



**NIMP 27**  
**Annexe 4**

## **NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES**

### **NIMP 27 PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC**

#### **PD 4: *Tilletia indica* Mitra**

*Adopté 2015; publié 2015*

#### **TABLE DES MATIÈRES**

|         |                                                                                             |         |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1.      | Informations sur l'organisme nuisible.....                                                  | PD 4-3  |
| 2.      | Données taxonomiques.....                                                                   | PD 4-3  |
| 3.      | Détection.....                                                                              | PD 4-3  |
| 3.1     | Examen des semences/grains.....                                                             | PD 4-4  |
| 3.2     | Extraction des télisporos à partir des semences/grains, test de filtration sélective.....   | PD 4-5  |
| 4.      | Identification.....                                                                         | PD 4-6  |
| 4.1     | Morphologie des télisporos.....                                                             | PD 4-6  |
| 4.1.1   | Identification morphologique.....                                                           | PD 4-6  |
| 4.1.2   | Comparaison morphologique avec d'autres espèces de <i>Tilletia</i> .....                    | PD 4-7  |
| 4.2     | Isolement et germination des télisporos.....                                                | PD 4-7  |
| 4.2.1   | Germination des télisporos.....                                                             | PD 4-7  |
| 4.2.2   | Germination d'espèces de <i>Tilletia</i> similaires.....                                    | PD 4-11 |
| 4.2.3   | Récupération de télisporos isolées.....                                                     | PD 4-11 |
| 4.3     | Identification moléculaire.....                                                             | PD 4-11 |
| 4.3.1   | Analyse de la région ITS1 par enzymes de restriction.....                                   | PD 4-12 |
| 4.3.2   | PCR conventionnelle réalisée avec des amorces spécifiques d'espèces.....                    | PD 4-13 |
| 4.3.3   | Essai PCR réalisé avec des amorces spécifiques d'espèces et une sonde fluorescente.....     | PD 4-14 |
| 4.3.4   | PCR en temps réel directe sur des télisporos.....                                           | PD 4-14 |
| 4.3.4.1 | Amplification de l'ADN de <i>Tilletia</i> avant la réalisation de la PCR en temps réel..... | PD 4-15 |

|         |                                                                                                                    |         |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 4.3.4.2 | Essai quintuplex de PCR en temps réel réalisé avec des sondes fluorescentes pour l'identification des espèces..... | PD 4-15 |
| 5.      | Données à conserver.....                                                                                           | PD 4-17 |
| 6.      | Points de contact pour tout complément d'information.....                                                          | PD 4-18 |
| 7.      | Remerciements .....                                                                                                | PD 4-18 |
| 8.      | Références .....                                                                                                   | PD 4-19 |
| 9.      | Figures .....                                                                                                      | PD 4-21 |

REVOQUE

## 1. Informations sur l'organisme nuisible

*Tilletia indica* Mitra est l'agent causal de la carie de Karnal sur le blé (*Triticum* spp.). La carie de Karnal a été décrite pour la première fois à Karnal, en Inde, en 1931. L'organisme pathogène est largement disséminé dans des régions de l'Asie du Sud et de l'Asie du Sud-Ouest (Département de l'agriculture des États-Unis (USDA), 2007; Wiese, 1987). Il a aussi été détecté dans certaines zones des États-Unis et du Mexique et en Afrique du Sud (Crous *et al.*, 2001; Fuentes-Davila, 1996).

Les hôtes sont notamment *Triticum aestivum*, *Triticum durum* et *Triticum aestivum* × *Secale cereale*. Les signalements relatifs à *Triticum aestivum* × *Secale cereale* sont rares; cependant, il a été démontré que *Secale* spp. était une plante hôte potentielle (Sansford *et al.*, 2008). Il a aussi été démontré que *T. indica* infectait d'autres espèces de graminées dans des conditions de culture sous serre, mais sa présence n'a jamais été détectée sur ces hôtes alternatifs lorsque ceux-ci étaient cultivés en plein champ (Inman *et al.*, 2003).

*T. indica* est un pathogène responsable d'un charbon qui attaque les fleurons de l'épi. Le champignon responsable de l'infection pénètre dans les semences par l'extrémité germinale du grain et se développe à l'intérieur du péricarpe où il produit une masse pulvérulente de téliosporos de couleur brun-noir. Lorsqu'elle est fraîche, la masse de spores produit une odeur fétide de poisson en décomposition (triméthylamine). À la différence de ce qui se passe pour les charbons systémiques, il est rare que tous les grains d'un épi de la plante hôte soient infectés par *T. indica*, et les épis porteurs de grains infectés ne diffèrent pas en apparence des épis sains (figure 1). En général, les semences ne sont que partiellement colonisées et présentent des degrés d'infestation divers (figure 2). C'est pourquoi il est très difficile de détecter la maladie en plein champ. Les symptômes ne sont habituellement pas repérés avant la récolte, à moins que les niveaux d'infestation ne soient élevés.

*T. indica* altère la qualité des grains en provoquant leur decoloration et en donnant une odeur déplaisante aux grains et aux produits confectionnés à partir de ces grains. Elle entraîne aussi une légère baisse de rendement. Généralement, une récolte de *Triticum aestivum* contenant plus de 3 pour cent de grains cariés est considérée comme impropre à la consommation humaine (Fuentes-Davila, 1996).

Il existe d'autres espèces de *Tilletia* qui peuvent être confondues avec *T. indica* et sont couramment observées dans les grains ou les semences récoltés. Il s'agit notamment de *Tilletia walkeri* (champignon pathogène de *Lolium perenne* et *Lolium multiflorum*), *T. horrida* (pathogène de *Oryza* spp.) et *T. ehrhartae* (pathogène de *Ehrharta calycina*). En Australie, on constate que *T. walkeri* et *T. ehrhartae* contaminent les semences récoltées de *Triticum aestivum*. *T. walkeri* et *T. horrida* sont présentes aux États-Unis et sont détectées dans les semences récoltées de *Triticum aestivum*, en particulier lorsque *Oryza* spp. et *Lolium* spp. sont cultivées en rotation avec *Triticum aestivum* (Castlebury, 1998; Castlebury et Carris, 1999; Pascoe *et al.*, 2005). Compte tenu de la similitude morphologique de ces agents pathogènes, il est important de procéder à une identification précise.

## 2. Données taxonomiques

|                                |                                                                                                                             |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nom:</b>                    | <i>Tilletia indica</i> Mitra, 1931                                                                                          |
| <b>Synonyme:</b>               | <i>Neovossia indica</i> (Mitra) Mundkur, 1941                                                                               |
| <b>Classement taxonomique:</b> | Eucaryote, Champignon, Basidiomycète, Ustilaginomycotina, Exobasidiomycetes, Exobasidiomycetidae, Tilletiales, Tilletiaceae |
| <b>Nom commun:</b>             | Carie de Karnal                                                                                                             |
| <b>Référence:</b>              | MycoBank 267835                                                                                                             |

## 3. Détection

Le dispositif de diagnostic de *T. indica*, tel qu'il est présenté dans la figure 3, décrit des procédures pour la détection de téliosporos dans les semences ou les grains des plantes hôtes. Les échantillons de semences ou de grains font l'objet d'un examen visuel dans le but de déterminer la présence éventuelle

de grains cariés (Section 3.1). Si un grain carié est détecté, des télisporos peuvent être prélevées pour identifier *T. indica* à l'aide d'un examen morphologique (Section 4.1).

Si aucun grain carié n'est repéré dans l'échantillon, celui-ci peut être analysé au moyen d'un test de filtration sélective effectué sur trois sous-échantillons afin de détecter la présence éventuelle de télisporos (Section 3.2). Cependant, ce test peut ne pas permettre d'établir une distinction entre les grains infestés et les grains contaminés superficiellement par des télisporos. Si aucune télisporos n'est détectée à l'issue du test de filtration sélective, le résultat du diagnostic relatif à l'échantillon est négatif. Si des télisporos sont détectées, le nombre de télisporos détectées déterminera la méthode qui peut être suivie pour l'identification:

- Lorsque 10 télisporos ou plus sont détectées, la première étape consiste à identifier les espèces auxquelles appartiennent les télisporos (Section 4.1) par un examen de leur morphologie. Si une confirmation complémentaire est requise, l'étape suivante consiste, *soit* à isoler les télisporos et à les faire germer (Section 4.2.1) puis à appliquer les protocoles moléculaires décrits aux Sections 4.3.1 à 4.3.3, *soit* à prélever des télisporos prises individuellement (Section 4.2.3) puis à soumettre chacune d'elles directement à une réaction en chaîne par polymérisation (polymerase chain reaction - PCR) en temps réel (Section 4.3.4) (Voir A, B et C dans la figure 3.)
- Lorsque moins de 10 télisporos sont détectées, afin de parvenir à distinguer *T. indica* des espèces similaires de manière fiable, il est fortement recommandé de répéter le test de filtration sélective sur de nouveaux sous-échantillons. La limite de détection peut être – mais n'est pas forcément – la limite réglementaire.

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention de noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent le degré de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité initialement obtenus.

### 3.1 Examen des semences/grains

L'examen visuel direct, que ce soit pour repérer les grains cariés ou pour repérer les télisporos qui contaminent la surface de semences ou de grains, n'est pas considéré comme une méthode fiable à des fins phytosanitaires. Cependant, les grains cariés peuvent être détectés par un examen visuel à l'œil nu associé à un examen au microscope à faible grossissement (x10 à x40). Ce protocole consiste en l'examen d'un échantillon constitué de 1 kg de semences ou de grains; la totalité de l'échantillon doit être examinée pour que l'on puisse déterminer la présence éventuelle de grains cariés (figure 2) ou de semences d'autres espèces (par exemple *Lolium* spp.). Les symptômes observés et la présence de semences d'autres espèces sont consignés.

Si des grains cariés sont présents, un diagnostic positif peut être établi sur la base de la morphologie des télisporos. Il faut préparer des lames de microscope avec des télisporos et décrire la morphologie de celles-ci. Si la morphologie des télisporos est comparable à celle des télisporos de *T. indica* (voir la Section 4.1 et les figures 4 à 8), un diagnostic positif peut être établi.

Pour faciliter la visualisation des symptômes, les grains peuvent être trempés pendant 24 heures dans une solution à 0,2 % d'hydroxyde de sodium (NaOH), à une température de 20 °C; cette opération permet de blanchir légèrement l'endosperme et fait ressortir par contraste la partie noircie caractéristique de l'infection. Ce processus est particulièrement utile lorsque l'analyse porte sur des lots de semences traitées avec des produits chimiques et que des teintures peuvent gêner l'observation des symptômes (Agarwal et Mathur, 1992; Mathur et Cunfer, 1993). Quand les niveaux d'infestation et de contamination sont élevés, des télisporos peuvent être observées sur la surface des semences (Mathur et Cunfer, 1993).

En l'absence de grains cariés, le test de filtration sélective (Section 3.2) peut être utilisé pour déterminer la présence ou l'absence de *T. indica* dans l'échantillon. Une autre possibilité, en l'absence de grain carié, est de considérer que *T. indica* n'est pas présent. Si l'on constate que des semences de

*Lolium* spp. contaminent l'échantillon, il est fortement probable que *T. walkeri* soit détecté dans cet échantillon.

### 3.2 Extraction des téliospores à partir des semences/grains, test de filtration sélective

Le test de filtration sélective constitue une méthode fiable pour la détection des téliospores de *T. indica* dans un échantillon non traité de *Triticum aestivum*, *Triticum durum* ou *Triticum aestivum* × *Secale cereale*. Il est important d'analyser au moins trois sous-échantillons identiques, constitués de 50 g chacun, pour garantir la détection des téliospores si celles-ci sont présentes dans l'échantillon (voir le tableau 1 qui présente les nombres d'échantillons à prélever pour détecter les téliospores). Cette méthode permet d'assurer la récupération des téliospores avec un taux d'efficacité égal à 82 % en moyenne; de plus, l'examen microscopique ne demande généralement qu'un petit nombre de lames par échantillon de 50 g. La méthode est décrite ci-après et des informations supplémentaires sont disponibles dans Inman *et al.* (2003), Peterson *et al.* (2000) et Wright *et al.* (2003). La limite de détection peut être – mais n'est pas forcément – la limite réglementaire.

Avant d'être utilisé, tout le matériel doit être trempé pendant 15 minutes dans une solution javellisée (1,6 % d'hypochlorite de sodium (NaOCl)) pour éliminer le risque d'obtenir des faux positifs par contamination croisée avec les échantillons précédents. L'eau javellisée tue les téliospores et leur donne une apparence hyaline alors qu'elles sont normalement foncées et pigmentées. Tout le matériel doit être rincé à l'eau courante après le trempage.

