

Végéphy - 12^e CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 11 ET 12 DÉCEMBRE 2018

**CARIE COMMUNE : ETUDE DES VIRULENCES PREDOMINANTES EN FRANCE ET MISE AU
POINT D'UN TEST DE RESISTANCE POUR L'INSCRIPTION AU CATALOGUE FRANÇAIS DES
VARIETES DE BLE TENDRE DEPOSEES EN AB**

V. CADOT ⁽¹⁾, G. ORGEUR ⁽¹⁾, L. LE DARE ⁽¹⁾, J. BRACHET ⁽¹⁾, C. GALON ⁽¹⁾, T. BALDWIN ⁽¹⁾,
J. GOMBERT ⁽²⁾, L. FONTAINE ⁽³⁾, P. DU CHEYRON ⁽⁴⁾, J. BRUYERE ⁽⁵⁾, S. OSTE ⁽⁵⁾, J. CHAMPION ⁽⁶⁾,
J.-P. MAIGNIEL ⁽⁷⁾, A. MAILLIARD ⁽⁷⁾, V. GRIMAULT ⁽¹⁾

⁽¹⁾ GEVES Beaucouzé – 25 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé – France

valerie.cadot@geves.fr, geoffrey.orgeur@geves.fr, thomas.baldwin@geves.fr,

valerie.grimault@geves.fr

⁽²⁾ FNAMS Impasse du Verger, 49800 Brain sur l'Authion, julie.gombert@fnams.fr

⁽³⁾ ITAB 9, rue André Brouard - CS 70510, 49105 Angers Cedex 02, laurence.fontaine@itab.asso.fr

⁽⁴⁾ Arvalis Institut du Végétal Route de Châteaufort, ZA des gravières 91190 – Villiers le Bâcle,
p.ducheyron@arvalisinstitutduvegetal.fr

⁽⁵⁾ FREDON Nord Pas-de-Calais 265, rue Becquerel BP 74, 62750 Loos-en-Gohelle,

julien.bruyere@fredon-npdc.com, sandrine.oste@fredon-npdc.com

⁽⁶⁾ Chambre d'Agriculture de la Drôme, Ferme expérimentale d'Etoile - 2485 route des Pécollets,
26800 Etoile sur Rhône, jchampion@drome.chambagri.fr

⁽⁷⁾ GEVES, Unité expérimentale de l'Anjouère, 49370 La Pouëze, jean-philippe.maigniel@geves.fr,
aurelie.mailliard@geves.fr

RÉSUMÉ

La carie commune est une maladie ré-émergente, transmissible par la semence, affectant particulièrement la filière céréales AB. A partir de 26 isolats collectés dans 15 départements français, *Tilletia caries* a été identifié comme l'espèce majoritaire, avec 100% d'occurrence, par rapport à *T. foetida* avec 15.4%. Vingt souches de *T. caries* ont été sélectionnées pour identifier leurs virulences, à partir de leur comportement sur la gamme d'hôtes différentiels, révélant une virulence prédominante sur le gène de résistance *Bt-7*, avec une fréquence de 48%, puis de *Bt-2* (24%) et *Bt-15* (19%). Un test de résistance variétale précoce par qPCR au stade 3 feuilles, quantifiant l'ADN de *Tilletia sp.*, a été mis au point. Ce test précoce s'est révélé bien corrélé avec le test au champ au stade adulte, basé sur la notation visuelle du taux d'épis cariés, à partir d'un panel de variétés cultivées en AB ($R_{\text{Spearman}} = 0.86$). Un test de résistance utilisant les virulences prédominantes va pouvoir être prise en compte pour l'inscription des variétés de blé tendre déposées en AB au Catalogue français.

Mots-clés : *Tilletia*, carie commune, virulence, test de résistance, AB

ABSTRACT

COMMON BUNT : STUDY OF PREDOMINANT VIRULENCES IN FRANCE AND DEVELOPMENT OF A RESISTANCE TEST FOR REGISTRATION IN THE FRENCH CATALOGUE OF COMMON WHEAT VARIETIES FOR ORGANIC FARMING

Common bunt is a re-emerging seed-borne disease affecting particularly organic cereal farming. *Tilletia caries* was identified as the predominant species in 26 isolates collected from 15 French departments with 100% occurrence, compared with *T. foetida*, at 15.4%. Twenty strains of *T. caries* were selected to identify their virulences, from their behaviour on differential host range, revealing a predominant virulence on *Bt-7* resistance gene, with a frequency of 48%, followed by *Bt-2* (24%) and *Bt-15* (19%). An early varietal resistance test by qPCR at the 3- leaf stage, quantifying *Tilletia sp.* DNA, was developed. This early test was found to be well correlated with the adult field test, based on visual notation of the bunted ear rate from a panel of varieties grown using organic practises ($R_{\text{Spearman}} = 0.86$). A resistance test using the predominant virulences will be taken into account for the registration in the French Catalogue of soft wheat varieties for organic farming.

