

# Obtention *in vitro* de périthèces de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. ; application à l'analyse de la résistance au bénomyl acquise au verger

Didier MARTIN, Jean-Marc OLIVIER & Yves LESPINASSE (\*)

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale,

(\*) Station d'Arboriculture fruitière, Beaucouzé, F 49000 Angers

## RÉSUMÉ

Tavelure,  
Venturia,  
Pommier,  
Malus,  
Résistance aux fongicides,  
Bénomyl,  
Génétique,  
Méthode de croisements,  
Epidémiologie.

L'étude du contrôle génétique de la résistance au bénomyl, associée à d'autres marqueurs (morphologie et pouvoir pathogène), sert de support à une mise au point méthodologique. La maturation de périthèces a été obtenue, au laboratoire, sur un milieu à base d'une « décoction » de feuilles de pommier et sur des disques de feuilles de pommier stérilisés (hypochlorite de calcium ou autoclavage), cette dernière technique donnant les meilleurs résultats.

L'analyse a porté sur 1 120 ascospores germées. L'observation d'une ségrégation 1 : 1 dans la descendance indique que le contrôle de la résistance au bénomyl à « haut niveau » est monogénique.

Les résultats sont discutés dans une optique épidémiologique ; associé aux autres marqueurs, le caractère de résistance au bénomyl permet une analyse des populations du champignon parasite et une étude du comportement de souches originales par leur virulence ou leur résistance à un fongicide.

## SUMMARY

Scab,  
Venturia,  
Apple-tree,  
Malus,  
Resistance to fungicides,  
Benomyl,  
Genetic,  
Method of mating,  
Epidemiology.

*In vitro production of apple scab perithecia applied to the study of benomyl resistance*

The natural resistance to benzimidazole fungicides, associated with other markers (morphology, pathogenicity) is used to improve a method for genetic study of *Venturia inaequalis*. Mature perithecia are produced *in vitro* on different media, as apple leaf decoction — agar medium. The best results are observed with autoclaved apple leaf discs. 1 120 ascospores giving a germinative tube were used to study the progenies of crosses between resistant and sensitive strains. The  $F_1$  segregation is 1 : 1 according to the hypothesis of a « single » gene control (observed frequency : 0,505). This result is only valuable with the « high level » resistance to benomyl (> 50 ppm tested *in vitro*). The different methods are discussed and the results are considered from an epidemiological outlook. The use of mixed markers allows some future researches on parasitic populations (competition, fitness) and the epidemiological effects of chemical or genetical control.

## I. INTRODUCTION

La tavelure du pommier, *Malus pumila* Mill., est une maladie pour laquelle la forme sexuée de l'agent pathogène, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., joue un rôle majeur. Les croisements entre thalles hermaphrodites sont à l'origine de recombinaisons ; il est donc intéressant pour le pathologiste de connaître le mode d'hérédité et le déterminisme génétique de caractères importants comme, par exemple, une virulence ou une résistance à un fongicide.

Une analyse génétique directe est difficilement réalisable au verger ; les conditions d'inoculation de la maladie sont délicates à contrôler, la recherche et l'analyse des périthèces sont très aléatoires. C'est cependant ainsi que KEITT & PALMITER (1938) ont réalisé les premières observations de périthèces et les premières analyses de descendance. L'amélioration des procédés a permis l'obtention de

périthèces et d'ascospores *in vitro* sur des milieux gélosés (KEITT & LANGFORD, 1941 ; ROSS & HAMLIN, 1965). Les méthodes préconisées restent cependant délicates à mettre en œuvre et il s'est avéré nécessaire de rechercher la technique la plus satisfaisante pour l'obtention *in vitro* d'effectifs compatibles avec une analyse de descendance. Le caractère dont l'hérédité sert de support à cette étude est la résistance aux benzimidazoles et plus particulièrement au bénomyl.

L'observation en vergers d'une résistance au bénomyl (OLIVIER, 1979) permet de disposer d'isolats naturellement marqués et d'étudier la transmission de ce caractère important tant sur le plan du développement des épidémies que sur celui du succès de la lutte chimique.

En ce qui concerne la résistance des champignons aux benzimidazoles, VAN TUYL (1977) montre qu'il existe au moins 2 systèmes chez *Aspergillus nidulans* Wint. : un gène principal contrôle un haut niveau de résistance alors qu'une

tolérance à un plus faible niveau de produit est conférée par 2 autres gènes.

