

Influence de paramètres climatiques et de la photopériode sur la biologie de Neofabraea alba, agent responsable de symptômes de gloeosporiose sur pommiers

Justine Perrin

▶ **To cite this version:**

Justine Perrin. Influence de paramètres climatiques et de la photopériode sur la biologie de Neofabraea alba, agent responsable de symptômes de gloeosporiose sur pommiers. Sciences agricoles. 2015. dumas-01205559

HAL Id: dumas-01205559

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01205559

Submitted on 25 Sep 2015

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.

AGROCAMPUS OUEST

☑ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

Année universitaire : 2014-2015

Spécialité : Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Gestion Durable du Végétal en horticulture et aménagements paysagers

Mémoire de Fin d'Études

☑ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Influence de paramètres climatiques et de la photopériode sur la biologie de *Neofabraea alba*, agent responsable de symptômes de gloeosporiose sur pommiers

Justine PERRIN



Soutenu à Angers le 7 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Président : M^me^ Josiane Le Corff

Maître de stage : M^me^ Claude COUREAU

Enseignant référent : M. Alexandre DEGRAVE

Inra : M. Medhi Al-rifai

Inra : M. Arnaud Lemarquand

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité :

☑ Non ☐ Oui si oui : ☐ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible[1].
A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage[2] :



Droits d'auteur :

L'auteur[3] autorise la diffusion de son travail

☑ Oui ☐ Non

Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☑ la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur :



Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

☒ Oui ☐ Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.
Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☒ la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

16/09/2015



(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Si j'ai pu réaliser cette étude, c'est en premier lieu grâce à ceux qui ont travaillé sur le sujet avant moi. Pour cela, je souhaite remercier M. Bompeix avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger, Claude Coureau et Christine Tessier qui réalisent des expériences sur *N. alba* à La Morinière depuis plus de 10 ans, et Nicolas André, ancien apprenti à la Morinière, qui a notamment proposé l'expérimentation bâche anti-pluie.

De nombreuses personnes ont participé à l'élaboration de ce rapport : de sa première ébauche à ses différentes relectures. Je tiens particulièrement à remercier Claude, Christine, Marie-Cécile, Anthony, Alexandre Degrave, Fanny, Philippine, Louise, David et Marion pour leurs relectures, leur esprit critique et leurs conseils. Je leur sais gré du temps qu'ils ont passé pour ce rapport.

Je souhaite également remercier Marie-Noëlle Bellanger et Laurent Ogé de l'Inra d'Angers qui nous ont respectivement permis d'utiliser une chambre climatique et prêté une étuve.

***

Ce rapport constitue pour moi l'aboutissement de mes trois années d'apprentissage au sein de la station de la Morinière. Je souhaite donc remercier Hugues Decrombrecque pour m'avoir permis de réaliser cet apprentissage dans sa structure, ainsi que Claude Coureau, ma maitre d'apprentissage, de m'avoir guidé durant cette expérience. Je tiens également à remercier l'équipe enseignante d'Agrocampus Ouest chargée de l'apprentissage : François Boulanger et Annie Salat, ainsi que mon tuteur d'apprentissage Yann Tricault qui m'ont suivi tout au long de ces trois années et qui ont répondu à mes questions.

Un grand merci à Claude, Christine et Marie-Cécile avec qui j'ai particulièrement travaillé au cours de mon apprentissage. Claude pour la confiance qu'elle m'a accordé et son optimisme inébranlable, Christine pour sa franchise et son sens de l'humour et Marie-Cécile pour sa rigueur et ses goûters lors des comptages tavelure.

Durant mon apprentissage, j'ai eu la chance de travailler avec toute l'équipe de la station. Cela m'a permis d'apprendre énormément sur l'arboriculture mais également sur la vie en entreprise. Merci à Antony, Benjamin, Cécile, Christian, Delphine, Didier, Eric, Fanny, les deux Gérard, Hervé, Jean-Paul, Julien, Laure, Mattéo, Philippe, Stéphane, Sylvain, Tom, Yollande.

Merci à tous les stagiaires avec qui j'ai partagé de très bons moments durant ces trois années.

Ces années à la Morinière constituent une expérience très enrichissante. J'ai beaucoup appris sur moi-même et je me sens maintenant prête pour aborder une nouvelle étape.

Merci à vous tous.

Table des matières

Glossaire i
Liste des abréviations ii
Liste des annexes iii
Liste des figures iv
Liste des tableaux v
1. Contexte 1
1.1. Incidence sur pommiers de *Neofabraea alba* et enjeux 1
1.2. Le genre *Neofabraea* et les caractéristiques générales de *N. alba* 1
1.2.1. Classification du genre *Neofabraea* 1
1.2.2. Morphologie des spores de *N. alba* 2
1.2.3. Symptômes de *N. alba* sur pommes 2
1.3. Paramètres biologiques connus du cycle de *N. alba* 2
1.3.1. Localisation sur l'arbre et dans l'environnement 2
1.3.2. Pycnidogénèse et sporogénèse 3
1.3.3. Sporulation 3
1.3.4. Dissémination des conidies 4
1.3.5. Germination des conidies 4
1.3.6. Contamination des fruits aux vergers 4
1.4. Choix des axes de travail et des hypothèses 6
2. Matériels et méthodes 7
2.1. Caractéristiques de l'environnement d'étude 7
2.1.1. Implantation du verger 7
2.1.2. Parcelle de la variété Corail® Pinova 7
2.2. Matériel microbiologique utilisé 7
2.2.1. Milieu de culture 7
2.2.2. Mycélium 7
2.2.3. Conditions de culture *in vitro* 7
2.3. Récolte et stockage des fruits 9
2.4. Recueil des données météorologiques et contrôle des températures 9
2.4.1. Station météorologique 9
2.4.2. Sondes HOBO et capteur chambres frigorifiques 9
2.5. Techniques expérimentales mises en œuvre 9
2.5.1. Isolement des épisodes pluvieux à l'aide d'une bâche anti-pluie 9
2.5.2. Création de chancres artificiels pour suivre la sporulation de *N. alba* 11
2.5.3. Mesure de la croissance mycélienne et dénombrement des pycnides et des conidies en boite de Pétri 11
2.6. Dispositifs expérimentaux 11
2.6.1. Essai 1 : bâche anti-pluie 11

2.6.2. Essai 2 : Rinçage 13
2.6.3. Essai 3 : température variable 13
2.6.4. Essai 4 : éclairement variable 13
2.6.5. Essai 5 : ensemencements hebdomadaires 15
2.7. Synthèse des essais et variables étudiées 15
2.8. Analyse statistique 15
3. Résultats 17
3.1. Mycélium 17
3.1.1. Effet de la température 17
3.1.2. Effet de la date d'ensemencement 17
3.1.3. Effet de températures supérieures à 30°C sur la vitesse de croissance mycélienne maximum 17
3.2. Pycnidogénèse 19
3.2.1. Effet de la température et de l'éclairement 19
3.2.2. Effet de la date d'ensemencement 19
3.3. Sporulation 19
3.3.1. Effet de la température et de l'éclairement 19
3.3.2. Effet de la date d'ensemencement 19
3.3.3. Suivi de la sporulation par rinçage de chancres artificiels 21
3.4. Dissémination des conidies 21
3.4.1. Résultats de 2012 21
3.4.2. Résultats de 2013 21
3.4.3. Résultats de 2014 23
3.4.4. Etude graphique de la relation entre le taux de fruits atteints de *N. alba* et la pluviométrie 23
4. Discussion 25
4.1. Discussion des résultats et des protocoles d'expérimentation : propositions d'amélioration 25
4.1.1. Mycélium 25
4.1.2. Pycnides 25
4.1.3. Sporulation 27
4.1.4. Dissémination 28
4.2. Perspectives d'étude sur *N. alba* 29
4.2.1. Poursuite des travaux engagés 29
4.2.2. Essais sur d'autres parties du cycle biologique de *N. alba* 29
Conclusion 31
Bibliographie 32
Sitographie 33
Annexes 35

Glossaire

** Tous les termes suivis d'un astérisque sont définis dans le glossaire.*

Acervule : « organe de fructification asexuée des champignons Ascomycètes, se présentant sous forme d'une masse mycélienne (ou stroma), en général sous-cuticulaire, portant les conidiophores et les conidies* » (Giraud *et al*., 2014).

Apothécie : « chez les champignons Ascomycètes, appareil producteur d'ascospores en forme de coupe. L'intérieur de la coupe, ouvert à l'air libre, est tapissé d'un hyménium* constitué d'asques* » [1].

Aseptée : se dit d'un hyphe* ou d'une spore* non cloisonnée.

Asque : « organe contenant huit ascospores formé au niveau de l'hyménium des périthèces des Ascomycètes » [1].

Conidie : « spore issue de la reproduction asexuée des champignons Ascomycètes » (Giraud *et al*., 2014).

Conidiophore : « partie du mycélium portant les conidies » (Giraud *et al*., 2014).

Epiphyte : organisme vivant sur des plantes qui ne constituent pour lui qu'un support.

Fructification : désigne « l'ensemble des structures de reproduction des champignons » (Giraud *et al*., 2001).

Hyménium : « pseudo-tissu tapissant l'intérieur des fructifications sexuées des Ascomycètes et des Basidiomycètes et comprenant des éléments fertiles (asques ou basides) et parfois des paraphyses (éléments stériles) » [1].

Hyphe : « chacun des filaments à structure cellulaire, dépourvus de chlorophylle, dont l'ensemble constitue le mycélium d'un champignon supérieur ou d'un lichen » [2].

Pourriture lenticellaire : maladie fongique se développant à partir des lenticelles d'un fruit. Les lenticelles étant les pores naturels de l'épiderme de celui-ci.

Pycnide : « organe de fructification asexuée des champignons Ascomycètes, se présentant sous forme d'un conceptacle clos, contenant les conidies, libérées par un orifice (ou ostiole) » (Giraud *et al*., 2014).

Pycnidogénèse : formation des pycnides.

Septée : se dit d'un hyphe ou d'une spore cloisonnée.

Spore : « organe de reproduction ou de conservation des champignons » (Giraud *et al*., 2001).

Sporogénèse : formation des spores.

Sporulation : émission des spores.

Liste des abréviations

ANOVA : ANalysis Of Variance (Analyse de variance)

BP : Boite de Pétri

Ctifl : Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes

DAR : Délai Avant Récolte

Inra : Institut national de la recherche agronomique

PDA : Potato Dextrose Agar

RNM : Réseau des Nouvelles des Marchés

SETOP : Société d'exploitation du système TOP

Liste des annexes

Annexe I : Espèces susceptibles d'être hôtes de *Neofabraea alba*

Annexe II : Intitulés des essais réalisés pour l'étude de *N. alba*

Annexe III : Cycle présumé de *N. alba* et correspondances avec les hypothèses de l'étude.

Annexe IV : Schéma de la parcelle d'expérimentation de bâches anti-pluie

Annexe V : Photographies du système de bâches anti-pluie utilisé pour étudier l'influence de la pluviométrie sur *N. alba*

Annexe VI : Code Ctifl en 10 images de la régression d'amidon des pommes de type radial

Annexe VII : Cinétique de croissance de *N. alba* en fonction de la date d'ensemencement

Annexe VIII : Evolution de la température lors de l'essai 5, ensemencement hebdomadaire et schématisation des périodes de croissance mycélienne maximale pour chaque date d'ensemencement

Annexe IX : Données climatiques de septembre 2013 à juillet 2014

Annexe X : Données climatiques d'août 2014 à juillet 2015

Annexe XI : Résultats des analyses de qualité sur les pommes de la variété Corail® Pinova, cueillies en 2012, 2013 et 2014

Annexe XII : Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités de l'essai 1, bâche anti-pluie, en 2012 et 2013

Annexe XIII : Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités de l'essai 1, bâche anti-pluie, en 2014

Annexe XIV : Variations de température observées dans les chambres froides et dans l'étuve

Annexe XV : Action de la température et de l'éclairement sur le développement mycélien, la pycnidogénèse et la sporulation

Annexe XVI : Effet de la maturité du fruit sur la capacité de *N. alba* à réaliser des contaminations

Liste des figures

Figure 1 : Symptômes de *N. alba* sur pomme (source : la Morinière).

Figure 2 : Cycle présumé de *N. alba*.

Figure 3 : Schéma présentant un exemple d'ouverture des bâches de la modalité T1 à un instant t (seule la modalité T1 reçoit la pluie, la modalité T2 est protégée par la bâche).

Figure 4 : Rinçage des chancres avec 10 ml d'eau et récupération de l'eau de rinçage.

Figure 5 : Conidies de N. alba (échelle non représentative).

Figure 6 : Méthode de calcul utilisée pour le cumul du nombre de conidies par mois.

Figure 7 : Vitesse moyenne de croissance mycélienne journalière de *N. alba* à l'obscurité en fonction de la température (données issues de l'essai 3).

Figure 8 : Vitesse au pic de croissance mycélienne en fonction du cumul de degré/jour supérieur à 30°C (température max.), 7 jours après ensemencement.

Figure 9 : Nombre de conidies de *N. alba* observées par mois en 2013.

Figure 10 : Nombre de conidies de *N. alba* observées par mois en 2014 et 2015.

Figure 11 : Pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction de la pluviométrie. Synthèse des données acquises durant 3 ans dans le cadre de l'essai 1.

Figure 12 : Phénomène de cicatrisation des inoculations de *N. alba* sur trois ans. Inoculation en mai 2013.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sensibilité variétale des pommes aux "Gloeosporioses" (Giraud *et al*., 2014).

Tableau 2 : Etapes du cycle, hypothèses et expérimentations abordées dans cette étude.

Tableau 3 : Détail des modalités mises en place en 2012, 2013 et 2014.

Tableau 4 : Synthèse des dispositifs expérimentaux bâche anti-pluie mis en place en 2012, 2013, 2014.

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques de chaque essai de l'étude.

Tableau 6 : Effet de la température sur la vitesse moyenne de croissance mycélienne journalière après 25 jours à l'obscurité (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

Tableau 7 : Vitesse de croissance et rayon moyen du mycélium selon la date d'ensemencement (tests utilisés : Kruskal-Wallis et comparaison multiple basée sur les rangs).

Tableau 8 : Effet de la température et de l'éclairement sur le nombre moyen de pycnides par boite de Pétri (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

Tableau 9 : Nombre de pycnides selon la date d'ensemencement (tests utilisés : Kruskal-Wallis et comparaison multiple basée sur les rangs).

Tableau 10 : Effet de la température et de l'éclairement sur le nombre moyen de conidies par boite de Pétri (test utilisé : ANOVA).

Tableau 11 : Nombre de conidies selon la date d'ensemencement (test utilisé : Kruskal-Wallis).

Tableau 12 : Résultats cumulés au 22 avril 2013 concernant le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction des périodes d'exposition aux pluies (T1 à T4) en 2012 (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

Tableau 13 : Résultats cumulés au 16 avril 2014 concernant le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction des périodes d'exposition aux pluies (M1 à M6) en 2013 (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

Tableau 14 : Résultats cumulés au 7 avril 2015 concernant le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction des périodes d'exposition aux pluies (P1 à P7) en 2014 (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

Tableau 15 : Synthèse des résultats obtenus dans les essais.

Tableau 16 : Synthèse des conclusions obtenues dans cette étude.

1. Contexte

1.1. Incidence sur pommiers de *Neofabraea alba* et enjeux

Au sein des maladies fongiques de conservation (maladies se développant durant le stockage des fruits), touchant les pommes et les poires, le groupe des « gloeosporioses » est le plus répandu en Europe occidentale (Giraud *et al*., 2012). Cette dénomination regroupe plusieurs espèces qui se développent à partir des lenticelles des fruits. Trois espèces principales de *Neofabraea* font parties de ce groupe : *N. alba*, *N. malicorticis* et *N. perennans*. En France, *N. alba* est la principale espèce rencontrée (Giraud *et al*., 2012). Ce pathogène est également présent en Belgique, en Italie et dans le sud de l'Allemagne (Giraud *et al*., 2012). De plus, Henriquez *et al.* (2004) l'ont récemment identifié en Amérique, et Soto-Alvear *et al*. (2013) au Chili, pays dans lesquels ces symptômes sur pommes sont dénommés « bull's eyes rot » (Soto-Alvear *et al*., 2013).

La France a exporté 600 000 tonnes de pommes en 2013/2014 (RNM [1], 2015) dont une partie conséquente en Asie, au Moyen-Orient et en Afrique (RNM [2], 2015). Or, Israël, la Chine (Cao, 2013) et l'Afrique du sud (Giraud *et al*., 2012) considèrent *Neofabraea alba* comme un organisme de quarantaine. La maîtrise de ce bio-agresseur est donc importante pour l'export français.

En outre, malgré l'existence de connaissances sur le cycle biologique de *Neofabraea alba*, ce pathogène est toujours mal connu. En effet, les molécules appliquées sur le verger, pour lutter contre *N. alba*, sont principalement choisies en fonction des Délais Avant Récolte (DAR), du nombre d'applications autorisées et de l'alternance des matières actives (Giraud *et al*., 2012). De plus, ces traitements sont réalisés à cadence. De ce fait, des recherches plus approfondies sur le mode de vie de *N. alba* sont nécessaires afin d'améliorer le raisonnement de la protection (Giraud *et al*., 2012). Cela permettrait, à terme, de mieux comprendre les modalités d'infection de *N. alba*, voire de réaliser un modèle de prédiction permettant une lutte raisonnée contre ce pathogène.

Les caractéristiques de ce bio-agresseur ainsi que les paramètres connus de son cycle biologique vont être plus amplement détaillés. Ces éléments sont indispensables pour déterminer quels seront les axes de recherche à développer dans cette étude.

1.2. Le genre *Neofabraea* et les caractéristiques générales de *N. alba*

1.2.1. Classification du genre *Neofabraea*

Autrefois classé parmi les *Pezicula* (Cunnington, 2004), le genre *Neofabraea* (ascomycète) fait aujourd'hui partie de la famille des *Dermateaceae*, ordre des Helotiales, classe des Leotiomycetes [3]. Ce genre regroupe des espèces phytopathogènes connues pour provoquer des symptômes de chancres sur certains arbres et arbustes, ainsi que des pourritures lenticellaires*[1] sur les pommes (Cunnington, 2004 ; Wang *et al*., 2014).

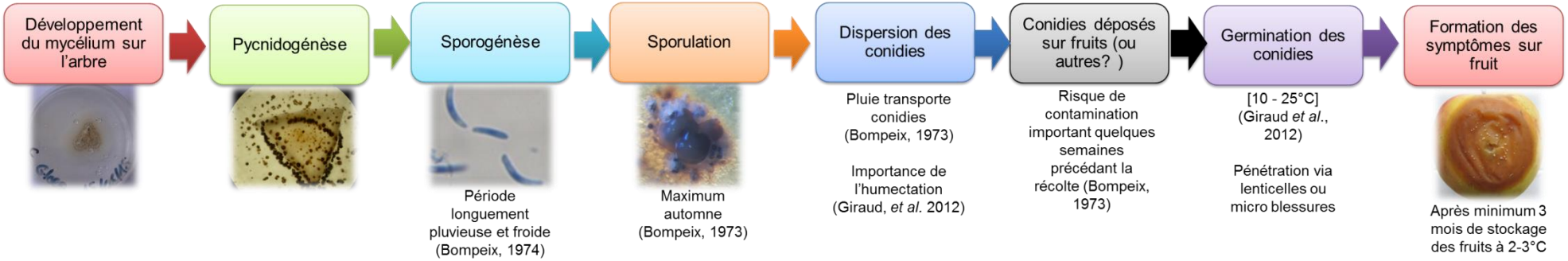
Actuellement, 8 espèces de *Neofabraea* ont été recensées : *N. krawtzewii*, et *N. populi* sur *Populus* (Verkley, 1999 ; Kasanen, 2002), *N. eucalypti* sur *Eucalyptus* (Cheewangkoon *et al*., 2009), *Neofabraea illicii* sur *Illicium verum* (Wang *et al*., 2014), ainsi que *N. kienholzii*,

[1] Tous les termes suivis d'un astérisque sont définis dans le glossaire.



