# Carie ABBLE - Carie commune : étude de la variabilité des populations en France et développement d'un test de résistance variétale pour l'inscription des variétés de blé tendre en Agriculture Biologique

**Cadot V.[1], Orgeur G.[1], Baldwin T.[1], Gombert J.[2], Fontaine L.[3], du Cheyron P.[4], Bruyère J.[5], Oste S.[5], Champion J.[6], Maigniel J.-P.[7], Mailliard A.[7], Grimault V.[1]**

[1] GEVES Beaucouzé, 25 rue Georges Morel, F-49071 Beaucouzé

[2] FNAMS, Impasse du Verger, 6-49800 Brain sur l'Authion

[3] ITAB, 9 rue André Brouard, CS 70510, F-49105 Angers Cedex 02

[4] Arvalis Institut du Végétal, Route de Châteaufort, ZA des graviers, F-91190 Villiers le Bâcle

[5] FREDON Nord Pas-de-Calais, 265 rue Becquerel, BP 74, F-62750 Loos-en-Gohelle

[6] CA de la Drôme, Ferme expérimentale d'Etoile, 2485 route des Pécollets, F-26800 Etoile sur Rhône

[7] GEVES, Unité expérimentale de l'Anjouère, F-49370 La Pouëze

**Correspondance** : valerie.cadot@geves.fr

## Résumé

La carie commune est une maladie ré-émergente, transmissible par la semence, affectant particulièrement la filière céréales en Agriculture Biologique (AB). L'objectif du projet Carie ABBLE était de disposer **d'un test de résistance à la carie commune rapide, fiable vis-à-vis des virulences prédominantes en France**. A partir d'une collecte de 26 isolats dans 15 départements, *Tilletia caries* a été identifiée comme l'espèce prédominante (100%) par rapport à *T. foetida* (15.4%). L'inoculation de 20 souches sur la gamme d'hôtes différentiels a montré 3 virulences majeures : sur le gène de résistance Bt7 (48%), Bt2 (24%) et Bt15 (19%). Un test de résistance précoce à la carie a été développé par qPCR, au stade 2-3 feuilles, en quantifiant l'ADN de *Tilletia sp*. Ce test précoce (7-8 semaines) s'est révélé fortement corrélé (R Pearson=0.89), avec le test de résistance au champ basé sur le taux d'épis cariés (8 mois). Un test de résistance utilisant les virulences prédominantes pourra être disponible pour l'inscription des variétés de blé tendre déposées en AB au Catalogue français, ainsi qu'en offre de service à la filière. La sélection de variétés résistantes en combinaison avec d'autres leviers agronomiques permettra de remplacer les traitements de semences chimiques.

**Mots-clés :** *Tilletia,* Carie commune, Virulence, Test de résistance, Agriculture Biologique (AB)

## Abstract : Common bunt: Study of prevalent 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 2-3 leaf stage, quantifying *Tilletia sp*. DNA, was developed. This early test (7-8 weeks) was found to be well correlated with the adult field test (8 months), based on visual notation of the bunted ear rate ($R_{Pearson}$= 0.89). 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. It will allow the selection of resistant varieties which can replace chemical seed treatments or be combined with alternative treatments.

**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 (ITAB, 2012) ; des études antérieures ayant indiqué l'existence d'une certaine diversité de races et de virulences au niveau international.

Une gamme d'hôtes différentiels a été constituée par Metzger (1978), 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 Bt*11* (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 préxistants, 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 Institut du Végétal 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* les ont contournées (Goates, 2012). 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 est de 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 deux 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.

## 1. Matériel et méthodes

### *1.1 Matériel*

#### 1.1.1 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 1).

**Tableau 1** : Gamme d'hôtes différentiels (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.) |

#### 1.1.2 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.

### 1.1.3 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 (présentant des spores externes) ont également été collectés.

## *1.2 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 :

### 1.2.1 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 : carie commune : *T. caries et T. foetida,* et aussi la carie naine *: T. controversa*.




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

### 1.2.2 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 a été réalisée (Orgeur, 2014). Un colorant vital a permis de vérifier la présence de spores vivantes (colorées) et mortes (non colorées) (Figure 2). Un test de quantification des spores a également été 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.

### 1.2.3 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, 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. Etudier 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.

### 1.2.4 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 :** Etapes 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.

### 1.2.5 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. Pour le site 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.

### 1.2.6 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 et 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.

### 1.2.7 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 les 4 témoins et 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 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.