Une analyse de la situation dans les vergers français montre qu'il existe également chez *V. inaequalis* 2 niveaux possibles de résistance stable (OLIVIER, 1980). JONES & EHRET (1976) avec *V. inaequalis* et SHABI & KATAN (1979) avec *V. pirina* Aderh. observent une ségrégation 1 : 1 après croisement de souches résistantes × sensibles ; ces résultats indiquent un contrôle de type monogénique pour la résistance à haut niveau.

Dans notre travail, au-delà de la mise au point d'une méthodologie satisfaisante pour l'obtention d'ascospores *in vitro*, nous cherchons à préciser l'hérédité des différents types de réponse de *V. inaequalis* aux benzimidazoles et à utiliser comme outil épidémiologique le marquage naturel que représente la résistance au bénomyl. Les méthodes employées sont développées ci-après et illustrées par les résultats d'une analyse détaillée de la résistance à haut niveau, la plus couramment rencontrée dans les vergers français.

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### A. Milieux et supports utilisés

Plusieurs milieux ont été testés pour l'obtention de périthèces *in vitro*.

#### 1) Milieu gélosé + décoction de feuilles (méthode de KEITT & LANGFORD, 1941)

Une décoction est préparée à partir de 25 g de poudre de feuilles sèches de pommier dans 500 ml d'eau distillée (ébullition légère pendant 1 h). Le milieu gélosé est obtenu après cuisson pendant 2 h de 15 g de cristomalt et 10 g de gélose dans 500 ml d'eau distillée. La décoction, filtrée, est mélangée au milieu gélosé (compléter à 1 l final pH = 7,6) avant autoclavage (120 °C, 20 mn).

#### 2) Milieu terre gélosée

Trente grammes de terre sont agités, pendant 30 mn, dans 100 ml d'eau distillée. Après 15 mn de sédimentation, le surnageant est filtré 2 fois (coton hydrophile puis papier filtre). Le volume est ramené à 100 ml final puis stérilisé sur filtres « Millipores » (1 fois sur préfiltre puis 2 fois sur filtres 0,45 µm).

La terre sédimentée est chauffée dans 900 ml d'eau distillée avec 15 g de gélose, pendant 1 h, dans un bain-marie à 80 °C (pH = 7,6) puis autoclavée (120 °C, 20 mn). Lors de l'utilisation, on mélange le filtrat stérile et la terre gélosée maintenue en surfusion à 55 °C.

#### 3) Milieu synthétique gélosé de ROSS & HAMLIN (1965), sans modification

#### 4) Disques de feuilles stériles (méthode de ROSS & HAMLIN, 1962, modifiée)

Des disques sont réalisés à l'aide d'un emporte-pièce dans des feuilles vertes de pommier (variété « Golden Delicious »), exemptes de tavelure (diamètre = 25 mm). Ils sont stérilisés selon 2 procédés :

- autoclavage (120 °C, 20 mn),
- trempage pendant 15 mn dans une solution d'hypochlorite de calcium à 12 p. 100, puis 2 rinçages à l'eau stérilisée.

Les disques stérilisés par l'hypochlorite de calcium doivent être utilisés rapidement, tandis que ceux autoclavés se conservent bien. Avant leur emploi, ils doivent être rehumidifiés, par trempage dans l'eau stérile (2 h). Les disques sont déposés à raison de 4 par boîte de Petri sur de l'eau gélosée (2 p. 100).

Dans tous les milieux utilisés, une solution d'antibiotiques a été incorporée : auréomycine 100 mg, streptomycine 500 mg, pénicilline 250 mg, H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml (OLIVIER & GUILLAUMES, 1976).

### B. Souches du parasite

Les souches de *Venturia* utilisées sont décrites ci-après.

#### 1) Souches sensibles au bénomyl

14 : race 1, colonie brune à croissance radiale.

101 : race 1, colonie brune à croissance radiale, possède un marqueur de pouvoir pathogène « p » (= souche E<sub>1</sub>, origine East Malling - G.B.).

Strk : race 1, colonie brune à croissance dense.

53 : race 3, colonie brune à croissance dense.

54 : race 2, colonie brune à croissance dense.

53 et 54 sont les 2 souches américaines compatibles (Purdue Univ., 1963).

