi without petroleum jelly [68 lesions] versus 570.8 ddpi with petroleum jelly [51 lesions]), or the origin of the isolates (567.2 ddpi for isolates originating from Versailles [19 lesions] versus 566.8 ddpi for isolates originating from Grignon [100 lesions]) (Table 2).

For each of the 12 selected isolates, the latent period LatPYC<sub>5</sub> (Fig. 3) was statistically different after ascospore and pycnidiospore inoculation ( $P = 0.04$ ; Table 3); LatPYC<sub>5</sub> was significantly longer after ascospore (557.4 ddpi) than pycnidiospore inoculation (501.9 ddpi). There was no difference either for lesion size SIZE<sub>max</sub> ( $P = 0.12$ ) or pycnidium density PYCDens ( $P = 0.21$ ). Means of SIZE<sub>max</sub> (13.4 mm<sup>2</sup> after ascospore inoculation vs 11.4 mm<sup>2</sup> after pycnidiospore inoculation) and of PYCDens (2.55 pycnidia mm<sup>-2</sup> vs 2.22 pycnidia mm<sup>-2</sup>) were not significantly different.

The mean latent period LatLES<sub>37</sub>, calculated from the cumulative number of sporulating lesions appeared after

inoculation (when  $PYC(t) \geq 0.05 \times PYC_{max}$ ), was 536.2 ddpi for ascospore inoculation and 472.7 ddpi for pycnidiospore inoculation (Fig. 4). LatLES<sub>37</sub>, which corresponds to the maximal rate of lesion appearance (time at which the mean number of new sporulating lesions appeared during one degree-day,  $\Delta LES(t)/\Delta t$ , is maximum), was reached, on average, 63.5 ddpi (3–4 days) later for ascospore than for pycnidiospore inoculation. The significance of the difference could not be tested statistically because of the heterogeneity of the two data sets used to calculate LatLES<sub>37</sub>: in one set, 119 lesions

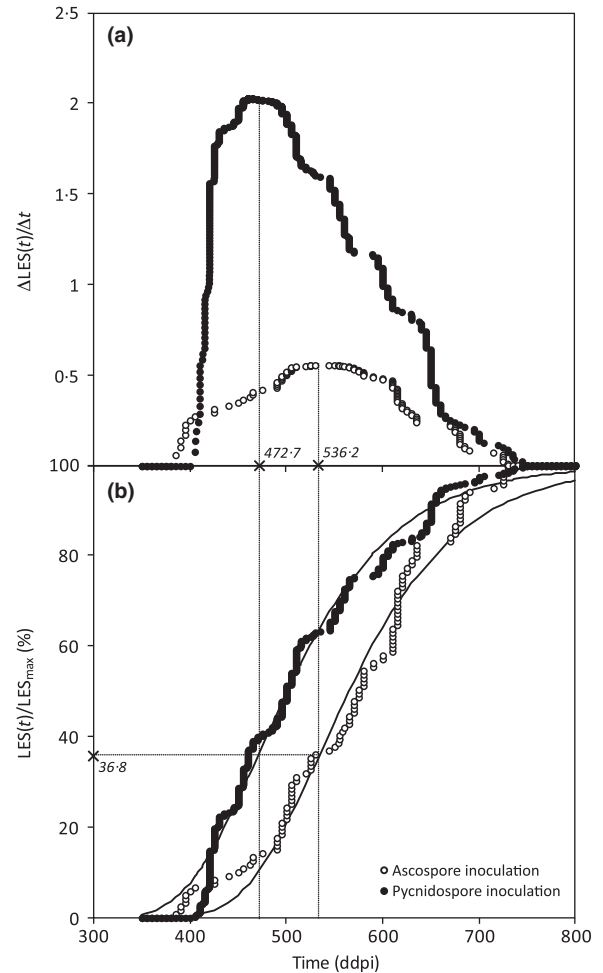
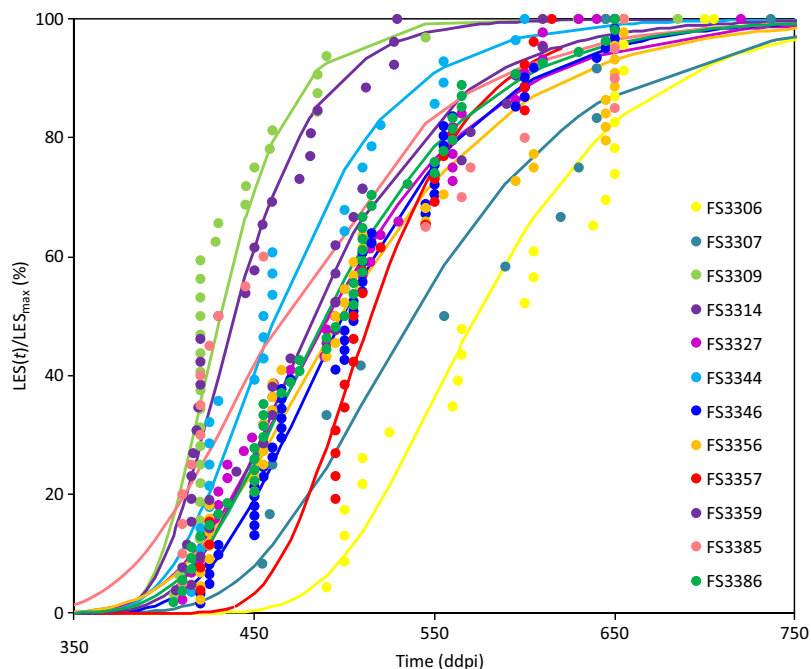


