

TakeNOTAIL : Caractérisation de la résistance variétale des céréales à paille au Piétin-Échaudage et prédiction du risque

Romain VALADE^{1*}, Cloé ADAM¹, Oriane BAUDOUIN¹, Philippe DU CHEYRON¹, Eric MASSON¹, Agnès TREGUIER¹, Quentin CROULLEBOIS², Laure DUCHALAIS³, Benoît FOUCAULT⁴, Cindy VITRY¹

1 - ARVALIS- Institut du Végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 PARIS

2 - SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule

3 - RAGT 2N, Route Epincy, 28150 Louville-la-Chenard

4 - KWS MOMONT, 1 rue Maurice Violette, 28150 Allonnes

*Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@arvalis.fr

1 Introduction

Le piétin-échaudage (Take-all), causé par le champignon tellurique *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), est la maladie racinaire du blé causant les plus importantes pertes économiques en France et dans le monde entier (Freeman *et al.*, 2004). Le champignon est également capable d'infecter le triticale, l'orge, le seigle et d'autres graminées (Cook, 2003). Signalé pour la première fois en 1852 dans le sud de l'Australie, le nom « take-all » est utilisé dès 1870 suite à la découverte de champs de blé entièrement ravagés par une sévère brûlure de semis (seedling blight). En 1890, Prilleux et Delacroix identifient le champignon comme étant *Ophiobolus graminis*. Au fil des avancées scientifiques et des observations, le genre *Gaeumannomyces* a été établi et le champignon renommé *Gaeumannomyces graminis*. Ensuite, en comparant des souches provoquant des symptômes sur différentes espèces de graminées, Walker conclut, en 1972, qu'elles appartiennent à des pathovars différents. Le champignon responsable du piétin-échaudage du blé est alors décrit comme le pathovar *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt). Dans l'espèce *Gaeumannomyces graminis*, quatre sous-espèces ont été décrites. Les différences se basent notamment sur l'hôte, la pathogénicité ou encore la taille des ascospores :

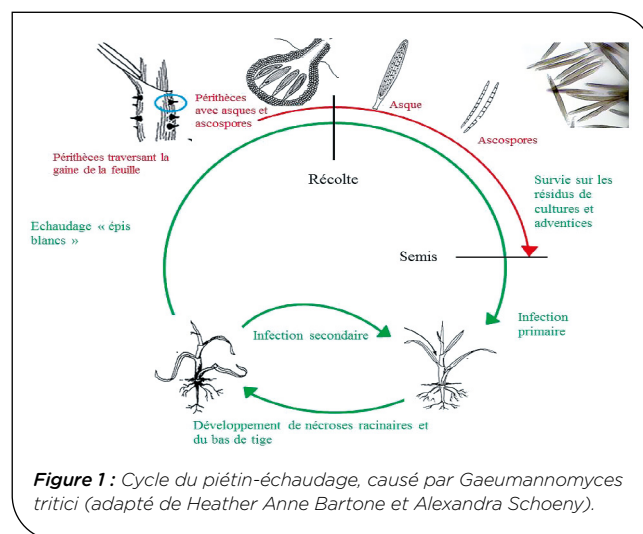
- *G. graminis* var. *tritici* (Ggt) : Espèce la plus agressive et attaque les céréales à paille et un grand nombre de graminées adventices. Il ne peut pas infecter l'avoine. En effet, l'avoine synthétise quatre phytoanticipines avénacines A-1, A-2, B-1 et B-2 présentant des propriétés antifongiques, au niveau racinaire.
- *G. graminis* var. *avenae* (Gga) : Il attaque principalement l'avoine. Gga est le seul à posséder une enzyme, l'avenacinase, qui va hydrolyser les molécules d'avénacines et ainsi lui permettre d'attaquer l'avoine. Il infecte également les céréales à paille (blé et orge) mais est beaucoup moins agressif.
- *G. graminis* var. *graminis* (Ggg) : Gazon, riz, chiendent et autres adventices.
- *G. graminis* var. *maydis* (Ggm) : Maïs et peut infecter le sorgho et d'autres céréales à la marge.

En 2016, Hemández-Restrepo *et al.*, suite à une étude taxonomique, concluent qu'il ne s'agit pas de trois

pathovars différents mais de trois espèces différentes. Le nouveau nom proposé est donc *Gaeumannomyces tritici* pour le piétin-échaudage du blé.

Au sein de Ggt, deux groupes génétiques existent : G1 et G2. Ils peuvent être présents en même temps dans le sol. Cependant, le génotype G1 est plus fréquemment rencontré en première année de culture alors qu'un pic du génotype G2 peut être observé en 3^{ème} et 4^{ème} année de culture. Le génotype G2 a pour particularité d'être plus agressif. Ces deux groupes sont différenciés par des outils moléculaires (INRA, Lebreton *et al.* 2004, 2007).

Le développement du piétin-échaudage comporte une phase de reproduction asexuée et une phase de reproduction sexuée (Figure 1). La majeure partie du cycle est effectuée dans le sol, à une profondeur de 5-10 cm. *G. tritici* est capable de survivre sous forme mycélienne sur les résidus de culture jusqu'à deux ans sans hôte intermédiaire, selon les conditions pédo-climatiques ; en sol chaud et humide (30°C et -0,3 MPa), en revanche, il est éliminé en moins de trois mois. Ce n'est pas un champignon compétitif et sa croissance à travers le sol est très limitée, ce qui explique que la maladie est souvent en foyer et liée à une rotation culturale riche en céréales à paille.



La contamination a lieu lorsque des racines saines entrent en contact avec le mycélium présent dans le sol, qui constitue alors l'inoculum primaire. Pour les blés d'hiver, l'infection primaire débute en automne



et des nécroses peuvent apparaître peu de temps après la levée. Le froid de la période hivernale stoppe le développement du champignon qui reprend au printemps, avec le réchauffement du sol et la reprise de la végétation. La propagation de la maladie est assurée par l'infection secondaire : le champignon se développe par contamination des racines saines avec des racines infectées de la même plante (auto-infection) ou d'une plante voisine (allo-infection). En été, le champignon reprend un mode de vie saprophytique sur les racines nécrosées et les tissus desséchés, formant un manchon noir à la base des tiges. La reproduction sexuée a très probablement un rôle assez mineur dans l'épidémiologie de la maladie. En effet, les ascospores (organes de dissémination du champignon en phase sexuée) ne se forment à la base des tiges que quelques semaines avant la moisson. En revanche, ils participent certainement à la contamination des repousses de céréales ou des adventices qui risquent à leur tour de contaminer la culture de blé suivante.

L'inoculum primaire du champignon dépend de l'historique cultural et joue un rôle majeur dans le développement de la maladie. Dans la rotation culturale peuvent se succéder des plantes hôtes, non hôtes et amplificatrices. Les plantes hôtes (céréales à paille) favorisent le développement de la maladie, contrairement aux plantes non hôtes (pois, betterave, luzerne) qui tendent à le diminuer. Les plantes amplificatrices telles que le maïs augmentent le risque en modifiant la composition du microbiote (ensemble des micro-organismes) du sol dans un sens favorable à la maladie. Ainsi, la maladie sera plus fréquente et intense dans des rotations très courtes en céréales à paille, notamment pour la seconde paille car la quantité d'inoculum primaire sera déjà très élevée au moment du semis de la seconde paille. Au contraire, diminuer la fréquence de retour des plantes hôtes permet de réduire la sévérité et l'incidence de la maladie.

Cependant, il a été montré que, dans le cas d'une monoculture de blé, au bout de la quatrième année (ou un peu plus tard, suivant le site) une diminution des symptômes de la maladie est constatée. Ce phénomène, dit « déclin du piétin-échaudage » (ou TAD pour *take-all decline*), s'explique par des modifications du microbiote du sol qui favorisent notamment des bactéries antagonistes de *G. tritici* telles que *Pseudomonas* spp., et aussi par des modifications de la composition des populations de *G. tritici*.

Le champignon pénètre à l'intérieur des racines et altère les vaisseaux du xylème : la plante ne peut donc plus puiser correctement dans le sol l'eau et les nutriments nécessaires à sa croissance et à son développement. Lors d'attaque précoce en reprise de végétation, les plantes sont chétives, moins développées et jaunissantes ; une réduction du tallage peut également être observée. Une forte attaque peut conduire à la perte précoce des plantes, sinon à l'arrêt plus ou moins total du remplissage des grains ou de leur maturation, et peut s'accompagner d'un blanchiment des épis - un symptôme caractéristique apparaissant surtout en cas de stress hydrique prononcé ; cependant, ce symptôme n'est pas systématique, même en cas de forte infestation des racines. Au niveau de la parcelle, la maladie entraîne l'apparition de foyers faisant moins

d'un mètre ou formant de grandes zones irrégulières se rejoignant. Ces zones sont généralement trouvées au niveau des andains de paille du précédent ou de l'antécédent.

L'observation minutieuse du système racinaire permet de déceler précocement la maladie. En effet, le champignon provoque des nécroses prenant l'aspect de manchons noirs sur les racines. Au niveau des jeunes racines, les nécroses se caractérisent par une coloration intense de la stèle mais pas du cortex, ce qui permet de différencier les symptômes causés par *G. tritici* des symptômes causés par d'autres agents pathogènes comme *Helminthosporium sativum* ou *Fusarium* spp. Une nécrose allant de 1 à 3 cm peut également apparaître en bas de tige, signe de la progression du champignon.

Le blé et l'orge sont les espèces les plus sensibles (Cook, 1994) alors que la sensibilité est très variable pour le triticale (Wallwork, 1989) et faible pour le seigle (Scott, 1981). Au sein de ces espèces, peu de différences variétales ont été observées dans les études menées dans les années 1990 (Cook *et al.*, 1995 ; Hornby *et al.*, 1998 ; Weller *et al.*, 2002). Néanmoins, des données obtenues dans le réseau d'Arvalis et des études récentes suggèrent une possible différence variétale dans la résistance au piétin-échaudage. Or, il est très difficile d'évaluer les variétés pour cette caractéristique. En effet, le piétin-échaudage est une maladie qui se disperse peu (Willocquet *et al.*, 2008) ce qui entraîne des pressions peu homogènes dans les essais au champ. De plus, le phénomène de Take-All Decline (TAD) décrit par Slope et Cox (1964) empêche également d'avoir une pression stable entre les années même dans des essais en monoculture de blé.