Keywords: *Tilletia*, Common bunt, virulence, resistance test, organic farming

INTRODUCTION

La carie commune du blé (*Tilletia caries* et *Tilletia foetida*), est une maladie fongique grave et ré-émergente en Europe du Nord et de l'Est depuis une dizaine d'années. Elle est très dommageable sur blé, avec d'importantes pertes de rendement allant jusqu'à 80%, une détérioration de la qualité sanitaire des semences (semences cariées remplies de téliospores noires, avec une odeur nauséabonde) et un pouvoir exceptionnel de propagation. La carie est transmise principalement par la semence : 1 grain carié peut contenir jusqu'à 9 millions de spores, sachant que 30 à 40 spores/grain sont suffisants pour provoquer la maladie, mais les spores peuvent également rester viables dans le sol pendant une dizaine d'années. Par manque d'outils fiables et rapides en sélection, la résistance variétale à la carie commune est peu travaillée. De ce fait, la sensibilité variétale pose un problème d'importance pour l'Agriculture Biologique, et nécessite des traitements de semences quasi-systématiques pour les semences conventionnelles, ce qui va à l'encontre des objectifs d'Ecophyto. Au niveau économique, les lots contaminés ne sont pas commercialisables avec refus à la collecte pour la meunerie, voire l'alimentation animale. En 2013, la Section CTPS Céréales à paille a entériné un protocole VATE (Valeur Agronomique Technologique et Environnementale) pour les variétés de blé tendre adaptées à l'Agriculture Biologique, intégrant le caractère d'évaluation de la résistance variétale à la carie commune. Or actuellement, le GEVES ne dispose pas de test de résistance fiable, par manque de connaissances suffisantes sur les virulences prédominantes en France. Des études antérieures ayant indiqué l'existence d'une certaine diversité de races et de virulences au niveau international.

Une gamme d'hôtes différentielle a été constituée par Metzger, complétée au cours du temps par Goates pour constituer 17 lignées, comprenant 15 gènes de résistance Bt, de *Bt1* à *Bt15*, utilisée internationalement pour caractériser les virulences des populations locales et l'apparition de nouvelles races (Goates, 2012). Aux Etats-Unis, en plus des 5 races définies virulentes sur les gènes *Bt5*, *Bt9* et *Bt10* en 1996, Goates a répertorié 11 nouvelles races en 2012 qui attaquent la combinaison de *Bt8* à *Bt12* pour la première fois (Goates, 2012). La majorité des populations européennes sont virulentes contre les gènes de résistance *Bt1*, *Bt2*, *Bt3*, et *Bt7*, tandis qu'elles n'attaquent pas les gènes *Bt5*, *Bt8*, *Bt9*, *Bt10*, et *Bt11* (Matanguihan, 2011). En France, la présence de la virulence sur *Bt7* et dans une moindre mesure sur *Bt15*, a été mise en évidence dans 2 essais et une certaine diversité de situation semble se dessiner pour les virulences sur *Bt13*, *Bt2*, *Bt4*, *Bt5* et *Bt9* (ITAB 2012). La participation à un réseau européen en 2007 a mis en évidence des contournements de résistance des variétés françaises Québon et Sankara par des populations de *Tilletia* spp. présentes dans d'autres pays européens, comme la Roumanie. Ces premiers travaux ont ainsi mis en évidence le besoin indispensable d'améliorer les connaissances sur la structuration des populations de carie présentes en France.

Au niveau des tests de résistance à la carie commune préexistants, le GEVES réalisait depuis les années 1960-70 un test au champ, en notant le taux d'épis cariés des variétés de blé, par contamination du sol avec une souche locale. Ce test a été supprimé en 2007, par manque d'information sur la souche utilisée et sur la représentativité des virulences présentes en France. ARVALIS a également conduit des essais tests au champ d'évaluation de la résistance à la carie commune, entre 2001 et 2011 sur une centaine de variétés de blé tendre. La notation du taux d'épis cariés a montré que seulement 10% des variétés présentaient un très bon niveau de résistance. Les 5 variétés les plus cultivées en AB étaient parmi les variétés sensibles à la carie : Renan 39,3% ; Pireneo 21,6% ; Attlass 27,7% ; Lona 42,2% ; Saturnus 34,2% (Fontaine *et al.*, 2013). Cette étude demande à être renouvelée avec les virulences actuelles. Actuellement, 15 gènes de résistance spécifiques ont été identifiés (Goates, 2012), mais pour la plupart des variétés, les gènes de résistance ne sont pas connus. Au Canada et aux Etats-Unis, les gènes de résistance les plus utilisés pendant plusieurs décennies furent *Bt1*, *Bt3*, *Bt4*, *Bt6* et *Bt7*. Actuellement, *Bt8* et *Bt12* sont les gènes de résistance couramment présents dans les variétés cultivées dans le Nord Ouest des Etats-Unis mais de nouvelles races de *T. caries* et *T. foetida* viennent de les contourner. Néanmoins *Bt8* et *Bt12*, qui ont permis de faire chuter la sévérité de 90% à 0%, se sont montrés durables pendant une quarantaine d'années, avec leur introduction dans les variétés américaines au début des années 1970 (Goates, 2012). En Europe, quelques références en matière de résistance variétale existent en Suisse (Bäzinger, 2003), en Allemagne (Wachter *et al.*, 2007) et en République tchèque (Dumalasova *et al.*, 2012). Ces derniers, lors d'inoculations artificielles, de 2009 à 2012, avec les isolats tchèques ont montré que les variétés portant *Bt11* ; *Bt12* et *Bt13* n'étaient pas attaquées. Fofana *et al.*, ont été les premiers en 2008 à cartographier des QTL associés à la

résistance de la carie commune, montrant 3 régions génomiques situées sur 2 chromosomes (1B et 7A) expliquant 32% de la variation phénotypique. Cette résistance est apparue non race spécifique et pourrait permettre une résistance durable contre les changements de virulence dans les populations de carie.