Figure 4 (a) Mean number of new sporulating lesions appeared per degree-day period ( $\Delta LES(t)/\Delta t$ ) after inoculation of 100 wheat leaves with 10 *Zymoseptoria tritici* ascospore suspensions (○) and after inoculation of 4 × 12 wheat leaves with pycnidiospore suspensions of 12 selected isolates (●). (b) Cumulative normalized number of lesions ( $LES(t)/LES_{max}$ ) appeared after inoculation of 100 wheat leaves with ascospore suspensions (○) and after inoculation of 4 × 12 wheat leaves with pycnidiospore suspensions of 12 selected isolates (●). Each point corresponds to a sporulating lesion. Lines correspond to the fitted curves (Gompertz model). Time is expressed in degree-days post-inoculation (ddpi). The mean latent period LatLES<sub>37</sub> (inflection point of the fitted curves) was 536.2 ddpi for ascospore inoculation and 472.7 ddpi for pycnidiospore inoculation.



**Figure 5** Cumulative normalized number of lesions ( $LES(t)/LES_{max}$ ) appeared after inoculation of  $4 \times 12$  wheat leaves with pycnidiospore suspensions of 12 *Zymoseptoria tritici* isolates. Each point corresponds to the appearance of a new sporulating lesion. Lines correspond to the fitted curves (Gompertz model). Time is expressed in degree-days post-inoculation (ddpi).

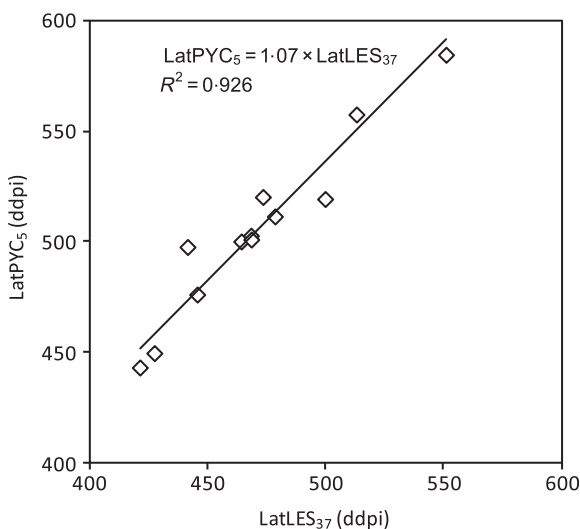
induced by 119 different isolates after ascospore inoculations, in the other set, 425 lesions induced by 12 different isolates after pycnidiospore inoculations. However, this difference in  $LatLES_{37}$  was consistent with that obtained for  $LatPYC_5$ .