Figure 1 : Symptômes de *N. alba* sur pomme (source : la Morinière).

Figure 2 : Cycle présumé de *N. alba*.



N. alba, *N. malicorticis* et *N. perennans* sur *Malus* (Spotts *et al*., 2009 ; Verkley, 1999). *N. alba* est également présent sur d'autres espèces que le pommier telles que : *Pyrus communis* (Henriquez *et al*. 2006), *Fraxinus spp*. (Angeles *et al*., 2006), *Olea europaea* (Rooney-Latham *et al*., 2013), *Quercus robur L*. et *Euonymus japonicus Thunb*. (Wang *et al.*, 2014).

1.2.2. Morphologie des spores de *N. alba*

Guthrie (1959) est le premier à décrire la forme sexuée de *N. alba* à partir d'observations réalisées sur des blessures de taille de Cox's Orange. D'après lui, les apothécies* contenant les ascospores se forment sur les restes des acervules*. Ces deux organes de reproduction sont difficiles à distinguer l'un de l'autre. Les asques* sont en forme de massues (Guthrie, 1959) et contiennent 8 ascospores (Verkley, 1999). Ces ascospores sont allongées à fusiforme-allongées, droites à légèrement incurvées, et d'une dimension de 20-30*7-10 µm (Guthrie, 1959 ; Tan et Burchill, 1972 ; Verkley, 1999). Les ascospores sont aseptées* puis deviennent septées* en 3-5, voire 6 segments au cours du processus de maturation (Guthrie, 1959). Verkley (1999) décrit également des macro et micro conidies*. Elles sont toutes deux aseptées. Les premières sont moins incurvées et plus larges (17-30*2.5-3.5 µm) que les deuxièmes (15-18*0.5-1 µm). D'autre part, il est important de noter les différences de nomenclature existantes selon les auteurs. Bompeix (1973) souligne l'emploi abusif du terme « acervules » pour *N. alba*. En effet *N. alba* faisant partie des Helotiales, le terme de pycnides* correspond davantage. Ces dissonances sont dues au changement de classification de *N. alba* au cours du temps. De plus, la forme sexuée de *N. alba* n'a, jusqu'à aujourd'hui, pas été observée en Europe continentale (Bompeix, 1973). Toutefois, par convention il est toujours nommé sous sa forme sexuée.

1.2.3. Symptômes de *N. alba* sur pommes

N. alba provoque des pourritures après minimum 3 mois de stockage des pommes à 2-3°C ***(figure 1)***. Le champignon forme des lésions rondes ou ovales, allant du marron au jaune (Soto-Alvear *et al*., 2013), dont le centre est parfois plus clair (Giraud *et al*., 2012). Ces taches peuvent être plates ou creuses et sont généralement fermes au toucher. Les lésions sont bien délimitées et ont un diamètre d'environ 31 mm ±12 mm (Soto-Alvear *et al*., 2013). Des anneaux concentriques peuvent parfois être observés selon la variété. Soto-Alvear *et al*. (2013) précisent que les tissus atteints se détachent aisément et forment une masse sphérique ou conique. En outre, des fructifications* blanches, puis marrons apparaissent lorsque la pourriture vieillit (Giraud *et al*., 2012).

1.3. Paramètres biologiques connus du cycle de *N. alba*

Les différentes étapes du cycle de *N. alba* sont présentées en ***figure 2***.

1.3.1. Localisation sur l'arbre et dans l'environnement

Si Lockhart *et al*. (1961) observent *N. alba* sur des chancres au verger, et affirment que celui-ci peut causer des dégâts sur bois sur des pommiers sains ou affaiblis sous serre, les auteurs s'accordent aujourd'hui sur le fait que *N. alba* est dans l'incapacité de créer lui-même des chancres (Giraud *et al*., 2012). En effet, son comportement semble se rapprocher davantage du saprophytisme. Giraud *et al*. (2012) le retrouvent sur des blessures, des fissures dans les écorces, voire sur des chancres engendrés par d'autres pathogènes. De même, Bompeix (1973) identifie *N. alba* sur des blessures naturelles, ou dues aux pratiques culturales. Il s'agit de rameaux de plus de 2 ans et les charpentières peuvent également être atteintes. De plus, en réalisant des inoculations artificielles sur des branches de pommier,

Bompeix (1973) conclut qu'une blessure parait nécessaire à la pénétration de *N. alba* dans les tissus de l'arbre. En outre, *N. alba* est recensé sur de nombreux organes morts : fruits momifiés, bourgeons et bourses nécrosés, rameaux morts. Des pycnides sont également retrouvées sous des lambeaux d'écorce (Bompeix, 1973).

Toutefois, la localisation précise de *N. alba* dans le verger est encore inconnue aujourd'hui. En effet, nous ne connaissons pas la source d'inoculum qui permet de perpétuer ce pathogène d'une année à l'autre. Bompeix (1973) remarque d'ailleurs que même en cherchant des points d'infection sur des arbres dont le taux de fruits atteints va jusqu'à 85%, il n'arrive à isoler *N. alba* que dans 4% de ses analyses. Ces résultats sont paradoxaux puisqu'ils laissent entrevoir un nombre de sites infectieux très faible au regard du nombre de fruits touchés. Ces observations ont conduit d'autres auteurs à supposer la présence de *N. alba* dans l'environnement du verger. Une liste d'une trentaine d'espèces sensibles à *N. alba* est présentée en ***annexe I***. Toutefois, Bompeix (1973) ne note pas de corrélation entre la présence d'un bois à proximité d'un verger et le taux d'inoculum de *N. alba*.

Tan et Burchill (1972), quant à eux, ont recherché *N. alba* sur les feuilles des pommiers. Ils découvrent des « acervules » de *N. alba* disposées de préférence sur le pétiole et le bord des feuilles. Celles-ci ne semblent se développer que sur les feuilles endommagées. Il en va probablement de même pour les apothécies puisque les deux chercheurs ont pu les observer sur des feuilles de pommiers stockées 12 mois dehors dans des sacs. Pour Tan et Burchill (1972), *N. alba* vivrait de façon épiphyte* sur les feuilles de pommiers en été et ne sporulerait sur celles-ci que lorsqu'elles sont sénescentes ou altérées.

N. ALBA A UN COMPORTEMENT PLUTOT SAPROPHYTE.

LA SOURCE D'INOCULUM PRECISE DE _N. ALBA_ DANS LE VERGER N'EST PAS CONNUE.

1.3.2. Pycnidogénèse et sporogénèse

D'après Bompeix (1974), la pycnidogénèse* nécessite une phase lumineuse pour se dérouler. Plus précisément, les longueurs d'onde bleues (435-480nm) et non les rouges (660 et 730nm), permettraient l'émergence des pycnides (Bompeix, 1974). Toutefois, Bompeix (1974) est ambigu dans ses propos puisqu'il affirme également que les pycnides sont noirâtres à la lumière, et blanches ou jaunes à l'obscurité, ce qui laisse supposer une formation possible des pycnides sans lumière.

Concernant la sporogénèse*, d'après ses observations en verger, Bompeix (1974) détermine qu'elle serait plus faible en été. Selon lui, des « périodes longuement pluvieuses et surtout froides » seraient nécessaires à son déroulement. Il évoque également un effet de la température sur la sporogénèse. Bompeix (1974) confirme ses hypothèses par des expérimentations *in vitro*. De plus, il avance que la sporogénèse peut se poursuivre à l'obscurité si une première phase de lumière a permis une maturation suffisante des pycnides.

1.3.3. Sporulation

Bompeix (1973) et Henriquez *et al.* (2006) ont observé la sporulation* de *N. alba* en conditions naturelles. Henriquez *et al*. (2006) ont effectué des suivis de sporulation dans le sud de l'Oregon, sur des inoculations artificielles de *N. alba* sur des branches de poiriers. Durant la première année, ils observent une sporulation maximale à la fin de l'été et à l'automne.

L'année suivante, la sporulation est minimale à la même période, puis le nombre de conidies augmente durant l'hiver. Bompeix (1973) a, quant à lui, réalisé des suivis sur des pommiers dans la région parisienne. Il observe une sporulation maximale en automne. D'après lui, seul le gel bloque l'activité de *N. alba*. La sporulation redémarre ensuite au printemps.

Par la suite, Bompeix a tenté d'obtenir des conidies *in vitro*. En 1974, il parvient à ses fins en 23 jours, en mettant *N. alba* dans les conditions suivantes : cinq jours à l'obscurité (20-22°C), puis un thermo-cycle de 12h à la lumière (10°C) et 12h à l'obscurité (6°C). En outre, d'après Emmanouilidis (1970), cité par Bompeix (1974), la lumière permettrait d'augmenter la taille des pycnides et des conidies.

LA SPORULATION EST MAXIMALE EN AUTOMNE.

1.3.4. Dissémination des conidies

Tan et Burchill (1972) suggèrent que la dissémination des conidies de *N. alba* a lieu dans des conditions pluvieuses et venteuses. Les autres auteurs semblent plus sceptiques sur le rôle du vent. En effet, Bompeix (1973) et Giraud *et al*. (2012) estiment que la pluie est le vecteur principal des conidies de *N. alba*.

1.3.5. Germination des conidies

Giraud *et al*. (2012) sont les seuls à avoir effectué des expérimentations sur la germination des conidies de *N. alba*. *in vitro*. D'après ces résultats, la germination débute dès 6 heures dans l'eau libre à des températures comprises entre 10 et 25°C. Le taux de germination augmente avec la durée d'humectation, mais est peu affecté par la température. En effet, après 24 heures entre 10 et 20°C, 40% des conidies sont germées et à 25°C, 60% des conidies sont germées. La longueur du tube germinatif croît avec l'augmentation de la température.

LE POURCENTAGE DE GERMINATION EST CONDITIONNE PAR LA DUREE D'HUMECTATION.
LA CROISSANCE DU TUBE GERMINATIF EST REGULEE PAR LA TEMPERATURE.

1.3.6. Contamination des fruits aux vergers

1.3.6.1. Réceptivité et sensibilité des fruits aux contaminations

La contamination des fruits s'effectue au verger (Bompeix, 1973). Il semblerait qu'un mois avant la récolte, 5 à 15% des fruits soient déjà atteints (Giraud *et al*., 2012). D'après Bompeix (1973), la quantité de conidies déposées sur les fruits augmente entre juillet et octobre, mais le risque de contaminations est vraiment important durant les quelques semaines précédant la récolte. Ce phénomène serait notamment dû à l'évolution de la maturité des fruits. En effet, le taux de fruits atteints par *N. alba* est plus faible sur des fruits cueillis avant la date de cueille optimale et augmente une fois celle-ci dépassée (Valiuskaite *et al*., 2006 ; Børve *et al*., 2013). De plus, il semblerait que les fruits plus gros soient atteints avant les autres (Bompeix, 1973).

Comme *N. alba* semble notamment pénétrer dans le fruit au moyen des lenticelles qui parsèment leur surface, la sensibilité des fruits est étroitement liée à la réceptivité de celles-ci. Or, les lenticelles se forment à partir de juillet et sont réceptives au champignon dès leur formation et jusqu'à la cueillette (Bondoux, 1992). Toutefois, Bondoux (1992) note une augmentation du risque de pénétration de *N. alba* dans les lenticelles à l'approche de la récolte, du fait de l'augmentation des durées d'humidité relative élevées et du dépassement du point de rosée.

Tableau 1 : Sensibilité variétale des pommes aux "Gloeosporioses" (Giraud *et al*., 2014).

Sensibilité des variétés de pommiers		
Faible	Moyenne	Elevée
Gala	Golden Delicous	Tentation®
Red Delicious	Fuji	Corail® Pinova
Granny Smith	Elstar	Pink Lady®
Braeburn	Reinettes	Goldrush
Jonagold	Chantecler	Topaz
Idared	Cameo®	Opal®
Sundowner®	$Ariane_{cov}$	
Jazz® Scifresh	Jonathan	
Antares®	Honeycrunch®	

Tableau 2 : Etapes du cycle, hypothèses et expérimentations abordées dans cette étude.

Etapes du cycle étudiées	Hypothèses nulles à vérifier	N° d'essai	Nom court des essais
Mycélium	H1 : la température n'influence pas le développement du mycélium.	Essai : 3	Température variable
	H2 : la date d'ensemencement n'influence pas le développement du mycélium.	Essai : 5	Ensemencement hebdomadaire
Pycnidogénèse	H3 : la température n'affecte pas la formation des pycnides.	Essai : 3	Température variable
	H4 : le type d'éclairement n'affecte pas la formation des pycnides.	Essai : 4	Eclairement variable
	H5 : la date d'ensemencement n'affecte pas la formation des pycnides.	Essai : 5	Ensemencement hebdomadaire
Sporulation	H6 : la température n'influence pas la sporulation.	Essai : 3	Température variable
	H7 : le type d'éclairement n'affecte pas la sporulation.	Essai : 4	Eclairement variable
	H8 : la date d'ensemencement n'influence pas la sporulation.	Essai : 5	Ensemencement hebdomadaire
	Pas d'hypothèse, juste un suivi	Essai : 2	Rinçage
Dissémination	H9 : la pluviométrie n'influence pas l'apparition des symptômes sur les fruits par *N. alba.*	Essai : 1	Bâche anti-pluie

D'autre part, une teneur importante des fruits en anthocyane et en acide ascorbique permettrait d'avoir moins de fruits atteints de « Gloeosporioses » selon Tahir and Gustavsson (2009), cité par Ahmadi-Afzadi *et al*. (2013).

Quoi qu'il en soit, les caractéristiques du fruit ont une importance concernant la sensibilité de ce dernier à *N. alba*. En effet, les variétés de pomme n'ont pas toutes la même sensibilité aux « Gloeosporioses », comme le montrent Giraud *et al.* (2014) dans le ***tableau 1***.

LA CONTAMINATION DES FRUITS PAR N. ALBA A LIEU AU VERGER.
LA CONTAMINATION EST ETROITEMENT LIEE A LA MATURITE DES FRUITS ET A LA SENSIBILITE DE LEURS LENTICELLES.

1.3.6.2. Facteurs climatiques favorisant les contaminations

Giraud *et al*. (2012) ont étudié l'impact de la pluviométrie et de l'humectation sur le taux de fruits touchés par *N. alba*. Il n'y a pas de contamination des fruits sans pluie. Une pluviométrie de 2 mm semble suffisante pour causer des dégâts sur les fruits. D'après Giraud *et al*. (2012), une pluie longue favoriserait davantage les contaminations sur fruit qu'une pluie rapide et importante. Toutefois, aucun lien n'est établi à ce jour entre le rythme et l'intensité des pluies et le taux de fruits atteints (Bompeix, 1973). La pluie semble n'être qu'un transporteur des conidies (Bompeix, 1973). Selon Giraud *et al*. (2012), l'humectation est un paramètre plus important que la pluviométrie. De plus, l'interaction humectation-température semble être le paramètre le plus pertinent pour expliquer le taux de fruits atteints.

En outre, l'exposition des fruits à l'eau, ou à des degrés d'humidité importants, favorise la formation de micro-blessures (Konarska, 2012) qui peuvent également constituer des portes d'entrées pour *N. alba* (Bondoux, 1992).

LA PLUIE PERMET LE TRANSPORT DES CONIDIES.
L'INTERACTION TEMPERATURE-HUMECTATION SEMBLE IMPORTANTE POUR LA REALISATION DE CONTAMINATIONS EFFECTIVES DE *N. ALBA* SUR FRUITS.

1.4. Choix des axes de travail et des hypothèses

Comme évoqué précédemment, les connaissances sur *N. alba* ne sont pas assez précises pour permettre un raisonnement adapté de la lutte chimique contre ce pathogène. Ainsi, selon les éléments fournis par la bibliographie existante, la problématique de cette étude portera sur **l'incidence des paramètres climatiques tels que la température, la pluviométrie, etc. sur le développement de *N. alba***. Le rôle de l'environnement sur le développement du mycélium, la pycnidogénèse, la sporulation et la dissémination des spores chez *N. alba* fera donc l'objet de recherches.

A cet effet, des hypothèses seront énoncées pour chaque étape du cycle étudiée ***(tableau 2)***. Chaque hypothèse fera l'objet d'une ou plusieurs expérimentations. Les numéros des essais concernés sont répertoriés dans le ***tableau 2***. Un tableau récapitulatif des essais figure en ***annexe II***. L'ensemble des hypothèses sont également reportées au niveau des étapes du cycle de *N. alba* correspondantes dans l'***annexe III***.

Dans la suite de cette étude, la méthodologie employée pour réaliser les 5 essais mis en place (2 essais *in vivo*, et 3 *in vitro*) sera détaillée. Les résultats et la discussion seront organisés par hypothèse, et non par expérimentation. Cela permettra une analyse des résultats de manière transversale entre les essais.

2. Matériels et méthodes

2.1. Caractéristiques de l'environnement d'étude

2.1.1. Implantation du verger

La parcelle d'étude est située sur le site de La Morinière, au sud du département de l'Indre-et-Loire. Le climat de la région, qualifié d'« océanique dégradé », est caractérisé par une pluviométrie annuelle comprise entre 750 et 800 mm. Le vent et les pluies viennent en majorité de l'ouest. Le sol est à dominante argileuse et hydromorphe.

2.1.2. Parcelle de la variété Corail® Pinova

La variété de pomme Corail® Pinova est une variété sensible au développement de *N. alba* en conservation. Greffés sur Nakb, les arbres de la parcelle sont plantés depuis 19 ans, avec un écartement de 1 mètre sur le rang et de 4 mètres pour l'inter-rang. L'irrigation est réalisée par goutte à goutte. Deux rangs de 100 mètres sont utilisés pour l'essai 1, bâches anti-pluie ***(annexe IV)***. Le suivi de sporulation par rinçage (essai 2) est également réalisé dans cette parcelle, sur un autre rang.

2.2. Matériel microbiologique utilisé

2.2.1. Milieu de culture

Pour l'ensemble des essais, les inoculations sont réalisées sur PDA. Ce milieu est composé de 15 g d'agar agar et de 24 g de PDA (Potato Dextrose Agar) pour un litre d'eau. Ce milieu a été choisi pour son aptitude à faire croître le mycélium de *N. alba* et à lui faire former des pycnides rapidement (données personnelles).

2.2.2. Mycélium

Le mycélium provient de pommes Corail® Pinova, où *N. alba* a été identifié d'après la morphologie de ses conidies. La souche de *N. alba* est identique pour les essais 3 (température variable), 4 (éclairement variable) et 5 (ensemencement hebdomadaire). Le mycélium est cultivé à température ambiante durant 15 jours avant d'être inoculé sur des arbres, ou ensemencé de nouveau en boite de Pétri. Le mycélium obtenu est ainsi apte à la croissance.

2.2.3. Conditions de culture *in vitro*

Les températures allant de 20 à 35°C sont réalisées dans une étuve Memmert de type UM 200, et les températures de 0 à 10°C sont effectuées dans des chambres froides à la Morinière.

