Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE

Direction Générale de l'Alimentation Sous-direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux **Mission « Laboratoires »** Adresse : Suivi par : Christian BAIN Tél (/ Fax / Mail) : 0149555496	**CIRCULAIRE** **DGAL/SDQPV/C2007-8007** **Date: 13 juin 2007**

Date de mise en application : immédiate
Annule et remplace : MHs/06/01 version a
Nombre d'annexe : 1
Confidentialité : tout public

Objet : Méthode officielle de détection de *Tilletia indica* par filtration sélective et identification morphologique.

Mots-clés : méthode de détection -carie des céréales - carie de Karnal - tilletia indica

Destinataires	
Pour exécution : Toutes DRAF Tous Laboratoires	Pour information :

Cette méthode permet la mise en évidence de /Tilletia indica/ , agent de la carie de Karnal sur semences de blé, triticales et seigle."

Le Sous Directeur de la Qualité
Et de la Protection des Végétaux

Joël MATHURIN

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Direction Générale de l'Alimentation

Sous Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Semences et grains de céréales, détection de *Tilletia indica* (agent de la carie de Karnal) par filtration sélective et identification morphologique

Réf.:MHs/06/01 version b

Laboratoire de Référence :
LNPV Unité de Mycologie agricole et forestière à Nancy
Domaine de Pixérécourt - BP 90059
54220 MALZEVILLE

Laboratoire de mise au point :
Laboratoire du Service Régional de la Protection des Végétaux de Midi Pyrénées

Février 2007

SEMENCES ET GRAINS DE CEREALES,

DETECTION DE *Tilletia indica* (AGENT DE LA CARIE DE KARNAL)

PAR FILTRATION SELECTIVE ET IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE

SOMMAIRE

Avertissements et précautions de sécurité 3

1. Objet 3

2. Domaine d'application 3

3. Définitions 3

4. Principe et diagramme décisionnel 4

5. Réactifs et produits 5

6. Appareillage 5

7. Verrerie 5

8. Consommable et petit matériel 5

9. Echantillonnage et échantillons 5

    9.1. Préparation de l'échantillon pour le laboratoire et conservation 6

    9.2. Préparation de l'échantillon pour analyse 6

10. Mode opératoire 6

    10.1. Prise d'analyse 6

    10.2. Essai témoin 6

    10.3. Déroulement du test 6

        10.3.1. Observation des grains cariés 7

        10.3.2. Lavage 7

        10.3.3. Filtration 7

        10.3.4. Centrifugation 8

        10.3.5. Lecture 8

11. Expression des résultats 8

12. Références bibliographiques 9

13. Annexes

    Annexe 1 : Tableau de détermination de différentes espèces de *Tilletia* spp. 10

    Annexe 2 : Photographies de symptômes sur grains et téliospores. 11

Avertissements et précautions de sécurité

- Les semences peuvent être traitées avec différents produits phytosanitaires. Elles doivent être manipulées doucement pour éviter la formation de poussières. Certaines matières actives peuvent être toxiques et irritantes pour la peau, les yeux, l'appareil respiratoire.
- Veiller à se protéger la peau (utilisation de gants jetables), les yeux et les voies respiratoires dans le cas de semences traitées (travail dans un local ventilé sans courant d'air et port d'un masque filtrant anti-poussières ou risques chimiques).
- Décontaminer tout le matériel jetable utilisé ainsi que les restes de l'échantillon après analyse, par stérilisation en chaleur humide par passage à l'autoclave à pression de vapeur au moins 20 minutes à une température minimale de 121°C ou par tout autre traitement permettant d'obtenir un résultat équivalent.
- Désinfecter le matériel recyclable (notamment la verrerie) soit par stérilisation dans les conditions précédentes (si le matériel le supporte) ou par trempage pendant au moins 20 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) ou d'eau de Javel, diluée et titrée à au moins 1°Cl, préparée extemporanément.