Latent period  $LatLES_{37}$  after pycnidiospore inoculation was calculated for each of the 12 selected isolates (Fig. 5) and compared to their  $LatPYC_5$ . The two measures of latent period ( $LatLES_{37}$  and  $LatPYC_5$ ) were found to be significantly correlated (Fig. 6), with a slope close to 1. Thus, the average time of appearance of the first pycnidia is close to the average time at which the rate of sporulating lesion appearance is maximal.

The correlation between the mean values of lesion size ( $SIZE_{max}$ ), pycnidium density (PYCdens), and latent period ( $LatPYC_5$ ), assessed after ascospore and pycnidiospore inoculation for each of the 12 selected isolates is presented in Figure 7. For each pathogenicity component, the inter-isolate variability was higher after ascospore than pycnidiospore inoculation. The value obtained after pycnidiospore inoculation corresponds to the mean recorded on several lesions, while it corresponds to a single value recorded on one lesion after ascospore inoculation. Despite this experimental artefact, no relationship between pathogenicity components obtained after ascospore and pycnidiospore inoculation was found.

## Discussion

In the experimental conditions of the present investigation, the latent period of *Z. tritici* on adult wheat leaves was significantly longer after infection with ascospores than with pycnidiospores, but no difference



**Figure 6** Assessment of the latent period (ddpi, degree-days post-inoculation) of septoria tritici blotch after inoculation of four wheat upper leaves with pycnidiospore suspensions (12 isolates, diamonds).  $LatLES_{37}$  is the time elapsed from inoculation to the maximum rate of lesion appearance at the leaf scale;  $LatPYC_5$  is the mean time elapsed from inoculation to the appearance of first pycnidia on the lesion.

was established for lesion size and density of pycnidia. Differences in pathogenicity between asexual and sexual spores were previously reported for only a few other ascomycete fungi (Wood & Barbeti, 1977; Gilles *et al.*, 2001; Mason & Huber, 2001; Karolewski *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Trapero-Casas & Kaiser, 2007). In contrast to those studies, the high inter-individual variation in *Z. tritici* pathogenicity (Suffert *et al.*, 2013)