#### 2) Souches résistantes au bénomyl

104 : race 1, colonie brune à croissance dense.

mBl : race 1, colonie blanche à croissance dense.

La souche « mBl » a été obtenue après exposition d'une suspension conidienne du clone 104 aux rayons ultra-violet (8 000 ergs/mm<sup>2</sup>).

### C. Méthode de croisements

L'ensemencement est réalisé à partir de mélanges des 2 souches (1 : 1 vol) sous forme de conidies et de fragments mycéliens en suspension dense dans l'eau stérile.

Pour les milieux gélosés, quelques gouttes de suspension sont étalées sur toute la surface de la boîte.

Trois gouttes (0,15 ml) de la suspension sont déposées au centre des disques de feuilles.

Les milieux, une fois ensemencés, sont incubés à l'obscurité pendant 10-12 j à 20 °C. Dès que le développement mycélien est important, les boîtes sont placées à l'obscurité à 8 °C. Les périthèces atteignent leur maturité après 8-9 mois.

Les croisements réalisés sont les suivants :

— Les 2 souches américaines (53-54) théoriquement compatibles ont été croisées :

— entre elles,

— avec la souche résistante au bénomyl (104),

— avec la souche blanche résistante au bénomyl (mBl).

— Chacune des 3 souches sensibles au bénomyl (14, 101, Strk) a été croisée :

— avec chacune des 2 souches américaines,

— avec la souche résistante au bénomyl (104),

— entre elles.

— La souche blanche résistante au bénomyl a été croisée :

— avec sa souche mère, résistante au bénomyl (104),

— avec les 2 souches sensibles au bénomyl (101, Strk).

Par ailleurs, des ensemencements avec une seule souche

TABLEAU 1

*Etude des descendance des croisements entre souches sensibles (S) et résistantes (R) au bénomyl*  
*Study of F<sub>1</sub> progenies from crosses between strains sensitive (S) or resistant (R) to benomyl*

N° analyse (Analysis)	Croisements (Crosses)	Témoin (Bénomyl 0 ppm) (Control)			Bénomyl 5 ppm (5 ppm benomyl)			Bénomyl 50 ppm (50 ppm benomyl)		
		Germination p. 100	Effectifs (sample)	Résistant p. 100	Germination p. 100	Effectifs (sample)	Résistant p. 100	Germination p. 100	Effectifs (sample)	
1	mBl × 101 (R × S)	46,6	305	48,7	42,0	152	45,2	42,0	100	
2	mBl × 101 (R × S)	18,5	27	50,0	25,0	20	58,3	21,3	89	
3	104 × 101 (R × S)	50,0	76	50,6	46,3	166	51,3	41,8	182	
4 (*)	104 × 101 (R × S)	47,9	121	58,8	30,4	56	48,5	40,7	81	
5 (*)	104 × 101 (R × S)	36,4	187	40,0	20,0	20	44,4	36,1	36	
6 (*)	104 × 101 (R × S)	55,0	120	61,5	—	13	50,0	—	14	
7	104 × 101 (R × S)	20,0	60	53,3	15,0	100	41,2	17,0	100	
8 (*)	104 × Strk (R × S)	91,4	35	50,0	94,7	38	40,0	81,4	43	
9 (*)	104 × Strk (R × S)	100	30	46,4	90,3	31	11,1	75,0	12	
10	104 × Strk (R × S)	6,7	150	75,0	3,1	131	60,0	3,0	168	

(\*) Analyse portant sur un seul périthèce  
 (Study on just one perithecium)

sont réalisés pour 104, mBl, 101 et les 2 souches américaines.

#### D. Méthode d'analyse

L'analyse du caractère de résistance au bénomyl est effectuée sur des milieux malt gélosé (1,5 p. 100) contenant 0, 5 ou 50 ppm de bénomyl (matière active). Les ascospores sensibles au bénomyl donnent naissance à des filaments germinatifs déformés, voire même éclatés. 1 120 ascospores ayant germé (sur 2 500 ascospores observées) ont été examinées pour ce caractère. Parallèlement, le pourcentage de germination est mesuré pour chaque descendance sur tous les milieux avec ou sans bénomyl.

### III. RÉSULTATS

#### A. Compatibilité des souches

Des périthèces sont obtenus jusqu'à leur maturité à partir des croisements suivants :

*Résistant × Sensible* 104 × 101, 104 × Strk, mBl × 101, mBl × Strk).