Ne disposant pas de dispositif lumineux à la Morinière, la modalité avec un éclairement alterné (essai 4, éclairement variable) est réalisée dans une chambre climatique de l'Inra d'Angers. Les boites de Pétri ont été 3 jours sous une lumière blanche puis 16 jours sous une lumière bleue. Cette alternance de lumière est due à une erreur de positionnement des boites lors du début de l'essai. La lumière initialement choisie pour l'essai était bleue, puisqu'elle favoriserait la fructification de *N. alba* (Bompeix, 1974).

La durée de culture est de 25 jours pour chaque modalité des essais 3 (température variable) et 5 (ensemencement hebdomadaire), durée suffisante pour l'apparition des

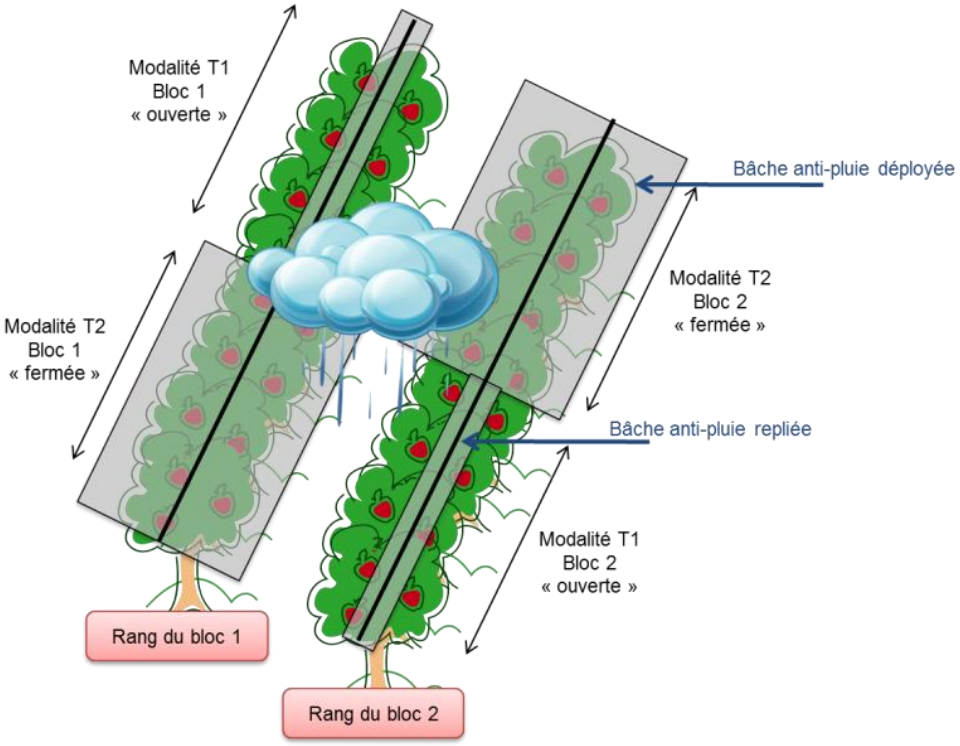


Figure 3 : Schéma présentant un exemple d'ouverture des bâches de la modalité T1 à un instant t (seule la modalité T1 reçoit la pluie, la modalité T2 est protégée par la bâche).

pycnides et la sporulation (Bompeix, 1974). Seules les boites de Pétri de l'essai 4 sont cultivées pendant 19 jours, durée au bout de laquelle l'ensemble des boites en éclairement alterné avaient des pycnides sporulantes, d'après M. Degrave, chargé de réaliser le suivi à l'Inra d'Angers.

2.3. Récolte et stockage des fruits

A la récolte, des analyses de qualité des fruits sont réalisées à l'aide de l'automate « Pimprenelle », fabriqué en 1999 par la société SETOP. Il s'agit d'un appareil d'agréage robotisé, qui analyse sur un échantillon d'une vingtaine de fruits, la fermeté, les taux de sucre et d'acidité malique des fruits. Par ailleurs, une analyse manuelle de la régression d'amidon est réalisée sur 20 fruits à l'aide du code Ctifl (Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes) ***(annexe VI)***. Ces analyses ont pour objectif de vérifier la qualité des fruits. Après récolte, les fruits sont stockés en froid normal (2°C) pendant 6 mois.

2.4. Recueil des données météorologiques et contrôle des températures

2.4.1. Station météorologique

Les données météorologiques sont issues d'une station météo automatisée placée dans le verger. Il s'agit d'une station Agribase fournie par la société Agriscope. Elle est munie de capteurs de température et d'hygrométrie (EME SYSTEMS), de pluviométrie (PRONAMIC), d'humectation (DECAGON Leaf Wetness Sensor) ainsi que d'un anémomètre (THIES). L'Agribase enregistre les données toutes les 15 minutes.

2.4.2. Sondes HOBO et capteur chambres frigorifiques

La température de l'étuve est contrôlée à l'aide de sondes HOBO Pro v2 de type U23-001. Une sonde HOBO est disposée à l'extérieur afin de suivre la température des boites de Pétri de l'essai 5 (ensemencement hebdomadaire). Les chambres froides ont chacune un capteur intégré permettant de suivre l'évolution de la température.

2.5. Techniques expérimentales mises en œuvre

2.5.1. Isolement des épisodes pluvieux à l'aide d'une bâche anti-pluie

A l'aide d'une bâche anti-pluie disposée au-dessus des arbres, des intervalles d'exposition aux pluies sont aménagés durant la période supposée de contamination des fruits par *N. alba*. Le système de protection se compose d'une bâche anti-pluie de 4 mètres de large, déployée au-dessus de la frondaison des arbres ***(annexe V)***. Elle est fixée au moyen de tendeurs afin de garantir une bonne couverture des arbres contre la pluie.

Pour chaque modalité, les bâches sont ouvertes durant une période puis refermées jusqu'à la récolte, de sorte que chaque modalité ne reçoit qu'un seul épisode pluvieux. L'ouverture d'une modalité correspond à la période où celle-ci est exposée aux intempéries (bâche repliée), et la fermeture où elle en est protégée (bâche déployée). Ainsi, une seule modalité est ouverte à un instant t alors que toutes les autres modalités sont fermées ***(figure 3)***, à l'exception du témoin toujours ouvert.



Figure 4 : Rinçage des chancres avec 10 ml d'eau et récupération de l'eau de rinçage (source : la Morinière).

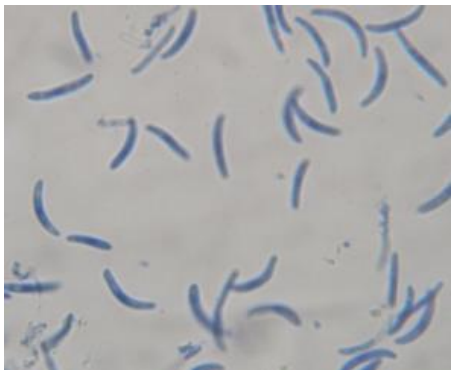


Figure 5 : Conidies de *N. alba* (échelle non représentative, source : la Morinière).

Tableau 3 : Détail des modalités mises en place en 2012, 2013 et 2014.

2012*		2013*		2014*	
Modalités	**Périodes d'exposition aux pluies****	**Modalités**	**Périodes d'exposition aux pluies****	**Modalités**	**Périodes d'exposition aux pluies****
T0 ouvert	24/08 au 02/10	M0 ouvert	14/07 au 10/10	P0 ouvert (hors bâches)	14/07 au 06/10
T0 fermé	Aucune	M0 fermé	Aucune	P0 ouvert B (bâches)	14/07 au 06/10
T1	28/08 au 11/09	M1	03/08 au 17/08	P0 fermé	Aucune
T2	11/09 au 21/09	M2	17/08 au 28/08	P1	14/07 au 29/07
T3	21/09 au 26/09	M3	28/08 au 12/09	P2	29/07 au 11/08
T4	26/09 au 02/10	M4	14/09 au 18/09	P3	11/08 au 19/08
		M5	18/09 au 26/09	P4	19/08 au 27/08
		M6	26/09 au 10/10	P5	27/08 au 16/09
				P6	19/09 au 25/09
				P7	25/09 au 06/10

* Fermeture des bâches (= début de l'essai) : 24/08 en 2012 et 14/07 en 2013 et 2014.
** Les périodes pluvieuses avant le début des essais ne sont pas incluses.

2.5.2. Création de chancres artificiels pour suivre la sporulation de *N. alba*

2.5.2.1. Inoculation de N. alba sur branches de pommier

Les inoculations de *N. alba* sont réalisées sur des branches de Corail® Pinova, âgées de 3-4 ans, d'après la méthode utilisée par Henriquez, *et al.* (2006). Un disque de 3-4 mm^2 de mycélium est inséré sous l'écorce, au niveau du xylème secondaire, après avoir préalablement réalisé une entaille en V sur les branches. La blessure ainsi réalisée est protégée 1 mois avec du parafilm, puis elle est exposée aux conditions climatiques.

2.5.2.2. Déroulement des rinçages

Les rinçages sont réalisés toutes les deux semaines, dans la mesure du possible. Lors des rinçages, chaque chancre est tout d'abord humecté avec 5 ml d'eau, puis 10 ml d'eau sont versés sur la blessure et récupérés dans un flacon ***(figure 4)***.

2.5.2.3. Dénombrement des conidies

Les conidies présentes dans l'eau de rinçage des chancres sont dénombrées au laboratoire, à l'aide d'une cellule de Malassez ***(figure 5)***. Le comptage s'effectue sur un microlitre de solution de rinçage.

2.5.3. Mesure de la croissance mycélienne et dénombrement des pycnides et des conidies en boite de Pétri

Le rayon de mycélium est mesuré à partir du bord du morceau de mycélium ensemencé, jusqu'à la limite de croissance du mycélium.

Le nombre de pycnides est évalué, à l'aide d'un compteur, lors d'une observation à la loupe binoculaire à la fin des essais.

L'évaluation du nombre de conidies formées s'effectue en versant 1 ml d'eau distillée sur les boites de Pétri à la fin de leur culture. La surface du mycélium est ensuite raclée à l'aide d'un scalpel. A partir de cette solution, la concentration en conidies est évaluée à l'aide d'une cellule de Malassez. Le résultat est exprimé en nombre de conidies par microlitre de solution.

2.6. Dispositifs expérimentaux

2.6.1. Essai 1 : bâche anti-pluie

Une bâche est installée sur les lignes des blocs 1 et 2 de l'essai ***(annexe IV)***. L'essai est mené sur trois années (2012, 2013 et 2014). Durant ces trois années d'étude, une modalité correspond à une période d'exposition aux pluies. La durée des périodes varie d'une modalité à une autre ***(tableau 3)***, car l'objectif est d'isoler les épisodes pluvieux susceptibles de provoquer l'apparition de symptômes sur les fruits. La pluviométrie minimale recherchée par modalité est de 10-15 mm (dans la mesure du possible) en une seule fois, ou cumulée sur plusieurs jours consécutifs. En effet, d'après les observations antérieures réalisées à La Morinière, il s'agirait du seuil minimum permettant d'obtenir des symptômes sur pommes avec certitude. Le dispositif utilisé pour les trois années d'étude est présenté dans le ***tableau 4***.

En 2012 et 2013, le dispositif comprend deux témoins ***(tableau 4)***. L'un toujours fermé dans les deux lignes qui sont bâchées, et l'autre, toujours ouvert dans une ligne adjacente aux deux lignes bâchées ***(annexe IV)***. Quelle que soit l'année d'étude, le dispositif est

Tableau 4 : Synthèse des dispositifs expérimentaux bâche anti-pluie mis en place en 2012, 2013, 2014.

	2012	2013	2014
Nombre de modalité	4	6	7
Nombre d'arbres par parcelle élémentaire	20 (faible charge)	10	10
Nombre de blocs	2	2	2
Type de témoins	- 1 témoin fermé - 1 témoin ouvert hors bâche	- 1 témoin fermé - 1 témoin ouvert hors bâche	- 1 témoin fermé - 1 témoin ouvert hors bâche - 1 témoin ouvert dans les bâches
Date d'arrêt des traitements	12 juillet 2012	2 juillet 2013	1er juillet 2014
Date de fermeture des bâches	24 août 2012	14 juillet 2013	14 juillet 2014
Date de récolte	2 octobre 2012	10 octobre 2013	6 octobre 2014
Dates des comptages sur fruits	18/01/13 27/02/13 22/04/13	03/02/14 05/03/14 16/04/14	04/02/15 07/04/15

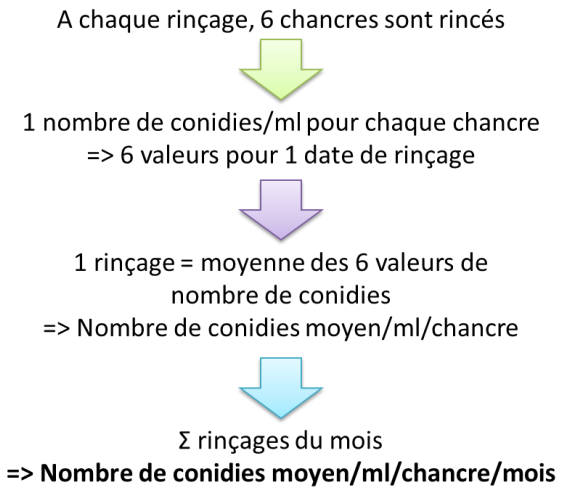


Figure 6 : Méthode de calcul utilisée pour le cumul du nombre de conidies par mois.

constitué de deux blocs randomisés correspondant aux deux lignes bâchées de l'essai. Compte tenu de la faible charge en fruits en 2012, chaque unité expérimentale comportait 20 arbres.

Lors de la saison 2013, la fermeture des bâches a été programmée un mois plus tôt (mi-juillet) afin de mieux cibler le début de la période de contamination. De plus, la charge en fruits étant plus conséquente, des modalités ont pu être rajoutées en réduisant le nombre d'arbres par parcelle élémentaire.

En 2014, un deuxième témoin ouvert a été ajouté au dispositif expérimental initial ***(tableaux 3 et 4)***. Il est situé dans les deux rangs bâchés, à l'emplacement du témoin fermé de 2013. Il a pour but de vérifier si la pose de bâches anti-pluie l'année précédente (N-1), a un impact sur l'inoculum de *N. alba* présent dans la parcelle l'année N.

Pour chaque modalité, 8 caisses de 60 fruits sont récoltées. Les fruits sont tous récoltés en octobre ***(tableau 4)***. Après trois mois de stockage, les fruits atteints de symptômes de *N. alba* sont dénombrés lors de deux ou trois comptages. Ces comptages ont lieu tous les 2-3 mois ***(tableau 4)***. Le résultat est exprimé en pourcentage de fruits atteints de symptômes de *N. alba*.

2.6.2. Essai 2 : Rinçage

Les chancres artificiels de *N. alba* ont été réalisés en mai 2013, sur deux blocs de trois arbres. Une seule branche a été inoculée par arbre. Les premiers rinçages ont eu lieu en septembre 2013 et se poursuivent actuellement.

Le nombre de conidies est exprimé par ml de solution de rinçage. Les résultats sont représentés graphiquement en effectuant un cumul du nombre de conidies par mois ***(figure 6)*** tel que le proposent Henriquez *et al*. (2006). La dynamique de sporulation de *N. alba* dans le verger étudié sera ainsi observée.

2.6.3. Essai 3 : température variable

L'objectif de cette expérimentation est de déterminer si la température influence le développement de *N. alba* au niveau de la croissance mycélienne, ainsi que de la formation des pycnides et des conidies. L'essai est réalisé à l'obscurité. En effet, *N. alba* étant capable de se développer sur des fruits conservés en chambre froide, il est intéressant de rechercher les températures nécessaires à son développement selon les étapes de son cycle. La gamme de température étudiée est la suivante : 0, 3, 10, 20, 25 et 35°C. Une température constitue une modalité. Pour chaque modalité, 10 boites de Pétri sont inoculées.

2.6.4. Essai 4 : éclairement variable

L'expérimentation consiste à tester l'effet d'un éclairement alterné sur la fructification et la formation des conidies de *N. alba*. Cet essai se déroule en partie à l'Inra d'Angers. Deux modalités d'éclairement sont réalisées : obscurité complète, et lumière-obscurité alternée 12h/12h. Les boites de Pétri sont à une température constante de 17°C, température qui est comprise dans l'intervalle de développement mycélien de *N. alba* (Bompeix, 1974 ; Giraud *et al*., 2012) Pour chaque modalité, 5 boites de Pétri sont réalisées.

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques de chaque essai de l'étude.

N° et nom des essais	But de l'essai	Hypothèses	Support	Dispositif	Modalités	Variables étudiées
Essai 1 *Bâche anti-pluie*	Vérifier l'existence d'un lien entre pluviométrie et apparition des symptômes sur fruits	H9	Variété Corail®Pinova	Bâches anti-pluie sur frondaison pommiers de 1 à 3 mois avant récolte	Périodes d'exposition des pommiers aux pluies	% de fruits atteints de *N. alba*
Essai 2 *Rinçage*	Observer la dynamique de sporulation de *N. alba* dans le verger étudié	-	Variété Corail®Pinova	Rinçage des 6 chancres artificiels tous les 15 jours	-	Cumul de conidies/ml de solution de rinçage sur un mois
Essai 3 *Température variable*	Observer la croissance mycélienne et la formation des pycnides et conidies à différentes T°C	H1, H3, H6	Boite de Pétri/ mycélium issu d'une pomme Corail®Pinova	10 boites/modalité 25 jours/modalité Obscurité	**Températures :** 0, 3, 10, 20, 25 et 35°C	**Après 25 jours :** vitesse de croissance mycélienne (cm/j), nombre de pycnides/boites, nombre de conidies/µl
Essai 4 *Eclairement variable*	Observer la formation des pycnides et conidies selon l'éclairement	H4, H7	Boite de Pétri/ mycélium issu d'une pomme Corail®Pinova	T°C = 17°C 5 boites/modalité 19 jours/modalité	**Eclairement :** obscurité ; lumière alternée 12h/12h (bleue)	**Après 19 jours :** nombre de pycnides/boites, nombre de conidies/µl
Essai 5 *Ensemencement hebdomadaire*	Observer la croissance mycélienne et la formation des pycnides et conidies en conditions « naturelles »	H2, H5, H8	Boite de Pétri/ mycélium issu d'une pomme Corail®Pinova	Début : 1er juin 8 dates d'ensemencement 5 boites/modalité 25 jours/modalité Observation 2 fois/semaine	**Date d'ensemencement :** 1 ensemencement/ semaine	• **Au pic de croissance mycélienne :** vitesse de croissance mycélienne maximum (cm/j) • **Après 25 jours :** rayon mycélium (cm), nombre de pycnides/boites, nombre de conidies/µl)

2.6.5. Essai 5 : ensemencements hebdomadaires

Cet essai a pour objectif d'évaluer l'effet de la date d'ensemencement sur la croissance mycélienne, ainsi que la formation des pycnides et des conidies. Pour cela, 5 boites de Pétri sont réalisées chaque semaine à partir du 1er juin et sont aussitôt mises en conditions naturelles à l'extérieur, à l'abri de la pluie et de la lumière directe du soleil. Pour cette étude, 8 dates d'ensemencement ont été testées : 1er juin, 8 juin, 15 juin, 22 juin, 29 juin, 6 juillet, 13 juillet et 20 juillet. Des observations sont réalisées 2 fois par semaine.

2.7. Synthèse des essais et variables étudiées

Les variables étudiées dans chaque essai sont regroupées dans le ***tableau 5***.