1. Objet

Cette méthode qualitative s'applique à la détection du champignon *Tilletia indica,* agent de la carie de Karnal. Ce champignon est listé dans l'annexe IAI de la directive européenne 2000/29/CE (organismes nuisibles inexistant dans la Communauté et dont l'introduction et la dissémination doit être interdite dans tous les états membres).
Cette méthode s'utilise pour les analyses réglementaires dans le cadre des contrôles phytosanitaires à l'importation et de la surveillance du territoire. La détention et la manipulation de *Tilletia indica* lors de ces analyses doivent être effectuées dans des conditions de précaution appropriées conformément à la directive 95/44/CE.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique à toutes les semences (traitées et non traitées) de blé, triticale et seigle, ainsi qu'aux grains destinés à la consommation et/ou à la transformation.

3. Définitions

Grain : terme regroupant les semences (destinées à la plantation) et les grains (destinés à la consommation et/ou à la transformation).

Spore : Propagule représentant l'unité de dissémination d'un champignon, pouvant être sexuée ou asexuée.

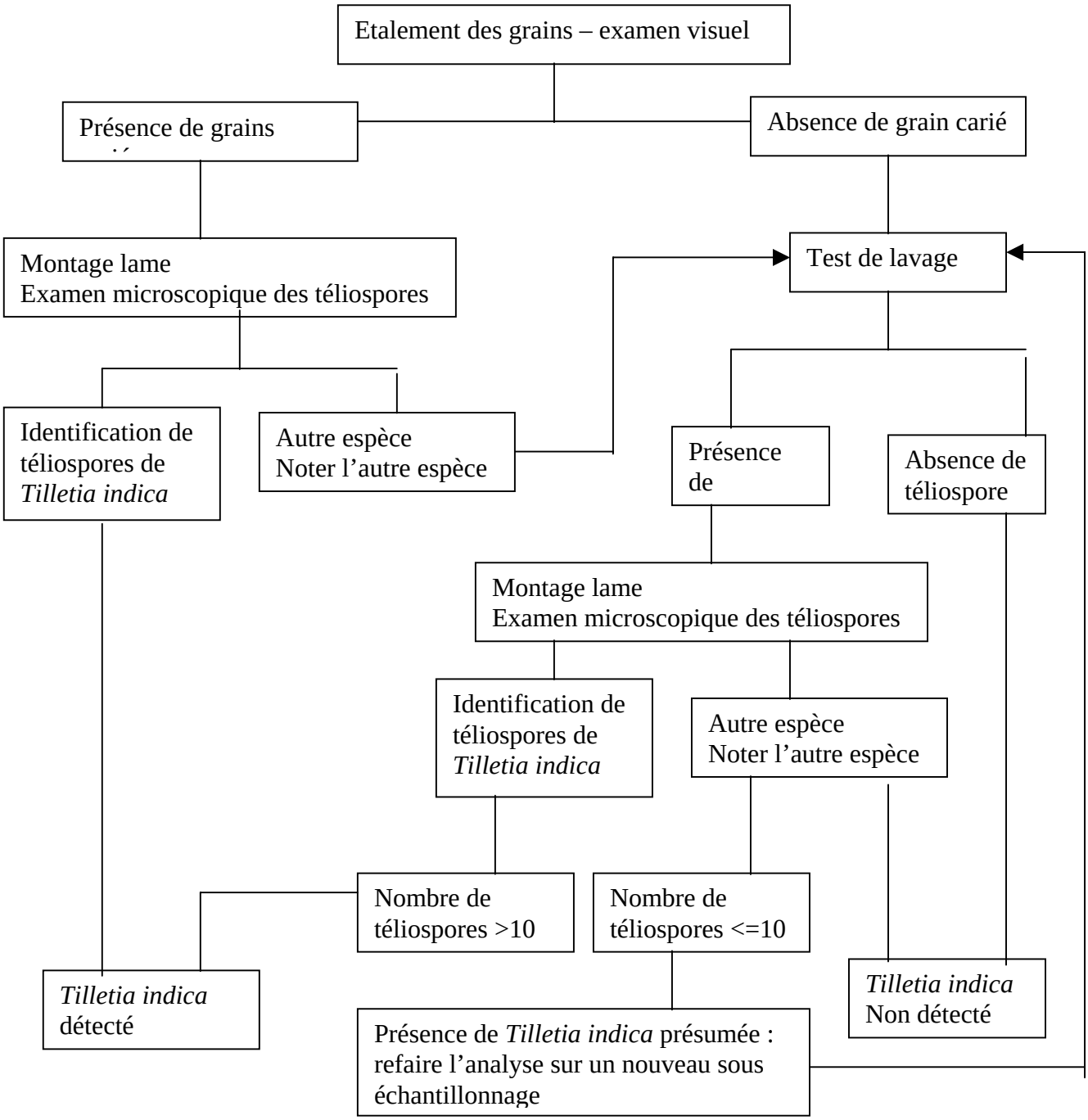
Téliospore : spore de dissémination à l'origine de la production de basidiospores chez les Ustilaginales (classe des Basidiomycètes).

