

des efforts à poursuivre…

Besoins de recherches







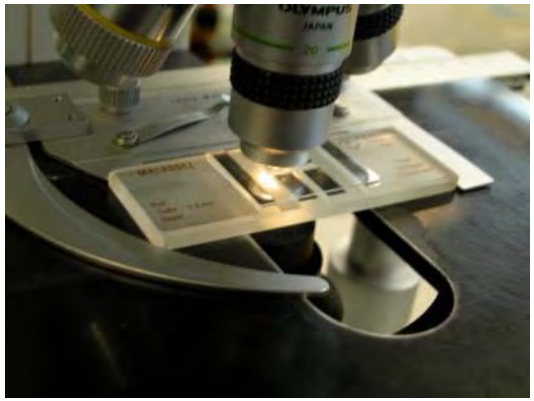

Détection de la carie sur semences

Isabelle Sérandat

Détection et dénombrement de la carie sur semences

- L'analyse est effectuée sur 50 grammes (~1000 semences)
- 10 prélèvements sont effectués après ajout de 50 mL d'eau et agitation





- Chaque prélèvement est placé sur un hématimètre (cellule de Mallassez) ce qui permet en plus de l'identification, la détermination de la concentration en spores/mL

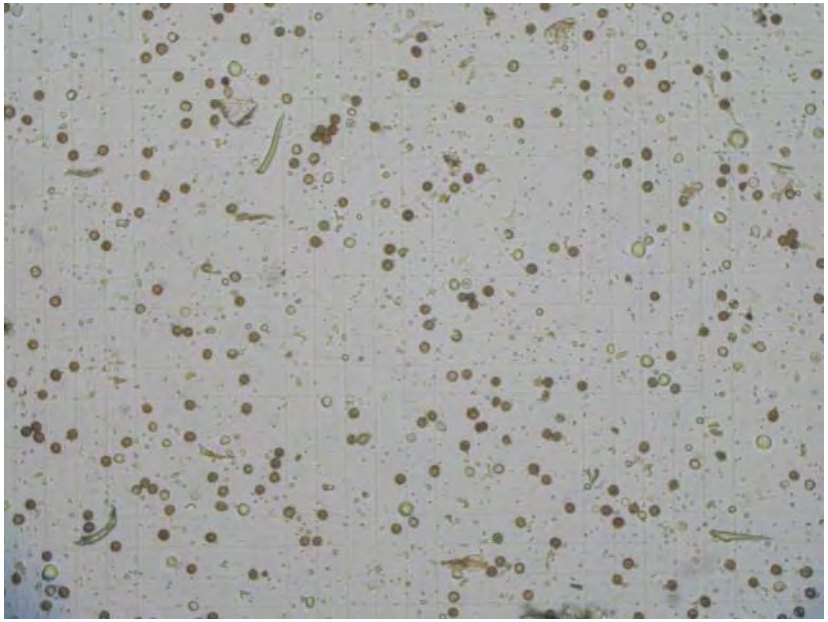


Détection et dénombrement de la carie sur semences

- Exemples d'observation sur cellule de Malassez



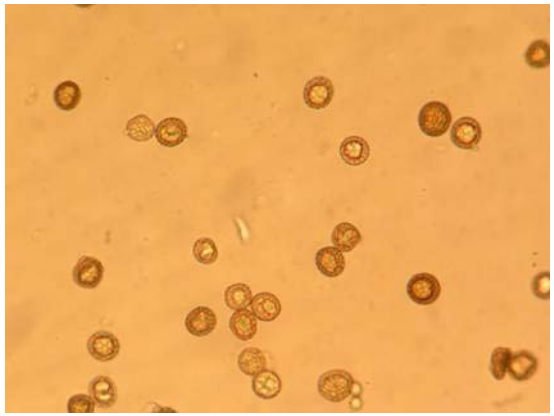
Concentration moyenne de spores



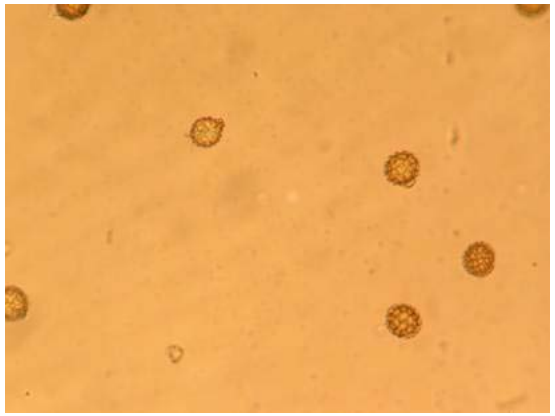
Concentration importante de spores et présence de saprophytes