*Sensible × Sensible* (101 × 14).

Ceci permet de faire un classement provisoire des souches testées ; (R = résistant au bénomyl, S = sensible au bénomyl) :

— 104 (R), mBl (R) et 14 (S) appartiennent à un groupe de compatibilité désigné arbitrairement (+).

— 101 (S) et Strk (S) appartiennent au groupe opposé désigné (-).

A noter l'absence de périthèces à partir du croisement 53 (S) × 54 (S), souches de collection théoriquement compatibles.

#### B. Analyse génétique de la résistance au bénomyl

Les résultats sont résumés dans les tableaux 1 et 2.

Pour un même croisement, le pourcentage de germination varie notablement d'un périthèce à l'autre (100 p. 100 pour un périthèce de 104 × Strk, 5,3 p. 100 pour un autre du même croisement). La moyenne générale pour tous les croisements est de 41,5 p. 100.

Aucune différence significative dans les pourcentages de germination et dans les pourcentages de descendants résistants n'est observée entre les 2 doses de bénomyl.

*La résistance au bénomyl à « haut niveau » se transmet selon une ségrégation 1 : 1 dans la descendance (fréquence observée d'ascospores résistantes au bénomyl 0,505 ± 0,040, P = 0,05).*

#### C. Etude des structures de reproduction sexuée

L'étude des structures de reproduction sexuée et de leur évolution dans le temps conduit aux résultats complémentaires suivants :

— Le milieu terre ne permet qu'une très faible croissance mycélienne à 20 °C. La sporulation (à 20° et 8 °C) est absente ; aucune ébauche d'organes sexués n'est observée.

— Le milieu synthétique permet une croissance mycélienne et une sporulation faible (à 8 °C). Quelques ébauches se forment après 8 à 10 j à 8 °C. Mais par la suite celles-ci n'évoluent plus.

— Le milieu « décoction » favorise une croissance mycé-

TABLEAU 2

Fréquence des spores « résistantes » dans l'analyse des croisements Résistant × Sensible ( $P : 0,05$ )  
(Frequency of resistant spores in the progenies of Resistant × Sensitive crosses ( $P : 0.05$ ))

Type de croisements (Crosses)	Concentration en bénomyl (benomyl doses)		Analyse globale (5 + 50 ppm) (total analysis)
	5 ppm	50 ppm	
mBl × 101	0,556 ± 0,087	0,513 ± 0,113	0,540 ± 0,069
104 × 101	0,523 ± 0,087	0,487 ± 0,080	0,503 ± 0,059
104 × Strk	0,500 ± 0,121	0,367 ± 0,143	0,444 ± 0,093
Analyse globale (tous croisements R × S) (all crosses together)	0,532 ± 0,055	0,474 ± 0,059	0,505 ± 0,040

Etude réalisée sur un total de 1 120 ascospores ayant germé  
(Study carried out on 1 120 germinating ascospores)

lienne importante ainsi qu'une très forte sporulation (à 8 °C). Les premières ébauches (structures muriformes) apparaissent après 10 j au froid. Ces structures conduisent à des périthèces mûrs après 8-9 mois à 8 °C. Le nombre d'asques par périthèce est relativement faible (inférieur ou égal à 10).

— Les disques de feuilles stérilisés sont les meilleurs supports pour l'obtention de périthèces et d'ascospores. La croissance mycélienne est importante et la sporulation moyenne. Toutes les analyses de sporées (tabl. 1) sont effectuées à partir de ces disques. La stérilisation par l'hypochlorite de calcium permet le développement de quelques saprophytes, habituellement présents sur les feuilles (*Alternaria*, *Pleospora*, *Penicillium*) alors que l'autoclavage des disques est la méthode la plus favorable et, de surcroît, la plus simple.

— L'utilisation du mutant de couleur (mBl) permet de vérifier également que :

- certaines souches interviennent uniquement comme porteuses d'anthéridies (par exemple, tous les périthèces sont blancs, à partir du croisement mBl × Strk) ;
- d'autres souches interviennent comme porteuses d'anthéridies et d'ascogones (mélange de périthèces blancs ou bruns à partir du croisement mBl × 101).