Prédire le risque qu'une maladie va atteindre le seuil économique critique est un enjeu important dans sa gestion. Il est communément admis que le taux initial d'inoculum de Ggt est important dans le développement de la maladie et que ce taux est déterminé par l'historique cultural, la sévérité de la maladie sur le précédent et le taux de décomposition de l'inoculum (Hornby, 1998). La sévérité de la maladie est souvent faible en première céréale mais peut être très forte en deuxième céréale. Néanmoins, de forts effets saisonniers agissent sur la sévérité de la maladie même en seconde céréale (Werker *et al.*, 1990). En effet, des interactions complexes entre les facteurs climatiques agissent sur les épidémies de piétin échaudage même si l'humidité du sol semble plus importante que la température (Roget *et al.*, 1991 ; Smiley, 2009). Néanmoins, des études récentes basées sur la quantification moléculaire du champignon dans les sols et des tests biologiques sols ont montré que ces méthodes sont potentiellement efficaces pour prédire le risque piétin-échaudage d'une parcelle (Herdina et Roget, 2000 ; Bithell *et al.*, 2012).

Prédire le risque nécessite également de pouvoir préconiser les espèces et variétés les plus optimum pour diminuer la sévérité de la maladie. Connaître la résistance des variétés est donc importante mais un autre critère est potentiellement aussi important pour le piétin-échaudage : le « Take-All inoculum Build-up », abrégé TAB (McMillan *et al.*, 2011). Ce trait décrit la capacité d'une variété ou d'une espèce à accumuler

de l'inoculum dans le sol au cours de sa culture. En Angleterre, McMillan *et al.* (2011) ont montré des différences dans la capacité des variétés élites anglaises de blé à constituer de l'inoculum pour la culture suivante. Ainsi, connaître les variétés et les espèces les moins accumulatrices en inoculum permettraient de les préconiser en première céréale afin de réduire le risque pour la céréale suivante (McMillan *et al.*, 2011).

Dans ce projet, axé principalement sur de la méthodologie pour travailler la problématique du piétin-échaudage en sélection, nous avons testé différentes méthodes permettant de caractériser les variétés de céréales à paille vis-à-vis du Ggt et de mieux anticiper le risque piétin échaudage en seconde céréale. Ainsi, cette étude s'articule autour de deux axes de recherche. Le premier vise à mettre au point des méthodes permettant de caractériser le potentiel en inoculum d'une parcelle et d'évaluer la variabilité intra-spécifique et inter-spécifique dans la constitution de l'inoculum (« TAB trait »). Le second objectif consiste à mettre au point une méthode efficace pour évaluer les variétés et ainsi potentiellement caractériser la tolérance variétale de différentes variétés de blé tendre, orge et triticale.

2 Matériel et méthode

Dans ce projet, nous avons testé deux outils : (i) un test moléculaire par PCR quantitative (Ophel-Keller *et al.*, 2008 ; Bithell *et al.*, 2012) et (ii) un test biologique sol (décrit pour la première fois par Hornby *et al.*, 1981) potentiellement utiles pour caractériser l'inoculum du sol, la maladie et les essais.

► 1. Mise au point d'une méthode qPCR

Les souches de *G. graminis* var. *tritici* utilisées proviennent de la mycothèque du laboratoire de phytopathologie d'Arvalis-Institut du végétal. Les souches de *G. graminis* var. *avenae* et *G. graminis* var. *graminis* proviennent du Westerdijk Fungal Bio Diversity Institute (anciennement CBS). Les souches sont mises en collection sous forme de plug de mycélium dans des tubes contenant du glycérol à 20 % et de l'huile minérale et conservées respectivement à -20°C et 4°C. La culture des champignons se fait sur un milieu Potato Dextrose Agar (PDA) à 20°C, avec 70 % d'hygrométrie et à l'obscurité.

2.1.1 - Extraction de l'ADN de *G. graminis* var. *tritici*, *G. graminis* var. *avenae*, *G. graminis* var. *graminis*

Une fois que le mycélium a recouvert la totalité du milieu de culture, celui-ci est gratté à l'aide d'une spatule stérile, mis dans un tube eppendorf de 2 mL et placé à -80°C au minimum une nuit. Le mycélium est ensuite lyophilisé grâce au Lyovac GT 2-E de STERIS pendant une durée minimum de 24h. L'échantillon est broyé à l'aide du broyeur MM400 de Retsch® (fréquence 30s⁻¹, durée 40 sec) puis 40 à 50 mg de poudre sont pesés et utilisés pour réaliser l'extraction. L'extraction est réalisée suivant le protocole du DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN optimisé par Arvalis-Institut du végétal. Le dosage de l'ADN ainsi extrait est réalisé par spectrophotométrie grâce au Nanodrop®. La qualité de l'extraction est appréciée grâce à la qualité protéique et nucléique données respectivement par les rapports 260/280 et 260/230.

2.1.2 - Séquençage des souches

Dans le cadre de ce projet trois gènes : internal transcribed spacer (ITS), RNA polymerase II (RPB2) et elongation factor 1-alpha (EF1- α) ont été séquencés. Pour l'amplification des gènes ITS (ITS-1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') et ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')), et RPB2 (RPB2-newF et RPB2-newR, en cours de publication), le programme d'amplification est identique avec une hybridation à 60°C pendant 1 min30 et une élongation à 72°C pendant 1min avec 35 cycles. Le gène EF1- α est amplifié grâce aux amorces GGT-EF1-1567R (5'- ACHGT RCCRATACCACC SATCTT-3') et GGT-EF1-983F (5'- GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3') (Rehner *et al.*, 2005). La seule différence par rapport au programme précédent se situe dans la température d'hybridation (53°C). La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 40 μ L. La quantité d'ADN ajoutée est de 60 ng, le mix est composé de 4 μ L de Q solution, 20 μ L de la solution contenant l'enzyme et de 1 μ L de chaque amorce à une concentration de 10 μ M. Le volume d'eau ultra pure est ajusté à 40 μ L en fonction du volume d'ADN ajouté. Les souches sont séquencées par la société Eurofins Genomics à partir des produits PCR non purifiés (15 μ L). Les séquences ont ensuite été analysées et alignées à l'aide du logiciel Bioedit sequence alignment editor. Le logiciel Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>) a permis de réaliser les arbres phylogénétiques selon la méthode du Neighbor-Joining. Les arbres phylogénétiques incluent comme outgroup *Magnaporthe grisea*, champignon phytopathogène de la famille des *Magnaporthaceae* responsable de la pyriculariose chez le riz (N° accession GenBank RPB2 : XM_003710773 ; EF1- α : XM_003716200 et ITS : KM484882.1, KM484880.1).

2.1.3 - Détection et quantification du champignon *G. graminis* var. *tritici* par PCR en temps réel

L'internalisation de la qPCR spécifique à Ggt est basée sur les travaux de Keenan *et al.* (2015). Le gène cible est le gène EF1- α . La taille de l'amplicon, obtenu grâce aux amorces GgtEFF1 (5'-CCCTGCAAGCTCTTCTCTTAG-3') et GgtEFR1 (5'-GCATGCGAGGTCCCAAAA-3') est de 106 paires de bases (pb). Le système est complété par une sonde Taqman_MGB (5'-[FAM] ACTGCACAGACCATC[MGBEQ]-3').

La souche D12020 a été choisie pour la mise au point de la méthode moléculaire. Une gamme de 4 points (5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng et 0,005 ng), obtenue par des dilutions en cascade est réalisée.

Tous les tests réalisés ont été basés sur les recommandations de la norme Afnor NF V03-110 (procédure de validation intra-laboratoire d'une méthode alternative à partir d'une méthode de référence), du guide COFRAC (Détection des ADN issus d'OGM végétaux) et du The MIQE Guideline (Bustin *et al.*, 2009). Ainsi, différentes expérimentations ont été réalisées pour optimiser la concentration des amorces et sondes, vérifier la spécificité du système, valider la droite de calibration (linéarité, normalité, reproductibilité et répétabilité) et déterminer les limites de détection et quantification. L'ensemble de ces étapes a été publié (Adam *et al.*, 2018, rapport de stage) et n'est pas détaillé dans ce matériel et méthode.

4 - Mise au point de la méthode à partir d'un échantillon de sol

Un des objectifs de la méthode qPCR est de pouvoir l'utiliser sur du sol. Ainsi, dans le cadre de ce projet, nous avons essayé de développer un protocole robuste permettant de quantifier le champignon dans le sol.

Un sol a été prélevé sur l'arboretum du site de l'AgroParisTech de Thiverval-Grignon, zone n'ayant jamais servi à la culture des céréales à pailles et ayant un risque nul en Ggt. Il a été autoclavé, mis à l'étuve à 50°C pendant deux jours, tamisé puis stocké dans un sachet plastique à température ambiante.

La souche de Ggt utilisée pour inoculer la terre est la D112020. Une gamme de six points a été réalisée : 20 -10 - 5 - 2 - 1 - 0,2 mg de mycélium/g de sol. La masse de mycélium a été directement ajoutée dans le tube contenant 5g ou 500mg de sol suivant le kit testé.

Trois kits d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de sol ont été testés : DNeasy PowerMax Soil Kit de Qiagen, FastDNA™ 50 mL Spin Kit for Soil de MP Biomedicals et NucleoSpin® Soil Kit de Macherey-Nagel. Les quantités de sols nécessaires varient d'un kit à l'autre, il faut 5g de sol sec pour les kits Qiagen et MP Biomedicals et 500 mg pour le kit Macherey-Nagel. Les principales différences entre les kits sont la technique de lyse cellulaire mécanique, les tampons utilisés et les colonnes. Le broyage pour le kit Qiagen a été réalisé en vortexant dix minutes à vitesse maximale. Les échantillons pour les kits Macherey-Nagel et MP Biomedicals ont été broyés à l'aide du FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals) avec respectivement des billes en céramique deux fois 40 secondes à 6 m/s et des pierres de grenat une fois 40 secondes à 4 m/s.

Pour essayer d'éliminer la présence d'inhibiteurs dans la solution d'ADN extrait, une filtration sur colonne de PVPP (Poly(VinylPolyPyrrolidone), Fluka Analytical) à 10 % a également été réalisée (protocole Arvalis).

