

# Charbon de l'orge: méthode moléculaire de détection pour les semences

Anouk Guyer<sup>1</sup>, Eveline Jenny<sup>1</sup>, Thomas Hebeisen<sup>2</sup>, Irene Bänziger<sup>1</sup>, Andreas Kägi<sup>1</sup>, Susanne Vogelgsang<sup>1</sup>, Franco Widmer<sup>1</sup> et Laure Weisskopf<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Agroscope, Institut des sciences en durabilité agronomique IDU, 8046 Zurich, Suisse

<sup>2</sup>Agroscope, Institut des sciences en production végétale IPV, 8046 Zurich, Suisse

<sup>3</sup>Agroscope, Institut des sciences en production végétale IPV, 1260 Nyon, Suisse

<sup>4</sup>CHANGINS, Haute école de viticulture et d'œnologie, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Laure Weisskopf, e-mail: laure.weisskopf@agroscope.admin.ch



Charbon de l'orge: les plantes contaminées ont un potentiel élevé de propagation de la maladie. (Photo: Gabriela Brändle, Agroscope)

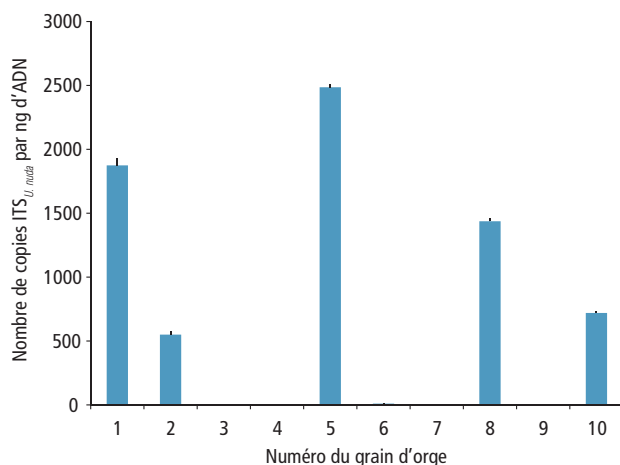
**Le charbon de l'orge est difficile à identifier dans les semences et le diagnostic microscopique classique prend énormément de temps. Une méthode moléculaire permet désormais de détecter cette maladie dans les semences en peu de temps et avec une sensibilité élevée, ce qui permettra de prendre des mesures pour endiguer la propagation de la maladie.**

Le charbon de l'orge (*Ustilago* spp.) fait partie des maladies des céréales qui se propagent par les semences et dont la maîtrise représente un enjeu croissant dans l'agriculture biologique. Lorsque les conditions sont favorables à une infection, les plantes atteintes forment des épis charbonnés qui infectent les plantes voisines par la libération de spores. L'agent pathogène du charbon de l'orge (*Ustilago nuda*) se conserve dans l'embryon de la semence sous forme de mycélium dont la croissance est activée par la germination des semences. Lorsqu'il atteint le point de croissance de la plante, l'agent patho-

gène est transféré de manière passive à la fleur (Wunderle 2013). Ainsi, la plante atteinte devient une nouvelle source de spores avec un potentiel élevé de propagation de la maladie.

Dans l'agriculture conventionnelle, le charbon de l'orge est efficacement maîtrisé à l'aide de produits chimiques de synthèse pour le traitement des semences. Dans l'agriculture biologique en revanche, les directives interdisent l'emploi de produits phytosanitaires chimiques et, comme il n'existe pas encore à ce jour de procédé de traitement efficace compatible avec les exigences bio, il est extrêmement important que les semences utilisées soient exemptes de contamination. En Suisse, l'infestation des semences par le charbon de l'orge est évaluée visuellement par l'inspection des lots de multiplication sur le terrain. Si l'on compte plus de trois, ou plus de cinq épis charbonnés par are (niveau Z<sub>1</sub> respectivement Z<sub>2</sub>), les lots ne peuvent plus être utilisés pour la production de semences, mais uniquement comme céréales fourragères ou panifiables (Krebs et al. 2014). A côté des inspections sur le terrain, il est aussi possible d'identifier la maladie à l'aide d'une analyse microscopique des semences. Pour cela, il existe une méthode reconnue par l'ISTA (International Seed Testing Association), qui consiste à extraire 2000 embryons de grains de céréales et à déterminer visuellement le nombre de grains touchés après coloration du mycélium. Cette méthode est notamment utilisée par l'Office bavarois de l'agriculture (Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, LfL), avec un seuil de contamination de 1 ‰. Ces analyses très chronophages du charbon de l'orge sur les semences ne sont pas employées en Suisse.