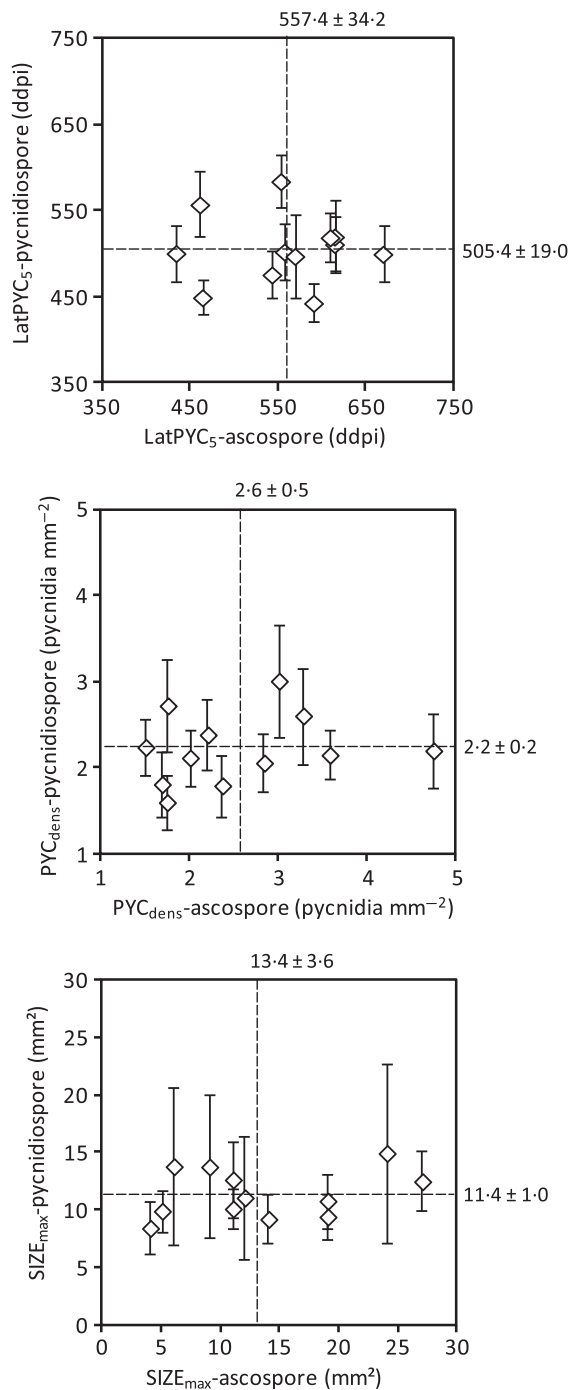


Figure 7 Latent period (LatPYC<sub>5</sub>), pycnidium density (PYC<sub>dens</sub>) and lesion size (SIZE<sub>max</sub>), assessed for 12 *Zymoseptoria tritici* isolates after ascospore and pycnidiospore inoculation. Each point corresponds to the mean of several values for pycnidiospore inoculation (vertical bars represent standard deviation) but to a single value for ascospore inoculation; mean values and standard deviations are given next to the dotted lines.

prompted the use of asexual and sexual spores of the same genotypic origin, produced through a two-stage inoculation procedure. To the best of the authors'

knowledge, this is the first report of successful infection of wheat leaves with *Z. tritici* ascospores in controlled conditions and of the subsequent development of lesions. Moreover, in all reported infection experiments, the asexual spores were conidia obtained by clonal multiplication from yeast-like mycelium grown on artificial medium, not pycnidiospores from pycnidia borne by a leaf lesion.

The difference in mean latent period between the two spore types, assessed as the maximum likely time elapsed between inoculation and the appearance of the first pycnidia ( $\Delta\text{LatPYC}_5 = 55.5$  ddpi), was close to the difference assessed as the maximum likely time elapsed between inoculation and the appearance of the majority of the sporulating lesions ( $\Delta\text{LatLES}_{37} = 63.5$  ddpi). This consistency is supported by the significant correlation between LatLES<sub>37</sub> and LatPYC<sub>5</sub> assessed for the 12 selected isolates.

The longer latent period recorded after inoculation with sexual spores suggests that fungal growth that precedes the appearance of the new lesions is slower after inoculation with an ascospore than with a pycnidiospore. The early processes of infection (spore adhesion, germination, and penetration) might also be less efficient in ascospores than in pycnidiospores. However, possible differences in infection efficiency, the probability that a spore deposited on a receptive host surface produces a lesion (Pariaud *et al.*, 2009), could not be tested. Technical limitations, such as the very low amounts of collected ascospores from spore traps and the small size of both *Z. tritici* ascospores and pycnidiospores compared to spores of other fungi (e.g. *Puccinia triticina*; Azzimonti *et al.*, 2013), prevented the precise assessment of inoculum concentration in the suspensions that is required for the accurate assessment of infection efficiency.

In contrast to the results obtained in the present study, ascospores were reported to be more infectious than asexual spores in three ascomycete fungi. In *Leptosphaeria maculans*, the cause of blackleg disease on *Brassica* crops, ascospores caused more infections than pycnidiospores (Mason & Huber, 2001) and the latent period was shorter after infection with ascospores (Brunin & Lacoste, 1970; Alabouvette *et al.*, 1974). Moreover, germination and penetration, as well as the subsequent development of lesions, were much earlier with ascospores than with pycnidiospores (Li *et al.*, 2004). In *Pyrenopeziza brassicae*, the cause of light leaf spot of oilseed rape, about 25 ascospores or about 700 pycnidiospores per leaf were required for successful infection (Karolewski *et al.*, 2002), confirming that ascospores of *P. brassicae* are more infective than conidia (Gilles *et al.*, 2001). These investigations did not test for a difference in latent period between the two spore types used for inoculation. In *Didymella rabiei*, the cause of ascochyta blight of chickpea, inoculation of plants with ascospores resulted in a significantly higher disease severity than conidia, which had a slower germination process than ascospores (Trapero-Casas & Kaiser, 2007). The differences among

Table 4 Number of cells and volume of ascospores and pycnidiospores/conidia in four ascomycete fungi

Fungus	Number of cells		Volume ( $\mu\text{m}^3$ ) <sup>a</sup>	
	Ascospore	Pycnidiospore or conidia	Ascospore	Pycnidiospore or conidia
<i>Zymoseptoria tritici</i> <sup>b</sup>	2	4–8	50	210
<i>Pyrenopeziza brassicae</i> <sup>c</sup>	1–2	1	70	80
<i>Leptosphaeria maculans</i> <sup>d</sup>	6	1	1100	7
<i>Didymella rabiei</i> <sup>e</sup>	2	1–2	330	70

<sup>a</sup>Volume was approximated as  $\pi/6 \times a \times b^2$  (ellipsoid) with mean length  $a$  and mean width  $b$ , whatever the shape of the spore.