► 2. Mise au point du test biologique

Décrite pour la première fois par Horby *et al.*, 1981, la méthode consiste à semer une variété sensible de blé dans des échantillons de sols suspects en conditions contrôlées et à noter le pourcentage de racines et de plantes présentant des symptômes après 5 semaines de cultures (Slope *et al.*, 1979 ; Gutteridge *et al.* ; 2008 ; McMillan *et al.*, 2011). Afin de valider les conditions du test qui permettent d'observer des symptômes de piétin-échaudage sur une variété rapportrice, différents tests ont été réalisés.

Ils ont consisté à utiliser différentes méthodes d'inoculation et à identifier une variété sensible à partir d'un sol autoclavé :

- Grains d'orge contaminés à différentes concentrations équivalent à 1.5 gramme/m², 3 g/m² et 6 g/m² répartis sur une couche ou homogène dans le pot
- Plugs de mycélium

Les variétés testées ont été Hereward et Boregar en semant graines par pot en trois répétitions

Après le semis, les pots ont été placés dans une serre avec des conditions de 15°C jour et 10°C nuit pendant 5 semaines. Ensuite, les racines ont été soigneusement lavées et notées selon une échelle de 1 à 4 (figure 2).

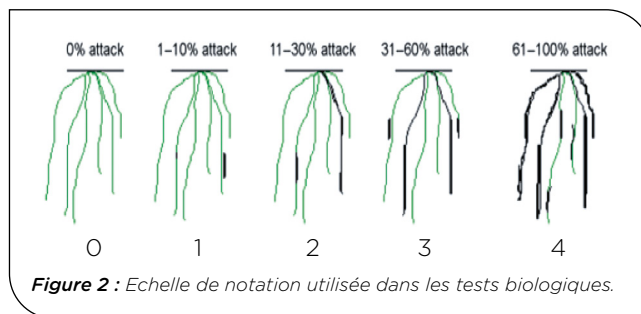


Figure 2 : Echelle de notation utilisée dans les tests biologiques.

► 3. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle au champ

Le LPV maîtrisant déjà la production d'inoculum (Lucas *et al.* 1989), ce dernier a produit des inocula avec la souche D113012, Ggt issu de de la mycothèque d'Arvalis. La souche sélectionnée était un isolat du groupe génétique G2 (caractérisée moléculairement (Daval *et al.*, 2010)), groupe génétique qui contient les isolats les plus agressifs en conditions naturelles (Lebreton *et al.*, 2004, 2007 ; Willocket *et al.*, 2008). En année 1 et 2, 4 essais ont été réalisés chez les différents partenaires (Maule (78), Ecardenville-la-Campagne (27), Louville-la-Chenarde (28) et Allonnes (28)). Dans chacun des essais, 5 variétés de blé tendre ont été choisies (Boregar, Barok, Nemo, Oregrain et Rubisko) grâce aux données préliminaires obtenues dans le réseau Arvalis en extrémasant au maximum les potentielles différences variétales. Sur le site Arvalis d'Ecardenville-la-Campagne, en plus des 5 variétés de blé tendre, 2 variétés d'orge (Etincel et KWS Cassia) et 2 variétés de triticales (RGT Eleac et Kereon) ont également été testées. Toutes ces variétés ont été semées en 6 lignes et 3 répétitions. 3 modalités d'inoculation ont été testées (Tableau 1).

Lieux	Année 1	Année 2
Louville la Chenard (28)	Témoin non-inoculé	Témoin non-inoculé
Allonnes (28)	1,5 g/m ²	3 g/m ²
Maule (78)	3 g/m ²	6 g/m ²
Ecardenville la Campagne (27)		

Tableau 1 : Sites des essais inoculés et modalités testées.

L'inoculation a été réalisée en épandant des grains d'orge inoculés par la souche de Ggt. Des notations des racines ont été réalisées à 3 dates pour 25 plantes par microparcelle (stade tallage, élongation et floraison) et ont permis de calculer le TAI (Take-all index) selon la méthode décrite par Schoeny et Lucas (1999). Cet indice est calculé à partir des notes de la façon suivante :

- 0 : aucune racine atteinte
- 1 : jusqu'à 10 % des racines atteintes
- 2 : 10-30 % de racines atteintes
- 3 : 31-60 % de racines atteintes
- 4 : 61-100 % de racines atteintes

TAI = [(0*N de 0 plantes) + (10*N 1 plantes) + (30*N 2 plantes) + (60*N 3 plantes) + (100*N 4 plantes)] / Nombre total de plantes avec N le nombre de plantes pour chaque indice.

► 4. Mise au point d'une méthode d'évaluation de la sensibilité variétale sans inoculation

En parallèle de la mise au point d'essais inoculés et afin d'augmenter les chances de mettre au point une méthode efficace pour caractériser les variétés, les mêmes variétés de blé tendre ont été semées en 3 répétitions les deux premières années du projet dans quatre parcelles connues pour être à risque. Afin de maximiser les chances d'infection par le Ggt, les semis ont été très précoces et ont eu lieu dans des parcelles ayant reçues un ou plusieurs blés (maximum 3 pour éviter le TAD). De plus, l'inoculum initial (avant semis) et final (après récolte) de chaque parcelle a également été déterminé par un test biologique sol afin de caractériser les sols pour leur potentiel infectieux.

Les notations réalisées sont les mêmes que dans le 2.3 (essais inoculés) et une analyse de rendement a été faite dans les quatre sites.

► 5. Caractérisation des espèces et des variétés pour leur capacité au TAB

McMillan *et al.* (2011) ont montré des différences entre les variétés de blé dans leur capacité à entretenir l'inoculum de piétin-échaudage pour la culture suivante. Ce trait a été évalué pour les cinq variétés de blé tendre semées dans les essais en conditions favorables en 2018 et 2019 (cf. 2.4). Il a également été évalué pour 10 autres génotypes semés dans trois essais variétés d'ARVALIS (Ouzouer le Marché (41), La Jaillière (44) et le Magneraud (17)). En complément, en 2018-2019, un essai avec la variété Boregar a été réalisé en ayant en précédent les différents génotypes testés en 2017/2018 afin de regarder, in situ, l'effet de ces génotypes comme précédent.

Pour caractériser ce trait, des prélèvements de sols ont été réalisés au semis et à la récolte dans l'ensemble des essais en adaptant le protocole de McMillan *et al.* (2011). A l'aide d'une tarière, il a été prélevé du sol sur 10 à 15 cm de profondeur. Ce sol a ensuite été mis dans un gobelet en carton. Le prélèvement a été effectué 6 fois par parcelle élémentaire afin de prendre en compte l'hétérogénéité de l'inoculum dans le sol. Les pots ont ensuite été envoyés au LPV et conservés à 4°C en attendant d'être analysés. L'analyse a consisté à semer 5 graines de la variété Boregar, placer les pots 5 semaines dans la serre puis noter le pourcentage de racines nécrosées (cf. 2.2).

3 Résultats

► 1. Mise au point de la méthode qPCR

3.1.1 - Validation des amorces de Keenan *et al.* (2015)

Le gène EF1- α est le gène cible théorique de la qPCR publiée par Keenan *et al.* 2015. Cependant, les analyses bio-informatiques ont révélé qu'il n'y avait aucune correspondance entre les amorces amplifiant le gène EF1- α de la qPCR publié par Keenan *et al.* (2015) et le génome de référence de Ggt R3-111a-1 (Okagaki *et al.*, 2015). Le BLAST des amorces fait ressortir une multitude d'organismes (*Triticum aestivum*, *Pongo pygmaeus*, *Ovis canadensis canadensis*, *Cyphellophora europaea*, *Bos mutus*, etc.). Un séquençage a été réalisé dans l'optique

de répondre aux interrogations qui résultent de cette découverte et de potentiellement pouvoir dessiner un couple d'amorces spécifique de Ggt. Les différentes souches de Ggt, Gga et Ggg de la collection d'Arvalis ont alors été séquencées pour trois gènes EF1- α , RPB2 et ITS. Le gène ITS est un gène multicopies et le gène RPB2 est un gène monocopie constitutif. Ce sont tous les deux des gènes universels chez les eucaryotes.

Le BLAST de toutes les séquences du gène EF1- α des souches de Ggt de la collection d'Arvalis contre la séquence du gène EF1- α du génome de référence Ggt R3-111a-1 (N° accession GenBank : XM_009226093.1) a mis en évidence 100 % d'identité entre les séquences. Les amorces de Keenan *et al.* ne blastent pas avec nos séquences confirmant les analyses bioinformatiques et suggérant donc une erreur dans la publication. Ce résultat a été confirmé par la suite dans une autre publication (Duran *et al.*, 2018). Aucun polymorphisme intraspécifique n'est observable dans les séquences de Ggt mais le polymorphisme interspécifique (entre les différentes espèces) n'a pas permis de dessiner de nouvelles amorces dans ce gène.

Pour le gène RPB2, l'analyse des séquences des souches de Ggt de la collection d'Arvalis avec le génome de référence Ggt R3-111a-1 a mis en évidence 96 % d'identité entre les séquences et permis de confirmer le statut taxonomique des souches de la collection. Néanmoins, les analyses n'ont pas mis en évidence la possibilité de dessiner des amorces spécifiques de Ggt dans ce gène.

L'analyse de toutes les séquences des souches de Ggt de la collection d'Arvalis contre la séquence du gène ITS du génome de référence Ggt R3-111a-1 a mis en évidence 100 % d'identité entre les séquences et sont donc bien identifiées comme étant du Ggt. Comme pour les autres gènes, le polymorphisme interspécifique n'a pas permis de dessiner d'autres amorces.

3.1.2 - Qualité et fiabilité de la méthode

Malgré les interrogations liées aux amorces de la publication de Keenan *et al.* (2015), nous avons effectué les différents tests pour valider la qPCR dans l'optique de pouvoir l'utiliser avec des échantillons de sols et de racines.

Afin de déterminer la concentration en amorces optimale pour la réaction qPCR, différentes concentrations ont été testées en combinaison (150, 300 et 600 nM) en SYBR green pour la détection des amplicons. Tous les résultats obtenus présentent une efficacité supérieure à 90 % et un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 sauf pour la combinaison 600nM d'amorces forward et 150nM d'amorces reverse qui a un r^2 de 0,98. Les pentes sont comprises entre -3,34 et -3,5. Les conditions avec les meilleurs critères sont une concentration de 300 nM pour les deux amorces. Une courbe de fusion a été établie. Un seul pic est visible à une température de 79°C. Les amorces ne se replient donc pas sur elles-mêmes pour former des dimères d'amorces et l'ADN quantifié est pur. La gamme dosée avec différentes concentrations en sonde (50, 100, 150, 200 et 250 nM) a permis de valider les paramètres optimaux pour les concentrations 100nM et 150nM avec respectivement 93,2 % et 90 % pour l'efficacité, 0,998 et 0,997 pour le r^2 et -3,497 et -3,593 pour la pente. La concentration 100nM est choisie pour une raison de réduction des coûts.