2.8. Analyse statistique

Dans chaque essai, les facteurs étudiés sont des variables qualitatives et les variables à expliquer sont des variables quantitatives. Dans le cas de pourcentage, les données subissent une transformation angulaire de Bliss = Arcsinus (racine(x)) où x représente le pourcentage.

Les données des essais, faisant l'objet d'une analyse statistique, sont analysées par une ANOVA (ANalysis Of Variance) au seuil α de 5%, ou par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (au seuil α de 5%) dans le cas où les résidus ne respectent pas la loi normale. Lorsque la p-value est inférieure au seuil de 5%, les différences entre moyennes sont étudiées par le test de Newman-Keuls pour l'ANOVA ; et par un test de comparaisons multiples basées sur les rangs pour le test de Kruskal-Wallis. L'ensemble des analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R (R core team, 2014).

Tableau 6 : Effet de la température sur la vitesse moyenne de croissance mycélienne journalière après 25 jours à l'obscurité (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

	Essai 3 obscurité
Modalités	Vitesse moyenne de croissance mycélienne (cm/jour)*
0°C	0,014 (c) ± 0,005**
3°C	0,029 (b) ± 0,007
10°C	0,049 (a) ± 0,002
20°C	0,050 (a) ± 0,006
25°C	0,052 (a) ± 0,001
35°C	0 (d) ± 0

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014)
** Ecart-type

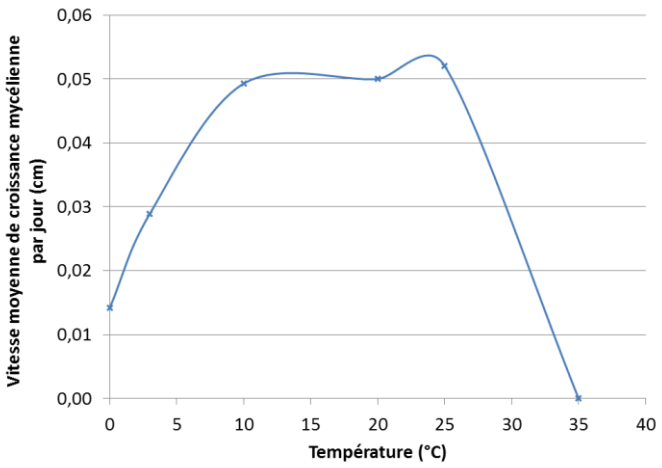


Figure 7 : Vitesse moyenne de croissance mycélienne journalière de *N. alba* à l'obscurité en fonction de la température (données issues de l'essai 3).

Tableau 7 : Vitesse de croissance et rayon moyen du mycélium selon la date d'ensemencement (tests utilisés : Kruskal-Wallis et comparaison multiple basée sur les rangs).

	Après 25 jours	Au pic de croissance
Dates d'ensemencement	Rayon moyen de mycélium (cm)*	Vitesse de croissance mycélienne moyenne (cm/jour)*
1er juin	0,94 (c) ± 0,27**	0,075 (c d) ± 0,047
8 juin	1,02 (a b c) ± 0,192	0,133 (b) ± 0,024
15 juin	0,98 (b c) ± 0,045	0,18 (a) ± 0,018
22 juin	0 (d) ± 0	0 (e) ± 0
29 juin	0 (d) ± 0	0 (e) ± 0
6 juillet	0 (d) ± 0	0 (e) ± 0
13 juillet	1,18 (a) ± 0,39	0,06 (d) ± 0,015
20 juillet	1,18 (a b) ± 0,37	0,107 (b c) ± 0,028

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014)
** Ecart-type

3. Résultats

Les résultats sont ordonnés par étape du cycle étudiée et par hypothèse, et non par essai. En effet, chaque étape du cycle regroupe plusieurs expérimentations. Ce choix de présentation a pour but de permettre une analyse plus transversale des résultats obtenus dans les différents essais. Les résultats seront présentés dans l'ordre des étapes suivantes : mycélium, pycnidogénèse, sporulation, dissémination.

3.1. Mycélium

Deux essais font partie de cet axe de travail, à savoir les essais 3, température variable et 5, ensemencement hebdomadaire. Les hypothèses nulles à tester sont H1 et H2 qui traitent respectivement de l'impact de la température et de la date d'inoculation sur le développement du mycélium.

3.1.1. Effet de la température

D'après les résultats de l'essai 3 présentés dans le ***tableau 6***, la vitesse moyenne de croissance mycélienne est identique à 10, 20 et 25°C après 25 jours d'obscurité. De plus, la vitesse est plus faible à 0 et 3°C qu'entre 10 et 25°C. La vitesse moyenne de croissance mycélienne semble atteindre son maximum à des températures supérieures à 10°C et inférieures à 35°C ***(figure 7)***. En effet, la croissance mycélienne est nulle à 35°C après 25 jours d'obscurité.

3.1.2. Effet de la date d'ensemencement

Il existe des différences significatives au niveau de la vitesse de croissance moyenne calculée au pic de croissance de chaque date d'ensemencement. La vitesse atteinte au pic de croissance est de plus en plus importante pour les ensemencements réalisés entre le 1er et le 15 juin, puis un arrêt de la croissance mycélienne est observé entre le 22 juin et le 13 juillet ***(tableau 7)***. A partir du 13 juillet, la croissance mycélienne reprend.

Toutes les inoculations qui croissent, ont un rayon de mycélium équivalent au bout des 25 jours. Les rayons des différentes dates d'ensemencement appartiennent à des groupes communs, hormis pour les dates du 22 juin au 6 juillet. La cinétique de croissance de *N. alba* en fonction de la date d'ensemencement est présentée en ***annexe VII***.

3.1.3. Effet de températures supérieures à 30°C sur la vitesse de croissance mycélienne maximum

L'absence de croissance mycélienne entre le 22 juin et le 6 juillet, ainsi que les observations réalisées à partir de la ***figure 7*** et de l'***annexe VIII***, conduisent à réaliser une interprétation graphique de la liaison entre la vitesse de croissance mycélienne maximum et la température. La température de 30°C est choisie comme référence puisqu'une forte diminution de la vitesse de croissance mycélienne est observée en ***figure 7*** pour cette température. De plus, ce phénomène est également observable graphiquement sur l'***annexe VIII***.

Pour cela, une variable dénommée « cumul de degré/jour supérieur à 30°C » est calculée pour chaque date d'ensemencement. Cette variable tient compte des températures maximum journalières supérieures à 30°C, pendant les 7 premiers jours à partir de l'ensemencement. Cette somme des degrés supérieurs à 30°C est ensuite mise en relation

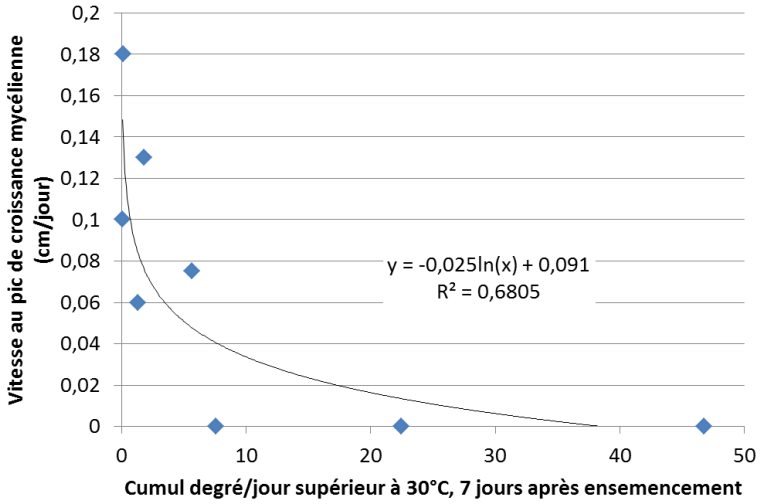


Figure 8 : Vitesse au pic de croissance mycélienne en fonction du cumul de degré/jour supérieur à 30°C (température max.), 7 jours après ensemencement.

Tableau 9 : Effet de la température et de l'éclairement sur le nombre moyen de pycnides par boite de Pétri (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

Essai 3		Essai 4	
Modalités	Nombre moyen de pycnides/boite de Pétri	**Modalités**	Nombre moyen de pycnides/boite de Pétri*
0°C	0 ± 0**	**Obscurité 24h**	0 (b) ± 0
3°C	0 ± 0	**Lumière/obscurité alternée 12h/12h**	85,20 (a) ± 57,521
10°C	0 ± 0		
20°C	0 ± 0		
25°C	0 ± 0		
35°C	0 ± 0		

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014)
** Ecart-type

Tableau 8 : Nombre de pycnides selon la date d'ensemencement (tests utilisés : Kruskal-Wallis et comparaison multiple basée sur les rangs).

		Après 25 jours
Dates d'ensemencement	Nombre de jours pour apparition 1ères pycnides	Nombre moyen de pycnides/boite de Pétri*
1er juin	7	93,4 (ab) ± 44,5**
8 juin	7	71,8 (b) ± 28,4
15 juin	4	74,6 (b) ± 35,9
22 juin	-	0 (d) ± 0
29 juin	-	0 (d) ± 0
6 juillet	-	0 (d) ± 0
13 juillet	7	34,4 (c) ± 22,8
20 juillet	7	117,2 (a) ± 14,2

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014)
** Ecart-type

avec la vitesse de croissance mycélienne maximum. Le graphique en ***figure 8*** est ainsi obtenu.

Il semblerait que la vitesse de croissance mycélienne au pic de croissance et le cumul de degré/jour supérieur à 30°C, dans les 7 jours qui suivent la date d'ensemencement, soient liés. Plus exactement la vitesse décroît quand le cumul de degrés supérieurs à 30°C augmente. Ce phénomène s'observe également sur les graphiques présentés en ***annexe VIII***. En effet, la croissance mycélienne est nulle lorsque la température maximale dépasse 30°C.

3.2. Pycnidogénèse

Les essais 3 (température variable), 4 (éclairement variable) et 5 (ensemencement hebdomadaire) ont permis d'étudier les effets de la température, de l'éclairement et de la date d'inoculation sur la formation des pycnides (H3, H4 et H5).

3.2.1. Effet de la température et de l'éclairement

A l'obscurité, quelle que soit la température, aucune pycnide n'a été dénombrée dans l'essai 3 ***(tableau 8)***. L'essai 4 met en évidence une différence significative du nombre de pycnides entre la modalité à l'obscurité totale, et celle ayant subi une alternance de lumière/obscurité. En effet, des pycnides se sont formées dans le dispositif avec lumière/obscurité alternées dès 7 jours après la mise en culture, alors qu'il n'y en a pas eues à l'obscurité même après 19 jours.

3.2.2. Effet de la date d'ensemencement

D'après le ***tableau 9*** les ensemencements entre le 1er et le 15 juin appartiennent à un groupe commun, il n'y a donc pas de différence du nombre de pycnides entre ces dates d'ensemencement. Par contre les ensemencements du 13 et 20 juillet se distinguent des autres. Le nombre de pycnides du 13 juillet est faible alors que celui du 20 juillet est aussi élevé que le 1er juin. A noter que les ensemencements n'ayant pas eu de développement de mycélium n'ont pas développé de pycnides. Les premières pycnides apparaissent entre 4 et 7 jours après ensemencement.

3.3. Sporulation

L'effet de la température, de l'éclairement et de la date d'inoculation sur la sporulation (H6, H7, H8) est étudié au travers des essais 3 (température variable), 4 (éclairement variable) et 5 (ensemencement hebdomadaire). L'essai 2 (rinçage) a permis de réaliser un suivi de la dynamique de sporulation de *N. alba* sur trois ans.

3.3.1. Effet de la température et de l'éclairement

L'essai 3 ne présente aucune conidie après 25 jours à l'obscurité, quelle que soit la température testée ***(tableau 10)***. En effet, il n'y avait pas eu de développement de pycnides. Concernant l'essai 4, il n'y a pas de différence significative entre les deux modalités testées du fait du faible nombre de conidies observées.

3.3.2. Effet de la date d'ensemencement

Très peu de conidies ont été retrouvées dans les boites de Pétri, quelle que soit la date d'ensemencement ***(tableau 11)***. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les dates d'ensemencement, le nombre de conidies observées étant très faible.

Tableau 10 : Effet de la température et de l'éclairement sur le nombre moyen de conidies par boite de Pétri (test utilisé : ANOVA).

Essai 3		Essai 4	
Modalités	Nombre moyen de conidies/boite de Pétri	**Modalités**	Nombre moyen de conidies/boite de Pétri*
0°C	0 ± 0**	**Obscurité 24h**	0 (NS) ± 0
3°C	0 ± 0	**Lumière/obscurité alternée 12h/12h**	0,2 (NS) ± 0,447
10°C	0 ± 0		
20°C	0 ± 0		
25°C	0 ± 0		
35°C	0 ± 0		

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014)
** Ecart-type

Tableau 11 : Nombre de conidies selon la date d'ensemencement (test utilisé : Kruskal-Wallis).

	Après 25 jours
Dates d'ensemencement	Nombre moyen de spores/boite de Pétri
1er juin	0 (NS) ± 0*
8 juin	0,4 (NS) ± 0,894
15 juin	0 (NS) ± 0
22 juin	0 (NS) ± 0
29 juin	0 (NS) ± 0
6 juillet	0 (NS) ± 0
13 juillet	0 (NS) ± 0
20 juillet	0 (NS) ± 0

* Ecart-type

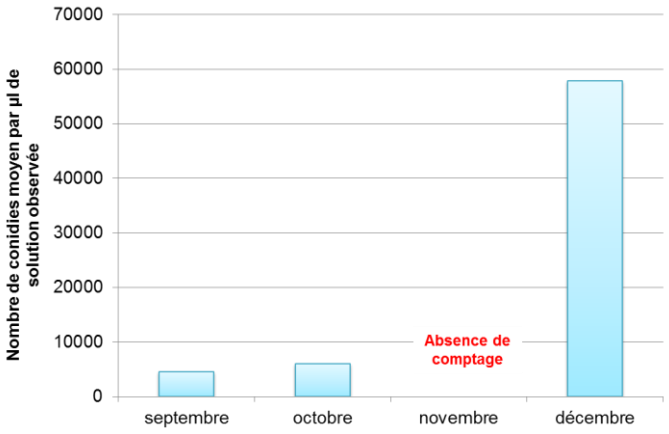


Figure 9 : Nombre de conidies de *N. alba* observées par mois en 2013.

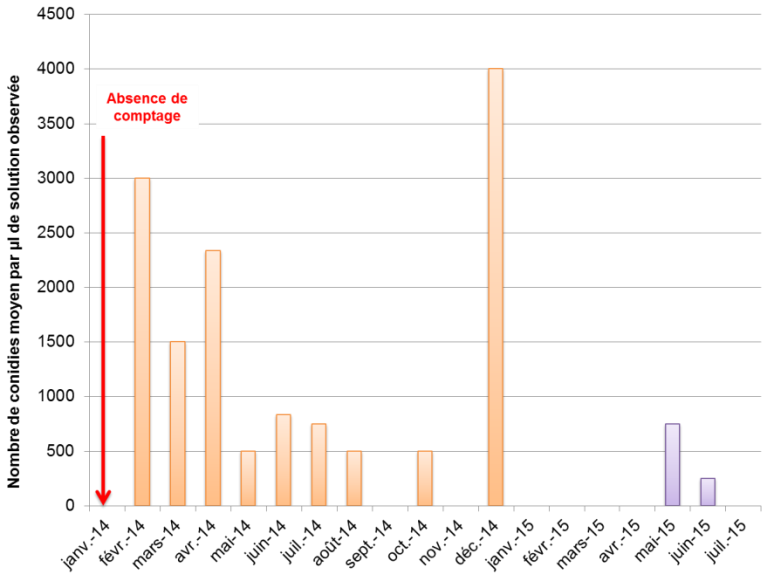


Figure 10 : Nombre de conidies de *N. alba* observées par mois en 2014 et 2015.

3.3.3. Suivi de la sporulation par rinçage de chancres artificiels

Ce suivi a été réalisé sur trois ans. Les résultats de 2013 sont présentés dans la ***figure 9***, et ceux de 2014 et 2015 dans la ***figure 10***. La météorologie de 2013 à 2015 est présentée dans les ***annexes IX*** et ***X***.

En 2013, on observe peu de conidies en septembre et octobre, alors que le mois de décembre en compte beaucoup plus. Il n'y a pas eu de comptage en novembre 2013 et janvier 2014 pour des raisons organisationnelles. En 2014, le nombre de conidies décroît de février jusqu'à l'automne, puis augmente en décembre. En 2015, des conidies sont observées uniquement en mai et en juin.

Alors qu'en 2014 la période de février à avril comptait entre 3000 et 1500 conidies par mois, en 2015, il n'y a pas eu de conidies durant cette période. De manière générale, le nombre de conidies observées semble diminuer d'année en année.

3.4. Dissémination des conidies

Cet axe de travail comprend l'essai 1 : bâches anti-pluie. L'hypothèse nulle à vérifier est H9 : La pluviométrie n'influence pas l'apparition des symptômes sur les fruits par *N. alba*. Les résultats des analyses qualité réalisées sur les fruits des trois années d'étude sont présentés en ***annexe XI***.

3.4.1. Résultats de 2012

En 2012, le cumul de précipitations dans l'essai est de 29 mm pour le témoin ouvert. Ce dernier présente un cumul de 57% de fruits contaminés par *N. alba* au 22 avril 2013 ***(tableau 12)***. Malgré la faible pluviométrie durant l'essai ***(annexe XII)***, la pression de l'agent pathogène est assez importante sur le témoin ouvert. A contrario, le témoin fermé, qui n'a reçu aucune pluie pendant la période concernée par l'étude, présente seulement 7% de fruits touchés par *N. alba*.

Il semble qu'il y ait eu une seule période responsable de la majorité des contaminations sur fruits. En effet la modalité T3 est la seule à avoir un taux de fruits atteints de *N. alba* (47%) comparable au témoin ouvert, bien que statistiquement différent de celui-ci. Or durant la période d'ouverture de T3, un cumul de pluie de l'ordre de 21 mm a été enregistré ***(tableau 12 et annexe XII)***. Les autres modalités T1, T2 et T4, qui ont respectivement reçu 2,2, 5,5 et 0,6 mm de pluie, ont un taux de fruits touchés par *N. alba* compris entre 6 et 11%, ce qui est équivalent au témoin fermé.

3.4.2. Résultats de 2013

L'année 2013 a été caractérisée par une forte pluviométrie durant le mois de septembre ***(annexe XII)***. Le cumul de précipitations durant l'essai atteint 122,6 mm pour le témoin ouvert ***(tableau 13)***. Le taux de fruits atteints de *N. alba* dans le témoin ouvert est équivalent à 2012. Le témoin fermé présente 2% de fruits touchés. L'ensemble des modalités de l'essai a reçu entre 9,6 et 54,8 mm de pluie. Toutefois, aucune modalité ne présente un taux de fruits contaminés équivalent au témoin ouvert ***(tableau 13)***. La modalité M6, avec 11,5 % de fruits atteints, est la plus touchée après le témoin ouvert. Toutes les autres modalités (de M1 à M5) ont un pourcentage de fruits contaminés par *N. alba* statistiquement équivalent à celui du témoin fermé.

