



Recherche pour la référence

Le projet européen TESTA (*Treatment methods, Evidence for Seed Transmission and Assessment of seed health*): compréhension des mécanismes de transmission des agents pathogènes à et par la semence pour un développement de méthodes de détection d'agents pathogènes et de traitements alternatifs sur semences

Aurélia Luciani (aurelia.luciani@geves.fr)(1), Geoffrey Orgeur (2), Valérie Grimault (2), Jean-François Guimbaud (3), Marie-Agnès Jacques (3)

(1) GEVES, Beaucozéz, France

(2) GEVES, Station nationale d'essai de semences (SNES), Beaucozéz, France

(3) Inra, UMR 1325, Institut de recherche en horticulture et semences, Beaucozéz, France

Le GEVES et l'Inra d'Angers participent depuis 2012 au projet européen TESTA. Ce projet vise à développer et valider des méthodes d'analyses de la qualité sanitaire des semences plus globales, plus rapides et plus efficaces. D'une durée de quarante mois et financé à hauteur de trois millions d'euros, ce projet associe treize partenaires européens (voir encadré) et a pour objectifs de mieux connaître les mécanismes associés à la transmission des pathogènes à et par la semence, d'améliorer les méthodes d'échantillonnage et de détection de pathogènes et d'évaluer l'efficacité de traitements sanitaires alternatifs sur semences.

Le volume et la fréquence du commerce des semences ont énormément progressé et se sont mondialisés depuis les années 1970 (Figure 1). Cette situation augmente le risque de dissémination des pathogènes portés par les semences. La réglementation européenne conduisant à une diminution progressive de produits phytosanitaires disponibles pour le traitement des semences, la question de la qualité sanitaire des semences devient prégnante pour limiter la propagation des maladies des plantes.

Le nombre de pathogènes et de ravageurs transmis via les semences est élevé et les méthodes de contrôle de la qualité

sanitaire doivent être aussi génériques et peu coûteuses que possible. Le développement de connaissances sur la biologie de la transmission des pathogènes à la semence est nécessaire pour progresser sur l'amélioration de la qualité sanitaire des semences. Les questions de qualité sanitaire doivent être discutées aussi bien au niveau européen qu'au niveau mondial, et les travaux doivent être menés en commun en Europe, afin de garantir que les semences importées et utilisées soient de haute qualité.

Le projet TESTA s'attache à développer un panel de nouvelles méthodes de contrôle de la qualité sanitaire des semences tout en contribuant à l'étude du mode de transmission des pathogènes à la semence et de la semence à la plantule. Seront notamment développées au cours du projet TESTA, des méthodes d'échantillonnage adaptées à la détection d'une faible qualité de pathogènes dans un lot important de semences,

Liste des partenaires du projet TESTA

- The Food, Environment and Rural Affairs (FERA), Royaume-Uni
- Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO), Pays-Bas
- Institut national de la recherche agronomique (INRA), France
- Università degli studi di Torino, Italie
- University of Pretoria, Afrique du Sud
- Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Royaume-Uni
- Aarhus Universitet, Danemark
- National Institute of Agricultural Botany (NIAB), Royaume-Uni
- Stichting Nederlandse Algemene Kwaliteitsdienst Tuinbouw (NAKT), Pays-Bas
- Università degli studi di Modena e reggio Emilia, Italie
- Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences (GEVES), France
- Organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes (OEPP), France
- Videometer A/S, Danemark

