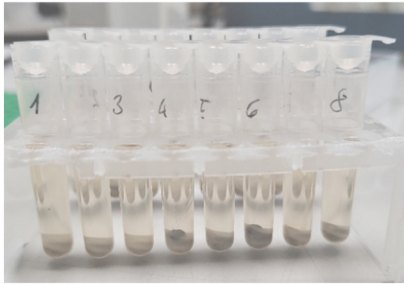


# La détection de charbon nu dans les semences d'orge et le niveau d'infection correspondant sur le champ



## Cecilia Panzetti

Écologie moléculaire (Agroscope), Laboratoire de génétique évolutive (Université de Neuchâtel)

Date: 12 Janvier 2024



[www.agroscope.ch](http://www.agroscope.ch) | gutes Essen, gesunde Umwelt

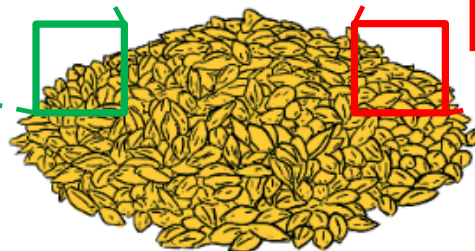


## Introduction – Charbon nu de l'orge (*Ustilago nuda*)

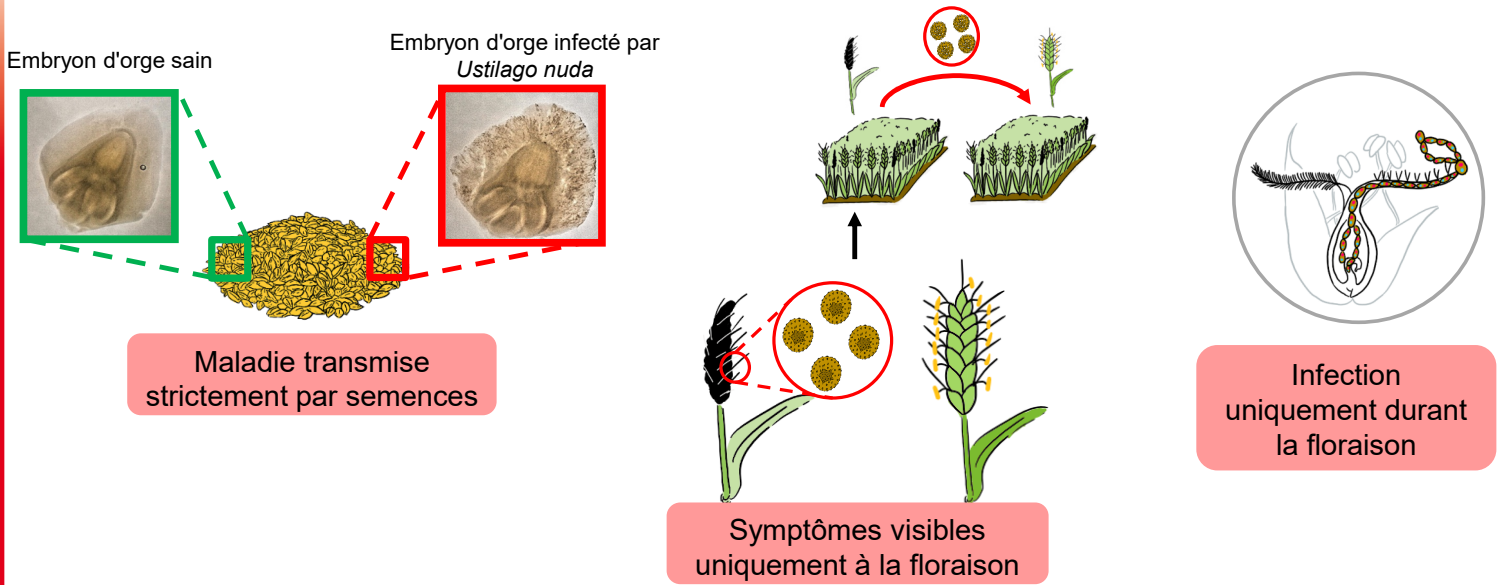
Embryon d'orge sain



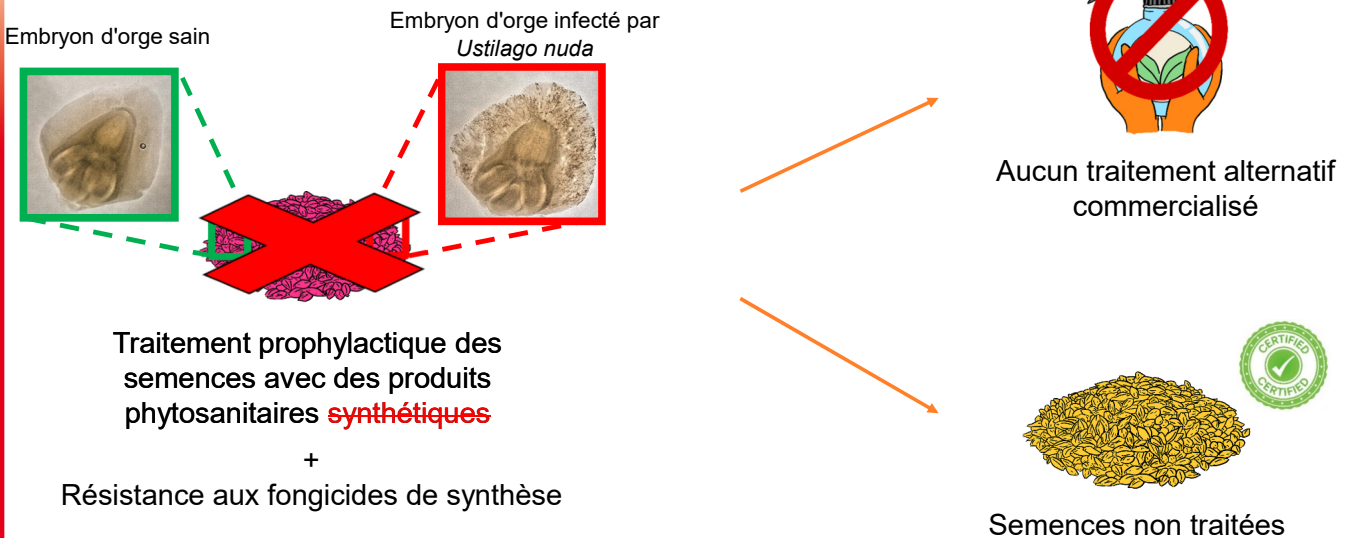
Embryon d'orge infecté par *Ustilago nuda*



# Introduction – Charbon nu de l'orge (*Ustilago nuda*)

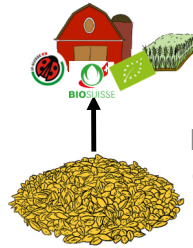


# Introduction – Charbon nu de l'orge (*Ustilago nuda*)



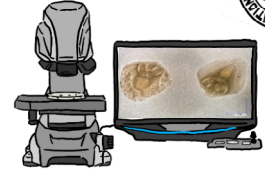
# 🇨🇭 Certification des niveaux tolérables d'infection par *U. nuda*

Surveillance des champs



Pas utilisé en Suisse