Tableau 12 : Résultats cumulés au 22 avril 2013 concernant le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction des périodes d'exposition aux pluies (T1 à T4) en 2012 (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

2012			
Modalités	Fruits observés atteints de *N. alba* (en %)	Moyennes données transformées*	Cumul de pluie reçu pendant l'essai (en mm)
T0 fermé	6,6	0.257 (c) ± 0,071**	0
T0 ouvert	56,8	0.890 (a) ± 0,129	29
T1	7,5	0.238 (c) ± 0,148	2,2
T2	10,8	0.331 (c) ± 0,091	5,2
T3	46,8	0.731 (b) ± 0,1	21
T4	6,5	0.260 (c) ± 0,039	0,6

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014) à partir des données transformées selon la transformation angulaire de Bliss
** Ecart-type

Tableau 13 : Résultats cumulés au 16 avril 2014 concernant le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction des périodes d'exposition aux pluies (M1 à M6) en 2013 (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

2013			
Modalités	Fruits observés atteints de *N. alba* (en %)	Moyennes données transformées*	Cumul de pluie reçu pendant l'essai (en mm)
M0 fermé	2,1	0.133 (c) ± 0,065**	0
M0 ouvert	57,9	0.869 (a) ± 0,165	122,6
M1	2,4	0.127 (c) ± 0,096	9,6
M2	1,3	0.075 (c) ± 0,088	11,8
M3	4,9	0.204 (c) ± 0,091	13,6
M4	5,6	0.193 (c) ± 0,158	22
M5	4,7	0.215 (c) ± 0,057	20,4
M6	11,5	0.332 (b) ± 0,109	54,8

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014) à partir des données transformées selon la transformation angulaire de Bliss
** Ecart-type

Tableau 14 : Résultats cumulés au 7 avril 2015 concernant le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction des périodes d'exposition aux pluies (P1 à P7) en 2014 (tests utilisés : ANOVA et Newman-Keuls).

2014			
Modalités	Fruits observés atteints de *N. alba* (en %)	Moyennes données transformées*	Cumul de pluie reçu pendant l'essai (en mm)
P0 fermé	3,8	0,172 (d) ± 0,102**	0
P0 ouvert (hors bâches)	32,1	0,608 (a) ± 0,135	177
P0 ouvert B (sous bâches)	19,1	0,446 (b) ± 0,109	177
P1	2,8	0,132 (d) ± 0,119	14,4
P2	9	0,282 (cd) ± 0,152	68,2
P3	4,7	0,190 (d) ± 0,130	48,2
P4	4,6	0,198 (d) ± 0,105	11,2
P5	4,1	0,195 (d) ± 0,069	21
P6	7,7	0,268 (cd) ± 0,081	14,4
P7	13	0,362 (bc) ± 0,082	20,6

* Moyennes calculées par le logiciel R (R Core Team, 2014) à partir des données transformées selon la transformation angulaire de Bliss
** Ecart-type

Malgré les précipitations importantes, les modalités M1 à M6 présentent de faibles taux de contaminations par *N. alba*.

3.4.3. Résultats de 2014

L'année 2014 s'est caractérisée par de forts épisodes pluvieux durant la 1ère quinzaine d'août, puis par un mois de septembre plutôt sec ***(annexe XIII)***. Le cumul de pluie atteint 177 mm dans les témoins ouverts. La pression de *N. alba* est faible pour cette année avec un maximum de 32% de fruits touchés dans le témoin ouvert hors bâche. Les deux témoins ouverts sont significativement différents l'un de l'autre ***(tableau 14)***. La modalité P7 peut être rapprochée du témoin ouvert sous bâche. Les modalités P2 et P6 ont une pression comprise entre celle du témoin fermé et celle de P7. Le témoin fermé, quant à lui, présente le plus faible taux de fruits atteints, ainsi que les modalités P1 et P3 à P5.

3.4.4. Etude graphique de la relation entre le taux de fruits atteints de *N. alba* et la pluviométrie

Le graphique en ***figure 11*** permet d'étudier la relation entre la pluviométrie et le taux de fruits atteints de *N. alba* (transformé selon Arcsinus racine (%)). Visuellement, il ne semble pas y avoir de liaison linéaire entre ces deux variables. La droite de régression et son R^2 associé confirme cette première analyse puisqu'ils n'indiquent pas de dépendance linéaire entre le taux de fruits atteints de *N. alba*, et la pluviométrie. En effet, R^2 indique qu'environ un quart de la variance du taux de fruits touchés par *N. alba* est expliqué par la pluviométrie. Cela signifie que la pluviométrie n'est pas le seul facteur permettant d'expliquer le pourcentage de fruits touchés par *N. alba*.

Enfin, le ***tableau 15*** résume l'ensemble des résultats obtenus pour chaque essai.

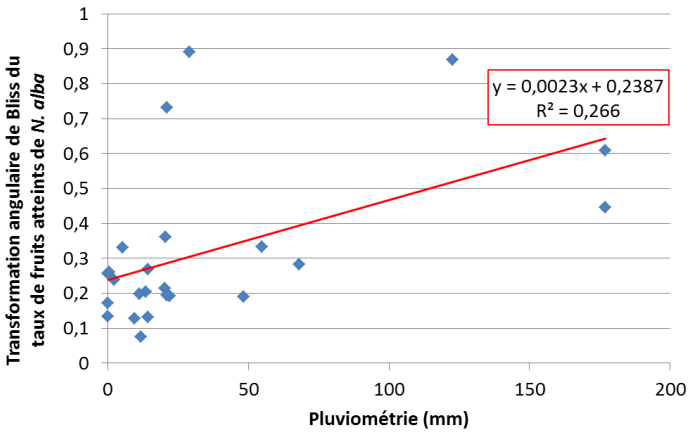


Figure 11 : Pourcentage de fruits atteints de *N. alba* en fonction de la pluviométrie. Synthèse des données acquises durant 3 ans dans le cadre de l'essai 1.

Tableau 12 : Synthèse des résultats obtenus dans les essais.

Essais	Etapes du cycle étudiées			
	Mycélium	Pycnidogénèse	Sporulation	Dissémination
Essai 1 *Bâche anti-pluie* H9	-	-	-	• Pas de symptômes sur fruits sans pluie • Pas d'augmentation des contaminations en fonction de la quantité de pluie • Dissémination contaminante dès 2-3 mois avant récolte
Essai 2 *Rinçage*	-	-	• Sporulation principalement au printemps (mars-avril) et en hiver (pic décembre)	-
Essai 3 *Température variable* H1, H3, H6	• Croissance identique entre 10-25°C • Croissance très faible à 0°C • Croissance nulle à 35°C	• Pas de pycnides à l'obscurité	• Pas de sporulation car pas de pycnides	-
Essai 4 *Eclairement variable* H4, H7	-	• Pycnides à la lumière uniquement • Formation dès 7 jours	• Pas de différence significative entre lumière et obscurité	-
Essai 5 *Ensemencements hebdomadaires* H4, H7	• Vitesse de croissance diminue quand T°C> 30°C	• Apparition pycnides entre 4 et 7 jours après ensemencement	• Pas de différence significative entre les dates d'ensemencement	-

4. Discussion

4.1. Discussion des résultats et des protocoles d'expérimentation : propositions d'amélioration

4.1.1. Mycélium

A travers l'analyse des essais 3 (température variable) et 5 (ensemencement hebdomadaire), consacrés au développement du mycélium, un effet de la température sur la vitesse de croissance est mis en évidence. Pour un développement de 25 jours à l'obscurité, il semblerait que la plage optimale de développement se situe entre 10 et 25°C. Les températures létales se situeraient entre 25-35°C et en dessous de 0°C. Ces températures restant toutefois approximatives étant données les variations de températures observées dans l'étuve ***(annexe XIV)*** ainsi qu'un arrêt des chambres froides survenu le 25 juin, entraînant une hausse temporaire des températures.

Ces résultats rejoignent les observations réalisées dans l'essai 5. En effet, la vitesse de croissance mycélienne semble plus importante lorsque la température moyenne est proche de 20°C ***(annexe VIII)***. De plus, un effet limitant des températures supérieures à 30°C sur la vitesse de croissance maximale est observé.

Les observations de Giraud *et al*. (2012) sur les températures de germination des conidies, ainsi que les expériences de thermo-cycle de Bompeix (1974), appuient l'hypothèse d'une température optimale de croissance mycélienne située entre 10 et 25°C.

A l'avenir, il serait souhaitable d'employer une étuve ayant moins de variations que celle utilisée dans cette étude pour les températures hautes (25-35°C).

4.1.2. Pycnides

Les essais 3 (température variable) et 4 (éclairement variable) mettent en évidence le besoin en lumière pour la formation des pycnides (Bompeix, 1974), quelle que soit la température considérée. Aucune pycnide ne peut se développer si le mycélium ne croît pas, d'après les observations de l'essai 5 (ensemencement hebdomadaire). Que ce soit dans les essais 4 ou 5, la formation des pycnides semble s'effectuer en moins de 10 jours. Il semblerait que les ensemencements du 1er juin et du 20 juillet ont été les plus favorables à la formation des pycnides, contrairement à ceux réalisés entre le 22 juin et le 13 juillet.

Toutefois, des écarts types importants sont présents dans les différentes modalités et amoindrissent les différences observées. D'autre part, l'essai 5 n'a été réalisé que durant 2 mois d'été, qui ne sont probablement pas les plus favorables à la pycnidogénèse (Bompeix, 1974). Il conviendrait de comparer ces données avec celles de mois plus propices à la pycnidogénèse, tels que novembre, décembre.

Lors des essais 4 et 5, le comptage du nombre de pycnides s'est avéré difficile à réaliser. En effet, leur nombre important sur une surface restreinte induit nécessairement des biais dans les comptages. Aussi, une appréciation approximative du nombre de pycnides, à l'aide d'une échelle de notation serait plus pertinente. L'échelle suivante, adaptée de celle proposée par Bompeix (1974), serait plus adaptée :

- 0 = absence de pycnides



Figure 1 : Phénomène de cicatrisation des inoculations de *N. alba* sur trois ans. Inoculation en mai 2013 (source : la Morinière).

- 1 = faible nombre de pycnides (inférieur à 10)
- 2 = entre 10 et 100 pycnides
- 3 = supérieur à 100 pycnides.

4.1.3. Sporulation

4.1.3.1. Etude de la sporulation in vitro

A l'obscurité, aucune conidie n'a pu être formée puisqu'il n'y avait pas de pycnides dans les boites de Pétri (essai 3). Quelques conidies ont été observées dans les essais 4 et 5, mais pas en quantité suffisante pour permettre de conclure sur les conditions nécessaires à la sporulation.

Aussi le dispositif expérimental est probablement à remettre en question. En effet, cette quasi absence de sporulation dans les essais peut être expliquée par une durée trop courte de culture, bien que Bompeix (1974) ait réussi à obtenir des conidies en 23 jours. De plus, les conditions dans lesquelles a été testée la sporulation ne lui étaient probablement pas favorables. Koul *et al*. (2001) signalent que la sporulation chez la plupart des champignons a une gamme de température plus étroite que la croissance mycélienne. La sporulation a généralement lieu lorsque la croissance mycélienne est réduite (Koul *et al*., 2001). En outre, Bompeix (1974) a obtenu des conidies de *N. alba* en réalisant des cultures avec une lumière/obscurité alternée 12h/12h, avec une température de 10°C à la lumière, et de 6°C à l'obscurité. Le repiquage successif d'une seule souche pour l'ensemble des essais a également pu altérer la capacité de sporulation de *N. alba*, phénomène notamment observé sur *Cordyceps militaris* par Sung *et al*. (2006) au-delà de 6 repiquages consécutifs.

4.1.3.2. Suivi de la sporulation par rinçage de chancres artificiels

Le suivi réalisé dans le cadre de l'essai 2 a permis d'identifier deux périodes principales de sporulation pour *N. alba* : une première au printemps (mars-avril) et une deuxième, plus importante en hiver (pic en décembre). Ces observations rejoignent celles de Henriquez *et al*. (2006) et de Bompeix (1973), et montrent l'intérêt de cette méthode pour suivre la dynamique de sporulation de *N. alba* au verger.

La comparaison de l'hiver 2013/2014 avec celui 2014/2015 met en évidence une brusque chute du nombre de conidies par mois pour l'hiver 2014/2015. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution. La première est la présence de fortes gelées en décembre et janvier 2015, alors que l'hiver 2013/2014 a été beaucoup plus doux ***(annexes VII et VIII)***. En effet, d'après Bompeix (1973) le gel bloquerait l'activité de *N. alba*. La deuxième hypothèse est la cicatrisation des inoculations au cours du temps ***(figure 12)***. Ce phénomène de cicatrisation expliquerait également la diminution globale du nombre de conidies observées chaque année. Afin de résoudre ces interrogations, il serait judicieux de réaliser chaque année de nouvelles inoculations. Cela permettrait de lisser l'effet cicatrisation mais également de comparer les sporulations de plusieurs dates d'inoculation.

D'autre part, certains mois aucun rinçage des chancres n'a été réalisé pour des raisons organisationnelles. Or, pour que ce suivi ait du sens il doit être régulier.

En outre, il serait pertinent de mettre en relation ce suivi avec la météorologie. Toutefois, la cadence de rinçage ne le permet actuellement pas, et une augmentation de celle-ci pourrait perturber le cycle naturel de *N. alba*. En effet, des rinçages quotidiens seraient nécessaires, or la pluie et l'humectation semblant jouer un rôle sur *N. alba* (Bompeix, 1974 ;

Giraud *et al*., 2012), cela fausserait l'étude de la dynamique de sporulation. La réalisation de rinçages hebdomadaires serait un compromis à étudier.

4.1.4. Dissémination

La comparaison des témoins ouverts et des témoins fermés de chaque année d'étude permet de rejeter l'hypothèse H9 puisqu'ils sont significativement différents l'un de l'autre, quelle que soit l'année. Les témoins fermés présentent toujours un taux de fruits atteints de *N. alba* inférieur à 10%, alors que les témoins ouverts ont des taux beaucoup plus importants. Or, Giraud *et al*. (2012) observent qu'en l'absence de pluie, il n'y a pas de contaminations sur fruits. Ces observations mettent en lumière la nécessité de périodes pluvieuses pour obtenir des taux de fruits contaminés par *N. alba* supérieurs à 10%.

Toutefois, il n'existe vraisemblablement pas de relation linéaire entre la pluviométrie et le taux de fruits atteints de *N. alba*, d'après l'analyse de la ***figure 11***. La pluviométrie explique seulement 26% de la variance du taux de fruits atteints par *N. alba*. D'autres facteurs jouent donc un rôle sur le pourcentage de fruits touchés.

En analysant les données de 2013 et 2014, il semblerait qu'un potentiel résiduel de contaminations (donnant environ 5% de symptômes) existe dès 2-3 mois avant la récolte. Les propos de Giraud *et al*. (2012) tendent également dans ce sens.

D'autre part, les résultats de l'année 2014 indiquent que l'utilisation d'une bâche anti-pluie l'année N réduit l'inoculum de *N. alba* pour l'année N+1. En effet, le témoin ouvert situé hors bâches est significativement différent du témoin ouvert sous bâches. Cela signifie que le témoin situé hors bâches n'est pas représentatif de la pression de *N. alba* au sein des rangs bâchés. Pour ce type d'essai, il convient donc d'avoir un témoin ouvert dans le dispositif des bâches.

Ainsi, il est intéressant de rechercher quels sont les autres facteurs, hormis la pluie, qui jouent un rôle dans la contamination des fruits par *N. alba*. En effet, malgré d'abondantes pluies en août 2014, il y a eu peu de contaminations sur fruits, alors que des pluies proches de la récolte engendrent davantage de contaminations. Plusieurs hypothèses sont à vérifier pour élucider ce point :

Ha : *N. alba* ne sporule pas en été.

Hb : Les conidies de *N. alba* ne sont pas aptes à contaminer les fruits en été.

Hc : Les fruits n'ont pas la même réceptivité à *N. alba* au cours de la saison.

D'après l'essai 2, malgré leur faible nombre, des conidies seraient tout de même libérées en été. L'hypothèse Ha n'est donc pas la plus vraisemblable. Le seul moyen pour la vérifier est le suivi de l'essai 2. Concernant Hb, il est nécessaire d'étudier plus en détail le processus de sporogénèse ainsi que la capacité d'infection des conidies. Enfin, l'hypothèse Hc est actuellement la plus plausible. En effet, la maturité des fruits a déjà été identifiée comme une cause de variation du pourcentage de fruits atteints par *N. alba* par plusieurs auteurs (Valiuskaite *et al*., 2006 ; Børve *et al*., 2013). De plus, Bondoux (1992) souligne une augmentation du risque de pénétration de *N. alba* dans les lenticelles à l'approche de la récolte.

4.2. Perspectives d'étude sur *N. alba*

Afin d'obtenir des connaissances plus précises sur *N. alba*, dans le but : à court terme de mieux raisonner la protection contre ce pathogène en verger, et à long terme d'acquérir suffisamment de données pour établir un modèle ; il est nécessaire de poursuivre les recherches sur *N. alba*.

4.2.1. Poursuite des travaux engagés

Davantage de précisions sur les premières données issues de cette étude peuvent être obtenues en améliorant les essais 3 et 4. Un essai concernant les effets de la température et de l'éclairement sur le développement du mycélium, la pycnidogénèse et la sporulation peut ainsi être mis en place ***(annexe XV)***. La gamme de température étudiée serait plus large que dans l'essai 3 (de -5 à 35°C) afin de déterminer la température limite basse. Cinq modalités d'éclairement seraient réalisées : obscurité 24h, lumière 24h, lumière/obscurité 12h/12h, lumière 6h/obscurité 18h et lumière 16h/obscurité 8h. La croissance mycélienne serait évaluée quotidiennement afin d'obtenir les cinétiques de développement mycélien de *N. alba* pour chaque température.

La durée d'exposition létale à 35°C pour le mycélium devrait également faire l'objet d'un essai. Pour cela, des boites de Pétri devraient être exposées à 35°C pendant des durées différentes allant de 1h à 72 heures, en passant par 6, 12, 24 et 48 heures. Après exposition les boites seraient remises à 20°C, qui constitue une température optimale pour la croissance mycélienne.

4.2.2. Essais sur d'autres parties du cycle biologique de *N. alba*

Il serait intéressant d'étudier l'effet de la maturité du fruit sur la capacité de *N. alba* à réaliser des contaminations. Des variétés avec des dates de récolte différentes pourraient être utilisées : Gala, Tentation® et Pink Lady® par exemple. Des contaminations artificielles devront être réalisées sur les fruits à différentes périodes dans les 2-3 mois qui précèdent la récolte ***(annexe XVI)***. Après chaque contamination, les fruits seraient ensachés afin d'être protégés des contaminations naturelles. Ainsi, il sera probablement possible de déterminer de façon plus précise le début des contaminations en verger. Cela permettrait de compléter les résultats de l'essai 1. Il faudra préalablement s'assurer que l'ensachage ne perturbe pas la germination des conidies.

De plus, en réalisant des contaminations artificielles à une période connue pour favoriser le développement de *N. alba* (à l'approche de la récolte), un essai sur la période de latence de ce champignon pourrait être proposé. En effet, lors de la conservation des fruits en chambre froide, une période de latence d'un minimum de 3 mois est observée avant le développement de symptômes de *N. alba* sur les fruits. Il serait donc pertinent de savoir si cette période de latence est également présente au verger, dans un premier temps. Dans un second temps, il sera nécessaire de déterminer le ou les facteurs influant sur ce phénomène. Pour cela, les fruits seraient inoculés au verger, ensachés et resteraient sur l'arbre jusqu'à l'apparition des symptômes de *N. alba*.

Tableau 13 : Synthèse des conclusions obtenues dans cette étude.