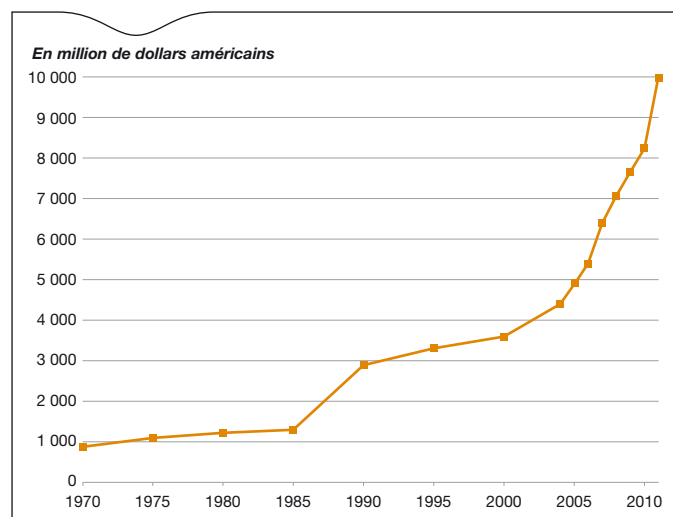


Figure 1. Évolution des échanges commerciaux mondiaux de semences (source: International Seed Federation)

Recherche pour la référence

des méthodes innovantes et génériques de détection des pathogènes, et des méthodes de désinfection de semences non destructives, efficaces et alternatives aux techniques actuelles qui utilisent des produits phytopharmaceutiques susceptibles de ne plus être autorisés et disponibles.

Le projet est structuré en sept axes opérationnels (Figure 2) :

- transmission des agents phytopathogènes à la semence ;
- échantillonnage ;
- détection des agents pathogènes ;
- désinfection des semences ;
- validation des méthodes ;
- diffusion des résultats ;
- gestion du projet.

TESTA débouchera sur :

- la compréhension de la transmission du pathogène du porteur-graine à la semence et de la semence à la plantule ;
- la construction d'une base de données internet répertoriant toutes les maladies et tous les ravageurs connus transmis par les semences ;
- de nouvelles méthodes d'évaluation des taux de transmission à la semence et à la culture, et l'évaluation du risque associé.
- des méthodes d'échantillonnage améliorées ;
- des méthodes génériques de détection nouvelles et efficaces
- des méthodes non destructives d'analyse de la qualité sanitaire des semences ;
- des méthodes opérationnelles pour les laboratoires officiels
- des méthodes de désinfection des semences ;
- des protocoles d'évaluation de l'efficacité des méthodes de désinfection.

L'équipe Emersys de l'Institut de recherche en horticulture et semences (Inra d'Angers) coordonne l'axe opérationnel 1 « Transmission des agents phytopathogènes à la semence ». Elle développera, dans cet axe, des travaux visant à étudier les voies, les mécanismes de transmission d'un panel de bactéries phytopathogènes à la semence et de la semence à la plantule.

Le laboratoire de pathologie de la Station nationale d'essai de semences (GEVES) réalisera quant à lui dans le cadre de ce projet :

- l'étude de la transmission de *Tilletia caries* de la semence à la plantule et au sol ;
- l'évaluation de l'efficacité de la thermothérapie pour désinfecter les semences de luzerne vis-à-vis du nématode *Ditylenchus dipsaci* ;
- la validation de méthodes de détection sur semences de *Ditylenchus dipsaci*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et *Phoma lingam* ;
- la diffusion des résultats à travers l'organisation d'un atelier en 2015.

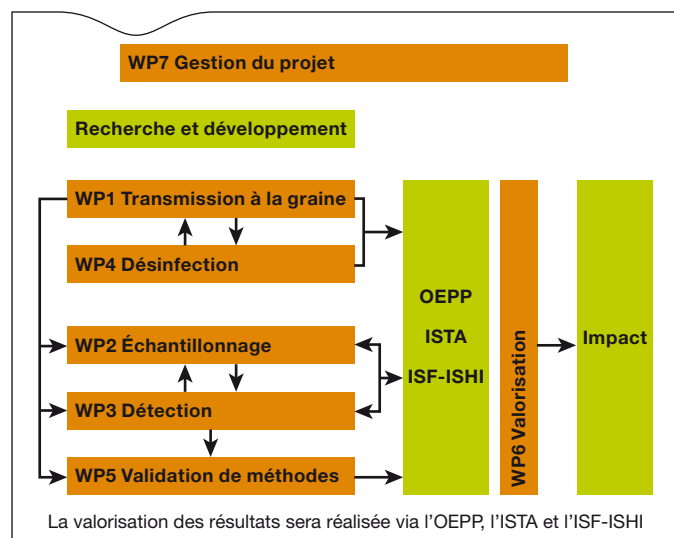


Figure 2. Organisation du projet TESTA.