Le projet présenté dans cet article, soutenu par l'Association suisse des producteurs de semences SWISSEM, avait pour but de déterminer si une méthode de détection moléculaire spécifique pouvait remplacer les méthodes classiques d'analyse des semences. Une identification moléculaire d'*U. nuda* dans les semences



**Figure 1** | Détection quantitative d'*U. nuda* dans les extraits d'ADN de dix grains d'orges d'un lot de semences fortement infestées (21 %) de la variété Sandra. Trois répétitions techniques ont été analysées par extraction d'ADN afin de déterminer la quantité d'ADN fongique. La quantité d'ADN fongique est exprimée en nombre de copies de gènes par nanogramme d'ADN extrait au début de la réaction qPCR (ITS<sub>U. nuda</sub>: Internal Transcribed Spacer d'*Ustilago nuda*). La figure représente les moyennes (n = 3) et les écarts-types des répétitions.

devrait permettre de décider de manière précoce si un lot de semences peut être semé sans risque ou non. Cette identification moléculaire devrait reposer sur l'extraction du patrimoine génétique des grains d'un échantillon représentatif. La détection spécifique de l'ADN d'*U. nuda* devrait permettre d'identifier la présence du champignon. Grâce au calcul de la quantité initiale d'ADN de champignons extrait, il devrait être possible de se prononcer sur l'intensité de l'infestation. Le défi consiste à adapter une méthode conçue pour du matériel végétal (Wunderle *et al.* 2012) à des extraits de farine, à déterminer la limite de détection méthodologique de l'infestation fongique et enfin, à vérifier la méthode de détection avec des lots de semences de la pratique mis en culture.

#### Adaptation de la réaction PCR aux semences

Pour adapter la méthode de détection moléculaire, l'ADN a été extrait (NucleoSpin® Plant II kit d'extraction ADN) de la farine de grains d'orge provenant d'un lot de semences de la variété Sandra fortement contaminées par le charbon (21 % d'infestation sur le terrain, Krebs *et al.* 2014). Au préalable, les grains avaient été traités avec de la chloramine T (3 %), pour éviter que d'éventuelles spores de charbon collées sur le grain ne soient détectées et donnent un résultat positif, sans pour autant conduire à une infection sur le terrain. La méthode a d'abord été optimisée à l'aide de la PCR standard, afin de réduire l'apparition de sous-produits PCR non spécifiques et d'augmenter ainsi la spécificité et la sensibilité

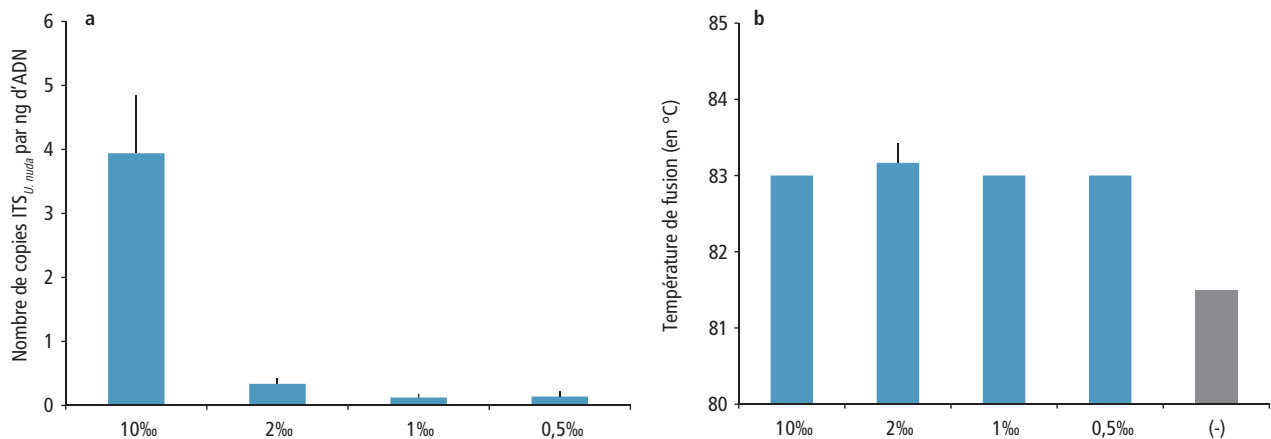
de la méthode quantitative de détection du charbon de l'orge. La détection du pathogène par PCR quantitative (qPCR) sur des grains individuels a montré que la quantité de matériel fongique détectée variait selon les grains (fig. 1). Il est probable que des quantités différentes de mycélium se forment dans les semences, ce qui se traduit par des écarts importants dans l'ADN fongique extrait et rend difficile la détermination du nombre de grains d'orge contaminés dans un lot.