Facteurs étudiés	Mycélium	Pycnidogénèse	Sporulation	Dissémination
Hypothèses	H1 : la température n'influence pas le développement du mycélium. **FAUX** H2 : la date d'ensemencement n'influence pas le développement du mycélium. **FAUX**	H3 : la température n'affecte pas la formation des pycnides. **ND** H4 : le type d'éclairement n'affecte pas la formation des pycnides. **FAUX** H5 : la date d'ensemencement n'affecte pas la formation des pycnides. **FAUX**	H6 : la température n'influence pas la sporulation. **ND** H7 : le type d'éclairement n'affecte pas la sporulation. **ND** H8 : la date d'ensemencement n'influence pas la sporulation. **ND**	H9 : la pluviométrie n'influence pas l'apparition des symptômes sur les fruits par *N. alba*. **FAUX**
Température	Influence de la vitesse de croissance *In vitro* Optimum : 10-25°C Maximum : 25-35°C Minimum : inf. à 0°C *In vivo* Optimum : env. 20°C Maximum : 30°C	-	-	-
Eclairement	-	Besoin de lumière	Besoin de lumière ?	-
Pluviométrie	-	-	-	Besoin de pluie Pas de liaison linéaire avec le % de fruits atteints de *N. alba*
Autres observations		Formation en moins de 10 jours	Deux périodes dans l'année : 1ère printemps (mars-avril) 2ème hiver (pic décembre)	Dissémination provoquant des symptômes dès 2-3 mois avant récolte

Légende :
- : non étudié
ND : Non Déterminé (manque d'informations pour conclure)

Conclusion

Cette étude visait à déterminer l'incidence de paramètres climatiques tels que la pluviométrie et la température, ainsi que de la photopériode sur différentes étapes du cycle de développement de *N. alba*. Les phases de développement étudiées étaient : la croissance mycélienne, la pycnidogénèse, la sporogénèse et la dissémination des conidies. Cinq essais ont été mis en place pour répondre aux différentes hypothèses posées. Les principaux résultats et les réponses aux hypothèses sont présentés dans le ***tableau 16***.

Différents points sont à améliorer dans cette étude. Afin d'être plus précis, il conviendrait de réaliser les mesures de croissance de mycélium quotidiennement pour l'essai 5 et de contrôler la température à l'intérieur des boites de Pétri avec des sondes. De plus, les rinçages de l'essai 2 pourraient être réalisés de façon hebdomadaire et les inoculations sur les arbres doivent être renouvelées chaque année. Il serait également souhaitable de vérifier l'impact des rinçages sur le cycle naturel de sporulation de *N. alba*. En outre, la méthode de comptage des pycnides doit être simplifiée pour faciliter leur dénombrement. Enfin, l'essai bâche anti-pluie ayant une action sur l'inoculum de *N. alba* présent d'une année sur l'autre, son emplacement doit changer chaque année.

Afin de compléter les données obtenues dans cette étude, des essais portant sur l'action de la température et de la photopériode sur la croissance mycélienne, la pycnidogénèse et la sporogénèse doivent être reconduits. De plus, différents paramètres du cycle de *N. alba* sont encore à étudier, tels que la période de latence avant l'apparition des symptômes, sa localisation dans le verger, etc. Sur ce dernier point, il faudrait explorer la présence de *N. alba* sur les feuilles sénescentes de pommiers, ainsi que sur les plantes hôtes de ce pathogène, présentes dans le verger.

Les résultats de cette étude doivent donc permettre de réaliser des expérimentations plus poussées dans l'objectif d'obtenir des données plus précises sur la biologie de *N. alba*. données qui permettront à terme la création d'un outil d'aide à la décision permettant une lutte raisonnée vis-à-vis de ce pathogène.

Bibliographie

Ahmadi-Afzadi M., *et al*. (2013). Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. Postharvest Biology and Technology, vol. 82, p 51-58.

Angeles G., *et al*. (2006). Effect of *Neofabraea alba* on bark and wood anatomy of *Fraxinus* spp. IAWA Journal, Vol. 27, n°4, p 409-418.

Bompeix G. (1973). Ecologie du *Pezicula alba* GUTHRIE sur *pyrus malus L*. en France. Fruits, vol. 28, n°11 : p 757-773 et vol. 28, n°12 : p 863-886.

Bompeix G. (1974). Action de la lumière et de la température sur le comportement du *Pezicula alba* GUTHRIE et du *P. malicorticis* (JACKS) NANN. *in vitro*. Annale phytopathologie, vol. 6, n°1, p 13-23.

Bondoux P. (1992). Maladies de conservation des fruits à pépins pommes et poires. INRA, Paris, 173 p.

Børve J., *et al*. (2013). Harvest time influences incidence of storage diseases and fruit quality in organically grown “Aroma” apples. European Journal of Horticulture Science, vol. 78, n°5, p 232–238.

Cao D., *et al*. (2013). PCR detection of the three *Neofabraea* pathogenic species responsible for apple bull’s eye rot. Advances in Microbiology, vol. 3, n°1, p 61-64.

Cheewangkoon R., *et al*. (2009). *Myrtaceae*, a cache of fungal biodiversity. Persoonia, vol. 23, p 55-85.

Cunnington J. H. (2004). Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. Australasian Plant Pathology, vol. 33, n°3, p 453–454.

Giraud M., *et al*. (2014). Conservation de la pomme - les gloeosporioses. Le point sur les maladies et ravageurs, n°5, 8 p.

Giraud M., *et al*. (2012). Maladies de conservation de la pomme-biologie et épidémiologie des gloeosporioses. Infos Ctifl, n°285, p 21-29.

Giraud M., *et al*. (2001). Reconnaitre les maladies de conservation pomme poire. Ctifl, Paris, 100 p.

Guthrie E. J. (1959). The occurrence of *Pezicula alba* sp. nov. and *P. malicorticis*, the perfect states of *Gloeosporium album* and G. perennans, in England. Transactions British Mycological Society, vol. 42, n°4, p 502-506.

Henriquez J. L., *et al*. (2004). Etiology of bull’s eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. Plant disease, vol. 88, n°10, p 1134-1138.

Henriquez J. L., *et al*. (2006). Induction of cankers on pear tree branches by *Neofabraea alba* and *N. perennans*, and fungicide effects on conidial production on cankers. Plant disease, vol. 90, n°4, p 481-486.

Kasanen R., *et al*. (2002). *Neofabraea populi* in hybrid aspen stands in southern Finland. Scandinavian journal of forest research, vol. 17, n°5, p 391-397.

Konarska A. (2012). Differences in the fruit peel structures between two apple cultivars during storage. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus, vol. 11, n°2, p 105-116.

Koul A. K., Sumbali G. (2001). Reproductive biology of fungi. In Reproductive biology of plants. Johri B.M., Srivastava P.S, Narosa Publishing House, p. 96-126.

Lockhart C. L., *et al*. (1961). *Gloeosporium album* and *G. malicorticis* on apples in Novia Scotia. Canadian plant disease survey, vol. 45, n°5, p 280-285.

RNM [1] (2015). La pomme en 2013-2014. France AgriMer, 8 p.

RNM [2] (2015). Les exportations de pommes en 2013-2014. France AgriMer, 2 p.

Rooney-Latham S., *et al*. (2013). First report of *Neofabraea alba* causing fruit spot on olive in north America. Plant disease, vol. 97, n°10, p. 1384.

Soto-Alvear S., *et al*. (2013). Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. Plant disease, vol. 97, n°4, p 485-490.

Spotts R. A. *et al*. (2009). Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. Mycological research, vol. 113, n°11, p 1301-1311.

Sung J-M. *et al*. (2006). Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris in vitro*. Mycobiology, vol. 34, n°4, p 196-199.

Tan A. M. et Burchill R.T. (1972). The infection and perennation of the bitter rot fungus, *Gloeosporium album*, on apple leaves. Annals of applied biology, vol. 70, n°3, p 199-206.

Valiuskaite A., *et al*. (2006). Post-harvest fruit rot incidence depending on apple maturity. Agronomy Research, vol. 4, special issue, p 427-431.

Wang L., *et al*. (2014). A new endophytic fungus *Neofabraea illicii* isolated from *Illicium verum*. Mycoscience, vol. 56, n°3, p 1-8.

Sitographie

[1] Inra (2011). Le glossaire de HYP3. http://www7.inra.fr/hyp3/glossaire.htm (consulté le 16 juillet 2015).

[2] Editions Larousse (2015). Dictionnaire de français Larousse. http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais (consulté le 16 juillet 2015).

[3] International Mycological Association (2015). Fungal databases, nomenclature and species bank. http://www.mycobank.org/name/Neofabraea%20alba (consulté le 5 mai 2015).

AGROCAMPUS OUEST

☑ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

Année universitaire : 2014-2015

Spécialité : Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

Gestion Durable du Végétal en horticulture et aménagements paysagers

Mémoire de Fin d'Études

☑ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage

☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Influence de paramètres climatiques et de la photopériode sur la biologie de *Neofabraea alba*, agent responsable de symptômes de gloeosporiose sur pommiers

Justine PERRIN

ANNEXES

Soutenu à Angers le 7 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} Josiane Le Corff

Maître de stage : M^{me} Claude COUREAU

Enseignant référent : M. Alexandre DEGRAVE

Inra : M. Medhi Al-rifai

Inra : M. Arnaud Lemarquand

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Annexe I : Espèces susceptibles d'être hôtes de *Neofabraea alba*

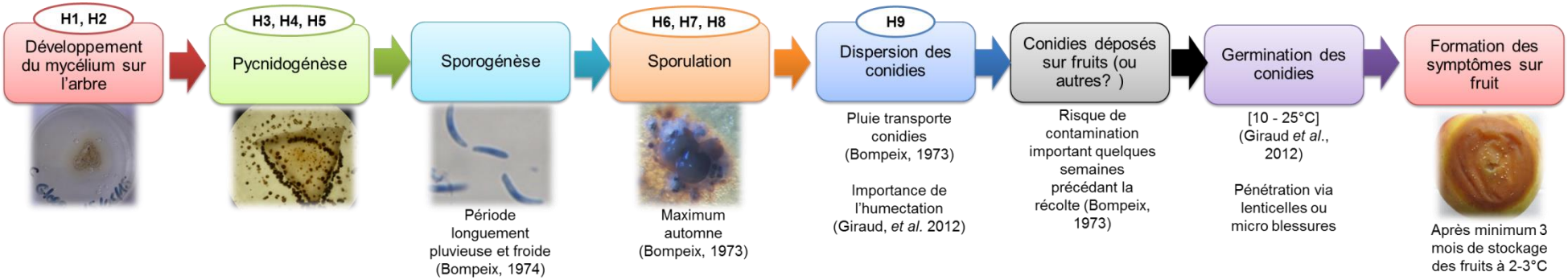
	Noms latins
Arbres fruitiers à pépins	*Malus domestica* *Malus pumila, M. sylvestris* *Pyrus communis* *Pyrus pyrifolia* *Cydiona sp.*
Arbres et arbustes	*Ilex aquifolium* *Fraxinus americana* *Olea europaea* *Quercus robur* *Rubus idaeus* *Rubus sp.* *Ruscus aculeatus* *Salix matsudana* *Sambucus canadensis* *Viburnum tinus* *Vitis vinifera*
Ornementaux	*Acer negundo* *Euonymus japonicus* *Kerria japonica* *Viburnum japonicum*
Plantes herbacées	*Althaea officinalis* *Althaea rosea* *Amaranthus retroflexus* *Aristolochia sipho* *Cucurbita sp.* *Dictamnus albus* *Erigeron sp.* *Linaria vulgaris* *Melilotus albus* *Tamus communis*

(Giraud, *et al*. 2012)

Annexe II : Intitulés des essais réalisés pour l'étude de *N. alba*

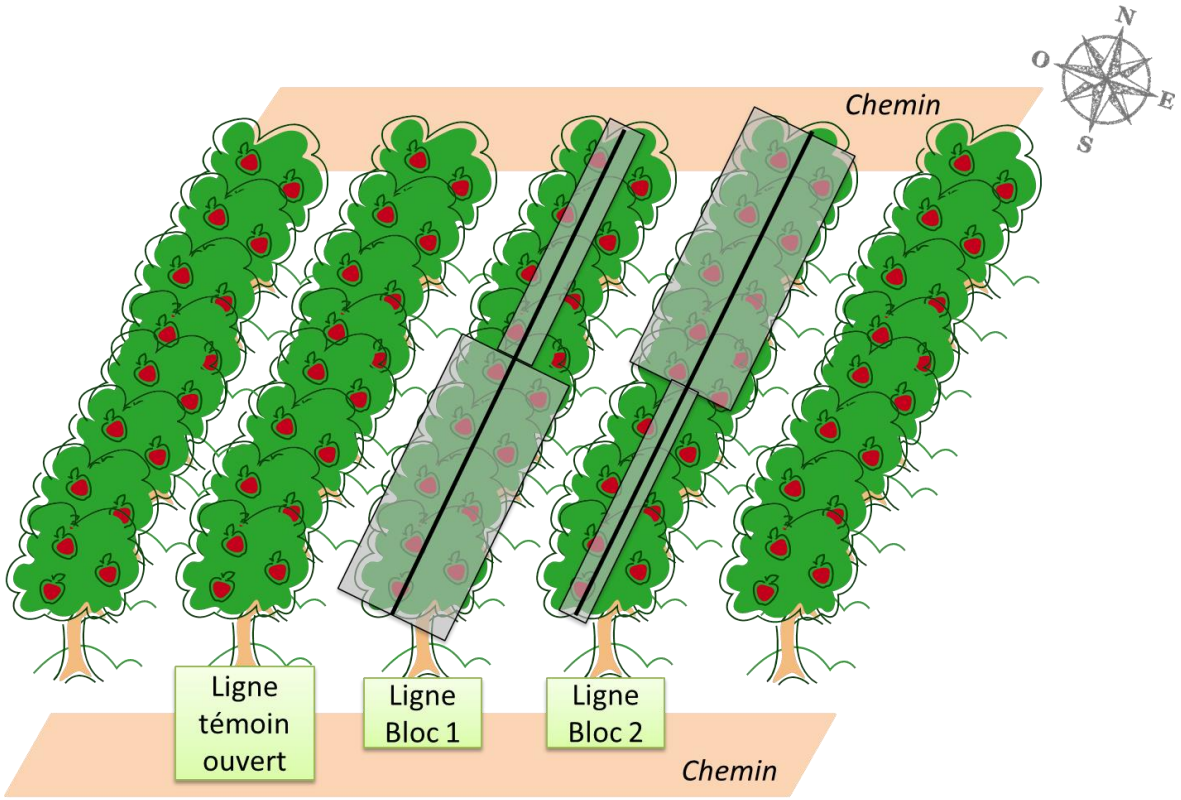
N° d'essai	Nom des essais	Objectifs des essais	Hypothèses nulles à vérifier
Essai 1	Bâches anti-pluie	Vérifier l'existence d'un lien entre pluviométrie et apparition des symptômes sur fruits.	H9 : la pluviométrie n'influence pas l'apparition des symptômes sur les fruits par *N. alba*.
Essai 2	Rinçage	Observer la dynamique de sporulation de *N. alba* dans le verger étudié.	*Pas d'hypothèse, juste un suivi*
Essai 3	Température variable	Observer la croissance mycélienne et la formation des pycnides et conidies à différentes T°C.	H1 : la température n'influence pas le développement du mycélium. H3 : la température n'affecte pas la formation des pycnides. H6 : la température n'influence pas la sporulation.
Essai 4	Eclairement variable	Observer la formation des pycnides et conidies selon l'éclairement.	H4 : le type d'éclairement n'affecte pas la formation des pycnides. H7 : le type d'éclairement n'affecte pas la sporulation.
Essai 5	Ensemencement hebdomadaire	Observer la croissance mycélienne et la formation des pycnides et conidies en conditions « naturelles ».	H2 : la date d'ensemencement n'influence pas le développement du mycélium. H5 : la date d'ensemencement n'affecte pas la formation des pycnides. H8 : la date d'ensemencement n'influence pas la sporulation.

Annexe III : Cycle présumé de *N. alba* et correspondance avec les hypothèses de l'étude

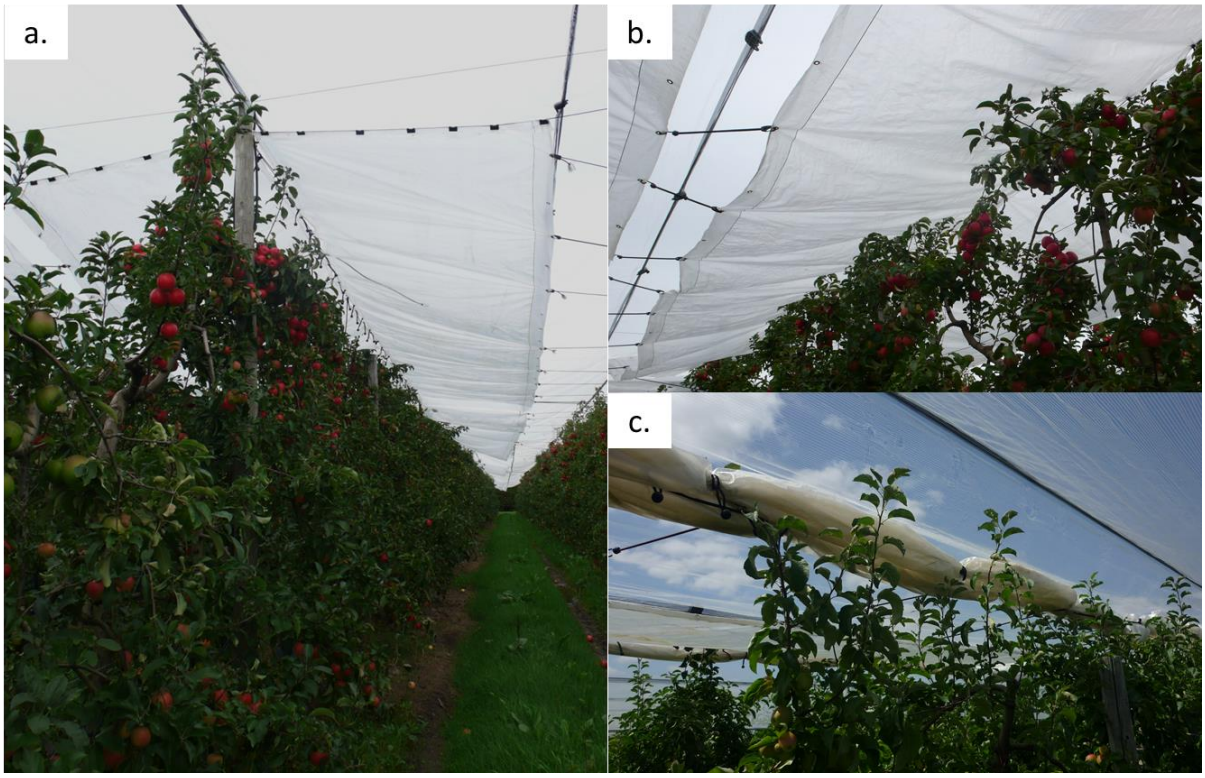


N°	Hypothèses nulles à vérifier
H1	La température n'influence pas le développement du mycélium.
H2	La date d'ensemencement n'influence pas le développement du mycélium.
H3	La température n'affecte pas la formation des pycnides.
H4	Le type d'éclairement n'affecte pas la formation des pycnides.
H5	La date d'ensemencement n'affecte pas la formation des pycnides.
H6	La température n'influence pas la sporulation.
H7	Le type d'éclairement n'affecte pas la sporulation.
H8	La date d'ensemencement n'influence pas la sporulation.
H9	La pluviométrie n'influence pas la contamination des fruits par *N. alba.*