A partir des méthodes existantes d'identification et de quantification de la carie commune du blé, l'objectif du projet Carie ABBLE vise à mettre au point un test rapide et fiable de résistance variétale en conditions contrôlées face aux races et espèces dominantes en France pour l'inscription CTPS des variétés de blé tendre menées en AB. Les travaux menés de 2015 à 2018 ont été structurés autour de 2 actions complémentaires :

- L'identification des principales espèces de carie et virulences présentes en France,
- La mise au point d'un test de résistance variétale appliqué aux virulences prédominantes, et caractérisation de la résistance variétale des variétés de blé tendre d'hiver les plus cultivées en AB.

MATERIEL ET MÉTHODE

Matériel

Hôtes différentiels :

En 2014 et 2015, le GEVES a multiplié la gamme d'hôtes différentiels et réalisé des tests de germination afin de disposer d'une quantité de semences suffisantes pour identifier les virulences des isolats collectés. Quinze hôtes différentiels sur les 17 réceptionnés ont été retenus (Tableau I).

Tableau I : Gamme d'hôtes différentiels (Goates, 2012)
Differential host range (Goates, 2012)

n° HD	Reference	Resistance genes
1	Heines VII	Bt-0
2	Sel. 2092	Bt-1
3	Sel. 1102	Bt-2
4	Ridit	Bt-3
5	CI 1558	Bt-4
6	Hohenheimer	Bt-5
7	Rio	Bt-6
8	Sel. 50077	Bt-7
9	PI 173438/Eg	Bt-8
10	Eg/PI 178383	Bt-9
11	Eg/PI 178383	Bt-10
12	Eg/PI 166910	Bt-11
13	PI 119333	Bt-12
14	Thule III	Bt-13
15	Carlton	Bt-15 (tetrapl.)

Variétés :

Témoins de résistance

Quatre variétés de blé tendre, connues pour leur comportement de résistance ont été sélectionnées : comme témoins sensibles : Lukullus, Renan, Apache, et comme témoin résistant : Arezzo.

Panel de variétés de blé tendre cultivées en AB :

Pour comparer le comportement de la résistance variétale à la carie commune sur un plus grand panel entre le test précoce et le test au champ, 10 variétés de blé tendre ont été sélectionnées, comprenant des témoins de sensibilité ou résistance, des témoins CTPS utilisés en AB, des variétés parmi les plus cultivées en AB et une variété en étude pour l'inscription au Catalogue français.

Isolats :

Les isolats de carie ont été collectés dans les régions céréalières représentatives de l'Agriculture Biologique de 15 départements. Différents réseaux ont participé à cette collecte : Coop de France, les réseaux des groupements professionnels biologiques et des Chambres d'Agriculture via l'ITAB, le réseau d'inscription CTPS par le GEVES, le réseau des ingénieurs régionaux d'Arvalis, et les analyses sanitaires de la SNES. Préférentiellement, les épis cariés ont été collectés ; leur détection précoce étant difficile et aléatoire, des échantillons de grains boutés ont également été collectés.

Méthodes

Des méthodes relatives à l'identification des espèces de carie et des virulences ainsi que des tests de résistance précoces et au champ ont été réalisés :

Caractérisation des souches

Analyse morphologique des espèces :

Sur tous les isolats collectés, des analyses microbiologiques ont été réalisées selon la méthode de référence MOA 017 version 2a, basée sur la morphologie des téliospores (Figure 1), pour identifier les 3 espèces de carie suivantes : *T. caries*, *T. foetida*, *T. controversa*.

Figure 1 : Aspect morphologique des téliospores a) *T. caries*, b) *T. foetida*, c) *T. controversa*

Morphological aspect of teliospores a) *T. caries*, b) *T. foetida*, c) *T. controversa*



Analyse de viabilité et quantification des spores de carie

Avant inoculation des semences, une analyse d'évaluation de la viabilité des spores, validée lors de projets précédents est réalisée (Orgeur, 2014). Un colorant vital permet de vérifier la présence de spores vivantes (colorées) et mortes (non colorées) (Figure 2). Un test de quantification des spores est également effectué avant chaque inoculation des graines sur 50 g de semences.

Figure 2 : Etapes de récupération de l'inoculum sous forme de spores pures et analyse de viabilité

a) Récolte des épis cariés b) Broyage des grains cariés c) Récupération des spores

d) Analyse de viabilité: d1) spore morte : décolorée, d2) spore vivante : colorée

Preparation and viability analysis of inoculum in the form of pure spores

a) Harvest of bunted ears b) Crushing of bunted seeds c) Spore recovery

d) Viability analysis: d1) dead spore : decolorated, d2) alive spore : colorated



Inoculation des semences par *Tilletia caries* et transmission à la plantule en laboratoire

Un semis en conditions contrôlées favorables à la transmission de *T. caries* de la semence à la plantule a été réalisé par le GEVES-SNES, selon un protocole défini dans un précédent programme de recherche européen TESTA (Orgeur *et al.*, 2014).

L'inoculation par *Tilletia caries* des semences a été nécessaire dans 4 tâches, pour :

1. multiplier l'inoculum des 20 isolats en année 1,
2. identifier le spectre de virulences des isolats, en inoculant la gamme différentielle en année 2,
3. mettre au point le test de résistance précoce par qPCR en laboratoire sur les témoins et comparer leur comportement avec le test au champ au stade adulte, en année 2,
4. étudier le comportement de résistance à la carie d'un panel de variétés AB au champ et valider le test précoce par comparaison avec ce test au champ, avec une souche représentative des virulences prédominantes en France, en année 3.