L'échantillon de 50 g de semences non traitées est déposé dans une fiole Erlenmeyer (250 ml) contenant 100 ml d'une solution aqueuse à 0,01 % de Tween 20. L'échantillon est placé pendant 3 minutes sur un agitateur réglé à 200 tours/minute, afin de libérer les téliospores, puis est versé sur un filtre de 53 µm positionné au-dessus d'un filtre de 20 µm, qui est lui-même inséré à l'intérieur d'un entonnoir posé sur une autre fiole (500 ml). La fiole qui contient l'échantillon est ensuite rincée deux fois avec 50 ml environ d'eau courante stérile chaque fois. L'eau de rinçage est versée sur l'échantillon déposé sur le filtre. L'échantillon est lavé une nouvelle fois avec de l'eau courante stérile (200–300 ml) au moyen d'une fiole à vide, pour faire en sorte que les téliospores se détachent bien des semences. L'échantillon et le filtre de 53 µm sont retirés. Le filtre de 20 µm est incliné à 45° et, avec une fiole à vide remplie d'eau courante stérile, les débris sont lavés sur le filtre, du haut vers le bas avec un mouvement de balayage latéral allant vers l'arrière et vers l'avant. Ce processus permet d'entraîner toutes les téliospores récupérées à partir de l'échantillon dans la partie inférieure du filtre. Les téliospores et les débris sont ensuite entraînés par lavage à l'intérieur d'un tube de centrifugation à fond conique de 15 ml. Il est important d'utiliser des tubes en polypropylène et non des tubes en polycarbonate car les téliospores adhèrent aux parois de ces derniers, ce qui fausse les résultats. Ces étapes doivent être répétées jusqu'à ce que le filtre de 20 µm apparaisse propre. Le volume final recueilli dans le tube sera approximativement égal à 8 ml. Si nécessaire, on peut examiner le filtre de 20 µm avec un microscope à faible grossissement pour vérifier l'absence de téliospores résiduelles.

La suspension recueillie est centrifugée à 1000 g pendant 3 minutes afin d'isoler les téliospores, qui sont plus denses que la plupart des débris collectés au cours du test de filtration. L'équation permettant de calculer la force centrifuge relative (RCF (g)) à partir de la vitesse en tours par minute (r.p.m) est  $RCF = 1,12 r_{\max} (r.p.m./100)^2$ , où  $r_{\max}$  est le rayon de rotation maximal (en mm), c'est-à-dire la distance entre l'axe du rotor et l'extrémité du tube à centrifuger. Le surnageant est soigneusement éliminé, sans que le culot ne soit dérangé, à l'aide d'une nouvelle pipette Pasteur à usage unique. Le culot peut alors être observé au microscope. Si le culot est trop épais, on peut ajouter de l'eau pour diluer la suspension puis mélanger l'eau et le culot avec l'extrémité d'une pipette pour obtenir une suspension homogène avant de procéder à l'examen au microscope.

La totalité de la suspension est placée par lots de 20 µl sur des lames de microscope qui sont ensuite recouvertes d'une lamelle. Les lames sont examinées au moyen d'une microscopie fond clair avec un grossissement de x20 à x40. Il est important d'examiner chaque millimètre carré de la suspension étalée sur la lame pour détecter la présence de téliospores. Si des téliospores sont détectées, les

caractéristiques morphologiques (par exemple, la taille, la couleur et l'ornementation) et le nombre des téliospores observées sur chaque lame doivent être consignés.

**Tableau 1.** Nombre de sous-échantillons identiques de 50 g qu'il est nécessaire de prélever pour détecter différents niveaux de contamination avec des niveaux de confiance donnés, dans l'hypothèse où les téliospores sont uniformément réparties (Peterson *et al.*, 2000)

| Niveau de contamination<br>(nombre de téliospores par<br>échantillon de 50 g) | Nombre d'échantillons identiques à prélever pour que la détection soit<br>effectuée avec un niveau de confiance donné (%) |        |         |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|
|                                                                               | 99 %                                                                                                                      | 99,9 % | 99,99 % |
| 1                                                                             | 3                                                                                                                         | 5      | 6       |
| 2                                                                             | 2                                                                                                                         | 3      | 4       |
| 5                                                                             | 1                                                                                                                         | 1      | 1       |

## 4. Identification

L'identification de *T. indica* est basée a) soit sur les symptômes présents par les grains et sur la morphologie des téliospores, b) soit sur la morphologie des téliospores et sur la détection de la séquence d'ADN caractéristique au moyen de l'une des techniques PCR (voir la figure 3).

### 4.1 Morphologie des téliospores

Quand la présence de téliospores suspectes est constatée au cours d'un test de filtration, on peut examiner une nouvelle fois les grains du (des) sous-échantillon(s) analysé(s) et de l'échantillon principal à la recherche de symptômes. Si des symptômes sont observés, ils devraient être confirmés par un examen des téliospores au microscope. La semence de graminée trouvée dans l'échantillon devrait également être examinée à la recherche de signes d'infestation par une carie et, dans les cas où une infestation est constatée, les téliospores associées devraient être examinées au microscope. Si les téliospores recueillies au cours du test de filtration sont identiques à celles qui sont observées sur les grains cariés, un diagnostic peut être établi. Si, cependant, aucun grain carié n'est décelé dans l'échantillon principal, il est recommandé de procéder à une analyse avec l'un des tests moléculaires (Sections 4.3.1 à 4.3.4) pour effectuer l'identification.

Le tableau 2 donne la liste des caractéristiques morphologiques des téliospores de *T. indica* ainsi que des téliospores des espèces courantes de *Tilletia* qui peuvent être observées dans les envois de semences ou de grains et peuvent être confondues avec *T. indica*.

#### 4.1.1 Identification morphologique

Les téliospores de *T. indica* sont globuleuses à subglobuleuses avec, parfois, de petits fragments d'hyphes attachés (plus communément sur les téliospores immatures mais, à l'occasion, aussi sur les téliospores matures); elles mesurent le plus souvent de 22 µm à 47 µm de diamètre, mais peuvent parfois atteindre 64 µm de diamètre (moyenne 35 µm à 41 µm); elles sont de couleur ocre clair à brun rougeâtre foncé; les téliospores matures sont noires et opaques (figures 4 et 5); elles sont densément ornementées avec des échinules à pointe aiguë à tronquée, parfois à l'extrémité recourbée, hautes de 1,4 µm à 5,0 µm (au maximum 7 µm), qui apparaissent en vue de surface soit comme des échinules indépendantes (densément échinulées), soit comme de fines arêtes séparées par des espaces étroits (finement cérébriformes) (figures 4 et 5); les échinules sont gainées par une mince membrane hyaline (Carris *et al.*, 2006; CMI, 1983).

Les cellules stériles de *T. indica* sont globuleuses, subglobuleuses à lacrymiformes (en forme de larme), de couleur ocre jaune, d'une dimension de 10 µm à 28 µm × 48 µm, avec ou sans apicule

(courte tige), et avec des parois lisses, ayant jusqu'à 7 µm d'épaisseur, et laminées. Les cellules stériles sont habituellement rares dans les filtrats (Carris *et al.*, 2006; CMI, 1983).

Si 10 téliospores ou plus sont observées au cours d'un test de filtration, alors l'identification morphologique peut être confirmée. Si moins de 10 téliospores sont détectées, les caractéristiques morphologiques ne sont pas considérées comme suffisamment fiables pour garantir une identification sûre (OEPP, 2007). Dans ce cas, il est recommandé de procéder à un rééchantillonnage en préparant de nouveaux sous-échantillons à partir de l'échantillon initial de 1 kg, et de répéter l'analyse.

#### 4.1.2 Comparaison morphologique avec d'autres espèces de *Tilletia*

Les caractéristiques morphologiques les plus importantes qui différencient *T. indica*, *T. walkeri*, *T. horrida* et *T. ehrhartae* sont la taille (fourchette de valeurs et moyenne), l'ornementation et la couleur des téliospores (tableau 2; figures 4 à 8). Les rapports publiés indiquent souvent des valeurs différentes pour la taille des spores. Celle-ci est influencée par le milieu de montage et les traitements thermiques. Dans Pascoe *et al.* (2005), il est démontré que, en Australie, *T. walkeri* et *T. ehrhartae* sont des contaminants courants des récoltes de *Triticum aestivum*. Aux États-Unis, le champignon morphologiquement et génétiquement similaire *T. walkeri* ainsi que *T. horrida* sont des contaminants connus des récoltes de *Triticum aestivum* (Castlebury et Carris, 1997; Cunfer et Castlebury, 1999; Smith *et al.*, 1996). Outre les espèces de *Tilletia* dont il est fait mention dans le tableau 2, d'autres espèces de *Tilletia* à spores en forme de tubercule peuvent être confondues avec *T. indica* (Durán, 1987; Durán et Fischer, 1961; Pimentel *et al.*, 1998). La probabilité que ces espèces soient observées en tant que contaminants de *Triticum aestivum* est moindre. Il s'agit des espèces suivantes: *Tilletia barclayana sensu lato* (charbon de diverses poacées, par exemple *Lanicum* et *Paspalum*), *Tilletia eragrostidis* (sur *Eragrostis*), *Tilletia inolens* (sur *Lechnagrostis filiformis*), *Tilletia rugispora* (sur *Paspalum*) et *Tilletia boutelouae* (sur *Bouteloua gracilis*). Aucune infestation naturelle de *Triticum aestivum* par l'une ou l'autre de ces espèces morphologiquement similaires n'a jamais été observée.

Les profils en plan médian des échinules de téliospores peuvent être rendus plus visibles si l'on décolore les téliospores dans une solution à 1 % de NaOCl pendant 15 à 20 minutes. Au besoin, les téliospores peuvent ensuite être rincées deux fois à l'eau et colorées, par exemple avec du bleu trypan ou une solution de bleu coton dans du propylène glycol (figure 8).

#### 4.2 Isolement et germination des téliospores

Il existe maintenant deux méthodes pour confirmer l'identification des téliospores détectées au cours du test de filtration (Section 4.2). L'une est la procédure normale consistant à récupérer les téliospores montées sur les lames et à induire leur germination (Section 4.2.1), l'autre est une nouvelle procédure mise au point par Tan *et al.* (2009) qui permet d'appliquer directement la technique PCR à une seule téliospore prélevée sur la lame (Section 4.2.3).

##### 4.2.1 Germination des téliospores

*T. indica* est un biotrophe facultatif. Pour produire des cultures, les téliospores sont soumises à un trempage dans l'eau puis à une rapide stérilisation de surface avant d'être mises à germer sur de l'eau gélosée.

Les téliospores peuvent être prélevées sur les lames et les lamelles par lavage avec de l'eau distillée au-dessus du filtre à 20 µm puis à l'intérieur d'un tube de centrifugation stérile à fond conique (comme expliqué dans la Section 3.2). Le volume recueilli devrait être de 3 ml à 5 ml environ. Les tubes sont incubés pendant toute la nuit à 21 °C, dans le but d'hydrater les téliospores et de rendre les contaminants fongiques et bactériens plus sensibles à la stérilisation de surface qui sera effectuée par la suite. Après une nuit d'incubation, les téliospores sont sédimentées par centrifugation à 1200 g pendant 3 minutes.

Le surnageant est éliminé et les téliospores sont stérilisées par suspension du culot dans 5 ml d'une solution javellisée (0,3 % à 0,5 % de NaOCl), puis le tube est rapidement retourné trois fois de suite avant d'être centrifugé à 1200 g pendant 1 minute. Un certain nombre de téliospores peuvent être tuées

pendant l'opération si le temps total qu'elles passent dans la solution javellisée est supérieur à 2 minutes. Une autre option consiste à stériliser la surface des téliospores en plaçant celles-ci pendant 30 minutes dans 5 à 10 ml d'eau électrolysée acide. L'eau électrolysée acide stérilise efficacement la surface des téliospores et, par rapport au traitement à la solution javellisée pendant 1 à 2 minutes, stimule plus qu'elle ne freine la germination des téliospores (Bonde *et al.*, 1999). Les téliospores sont ensuite lavées deux fois en éliminant le surnageant, en remettant en suspension le culot dans 1 ml d'eau distillée stérile (SDW) et en centrifugeant à 1 200 g pendant 5 minutes.