4. Principe

Les grains de l'échantillon à analyser sont étalés afin de repérer visuellement ceux qui présenteraient des symptômes de carie, donc éventuellement contaminés par *Tilletia indica*. Le cas échéant, ces grains sont isolés et observés séparément.
Les grains d'apparence normale sont lavés au moyen d'une solution de lavage pour mettre en suspension d'éventuelles téliospores. La solution est ensuite filtrée au travers de 2 filtres de 60 et 20 µm. Les téliospores sont récupérées sur le filtre de 20 µm. L'identification du champignon se fait par comparaison des caractères morphologiques en se rapportant à des documents bibliographiques et à une lame de référence.

Remarque : il peut arriver que, pour les semences traitées, l'enrobage avec des produits gène fortement la lecture. Dans ce cas particulier, on pratique un prélavage dans une solution d'hydroxyde de sodium.

Diagramme décisionnel



5. Réactifs et produits

• Eau distillée ou osmosée stérile.
• Vernis à ongles transparent.
• Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 1°Chlorométrique minimum **[Produits corrosifs à manipuler avec précautions]**
• Solution de lavage : Ajouter environ une goutte de Tween 20 pur à un litre d'eau osmosée ou distillée stérile (des flacons de cette solution peuvent être préparés à l'avance afin de réduire le temps d'analyse).
Conservation : à température ambiante.
• Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à environ 0,2%.

6. Appareillage

Matériel courant dans un laboratoire de microbiologie, et notamment :
• Micro pipettes avec cônes de 1000 µl et 5000 µl.
• Appareils de filtration (cf. fig. 1) équipés de filtres de diamètre de pores de 60 µm (+-10 µm) et 20 µm (+- 4 µm) (ex. membrane en acétate de cellulose ou toile).
• Récipient de type plateau ou bac plastique.
• Réfrigérateur ou chambre froide permettant de garantir une conservation en froid positif (T = 5°C ± 4°C).
• Loupe binoculaire (stéréomicroscope), grossissement d'au moins G x 20 à G x 30.
• Microscope photonique à grossissement G x 100 à G x 400 équipé d'un système de mesure.
• Système de production de vide (type pompe à vide).
• Autoclave.
• Centrifugeuse (permettant d'obtenir une vitesse d'environ 1000 t/min pour un rayon du rotor de 14 cm).

7. Verrerie

• Erlenmeyer de 500 ml.
• Becher
• Flacons autoclavables

8. Consommables et petit matériel

• Boîtes de Petri.
• Tubes coniques de centrifugation.
• Parafilm.
• Papier filtre (éventuellement des coupelles en papier jetable).
• Lames en verre porte objet et lamelles couvre-objets.
• Vernis à ongle.
• Spatule.
• Masques anti-poussière risques chimiques
• Gants latex jetables

9. Echantillonnage et échantillons

Avertissements et précautions

Les téliospores de *Tilletia indica* étant extrêmement volatiles, les risques de contamination croisées sont élevés entre les différents échantillons à traiter. Il faut prendre les précautions suivantes pour la manipulation des échantillons avant, pendant et après l'analyse :

-Ne traiter qu'un échantillon à la fois,

-Bien séparer les échantillons,

-Porter des gants latex et les changer entre chaque échantillon,

-Bien désinfecter le matériel et les paillasses entre chaque échantillon.

9.1. Préparation de l'échantillon pour le laboratoire et conservation

L'échantillon est constitué d'un prélèvement d'environ 1 Kg de grains représentatifs d'un lot.

