



FsoV

JEUDI 8 JANVIER 2015

CONSTITUTION D'UNE MYCOTHÈQUE DES CHAMPIGNONS PATHOGÈNES DU BLÉ TENDRE ET MISE AU POINT D'OUTILS PERMETTANT LA CARACTÉRISATION ET LA QUANTIFICATION DE CES ESPÈCES: MYCOTEK

VALADE Romain



PROBLÉMATIQUE

- Nombreuses maladies sur le blé tendre qui peuvent provoquer des dégâts importants

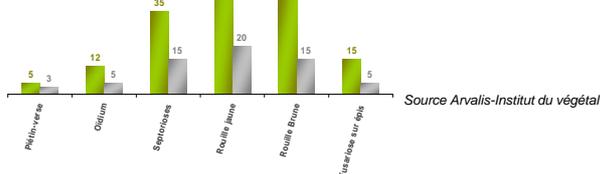
Ecart traité/non-traité en qx/ha

Année forte pression

Année moyenne

Moyenne 2014: 21.7q/ha

Moyenne pluriannuelle: 17q/ha

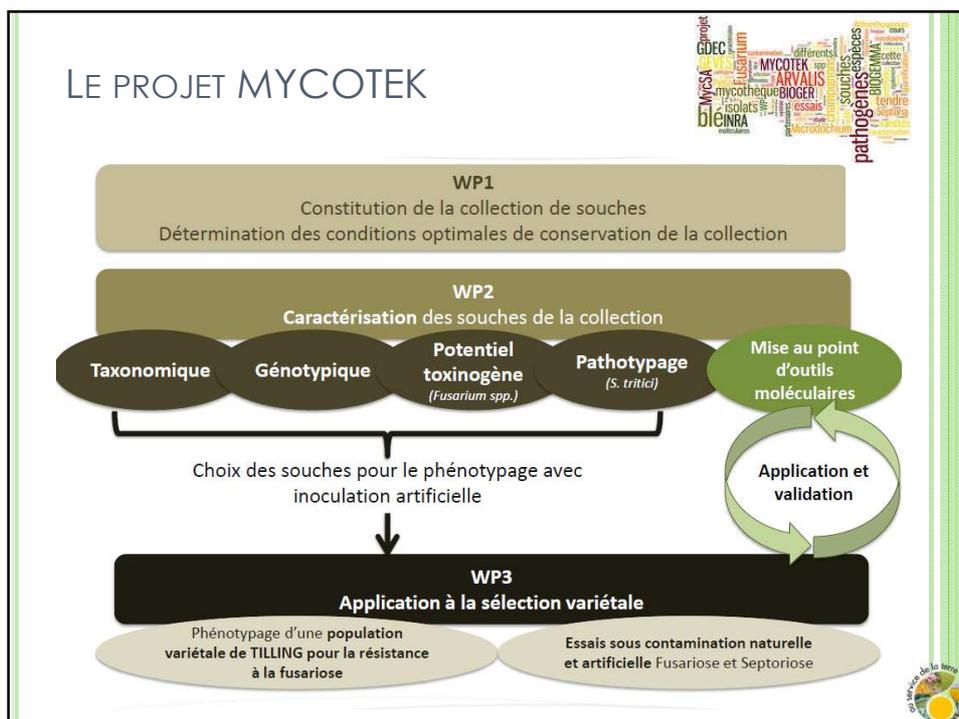


Source Arvalis-Institut du végétal

- Plan ECOPHYTO, résistances aux fongicides, contournement des résistances variétales...

→ Comment caractériser au mieux les variétés de blé tendre vis-à-vis des différents champignons pathogènes actuels afin d'aider à la sélection variétale?





LA MYCOTHÈQUE

- 14 espèces, 151 souches
Fusarium spp., *Z. tritici*, *S. nodorum*, *Microdochium spp.*, *Drechslera tritici-repentis*, *Pseudocercospora herpotrichoïdes*, *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Rhizoctonia cerealis*
- Banque pérenne accessible aux partenaires du projet. Conserver en trois exemplaires

→ Source d'inoculum importante pour phénotyper les variétés avec des isolats récents



CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

○ Génotypique (*Z. tritici*)

Marqueurs microsatellites disponibles utilisés (Gautier et al., 2014).

→ Tous les isolats intégrés dans la mycothèque sont génétiquement différents

○ Pathotypage (*Z. tritici*)

15 isolats phénotypés sur une lignée différentielle de blé

LIGNÉES DIFFÉRENTIELLES DE BLE	
Cultivars	Stb
Teching 29	
Obelisk	
Capella	
Blagyna 88	Stb1
Vompois	Stb2
Israël 483	Stb3
Tadania	Stb4
CS/Pyralatic	Stb5
Shefir	
Calama	Stb6
Eilatoula Federal	
M8 Synthet/3843	Stb7
Count	
Selmon	
Kovaez - K4500	Stb6
TEH11	Stb6
Salamouni	
Arina	Stb6
Riband	
Synthetic M3	
Balance	
Apache	Stb4

CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

○ Génotypique (*Z. tritici*)

Marqueurs microsatellites disponibles utilisés (Gautier et al., 2014).