Le culot est remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile puis 200 µl de la suspension de téliospores sont placés dans des conditions aseptiques sur de l'eau gélosée à 2 % additionnée d'antibiotiques (boîtes de gélose avec antibiotiques) et étalés avec un étaleur stérile. Les antibiotiques employés sont 60 mg de pénicilline-G (sel de sodium) et 200 mg de sulfate de streptomycine par litre de gélose (OEPP, 2007). Les boîtes de gélose avec antibiotiques sont incubées à 21 °C avec un cycle de lumière de 12 heures sur 24 heures puis sont laissées 5 jours environ avant d'être scellées ou placées à l'intérieur de sachets en polyéthylène transparents.

Après 7 à 14 jours, les téliospores non dormantes donnent naissance à un promycélium qui porte 32 à 128 basidiospores (sporidies primaires), voire plus, à son extrémité. Ces colonies produisent des sporidies secondaires qui sont généralement de deux types: filiforme et allantoïde. Ces sporidies peuvent alors être cultivées directement sur un milieu solide (figure 9) ou un milieu nutritif liquide tel qu'un Potato Dextrose Broth (PD Broth: bouillon dextrosé à la pomme de terre). De petits blocs de gélose (1 cm × 1 cm) portant soit des téliospores qui ont germé, soit des colonies, sont découpés et collés sur la face inférieure du couvercle d'une boîte de Petri afin que la téliospore germée soit placée au-dessus de la surface du milieu liquide. De cette manière, les sporidies sont relâchées sur la surface du liquide. Les boîtes de Petri sont incubées à 21 °C avec un cycle de lumière de 12 heures sur 24 heures. Après 2 à 3 jours, les basidiospores déposées sur la surface du milieu liquide produisent de petites plaques de filaments mycéliens de 0,5 à 1,0 mm de diamètre. Chaque plaque de filaments est prélevée avec une aiguille stérile puis est légèrement mise en contact avec du papier filtre stérile afin que celui-ci absorbe le liquide en excès. Le mycélium est déposé dans des flacons adaptés (par exemple des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml à 2,0 ml) en cas d'extraction immédiate de l'ADN, ou stocké à – 80 °C pour une extraction d'ADN ultérieure.

La germination des téliospores à des fins d'analyse moléculaire peut ne pas être toujours possible; par exemple, lorsque les semences sont traitées avec du NaOH, comme c'est le cas pour les grains traités au fongicide. En accroissant le nombre de sous-échantillons soumis à la filtration, on peut accroître le nombre de téliospores récupérées et donc, le nombre de téliospores que l'on peut mettre à germer. Les téliospores peuvent avoir une période de dormance, avec d'éventuelles répercussions sur la germination (Carris *et al.*, 2006). Il est possible de surmonter ces problèmes en appliquant directement la technique PCR en temps réel sur des téliospores individuelles (voir la Section 4.3.4).



**Tableau 2.** Caractéristiques morphologiques des téliospores de *Tilletia indica*, *Tilletia walkeri*, *Tilletia horrida* et *Tilletia ehrhartae*, et hôtes associés à ces quatre espèces

| Espèces                          | Taille des téliospores (en µm) | Taille des téliospores (moyenne) (en µm) | Couleur des téliospores                                            | Forme des téliospores      | Gaine des téliospores                                                           | Échinules des téliospores                                                                                                                                                                                                                                                                  | Hôte                                               |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <i>T. indica</i> <sup>a</sup>    | 22–64                          | 35–41                                    | Ocre clair à brun rougeâtre foncé, spores matures noires à opaques | Globuleuse à subglobuleuse | Présente                                                                        | 1,4 µm à 5 (à 7) µm<br>En vue de surface, spores densément échinulées avec de fines arêtes séparées par des espaces étroits (normalement cérébriformes).<br>En vue médiane, profil plus lisse et régulier en raison de la densité des échinules, dont les pointes sont parfois recourbées. | <i>Triticum</i> spp.                               |
| <i>T. walkeri</i> <sup>b</sup>   | 28–35                          | 30–31                                    | Jaune pâle à brun rougeâtre foncé (jamais noire ni opaque)         | Globuleuse                 | Présente, étendue jusqu'aux extrémités des projections, hyaline à brun jaunâtre | 3 µm à 6 µm<br>Agencement grossier +/- cérébriforme.<br>En vue de surface, arêtes larges irrégulièrement cérébriformes.<br>En vue médiane, le profil est irrégulier avec des espaces entre les échinules.                                                                                  | <i>Lolium perenne</i> et <i>Lolium multiflorum</i> |
| <i>T. horrida</i> <sup>c</sup>   | 14–36 (mature <25)             | 24–28                                    | Certaines spores châtâtres foncées, peut être seulement opaques    | Globuleuse à subglobuleuse | Présente, étendue jusqu'aux pointes des échinules, hyaline à colorée            | 1,5 µm à 4 µm<br>Fréquemment recourbées et, en vue de surface, apparaissent comme des motifs polygonaux.                                                                                                                                                                                   | <i>Oryza</i> spp.                                  |
| <i>T. ehrhartae</i> <sup>d</sup> | 17–25                          | Pas de données                           | Brun olivâtre très foncé quand mature. Peut être                   | Globuleuse à subglobuleuse | Présente, étendue jusqu'au                                                      | 1 µm à 2,5 µm<br>Échinules cylindriques ou légèrement                                                                                                                                                                                                                                      | <i>Ehrharta calycina</i>                           |

opaque en raison  
de la mélanisation  
des écailles.

sommet des  
échinules ou  
un peu au-  
delà

fuselées.

En vue de surface, spores rarement  
cérébriformes. Figures polygonales  
plus larges et marquées.

En vue médiane, largement tronquées  
à légèrement arrondies au sommet.

Notes: <sup>a</sup>Données basées sur Inman *et al.* (2003). <sup>b</sup>Données basées sur Castlebury, 1998; Milbrath *et al.*, 1998; Castlebury et Carris, 1999; Cunfer et Castlebury, 1999. <sup>c</sup>Comme *T. barclayana*: Durán et Fischer, 1961; CMI, 1965; Durán, 1987; Castlebury et Carris, 1999. Comme *T. korrida*: Hannah et Payak, 1968; Aggarwal *et al.*, 1990; Castlebury, 1998. <sup>d</sup>Pascoe *et al.*, 2005.

REVOQUÉ

#### 4.2.2 Germination d'espèces de *Tilletia* similaires

Lorsqu'elles sont mises en culture, *T. walkeri* et *T. indica* produisent des colonies très similaires. Cultivées sur Potato Dextrose Agar (PDA: gélose dextrosée de pomme de terre) après 14 jours à 19 °C avec un cycle de lumière de 12 heures sur 24 heures, les deux espèces produisent généralement des colonies encroûtantes irrégulières à croissance lente de couleur blanche à crème, dont le diamètre varie de 4 à 6 mm environ (figure 9). En revanche, dans des conditions comparables, *T. horrida* croît sensiblement plus lentement (les colonies ont seulement de 2 à 3 mm de diamètre) car sa température optimale de culture est plus élevée. Des isolats de *T. horrida* peuvent aussi produire un pigment violet tirant sur le rouge (figure 9), que ce soit sur PDA ou PD Broth.

#### 4.2.3 Récupération de téliospores isolées

Une fois les téliospores examinées et leur morphologie consignée, la lame est mise à sécher, avec ou sans la lamelle. Quand la lamelle est retirée, elle est déposée à l'envers sur la lame de manière à ce qu'on puisse vérifier la présence éventuelle de téliospores qui auraient adhéré à la surface de la lamelle.

Un petit fragment de lamelle, obtenu en coupant une lamelle en petits morceaux ( $1 \times 1 \text{ mm}^2$ ) est stérilisé (à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes ou dans un four à 170 °C pendant 2 h) puis placé sur une autre lame. Une goutte de 1 µl de tampon Tris- acide éthylène diamine tétra-acétique (Tris-EDTA) est déposée sur ce fragment de lamelle. Sous l'objectif d'un microscope composé ou d'un microscope à dissection, une unique téliospore est prélevée avec une aiguille très fine et est placée dans la goutte de tampon TE. La téliospore sera transférée dans la goutte. Un autre petit fragment de lamelle stérilisé est déposé sur l'ensemble avec une pince de type brucelles pour confectionner un «sandwich». La téliospore est écrasée avec les brucelles que l'on presse sur le fragment de lamelle supérieur, puis le sandwich de verre est transféré dans un tube pour PCR de 0,2 ml. Le fragment supérieur est à nouveau écrasé avec l'extrémité d'une pipette (Tan *et al.*, 2009).

L'étape suivante de la procédure est décrite à la Section 4.3.4.1.

#### 4.3 Identification moléculaire

Il existe plusieurs méthodes moléculaires pour l'identification de *T. indica*. L'une ou l'autre des méthodes décrites ci-après peut être utilisée, cependant, il est essentiel que le matériel de référence (témoins positifs) ait été obtenu de spécialistes du domaine (voir la Section 6).

Les trois premiers protocoles décrits ci-après fonctionnent bien mais dépendent de la germination des téliospores puisqu'il faut qu'une quantité suffisante d'ADN puisse être extraite de la plaque de filaments mycéliens qui a été produite. La germination des téliospores peut demander jusqu'à trois semaines. Dans Peterson *et al.* (2000), le taux de germination moyen des téliospores a été évalué à 55 %, ce qui réduit considérablement les chances d'identifier les téliospores par ces trois méthodes moléculaires. Un quatrième protocole moléculaire, indépendant de la germination des téliospores, est donc décrit.

Sur le plan du diagnostic, des différences importantes existent entre *T. indica*, *T. walkeri* et *T. horrida*, s'agissant de leur ADN nucléaire et mitochondrial (mt). Des polymorphismes interspécifiques ont été identifiés au moyen de diverses méthodes de PCR, notamment par RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Laroche *et al.*, 1998; Pimentel *et al.*, 1998). Dans les régions 1 et 2 de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique (r) nucléaire, il existe une similarité > 98 % entre les séquences de *T. walkeri* et *T. indica* (Levy *et al.*, 2001). Cependant, dans la région ITS1, *T. walkeri* est dotée d'un site reconnu par une enzyme de restriction (*Sca*1) qui n'est pas présent chez *T. indica*, *T. horrida* ou d'autres espèces très proches, ce qui rend ce site important sur le plan du diagnostic (Levy *et al.*, 2001; Pimentel *et al.*, 1998). Les différences entre les séquences d'ADNmt ont permis de mettre au point des amorces spécifiques de l'espèce pour *T. indica* et *T. walkeri* (Frederick *et al.*, 2000). Ces amorces peuvent être employées en PCR conventionnelle, dans un système

TaqMan® utilisé en conjonction avec une sonde (Frederick *et al.*, 2000) ou en PCR en temps réel multiplex réalisée avec cinq sondes (Tan *et al.*, 2009).

#### 4.3.1 Analyse de la région ITS1 par enzymes de restriction

La région génomique cible est la région ITS du gène de l'ARNr nucléaire (Pimentel *et al.*, 1998). L'amplicon produit par la PCR comprend à la fois les régions ITS1 et ITS2 et le fragment conservé 5.8S. Cet amplicon se compose de 670 paires de base (pb) environ, y compris les séquences des amorces. Les oligonucléotides employés pour *T. indica* sont les suivants:

Amorce sens ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Amorce antisens ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).

L'ADN est extrait du mycélium. On procède à cette extraction en broyant le mycélium avec un mortier et un pilon ou bien en plaçant environ 0,1 g de mycélium dans un tube de microcentrifugation stérile de 2 ml, rempli jusqu'au tiers de son volume avec des billes de verre stériles de 0,5 mm de diamètre et 1 ml d'eau de qualité biologie moléculaire. Le tube est fermé hermétiquement avec un bouchon à vis doté d'un joint o-ring, puis est agité dans un beadbeater (agitateur secoueur) ou dans un broyeur de tissu réglé au quart de sa puissance, pendant 5 minutes. L'échantillon broyé est mis à reposer pendant 30 secondes, puis son ADN est extrait au moyen d'un kit d'extraction d'ADN fongique disponible dans le commerce. Il n'est pas utile de purifier l'ADN. L'ADN extrait est soit employé immédiatement, soit conservé à 4 °C pour la nuit, soit stocké à -20 °C pour des périodes plus longues.

La PCR visant à produire l'amplicon à digérer est réalisée dans le mélange réactionnel suivant (concentration pour 50 µl de volume réactionnel individuel): 1× tampon PCR (contenant 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) (Applied Biosystems))<sup>1</sup>, 0,2 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP), 1,25 µl d'AmpliTaq (5 U/µl) (Applied Biosystems)<sup>1</sup>, 0,5 µM de chaque amorce et 1 µl d'ADN extrait. Les paramètres des cycles de la PCR sont les suivants: une dénaturation à 94 °C pendant 2 minutes; 30 cycles à 94 °C pendant 1 minute, à 54 °C pendant 1 minute et à 72 °C pendant 1 minute; et une phase d'élongation à 72 °C pendant 10 minutes.