#### Taille des échantillons et limite de détection

La première étape pour quantifier l'infestation fongique consiste à réduire les grains en une farine fine, puis à les homogénéiser en les tamisant et à les séparer des enveloppes. Les facteurs qui déterminent la fiabilité et la reproductibilité de l'identification moléculaire sont la taille de l'échantillon de grains, le volume de l'échantillon de farine et la quantité d'ADN utilisé pour la qPCR. Différentes adaptations de la méthode ont montré que des échantillons de 1000 grains d'orge et de 200 mg de farine pour l'extraction d'ADN permettaient d'obtenir des données reproductibles. La limite technique de détection, c'est-à-dire le nombre de copies de gènes pouvant être détectées dans la réaction qPCR, était comprise entre 10 et 20. Afin de quantifier de manière fiable le seuil de contamination d'une copie d'ADN de champignon/ng d'ADN, il est recommandé de travailler avec 30 ng d'ADN au départ.

#### Détection de l'infestation à l'aide de gradients

Un gradient d'infection a été établi de manière artificielle en mélangeant un échantillon de farine atteint de charbon de l'orge et un échantillon sans charbon, ce qui a permis de déterminer la limite de détection. Il n'est pas possible de mesurer les échantillons de farine dans lesquels l'infestation est inférieure à 2 ‰ d'un point de vue quantitatif, car aucune baisse de l'intensité du signal ne peut être observée entre l'échantillon infesté à 1 ‰ et l'échantillon infesté à 0,5 ‰ (fig. 2a). L'évaluation des températures de fusion de l'ADN (températures auxquelles les deux brins double hélice d'ADN se séparent l'un de l'autre) a cependant permis de détecter la maladie de manière fiable jusqu'à un taux d'infection de 0,5 ‰ (fig. 2b). La température de fusion typique d'*U. nuda* (83 °C) se distinguait clairement du témoin négatif (81,5 °C). Selon l'Office bavarois de l'agriculture, une infestation de plus de 1 ‰ conduit à l'exclusion du lot de semences avec la méthode ISTA. Grâce au diagnostic moléculaire adapté à la farine, le charbon de l'orge a pu être détecté avec une sensibilité encore plus élevée (0,5 ‰, indique un grain contaminé parmi 2000 autres grains).