Multiplication de l'inoculum

Vingt isolats ont été multipliés, avec une étape de développement des plantules en conditions contrôlées, suivi d'un repiquage au champ des plantules, en décembre 2015, dans 2 sites de la FNAMS (Brain sur l'Authion, 49 et Bourges, 18), pour sécuriser les résultats. Les grains boutés (présentant des spores externes) ont été semés directement tandis que pour les 4 échantillons

issus d'épis cariés, les spores ont été extraites par broyage puis mélangées aux semences de la variété sensible, Renan. Les épis cariés ont été collectés en juin 2016 et envoyés au GEVES pour la récupération des spores, leur quantification et l'analyse de leur viabilité (Figure 3).

Figure 3 : Etape clés de la multiplication de l'inoculum : a) contamination artificielle des semences avec spores issues des épis cariés pour semis, b) stade 3 feuilles atteint en module climatique, c) repiquage des plantules au champ (2 sites FNAMS 49 et 18) d) prélèvement des épis cariés.

Key stages of inoculum multiplication: a) artificial contamination of seeds with spores from bunted ears for sowing, b) 3-leaf stage in a climatic module, c) field transplantation of seedlings (2 FNAMS sites 49 and 18) d) sampling of bunted ears.



Identification du spectre de virulence

Le spectre de virulence des 20 souches a été caractérisé sur la gamme d'hôtes différentiels retenue, en divisant les souches dans deux sites afin de répartir les charges et les risques : à raison de 11 souches à Brain sur l'Authion (49) par la FNAMS et de 10 souches à Auchy-les-Mines (62) par la FREDON Nord Pas-de-Calais. Afin de pouvoir comparer les résultats, la souche S1 a été caractérisée sur les 2 sites. Les semences des 20 souches ont été artificiellement contaminées en conditions contrôlées à la SNES. Pour des raisons de coût et de place, seul le site du 49 a bénéficié des plantules en conditions contrôlées, gage de réussite de la contamination des plantules. Dans le 62, un semis direct au champ des semences contaminées des 10 souches a été réalisé en décembre 2016. Pour chaque souche, une notation visuelle au champ du taux d'épis cariés de la gamme différentielle a été effectuée en juin 2017, sur 25 épis/répétition avec 3 répétitions afin de définir les virulences.

Mise au point d'un test de résistance variétal précoce

Des programmes de recherche précédents ont permis de développer une méthode de quantification moléculaire précoce de la carie commune (France Agrimer 2012 et projet européen TESTA), avec le développement d'un couple d'amorces spécifiques au genre *Tilletia*, dessiné par Arvalis Institut du Végétal, à partir de la cible ITS1, entre l'ADNr 18s et 5.6s de *Tilletia sp.* Pour mettre au point un test résistance par qPCR à un stade précoce, plusieurs facteurs ont été étudiés par BioGEVES afin de différencier au mieux les variétés sensibles des résistantes, notamment :

- le stade physiologique de prélèvement : au stade 2-3 feuilles et au stade montaison, avec prélèvement d'un tronçon de 2-3 cm de la tige principale.
- la concentration de l'inoculum : 10^3 et 10^4 spores/semence (SPS).

Après une extraction d'ADN (Nucleospin 96 Plant II, Macherey-Nagel), la présence de *T. caries* est détectée par qPCR-SYBR Green (Go Taq qPCR Master Mix, Promega) sur 15 plantules/témoin et 2 répétitions/variété ; les semences ayant été contaminées avec la souche S1.

Comparaison du test de résistance qPCR avec le test au champ

Les semences ont été inoculées avec la souche S1, à une concentration de 10^4 spores/semence sur le panel de 10 variétés. La qPCR a été effectuée au stade 2-3 feuilles sur 2 répétitions de 15 plantules, selon le protocole préalablement mis au point, afin de comparer le niveau de résistance des variétés avec le test au champ, dans 2 sites : Villiers-le-Bâcle (91) par Arvalis et Etoile (26) par la Chambre d'Agriculture de la Drôme. Le transfert du pathogène de la semence à la plantule a eu lieu en conditions contrôlées au GEVES-SNES afin de favoriser une contamination homogène des plantules. Une partie des plantules a été analysée en qPCR, avec 2 semis distincts de 15 plantules/variété, correspondant à deux reproductions distinctes. Les autres plantules ont été

transplantées au champ au stade 3 feuilles dans les 2 sites, afin de réaliser une notation visuelle du taux d'épis cariés, à raison de 3 répétitions de 1 m /variété.

Analyses statistiques

Les tests statistiques d'analyse de variance, de comparaison de moyenne selon Student Newman-Keuls et les tests de corrélation de Spearman ont été menés avec le logiciel XLSTAT-Pro.

RESULTATS

ACTION 1 : IDENTIFIER LES PRINCIPALES ESPECES DE CARIE ET VIRULENCES PRESENTES EN FRANCE

Hôtes différentiels :

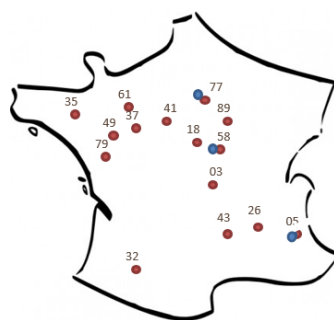
Une attention particulière a été portée lors des notations visuelles sur épis des hôtes différentiels pour choisir les bons types morphologiques, en s'aidant des descriptions antérieures et éviter les hors-types.

Collecte et caractérisation des isolats

En 2015, 26 isolats ont été collectés dont 4 issus d'épis cariés et 22 de grains boutés. En terme de diversité, ils sont issus de 11 variétés différentes de blé tendre, de 4 mélanges variétaux, de 3 petits épeautres et de 3 origines inconnues. *T. caries* s'est révélée être l'espèce majoritaire ; le mélange *T. caries-foetida* n'a été identifié que dans 4 cas sur 26 (15.4%) dans 3 départements sur 15 (20%), dans les 05, 58 et 77 (Figure 4). 20 isolats sur 26 ont été sélectionnés, en ciblant le blé tendre, un isolat monospécifique, un taux de viabilité suffisant, une diversité géographique et variétale.