La digestion de l'amplicon PCR est réalisée comme suit. Le mélange de restriction (concentration pour 20 µl de volume réactionnel individuel): 7,3 µl d'eau de qualité biologie moléculaire, 2,0 µl de tampon de restriction (Promega)<sup>2</sup>, 0,2 µl d'albumine de sérum bovin (bovine serum albumin) (10 µg/µl), 0,5 µl d'enzyme de restriction (soit *TaqI* soit *ScaI* à raison de 10 U/µl (Promega))<sup>2</sup> et 10,0 µl net de solution d'amplicon d'ADN tel qu'il a été produit par la méthode décrite plus haut (> 50 ng/µl d'ADN). Le mélange est incubé pendant 3 heures à 37 °C et le contenu du tube est doucement mélangé par inversion pendant l'incubation. Les produits de la restriction sont stockés à 4 °C avant d'être visualisés sur un gel. Si nécessaire, on peut ajouter un marqueur adapté à 10 µl du produit de la réaction avant de réaliser une migration sur un gel à 2 %.

L'essai est positif pour *T. indica* si les échantillons amplifiés analysés sont coupés par l'enzyme de restriction *TaqI* pour donner cinq produits (fragments de 60, 70, 110, 170 et 260 pb) et s'il n'y a pas de coupure provoquée par *ScaI*. Le résultat est positif pour *T. walkeri* si les échantillons amplifiés analysés sont coupés par *TaqI* pour donner les mêmes cinq fragments qu'avec *T. indica* et si *ScaI*

<sup>1</sup> L'emploi des produits de la marque Applied Biosystems dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

<sup>2</sup> L'emploi des produits de la marque Promega dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

coupe les produits amplifiés pour donner deux fragments: à 140 pb et 520 pb. Lorsque le produit amplifié est issu de *T. horrida*, *TaqI* produit quatre fragments d'ADN (60, 110, 150 et 335 pb) et *ScaI* ne provoque pas de coupure. Les autres espèces de *Tilletia* produisent des cartes de restriction différentes avec ces enzymes et avec d'autres (Pimentel *et al.*, 1998)

#### 4.3.2 PCR conventionnelle réalisée avec des amorces spécifiques d'espèces

Cet essai conçu par Frederick *et al.* (2000) utilise l'ADNmt<sup>3</sup> et produit un amplicon de 414 pb. Les oligonucléotides employés pour *T. indica* sont les suivants:

Amorce sens Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

Amorce antisens Tin 4 (5'-CAA CTC CAG TGA TGG CTC CG-3').

L'ADN est extrait du mycélium. À cet effet, on broie 0,5 g à 1,0 g de mycélium avec 75 µl de tampon de lyse dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml, à l'aide d'un piston stérile fixé à un moteur rotatif. On ajoute 75 µl de tampon de lyse avant de procéder à l'extraction de l'ADN au moyen d'un kit d'extraction d'ADN fongique disponible dans le commerce. Il n'est pas utile de purifier l'ADN. L'ADN extrait est soit employé immédiatement, soit conservé à 4 °C pour la nuit, soit stocké à -20 °C pour des périodes plus longues.

Pour cet essai de PCR, le mélange réactionnel employé est le suivant (concentration pour 25 µl de volume réactionnel individuel): 1x tampon PCR (contenant 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de chlorure de potassium (KCl) (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,001 % (poids/volume) de gélatine); les désoxynucléotides triphosphates, dATP, dGTP, dCTP et dTTP, chacun, une concentration de 0,1 µM; chaque amorce à une concentration de 0,1 µM; 0,5 U d'ADN polymérase *AmpliTaq*; et 1,0 µl d'ADN extrait selon la méthode décrite plus haut.

Les paramètres des cycles de la PCR sont les suivants: dénaturation à 94 °C pendant 1 minute; 25 cycles à 94 °C pendant 15 secondes, à 65 °C pendant 15 secondes et à 72 °C pendant 15 secondes; et une phase d'élongation à 72 °C pendant 6 minutes.

Si nécessaire, 10 µl du produit de la réaction seront mélangés à un tampon de charge approprié et déposés pour migration sur un gel d'agarose 2 %.

Lorsque l'analyse porte sur *T. walkeri*, l'amorce Tin 3 est remplacée par 0,1 µl d'amorce sens Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AG-3') (25 µM). De cette manière, on produit un amplicon de 414 pb.

Les réactions positives produisent un seul amplicon de 414 pb, à la fois pour *T. indica* (amorces Tin 3/Tin 4) et pour *T. walkeri* (amorces Tin 11/Tin 4). Si les amorces spécifiques de *T. walkeri* et de *T. indica* ne donnent pas de résultat positif pour les échantillons analysés (alors que les échantillons d'ADN de témoins positifs sont effectivement positifs), alors l'ADN extrait des échantillons appartient à une autre espèce de *Tilletia*, telle que *T. horrida*. L'analyse par enzymes de restriction peut permettre d'identifier plus précisément l'espèce de ces échantillons, si nécessaire (Section 4.3.1).

Il se peut aussi que l'absence d'amplification s'explique par la mauvaise qualité de l'ADN. Cette éventualité peut être vérifiée en analysant les extraits avec les amorces universelles (ITS1 et ITS4) décrites à la Section 4.3.1. Si les échantillons contiennent de l'ADN de bonne qualité et donc si les

<sup>3</sup> Ferreira et ses collègues ont soumis les identifiants GenBank AF218058, AF218059 et AF218060. Cette séquence mitochondriale présente peu de similitude avec une séquence d'ADN mitochondrial de *T. indica* dont l'identifiant est DQ993184: les résultats obtenus avec BLAST (un outil de recherche de similitude de séquences) n'indiquent que 30 % environ de similitude. Dans la composition de base de l'ADN mitochondrial, le contenu en paires AT (adénine – thymine) est plus élevé que le contenu en paires GC (guanine – cytosine), qui est généralement de l'ordre de 30 % à 40 % (Kurtzman, 1985), or, le contenu en AT des trois séquences soumises à GenBank par Ferreira et ses collègues est égal à 43,5 %, soit moins que le contenu en GC (56,55 %). (C) Les amorces Tin3/Tin4 ne peuvent pas servir à amplifier l'ADN mitochondrial pour donner l'amplicon attendu quand elles sont dérivées de l'ADN mitochondrial de *T. indica* extrait et purifié; c'est pourquoi les trois séquences soumises font référence à l'ADN génomique.

échantillons analysés ne sont ni *T. indica* ni *T. walkeri* mais une autre espèce de *Tilletia*, alors la migration des amplicons PCR sur un gel d'agarose produira une seule bande (de 670 pb environ). Si l'on n'observe toujours pas d'amplification, de l'ADN frais devrait être à nouveau extrait et analysé.

#### 4.3.3 Essai PCR réalisé avec des amorces spécifiques d'espèces et une sonde fluorescente

Cet essai conçu par Frederick *et al.* (2000) utilise de l'ADN génomique et produit un amplicon de 212 pb. Les oligonucléotides employés pour *T. indica* sont les suivants:

Amorce sens Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

Amorce antisens Tin 10 (5'-AGCTCCGCCTCAAGTTCCTC-3')

Sonde pour PCR en temps réel: sonde TaqMan® (10 µM) (Applied Biosystems<sup>1</sup>): 5: osys label)-ATT CCC GGC TTC GGC GTC ACT-(TAMRA quencher)-3nc

L'ADN est extrait du mycélium selon la méthode décrite à la Section 4.3.2.

Pour cet essai de PCR, le mélange réactionnel employé est le suivant (concentration pour 25 µl de volume réactionnel individuel): 1× mélange TaqMan® Universal Master Mix, 0,4 µM soit d'amorces Tin3/Tin10 soit d'amorces Tin11/Tin10 et 4 µM de la sonde, 12,5 ng d'ADN génomique (obtenu selon la méthode décrite à la Section 4.3.2) pour, à la fois les essais spécifiques de *T. indica* et les essais spécifiques de *T. walkeri*. Les paramètres des cycles de la PCR sont les suivants: 50 °C pendant 2 minutes, 95 °C pendant 10 minutes et 34 cycles à 95 °C pendant 15 secondes et à 60 °C pendant 1 minute.

Les tubes de réaction et les bouchons employés seront adaptés à une amplification en temps réel.

Lorsque l'analyse concerne *T. walkeri*, Tin 3 est remplacée par 1,0 µl d'amorce sens Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 µM), ce qui produit un amplicon de 212 pb.

*T. indica* donne lieu à une amplification avec les amorces Tin 3/Tin 10 et *T. walkeri* avec les amorces Tin 11/Tin 10. Si ni l'un ni l'autre des couples d'amorces ne produit d'amplification mais, si les échantillons témoins réagissent conformément à ce qui est attendu, alors l'ADN extrait des échantillons appartient à une autre espèce de *Tilletia*, telle que *T. horrida*. Lorsque l'analyse porte sur *T. indica* et que le «cycle seuil» (threshold cycle (Ct)) de l'échantillon est > 33, le résultat indique que le diagnostic est négatif pour *T. indica* et qu'il est fortement probable que l'on soit en présence d'une autre espèce de *Tilletia*. De même, lorsque l'analyse porte sur *T. walkeri* et que le Ct est > 33, le résultat indique que le diagnostic est négatif pour *T. walkeri* et qu'il est fortement probable que l'on soit en présence d'une autre espèce de *Tilletia*. L'analyse par enzymes de restriction peut permettre d'identifier plus précisément l'espèce de ces échantillons, si nécessaire (Section 4.3.1).

Il se peut aussi que l'absence d'amplification s'explique par la mauvaise qualité de l'ADN. Cette éventualité peut être vérifiée en analysant les extraits avec les amorces universelles (ITS1 et ITS4) décrites à la Section 4.3.1. Si les échantillons contiennent de l'ADN de bonne qualité et donc si les échantillons analysés ne sont ni *T. indica* ni *T. walkeri* mais une autre espèce de *Tilletia*, alors la migration des amplicons PCR sur un gel d'agarose produira une seule bande (de 670 pb environ). Si l'on n'observe toujours pas d'amplification, de l'ADN frais devrait être à nouveau extrait et analysé.

On a constaté que la limite de sensibilité des essais relatifs à *T. indica* et à *T. walkeri* était de 5 pg d'ADN total. Cette concentration produit des niveaux de fluorescence détectables (Frederick *et al.*, 2000). La spécificité des essais à l'égard de l'espèce a été soumise à une contre-vérification avec de l'ADN extrait de *T. barclayana*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia controversa* et *Tilletia fusca*. Aucun de ces isolats n'a donné lieu à une amplification, que ce soit dans les essais spécifiques de *T. indica* ou dans les essais spécifiques de *T. walkeri* (Frederick *et al.*, 2000).

#### 4.3.4 PCR en temps réel directe sur des téliospores

Cet essai a été conçu par Tan *et al.* (2009) en vue d'utiliser la région ITS qui se situe entre l'ADNr nucléaire de la petite sous-unité et celui de la grande sous-unité du ribosome. Il a été observé que les

espèces de *Tilletia* étaient dotées de deux régions variables (ITS1 et ITS2) séparées par le gène de l'ARNr 5.8S conservé (Levy *et al.*, 2001; Tan et Murray, 2006). Le protocole prévoit, en premier lieu, l'amplification de l'ADN spécifique de *Tilletia*, puis l'utilisation de la PCR en temps réel avec des sondes fluorescentes pour identifier les espèces de *Tilletia*. Dans la présente étude, l'essai multiplex est conçu de façon à cibler la région ITS1 de l'ADNr; il s'agit d'un essai quintuplex de PCR réalisé avec des sondes fluorescentes afin d'identifier les espèces voisines de *Tilletia* détectées dans les grains.

Une partie aliquote du mélange réactionnel est ajoutée dans le tube de PCR (voir la Section 4.2.3) et, avec l'extrémité de la même pipette, on brise le sandwich de verre en morceaux pour libérer le matériel de la spore. Il est important de veiller à ce que le tube PCR ne soit pas cassé lorsque l'on procède à ce broyage.