<sup>b</sup> $a = 12.5$ ,  $b = 2.8 \mu\text{m}$  for ascospore (range  $10\text{--}15 \times 2.5\text{--}3.0 \mu\text{m}$ ; Shaner, 2010);  $a = 59.0$ ,  $b = 2.6 \mu\text{m}$  for pycnidiospore (range  $20\text{--}98 \times 1.4\text{--}3.8 \mu\text{m}$ ; Shaner, 2010).

<sup>c</sup> $a = 14.5$ ,  $b = 3.0 \mu\text{m}$  for ascospore (range  $13.5\text{--}15.5 \times 2.5\text{--}3.0 \mu\text{m}$ ; Rawlinson *et al.*, 1978);  $a = 13.0$ ,  $b = 3.5 \mu\text{m}$  for pycnidiospore (range  $10\text{--}16 \times 3.0\text{--}4.0 \mu\text{m}$ ; Rawlinson *et al.*, 1978).

<sup>d</sup> $a = 50$ ,  $b = 6.5 \mu\text{m}$  for ascospore (range  $30\text{--}70 \times 4.0\text{--}9.0 \mu\text{m}$ ; Smith & Sutton, 1964);  $a = 4.0$ ,  $b = 1.8 \mu\text{m}$  for pycnidiospore (range  $3.0\text{--}5.0 \times 1.5\text{--}2.0 \mu\text{m}$ ; Smith & Sutton, 1964).

<sup>e</sup> $a = 15.4$ ,  $b = 6.4 \mu\text{m}$  for ascospore (range  $13.5\text{--}17.3 \times 6.0\text{--}6.8 \mu\text{m}$ ; Nene, 1982);  $a = 13$ ,  $b = 3.3 \mu\text{m}$  for pycnidiospore (range,  $10\text{--}16 \times 3.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$ ; Punithalingam & Holliday, 1972).

these fungi might be due to differences in the size of the spores (Table 4). In *Z. tritici*, the spore volume is four times bigger for a pycnidiospore than for an ascospore. The volumes of the two types of spores are nearly equivalent in *P. brassicae*. In contrast, the spore volume is much bigger for an ascospore than for a pycnidiospore in *D. rabiei* (5 $\times$ ) and *L. maculans* (150 $\times$ ). The difference in latent period observed between the two spore types in those three fungi may be related to a differential ability to cause infection: smaller spores, which also contain a smaller number of cells (Table 4), are likely to contain less nutrient reserves (Garrett, 1973); consequently, the time required for germ tube growth and penetration into host tissues may be longer. In the case of *Z. tritici*, it may be that the smaller ascospores germinated less rapidly than the bigger pycnidiospores, and so took longer to enter the host tissue. It may also be possible that a longer latent period was due to a slower growth period after infection. Both assumptions should be tested using microscopic observations.

Differences in latent period for ascospore and pycnidiospore infections could be related to different microclimatic requirements. Temperature and wetness requirements for infection by two spore types have rarely been compared in ascomycete fungi (Karolewski *et al.*, 2002; Trapero-Casas & Kaiser, 2007). However, in the present investigation, it is unlikely that wetness duration was a limiting factor as both spore types were kept in a humid environment for a long period (72 h). The average temperature during the 3 weeks after inoculation was slightly higher for ascospores (18.9°C) than pycnidiospores (17.2°C). However, these temperatures are quite close to the thermal optimum of *Z. tritici* after conidial inoculation (c. 18°C; Bernard *et al.*, 2013); therefore, it is unlikely that temperature was a limiting factor for any of the spore types.