Les descendants de ce dernier croisement donnent naissance à des colonies qui peuvent être soit blanches soit brunes et soit résistantes au bénomyl soit sensibles. Bien que l'étude quantitative ne soit pas interprétable précisément, faute d'effectifs suffisants, cette observation laisse supposer l'indépendance des 2 caractères, pigmentation et résistance au bénomyl.

- Enfin, comme dans les travaux de SHAY & KEITT (1945), la présence de la souche blanche comme parent entraîne la formation d'asques ne contenant que 4 ascospores bien formées, les 4 autres étant avortées ; le caractère « blanc » serait associé à un facteur perturbant la différenciation des ascospores, dans certains croisements.

#### IV. DISCUSSION

Les disques de feuilles, stérilisés par autoclavage, constituent le meilleur support pour l'obtention de périthèces et

d'ascospores en vue d'une analyse génétique. Mais ce matériel se prête mal à l'étude des stades morphologiques précédant la formation des asques ; il faut alors recourir à des coupes fines. L'utilisation de croisements en milieu gélosé permet, par contre, une observation directe. Le milieu « décoction » semble alors le plus adapté à ce genre d'investigations, malgré le faible rendement en asques et ascospores viables et le fait qu'il soit relativement favorable au développement de contaminants (*Aspergillus*, *Penicillium*). Selon l'étude envisagée, ontogénie ou étude génétique, les milieux à utiliser seront donc différents.

Le milieu terre gélosée n'a pas permis le développement de structures de reproduction sexuée ; l'absence d'enrichissement nutritif (par exemple, malt) pourrait expliquer la faible croissance mycélienne initiale, l'absence de sporulation conidienne et la non-formation de périthèces.

Le milieu synthétique de ROSS & HAMLIN (1965) a l'avantage d'être transparent et indépendant du génotype des feuilles choisies. Des difficultés sont cependant apparues lors de sa réalisation. On note d'ailleurs que COOK (1970), dans son étude sur l'hivernation du *Venturia*, a utilisé ce milieu avec d'autres concentrations en produits. Une mise au point sur les différentes formulations de ce milieu est nécessaire.

La production d'ascospores au laboratoire avec des souches bien typées n'est donc pas aussi aisée que ne le laisserait supposer la simplicité apparente des méthodes décrites depuis plus de 30 ans. La technique d'analyse des descendances en fonction de l'ordre des ascospores dans l'asque est certes très élégante (KEITT & PALMITER, 1938), mais les résultats recueillis n'intéressent qu'un très petit nombre d'asques ; l'étude en masse réalisée sur plus de 2 500 ascospores montre une forte hétérogénéité dans les pourcentages de germination. Le nombre d'asques à étudier, pour arriver à un résultat interprétable, est très élevé et incompatible avec la méthode d'analyse ordonnée. Celle-ci trouverait cependant une utilité dans des études où plusieurs marqueurs sont présents (interprétation des pré- et post-réductions) et dans la mesure où pourrait être défini un stade optimum de maturité des ascospores, limitant ainsi l'hétérogénéité de germination.

KEITT & PALMITER (1938) ont émis l'idée que l'état hétérothallique de *V. inaequalis* était complété par l'existence d'isolats, certes auto-incompatibles, mais herma-

phrodites c'est-à-dire générateurs des 2 organes ascogones et anthéridies. Les résultats, rapportés par ces auteurs, sur les rôles relatifs des ascogones et anthéridies et sur la présence simultanée (obligatoire ou non) des 2 organes sur le même thalle ne paraissent pas suffisants pour confirmer l'hypothèse de l'hermaphrodisme vrai.

Par ailleurs, il est vraisemblable que le vieillissement des souches influe sur leur capacité à produire des ascogones. Les difficultés observées dans les croisements utilisant des souches de collection, reconnues antérieurement comme compatibles, par exemple la race 3 (souche 53) et la race 2 (souche 54) conservées à Angers depuis 1963, pourraient alors s'expliquer. Il faut cependant souligner le cas des clones Strk, 104 (et donc mBl issu de 104) isolés simultanément. La souche Strk, bien que récente, s'est toujours comportée, dans les conditions d'essais, uniquement en porteuse d'anthéridies. Cet aspect de l'hermaphrodisme doit donc être précisé. L'absence « physiologique » de capacité « femelle » (génératrice d'ascogones) réduit alors les possibilités réelles de croisements, en s'ajoutant au système génétique d'incompatibilité. On peut alors s'interroger sur la valeur épidémiologique, au sein des populations de telles souches uniquement « mâles ». Les aptitudes à la reproduction sexuée devraient être mieux prises en compte dans l'évaluation de la capacité à transmettre la maladie (« fitness » de ZADOKS & SCHEIN, 1979) pour un parasite, comme *Venturia*, ayant une phase saprophytique importante.