#### 4.3.4.1 Amplification de l'ADN de *Tilletia* avant la réalisation de la PCR en temps réel

L'amplification de l'ADN spécifique de *Tilletia* présent dans les diverses espèces de *Tilletia* est réalisée avec les amorces MK56 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3') (Tan *et al.*, 1996) et Tilletia-R (5'-CAA GAG ATC CGT TGT CAA AAG TTG-3') (Tan et Murray, 2006). Chaque PCR est effectuée dans 20 µl (volume réactionnel individuel) contenant 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chacun des quatre désoxynucléotides, dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 0,5 µM de chacune des deux amorces et 0,5 U d'ADN polymérase Taq (Invitrogen<sup>4</sup>) dans 1× tampon (50 mM de Tris (pH 9,0), 20 mM de NaCl, 1 % de Triton X-100 et 0,1 % de gélatine).

Les paramètres des cycles de la PCR sont les suivants: un cycle initial à 95 °C pendant 3 minutes; 20 cycles à 94 °C pendant 20 secondes, à 63 °C pendant 30 secondes et à 72 °C pendant 30 secondes, avec la température d'hybridation décroissant de 1 °C par cycle pendant 5 cycles jusqu'à 59 °C; et enfin une incubation à 72 °C pendant 10 minutes et à 4 °C pendant 1 minute.

Les produits de la restriction peuvent être stockés à 4 °C. Pour les visualiser sur un gel, un tampon de charge adapté est ajouté à 10 µl du produit de la réaction puis la migration est réalisée sur un gel d'agarose à 2 %. La taille attendue du fragment est égale à 260 pb. Cependant, ce fragment ne sera pas visible si la PCR est effectuée avec une seule téliospore, car il n'y aura pas suffisamment d'ADN présent.

#### 4.3.4.2 Essai quintuplex de PCR en temps réel réalisé avec des sondes fluorescentes pour l'identification des espèces

Les essais de PCR en temps réel effectués avec les sondes d'hydrolyse et les oligonucléotides amorces (tableau 3) dans 20 µl de volume réactionnel placés dans des microtubes de 0,1 ml adaptés, sont réalisés dans l'appareil Rotor-Gene 6000 (Qiagen<sup>5</sup>). Le mélange de la réaction quintuple est composé comme suit: 1× ImmoBuffer (Bioline<sup>6</sup>), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chacun des quatre

<sup>4</sup> L'emploi des produits de la marque Invitrogen dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

<sup>5</sup> L'emploi des produits de la marque Qiagen dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

<sup>6</sup> L'emploi des produits de la marque Bioline dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

désoxynucléotides, dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 1U d'ADN polymérase Immolase™ (Bioline<sup>6</sup>) et 0,2 µM, 0,4 µM et 0,9 µM de chacune des sondes, chacune des quatre amorces sens et chacune des quatre amorces antisens, respectivement (tableau 3). L'ADN testé est constitué par 1 µl du produit de l'amplification PCR de l'ADN spécifique de *Tilletia* (Section 4.3.4.1).

Les paramètres des cycles de la PCR sont les suivants: un cycle initial à 95 °C pendant 10 minutes suivi par 40 cycles à 94 °C pendant 15 secondes et 65 °C pendant 60 secondes, avec la température d'hybridation décroissant de 1 °C par cycle pendant 6 cycles jusqu'à 60 °C. L'option de la normalisation dynamique tube par tube est employée pour déterminer les caractéristiques générales moyennes de chaque échantillon individuel avant le commencement de l'amplification. Les données relatives à la fluorescence sont consignées pour cinq canaux: vert, jaune, orange, rouge et rouge cramoisi.

La sensibilité de l'analyse pour des spores individuelles allait de 10 % à 40 % (ce qui signifie que, sur des spores de *T. indica* dont la positivité a été établie, seuls 10 % à 40 % ont donné des résultats positifs à l'issue de la PCR) (Tan et Wright, 2009). Plusieurs éléments expliquent cette valeur de la sensibilité, notamment le fait que toutes les spores de *T. indica* et tous les grains cariés ont dû être autoclavés deux fois, de sorte que le matériel génétique a pu être détérioré. La spécificité de la sonde à l'égard de *T. indica* a été étudiée avec un mélange d'ADN de *T. indica* et d'ADN de *T. walkeri* ou de *T. ehrhartae* ou de *T. caries*, dans les ratios de 1:0,1 pg et 0,1:1 pg (la fourchette de concentration qui convient est dérivée de l'analyse d'une spore individuelle). La spécificité des amorces a été vérifiée et l'on a constaté qu'elles ne réagissaient pas avec les autres espèces de *Tilletia*.

Les courbes types correspondant à la détection de chacune des espèces devraient être établies conformément à ce qui est décrit par Tan *et al.* (2009) c'est-à-dire à l'aide de concentrations connues d'ADN de *Tilletia* spp. La valeur du cycle seuil (Ct) (valeur du cycle au cours duquel la courbe d'amplification croise la ligne du signal seuil) qui est obtenue est utilisée pour fixer le seuil correspondant à l'espèce de *Tilletia* analysée. En général, une valeur de Ct supérieure à celle qui est fixée au cours de cette étape est considéré comme un résultat négatif.



**Tableau 3.** Séquences et modifications des amorces et des sondes employées dans l'essai quintuplex de diagnostic par PCR à sondes fluorescentes pour *T. indica* et des espèces de *Tilletia* voisines.

| Couples d'amorces<br>(séquence 5'-3')                          | Sondes<br>(modifications 5', 3')                                | Canal             | Cible                                                          |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------|
| KB-DL-sens:<br>CTTCGGAAGAGTCTCCTT (nt. 64–81 <sup>a</sup> )    | ACGGAAGGAACGAGGC (nt. 105–120)<br>(6-FAM, BHQ1)                 | Vert              | <i>T. indica</i>                                               |
| KB-DL-antisens:<br>CCGGACAGGTACTCAG (nt. 127–142)              | ACGGAAGGAACAAGGC (nt. 67–82 <sup>b</sup> )<br>(JOE, BHQ1)       | Jaune             | <i>T. walkeri</i>                                              |
| Hor-DL-sens:<br>GGCCAATCTTCTCTACTATC (nt. 40–59 <sup>c</sup> ) | CAACCCAGACTACGGAGGGTGA (nt. 60–81)<br>(CAL Fluor Red 610, BHQ2) | Orange            | <i>T. horrida</i><br>(certaines souches ne sont pas détectées) |
| Hor-DL-antisens:<br>CCGGACAGGATCACTA (nt. 87–102)              |                                                                 |                   |                                                                |
| Tri-DL-sens:<br>ATTGCCGTACTTCTCTTC (nt. 56–73 <sup>d</sup> )   | AGAGGTCGGCTCTAATCCATCA (nt. 75–97)<br>(Quasar 670, BHQ2)        | Rouge             | Large gamme d'espèces*                                         |
| Tri-DL-antisens:<br>GTAGTCTTGTGTTTGGATAATAG (nt. 99–112)       |                                                                 |                   |                                                                |
| Ehr-DL-sens:<br>CGCATTCTTATGCTTCTTG (nt. 72–90 <sup>e</sup> )  | CAGACTCTTGGTTCTTCGGAGC (nt. 104–126)<br>(Quasar 670, BHQ2)      | Rouge<br>cramoisi | <i>T. ehrhartae</i>                                            |
| Ehr-DL-antisens:<br>GTTAGGAACCAAAGCCATC (nt. 128–146)          |                                                                 |                   |                                                                |

Notes: Les identifiants GenBank sont <sup>a</sup>AF198433, <sup>b</sup>AF310180, <sup>c</sup>AF310171, <sup>d</sup>AF398447 et <sup>e</sup>AY770433. La liste du matériel de référence employé et des lieux d'origine figurent dans Tan *et al.* (2009). Du matériel est conservé au Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (EMA), Département des industries primaires de Nouvelle-Galles du Sud (Australie) (voir la Section 6, Points de contact). nt., nucléotides.

\*Notamment *T. caries*, *T. laevis*, *T. controversa*, *T. fusca*, *T. bromi*, *T. goloskokovii*.

## 5. Données à conserver

Les données à enregistrer et à conserver sont énumérées dans la Section 2.5 de la NIMP 27.

Le rapport relatif au diagnostic devrait indiquer le nombre de sous-échantillons positifs et une estimation du nombre de téliospores détectées dans chaque sous-échantillon positif. Si l'on a produit des cultures pour procéder à une analyse moléculaire, la morphologie des colonies, notamment les pigmentations éventuelles, et le rythme de croissance dans des conditions données devraient être consignés. Les cultures devraient être conservées (le mycélium prélevé dans les milieux liquides ou les implants mycéliens provenant de cultures gélosées peuvent être stockés congelés à – 80 °C).

## 6. Points de contact pour tout complément d'information

Un complément d'information sur cet organisme peut être obtenu auprès des points de contact suivants:

Département de l'agriculture et de l'alimentation, Gouvernement de l'Australie-Occidentale, South Perth, WA 6151, Australie (Mme Dominie Wright; courriel: [dominie.wright@agric.wa.gov.au](mailto:dominie.wright@agric.wa.gov.au); tél.: +61 8 9368 3875; télécopie: + 61 8 474 2658).

Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (EMAI), Département des industries primaires de Nouvelle-Galles du Sud, Camden, NSW 2570, Australie (Mme Mui-Keng Tan; courriel: [mui-keng.tan@dpi.nsw.gov.au](mailto:mui-keng.tan@dpi.nsw.gov.au)).

Laboratoire de l'inspection des végétaux et de la quarantaine, Bureau de l'inspection à l'entrée et à la sortie et de la quarantaine de Shenzhen, Shenzhen, 518045 Province du Guangdong, Chine (M. Guiming Zhang; courriel: [zgm2001cn@yahoo.com.cn](mailto:zgm2001cn@yahoo.com.cn); tél.: +86 755 8211 1148; télécopie: +86 755 2558 8630).

Service de la recherche agricole (ARS) du Ministère de l'agriculture des États-Unis (USDA), zone Atlantique Nord (NAA), Fort Detrick, MD 21702, États-Unis (M. Gary Peterson; courriel: [gary.peterson@ars.usda.gov](mailto:gary.peterson@ars.usda.gov)).

Service d'inspection de la santé animale et végétale (APHIS) de l'USDA, Riverdale, MD, États-Unis (Mme Mary Palm; courriel: [Mary.E.Palm@aphis.usda.gov](mailto:Mary.E.Palm@aphis.usda.gov)).

USDA APHIS, Beltsville, MD, USA (M. John McKemy; courriel: [John.McKemy@aphis.usda.gov](mailto:John.McKemy@aphis.usda.gov)).

Agence de recherche sur l'alimentation et l'agriculture, York YO41 1LZ, Royaume-Uni (M. Kelvin Hughes; courriel: [Kelvin.Hughes@fera.gsi.gov.uk](mailto:Kelvin.Hughes@fera.gsi.gov.uk)).

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV), les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) au Secrétariat de la CIPV ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)), qui la transmettra au Groupe technique sur l'élaboration des protocoles de diagnostic (GTPD).

## 7. Remerciements

Les éléments de base du présent protocole sont tirés d'un projet initialement élaboré en 2003 par A. J. Inman, K. J. D. Hughes et R. S. Bowyer, Agence de recherche sur l'alimentation et l'agriculture (FERA), York, Royaume-Uni. Ce protocole a fait l'objet d'essais inter laboratoires dans des laboratoires européens (Riccioni *et al.*, 2002) et a servi de base au protocole PM 7/29(2) de l'OEPP (OEPP, 2007).

Le protocole a été affiné par D. G. Wright, du Département de l'agriculture et de l'alimentation, gouvernement de l'Australie-Occidentale, Perth (Australie); K. J. D Hughes, de l'Agence de recherche sur l'alimentation et l'agriculture (FERA), York (Royaume-Uni) et G. Zhang, du Laboratoire de l'inspection des végétaux et de la quarantaine, Shenzhen (Chine). V. Cockerell, Science and Advice for Scottish Agriculture, Edimbourg (Royaume-Uni), a examiné le protocole et formulé des observations.

<sup>7</sup> A. Radova, Administration phytosanitaire publique, Olomouc (République tchèque); I. Vloutoglou, Institut de phytopathologie Benaki, Athènes (Grèce); A. Porta-Puglia, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome (Italie); C. Montuschi, Servizio Fitosanitario Regionale, Bologne (Italie); I. van Brouwershaven, ONPV, Wageningen (Pays-Bas); M. de Jesus Gomes, E. Diogo et M.R. Malheiros, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Lisbonne (Portugal); V. Cockerell, Science and Advice for Scottish Agriculture, Edimbourg (Royaume-Uni); A. Barnes, Agence de recherche sur l'alimentation et l'environnement (FERA), York (Royaume-Uni).