Dans le cas où la quantité de grains paraît inférieure, le poids de l'échantillon est estimé et ce nombre est reporté sur la fiche de suivi de l'échantillon.
L'échantillon est placé dans un sac plastique étanche suffisamment solide pour résister à des chocs au cours du transport. Il doit être pourvu d'un double étiquetage dans le sac et sur le sac. Il doit être accompagné d'une fiche de renseignements. Celle-ci est placée dans une enveloppe qui doit être scotchée à l'extérieur du colis qui, de plus, doit comporter une signalétique indiquant la quarantaine (ex. ruban adhésif quarantaine, contrôle phytosanitaire, etc.). Le colis est envoyé au laboratoire dans les plus brefs délais.

Lors de sa réception au laboratoire, l'échantillon peut être stocké avant analyse. Au cours du stockage et de la conservation, toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations à d'autres ou par d'autres échantillons (utilisation de bocaux à bouchons vissés par exemple).
Conservation : 5°C ± 4°C pour empêcher le développement des insectes ravageurs.

9.2. Préparation de deux sous échantillons ou prises d'essai pour analyse

Le contenu du sac de grains est transféré dans un récipient plat de type plateau ou bac plastique suffisamment vaste pour étaler de façon correcte et homogène la totalité du matériel à analyser.

L'analyse comporte deux prises d'essai par échantillon :

A l'aide d'une spatule, les grains sont mélangés puis dix prélèvements aléatoires minimum en dix points différents du récipient sont effectués afin de constituer un volume minimal de 60 ml (correspond à un minimum de 1000 grains). Ces 10 prélèvements constituent une prise d'essai pour analyse.

Un échantillon peut-être également conservé quelques temps (quelques semaines par exemple) après analyse (cas d'analyses dans le cadre d'échanges internationaux par exemple). Il est alors à nouveau placé dans un sac plastique étanche et stocké à 5°C ± 4°C.

10. <u>Mode opératoire</u>

10.1. Prise d'essai pour analyse

Chaque prise d'essai est ainsi constituée d'un minimum de 1000 grains. Le volume nécessaire, correspondant à ce minimum à atteindre, est indiqué par un trait gravé sur un erlenmeyer de 250 ml réservé à l'analyse.

10.2. Essai témoin

Témoin positif : lames microscopiques de référence, serties au vernis, qui présentent des téliospores de *Tilletia indica.*

10.3. Déroulement du test

Remarque : une manipulation supplémentaire préalable est nécessaire lorsque l'analyse porte sur des semences traitées, car les produits de traitement des semences peuvent gêner l'observation. Dans ce cas :

Laver les semences par trempage dans une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à environ 0,2% (cf. § 5) pendant 24 heures à température ambiante.

Rincer à l'eau distillée ou osmosée stérile puis étaler les semences sur un papier absorbant sous une hotte filtrante pour séchage.

Ensuite, pour tout type de grain (traité et non traité) :

10.3.1. Observation de grains cariés

Bien étaler les grains afin de repérer ceux qui sont cariés, reconnaissables à leur aspect noir luisant contrastant avec la teinte jaune pâle des grains sains.

Enlever les grains cariés détectés et préparer une lame avec les téliospores prélevées dans la partie cariée au moyen d'un scalpel ou d'une aiguille lancéolée pour un examen microscopique.

Observer les lames montées et scellées par une bande de vernis à ongle au microscope photonique à grossissement Gx100 pour détecter la présence de spores. Si des spores de *Tilletia sp*. sont observées, passer au grossissement Gx400 pour identifier l'espèce. Pour la détermination, se reporter à la fiche descriptive en annexe.

Si aucun grain carié ni téliospore caractéristique de *T. indica* ne sont observés, poursuivre l'analyse avec le lavage (§ 10.3.2 et diagramme décisionnel § 4).

10.3.2. Lavage

Effectuer deux prises d'essais pour analyse (§ 9.2) et transvaser chaque prise d'essai dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml contenant environ 200 ml de la solution de lavage.