Annexe IV : Schéma de la parcelle d'expérimentation de bâches anti-pluie

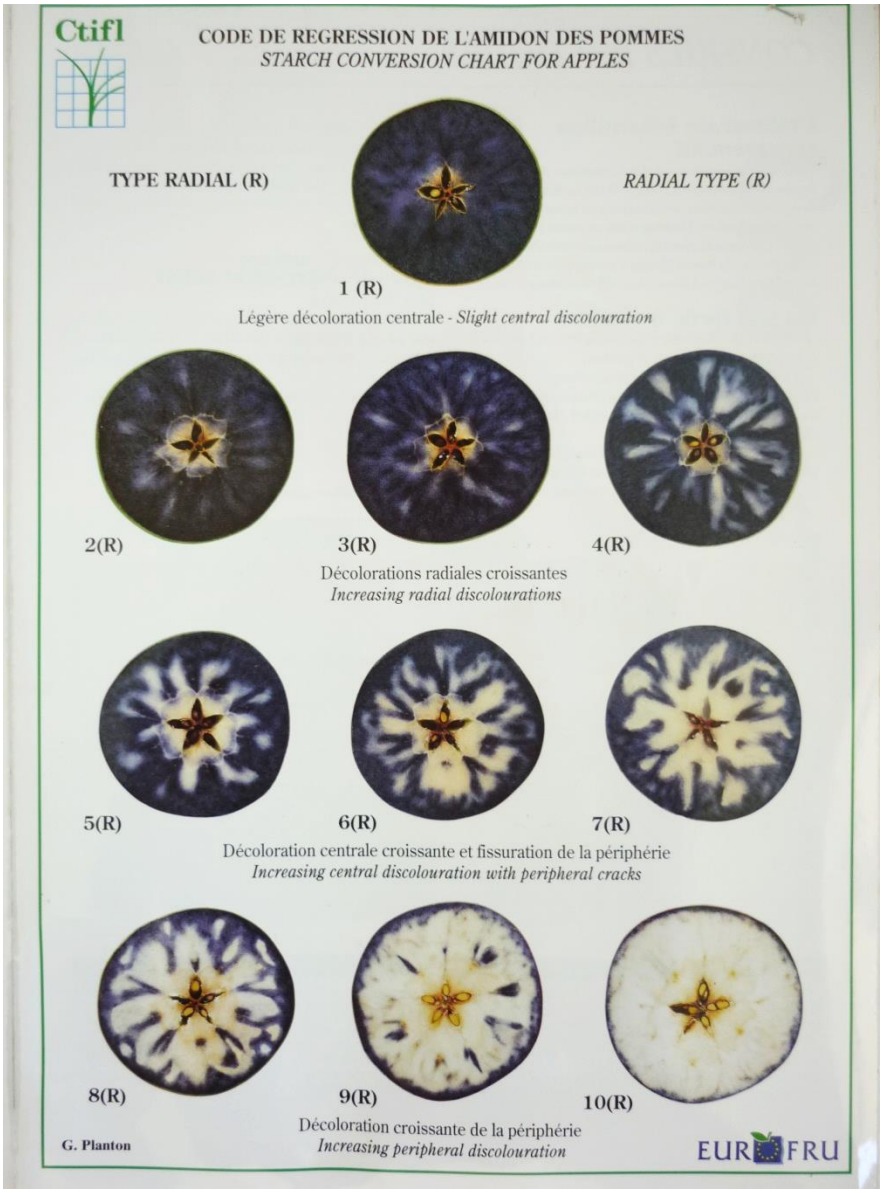


Annexe V : Photographies du système de bâches anti-pluie utilisé pour étudier l'influence de la pluviométrie sur *N. alba*



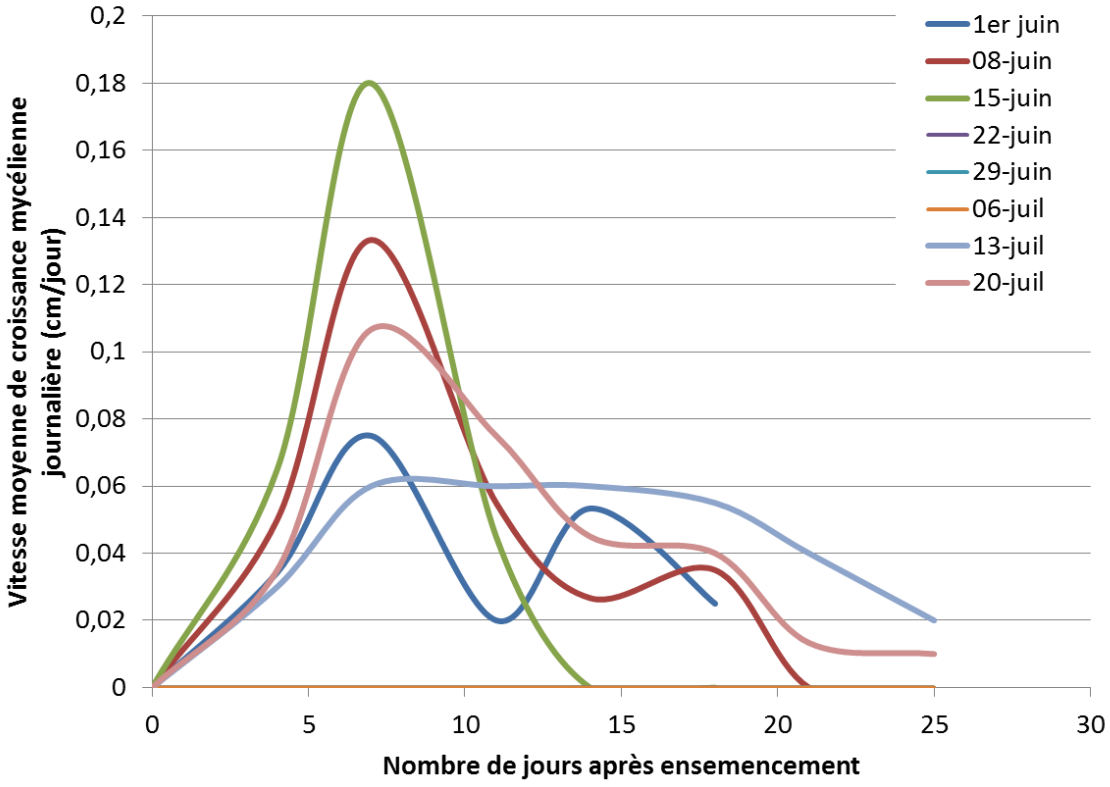
a. Bâche déployée sur une modalité de l'essai. b. Arbres protégés de la pluie par la bâche (modalité fermée). c. Arbres exposés à la pluie (modalité ouverte). *(Source : La Morinière)*

Annexe VI : Code Ctifl en 10 images de la régression d'amidon des pommes de type radial

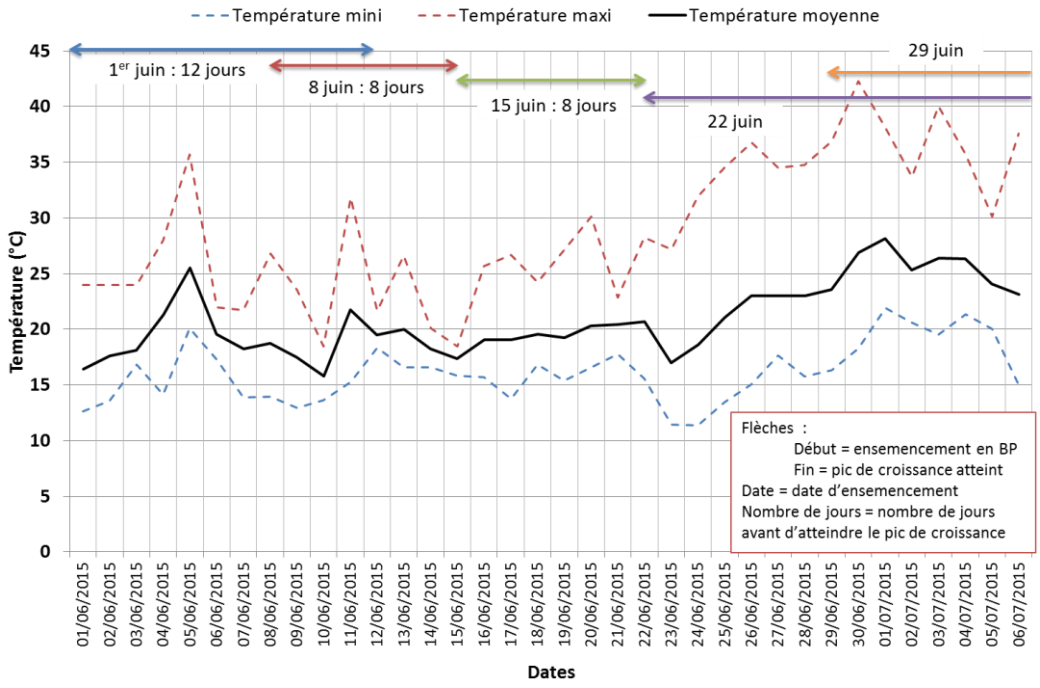


Les fruits sont aspergés d'une solution iodée permettant de révéler la présence d'amidon (coloration bleu foncée). Plus le fruit est bleu, plus il contient d'amidon, et moins il est mature. *(Source : Ctifl)*

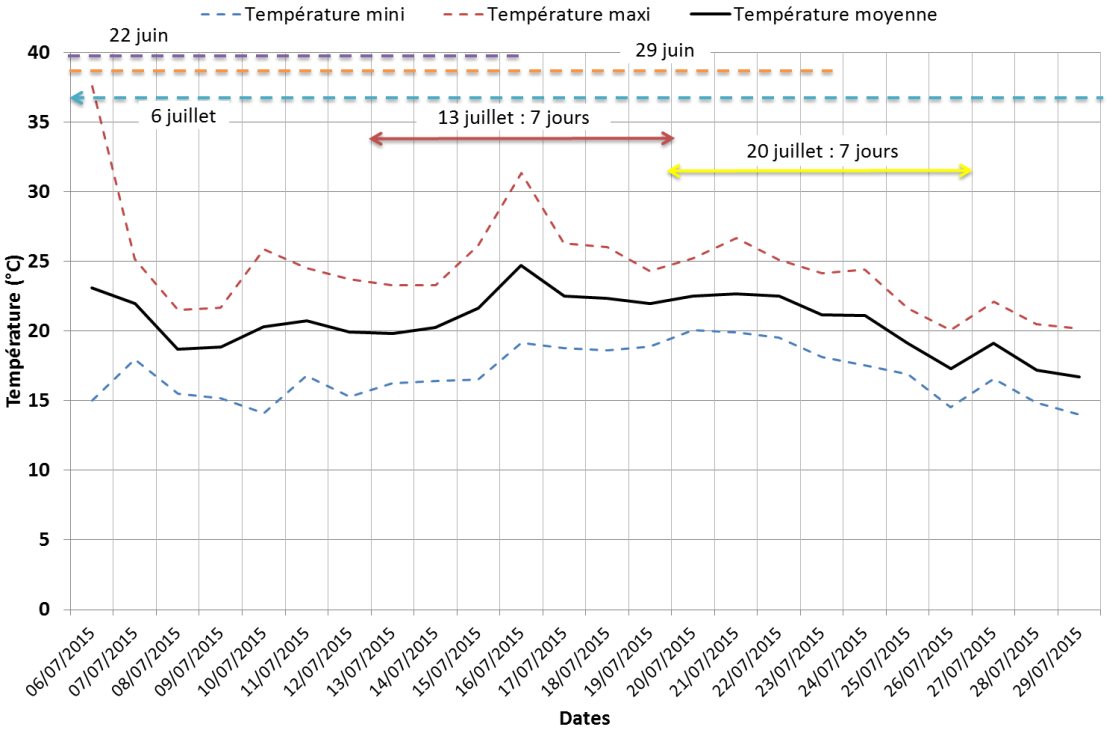
Annexe VII : Cinétique de croissance de *N. alba* en fonction de la date d'ensemencement (données issues de l'essai 5, ensemencement hebdomadaire)



Annexe VIII : Evolution de la température lors de l'essai 5, ensemencement hebdomadaire et schématisation des périodes de croissance mycélienne maximale pour chaque date d'ensemencement

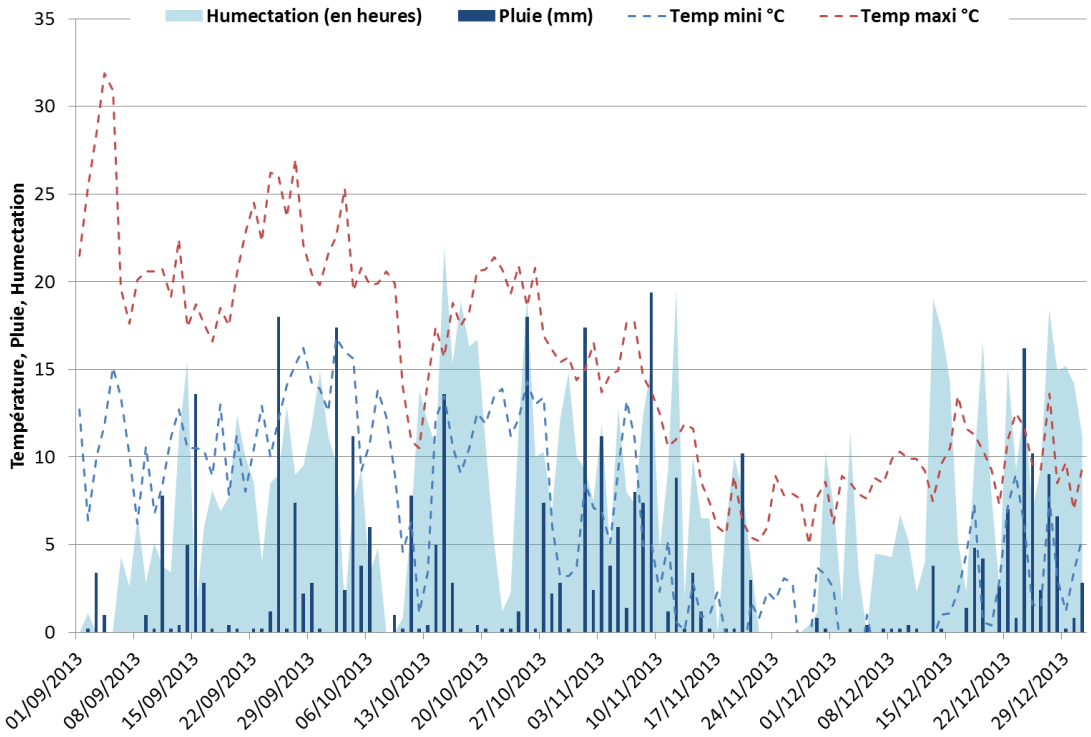


Période du 1er juin au 6 juillet 2015.

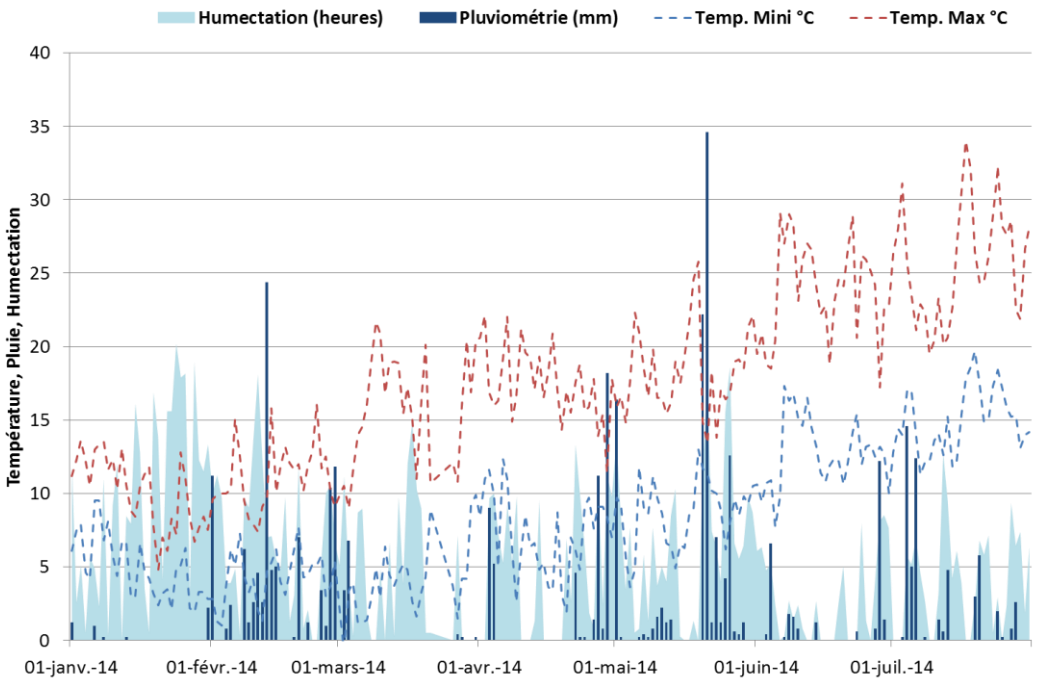


Période du 6 juillet au 29 juillet.

