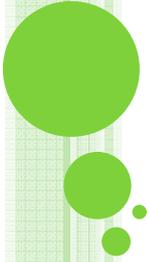




FsoV JEUDI 8 JANVIER 2015

DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL D'AIDE
À LA SÉLECTION DE VARIÉTÉS DE BLÉ
RÉSISTANT À LA SEPTORIOSE

Olivier ROBERT



LES OBJECTIFS DU PROJET

- *Obtenir un test prédictif de la résistance à la septoriose*
- *Pourquoi s'intéresser aux toxines de *Z. tritici* ?*
 - *Pas de manipulation de champignon ou spores,*
 - *Pas de contamination*
 - *Résultat en 3 à 5 jours !*
- *Résistance variétale moins spécifique aux toxines qu'avec les races de septoriose ?*



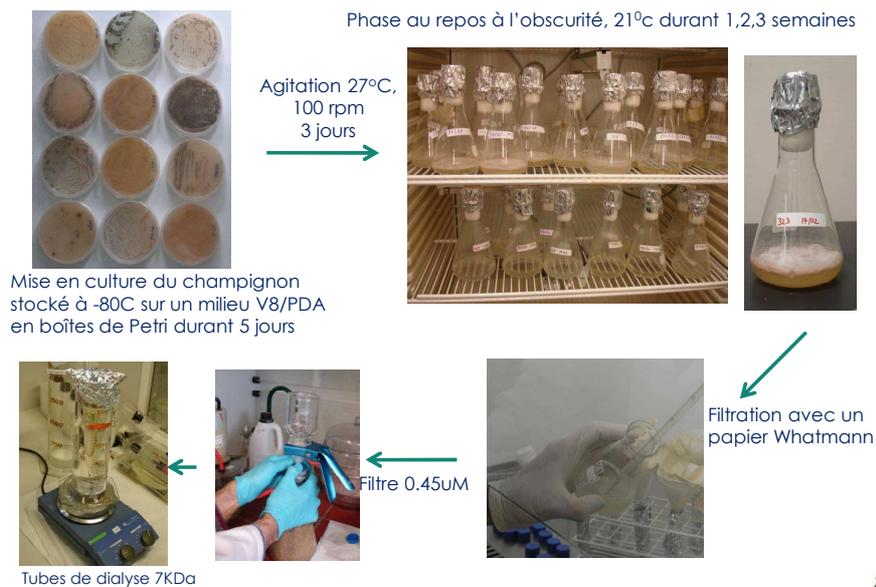


ÉTAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES AU DÉBUT DU PROJET

- Il existe des toxines produites par des septorioses qui nécrosent les feuilles de blé
 - *Septoria nodorum* (ToxA – Tsn1 ; J. Faris, USDA)
 - *Zymoseptoria tritici* (MgTox1 ; G. Kema, PRI)
 - Isolement d'un substrat (filtrat de culture) qui est un mélange de protéines (toxines - effecteurs) responsables de la nécrose des feuilles (lumière dépendant)



PRODUCTION DU FILTRAT DE CULTURE





INFILTRATION DU FILTRAT DE CULTURE



Notation des symptômes : 3 à 4 jours après infiltration



INFILTRATION DU FILTRAT DE CULTURE (CF) DE IPO323 SUR LA VARIÉTÉ OBELISK



CF IPO323



Témoin négatif



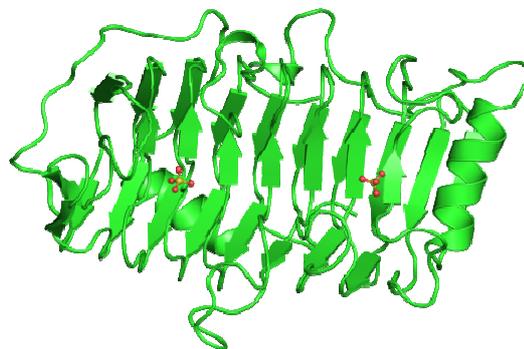


LES ENJEUX DU PROGRAMME FSOV

- Les toxines de *Z. tritici*
 - Quelles sont la ou les protéines SSP (Small Secreted Protein) qui provoquent la nécrose (la mort cellulaire) des feuilles de blé ?
 - Quelles sont la ou les protéines SSP qui permettent de différencier les génotypes résistants des sensibles ?
- Le protocole d'application
 - Quel protocole d'inoculation peut être appliqué au champ ?