### 1.2.8 Analyses statistiques

Les tests statistiques d'analyse de variance, de comparaison de moyennes selon le test de Student Newman-Keuls ainsi que les tests de corrélation de Pearson & Spearman ont été menés avec le logiciel XLSTAT-Pro.

## 2. Résultats

### *2.1 Identification des principales espèces de carie et virulences présentes en France (Action 1)*

### 2.1.1 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.

### 2.1.2 Collecte et caractérisation des isolats

En 2015, 26 isolats ont été collectés dont 4 issus d'épis cariés et 22 de grains boutés. En termes 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). Vingt isolats sur 26 ont été sélectionnés, en ciblant le blé tendre, un isolat monospécifique, un taux de viabilité suffisant, une diversité géographique et variétale.

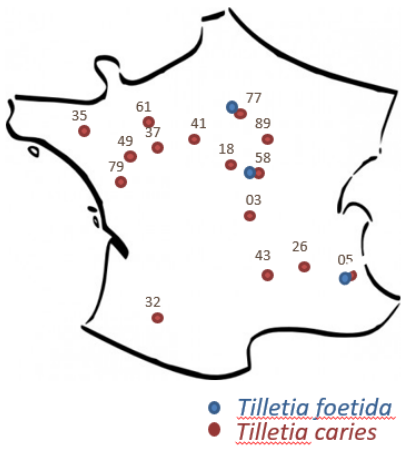



**Figure 4 :** Caractérisation des espèces de *Tilletia* sur les 26 souches collectées en France

### 2.1.3 Multiplication de l'inoculum

En 2016, la multiplication des 20 isolats dans les 2 sites de la FNAMS a permis l'obtention d'une très bonne production d'épis cariés, liée à une maîtrise du processus d'inoculation en laboratoire et au champ et à des conditions météorologiques favorables à la carie. La collecte des spores en quantité suffisante a permis d'assurer l'inoculation de la gamme différentielle pour identifier les virulences.

### 2.1.4 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 mineure sur Bt6 avec 5% (Tableau II). Certaines virulences semblent émerger sur Bt3, Bt4, Bt5, Bt8, Bt9, 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 Bt15 a été retenue pour les tests de résistance. A noter que S1-FNAMS issue du 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 2). Des vérifications de S1-FNAMS sur la gamme différentielle en laboratoire ont été menées pour confirmer son spectre.

**Tableau 2 :** 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%

| HD | Hôtes différentiels | Gènes de résistance | Souches pathogènes de *Tilletia caries* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Fréquence des virulences : V+(V) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 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 | 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 | 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*

La souche S1 représentative des 3 virulences, sur Bt7, Bt2 et Bt 15, a été retenue pour la mise au point du test de résistance.

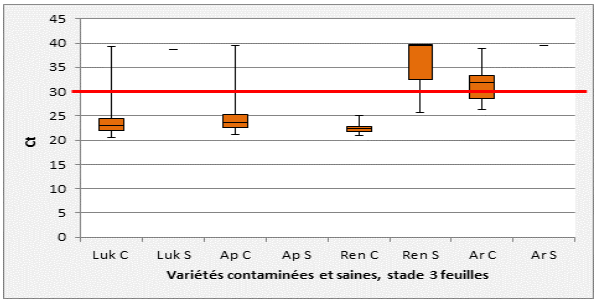
### *2.2 Mise au point d'un test de résistance précoce à la carie commune (Action 2)*

#### 2.2.1 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 concentration de $10^3$ spores/semence a montré un trop faible taux de contamination (données non montrées) tandis que le niveau de contamination de $10^4$ spores/semence a montré une discrimination suffisante entre témoins sensibles et résistants contaminés et aussi entre variétés saines et contaminées (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 et b), avec un Ct (Cycle threshold) plus faible pour les variétés sensibles contaminées (Lukullus, Apache et Renanque la variété résistante contaminée, Arezzo, et les témoins sains ; Ce Ct plus faible s'explique par le fait qu'il faut moins de cycles PCR pour détecter l'ADN amplifié du pathogène dans une variété sensible que dans une variété résistante.

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.