## 8. Références

- Agarwal, V.K. et Mathur, S.B.** 1992. Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides. *FAO Plant Protection Bulletin*, 40: 148–153.
- Aggarwal, R., Joshi, L.M. et Singh, D.V.** 1990. Morphological differences between teliospores of *Neovossia indica* and *N. horrida*. *Indian Phytopathology*, 43: 439–442.
- Bonde, M.R., Nester, S.E., Khayat, A., Smilanick, J.L., Frederick, R.D. et Schaad, N.W.** 1999. Comparison of effects of acidic electrolyzed water and NaOCl on *Tilletia indica* teliospore germination. *Plant Disease*, 83: 627–632.
- Carris, L.M., Castlebury, L.A. et Goates, B.J.** 2006. Nonsystemic bunt fungi – *Tilletia indica* and *T. horrida*: A review of history, systematics, and biology. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 113–133.
- Castlebury, L.A.** 1998. Morphological characterisation of *Tilletia indica* and similar fungi. In V.S. Malik et D.E. Mathre (sous la direction de). *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, pp. 97–105. Ottawa, Organisation nord-américaine pour la protection des plantes (NAPPO). 445 + xv pp.
- Castlebury, L.A. et Carris, L.M.** 1999. *Tilletia walkeri*, a new species on *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. *Mycologia*, 91: 121–131.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute).** 1965. *Tilletia barclayana*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 75. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute).** 1983. *Tilletia indica*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 748. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.
- Crous, P.W., Jaarsveld, A.B. van, Castlebury, L.A., Carris, L.M., Frederick, R.D. et Pretorius, Z.A.** 2001. Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent. *Plant Disease*, 85: 561.
- Cunfer, B.M. et Castlebury, L.A.** 1999. *Tilletia walkeri* on annual ryegrass in wheat fields in the southeastern United States. *Plant Disease*, 83: 685–689.
- Durán, R.** 1987. *Ustilaginales of Mexico: Taxonomy, symptomatology, spore germination, and basidial cytology*. Seattle, Washington State University. 331 + xvi pp.
- Durán, R. et Fischer, G.W.** 1961. *The genus Tilletia*. Seattle, WA, Washington State University. 138 pp.
- Frederick, R.D., Snyder, R.E., Booley, P.W., Berthier-Schaad, Y., Peterson, G.L., Bonde, M.R., Schaad, N.W. et Knorr, D.A.** 2000. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 951–960.
- Fuentes-Davila, G.** 1996. Karnal bunt. In R.D. Wilcoxson et E.E. Saari (sous la direction de). *Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*, pp. 26–32. Mexico, Centre international d'amélioration du maïs et du blé (CIMMYT). 74 pp.
- Inman, A.J., Hughes, K.J.D. et Bowyer, R.** 2003. Protocol for extracting teliospores from untreated seed or grain by size-selective sieving. Dans: *EU recommended protocol for the diagnosis of a quarantine organism: Tilletia indica*, pp. 21–26. Département de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni, DIAGPRO (projet de l'Union européenne sur les protocoles de diagnostic). 38 pp. Voir <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/planthealth/pestsdiseases/documents/protocols/tipro.pdf> (consulté le 3 octobre 2010).
- Khanna, A. et Payak, M.M.** 1968. Teliospore morphology of some smut fungi. II. Light microscopy. *Mycologia*, 60: 655–662.
- Kurtzman, C.P.** 1985. Molecular taxonomy of the fungi. pp. 35–63. Dans W. Bennett et L.L. Lasure (sous la direction de). *Gene manipulations in fungi*. Orlando, FL, Academic Press, Inc. 558 pp.
- Laroche, A., Gaudet, D.A., Despins, T., Lee, A. et Kristjansson, G.** 1998. Distinction between strains of Karnal bunt and grass bunt using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Dans V.S. Malik et D.E. Mathre (sous la direction de). *Bunts and smuts of wheat: An*

- international symposium*, p. 127. Ottawa, Organisation nord-américaine pour la protection des plantes (NAPPO). 445 + xv pp.
- Levy, L., Castlebury, L.A., Carris, L.M., Meyer, R.J., Pimentel, G.** 2001. Internal transcribed spacer sequence-based phylogeny and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism differentiation of *Tilletia walkeri* and *T. indica*. *Phytopathology*, 91: 935–940.
- Mathur, S.B. et Cunfer, B.M.** 1993. Karnal bunt. In S.B. Mathur and B.M. Cunfer (sous la direction de). *Seed-borne diseases and seed health testing of wheat*, pp. 31–43. Frederiksberg (Danemark), Institut danois de pathologie des semences pour les pays en développement. 168 pp.
- Milbrath, G.M., Pakdel, R. et Hilburn, D.** 1998. Karnal bunt spores in ryegrass (*Lolium* spp.). In V.S. Malik et D.E. Mathre (sous la direction de). *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, pp. 113–116. Ottawa, Organisation nord-américaine pour la protection des plantes (NAPPO). 445 + xv pp.
- OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes).** 2007. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/29(2). *Tilletia indica*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 37: 503–520.
- Pascoe, I.G., Priest, M.J., Shivas, R.G., Cunnington, J.H.** 2005. Ustilospores of *Tilletia ehrhartae*, a smut of *Ehrharta calycina*, are common contaminants of Australian wheat grain, and a potential source of confusion with *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat. *Plant Pathology*, 54: 161–168.
- Peterson, G.L., Bonde, M.R. et Phillips, J.G.** 2000. Size-selective sieving for detecting teliospores of *Tilletia indica* in wheat seed samples. *Plant Disease*, 84: 1006–1007.
- Pimentel, G., Carris, L.M., Levy, L. et Meyer, R.** 1998. Genetic variability among isolates of *Tilletia barclayana*, *T. indica* and allied species. *Mycologia*, 90: 1017–1027.
- Riccioni, L., Valvassori, M., Inman, A.J., Hughes, K.J., Bowyer, R.J., Barnes, A.V., Montuschi, C.** 2002. International validation of a diagnosis protocol for *Tilletia indica* [*Triticum* - *Secale* -  $\times$  *Triticosecal*]. Rapport interne. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome.
- Sansford, C.E., Baker, R.H.A., Brennan, J.P., Ewert, F., Gioli, B., Inman, A.J., Kinsella, A., Magnus, H., Miglietto, F., Murray, G.M., Porta-Puglia, A., Porter, J.R., Rafoss, T., Riccioni, L., et Thorpe, E.** 2008. The new pest risk analysis for *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat, continues to support the quarantine status of the pathogen in Europe. *Plant Pathology*, 57: 603–611.
- Smith, O.P., Peterson, G.L., Beck, R.J., Schaad, N.W. et Bonde, M.R.** 1996. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. *Phytopathology*, 86: 115–122.
- Tan, M.-K., et Murray, G.M.** 2006. A molecular protocol using quenched FRET probes for the quarantine surveillance of *Tilletia indica*, the causal agent of Karnal bunt of wheat. *Mycological Research*, 110: 203–210.
- Tan, M.-K., Timmer, L.W., Broadbent, P., Priest, M. et Cain, P.** 1996. Differentiation by Molecular Analysis of *Elsinoe* spp. Causing Scab Diseases of Citrus and Its Epidemiological Implications. *Phytopathology* 86:1039–1044.
- Tan, M.-K., et Wright, D.G.** 2009. *Enhancing the detection of Tilletia indica, the cause of Karnal bunt. Final report*. CRC20004: Karnal bunt detection. Canberra, CRC National Plant Biosecurity (Centre de recherche coopérative pour la biosécurité végétale nationale). 63 pp.
- Tan, M.-K., Ghalayini, A., Sharma, I., Yi, J., Shivas, R., Priest, M., et Wright, D.** 2009. A one-tube fluorescent assay for the quarantine detection and identification of *Tilletia indica* and other grass bunts in wheat. *Australasian Plant Pathology*, 38: 101–109.
- USDA (Ministère de l'agriculture des États-Unis).** 2007. *Karnal bunt manual*. Frederick, MD, USDA. 160 pp. Voir

[http://www.aphis.usda.gov/import\\_export/plants/manuals/online\\_manuals.shtml](http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/online_manuals.shtml) (consulté en février 2012).

**White, T.J., Bruns, T., Lee, S., et Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky et T.J. White (sous la direction de). *PCR protocol: A guide to methods and applications*, pp. 315-322. Londres, Academic Press. 482 pp.

**Wiese, M.V.** (sous la direction de). 1987. *Compendium of wheat diseases*, 2<sup>e</sup> éd. Saint Paul, MN, APS Press. 112 pp.

**Wright, D., Murray, G. et Tan, M.-K.** 2003. National diagnostic protocol for the identification of *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt. Perth (Australie), Département de l'agriculture et de l'alimentation, Gouvernement de l'Australie-Occidentale.

## 9. Figures



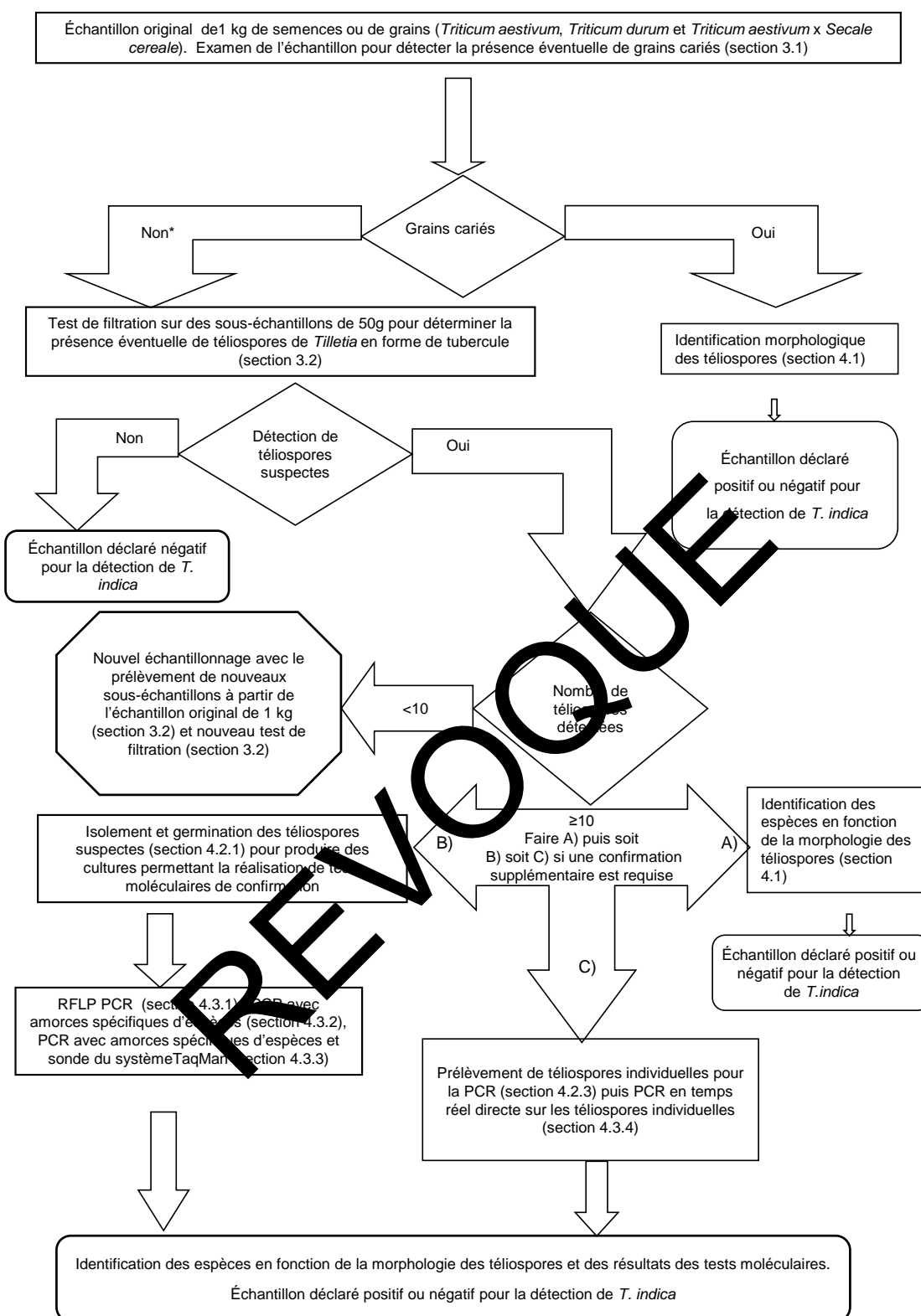
**Figure 1.** Épi de blé infecté, présentant les symptômes de la carie de Karnal.