Détection et dénombrement de la carie sur semences

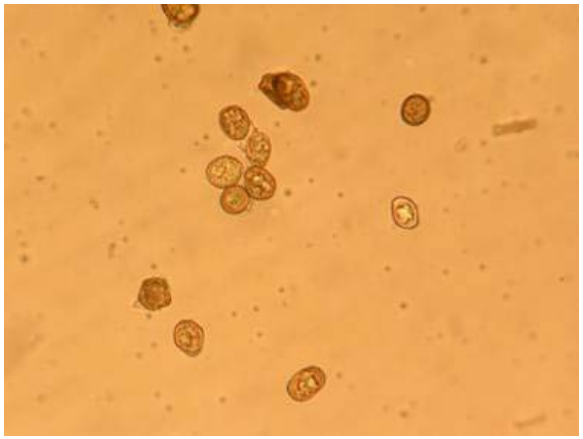
Identification des différentes espèces de caries



- *Tilletia caries*



- *Tilletia controversa*



- *Tilletia foetida*

Détection et dénombrement de la carie sur semences

- Si aucune spore n'est détectée après les 10 prélèvements une observation de 300 µL supplémentaires est effectuée.









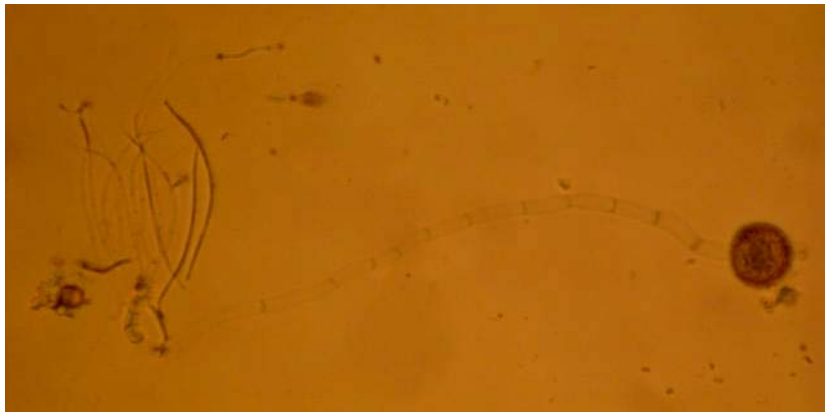
- Si la concentration est trop faible
une centrifugation est effectuée.
- Le résultat sera donné, après conversion, en nombre de spores par gramme de semences, pour chaque espèce de carie

Détermination de la viabilité de la carie sur semences
Test de germination des spores

- Etalement de 100 µL de l'eau de lavage sur milieu Water agar
- Incubation de 10 à 15 jours
- Observation microscopique du filament germinatif







Détermination de la viabilité de la carie sur semences
Test de germination des spores

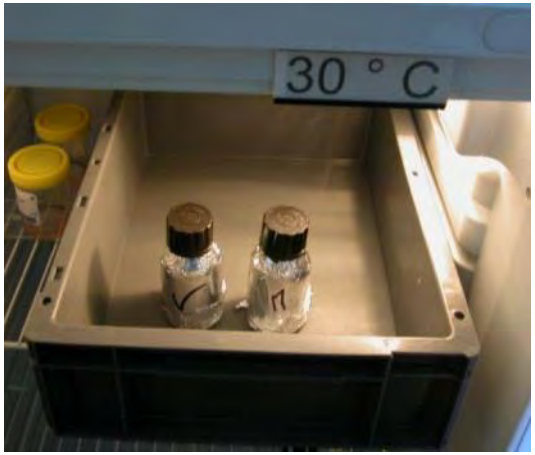
- Méthode de référence pour validation des méthodes par coloration
- Avantages
  - La méthode peut être appliquée à partir du macérât de l'analyse de détection
- Inconvénients
  - Etape supplémentaire d'étalement sur boîtes après le dénombrement
  - Incubation longue
  - Problème de lecture si présence de saprophytes