(a) Stade 3 feuilles




(b) Stade montaison

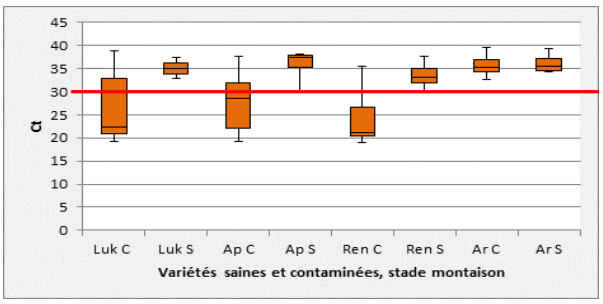



**Figure 5 :** Comparaison du nombre de plantes infectées par *T. caries*, par qPCR, pour les témoins contaminés (C) et sains (S), à la concentration de $10^4$ spores/semence, à 2 stades, pour un Ct= 30 (Cycle threshold ou cycle PCR seuil). 4 témoins : Luk : Lukullus, Ap : Apache, Ren : Renan, Ar : Arezzo

La comparaison des résultats pour ces quatre témoins entre le test précoce par qPCR au stade 3 feuilles et le test adulte au champ dans 2 sites confirme le classement des témoins sensibles et résistants (Tableau 3). La variété sensible Lukullus, avec un semis direct de semences inoculées, a présenté un faible taux de plantes cariées dans le site 62, aussi bien par qPCR que par notations visuelles au champ, comparé au taux élevé de plantes cariées obtenu après plantation au champ de plantules contaminées dans le site 49. Ce résultat tend à confirmer que la méthode de transmission de la carie de la semence à la plantule en conditions contrôlées permet un meilleur taux de transmission de la carie qu'un semis direct de semences contaminées. Pour obtenir un test de résistance au champ fiable et reproductible, il sera préférable d'utiliser la méthode de repiquage de plantules contaminées, avec la souche S1 représentative des virulences majoritaires en France.

**Tableau 3**: Comparaison du taux de plantes cariées entre le test précoce par qPCR et le test au champ, pour les témoins inoculés avec la souche S1

| | Stade Adulte au champ | | Stade 3 feuilles par qPCR | |
|---|---|---|---|---|
| | FNAMS 49 Semis en CC | FREDON 62 Semis directement | FNAMS 49 Semis en CC | FREDON 62 Semis directement |
| Lukullus | 44% | 1% | 53% | 7% |
| Renan | 60% | 37% | 87% | 53% |
| Apache | 40% | 28% | Non Testé | Non Testé |
| Arezzo | 1% | 1% | 20% | 20% |


| | Stade Adulte au champ | | Stade 3 feuilles par qPCR | |
|---|---|---|---|---|
| | FNAMS 49 Semis en CC | FREDON 62 Semis directement | FNAMS 49 Semis en CC | FREDON 62 Semis directement |
| Lukullus | 44% | 1% | 53% | 7% |
| Renan | 60% | 37% | 87% | 53% |
| Apache | 40% | 28% | Non Testé | Non Testé |
| Arezzo | 1% | 1% | 20% | 20% |


CC : Conditions contrôlées : Semence inoculée et élevage jusqu'au stade 3 feuilles en CC, puis repiquage au champ des plantules contaminées ; Semis directement : semences contaminées en laboratoire puis semis direct au champ

### 2.2.2 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 4).

**Tableau 4 :** Analyse de variance à 3 facteurs : variété, site, répétition

**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 |

Le test de rang de Spearman confirme cette très forte corrélation, $R_{Spearman}$=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.

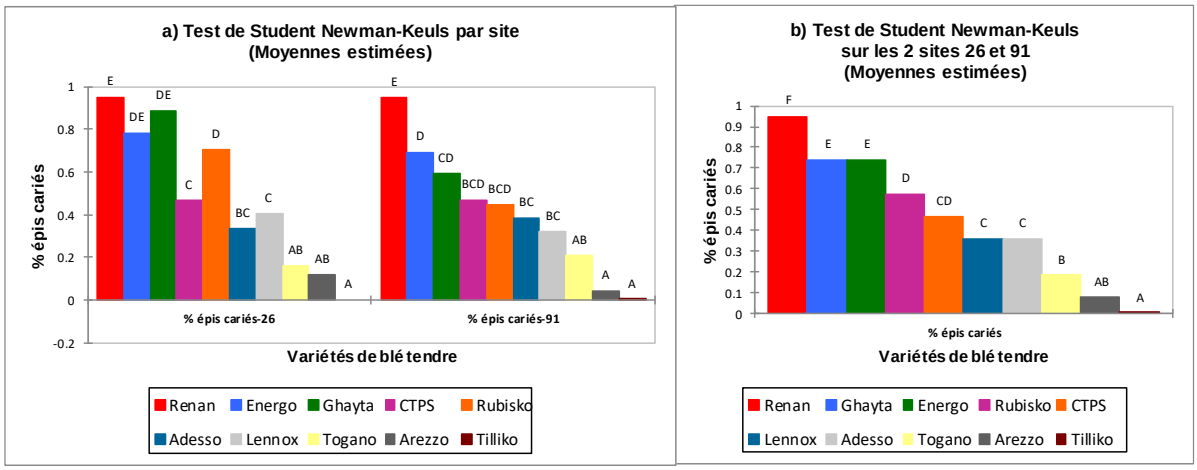



**Figure 6 :** Evaluation de la résistance à la carie commune des variétés de blé tendre cultivées en AB, avec le test de résistance au champ dans les sites 26 et 91, et sur la moyenne des deux sites