Figure 3. Extraction du nématode *Ditylenchus dipsaci*



Recherche pour la référence

Transmission des agents pathogènes à et par la semence

Pour de nombreuses bactéries phytopathogènes, les voies et mécanismes de contamination des semences ne sont pas encore connus. La transmission des bactéries aux semences peut se faire selon trois voies : le système vasculaire du porteur-graine, les organes floraux, ou par contact avec des tissus contaminés ou infectés, essentiellement lors des opérations de récolte et battage. Il a été montré que la contamination des fleurs joue un rôle important dans la contamination des semences pour différentes bactéries phytopathogènes, dont des *Xanthomonas* et *Acidovorax* (Darsonval *et al.*, 2008 ; Lessl *et al.*, 2007). Elle peut, ou non, être associée à une contamination interne par la voie vasculaire (Darsonval *et al.*, 2008, 2009). Peu d'informations sont disponibles concernant la localisation (interne ou externe) des bactéries au niveau de la semence et les mécanismes de transmission de la semence à la plantule (Darrasse *et al.*, 2010). La connaissance des voies de contamination, qui déterminent la localisation future des bactéries dans les organes de multiplication, est primordiale pour la sélection de nouvelles variétés et pour le contrôle visant à éviter ou réduire la contamination des semences par les agents pathogènes.

Du fait de la réduction des traitements de semences et avec l'apparition de méthodes de traitements alternatives, se pose la question des niveaux de contamination des semences par *Tilletia* spp. pouvant entraîner une contamination de la plante ou du sol. Des méthodes de détection de *Tilletia* spp. ont été décrites sur semences (Anses, 2012), mais aucune ne permet d'évaluer rapidement la transmission à la plantule et la viabilité des spores.

La transmission des agents pathogènes à et par la semence sera étudiée sur des couples hôtes/pathogène mettant en œuvre différents types de transmission (bactéries sur tomate, crucifères et cucurbitacées, champignons et viroïdes sur tomate, *Tilletia* spp. sur blé). Les questions de recherche à résoudre sont les suivantes : quel est le lien entre le taux de contamination des semences et l'incidence de la maladie au champ ? Comment le pathogène pénètre-t-il dans la semence ? Comment le pathogène se déplace-t-il de la semence à la plantule ? Le lien entre la localisation du pathogène au niveau de la semence et sa transmission de la plante mère à la semence, et de la semence à la plantule sera mis en évidence. Ces nouvelles connaissances permettront aux industriels semenciers et aux pouvoirs publics d'adapter leurs procédures de désinfection des semences et de détection des pathogènes considérés.

Méthodes d'échantillonnage

Des méthodes d'échantillonnage adaptées aux semences ont été développées par des organisations internationales en particulier l'ISTA (*International Seed Testing Association*) et l'AOSA (*Association of Official Seed Analysts*). Cependant, certains pathogènes ne sont présents dans les lots de semences qu'à de très faibles fréquences, mais leur présence même en faible quantité dans un lot de semences entraîne des pertes économiques notables, ou bien est rédhibitoire pour la commercialisation du lot quand il s'agit d'agents pathogènes de quarantaine et d'organismes nuisibles non réglementés mais d'impact grave sur les cultures. Les règles d'échantillonnage et de taille d'échantillons nécessaires pour détecter la présence de ces pathogènes sont peu étudiées. Très peu d'études ont été réalisées sur la distribution des pathogènes du sol dans les lots de semences (Whitaker *et al.*, 2001), et elles concernent uniquement des pathogènes du blé.

Le projet TESTA mettra en œuvre des approches statistiques afin d'améliorer la pertinence de l'échantillonnage, notamment pour des grands lots de semences dans lesquels le niveau d'inoculum est susceptible d'être faible. La procédure d'échantillonnage mise au point dans le projet sera adoptée par l'ISTA et utilisable par les laboratoires officiels et par les industriels.