La spécificité du système sonde/amorces a été vérifiée par la quantification de 7 souches de Ggt et de 10 souches d'autres espèces fongiques, présentes au niveau des racines et/ou bas de tige des céréales. Malgré le fait que le gène cible n'est pas connu, la qPCR est bien spécifique à Ggt. Les souches de Ggt sortent à des Ct allant de 23,07 à 26,08 pour le deuxième point de gamme (0,5 ng d'ADN). Les efficacités sont supérieures à 90 % et les r^2 à 0,99.

Tous les critères nécessaires à la validation de la méthode sur champignon pur ont été validés (Adam *et al.*, 2018 ; Valade *et al.*, 2019).

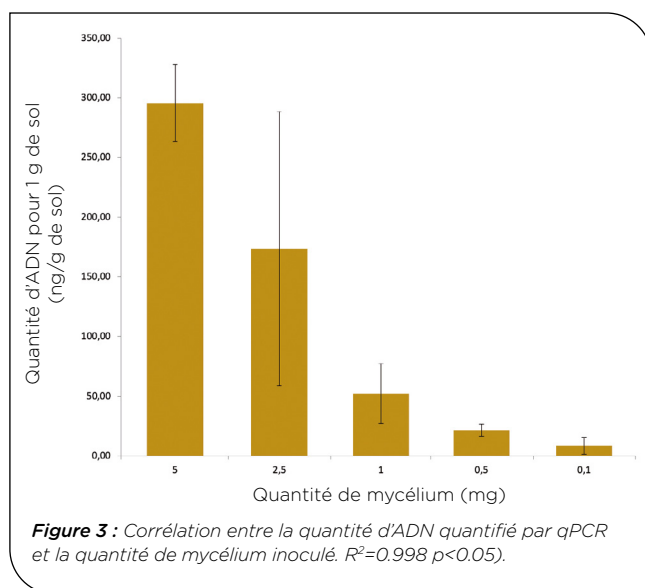
3.1.3 - Mise au point du protocole d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon de sol

Trois kits d'extraction d'ADN à partir de sol ont été testés afin de déterminer lequel fournit les meilleurs résultats en termes de quantité, qualité (faible présence d'inhibiteurs) et de reproductibilité de l'ADN extrait pour les analyses moléculaires.

Pour cela une gamme étalon a été évaluée (10 - 5 - 2 - 1 - 0,2 mg de mycélium/g de sol) et différentes optimisations ont été effectuées (non détaillé dans cet article).

Pour le kit Qiagen et MP Biomedicals, aucun point de la gamme n'a été détecté ou des problèmes de reproductibilité et sensibilité ont été observés.

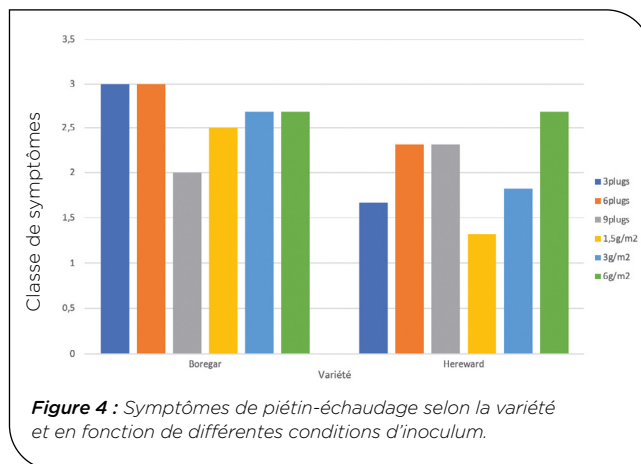
Le kit NucleoSpin® Soil Kit de Macherey-Nagel est le kit d'extraction d'ADN de sol qui a fourni les meilleurs résultats. Avec l'optimisation du protocole, la quantité d'ADN extrait par gramme de sol a été déterminée (figure 3). Les résultats présentent une bonne corrélation ($r^2 = 0,988$), la quantité d'ADN détectée dans le sol diminue de façon logique avec la quantité de mycélium inoculée. Ces résultats montrent qu'il est potentiellement possible de quantifier efficacement le champignon dans le sol avec la méthode mise au point.



La méthode a ensuite été testée sur des racines symptomatiques et différents sols prélevés au cours du projet. Les résultats n'ont pas été concluants et ne sont pas présentés dans cet article.

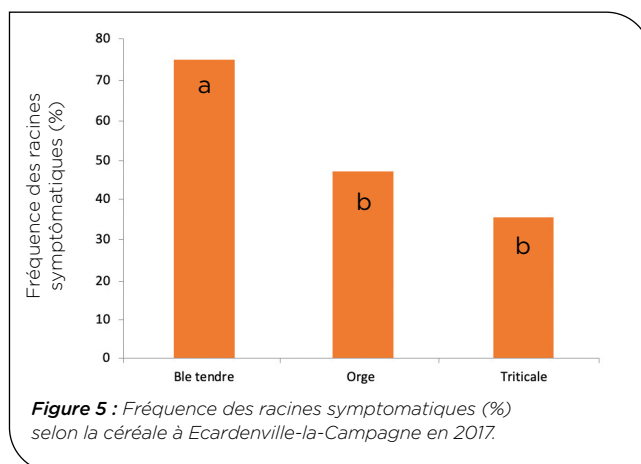
► 2. Mise au point d'un test biologique sol

Toutes les conditions testées (plugs, grains contaminés broyés à des concentrations différentes) ont permis d'observer des symptômes sur les racines (figure 4) à des niveaux significatifs. Ce résultat a permis de valider le test biologique dans nos conditions contrôlées. Les résultats ont également mis en évidence une sensibilité plus forte de la variété Boregar par rapport à la variété Hereward que nous avons donc choisi comme variété témoin pour les tests biologiques réalisés dans le projet.



► 3. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle au champ

Lors de la première année, des symptômes ont pu être observés dans 3 sites sur les 4 inoculés. Seul le site d'Allonnes (28) n'a pas pu être exploité car peu de symptômes ont été observés probablement à cause des conditions pédo-climatiques peu favorables à la maladie. Dans les 3 sites présentant des symptômes de piétin-échaudage, des différences significatives ont été observées entre le témoin non inoculé et les modalités inoculées. La pression a été la plus forte dans le site d'Ecardenville. Il est intéressant de noter que ce site était en précédent orge à la différence des deux autres sites dont le précédent n'était pas une céréale. D'ailleurs, c'est le seul site où des symptômes significatifs ont été observés dans les modalités non inoculées. Dans ce site, les analyses ont permis de mettre en évidence un effet significatif de l'espèce hôte avec le blé tendre plus sensible que l'orge et le triticale sur les notations racinaires à floraison (figure 5 ; $p<0,05$).



Dans cet essai, au sein des quatre géotypes de blé tendre, des différences significatives ont été observées pour la fréquence de la maladie sur les racines à floraison (Tableau 2).

Variété	Moyenne ajustée	Groupe Homogène (5%)
BOREGAR	83.33	a.
NEMO	80.56	a.
BAROK	75.56	ab
RUBISKO	73.89	ab
OREGRAIN	58.72	.b

Tableau 2 : Classement variétal selon la fréquence de la maladie sur racines (à floraison) à Ecardenville (27) en 2017.

Dans le site de Louville-la-Chenard (28), il n'a pas été observé de différences significatives entre la modalité inoculée à 1.5 g/m² et la modalité inoculée à 3 g/m² pour les différentes notations (fréquence, intensité et TAI). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les 4 géotypes de blé testés. Dans le site de Maule (78) où la pression a été un peu plus faible, les résultats sont identiques.

Cette première année d'essais a permis de montrer qu'il était possible d'inoculer des essais avec du piétin-échaudage afin d'étudier la sensibilité de l'hôte vis-à-vis de cette maladie.

Lors de la seconde année (2017-2018), les essais ont été reconduits dans les mêmes sites en modifiant la modalité 1.5 g/m² en 6 g/m² afin de définir le taux d'inoculum le plus pertinent pour différencier la sensibilité variétale et minimiser les interactions GxE. L'essai réalisé à Maule (78) a été peu informatif à cause d'une pression trop faible dans l'essai ne permettant pas de différencier les modalités et les géotypes.

Dans les trois autres essais, la pression maladie a été significative avec des résultats semblables à ceux obtenus l'année précédente. En effet, l'analyse statistique de l'essai d'Ecardenville (27) conduit en précédent blé n'a pas montré de différences significatives entre les modalités inoculées mais a permis de confirmer des différences de sensibilité des espèces de céréales et des différences entre géotypes (figure 6).

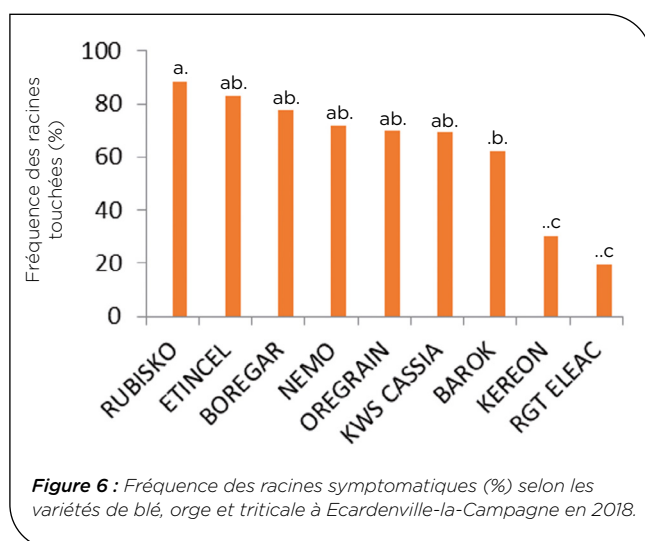


Figure 6 : Fréquence des racines symptomatiques (%) selon les variétés de blé, orge et triticales à Ecardenville-la-Campagne en 2018.