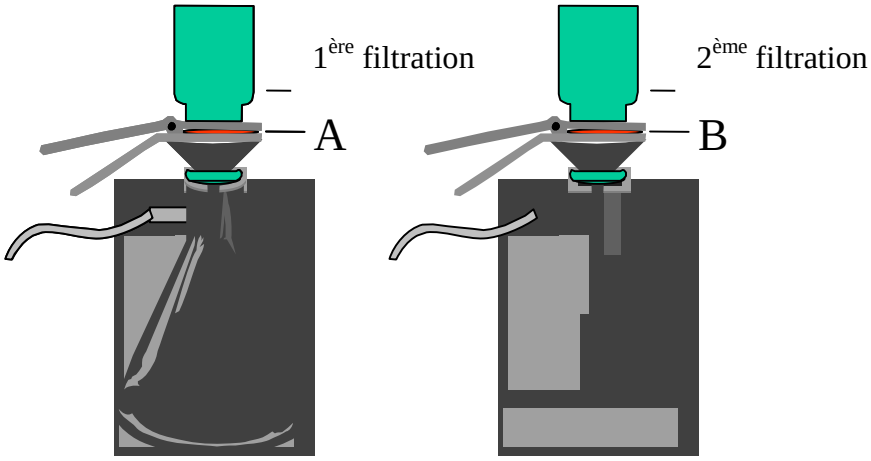
-Recouvrir la fiole de parafilm ®.
-Agiter vigoureusement à la main pendant environ 30 secondes.
-Laisser reposer quelques secondes.

10.3.3. Filtration

-Filtrer la solution de lavage en utilisant un appareillage de filtration sous vide (cf. §6) surmonté d'un filtre de 60 µm (+- 10 µm) pour retenir les grains et les débris.

-Récupérer le filtrat puis réaliser une deuxième filtration sur un second appareillage de filtration équipé d'une membrane de 20 µm (+- 4 µm) de façon à retenir les téliospores potentiellement présentes.

-Récupérer délicatement le filtre de 20 µm et laver minutieusement dans un petit bécher la face supérieure de ce filtre avec environ 12 à 14 ml d'eau stérile à l'aide d'une micro pipette munie d'un cône de 5 ml.



A – Filtre de 60 µm qui retient graines et débris ;

B - Filtre de 20 µm qui retient les téliospores ;

Figure 1. Dispositif de filtration

10.3.4. Centrifugation

-Transférer le liquide contenant potentiellement les téliospores dans un tube de centrifugation de 15 ml.
-Centrifuger à une vitesse minimale de 1000 t/min (pour un rayon du rotor de 14 cm), ou accélération équivalente, pendant au moins 1 minute à température ambiante.
-Enlever délicatement le surnageant en laissant 1 ml environ au-dessus du culot.
-Centrifuger à nouveau à une vitesse minimale de 1000 t/min (pour un rayon du rotor de 14 cm), ou accélération équivalente, pendant au moins 1 minute à température ambiante.
-Eliminer la majorité du surnageant en laissant un minimum de liquide au-dessus du culot.
-A l'aide d'une micropipette munie d'un cône de 1000 µl, remettre le culot en suspension dans de l'eau par aspiration refoulement. Monter la suspension obtenue entre lame et lamelle en prenant bien soin de répartir la totalité du volume récolté sur un nombre nécessaire et suffisant de lames.

Remarque : le culot peut être conservé au réfrigérateur pour des analyses ultérieures.

10.3.5. Lecture

-Observer les lames au microscope à des grossissements variant de 100 à 400 x, comme indiqué au paragraphe 10.3.1. Lorsque des téliospores sont présentes, se reporter à la fiche descriptive en annexe pour l'identification de l'espèce. Suivre le diagramme décisionnel.

-Les téliospores observées seront identifiées comme produits de l'espèce *T. indica* si tous les critères spécifiques listés dans le tableau annexé sont satisfaits.

11. Expression des résultats

Le résultat sera exprimé sous forme qualitative, par un tableau ou une phrase du type :

⇨ lorsque le résultat de l'analyse est négatif :

" ***Tilletia indica*** non détecté par filtration sélective et/ou observation morphologique dans l'échantillon analysé ".

⇨ lorsque le résultat de l'analyse est positif :

" ***Tilletia indica*** détecté par filtration sélective et/ou observation morphologique dans l'échantillon analysé ".

La mise en évidence de ***T. indica*** peut être confirmée par l'envoi, au laboratoire de référence, de l'échantillon accompagné de lames fixées et d'une fiche de renseignements.