→ Tous les isolats intégrés dans la mycothèque sont génétiquement différents

○ Pathotypage (*Z. tritici*)

15 isolats phénotypés sur une lignée différentielle de blé

Souches	R Gènes																
	Stb1	Stb2	Stb3	Stb4	Stb5	Stb6	Stb7	Stb8	Stb9	Stb10	Stb11	Stb12	Stb13	Stb14	Stb15	Stb16	Stb18
MTK30						x	x										x
MTK32				x		x	x				x						x
MTK33			x			x		x			x						x
MTK45			x	x	x	x		x			x						x
MTK46			x	x	x	x		x			x						x
MTK47			x	x	x	x		x			x						x
MTK48																	
MTK82																	
MTK83																	
MTK84				x		x	x		x		x						x
MTK85						x	x										x
MTK86						x	x										x
MTK87	x					x	x		x								x

0% avirulent
 1-9% faiblement virulent
 10-24% virulent, intermédiaire
 30-100% virulent

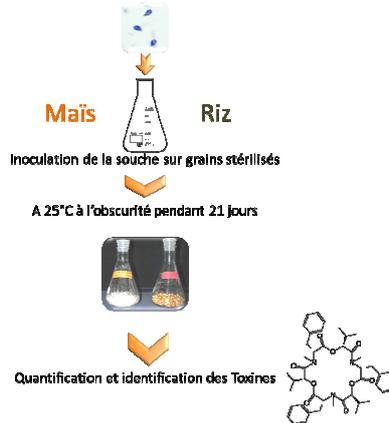
✓ 3 souches avirulentes sur l'ensemble des génotypes
 ✓ Combinaisons de virulences différentes

→ Inoculations artificielles avec des isolats caractérisés pour leurs virulences



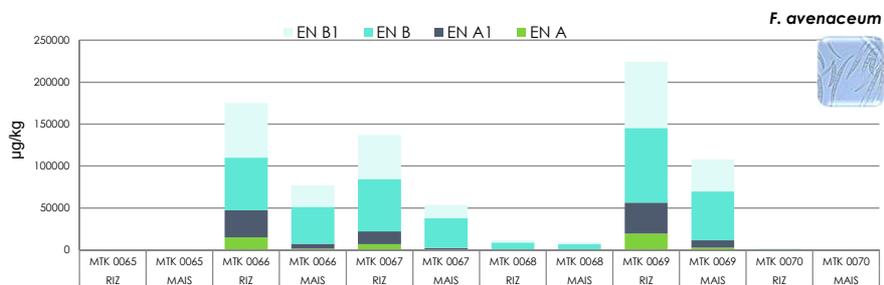
CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxinogène (*Fusarium spp.*)
 - Mise au point d'outil biochimique et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)



CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxinogène (*Fusarium spp.*)
 - Mise au point d'outil biochimique et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)



→ Meilleure expression du potentiel toxinogène sur riz pour les différentes espèces et toxines testées





CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxinogène (*Fusarium spp.*)
 - Mise au point d'outil biochimique et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)

Espèces	ENNS				Nb souches produisant	BEA	Nb Souches produisant	MON
	A1	A	B	B1				
<i>F. poae</i>	0	+	0	0	5/6	++++	6/6	0
<i>F. avenaceum</i>	++	++	++++	++++	3/6	+	6/6	0

- Caractérisation des espèces pour la production de **TCTB** avec des outils moléculaires et biochimiques
- Tous les isolats de *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* ont été chémotypés. Données disponibles pour les partenaires.



CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxinogène (*Fusarium spp.*)
 - Mise au point **d'outil moléculaire** et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)
- ✓ quantification **simple, fiable** et **rapide** des espèces productrices d'ENN et BEA sur céréales (par qPCR)
- ✓ **Problème:** très grande hétérogénéité du gène *esn1* → difficulté de détection des producteurs sur céréales

→ L'outil développé permet actuellement la quantification et l'identification de 3 espèces productrices d'enniaticines et /ou beauvericine sur matrice blé :

F. acuminatum*, *F. tricinctum* et *F. avenaceum

→ Poursuite du développement pour les autres espèces productrices dont *F. poae*





MISE AU POINT D'OUTILS MOLÉCULAIRES

- Internalisation ou développement de méthodes qPCR lors des trois années du projet:
 - Méthodes internalisées, validées pour 7 espèces de *Fusarium* et deux espèces de *Microdochium* (Elbet et al., 2014)
 - Nouvelle méthode développée pour *Z. tritici* avec technologie TaqMAN® → gène nucléaire monocopie de la mannitol déshydrogénase. Méthode très spécifique et sensible