Models of the development of septoria tritici blotch that explicitly consider both ascospores and pycnidiospores, either all through the crop season (Eriksen *et al.*, 2001) or only at the onset of the epidemic (Robert *et al.*,

2008), assume that the infection process after spore deposition is the same for both spore types. The results of the present study suggest that the mean latent period during the very beginning of an epidemic, when first lesions are mainly caused by wind-dispersed ascospores (Suffert *et al.*, 2011), is longer than during the spring epidemic stage, when secondary infections are caused by splash-dispersed pycnidiospores. This difference might be increased by winter cold temperatures and the non-linearity of the thermal performance curve of *Z. tritici* (Shaw, 1990; Bernard *et al.*, 2013). Although spring infections are mainly caused by pycnidiospores splash-dispersed upwards in the wheat canopy, infections by airborne ascospores released by pseudothecia developing on wheat plants cannot be excluded (Duvivier *et al.*, 2013). The pycnidiospore surface density is likely to be high in a wheat crop from first node visible Z31 to flag leaf visible Z37 (Lovell *et al.*, 1997; Suffert & Sache, 2011) and the ascospore surface density is much lower (Hunter *et al.*, 1999; Suffert & Sache, 2011). However, environmental conditions (wind versus rainfall) could affect the relative availability of ascospores versus pycnidiospores, so inducing infections on upper leaves by ascospores rather than by pycnidiospores; this has been sporadically suspected in field observations (C. Maumené, Arvalis-Institut du Végétal, Boigneville, personal communication). A 60-dd difference in latent period seems to be minor at the epidemic scale, but this delay should be incorporated into epidemiological models. Moreover, forecasting models used for timing fungicide sprays might be improved if the difference in latent period between the two spore types were considered.

## Acknowledgements

This research received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 261752 ‘Plant and Food Biosecurity’ (PLANTFOODSEC). The authors are grateful to Nathalie Galet for technical assistance.