12. Références bibliographiques

- **AGARWAL V.K., MATHUR S.B.**, 1992. Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides. *FAO Plant Prot. Bull.*, **40** (4) : 148-153.
- **AGARWAL, V.K., VERMA H.A.,** 1983. A simple technique for detection of karnal bunt infection in wheat seed samples. *Seed Res.*, **11** (1) : 100-102.
- **CASTRO C., SCHAAD N.W., BONDE M.R.**, 1994. A technique for extracting *Tilletia indica* teliospores from contaminated wheat seeds. *Seed Sci. and Technol.*, **22** : 91-98.
- **ORGANISATION EUROPÉENNE ET MÉDITERRANÉENNE POUR LA PROTECTION DES PLANTES** - 96/5538 - WP RP point 9 - The detection of teliospores of *Tilletia indica*, the causal agent of Karnal bunt of wheat sampled during the national Karnal bunt survey and the export elevator survey. April 1996, USDA.
- **Commonwealth Mycological Institute**. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria : Fiche n° 719 (***Tilletia caries***), fiche n° 720 (***Tilletia foetida***), fiche n° 746 (***Tilletia controversa***), fiche n° 748 (***Tilletia indica***).
- **WIESE M.V.**, 1987. **Compendium of Wheat diseases**. The American Phytopathological Society. 106 pp.
- **ZILLINSKY F.J.**, 1983. **Maladies communes des céréales à paille *:* Guide d'identification**. Centre international pour l'amélioration du maïs et du blé. 140 pp.
- **RAPILLY F., LEMAIRE J.M., CASSINI R.,** 1973. **Les principales maladies cryptogamiques des céréales**. INRA Département de Pathologie Végétale. Ouvrage I.T.C.F.
- **EU** Recommended protocol for the diagnosis of a quarantine organism *:* ***Tilletia indica***

ANNEXE 1

Détermination de différentes espèces de *Tilletia* spp. présentes sur céréales ou morphologiquement proches de *T. indica*

	T. caries (DC.) Tul.	***T. controversa*** Kühn	***T. foetida*** (Wallr.) Liro	***T. indica*** Mitra	***T. barclayana*** (Bref.) Sacc. & Syd.	***T. walkeri*** Castlebury & Carris
Synonymes	***T. tritici*** (Bjerk.) Wolf ***Uredo caries*** de Candolle	***T. brevifaciens*** Fischer	***T. laevis*** Kühn	***Neovossia indica*** (Mitra) Mundkur	***T. horrida*** Takahashi	
Répartition géographique	Cosmopolite	Cosmopolite	Cosmopolite	Inde, Pakistan, Iraq, Mexique, U.S.A.	Asie, extrême Orient, Afrique, Amérique centrale	Cosmopolite
Hôtes	*Triticum* et nombreuses graminées	*Triticum* et nombreuses graminées	*Triticum* et nombreuses graminées	*Triticum, Triticale*	*Oryza sativa et* diverses graminées	*Lolium multiflorum, L. perenne*
Maladie	Carie commune	Carie naine	Carie lisse	Carie de Karnal	Rice smut	Ryegrass bunt
Morphologie des spores						
Forme	Globuleuse ou subglobuleuse à ovoïde	Globuleuse à subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse à ovoïde	Globuleuse ou subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse	Globuleuse ou subglobuleuse
Couleur	Brun rougeâtre ou brun clair	Jaune à brun rougeâtre	Brun olivâtre	Brun rougeâtre sombre à presque noire (opaque)	jaune pâle à brun marron (semi opaque)	jaune pâle à brun rouge foncé (jamais opaque)
Paroi *	Réticulation polygonale : 0,5 - 1,5 µm de haut, < 3 µm de large	Réticulation polygonale : 1,5 - 3 µm de haut, 3 - 5 µm de large	Lisse à légèrement trouée	Verruqueuse densément échinulée, finement cérébriforme (espaces étroits)	Verruqueuse, echinulations pointues et fréquemment courbées (espaces étroits)	Verruqueuse coralloïde (ornementations plus espacées)
Gaine	Absente	Présente, peu visible	Absente, parfois court fragment de mycélium attaché	Absente, parfois appendice cellulaire court	Présente , hyaline ou tintée, parfois apiculus court	
Taille (en µm) *	14 - 18,0 - 23	16 - 19,9 - 25	13 - 18,8 - 25	28 - 35-41 - 54	20- 24-28 - 40	24-30-31-44

**D'après les fiches du Commonwealth Mycological Institute et le protocole EU pour la détection de Tilletia indica*