Photographie publiée avec l'aimable autorisation du Département de l'agriculture et de l'alimentation, Gouvernement de l'Australie-Occidentale.



**Figure 2.** Grains de blé infectés présentant les symptômes de la carie de Karny.

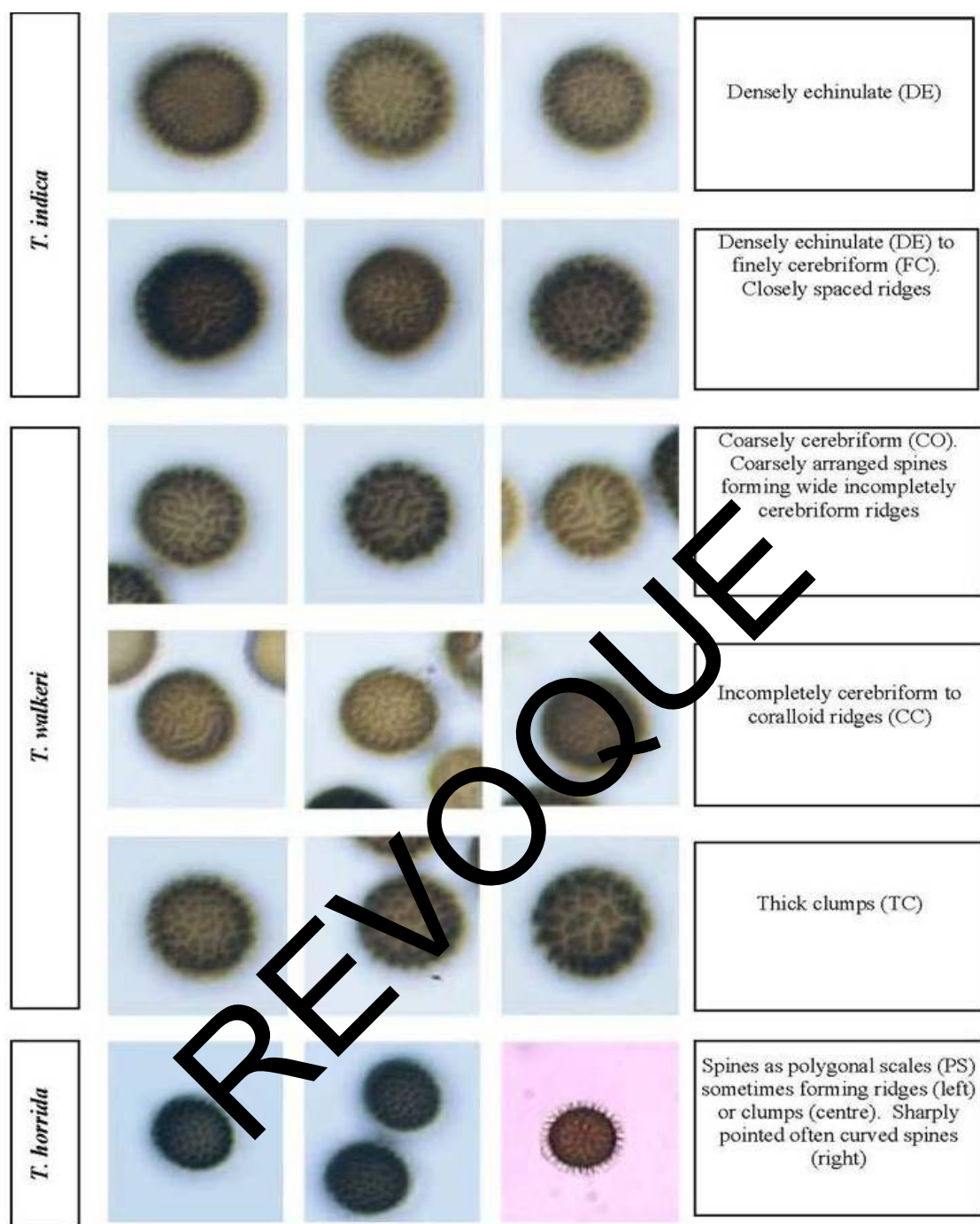
*Photographie publiée avec l'aimable autorisation du Département de l'agriculture et de l'alimentation, gouvernement de l'Australie-Occidentale.*



**Figure 3.** Schéma présentant le déroulement du processus pour la détection et l'identification de *Tilletia indica* dans les échantillons de semences et de grains.

Légende: PCR, réaction en chaîne par polymérisation; RFLP, polymorphisme de longueur des fragments de restriction.





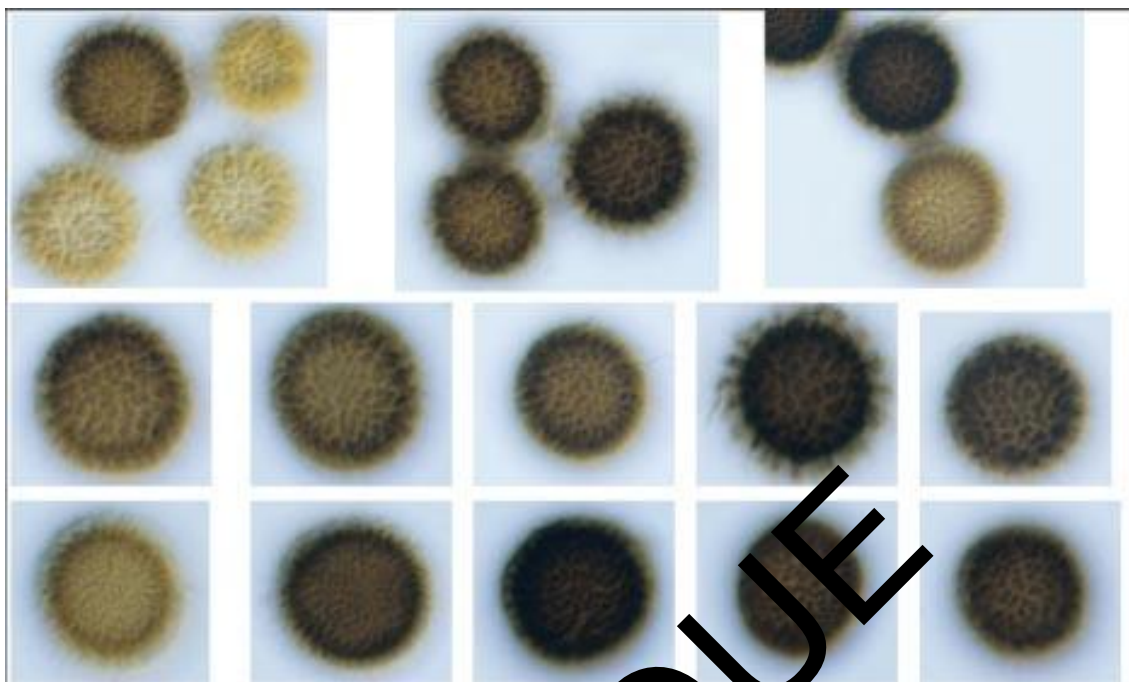
#### Légende

|                   |                                                                                                                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>T. indica</i>  | Densément échinulée                                                                                                                                           |
| <i>T. indica</i>  | Densément échinulée à finement cérébriforme. Arêtes séparées par des espaces étroits                                                                          |
| <i>T. walkeri</i> | Grossièrement cérébriforme. Échinules grossièrement agencées formant de larges arêtes incomplètement cérébriformes                                            |
| <i>T. walkeri</i> | Arêtes incomplètement cérébriformes à coralloïdes                                                                                                             |
| <i>T. horrida</i> | Amas épais                                                                                                                                                    |
| <i>T. horrida</i> | Échinules formant des motifs polygonaux et parfois des arêtes (à gauche) ou des amas (au centre). Échinules à pointe aiguë, fréquemment recourbées (à droite) |

**Figure 4.** Tableau d'identification visuelle des télisporos de *Tilletia* selon leur ornementation. À utiliser conjointement au tableau 2 (Section 4.1).

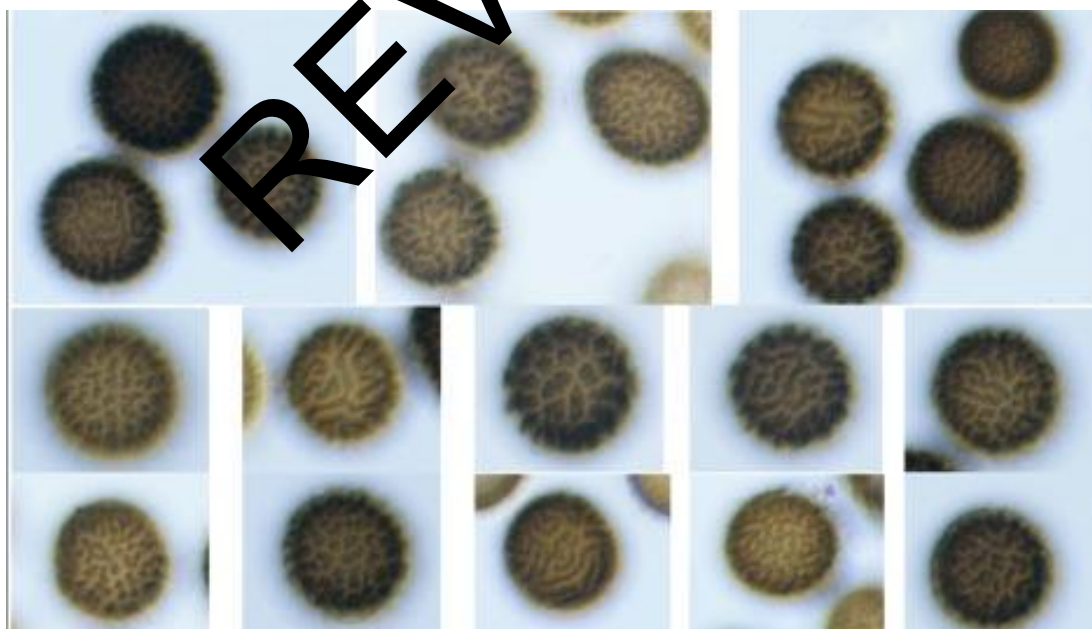


Photographies publiées: avec l'aimable autorisation de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni).



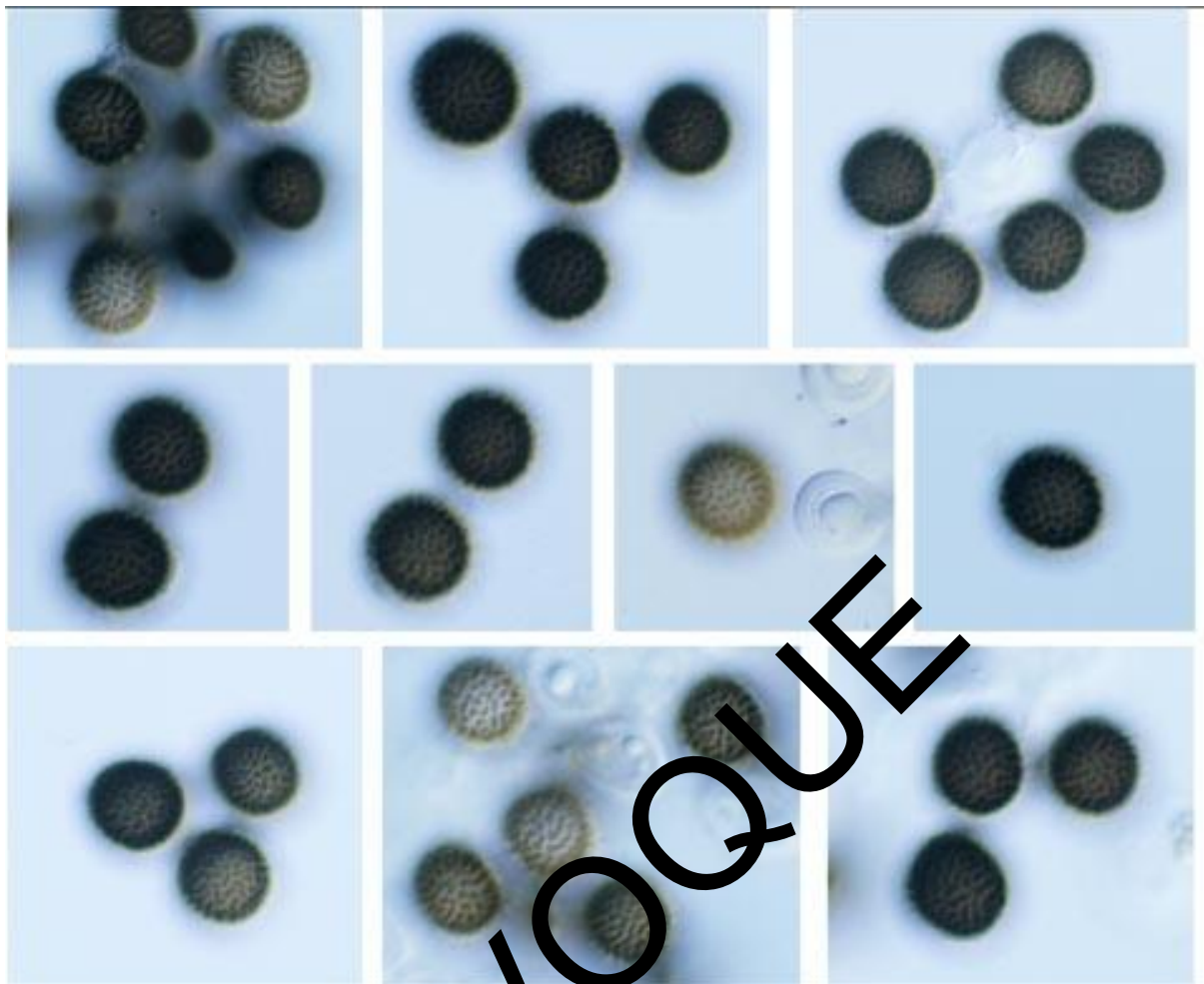
**Figure 5.** Télisporos de *Tilletia indica* présentant différents types d'ornementation de surface. Les échinules sont densément agencées, soit individuellement (densément échinulées), soit en fines arêtes séparées par des espaces étroits (finement cérébriformes). Échelle: 10 mm = 17 µm.