Les résultats portant sur la nature génétique de la résistance au bénomyl montrent que ce caractère s'hérite

comme s'il était contrôlé par un gène unique. Aucune différence n'est observée entre les 2 doses de bénomyl utilisées (5 et 50 ppm), ni sur les pourcentages de germination, ni sur les pourcentages de déformation des filaments germinatifs. Par contre, l'utilisation de 2 doses de bénomyl devrait se révéler discriminante dans l'étude du déterminisme génétique de la résistance à « faible niveau » (étude en cours).

Un autre objectif de ce travail concerne le devenir de pathotypes originaux, apparaissant en conditions naturelles au sein des populations du parasite. Il est important de pouvoir démontrer et mesurer les effets d'une éventuelle sélection stabilisatrice s'exerçant sur ce pathotype confronté à des populations de type sauvage (VAN DER PLANK, 1968). Le recours à des marqueurs multiples est un moyen d'aborder ce sujet et la possibilité des croisements entre souches doit permettre d'obtenir des pathotypes portant ces marqueurs multiples. La souche 101, utilisée dans le travail ci-dessus, est un pathotype particulier par sa réaction de résistance type « p » sur son hôte différentiel (LESPINASSE *et al.*, 1979). A partir des descendances des croisements entre cette souche et des clones résistants au fongicide, il est possible d'étudier l'hérédité du caractère de virulence de la souche 101, puis d'analyser le devenir de cette virulence dans une parcelle expérimentale soumise à la pression d'un inoculum de type sauvage.

Reçu le 29 décembre 1980.

Accepté le 11 juin 1981.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cook R. T. A., 1970. *Studies on the overwintering of Venturia inaequalis (Cke.) Wint.* Thèse. Londres, 205 pp.
- Jones A. L., Ehret G. R., 1976. Tolerance to fungicides in *Venturia* and *Monilinia* of tree fruits. *Symp. Resist. Chem. Proc., Am. phytopathol. Soc.*, 3, 84-90.
- Keitt G. W., Palmiter D. M., 1938. Heterothallism and variability in *Venturia inaequalis*. *Amer. J. Bot.*, 25, 338-345.
- Keitt G. W., Langford M. H., 1941. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. I. A groundwork for genetic studies. *Am. J. Bot.*, 28, 805-819.
- Lespinasse Y., Olivier J. M., Godicheau M., 1979. Etudes entreprises dans le cadre de la résistance à la tavelure du pommier. *Proc. Angers, Eucarpia Symp.*, 97-100.
- Olivier J. M., Guillaumes J., 1976. Etude écologique des composts de champignonnières. *Ann. Phytopathol.*, 8 (3), 283-301.
- Olivier J. M., 1979. Observations sur les souches de tavelures du pommier et du poirier résistantes aux benzimidazoles. *Ann. Phytopathol.*, 11 (1), 135.
- Olivier J. M., 1980. La tavelure du pommier. *Def. Veg.*, 202, 89-100.
- Ross R. G., Hamlin S. A., 1962. Production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. on sterile apple leaf discs. *Can. J. Bot.*, 40 (5), 629-635.
- Ross R. G., Hamlin S. A., 1965. Influence of nutrients on perithecial production of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Can. J. Bot.*, 43, 959-965.
- Shabi E., Katan T., 1979. Genetics, pathogenicity and stability of carbendazim-resistant isolates of *Venturia pirina*. *Phytopathology*, 69, 267-269.
- Shay J. R., Keitt G. W., 1945. The inheritance of certain mutant characters in *Venturia inaequalis*. III. *J. Agric. Res.*, 70, 33-41.
- Van der Plank J. E., 1968. *Disease resistance in plants*. Academic Press Inc., 206 p.
- Van Tuyl J. M., 1977. *Genetics of fungal resistance to systemic fungicides*. Thèse Wageningen, 136 p.
- Zadoks J. C., Schein R. D., 1979. *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press. New York, 427 p.