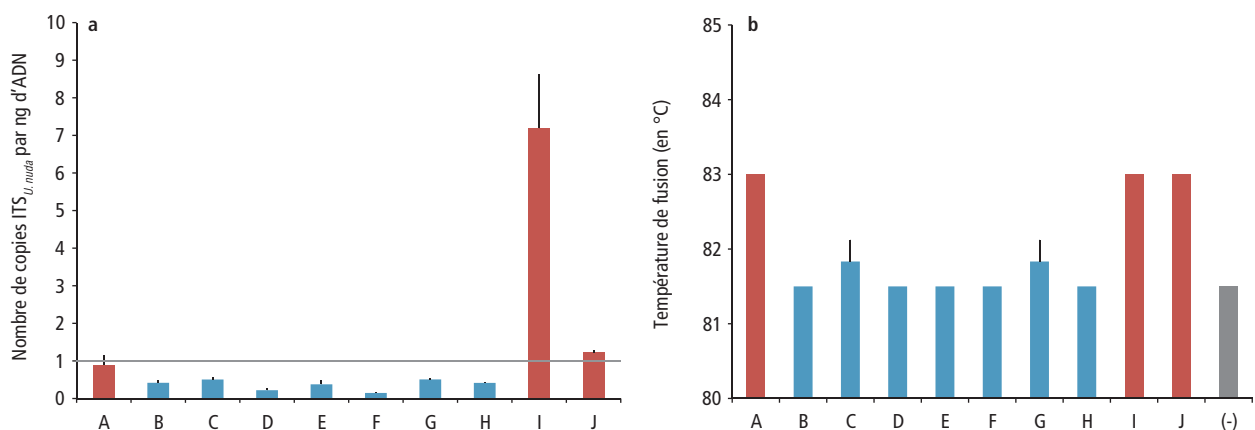
**Figure 2** | Détection quantitative de l'infestation par le charbon de l'orge dans les échantillons de farine dont la teneur en matériel infecté par le charbon est le résultat d'une contamination artificielle. 10 ‰, 2 ‰, 1 ‰ et 0,5 ‰ (2a), ainsi que résultats des courbes de fusion des mêmes échantillons (2b). (-): témoin négatif (eau). La quantité d'ADN fongique est exprimée en nombre de copies de gènes par nanogramme d'ADN extrait au début de la réaction qPCR (ITS<sub>U.nuda</sub>: Internal Transcribed Spacer d'*Ustilago nuda*). La figure représente les moyennes (n = 2-3) et les écarts-types des répétitions.

### Quantification dans les lots de semences de la pratique

La méthode de détection moléculaire adaptée d'*U. nuda* pour les semences d'orge a été vérifiée par l'inspection des lots de semences de l'organisme de certification. Pour tous les échantillons qui présentaient une infestation par le charbon de l'orge lors des inspections sur le terrain, le champignon a pu être détecté dans la farine (fig. 3a et 3b, échantillons A, I, J). Tous les échantillons qui ont été jugés exempts d'infestation à l'aide de la qPCR, ne présentaient pas non plus d'infestation sur le terrain (fig. 3a et 3b, échantillons B–H).

### Conclusions

- Le charbon de l'orge peut être détecté de manière fiable dans les semences jusqu'à un taux d'infection de 0,5 ‰.
- Aucun charbon de l'orge n'a été détecté à l'aide de la nouvelle méthode sur les lots de semences qui ne présentaient pas d'infestation sur le terrain.
- Le diagnostic moléculaire est non seulement plus sensible que le diagnostic microscopique, il prend également moins de temps, notamment lorsque plusieurs lots doivent être conditionnés et analysés en parallèle.



**Figure 3** | Détection quantitative de l'infestation par le charbon de l'orge dans les échantillons de farine de l'organisme de certification (3a) ainsi que résultats des courbes de fusion des mêmes échantillons (3b). A, I, J: échantillons avec charbon; B–H: échantillons sans charbon; (-): (-): témoin négatif (eau). La ligne horizontale de la figure 3a représente la limite d'infection d'une copie de gène/ng d'ADN. La figure représente les moyennes (n = 3) et les écarts-types des répétitions.