Le triticales est l'espèce la moins sensible comme en 2017 alors que l'orge est dans le même groupe de significativité que le blé en 2018. Le classement des variétés de blé tendre est différent de l'année précédente. Ce résultat confirme la difficulté d'avoir des résultats consistants entre les sites et les années pour le critère de sensibilité au piétin-échaudage même si des tendances semblent se détacher comme une plus forte sensibilité de Boregar à l'inverse d'Oregrain. Cette difficulté à différencier les variétés est probablement liée à des interactions GxE fortes, à la difficulté des notations et à l'absence de résistance directe dans le matériel.

Dans les deux autres essais (Allonnes et Louville-la-Chenard), l'inoculation a permis d'avoir une pression significativement différente entre les modalités inoculées et non inoculées. La pression a été plus forte avec la modalité 6 g/m² dans l'essai d'Allonnes alors qu'il n'y a pas de différence dans l'essai de Louville-la-Chenard. Pour ces deux essais, malgré des tendances proches de celles de l'essai précédent, il n'y a pas de différence significative entre les variétés sur la fréquence ou le TAI à floraison.

Pour conclure, lors des deux années, nous avons pu mettre en évidence l'intérêt d'apporter de l'inoculum de Ggt au semis afin d'observer la maladie à des pressions significatives sur différents géotypes. Un inoculum de 3 g/m² est suffisant pour obtenir une bonne pression maladie dans la majorité des cas. Avec cette méthodologie, nous avons pu confirmer la différence de sensibilité au piétin-échaudage entre les espèces de céréales avec le blé ≥ orge ≥ triticales. Par contre, malgré des différences observées entre géotypes de blé et certaines tendances, les analyses statistiques ne mettent pas en évidence de fortes différences qui sont probablement liées à des effets environnements forts. Ces essais ont également permis de rappeler qu'il est important de noter les racines et non seulement les épis blancs pour qualifier la pression piétin-échaudage d'un essai.

► 4. Mise au point d'une méthode d'évaluation de la sensibilité variétale en conditions favorables au développement de la maladie

Lors des deux premières années du projet, sept essais sur les huit prévus ont été réalisés selon le protocole prévu. En année 1, comme pour les essais inoculés, très peu de symptômes ont été observés sur le site d'Allonnes (28) rendant l'essai inexploitable probablement à cause des conditions climatiques de l'année. Dans l'essai de Maule (78), avec une pression moyenne, aucune différence significative n'a été observée entre les géotypes même si, en tendance, les résultats obtenus pour la fréquence, l'intensité et l'indice TAI classent Boregar et Nemo comme des variétés plus sensibles qu'Oregrain. De plus, l'écart de rendement entre les parcelles traitées au Latitude (traitement de semences fongicide pour lutter contre le piétin-échaudage) et non traitées n'est pas significatif suggérant que la pression n'a pas été assez forte.

L'essai réalisé « en conditions favorables » en Bretagne a permis d'obtenir une forte pression de la maladie dans l'ensemble du dispositif. Une forte corrélation significative a été observée entre la perte de rendements et les notations racinaires (figure 7). Dans ce dispositif, les variétés Boregar et Nemo ressortent comme les plus sensibles comme dans les essais inoculés. De plus, 2 variétés de triticales semées dans le dispositif

ont permis de confirmer la moindre sensibilité de cette céréale observée dans les essais contaminés.

En 2017/2018, les quatre essais ont permis d'observer des symptômes avec des niveaux de pression très variables entre les essais. Les résultats sont sensiblement identiques aux résultats précédents avec des différences entre géotypes qui ne sont pas significatives dans tous les essais rendant difficile l'exploitation des données.

Pour conclure, en réalisant des essais en conditions favorables au piétin-échaudage c'est-à-dire en semant précocement avec un précédent blé, la maladie peut s'exprimer. Par contre, la pression est très variable selon les conditions pédoclimatiques ce qui rend difficile la caractérisation des variétés.

► 5. Caractérisation de la sensibilité variétale

Afin d'essayer de caractériser un plus grand nombre de variétés, nous avons mis en place des essais avec les deux protocoles développés précédemment (inoculation à 3 g/m² et conditions favorables).

Sur les 3 essais inoculés, l'essai de Louville-la-Chenard a permis d'avoir une pression suffisante pour noter les variétés pour leur sensibilité au piétin-échaudage. Malgré des différences observables entre les variétés, les analyses statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence des différences de sensibilité variétale à cause notamment d'un effet bloc significatif et donc d'une hétérogénéité importante dans l'essai (figure 8).

Dans les deux essais réalisés en conditions favorables au développement du piétin-échaudage, une pression significative a été observée.

Pour les différentes notations réalisées, il n'y a pas de différence significative entre les variétés de blé testées dans l'essai réalisé à Maule (figure 9).

Dans ce même essai, 10 variétés d'orge ont été caractérisées pour un résultat similaire c'est-à-dire une absence d'effet géotype. Par contre, l'effet hôte est significatif avec une faible sensibilité de l'orge vis-à-vis de cette maladie.

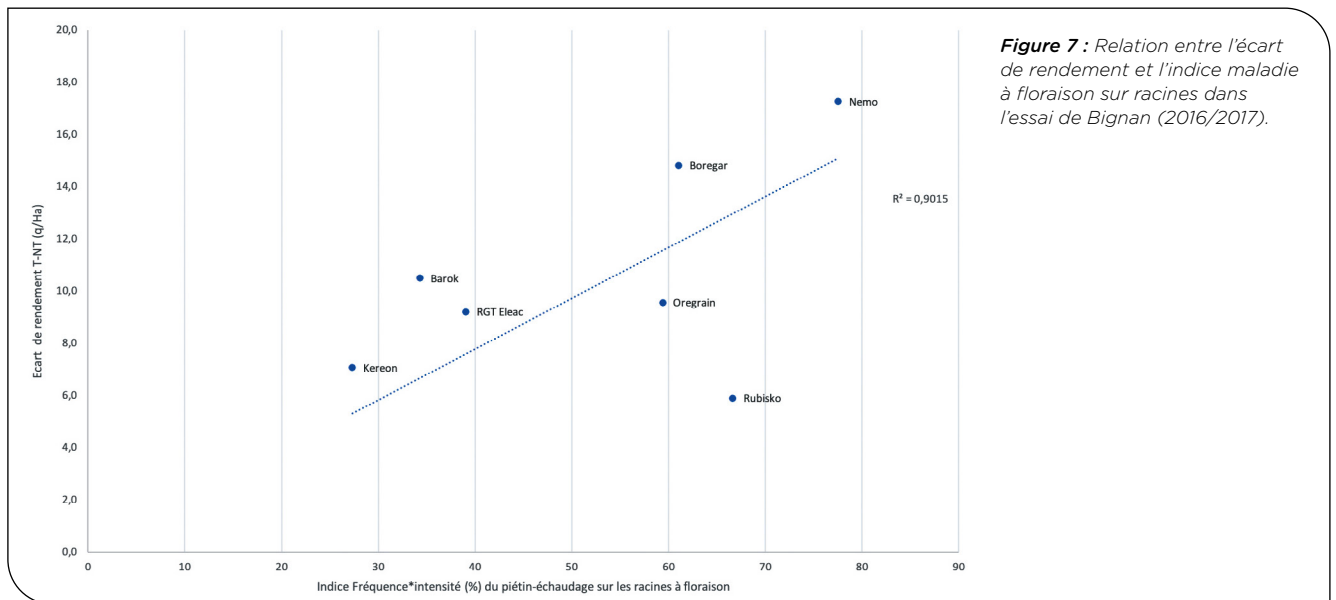


Figure 7 : Relation entre l'écart de rendement et l'indice maladie à floraison sur racines dans l'essai de Bignan (2016/2017).

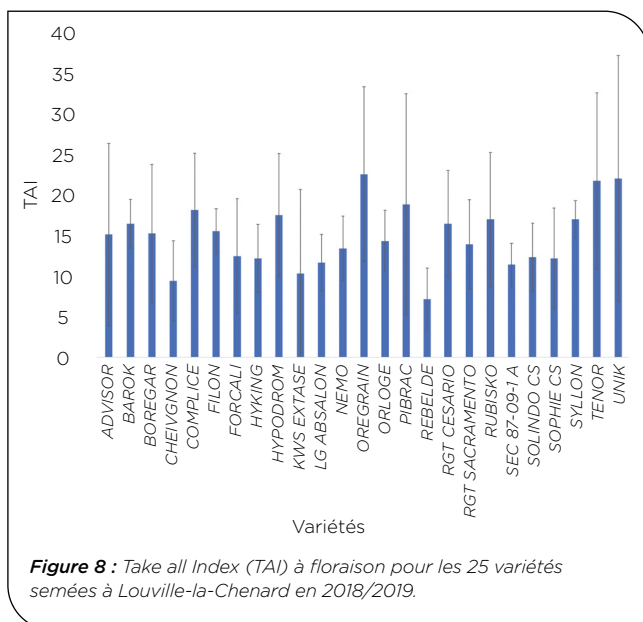


Figure 8 : Take all Index (TAI) à floraison pour les 25 variétés semées à Louville-la-Chenard en 2018/2019.

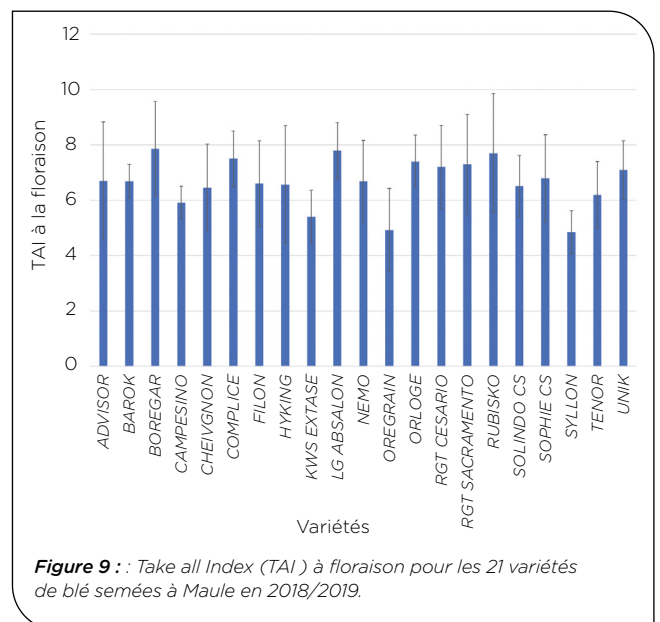


Figure 9 : Take all Index (TAI) à floraison pour les 21 variétés de blé semées à Maule en 2018/2019.