Figure 4 : Caractérisation des espèces de *Tilletia* sur les 26 souches collectées en France

Characterisation of *Tilletia* species on the 26 strains collected in France



Multiplication

En 2016, la FNAMS a

permis d'assurer l'inoculation de la gamme différentielle pour identifier les virulences.

de l'inoculum

multiplication des 20 isolats dans les 2 permis l'obtention d'une très bonne

Identification des spectres de virulence avec inoculation des hôtes différentiels au champ

Les analyses de virulence sur les 20 souches montrent une prédominance de la virulence sur Bt7, avec une fréquence de 48%, suivi de Bt2 (24%), Bt15 (19%) et de Bt1 (10%), puis de façon plus mineure sur Bt6 avec 5% (Tableau II). Certaines virulences semblent émerger sur Bt3, Bt4, Bt5, Bt8, Bt9, Bt10, Bt11 et Bt13. Elles devront faire l'objet d'un suivi à l'avenir. D'après ces résultats, les gènes de résistance encore efficaces seraient : Bt3, Bt4, Bt5, Bt8, Bt9, Bt10, Bt11, Bt12 et Bt13.

La souche S1 de la FNAMS cumulant les virulences sur Bt7, Bt2 et Bt 15 a été retenue pour les tests de résistance. A noter que S1-FNAMS issue transfert de la carie de la semence à la plantule en conditions contrôlées a présenté une différence de spectre avec la souche S1-FREDON pour Bt1 et Bt15, issue de semences contaminées directement implantées au champ (Tableau II). Des vérifications de S1-FNAMS sur la gamme différentielle en laboratoire vont être menées pour confirmer son spectre.

Tableau II : Réaction d'avirulence et de virulence des 20 isolats de *Tilletia caries* collectés en France, par rapport à la gamme d'hôtes différentiels. Virulence prise en compte pour un taux d'épis cariés >5%

Avirulence and virulence reactions of 20 isolates of *Tilletia caries* collected in France, on differential host range. Virulence taken into account for a bunted ear rate >5%.

HD	Hôtes différentiels	Gènes de résistance	Souches pathogènes de <i>Tilletia caries</i>																								Fréquence des virulences : V/(V) >=5% épis cariés
			FNAMS 49												FREDON 62												
			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S1				
Département			49	18	61	49	05	41	89	43	35	26	26	79	32	77	89	89	58	26	26	61	49	>=5% épis cariés			
1	Heines VII	Bt-0	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	100%		
2	Sel. 2092	Bt-1	A	A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	A	A	V	10%			
3	Sel. 1102	Bt-2	V	A	A	(V)	V	A	A	(V)	A	A	A	A	A	(A)	A	(A)	(A)	(A)	A	A	V	24%			
4	Ridit	Bt-3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	A	(A)	(A)	A	A	A	A	A				
5	CL 1558	Bt-4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	A					
6	Hohenheimer	Bt-5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	A	A	(A)	(A)	A	(A)				
7	Rio	Bt-6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	V	(A)	A	(A)	(A)	A	5%			
8	Sel. 50077	Bt-7	V	(A)	V	V	V	A	V	(V)	V	A	V	A	A	(A)	A	V	(A)	(A)	(A)	(A)	V	48%			
9	PL 173438/Eg	Bt-8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	(A)	A	(A)	A	(A)	A				
11	Eg/PL 178383	Bt-9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	(A)	A				
12	Eg/PL 178383	Bt-10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	A	A				
13	Eg/PL 166910	Bt-11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	(A)	A	A	A	A	A	A	(A)	A	(A)	A				
14	PL 119333	Bt-12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
15	Thule III	Bt-13	A	A	A	A	A	(A)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
17	Carlton	Bt-15	V	(A)	A	(A)	A	A	V	(A)	(V)	(V)	(A)	A	(A)	(A)	A	A	A	(A)	(A)	A	(A)	19%			

Avirulent : 0% épis cariés ; (Avirulent) : <=5% épis cariés ; 5<(Virulent)<=10% épis cariés ; Virulent : >10% épis cariés

Action 2 : Mise au point d'un test de résistance précoce à la carie commune

Mise au point du test de résistance précoce par qPCR

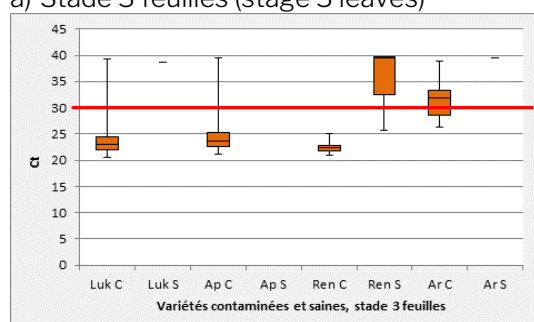
Le protocole qPCR, mis au point initialement pour identifier de la carie à un stade précoce, a été affiné pour être utilisé comme test de résistance précoce à la carie, en sélectionnant une concentration et un stade de prélèvement pour la qPCR. La comparaison entre les concentrations 10^3 et 10^4 spores/semence a montré un trop faible taux de contamination pour la concentration 10^3 spores/semence (données non montrées) et un niveau de contamination suffisant pour 10^4 spores/semence, permettant une bonne discrimination entre témoins sensibles contaminés et témoins sains et témoin résistant Arezzo contaminé (Figure 5). Les résultats du classement des témoins sensibles et résistants se sont avérés similaires entre le stade 3 feuilles et le stade montaison (Figure 5 a & b), avec un Ct (Cycle threshold) plus faible pour les variétés sensibles contaminées (Lukullus, Apache et Renan), par rapport à la variété résistante contaminée, Arezzo, et les témoins sains, logiquement expliqué par le fait qu'il faut moins de cycles PCR dans une variété sensible que dans une variété résistante pour détecter l'ADN amplifié du pathogène.

Les conditions de test de résistance précoce retenues sont une contamination artificielle à une concentration de 10^4 spores/semence et un prélèvement au stade 3 feuilles, avec une sélection d'un seuil Ct, en relation avec les témoins présents.

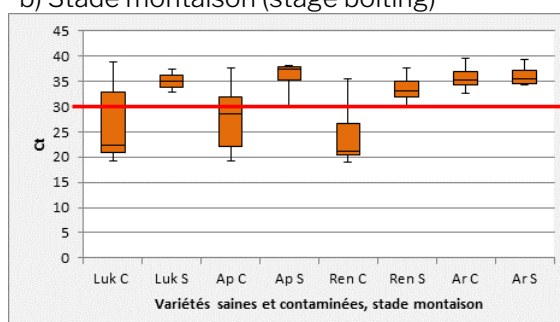
Figure 5 : Comparaison du nombre de plantes infectées par *T. caries*, par qPCR, pour les témoins contaminés (C) et sains (S), à la concentration de 10^4 spores/semence, à 2 stades, pour un Ct= 30 (Cycle threshold ou cycle PCR seuil)

Comparison of the number of plants infected with *T. caries*, using qPCR for inoculated (C) and healthy (S) controls at 2 stages, for a Ct=30 (Cycle threshold)

a) Stade 3 feuilles (stage 3 leaves)



b) Stade montaison (stage bolting)



Luk : Lukullus, Ap : Apache, Ren : Renan, Ar : Arezzo

Test de résistance variétal au champ au stade adulte

Le témoin sensible, Heines VII, Bt0, sans gène de résistance, a présenté un niveau suffisant de contamination, avec en moyenne 45 % d'épis cariés pour valider le test de résistance. L'étude du comportement variétal de la résistance à la carie commune au champ au stade adulte montre, d'après l'analyse de variance, un effet significatif des facteurs variétés et sites, pas d'effet répétition et l'absence d'interaction site*variété (Tableau III). Le test de rang de Spearman confirme cette très forte corrélation, $R_{sp}=0.96$, du classement de la résistance variétale entre les deux sites (91 et 26). L'évaluation de la résistance variétale révèle un continuum avec des variétés sensibles, intermédiaires et résistantes (Figure 6). Tilliko et Arezzo sont confirmés être résistants aux virulences prédominantes et Renan sensible. La variété en étude CTPS présente un niveau de résistance intermédiaire. Les effectifs d'épis comptés sur l'ensemble des 3 répétitions étant supérieurs dans le 91 (256 à 539 épis) par rapport au 26 (75 à 120 épis) peuvent expliquer quelques différences de comportement de résistance entre les deux sites ; particulièrement pour 3 variétés : Togano avec 75/256 épis, pour Ghayta avec 90/397 épis et Arezzo avec 73/442 épis pour respectivement les sites du 26 et du 91.

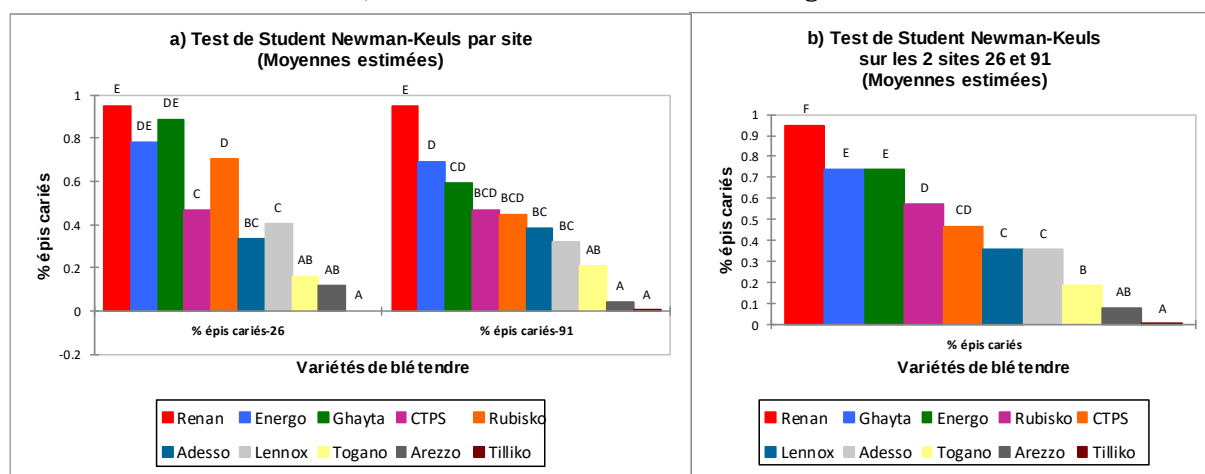
Tableau III : Analyse de variance à 3 facteurs : variété, site, répétition

Analysis of variance with 3 factors: variety, site, replication

Analyse Type III Sum of Squares (% épis cariés) :			
Source	DDL	F	Pr > F
Variété	9	50.104	< 0,0001
rep	2	0.820	0.448
Site	1	6.435	0.015
Variété*Site	9	1.893	0.083

Figure 6 : Evaluation de la résistance à la carie commune des variétés de blé tendre cultivées en AB, avec le test de résistance au champ dans les sites 26 et 91, et sur la moyenne des deux sites

Evaluation of common bunt resistance of soft wheat varieties for organic farming with a field resistance test, in sites 26 and 91 and with the average of the two sites



Corrélation entre le test qPCR au stade 3 feuilles et le test au champ au stade adulte

L'évaluation de la résistance variétale au stade 3 feuilles d'après les analyses qPCR montre également un continuum pour la résistance à la carie commune, avec des différences significatives d'après le test de Student Newman-Keuls, entre les témoins résistants, Tilliko et Arrezzo et le témoin sensible, Renan. Comme au champ, la variété en étude CTPS s'avère également présenter un niveau de résistance intermédiaire (Figure 7). Une forte corrélation ($R_{Sp}=0.86$) est observée entre le tests qPCR (Ct) et le test au champ (taux d'épis non cariés), montrant un classement de la résistance variétale globalement proche entre les deux méthodes (Tableau IV).

Figure 7 : Comparaison du classement de la résistance variétale à la carie commune du test précoce par qPCR (Ct) et du test au champ au stade adulte (taux d'épis non cariés) sur 10 variétés de blé tendre AB

Comparison of the classification of varietal resistance to common bunt of the early test by qPCR (Ct) and the field test at adult stage (non bunted ear rate) on 10 varieties of common wheat for organic farming

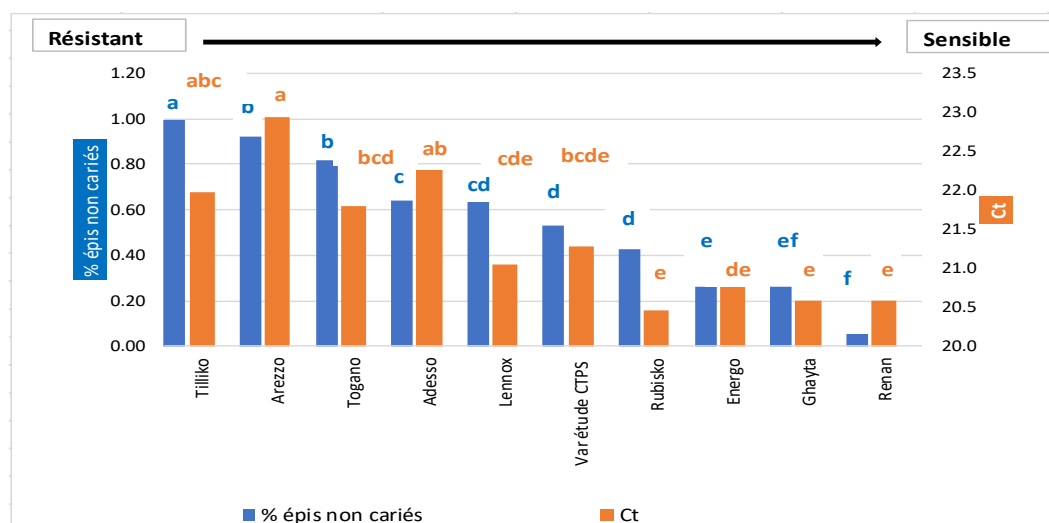


Tableau IV : Matrice de corrélation de Spearman entre le test précoce par qPCR (Ct=cycle seuils) et le test au champ au stade adulte (taux épis non cariés) sur 10 variétés de blé tendre AB

Spearman correlation matrix between the early test by qPCR (Ct= cycle threshold) and the field test at adult stage (non bunted ear rate) on 10 varieties of common wheat for organic farming

Variables	Ct	% épis non cariés	% épis non cariés-26	% épis non cariés-91
Ct	1	0.855	0.855	0.733
% épis non cariés	0.855	1	1.000	0.964
% épis non cariés-26	0.855	1.000	1	0.964
% épis non cariés-91	0.733	0.964	0.964	1

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

DISCUSSION

Le projet CASDAR Carie ABBLE, intitulé « Carie commune : étude de la variabilité des populations en France en vue du développement d'un test de résistance variétal pour l'inscription des variétés de blé tendre en Agriculture Biologique » a permis de confirmer la prédominance en France de *T. caries* par rapport à *T. foetida* et a montré qu'environ 50 % des souches possèdent la virulence Bt7, combinée aux virulences Bt2 et Bt15, et de façon mineure avec les virulences Bt1 et Bt6. Ces résultats confirment la prédominance de Bt7 trouvée dans 2 populations en France en 2012 (Fontaine *et al.*, 2013) ainsi que dans d'autres études européennes (Babayants *et al.*, 2006 ; Matanguihan, 2011 ; Wachter *et al.*, 2007). Le fait d'avoir effectué cette étude sur 20 souches dans 15 départements n'exclut pas la présence d'autres virulences dans d'autres lieux. Il serait intéressant de repartir des hôtes différentiels initiaux pour disposer d'un matériel homogène et harmonisé entre pays ; ce problème d'hétérogénéité ayant déjà été relevé en Suisse (Agroscope) et en Autriche (AGES). Il serait également souhaitable de disposer de souches monoclonales et non de populations pour conserver une souche de référence, avec un spectre de virulences stable. La mise au point de ce test de résistance à un stade précoce va pouvoir stimuler la création de variétés résistantes à la carie. Le développement de variétés avec des résistances spécifiques nécessitera un suivi épidémiologique afin de mettre à jour périodiquement une souche de référence, représentative des virulences prédominantes pour les tests de résistance CTPS et mieux comprendre les contournements de résistance. L'utilisation de QTL (Fofana *et al.*, 2008) combinée à des résistances spécifiques est une piste à poursuivre pour développer des résistances durables. La forte corrélation du classement de la résistance variétale, $R_{sp}=0.96$ entre les deux essais au champ s'explique par un protocole maîtrisé, au niveau de l'inoculation conduisant à une pression importante et homogène de la carie, ainsi qu'au contrôle des virulences présentes dans la souche sélectionnée, permettant une expression homogène de la résistance variétale. Ainsi ce protocole permet de diminuer le nombre d'essais au champ, par rapport aux préconisations de Dumasová *et al.* (2006) d'au moins 3 ans d'essais pour évaluer correctement la résistance à la carie. La forte corrélation entre le test de résistance au stade précoce et au stade adulte sur le panel AB, avec $R_{sp}=0.86$, demanderait à être confirmée sur des variétés présentant des mécanismes de résistance différents. Dans le cultivar résistant, les hyphes invasifs du champignon seraient stoppés par une accumulation de callose et ne parviendrait pas à atteindre les méristèmes floraux. Un autre mécanisme de résistance existerait par incompatibilité faisant intervenir des protéines PR-1, de chitinase et une lipase (Gaudet *et al.*, 2007).

CONCLUSION

Le projet Carie ABBLE a permis :

- une meilleure connaissance de la variabilité des espèces et races de carie en France, en démontrant la prédominance de *T. caries* et des virulences Bt7, Bt2 et Bt15,
- la mise au point d'un test de résistance à la carie commune en laboratoire, au stade 3 feuilles (8 semaines), plus précoce que le test au champ au stade adulte (8-9 mois) et en évitant la dissémination des spores de carie au champ,

- la proposition d'un protocole CTPS de test de résistance à la carie commune pour les variétés déposées pour l'inscription en Agriculture Biologique,

La résistance variétale à la carie va pouvoir prendre une dimension essentielle dans la lutte contre la carie en dotant la sélection variétale de ce nouveau test précoce opérationnel pour caractériser les variétés résistantes comparativement à la lutte chimique. L'utilisation de ce test de détection précoce de la carie va également permettre de mieux prévoir la qualité sanitaire d'un lot de semences.

REMERCIEMENTS

Les partenaires du projet CASDAR Carie ABBLE remercient le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, pour sa contribution financière au compte d'affectation spéciale « Développement agricole et rural ». La FREDON Nord Pas-de-Calais remercie également la Région Hauts-de-France pour le soutien financier apporté en co-financement.

BIBLIOGRAPHIE

- Babayants L.T., Babayants O.V., Baranovskaya V.L., Dubinina L.A., 2006. *Tilletia caries* and resistance of wheat to this pathogen in Ukraine, Czech J. Genet. Plant Breed., 42, p.33-36
- Bänzinger I., 2003. Stinkbrandanfälligkeit in- und ausländischer Weizensorten [Résistances des variétés de blé à la carie ordinaire], AgrarForschung 10, 328-333.
- Dumalasová, V., and Bartoš, P. 2006. Resistance of winter wheat cultivars to common bunt *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. and *T. laevis* Kühn. J. Plant Dis. Prot. 113:159-163.
- Fofana, B., Humphreys, D. G., Cloutier, S., McCartney, C. A., and Somers, D. J. 2008. Mapping quantitative trait loci controlling common bunt resistance in a doubled haploid population derived from the spring wheat cross RL4452 × AC Domain. Mol. Breed. 21:317-325.
- Fontaine L., Robin N., Bruyère J., du Cheyron P. 2013. Agir rapidement pour contenir la carie commune : exploration de diverses méthodes de contrôle. Innovations agronomiques 32, 35-46
- Gaudet, D. A., Lu, Z.-X., Leggett, F., Puchalski, B., and Laroche, A. 2007. Compatible and incompatible interactions in wheat involving the Bt-10 gene for resistance to *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. Phytopathology 97:1397-1405.
- Goates, B.J. 2012. Identification of new pathogenic races of common bunt and dwarf bunt fungi, and evaluation of known races using an expanded set of differential lines. Plant Dis. 96:361-369. doi:10.1094/PDIS-04-11-0339
- Matanguihan, J.B., 2011. Control of common bunt in organic wheat. Plant Dis. 95: 92-103
- ITAB, 2012. Agir rapidement pour contenir la carie commune. Actes du colloque de restitution du projet de recherche, 9 février 2012, Paris. 55 p.
- Orgeur G., 2014. Common bunt caused by *Tilletia caries*: Evaluation of viable spores, set up of a protocol to assess transmission to plantlets and damage threshold, The XVIII Biennial International Workshop on the Smuts and Bunts, Copenhagen, Denmark.
- Orgeur G., Delaunay A., Serandat I., Decugis. F., Rolland. M., Gombert. J., Fontaine L., Valade. R., Grimault V., 2014. Common bunt caused by *Tilletia caries*: epidemiology study and set up of a protocol to assess transmission to plantlets and damage threshold. 7th ISTA Seed Health Symposium –Edimbourg, Scotland.
- Wächter, R., Waldow, F., Müller, K. J., Spiess, H., Heyden, B., Furth, U., Frahm, J., Weng, W., Miedaner, T., Stephan, D., and Koch, E. 2007. Resistance of winter wheat varieties and breeding lines against common bunt (*T. tritici*) and dwarf bunt (*T. controversa*). Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Berlin) 59:S.30-39.