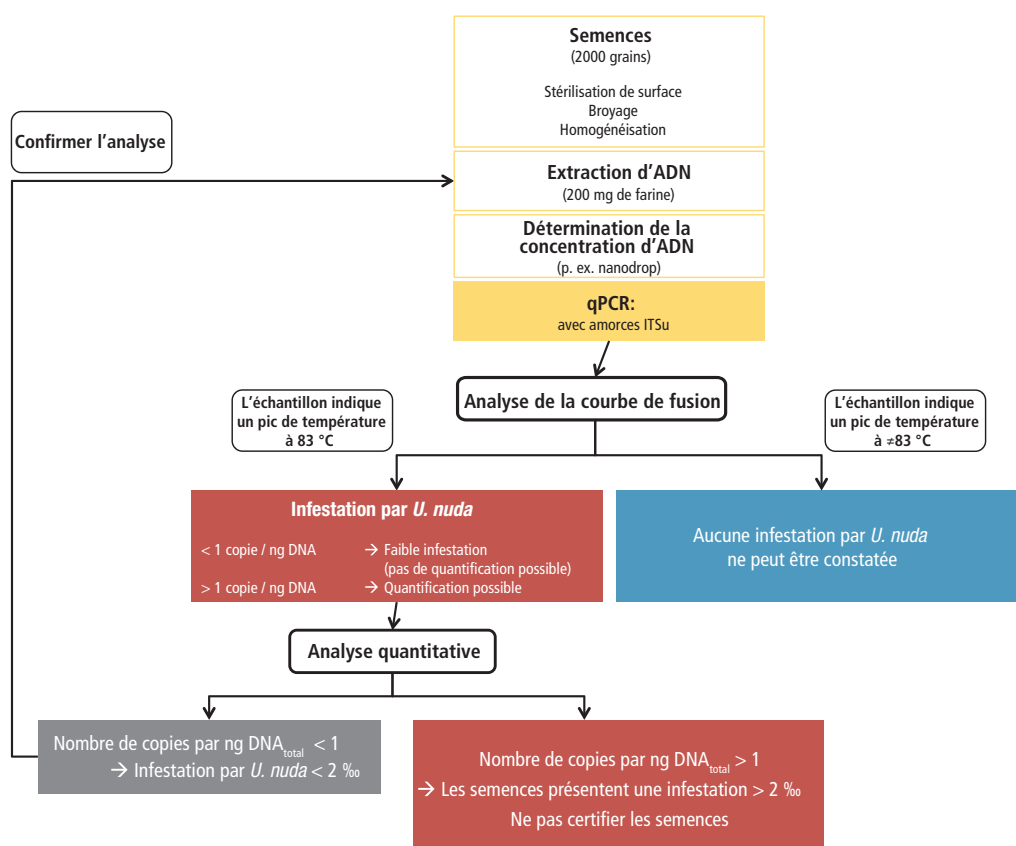


Figure 4 | Processus de la détection moléculaire quantitative d'*U. nuda* dans les semences d'orge.

### Perspectives

- Le diagnostic moléculaire du charbon de l'orge dans les semences pourrait conduire à ce que seules des semences exemptes d'infection soient semées à des fins de multiplication (fig. 4). Des lots initiaux exempts d'infection permettraient d'endiguer la maladie à long terme et de produire des semences bio sans risque de propagation de ce fléau.
- Ce test peut non seulement servir à identifier la maladie dans les lots de multiplication indigènes; il pourrait également servir à contrôler les semences certifiées importées.
- A l'aide de lots de semences issus de la récolte 2015 et affichant différents niveaux d'infection, la reproductibilité et la praticabilité de cette méthode de détection seront étudiées pour décider si cette dernière peut être utilisée à l'avenir pour la certification routinière des semences d'orge bio.
- Cette détection moléculaire pourrait également être adaptée à d'autres agents pathogènes du charbon (p. ex. le charbon nu du blé) – un autre objectif dans la lutte contre cette maladie qui joue un rôle crucial pour l'agriculture biologique.

### Remerciements

Les auteurs remercient l'Association suisse des producteurs de semences SWISS-SEM pour leur soutien financier. Ils tiennent tout particulièrement à remercier Heinz Krebs, qui a initié les essais sur la régulation du charbon de l'orge à Agroscope, et qui a considérablement contribué à la réussite du projet par son expertise et la mise à disposition de semences hautement contaminées.

### Bibliographie

- Krebs H., Kägi A., Bänziger I., Herzog C., Hebeisen T., Vogelgsang S. & Weisskopf L., 2014. Charbon de l'orge: sensibilité variétale et alternatives de lutte. *Recherche Agronomique Suisse* 5 (9), 374–377.
- Wunderle J., Leclerque A., Schaffrath U., Slusarenko A. & Koch E., 2012. Assessment of the loose smut fungi (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) in tissues of barley and wheat by fluorescence microscopy and real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 133, 865–875.
- Wunderle J., 2013. Entwicklung und Anwendung von Methoden für einen frühen Nachweis der Flugbranderreger *Ustilago nuda* und *U. tritici* in Gerste und Weizen. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 124 p. Accès: <http://publications.rwth-aachen.de/record/211237/files/4506.pdf> [16.9.2015].