### 2.2.3 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 confirme 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 Arrezo 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 ($R_{Pearson}$=0.89) est observée entre le test qPCR (taux de tige cariée calculé par rapport à un seuil Ct et le test au champ (taux d'épis cariés), montrant un classement de la résistance variétale globalement proche entre les deux méthodes.

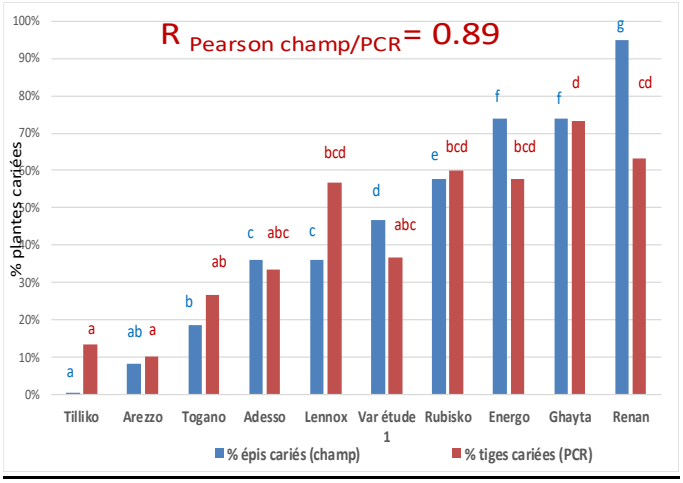



**Figure 7 :** Comparaison du classement de la résistance variétale à la carie commune du test précoce par qPCR (taux de tige cariée) et du test au champ au stade adulte (taux d'épis cariés) sur 10 variétés de blé tendre AB et témoins

## 3. Discussion

Le projet CASDAR Carie ABBLE 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 attestent 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, $R_{Speaman}$=0.96 entre les deux essais au champ s'explique par un protocole maitrisé, 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 Dumalasová et Bartoš. (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 $R_{Pearson}$=0.89, va être vérifiée sur des variétés présentant des gènes de résistance différents pouvant être liés à 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 2-3 feuilles (8 semaines), plus précoce que le test au champ au stade adulte (8-9 mois), tout en évitant la dissémination des spores de carie au champ.

Un test de résistance à la carie commune vis-à-vis des virulences prédominantes va pouvoir être pris en compte pour l'inscription des variétés de blé tendre déposées en AB au Catalogue français. Le GEVES pourra également offrir ses services aux sélectionneurs pour évaluer les variétés déposées en agriculture conventionnelle. La résistance variétale va pouvoir prendre une dimension renforcée dans la lutte contre la carie en dotant la sélection variétale de ce nouveau test précoce et opérationnel. Le développement d'un plus grand nombre de variétés résistantes utilisées en combinaison avec d'autres leviers de lutte, comme des méthodes prophylactiques et des traitements alternatifs, favoriseront la réduction des traitements de semences chimiques.

### Remerciements

Les partenaires du projet CASDAR Carie ABBLE remercient le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation pour sa contribution financière au compte d'affectation spéciale « Développement agricole et rural » (C 2015-01). La FREDON Nord Pas-de-Calais remercie également la Région Hauts-de-France pour le soutien financier apporté en co-financement.

**Références bibliographiques**

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

Bäzinger I., 2003. Stinkbrandanfälligkeit in- und ausländischer Weizensorten [Résistances des variétés de blé à la carie ordinaire], AgrarForschung 10, 328-333.

Dumalasová V., 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., 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., 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

ITAB, 2012. Agir rapidement pour contenir la carie commune. Actes du colloque de restitution du projet de recherche, 9 février 2012, Paris. 55 p.

Matanguihan J.B., 2011. Control of common bunt in organic wheat. Plant Dis. 95: 92-103

Metzger R.J., Hoffmann J.A., 1978. New races of common bunt useful to determine resistance of wheat to dwarf bunt. Crop Sci. 18:49–51 doi:10.2135/cropsci1978.0011183X00180 0010013x

Orgeur G., 2014. Common bunt caused by Tilletia caries: Evaluation of viable spores, set up of a protocol to access 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 access 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., 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.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).