Détection multicibles des pathogènes

La détection des pathogènes sur semences constitue une étape importante de l'analyse de la qualité sanitaire afin de limiter l'introduction et la diffusion des pathogènes aux cultures végétales. L'ISHI (*International Seed Health Initiative*), l'ISTA et l'OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes) ont développé, validé et publié des méthodes au sein de leurs comités « Qualité sanitaire », mais toutes ces méthodes sont basées sur la détection d'un seul pathogène.

TESTA a pour but d'améliorer les procédures de détection des pathogènes sur semences de tomate, céréales, chou et cucurbitacées en développant des méthodes génériques basées sur les technologies de multiplexage et de séquençage de l'ADN. Les méthodes d'extraction d'ADN/ARN et de PCR en temps réel seront également améliorées. Le projet évaluera aussi de nouvelles méthodes non destructives basées sur la réflexion de la lumière, utilisables sur des lots de taille réduite ou à grande valeur ajoutée pour lesquels les méthodes moléculaires ne sont pas adaptées.

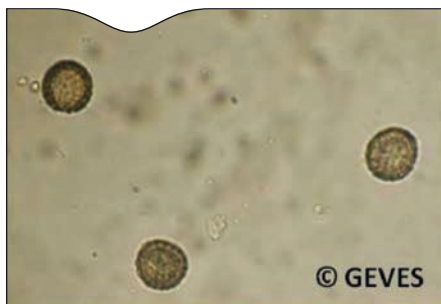


Figure 4. Teliospores de *Tilletia caries*



Figure 5. Inoculation artificielle de boutons floraux



Figure 6. Lots de semences de haricot sain/contaminé



Recherche pour la référence

Désinfection des semences

Les traitements chimiques de lots de semences commerciaux sont utilisés depuis des décennies, mais depuis quelques années, la disponibilité des traitements chimiques diminue. Des méthodes de désinfection physiques et biologiques seront mises au point dans le projet TESTA. Ces méthodes feront appel à des traitements thermiques, et feront intervenir des micro-organismes ou des extraits de plantes. L'aptitude des microorganismes et extraits de plantes à contrôler les maladies et ravageurs, et à améliorer la germination des semences sera évaluée. Des procédures d'évaluation de la viabilité des pathogènes concernés seront mises au point. Un guide de choix de la méthode de désinfection la plus appropriée selon le pathogène considéré sera réalisé à la fin du projet.

Valorisation des résultats

Les résultats du projet seront largement diffusés auprès des scientifiques, pouvoirs publics, industriels et autres acteurs de la filière semences. La participation de l'ISHI au projet assurera l'adéquation des résultats produits aux besoins de la filière et leur large diffusion auprès des laboratoires d'analyses de la qualité sanitaire des semences. L'implication d'ISHIVeg permettra le transfert des méthodes vers les industriels. Les informations concernant les pathogènes de quarantaine seront diffusées via l'OEPP. Des actions de formation auprès des pathologistes et analystes de la qualité des semences seront entreprises.

Les livrables du projet consisteront en une base de données des maladies et ravageurs transmis par les semences, des méthodes de détection de pathogènes sur semences, un protocole d'évaluation de l'efficacité des traitements des semences et de nombreuses publications scientifiques.

Via le projet TESTA, de nouvelles méthodes et connaissances sur la qualité sanitaire des semences seront ainsi apportées aux services de santé des végétaux et laboratoires d'analyses de semences européens.

Le projet TESTA est soutenu financièrement par l'Union européenne dans le cadre du septième Programme-cadre de recherche et développement de l'Union européenne (FP7-KBBE-2012-1.2-05, grant agreement n° 311875).

Références bibliographiques

ANSES, 2012. Méthode officielle d'analyse MOA 017 version 2a relative à la détection sur semences et grains de céréales de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal), *Tilletia caries*, *Tilletia controversa* et *Tilletia foetida* par filtrations sélectives et identification morphologique. Note de service DGAL/SDQPV/N2012-8061 du 15 mars 2012.