Photographies publiées avec l'aimable autorisation de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni).



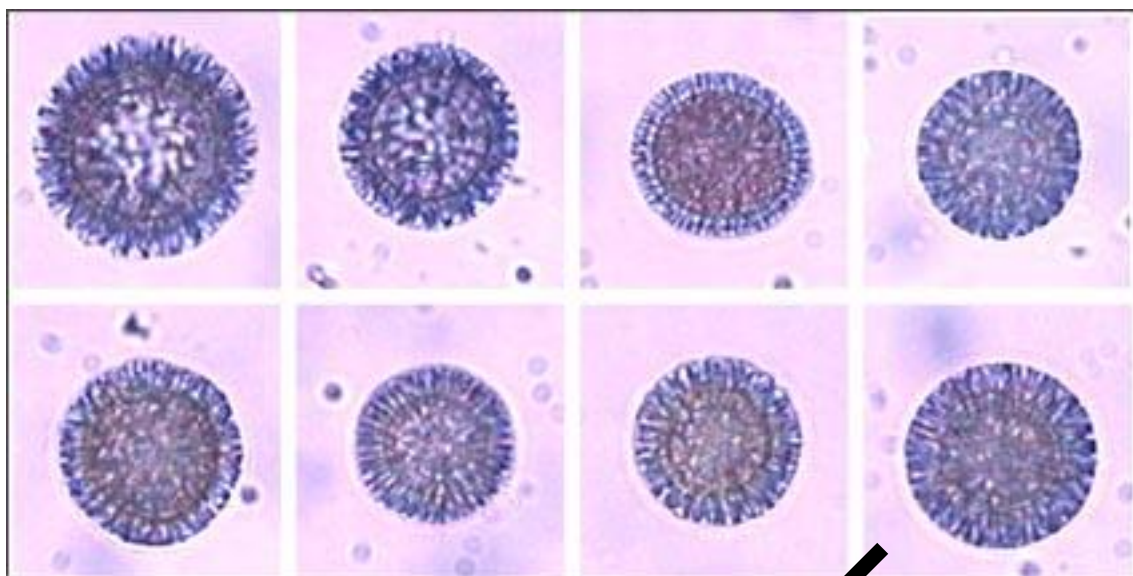
**Figure 6.** Télisporos de *Tilletia walkeri* présentant différents types d'ornementation de surface. Les échinules sont grossièrement agencées et forment de larges arêtes incomplètement cérébriformes à coralloïdes ou des amas épais. Échelle: 10 mm = 17 µm.

Photographies publiées avec l'aimable autorisation de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni).

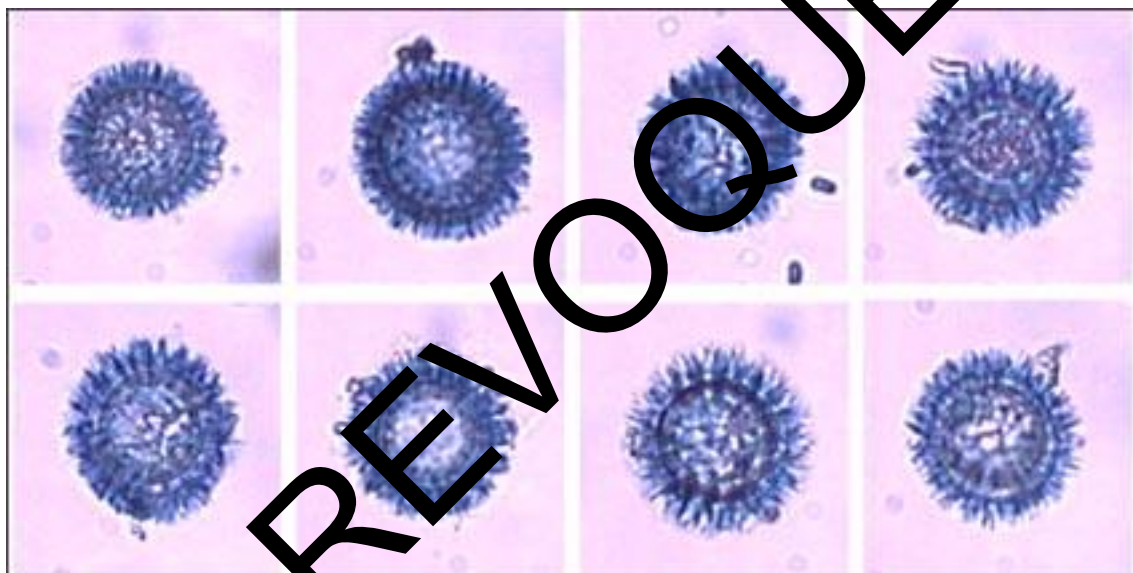


**Figure 7.** Télïospores de *Tilletia horrida* illustrant différents types d'ornementation de surface. Les échinules sont agencées en structures polygonales ou, parfois, en arêtes cérébriformes. Échelle: 10 mm = 17 µm.

Photographies publiées avec l'autorisation de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni).



A

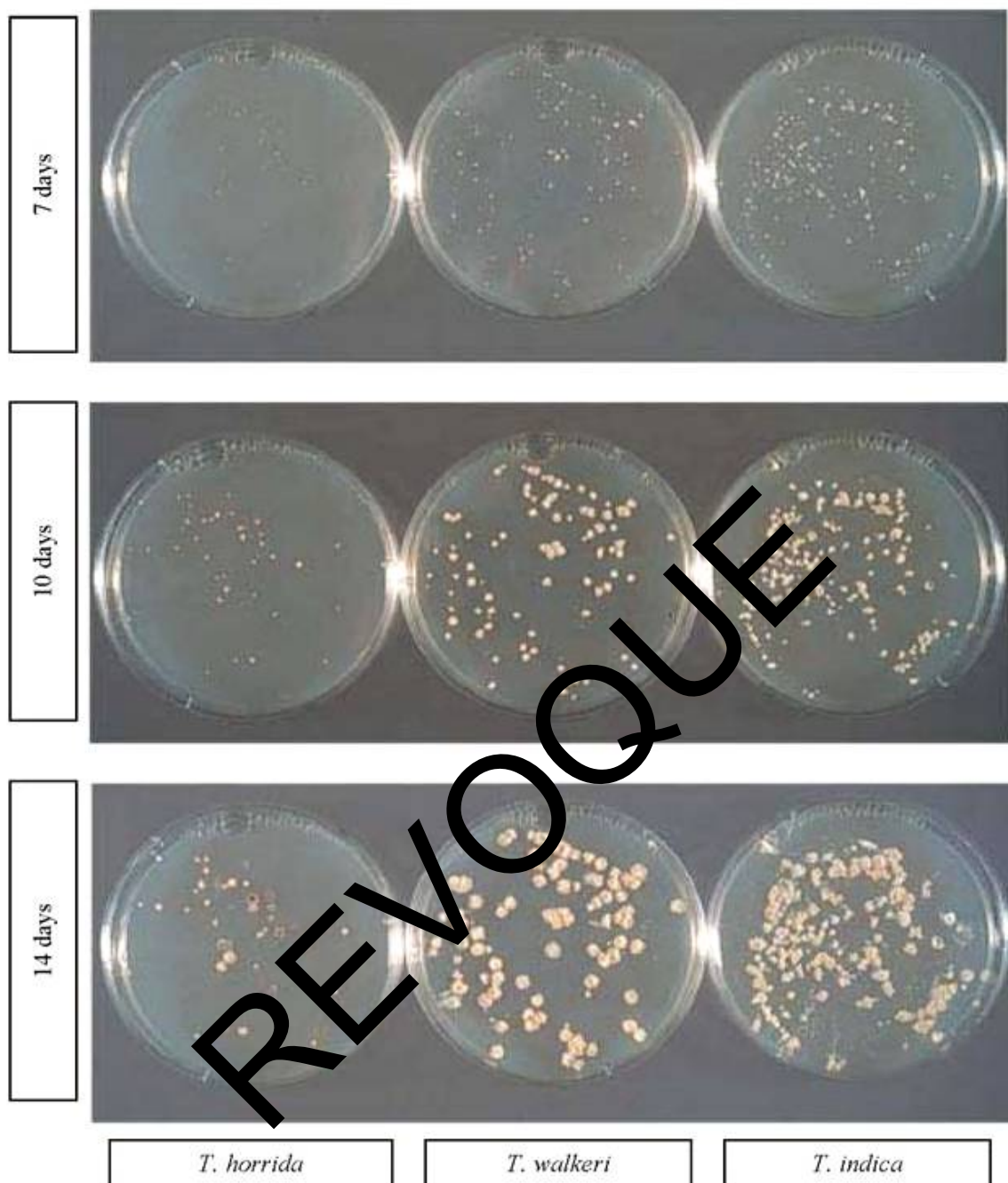


B

**Figure 8.** Vue en plan médian de profils de télisporos de *Tilletia indica* (A) et de *Tilletia walkeri* (B), après décoloration des télisporos puis coloration au lactoglycérol-bleu trypan. Observer le profil plus lisse des télisporos de *T. indica* par rapport au profil irrégulier des télisporos de *T. walkeri*, qui fait apparaître des espaces marqués entre les échinules.

Photographies publiées avec l'aimable autorisation de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni).





#### Légende

7 jours  
10 jours  
14 jours

**Figure 9.** Colonies de *Tilletia indica* (à droite), de *Tilletia walkeri* (au centre) et de *Tilletia horrida* (à gauche) après 7 jours (en haut), 10 jours (au centre) et 14 jours (en bas), cultivées sur PDA (Potato Dextrose Agar), à 19 °C et avec un cycle lumière/obscurité de 12 h. Observer la croissance plus lente et la pigmentation pourpre après 14 jours pour les colonies de *T. horrida*.

Photographies publiées avec l'aimable autorisation de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni).

### Étapes de la publication

*Cet encadré ne fait pas officiellement partie de la norme.*

2006-03 La CMP, à sa première session, adopte le sujet *Tilletia indica* / *T. controversa* (2004-01), au titre du thème: Champignons et organismes fongiformes.

2012-11 Le CN approuve par décision électronique le projet de texte en vue de sa présentation aux membres pour consultation.

2012-07 Consultation des membres

2013-05 Le CN approuve le texte en vue de son adoption via décision électronique (texte retourné au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (TPDP))

2013-06 Le TPDP révisé le texte.

2013-10 Transmission au CN pour approbation en vue de l'adoption par décision électronique.

2013-10 Le CN approuve le projet de texte en vue de sa transmission pour la période de notification de 45 jours via décision électronique.

2013-12 Période de notification de 45 jours

2014-01 Le CN adopte le protocole de diagnostic au nom de la CMP.

2015-01 Le Secrétariat apporte des corrections mineures à la mise en page.

**NIMP 27. Annexe 4 *Tilletia indica* Mitra (2014)**

2015-03 La CMP-10 prend note des modifications de forme apportées par le groupe d'examen linguistique en français.

2015-03 Le Secrétariat intègre les modifications de forme approuvées par la CMP-10

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2015-04.