Détermination de la viabilité de la carie sur semences
Test de coloration au Tétrazolium

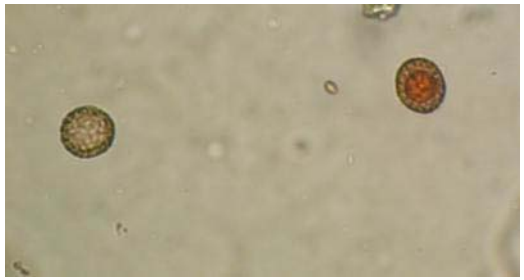
- Les semences sont mises en agitation dans une solution au Tétrazolium puis incubées à 30°C pdt 24h







- Observation microscopique des spores colorées





Détermination de la viabilité de la carie sur semences
Test de coloration

- Premiers résultats
  - Bonne corrélation avec la méthode de germination des spores
- Avantages
  - La méthode peut être réalisée en même temps que la détection et le dénombrement
- Inconvénients
  - Produit sensible à la T° et à la lumière

Détermination de la viabilité de la carie sur semences

- Travaux en cours
  - Amélioration du protocole de coloration vitale
  - Les méthodes de détermination de la viabilité ont été testées uniquement sur *Tilletia caries* et doivent être mises au point sur les autres espèces de carie.

Appui financier

Partenaires

Collaborations

Programme de lutte contre la carie commune du blé

2008-2011

PCR approche qualitative

redec · idi-yrénées

Détecter précocement les caries dans la plante

- Pourquoi ces essais?
  - Connaître de manière précoce la présence de la carie dans le plant de blé
  - Etablir un ordre de récolte des parcelles
    - des parcelles indemnes aux parcelles les plus touchées
  - Manipuler avec précaution les grains provenant de parcelles contaminées
  - Isoler dans les silos les lots touchés

- Comment ces essais ont-ils été réalisés?

Essais 2011

Echantillons
Différents stades et provenances



2 feuilles



Maturité

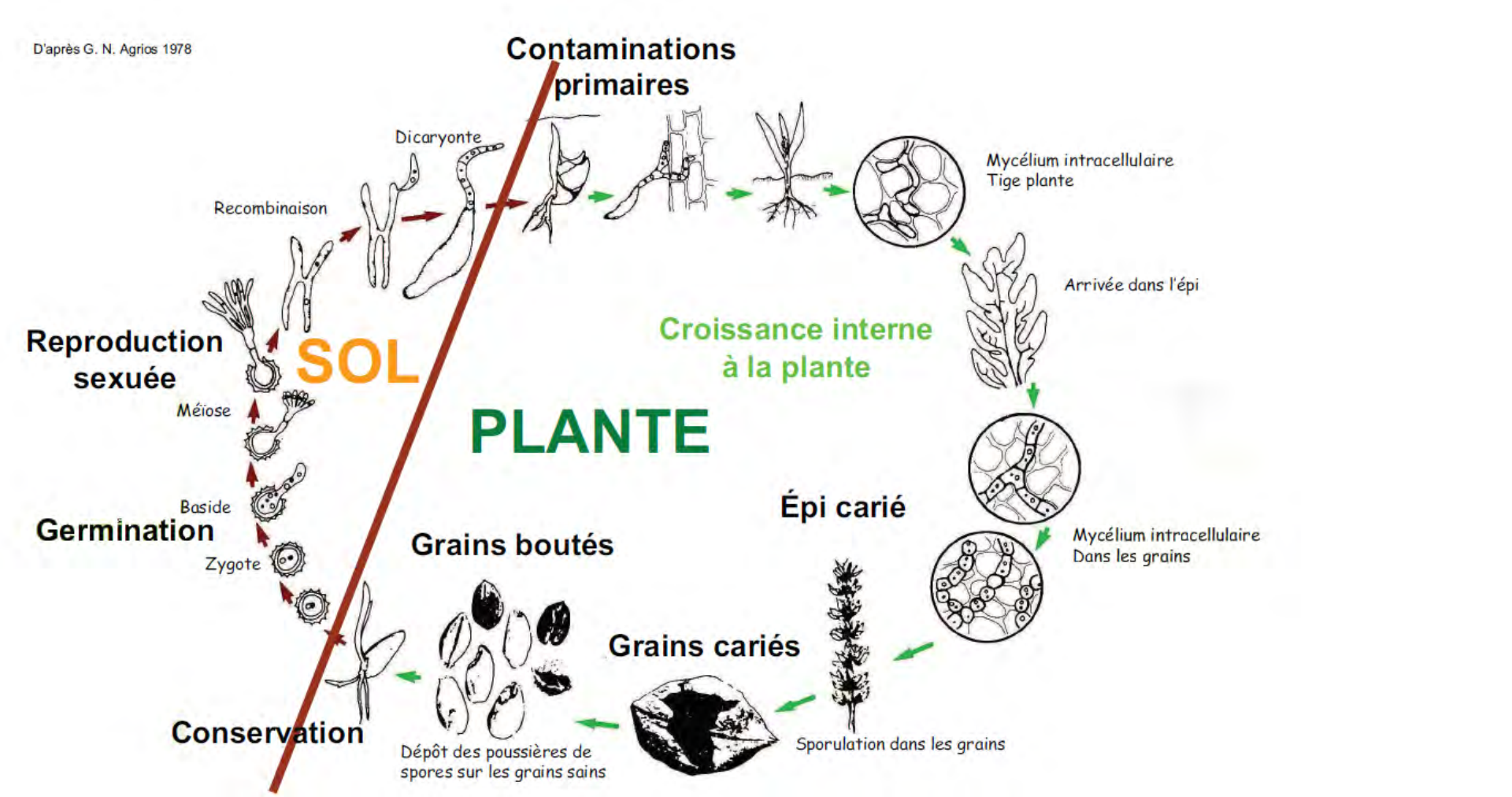
Tests PCR



Comparaison des résultats
PCR / terrain
> **Résultats qualitatifs**

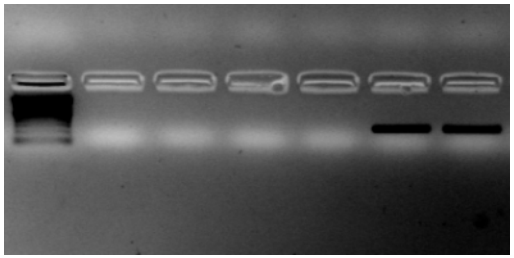
Terrain	PCR
Détecté	Non-détecté
Non-détecté	Détecté
Détecté	Détecté
Non-détecté	Non-détecté

Validité de l'essai


D'après G. N. Agrios 1978
Contaminations primaires
Dicaryonte
Recombinaison
Mycélium intracellulaire
Tige plante
Arrivée dans l'épi
Reproduction sexuée
SOL
Croissance interne à la plante
PLANTE
Méiose
Baside
Germination
Zygote
Épi carié
Mycélium intracellulaire
Dans les grains
Grains boutés
Grains cariés
Conservation
Dépôt des poussières de spores sur les grains sains
Sporulation dans les grains


Semis
Levée
3 feuilles
Tallage
Epi 1cm
1-2 Noeuds
Epiaison
Gonflement
Remplissage
Maturité

Détecter précocement les caries dans la plante



Comparaison des résultats

PCR / terrain

> **Résultats qualitatifs**



Détection de la carie

> Essais concluants

Détection précoce de la carie

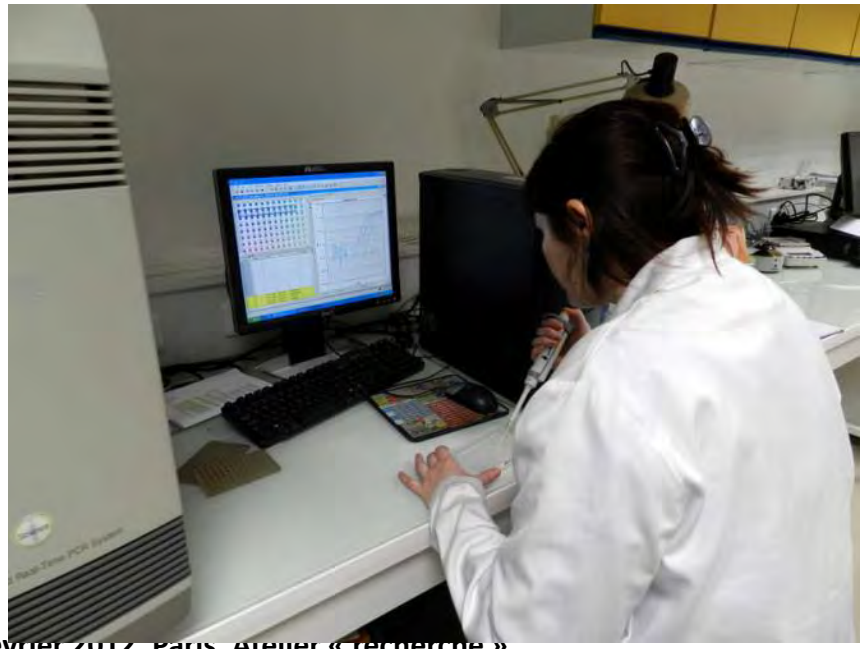
> Essais à approfondir

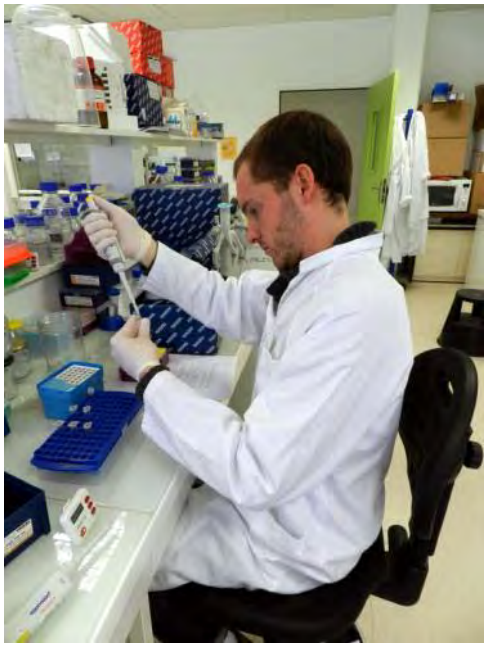
Méthode d'analyse finalisée

Définition du stade de détection

Carie du blé : mieux la connaître pour mieux lutter

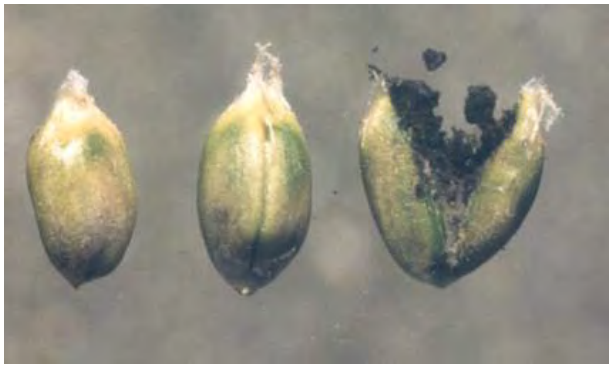
Projet FAM 2012 : perspectives





Mieux connaître la carie : Taxonomie de *Tilletia spp.*





Récupération d'épis et lots de grains cariés / boutés

Isolement / Purification des souches

Séquençage de gènes clefs : ITS, EF1α, β-tubuline)

Identification des espèces sans ambiguïté

- *T. caries*
- *T. foetida*

Taxonomie : participation au réseau Rsyst

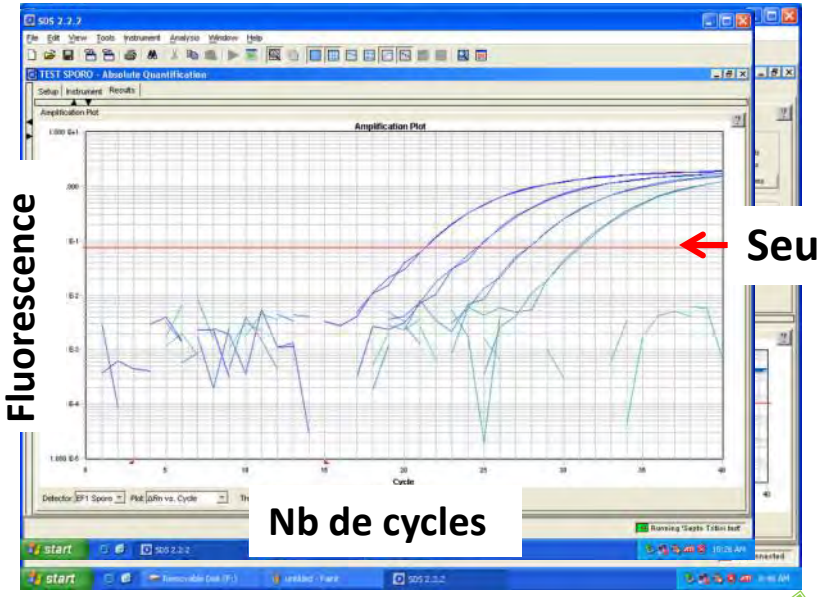
Génération de séquences génétiques pour le développement moléculaire

ARVALIS Institut du végétal

Mieux détecter la carie : qPCR et détection précoce de *Tilletia*

Développement d'un test qPCR pour *T. caries* et *T. foetida* (incrémenté de *T. indica* et *T. controversa* selon faisabilité

- Non dépendant de l'œil de l'observateur
- Plus rapide (analyse de 43 échantillons en même temps)
- **Quantification** du champignon



Application à la qualité des lots

Ring-Test sur 50 lots en comparaison à l'analyse actuelle par filtration et observation (corrélation entre nombre de spores et quantité d'ADN)

Détection / Quantification sur plantule

Phénotypage en serre sur variétés connues

Applications futures :

- Classement variétal
- Test d'efficacité de traitements



Essais simplifiés : plus besoin d'amener les plantes à épiaison.



Poursuivre les essais aux champs

Recommandations méthodologiques et perspectives

Présenté par Hélène Sicard (ITAB)

Besoins de recherche :





Recommandations méthodologiques :

Dispositif expérimental



Recommandations méthodologiques :

Choix de la variété

Sensibilité à la carie



Recommandations méthodologiques :

Contamination des semences

Contamination naturelle

Méthode CEB n°42 : méthode de référence







Recommandations méthodologiques :

Contamination des semences

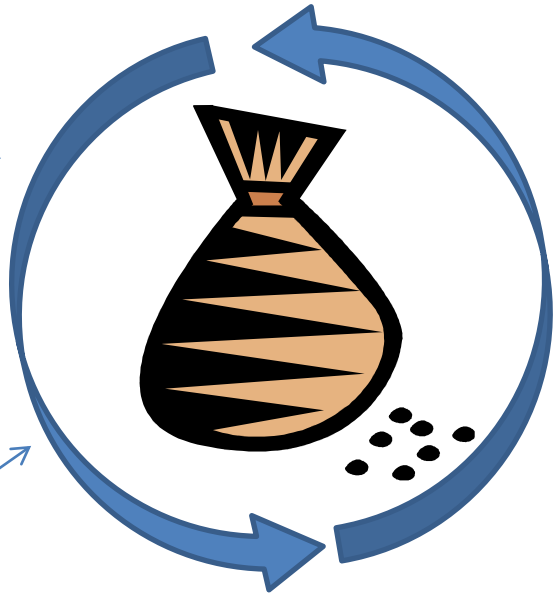
Méthode de Waldow & Jahn (2007)

1



2





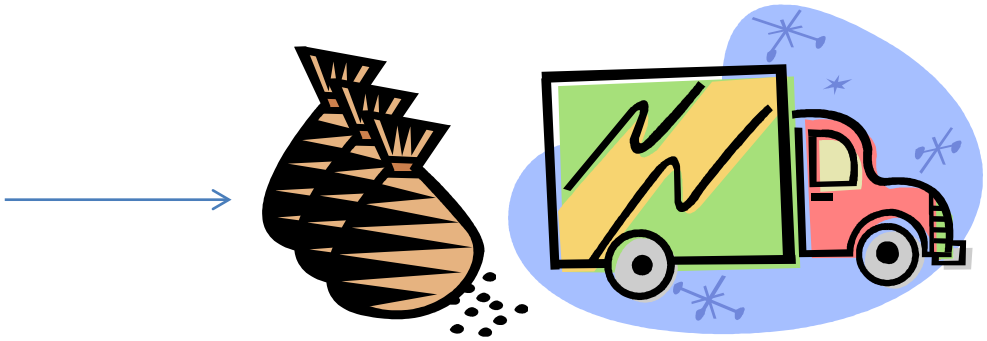


Recommandations méthodologiques :

Contamination des semences

Quelle que soit la méthode :





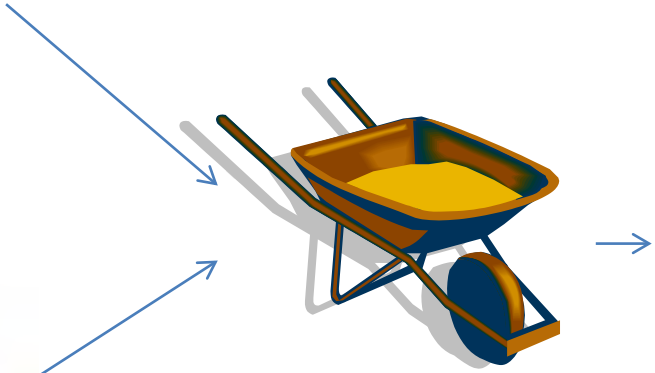
Recommandations méthodologiques :

Contamination du sol

Utilisation de la CEB n°42





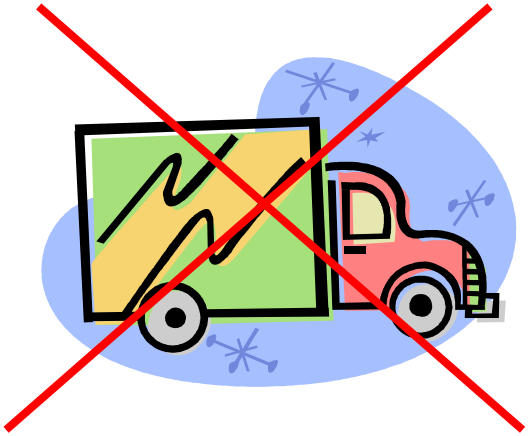


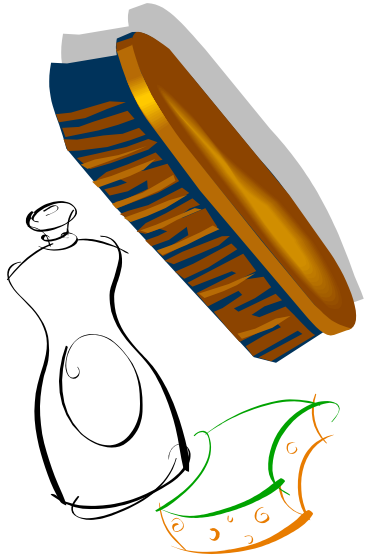


Recommandations méthodologiques :

Origine et stockage des spores







Recommandations méthodologiques :

% d'épis cariés







Quelques perspectives de recherches aux champs

Implantation de la gamme variétale

Essais variétaux

Essais traitements de semence