Les mêmes résultats ont été obtenus dans l'essai réalisé à Bignan en Bretagne avec une pression très forte de la maladie (plus de 80 % en intensité sur les racines à floraison). Cette très/trop forte pression a minimisé les possibles différences variétales et confirme l'absence de résistance même partielle vis-à-vis du piétin-échaudage.

Par contre, des différences significatives ont été observées pour les variétés d'orge testées (figure 10).

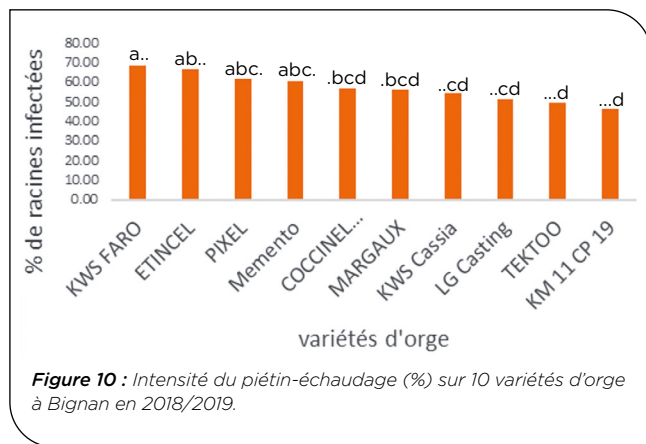


Figure 10 : Intensité du piétin-échaudage (%) sur 10 variétés d'orge à Bignan en 2018/2019.

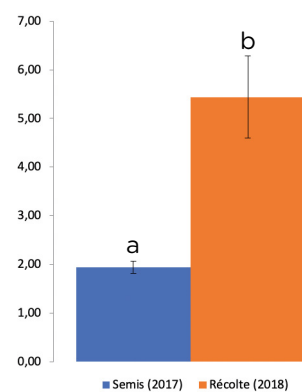
Néanmoins, avec un seul essai et une seule année, il est difficile d'affirmer avec certitude que ces différences sont le reflet de la sensibilité variétale de l'orge au piétin-échaudage.

► 6. Caractérisation des espèces et des variétés pour leur capacité au TAB

Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié la capacité des variétés à modifier l'inoculum présent dans le sol.

Au total, 4132 prélèvements de sols ont été analysés avec le test biologique en conditions contrôlées. Dans l'ensemble des analyses, nous avons pu observer une augmentation significative de l'inoculum de piétin-échaudage entre le semis et la récolte traduit par un pourcentage de racines nécrosées plus important sur la variété Boregar avec les sols prélevés au moment de la récolte (figure 11).

Figure 11 : Pourcentage de nécroses racinaires observées sur la variété témoin Boregar selon la date de prélèvements du sol (tous sites et variétés confondus) avec significativité ($p < 0.05$).



Ce résultat est cohérent avec la biologie de la maladie avec le champignon qui s'accumule dans les racines puis dans le sol avec la dégradation des racines. Ce résultat observé, dans chaque essai pris individuellement, permet aussi de valider, avec un grand nombre de données, l'intérêt du test biologique sol pour potentiellement caractériser l'inoculum du sol.

Par contre, ce test n'a pas permis d'identifier une relation significative très forte entre l'inoculum primaire au semis et les notations racinaires effectuées à floraison dans les différents essais. Ce résultat s'explique par le fait que le développement de la maladie et son incidence sur le rendement, va dépendre des autres composantes abiotiques (pH, composition physicochimique, humidité) et biotiques (microbiote ou ensemble des microorganismes) du sol. Comme pour toute maladie, le climat et les pratiques culturales modifient cet environnement et interfèrent sur la dynamique épidémique. La capacité d'un sol infesté à engendrer de la maladie ou potentiel infectieux du sol dépend donc à la fois de la quantité d'inoculum et des autres paramètres du sol. Dans notre cas, il semblerait que les autres facteurs ont un impact plus fort que seule la présence de l'inoculum primaire.

Dans l'ensemble des analyses réalisées, nous n'avons pas réussi à identifier un effet significatif de la variété pour l'accumulation de l'inoculum à la récolte dans l'analyse globale avec le test biologique même si des différences entre variétés sont observées (figure 12).

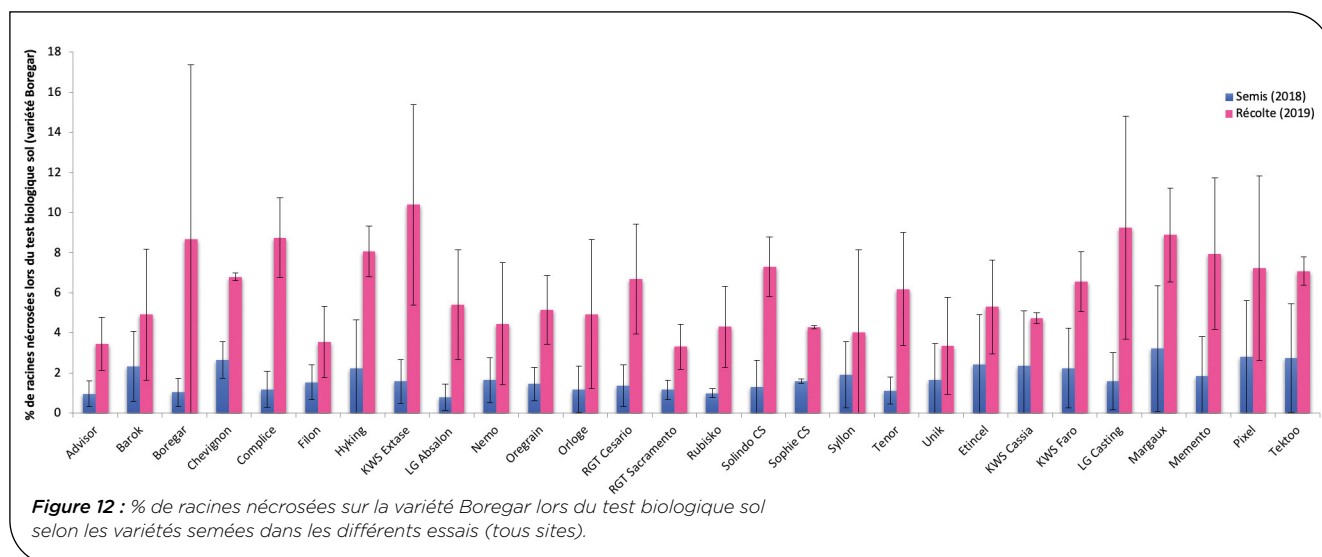


Figure 12 : % de racines nécrosées sur la variété Boregar lors du test biologique sol selon les variétés semées dans les différents essais (tous sites).

En effet, l'effet site, qui est significatif dans nos conditions, influence fortement ce trait, ce qui a été confirmé dans une étude récente (Mc Millan *et al.*, 2018).

Il est intéressant de noter que nous n'avons pas observé non plus de différences entre l'orge et le blé pour ce trait. Ainsi, à la différence de la sensibilité d'hôte qui est plus faible pour l'orge, cette espèce contribuerait autant que le blé à entretenir l'inoculum du sol. En termes de lutte prophylactique, ce résultat confirme que des rotations chargées en céréales à paille et pas seulement en blé sont des facteurs de risque important dans la présence de la maladie et permet de comprendre aussi la fréquence importante du piétin-échaudage observée dans des régions avec des rotations du type Maïs/blé/orge ou colza/blé/orge.

Pour finir, ce trait a également été étudié, in situ, à Ouzouer le Marché avec des variétés de blé dur et de blé tendre. Ainsi, différentes variétés ont été semées en 2017 et récoltées en 2018. Ensuite, la variété Boregar a été implantée sur l'ensemble du dispositif en repérant par RTK les variétés précédentes.

Tout d'abord, le test biologique réalisé pour ce seul site montre une augmentation significative de l'inoculum du sol au cours des deux campagnes entre le semis 2017 et la récolte 2019 (figure 13). Ainsi, on constate que le pourcentage des racines infectées (sur la variété rapportrice) au semis 2017 est très faible avec un taux de 1.01%. A la récolte 2018, on obtient une moyenne de 8.04% de racines contaminées, ce qui indique que la charge en inoculum a augmenté au cours de la saison culturale. Ce résultat est en concordance avec tous les autres résultats obtenus. Enfin, le pourcentage moyen des racines infectées à la récolte 2019 est significativement supérieur avec une moyenne de 19.13% ce qui confirme l'accumulation de l'inoculum dans le sol avec la charge en céréales. Comme pour l'orge, le blé dur ne semble pas différent du blé tendre pour le caractère TAB.

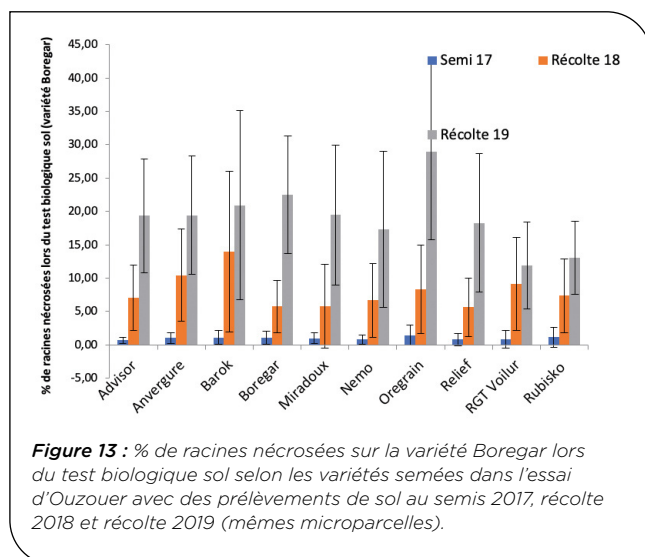


Figure 13 : % de racines nécrosées sur la variété Boregar lors du test biologique sol selon les variétés semées dans l'essai d'Ouzouer avec des prélèvements de sol au semis 2017, récolte 2018 et récolte 2019 (mêmes microparcelles).

Un effet rendement de la variété Boregar (récolte 2019) est observé selon la variété cultivée en précédent (récolte 2018) (figure 14). Cet effet n'est pas observé en prenant en compte individuellement les notations racinaires ou le pourcentage d'épis blancs même si le rendement est corrélé avec ce pourcentage ($R^2=0.8145$, $p<0.05$).

Par contre, le classement variétal lié au rendement est expliqué à plus de 80 % par le pourcentage d'épis blancs et 40 % pour le pourcentage de racines nécrosées.