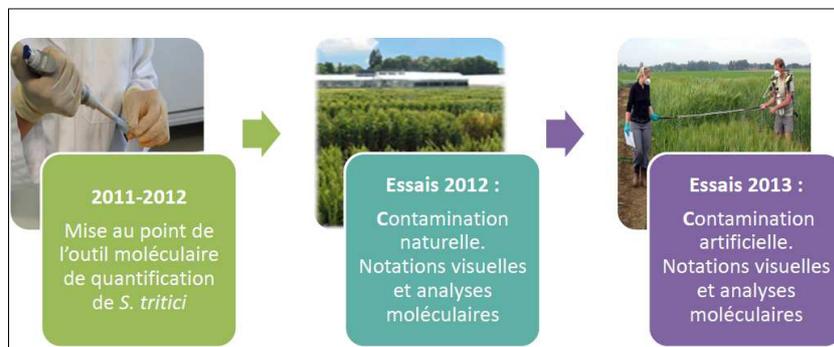
→ Applications évaluées pour la sélection variétale



APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

- Septoriose et Fusarioses

Objectif: étudier la corrélation entre les notations visuelles et la présence de l'agent pathogène par la quantification de son ADN. Valider le phénotypage sous contamination artificielle et comparer l'efficacité de différentes souches.





APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

- Essais pour la septoriose et les fusarioses

2012

Contamination naturelle

5 lieux / 2 répétitions
2 dates de notation + prélèvements

2 approches :

- Par étage foliaire (= voir poster)
- Globale



2013

Contamination artificielle :

- 3 souches différentes / essai
- 1 témoin non-inoculé

6 lieux / 2 répétitions

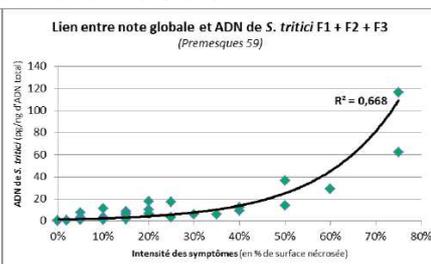
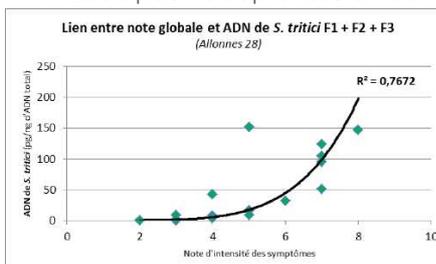
2 dates de notation + prélèvements

Approche globale



APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

- Essais pour la Septoriose en contamination naturelle



Allonnes					Premesques				
Globalité (F1+F2+F3)	Symptômes 1 ^{ère} notation	Symptômes 2 ^{ème} notation	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation	Globalité (F1+F2+F3)	Symptômes 1 ^{ère} notation	Symptômes 2 ^{ème} notation	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation
Symptômes 1 ^{ère} notation	1	0,87	0,70	0,83	Symptômes 1 ^{ère} notation	1	0,94	0,93	0,83
Symptômes 2 ^{ème} notation		1	0,67	0,78	Symptômes 2 ^{ème} notation		1	0,90	0,86
Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation			1	0,74	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation			1	0,92
Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation				1	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation				1

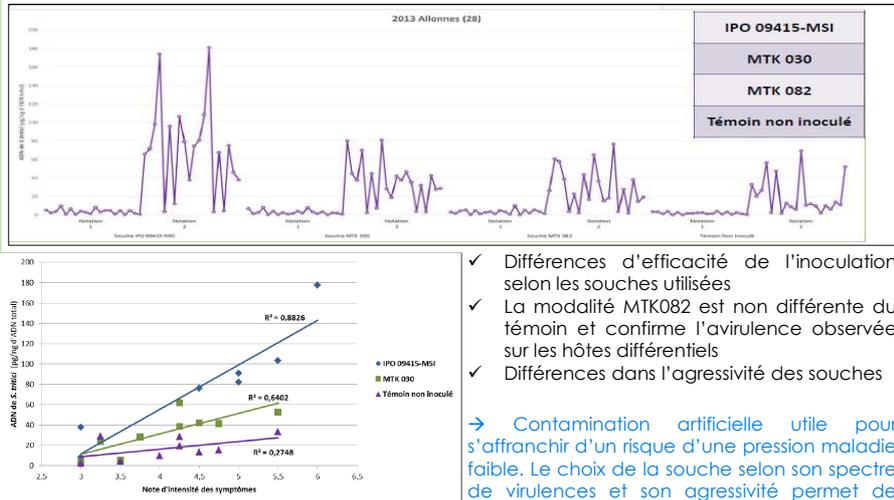
→ Très bonne corrélation entre les notations visuelles et la quantité d'ADN du champignon et donc sur le classement variétal
 → Intérêt supérieur de la qPCR en cas de complexe de maladies. Certaines variétés sensibles à la rouille jaune et la rouille brune ont pu être discriminées par l'outil qPCR contrairement aux notations visuelles impossibles à faire





APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

○ Essais pour la Septoriose en contamination artificielle



- ✓ Différences d'efficacité de l'inoculation selon les souches utilisées
- ✓ La modalité MTK082 est non différente du témoin et confirme l'avirulence observée sur les hôtes différentiels
- ✓ Différences dans l'agressivité des souches

→ Contamination artificielle utile pour s'affranchir d'un risque d'une pression maladie faible. Le choix de la souche selon son spectre de virulences et son agressivité permet de discriminer finement des variétés pour des gènes spécifiques au champ



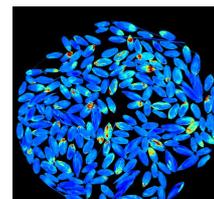
APPLICATION A LA SÉLECTION VARIÉTALE

○ Phénotypage par imagerie spectrale

→ Diagnostiquer la fusariose de l'épis?

- ✓ Automatiser, robotiser les mesures
- ✓ Passer des notations visuelles aux mesures physiques dynamiques, non invasives et non destructives

→ Etudier la corrélation entre le % de grains fusariés évalué par le videometer et le % d'épillets fusariés par notation visuelle





APPLICATION A LA SÉLECTION VARIÉTALE

Phénotypage par imagerie spectrale

Dispositif expérimental :

Essai inoculé par spray de *F. graminearum* 07-03 et *F. culmorum* R964

Blé tendre : 5 variétés :

Tremie (4) ; Altigo (4) , Solehio (5) ; Arezzo (5.5) ; Apache (7)

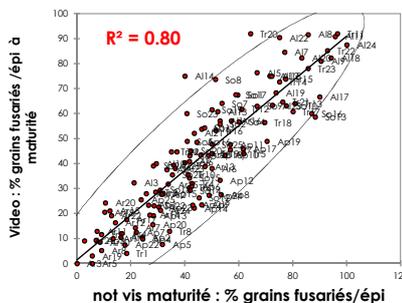
2 répétitions de 25 épis notés/rep

Notations visuelles au champ :

à la 2^{ème} notation visuelle : autour de 360°C jour après floraison

Par épi : estimation du % épillets fusariés , % grains fusariés

à maturité : comptage du % grains fusariés



→ Bonne corrélation pour tous les stades testés avec l'algorithme mis au point par le GEVES



APPLICATION A LA SÉLECTION VARIÉTALE

Phénotypage par imagerie spectrale

Dispositif expérimental :

Essai inoculé par spray de *F. graminearum* 07-03 et *F. culmorum* R964

Blé tendre : 5 variétés :

Tremie (4) ; Altigo (4) , Solehio (5) ; Arezzo (5.5) ; Apache (7)

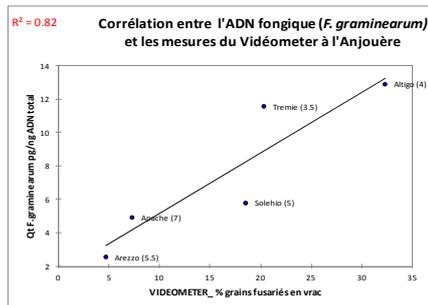
2 répétitions de 25 épis notés/rep

Notations visuelles au champ :

à la 2^{ème} notation visuelle : autour de 360°C jour après floraison

Par épi : estimation du % épillets fusariés , % grains fusariés

à maturité : comptage du % grains fusariés



→ Bonne corrélation pour tous les stades testés avec l'algorithme mis au point par le GEVES
 → Corrélations plus faibles dans d'autres essais notamment quand *Microdochium* est présent
 → Continuer le développement en prenant en compte la présence de *Microdochium* (FSOV 2014 *Microdochium*)





CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- Mise à disposition d'une mycothèque pérenne et accessible avec les principaux agents pathogènes du blé tendre caractérisés pour des critères utiles (gènes d'avirulence, agressivité, potentiel toxigène...) afin d'aider la sélection variétale
- Progrès collectif pour la réalisation d'essais en contamination artificielle avec des échanges multiples et constructifs entre les différents acteurs de la filière
- Développements et validations d'outils de phénotypage (moléculaire et visuel automatisé) ayant un intérêt afin d'améliorer la précision dans le phénotypage des variétés notamment en présence d'un complexe maladies. Outils à disposition des partenaires (transfert, prestation...)
- Poursuivre ces collaborations pour lever les verrous techniques dans le phénotypage précis pour certaines maladies (FSOV 2014 Microdochium)