Darrasse A., Darsonval A., Boureau T., Brisset M. N., Durand K., Jacques M. A., 2010. Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. Appl. Environ. Microbiol. October 2010 vol. 76 no. 20 6787-6796.

Darsonval A., Darrasse A., Meyer D., Demarty M., Durand K., Bureau C., Manceau C., Jacques M. A., 2008. The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. Appl. Environ. Microbiol. May 2008 vol. 74 no. 9 2669-2678.

Darsonval A., Darrasse A., Durand K., Bureau C., Cesbron S., Jacques M. A., 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 22, No. 6, 2009, pp. 747-757.

Lessl J.T., Fessehaie A., Walcott R.R., 2007. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. J. Phytopathology 155, 114-121 (2007).

Whitaker T.B., Hagler W.M.Jr, Johansson A.S., Giesbrecht F.G., Trucksess M.W., 2001. Distribution among sample test results when testing shelled corn lots for fumonisin. Journal of AOAC International, 84 (3): 770-776.

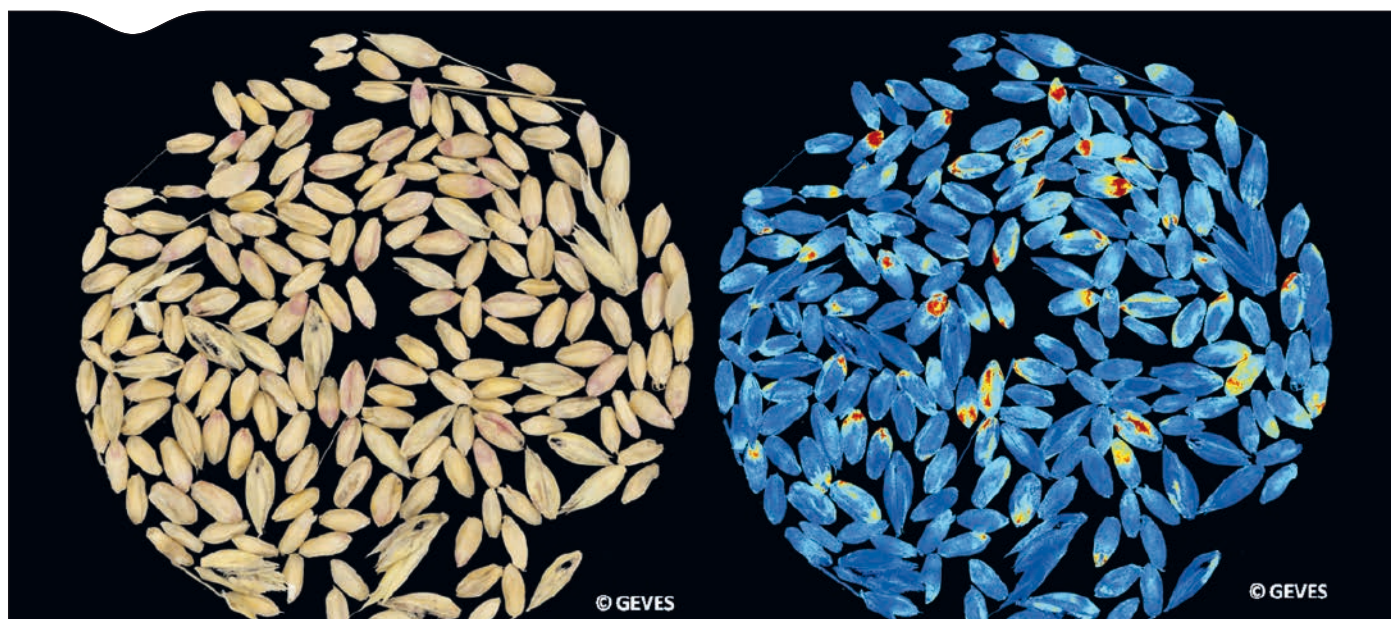


Figure 7. Détection de *Fusarium* sp. sur blé par l'appareil VideometerLab