L'ensemble de ces données confirment que certaines variétés sont préférables en 1^{ère} paille car elles minimisent la perte de rendements de la culture suivante. Cependant, nous n'avons pas réussi à relier directement cet effet au TAB avec le test biologique. Même si ce trait doit probablement jouer un rôle, d'autres mécanismes en jeu restent à identifier comme la modification du microbiome du sol et de la rhizosphère.

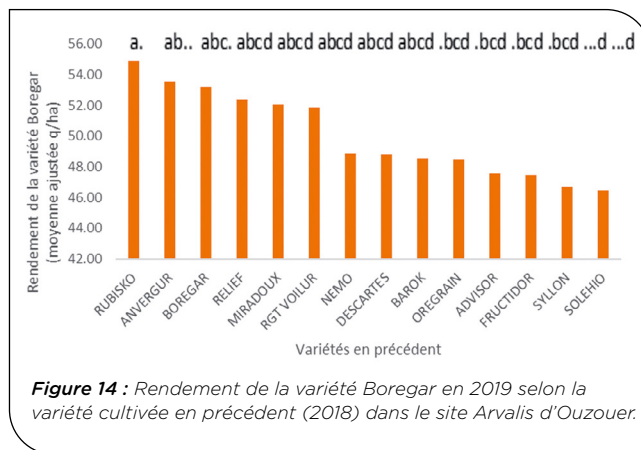


Figure 14 : Rendement de la variété Boregar en 2019 selon la variété cultivée en précédent (2018) dans le site Arvalis d'Ouzouer.

4 Discussion et conclusions

Le projet FSOV TakeNotAll avait pour ambition de développer des méthodes utiles à la sélection pour travailler une maladie racinaire importante des céréales, le piétin-échaudage.

Nous avons pu tester deux méthodes publiées dans la littérature (i) une méthode moléculaire et (ii) un test biologique potentiellement utile pour caractériser l'inoculum du sol ou la pression maladie. Nos résultats ont montré que la méthode qPCR développée par Keenan *et al.* (2015) était difficilement utilisable. En effet, même si elle répond techniquement à notre cahier des charges pour valider une qPCR, le gène cible n'est pas celui indiqué dans la publication. Ce résultat a également été observé par une autre étude réalisée par une autre équipe de recherche (Duran *et al.*, 2018). Le séquençage de plusieurs gènes de différentes espèces de *Gaeumannomyces graminis* n'a pas permis de développer une nouvelle méthode dans le cadre de ce projet. Néanmoins, de nouvelles méthodes qPCR ont été publiées depuis la fin du projet ainsi que de nouvelles séquences. Ainsi, ARVALIS va travailler à évaluer ces méthodes ou en développer une nouvelle pour réussir à quantifier le champignon dans le sol ou les racines notamment pour aider aux notations qui sont compliquées et lourdes. Le test biologique du sol selon la méthode développée par Horby (1981) a été internalisé avec succès. Il a permis de caractériser un très grand nombre de sol dans le cadre de ce projet. Ce test a montré son efficacité pour mettre en évidence l'inoculum présent dans le sol ainsi que son accumulation au cours du temps en utilisant une variété rapportrice comme Boregar. Néanmoins, l'utilisation de ce test reste très fastidieuse et assez peu corrélée à

la pression maladie observée. Ce résultat s'explique par le fait que le développement de la maladie et son incidence sur le rendement, va dépendre des autres composantes abiotiques et biotiques comme le microbiote du sol. Comme pour toute maladie, le climat et les pratiques culturales modifient cet environnement et interfèrent sur la dynamique épidémique. La capacité d'un sol infesté à engendrer de la maladie ou potentiel infectieux du sol dépend donc à la fois de la quantité d'inoculum et des autres paramètres du sol. Dans notre cas, il semblerait que les autres facteurs ont un impact plus fort que seule la présence de l'inoculum primaire. Dans cette optique, des sols ont été conservés afin de pouvoir caractériser notamment le microbiote et potentiellement comprendre pourquoi certains sols semblent plus suppressifs que d'autres.

Ensuite, le projet a permis de mettre au point une méthode d'inoculation du sol afin de pouvoir faire des essais de type pépinières. Grâce à cette méthode, nous pouvons potentiellement étudier la sensibilité variétale de différentes espèces de céréales, de populations recombinantes qui pourraient posséder des gènes de résistance ou étudier d'autres aspects comme l'efficacité des produits de biocontrôle. De même, un protocole a été établi pour réaliser ce type d'essais en conditions favorables qui permet d'avoir une pression maladie sans inoculation même si elle n'est pas maîtrisée. Ce type de protocole est utile pour étudier différents traits comme des solutions de biocontrôle ou l'impact de la fertilisation sur la maladie (Valade *et al.*, 2019). Le projet a également permis de valider les méthodes de notations les plus pertinentes et démontré qu'il est important de noter les racines et pas seulement le pourcentage d'épis blancs.

Concernant la sensibilité variétale, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les variétés testées. Il semblerait, en tendance, que certaines variétés réagissent différemment à la maladie mais cet effet n'est pas robuste entre les années et les sites. Ce résultat est cohérent avec des études précédentes qui n'ont jamais réussi à démontrer une résistance même

partielle dans le blé tendre. Ainsi, il est possible que des mécanismes encore inconnus, très liés aux conditions pédo-climatiques, permettent à des variétés de plus ou moins bien résister à la maladie. Cette hypothèse expliquerait la forte interaction GxE qui semble exister pour l'interaction entre le piétin-échaudage et le blé.

Enfin, une originalité du projet a été d'essayer de caractériser, pour la première fois en France, le « Take-All inoculum Build-up », TAB, de variétés françaises. En effet, entre l'étude de McMillan *et al.* (2011) et des observations réalisées dans le réseau blé sur blé d'Arvalis, ce trait semblait intéressant à étudier pour gérer le risque piétin-échaudage. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une forte variabilité entre les variétés des différentes céréales. Comme pour la sensibilité variétale, plusieurs facteurs semblent interagir avec l'accumulation de l'inoculum dans le sol et pas seulement l'effet génotype ce qui entraîne de fortes interactions GxE qui rendent difficile la caractérisation de ce trait. Néanmoins, l'essai réalisé à Ouzouer en 2018/2019 a permis de confirmer des observations réalisées dans le réseau blé sur blé c'est-à-dire que certaines variétés s'en sortent mieux que d'autres après un précédent blé. Le dispositif original d'Ouzouer avec l'utilisation d'une seule variété a permis de montrer qu'il y a un effet significatif du génotype en 1^{er} blé sur la céréale suivante. Le déterminisme de cette observation n'est pas encore connu (TAB, modification microbiome sol, structure du sol, architecture racinaires, ...) mais des études seraient utiles pour comprendre le mécanisme et ainsi pouvoir l'utiliser dans la lutte contre le piétin-échaudage.

Remerciements

Nous remercions l'ensemble des collaborateurs qui ont participé à ce projet. Nous remercions sincèrement Alain SARNIGUET (DR INRAE IRHS) pour sa participation aux différents comités de pilotage et son expertise précieuse tout au long du projet. Enfin, nous remercions vivement le FSOV et son comité d'engagement pour le financement du projet TAKENOTALL.

Références bibliographiques

- Bithell SI, Butler Rc, Harrow S, Mckay A, Cromey Mg**, 2011. Susceptibility to take-all of cereal and grass species, and their effects on pathogen inoculum. *Annals of Applied Biology* 159, 252-66.
- Bithell SI, Mckay A, Butler Rc**, 2012. Predicting Take-All Severity in Second-Year Wheat Using Soil DNA Concentrations of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* Determined with qPCR. *Plant Disease* 96, 443-51.
- Cook Rj**, 1994. Problems and Progress in the Biological Control of Wheat Take-All. *Plant Pathology* 43, 429-37.
- Cook Rj**, 2003. Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 73-86.
- Cook Rj, Thomashow Ls, Weller Dm, et al.**, 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4197-201.
- Daval S, Lebreton L, Gazengel K, Guillerm-Erckelboudt Ay, Sarniguët A**, 2010. Genetic evidence for differentiation of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* into two major groups. *Plant Pathology* 59, 165-78.
- Duran p, Tortella G, Viscardi S, Barra PJ, Carrion VJ, de la Luz Mora M, Pozo MJ**, 2018. Microbial community composition in take-all suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 9:2198.
- Freeman J, Ward E**, 2004. *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology* 5, 235-52.
- Gutteridge Rj, Treskic S, Hammond-Kosack Ke**, 2008. Assessing take-all risk in second wheats using the Predicta B test. *HGCA Project Report*, 24 pp.
- Herdina, Roget Dk**, 2000. Prediction of take-all disease risk in field soils using a rapid and quantitative DNA soil assay. *Plant and Soil* 227, 87-98.

Hernandez-Restrepo M, Groenewald JZ, Elliott ML, Canning G, McMillan VE, Crous PW, 2016. Take-all or nothing. *Studies in Mycology* 83, 19-48.

Hornby D, 1983. Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology* 21, 65-85.

Hornby D, 1998, Bateman GL, Gutteridge RJ et al., 1998. Take-all Disease of cereals: a regional perspective. Wallingford, UK: CAB international.

Lebreton L, Gosme M, Lucas P, Guillerme-Erckelboudt a-Y, Sarniguet A, 2007. Linear relationship between *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Ggt) genotypic frequencies and disease severity on wheat roots in the field. *Environmental Microbiology* 9, 492-9.

McMillan Ve, Hammond-Kosack Ke, Gutteridge Rj, 2011. Evidence that wheat cultivars differ in their ability to build up inoculum of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, under a first wheat crop. *Plant Pathology* 60, 200-6.

Ophel-Keller K, Mckay A, Hartley D, Herdina, Curran J, 2008. Development of a routine DNA-based testing service for soilborne diseases in Australia. *Australasian Plant Pathology* 37, 243-53.

Roget Dk, Rovira Ad, 1991. The relationship between incidence of infection by the take-all fungus (*gaeumannomyces-graminis var. tritici*) rainfall and yield of wheat in south-Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31, 509-13.

Roget Dk, 2001. Prediction modelling of soilborne plant diseases. *Australasian Plant Pathology* 30, 85-9.

Scott PR, 1981. Variation in host susceptibility. In: Asher MJC, Shipton PJ, eds. *Biology and control of take-all*. London, UK: Academic press, 219-36.

Slope DB, Cox J, 1964. Continuous wheat growing and the decline of take-all. In: Rothamstead experimental station report for 1963. Bungay, UK: Richard Clay and Co., Ltd, 108.

Slope Db, Prew Rd, Gutteridge Rj, Etheridge J, 1979. Take-All, *gaeumannomyces-graminis var. tritici*, and yield of wheat grown after ley and arable notations in relation to the occurrence of *Phialophora-radicicola var.graminicola*. *Journal of Agricultural Science* 93, 377-89.

Smiley Rw, 2009. Water and Temperature Parameters Associated with Winter Wheat Diseases Caused by Soilborne Pathogens. *Plant Disease* 93, 73-80.

Valade R, Masson E, Sarniguet A, 2019. Dossier piétin-échaudage. *Perspectives agricoles*, N°463.

Wallwork H, 1989. Screening for resistance to take-all in wheat, triticale and wheat-triticale hybrid lines. *Euphytica* 40, 103-9.

Weller Dm, Raaijmakers Jm, Gardener Bbm, Thomashow Ls, 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40, 309.

Werker Ar, Gilligan Ca, 1990. Analysis of the effects of selected agronomic factors on the dynamics of the take-all disease of wheat in fields plots. *Plant Pathology* 39, 161-77.

Willoquet L, Lebreton L, Sarniguet A, Lucas P, 2008. Quantification of within-season focal spread of wheat take-all in relation to pathogen genotype and host spatial distribution. *Plant Pathology* 57, 906-15.

TakeNOTAIL : Caractérisation de la résistance variétale des céréales à paille au Piétin-Échaudage et prédiction du risque

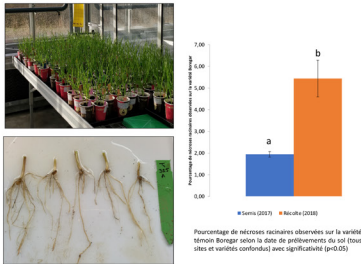
Romain VALADE^{1*}, Cloé ADAM¹, Oriane BAUDOUIN¹, Philippe DU CHEYRON¹, Eric MASSON¹, Agnès TREGUIER¹, Quentin CROULLEBOIS², Laure DUCHALAIS³, Benoît FOUCAULT⁴, Cindy VITRY¹

1 - ARVALIS- Institut du Végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 PARIS
 2 - SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule
 3 - RAGT 2N, Route Epincy, 28150 Louville-la-Chenard
 4 - KWS MOMONT, 1 rue Maurice Violette, 28150 Allonnes
 *Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@arvalis.fr



Le piétin-échaudage (Take-all), causé par le champignon tellurique *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), est la maladie racinaire du blé causant les plus importantes pertes économiques en France et dans le monde entier. Le blé et l'orge sont les espèces les plus sensibles alors que la sensibilité est très variable pour le triticale et faible pour le seigle. Au sein de ces espèces, peu de différences variétales ont été observées dans les études menées dans les années 1990. Néanmoins, des données obtenues dans le réseau d'Arvalis et des études récentes suggèrent une possible différence variétale dans la résistance au piétin-échaudage. Or, il est très difficile d'évaluer les variétés pour cette caractéristique. Dans ce projet, axé principalement sur de la méthodologie pour travailler la problématique du piétin-échaudage en sélection, nous avons mis au point différentes méthodes permettant de caractériser les variétés de céréales à paille vis-à-vis du Ggt.

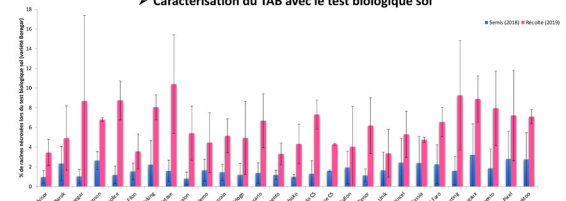
Mise au point d'un test biologique et caractérisation de l'inoculum du sol



Caractérisation des espèces et des variétés pour leur capacité au TAB

« Take-All inoculum Build-up » → Ce trait décrit la capacité d'une variété ou d'une espèce à accumuler de l'inoculum dans le sol au cours de sa culture. Ainsi, connaître les variétés et les espèces les moins accumulatrices en inoculum permettrait de les préconiser en première céréale afin de réduire le risque pour la céréale suivante.

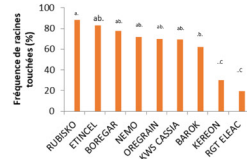
Caractérisation du TAB avec le test biologique sol



Caractérisation de la sensibilité des espèces et variétés au piétin-échaudage

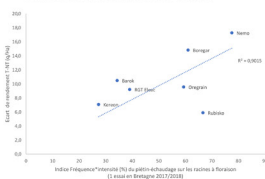
Mise au point d'une méthode d'inoculation aux champs

Site	Année 1	Année 2
Louville la Chenard (28)	Témoin non inoculé	Témoin non inoculé
Allonnes (22)	3,5g/m ²	3g/m ²
Maulé (78)	3g/m ²	3g/m ²
Écandeville la Campagne (22)		



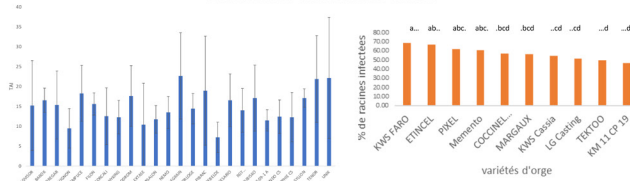
Mise au point d'une méthode en conditions favorables

- 7 essais en 2 ans
- Précédent blé
- Semis précoce
- Notations
- Rendement avec et sans traitement fongicide



- Inoculation possible avec 3g/m² (grains d'orge inoculés) pour obtenir une pression homogène de la maladie → Peut permettre de faire des essais type « pépinière »
- Protocole validé pour des essais en conditions favorables au piétin-échaudage: semis précoces avec précédent blé. Par contre, la pression est très variable selon les conditions pédo-climatiques ce qui rend difficile la caractérisation des variétés.
- Confirmation de la différence de sensibilité au piétin-échaudage entre les espèces de céréales avec le blé ≥ orge ≥ triticale avec les deux types d'essais.

Caractérisation de la sensibilité variétale

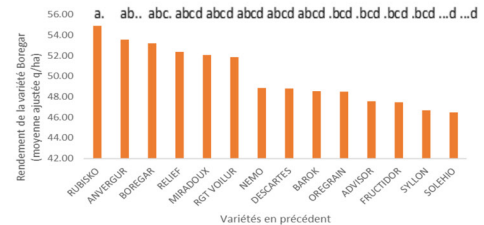


- Des différences observées entre génotypes de blé avec des tendances entre essais mais les analyses statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives → Fortes interactions GxÉ
- Des différences significatives observées entre génotypes d'orge mais dans 1 site et 1 année

- Plus de 4000 prélèvements de sols ont été analysés avec le test biologique en conditions contrôlées (2 années, 9 essais)
- Augmentation significative de l'inoculum de piétin-échaudage entre le semis et la récolte traduit par un pourcentage de racines nécrosées plus important sur la variété Boregar.
- Pas d'effet de l'espèce (blé tendre ou orge) sur l'accumulation de l'inoculum dans le sol
- Pas d'effet significatif de la variété même si des différences entre variétés sont observées → fort effet site qui influence fortement ce trait

Caractérisation du TAB in situ

- 10 variétés semées en 2017/2018 dans un site (Ouzouer le Marché (28))
- Semis de la variété Boregar en 2018/2019 sur les mêmes micro-parcelles référencées avec la variété précédente
- Notations de la maladie et mesures du rendement de Boregar



- Un effet rendement de la variété Boregar (récolte 2019) est observé selon la variété cultivée en précédent (récolte 2018).
- Le classement variétal lié au rendement est expliqué à plus de 80% par le pourcentage d'épis blancs et 40% pour le pourcentage de racines nécrosées.
- Certaines variétés sont préférables en 1^{ère} paille car elles minimisent la perte de rendements de la culture suivante → Pas relié au TAB? Même si ce trait doit probablement jouer un rôle, d'autres mécanismes en jeu restent à identifier comme la modification du microbiome du sol et de la rhizosphère.

Le projet FSOV TAKENOTAL a permis de valider un test biologique qui a montré son efficacité pour mettre en évidence l'inoculum présent dans le sol ainsi que son accumulation au cours du temps en utilisant une variété rapportrice comme Boregar. Néanmoins, l'utilisation de ce test reste très fastidieuse et assez peu corrélée à la pression maladie observée. Ce résultat s'explique par le fait que le développement de la maladie et son incidence sur le rendement, va dépendre des autres composantes abiotiques et biotiques comme le microbiote du sol.

Ensuite, le projet a permis de mettre au point différents protocoles d'essais pour caractériser différents traits de génotypes de céréales vis-à-vis du piétin-échaudage. Grâce à ces méthodes, nous pouvons étudier la sensibilité variétale de différentes espèces de céréales ou étudier d'autres aspects comme l'efficacité des produits de biocontrôle.

Concernant la sensibilité variétale, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les variétés testées. Il semblerait, en tendance, que certaines variétés réagissent différemment à la maladie mais cet effet n'est pas consistant entre les années et les sites. Ce résultat est cohérent avec des études précédentes qui n'ont jamais réussi à démontrer une résistance même partielle dans le blé tendre. Ainsi, il est possible que des mécanismes encore inconnus, très liés aux conditions pédo-climatiques, permettent à des variétés de plus ou moins bien résister à la maladie. Cette hypothèse expliquerait la forte interaction GxÉ qui semble exister pour l'interaction entre le piétin-échaudage et le blé.

Enfin, une originalité du projet a été d'essayer de caractériser, pour la première fois en France, le « Take-All inoculum Build-up », TAB, de variétés françaises. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une forte variabilité entre les variétés des différentes céréales. Comme pour la sensibilité variétale, plusieurs facteurs semblent interagir avec l'accumulation de l'inoculum dans le sol et pas seulement l'effet génotype. Néanmoins, l'essai réalisé à Ouzouer en 2018/2019 a permis de confirmer que certaines variétés s'en sortent mieux que d'autres après un précédent blé. Le déterminisme de cette observation n'est pas encore connu (TAB, modification microbiome sol, structure du sol, architecture racinaires, ...) mais des études seraient utiles pour comprendre le mécanisme et ainsi pouvoir l'utiliser dans la lutte contre le piétin-échaudage.