IDENTIFICATION DES PROTÉINES DU FILTRAT DE CULTURE DE L'ISOLAT IPO232



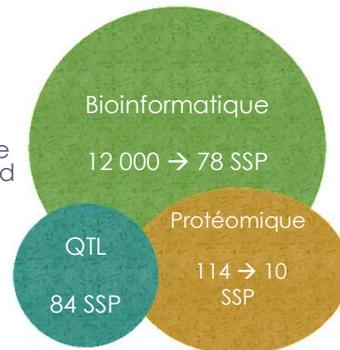
Pectate lyase (Bsp165PelA) de *Bacillus*





DIFFÉRENTES APPROCHES POUR IDENTIFIER DES PROTÉINES SSP CANDIDATES

- Analyse Bioinformatique
 - Petite protéine sécrétée (<300aa)
 - Pas de signature GPI
 - Pas de domaine trans-membranaire
 - Riche en cystéines
- Analyse Protéomique
 - Protéines sécrétées *in vitro* (filtrat de culture)
 - Chromatographie liquide à échange d'ion de type Fast Performance liquid Chromatography (FPLC)
 - LC-MS
- Analyse QTL
 - Focus sur le QTL majeur du chromosome 5

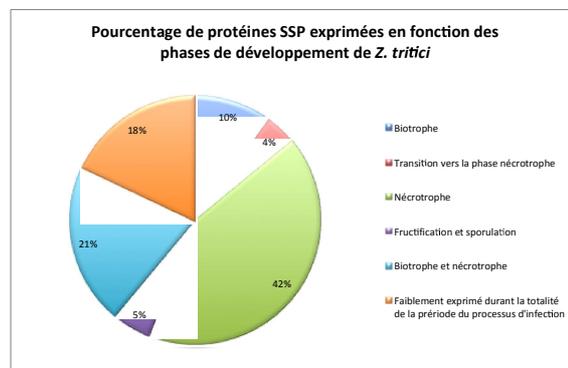
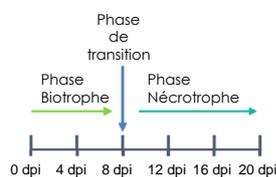


→ 115 protéines SSP (toxines potentielles) identifiées



IDENTIFICATION DES PROTÉINES PRÉSENTES DANS LE FILTRAT DE CULTURE

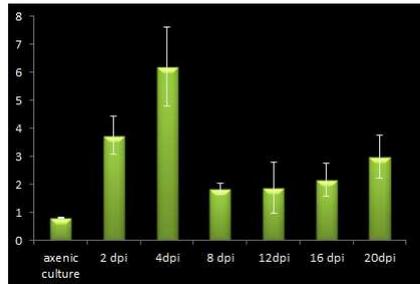
- 115 protéines (toxines potentielles) identifiées





PROTÉINES SSP15, SSP18 ET SSP127

○ Protéine SSP127

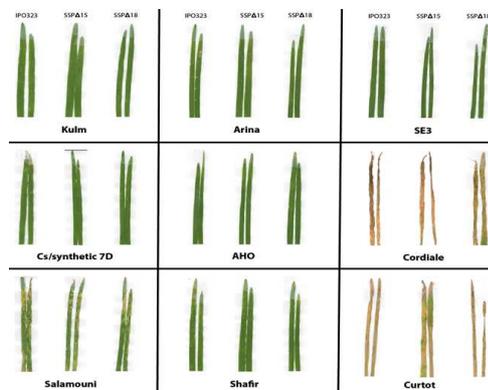


→ SSP127 est surexprimée durant la phase biotrophe et provoque des nécroses sur Cordiale mais pas sur Nuage



VALIDATION DES PROTÉINES SSP15 ET SSP18 PAR MUTATION DE GÈNE

○ Infiltration des filtrats de culture de IPO232, IPO323ΔSSP15 et IPO323ΔSSP18 sur 12 lignées de blé



→ Pas de différences : Ces 2 protéines ne jouent pas de rôle clé dans l'apparition de nécroses





MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE D'ÉVALUATION AU CHAMP



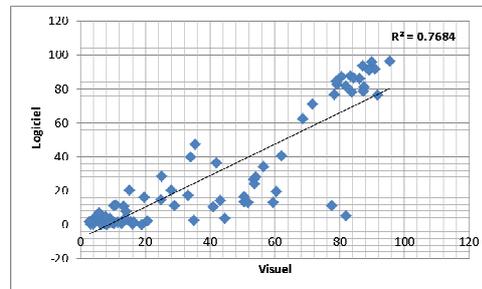
MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE D'ÉVALUATION AU CHAMP

- Matériel Végétal
 - 13 géotypes
 - 10 feuilles par géotypes
 - 2 modalités : toxine vs eau
 - 2 répétitions et 2 dates d'inoculations
 - 3 lieux (F. Desprez, R2n et Arvalis), 2 années
- Toxine
 - Substrat de culture (ensemble de toxines)
 - Protéine SSP127
 - Témoin avec de l'eau
- Méthode d'inoculation
 - Infiltration
 - Pinceau (avec ou sans pliure transversale de la feuille)
 - Abrasion (avec de la cérite)
- Notation des symptômes
 - Pourcentage de surface nécrosée / surface inoculée
 - Numérisation des feuilles avec logiciel SCANAREA





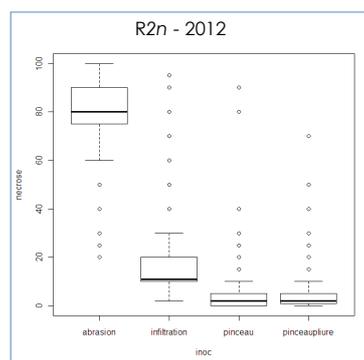
CORRÉLATION ENTRE LA NOTATION VISUELLE ET LA MESURE LOGICIELLE DES NÉCROSES



- Corrélation satisfaisante $R^2=0,77$
- La numérisation ne fait pas réellement gagner de temps
- La numérisation permet de conserver les images des symptômes



QUELLE EST LA MEILLEURE MÉTHODE D'INOCULATION ?

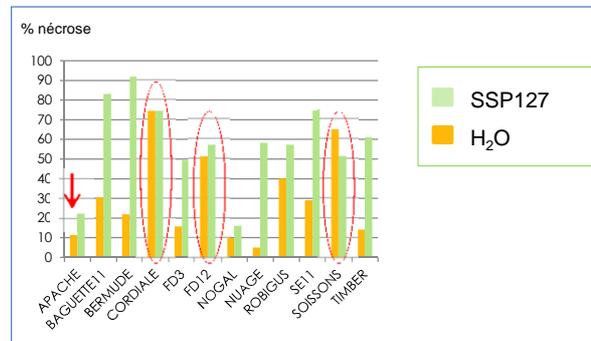


- L'abrasion est la méthode qui donne un maximum de nécroses
- Le badigeonnage de la toxine au pinceau n'est pas efficace





RÉSULTATS AVEC ABRASION (ARVALIS -2012)



- Il existe un polymorphisme variétal
- Mais les résultats ne sont pas corrélés à la résistance (exemple : Apache)
- Dans certains cas, la protéine n'a pas d'effet significatif comparé à l'eau



CONCLUSION

- Mise au point d'un protocole au stade juvénile avec le substrat de culture et certaines protéines qui permet une expression différente du phénomène de nécrose selon les variétés
- Identification de 115 protéines SSP susceptibles d'être des toxines impliquées dans le mécanisme de nécrose foliaire
 - Identification des protéines SSP exprimées par le champignon durant sa phase biotrophe et/ou nécrotrophe (et de transition)
 - Mais, les protéines SSP responsables de la nécrose foliaire n'ont pas clairement été identifiées
- Tests au champ : Les résultats ne sont pas satisfaisants
 - Problème d'inoculation (symptômes différents en fonction de la méthode et de l'expérimentateur)
 - La protéine choisie n'est pas discriminante et ne permet pas de prédire le niveau de résistance variétale





PARTENAIRES - REMERCIEMENTS



- Valérie LAURENT
- Laure DUCHALAIS
- Denis BEGHIN
- Ellen GOUDEMAM



- Gert KEMA
- Amir Mirzadi GOHARI



- Delphine HOURCADE