Annexe IX : Données climatiques de septembre 2013 à juillet 2014

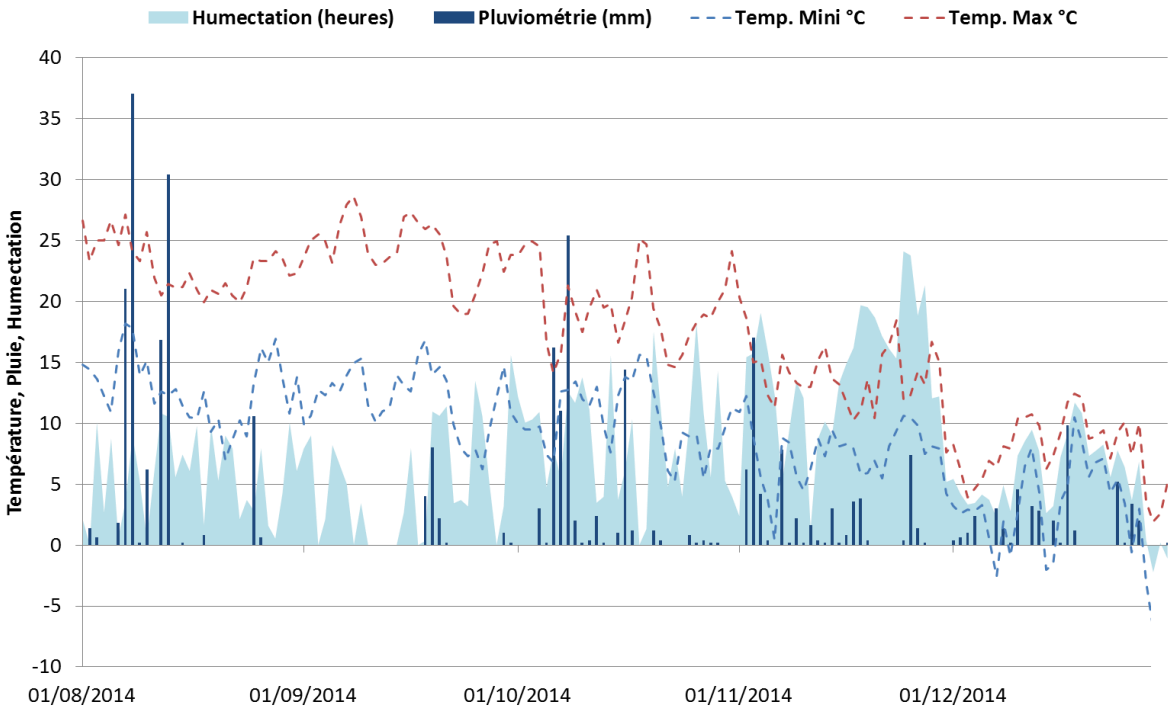


Données climatiques de septembre 2013 à décembre 2013

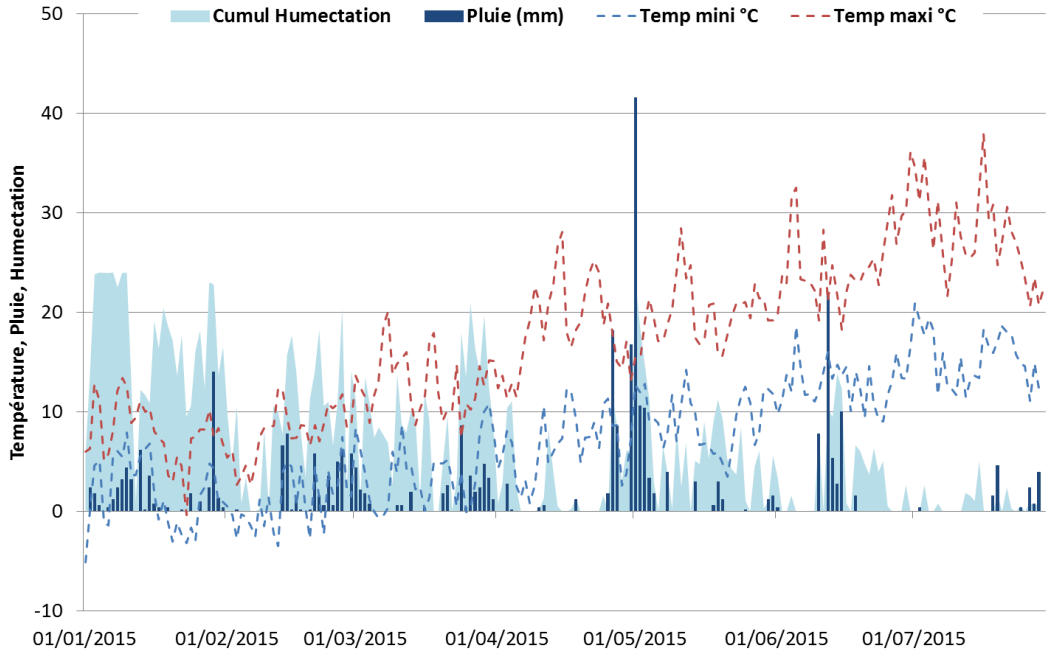


Données climatiques de janvier 2014 à juillet 2014

Annexe X : Données climatiques d'août 2014 à juillet 2015



Données climatiques d'août 2014 à décembre 2014.



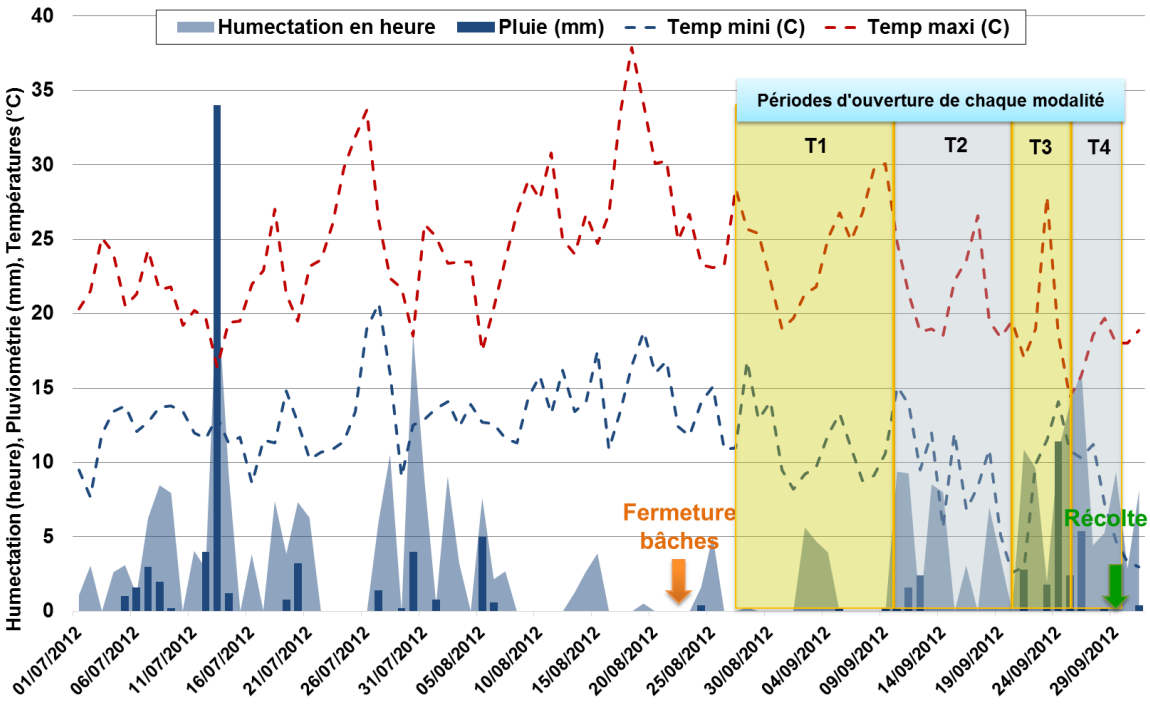
Données climatiques de janvier 2015 à juillet 2015.

Annexe XI : Résultats des analyses de qualité sur les pommes de la variété Corail® Pinova, cueillies en 2012, 2013 et 2014

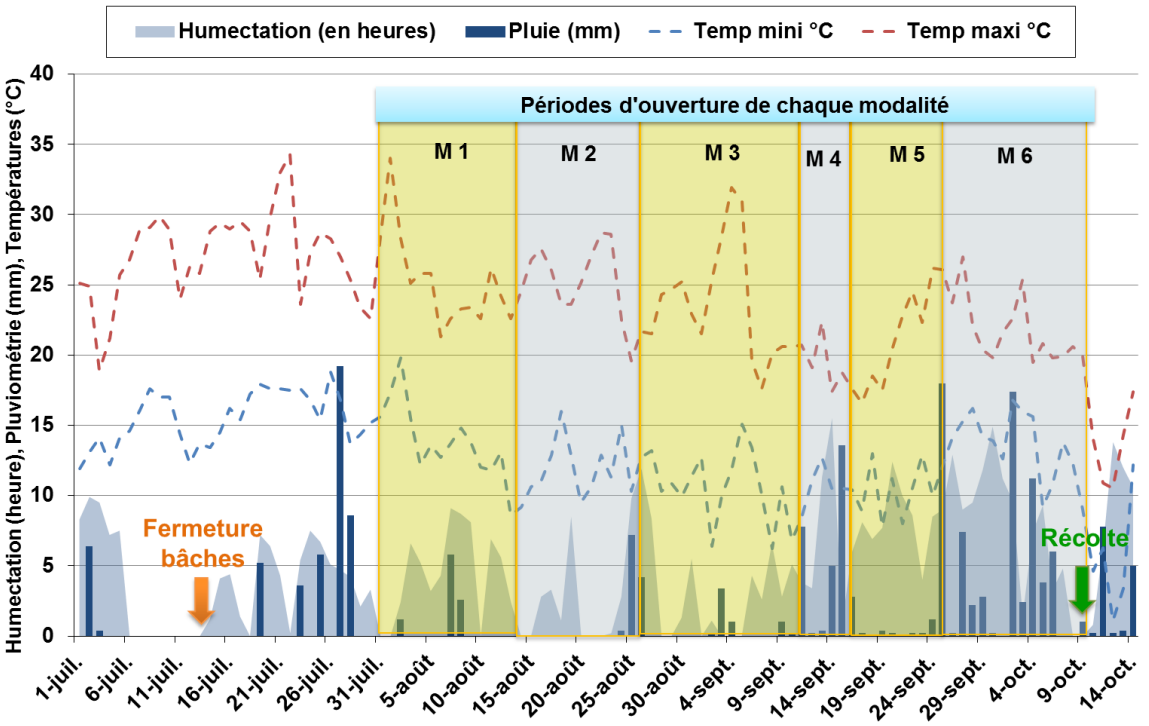
Analyses qualité	2012	2013	2014
Régression d'amidon (code Ctifl en 10 images)	5,8	9,2	6,4
Fermeté (en kg/cm² avec l'automate « Pimprenelle »*)	7,5	7,6	7,2
Taux d'acidité malique (en g/L avec l'automate « Pimprenelle »)	8,5	5,8	8,3
Indice réfractométrique (en % Brix avec l'automate « Pimprenelle »)	14,6	12	14,8

*Appareil d'agréage robotisé, qui analyse sur un échantillon d'une vingtaine de fruits, la fermeté, les taux de sucre et d'acidité malique des fruits.

Annexe XII : Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités de l'essai 1, bâches anti-pluie, en 2012 et 2013

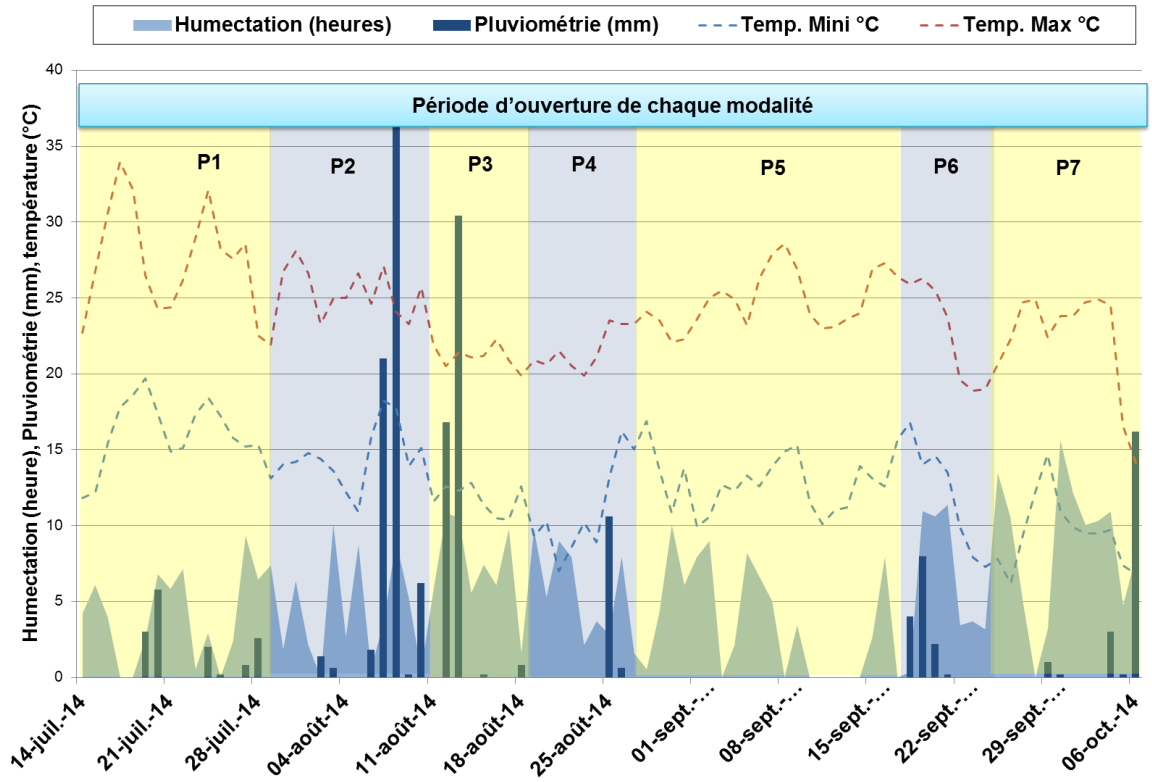


Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités en 2012.



Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités en 2013.

Annexe XIII : Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités de l'essai 1, bâches anti-pluie, en 2014



Données climatiques et périodes d'ouverture des modalités en 2014.

Annexe XIV : Variations de température observées dans les chambres froides et dans l'étuve

	Chambres froides			Etuve		
Consigne	0°C	3°C	10°C	20°C	25°C	35°C
Variation observée	± 0,4°C	± 0,6°C	± 1°C	± 4,1°C	± 2,6°C	± 3,2°C

Annexe XV : Action de la température et de l'éclairement sur le développement mycélien, la pycnidogénèse et la sporulation

Objectif: Déterminer les conditions d'éclairement et de température nécessaires au développement mycélien, à la pycnidogénèse et à la sporulation de *N. alba*.

Modalités étudiées : 2 facteurs sont étudiés = éclairement et température

- Modalités éclairement = obscurité 24h, lumière 24h, lumière/obscurité 12h/12h, lumière 6h/obscurité 18h et lumière 16h/obscurité 8h. La lumière utilisée sera blanche (identique au spectre naturel)

- Modalités température = -5, -1, 0, 3, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C.

Dispositif expérimental : Une seule souche de *Neofabraea alba*, issue d'une pomme, sera utilisée pour réaliser les isolements des différentes modalités. Il s'agira de mycélium mis en culture sur pda, et âgé d'une quinzaine de jours. Pour chaque modalité, 10 boites seront ensemencées.

Comptages et observations : La croissance mycélienne sera mesurée chaque jour pendant 4 semaines. Pour se faire, mesurer le rayon du mycélium du bord du mycélium implanté, jusqu'à la limite de croissance. Le nombre de jour avant apparition des pycnides sera noté. Le nombre de pycnides ainsi que le nombre de conidies sera évalué au bout des 4 semaines d'essai. La quantité de conidies sera appréciée de façon approximative de par la difficulté de les dénombrer. Pour cela utiliser l'échelle de notation suivante, adaptée de Bompeix (1974) :

- 0 = absence de pycnides
- 1 = faible nombres de pycnides (inférieur à 10)
- 2 = entre 10 et 100 pycnides
- 3 = supérieur à 100 pycnides.

Pour observer le nombre de conidies, chaque boite sera rincée avec 1 ml d'eau, et la surface des colonies sera raclée avec un scalpel. Après dilution si besoin, compter les conidies à la cellule de Malassez.

Les résultats seront exprimés en :

- Vitesse de croissance mycélienne (cm/jour)
- Rayon final de mycélium après 4 semaines (cm)
- Nombre de pycnides après 4 semaines
- Nombre de conidies après 4 semaines (/µl de solution)

Traitements des résultats : Les résultats seront traités avec le logiciel R, via une ANOVA à deux facteurs au seuil de 5%.

Annexe XVI : Effet de la maturité du fruit sur la capacité de *N. alba* à réaliser des contaminations

Objectif : Déterminer l'impact de la maturité du fruit sur la capacité de *N. alba* à réaliser des contaminations.

Modalités étudiées : Contamination tous les 15 jours de fruits, dès 2-3 mois avant récolte, jusqu'à la récolte. Une modalité = 1 période de contamination. Pour chaque modalité deux témoins seront réalisés : 1 témoin rincé à l'eau, et un témoin sans rien. Trois variétés pourront être testées : Gala, Tentation® et Pink Lady® par exemple.

Dispositif expérimental : Une seule souche de *Neofabraea alba* sera utilisée pour réaliser les contaminations des différentes modalités. Il s'agira de mycélium mis en culture sur pda, et ayant fructifié et sporulé. 4 répétitions seront réalisées par modalité. Pour chaque répétition, 50 fruits seront traités à l'aide d'une solution à une concentration de 10^6 conidies/ml. 1 ml de cette solution sera déposé sur chaque fruit à l'aide d'un pulvérisateur manuel. Pour 1200 fruits, prévoir 1,1 L de solution. Dès le début de l'expérimentation, et jusqu'à sa fin, les fruits seront ensachés afin d'éviter des contaminations naturelles non désirées. Le sachet de protection sera uniquement retiré lors de la pulvérisation.

Comptages et observations : Le pourcentage de fruits atteints de *N. alba* sera dénombré après 3 mois de conservation minimum. Trois comptages seront réalisés.

Traitements des résultats : Les résultats seront traités avec le logiciel R, via une ANOVA au seuil de 5%.

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Gestion Durable du Végétal en horticulture et aménagements paysagers Enseignant référent : M. Alexandre DEGRAVE

Auteur(s) : Justine PERRIN Date de naissance* : 19/05/1991	Organisme d'accueil : Station d'expérimentations La Morinière Adresse : La Morinière, 37800 Saint Epain
Nb pages : 51 Annexe(s) : 16	
Année de soutenance : 2015	Maître de stage : M^{me} Claude COUREAU

Titre français : Influence de paramètres climatiques et de la photopériode sur la biologie de *Neofabraea alba,* agent responsable de symptômes de gloeosporiose sur pommiers

Titre anglais : Impact of climatic factors and photoperiod on *Neofabraea alba* biology, causal agent of gloeosporiose on apple

Résumé (1600 caractères maximum) : La biologie de *Neofabraea alba* présente de nombreuses lacunes qui ne permettent pas une lutte raisonnée contre ce pathogène. C'est pourquoi une étude portant sur l'influence de paramètres climatiques et de la photopériode sur différentes phases du cycle de *N. alba* a été réalisée. La mise en place de bâches anti-pluie sur la frondaison des arbres a permis d'étudier la période d'infection de *N. alba* au verger. D'autre part, la sporulation de ce pathogène a pu être observée en réalisant des chancres artificiels sur des branches de pommiers. Enfin, différents essais *in vitro* ont été réalisés pour tester les besoins en température et en photopériode de *N. alba*.

D'après les résultats obtenus, la pluie est nécessaire pour permettre à *N. alba* de contaminer les pommes. Toutefois, le pourcentage de fruits atteints n'est pas directement lié avec la pluviométrie. Concernant la sporulation, deux périodes principales ont été identifiées : le printemps et l'hiver. La croissance du mycélium est optimale entre 10-25°C. A 35°C, le mycélium ne croît plus, alors qu'à 0°C la croissance est ralentie mais non stoppée. Le développement des pycnides semble s'effectuer à la lumière.

Ces résultats sont à approfondir par d'autres expérimentations, notamment pour définir les gammes de températures précises de chaque phase du cycle de développement. En outre, plusieurs points n'ont pas été approchés dans cette étude et seraient à étudier. Entre autre, la période de latence avant le développement de symptômes visibles sur le fruit.

Abstract (1600 caractères maximum): The biology of the fungus *Neofabraea alba* is not very well known and that is why the impact of climatic parameters and photoperiod on different stages of the life cycle of the fungus were studied. Trees were covered with a rain protection in order to study the period of infection of *N. alba* in the orchard. Artificial cankers on apple branches were also monitored to follow the sporulation of the fungus. Some in vitro trials were conducted as well to assess the temperature and photoperiod requirements of *N. alba*.

One of the main result is that the rain is necessary for *N. alba* to contaminate apples. However the rate of infected apples is not directly linked to the rainfall. Concerning the sporulation, two main periods have been spotted: spring and winter. Maximum mycelia growth is between 10-25°C and the mycelium development stops at 35°C. At 0°C, the growth is slowed down but still efficient. The pycnid development is light-dependant.

Further experiments need to be done to complete these results, especially to define a more precise temperature range for each stage of the fungal development. Besides, the latency period before the emergence of the symptoms has to be investigated.

Mots-clés : *Neofabraea alba*, température, précipitation, photopériode, mycélium, pycnides, conidies.

Key Words: *Neofabraea alba*, temperature, rainfall, photoperiod, mycelium, pycnidia, conidia.

* *Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires*