



des efforts à poursuivre...
Besoins de recherches





Détection de la carie sur semences

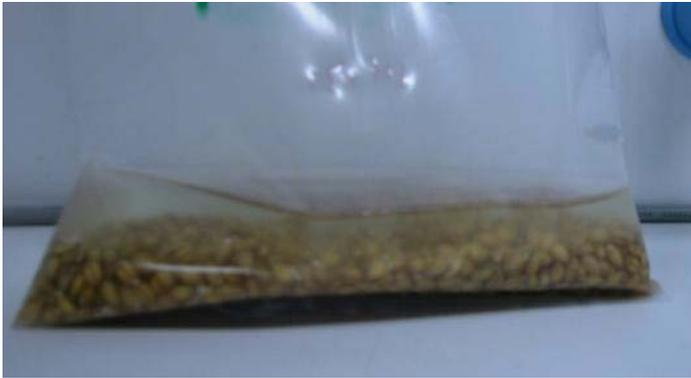
Isabelle Sérandat





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



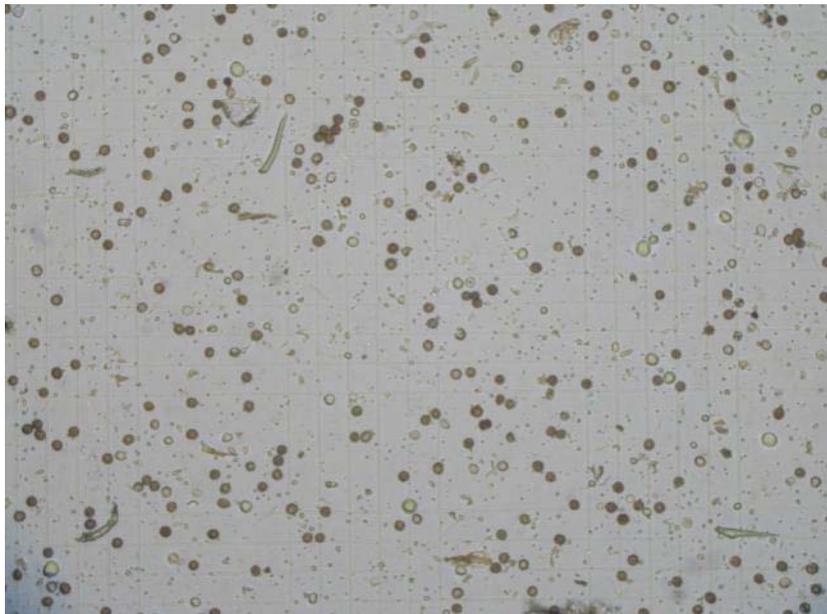
- Chaque prélèvement est placé sur un hématimètre (cellule de Mallassez) ce qui permet en plus de l'identification, la détermination de la concentration en spores/mL





Détection et dénombrement de la carie sur semences

➤ Exemples d'observation sur cellule de Malassez



Concentration importante de spores et présence de saprophytes



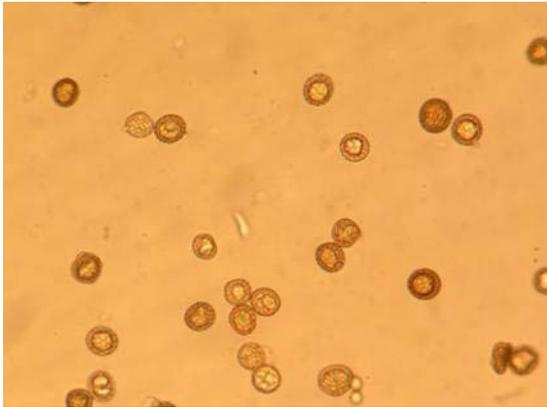
Concentration moyenne de spores



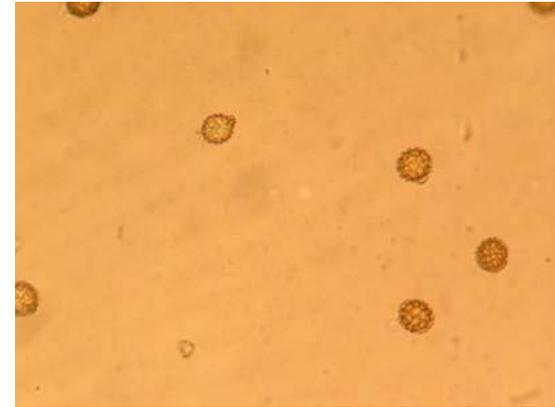


Détection et dénombrement de la carie sur semences

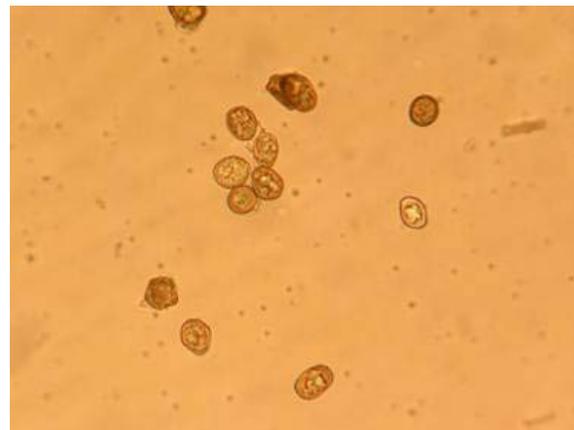
➤ Identification des différentes espèces de caries



• *Tilletia caries*



• *Tilletia controversa*



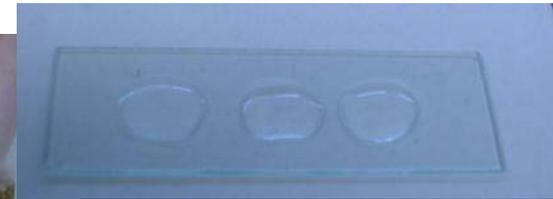
• *Tilletia foetida*





Détection et dénombrement de la carie sur semences

- Si aucune spore n'est détectée après les 10 prélèvements une observation de 300 μ L 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

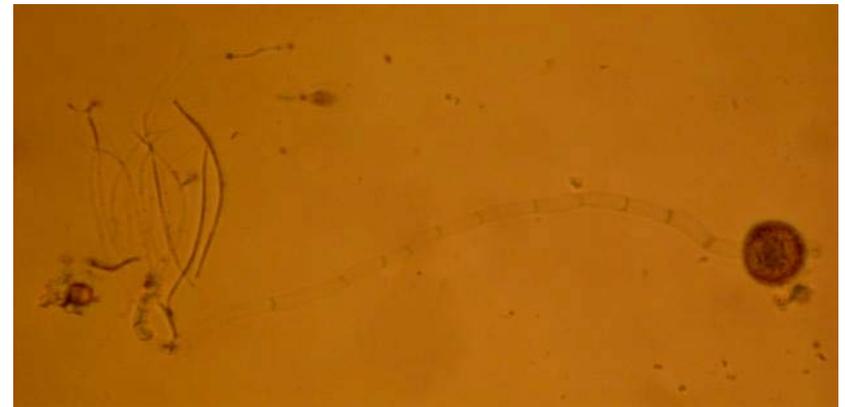
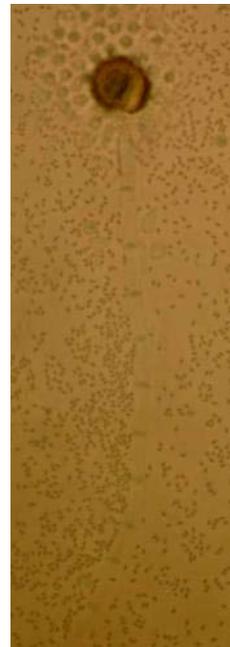




Détermination de la viabilité de la carie sur semences

Test de germination des spores

- Etalement de 100 μ L 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



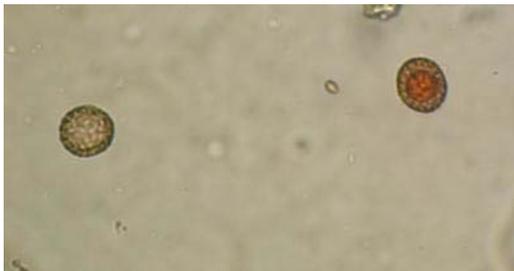


Détermination de la viabilité de la carie sur semences Test de coloration au Tétrazolium

- 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



REPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

Le soutien financier est assuré par
le Comité agricole pour
le développement agricole et rural

Partenaires

ITAB

Institut Technique de
l'Agriculture Biologique

ARVALIS

Institut du végétal

FREDON
Agriculture & Développement

**AGRICULTURES
& TERRITOIRES**
L'AMBIANCE RURALE

Fredec
Midi-Pyrénées

QualiSol

CCP
DE FRANCE

Collaborations


FNAMS

Programme de lutte contre la carie commune du blé 2008-2011

PCR approche qualitative

redec · idi-yrénées

Fredec
Midi-Pyrénées

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?

Echantillons

Différents stades et provenances



2 feuilles

Maturité

Tests PCR



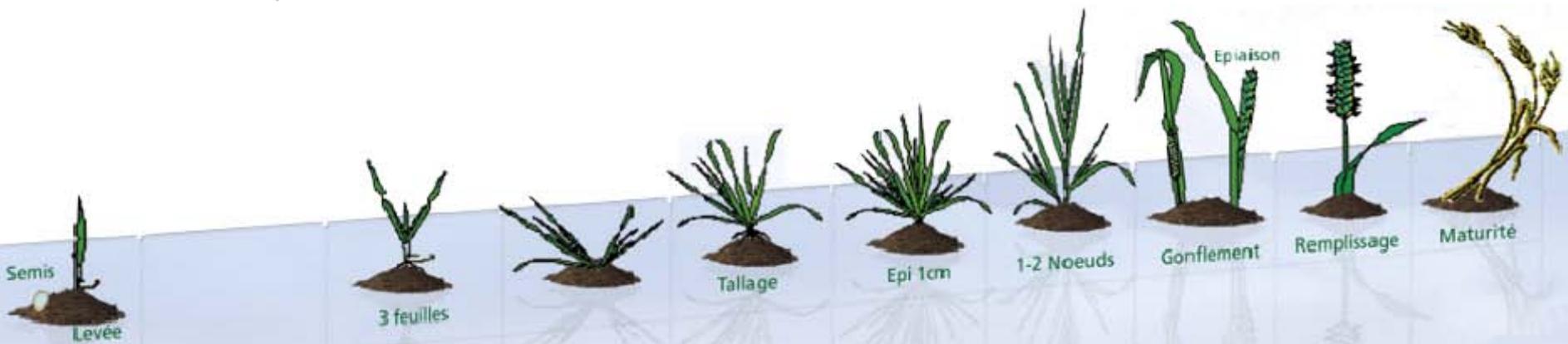
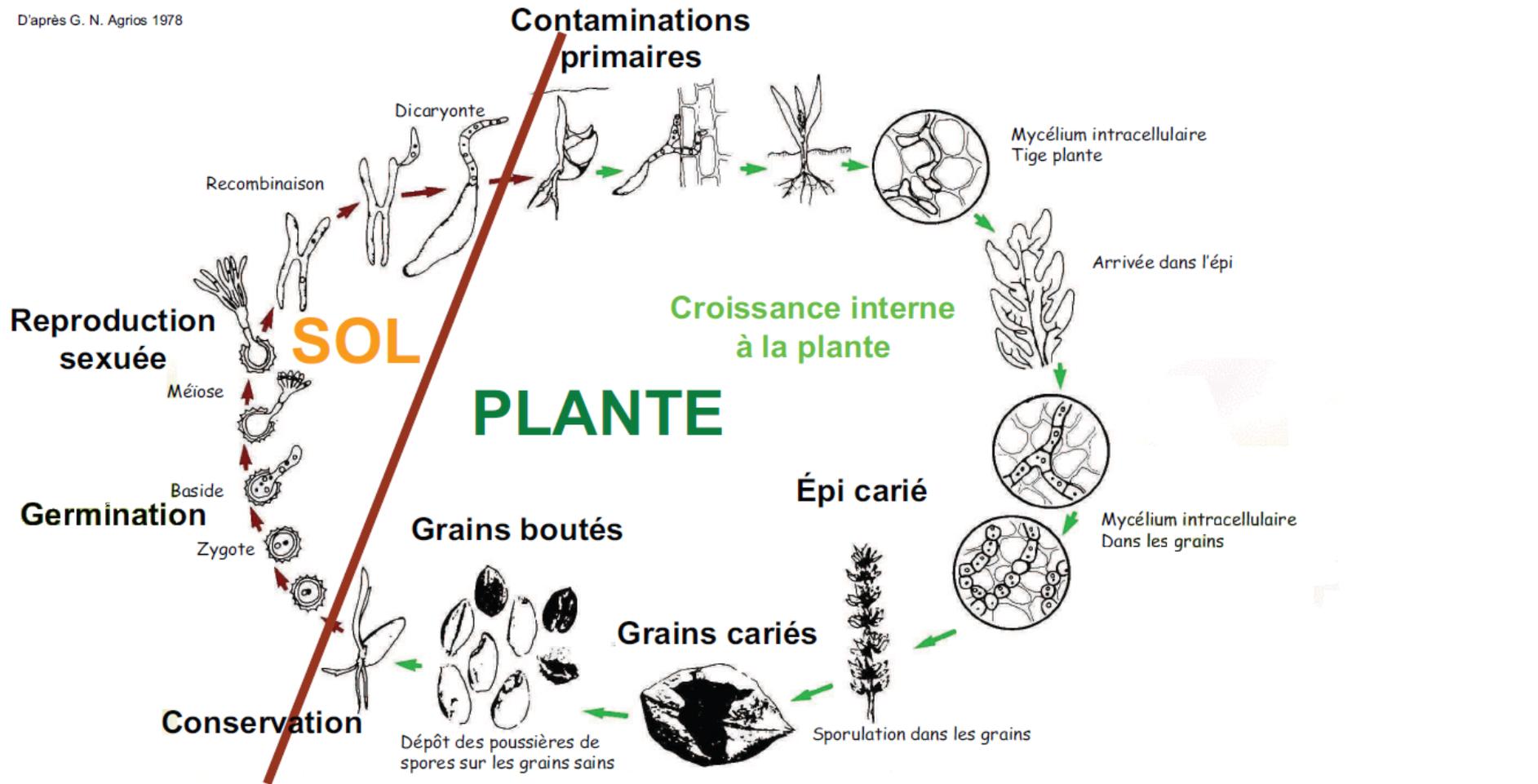
Comparaison des résultats

PCR / terrain

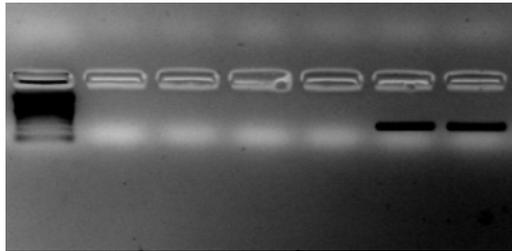
> **Résultats qualitatifs**

Terrain	PCR
Déecté	Non-déecté
Non-déecté	Déecté
Déecté	Déecté
Non-déecté	Non-déecté

Validité de l'essai



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

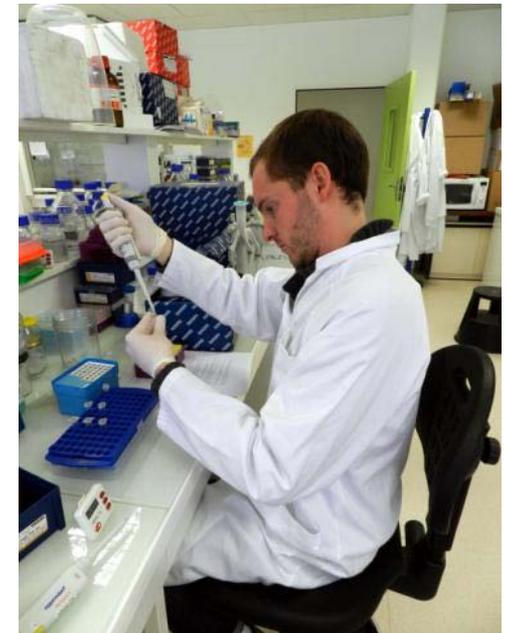
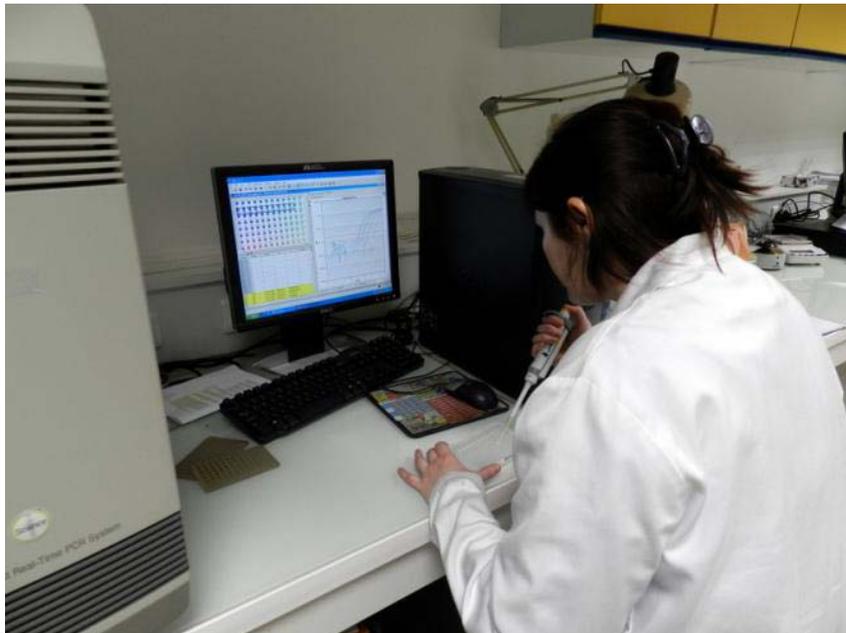
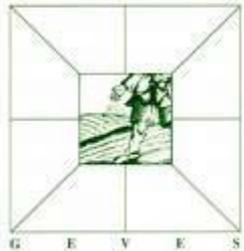
Méthode d'analyse finalisée

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, EF1 α , β -
tubuline)



Identification des espèces
sans ambiguïté

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

Taxonomie : participation au
réseau Rsyst

Génération de séquences
génétiques pour le
développement moléculaire

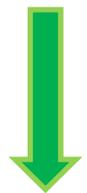


Mieux détecter la carie : qPCR et détection précoce de *Tilletia*



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



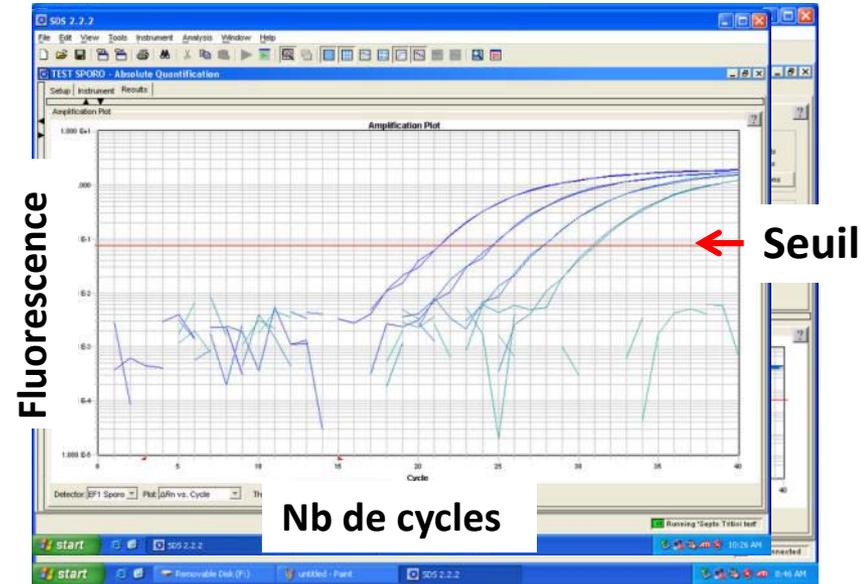
Application à la qualité des lots

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





Poursuivre les essais aux champs

Recommandations méthodologiques et perspectives



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

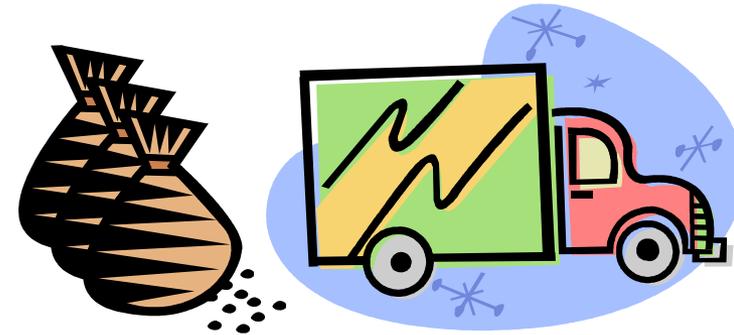
Méthode de Waldow & Jahn (2007)



Recommandations méthodologiques :

Contamination des semences

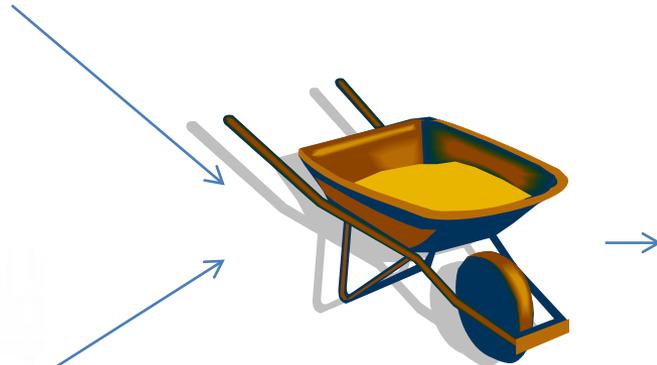
Quelle que soit la méthode :



Recommandations méthodologiques :

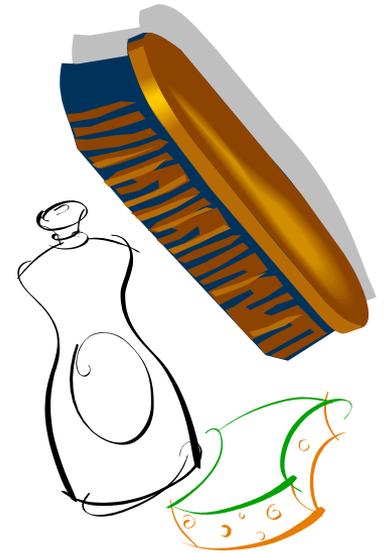
Contamination du sol

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