## References

- Alabouvette C, Brunin B, Louvet J, 1974. Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. IV. Pouvoir infectieux des pycnidiospores et sensibilité variétale. *Annales de Phytopathologie* 6, 265–75.
- Armour T, Viljanen-Rollinson SLH, Chng S, Butler RC, Jamieson PD, Zyskowski RF, 2004. Examining the latent period of *Septoria tritici* blotch in a field trial of winter wheat. *New Zealand Plant Protection* 57, 116–20.
- Arraiano LS, Brown JKM, 2006. Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology* 55, 726–38.
- Azzimonti G, Lannou C, Sache I, Goyeau H, 2013. Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathology* 62, 970–81.
- Berger RD, 1981. Comparison of the Gompertz and logistic equations to describe plant-disease progress. *Phytopathology* 71, 716–9.
- Bernard F, Sache I, Suffert F, Chelle M, 2013. The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature! *New Phytologist* 198, 232–40.
- Brunin B, Lacoste L, 1970. Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. IV. Pouvoir pathogène des ascospores. *Annales de Phytopathologie* 2, 477–88.
- Clinckemaielle A, Dedeurwaerder G, Duvivier M, Moreau JM, Legrève A, 2010. Presence of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* and occurrence of sexual reproduction during the growing season in Belgium. *Phytopathology* 100, S26 (abstract).
- Cowger C, Mundt CC, 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* 92, 624–30.
- Duvivier M, Dedeurwaerder G, De Proft M, Moreau JM, Legrève A, 2013. Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *European Journal of Plant Pathology* 137, 325–41.
- Eriksen L, Shaw MW, Østergård H, 2001. A model of the effect of pseudothecia on genetic recombination and epidemic development in populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 91, 240–8.
- Eyal Z, 1971. The kinetics of pycnosporium liberation in *Septoria tritici*. *Canadian Journal of Botany* 49, 1095–9.
- Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM, Ginkel MV, 1987. *The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico City, Mexico: CIMMYT.
- Garrett SD, 1973. Deployment of reproductive resources by plant pathogenic fungi: an application of E. J. Salisbury's generalization for flowering plants. *Acta Botanica Islandica* 1, 1–9.
- Gilles T, Fitt BDL, McCartney HA, Papastamati K, Steed JM, 2001. The roles of ascospores and conidia of *Pyrenopeziza brassicae* in light leaf spot epidemics on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *Annals of Applied Biology* 138, 141–52.
- HGCA, 2012. *Septoria tritici* in winter wheat. Topic sheet 113, spring 2012. [[http://www.hgca.com/media/178045/ts113\\_septoria\\_tritici\\_in\\_winter\\_wheat.pdf](http://www.hgca.com/media/178045/ts113_septoria_tritici_in_winter_wheat.pdf)]. Accessed 1 March 2015.
- Hunter T, Coker RR, Royle DJ, 1999. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 48, 51–7.
- Karolewski Z, Evans N, Fitt BDL, Todd AD, Baierl A, 2002. Sporulation of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot) on oilseed rape (*Brassica napus*) leaves inoculated with ascospores or conidia at different temperatures and wetness durations. *Plant Pathology* 51, 654–65.
- Kema GHJ, Verstappen ECP, Todorova M, Waalwijk C, 1996. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 30, 251–8.
- Leyva-Mir SG, Gilchrist-Saavedra LI, Huerta-Espino J, Villasenor-Mir HE, 2008. Effect of the interaction of isolates of *Septoria tritici* Rob. ex. Desm. inoculated into different genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.), in the latency period. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26, 15–20.
- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, Kuo J, 2004. Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *Journal of General Plant Pathology* 70, 261–9.
- Linde CC, Zhan J, McDonald BA, 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* 92, 946–55.
- Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Royle DJ, Coker RR, 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* 46, 126–38.
- Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, Van Den Bosch F, 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53, 170–81.
- Mason PG, Huber JT, 2001. *Biological Control Programmes in Canada, 1981–2000, Technology & Engineering*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Nene YL, 1982. A review of ascochyta blight of chickpea. *Tropical Pest Management* 28, 61–70.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C, 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58, 409–24.
- Punithalingam E, Holliday P, 1972. Ascochyta rabiei. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* 337, 1–2.
- Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ *et al.*, 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia* 26, 57–69.
- Rawlinson CJ, Sutton BC, Muthyalu G, 1978. Taxonomy and biology of *Pyrenopeziza brassicae* sp. nov. (*Cylindrosporium concentricum*), a pathogen of winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Transactions of the British Mycological Society* 71, 425–39.
- Robert C, Fournier C, Andrieu B, Ney B, 2008. Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant–pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology* 35, 997–1013.
- Shaner G, 2010. *Septoria tritici* blotch. In: Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD, Smiley RW eds. *Compendium of Wheat Diseases and Pests*, 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS Press, 56–8.
- Shaw MW, 1987. Assessment of upward movement of rain splash using a fluorescent tracer method and its application to the epidemiology of cereal pathogens. *Plant Pathology* 36, 201–13.
- Shaw MW, 1990. Effects of temperature, leaf wetness and cultivar on the latent period of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Plant Pathology* 39, 255–68.
- Shaw MW, Royle DJ, 1989. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology* 38, 35–43.
- Shearer BL, Zadoks JC, 1972. The latent period of *Septoria nodorum* in wheat. 1. The effect of temperature and moisture treatments under controlled conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 78, 237–47.
- Simon MR, Cordo CA, 1997. Inheritance of partial resistance to *Septoria tritici* in wheat (*Triticum aestivum*): limitation of pycnidia and spore production. *Agronomie* 17, 343–7.
- Smith HC, Sutton BC, 1964. *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of the British Mycological Society* 47, 159–65.
- Suffert F, Sache I, 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola*

- in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* **60**, 878–89.
- Suffert F, Satche I, Lannou C, 2011. The early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–77.
- Suffert F, Satche I, Lannou C, 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* **62**, 1330–41.
- Trapero-Casas A, Kaiser WJ, 2007. Differences between ascospores and conidia of *Didymella rabiei* in spore germination and infection of chickpea. *Phytopathology* **97**, 1600–7.
- Wood MRP, Barbetti MJ, 1977. A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycnidiospores of the blackleg disease causal agent *Leptosphaeria maculans*. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **4**, 79–80.
- Zearfoss AD, Cowger C, Ojiambo PS, 2011. A degree-day model for the latent period of *Stagonospora nodorum* blotch in winter wheat. *Plant Disease* **95**, 561–7.