Test d'embryon



$$5 \frac{\text{\# épis infectés}}{100 \text{ m}^2}$$

$$1 \frac{\text{\# embryon infecté}}{1000 \text{ embryons}} \approx 30 \frac{\text{\# épis infectés}^*}{100 \text{ m}^2}$$

### Problèmes des méthodes:

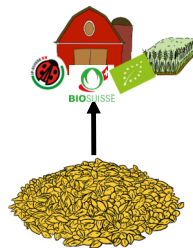
- Infections sont difficiles à détecter
- Demande de temps élevée
- Sensibles aux influences environnementales
- Pas applicable à grande échelle

**Comment faciliter la détection**



# 🇨🇭 Certification des niveaux tolérables d'infection par *U. nuda*

Surveillance des champs



### Objectifs

- Efficace en termes de temps
- Application à grande échelle

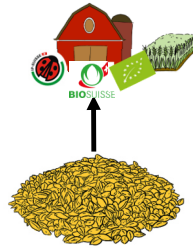
$$5 \frac{\text{\# épis infectés}}{100 \text{ m}^2}$$

# 🇨🇭 Certification des niveaux tolérables d'infection par *U. nuda*

Surveillance des champs



5  $\frac{\text{\# épis infectés}}{100 \text{ m}^2}$



Détection moléculaire

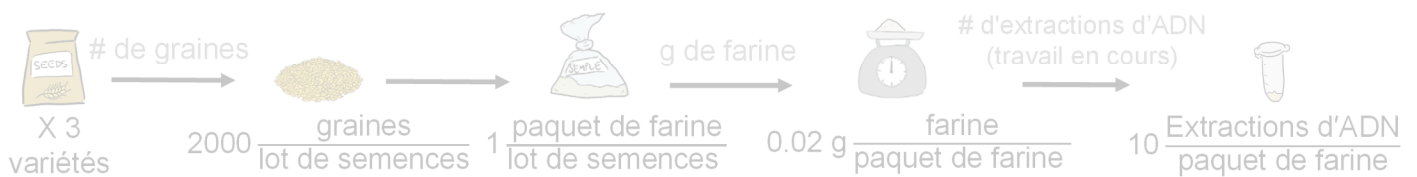


Objectifs

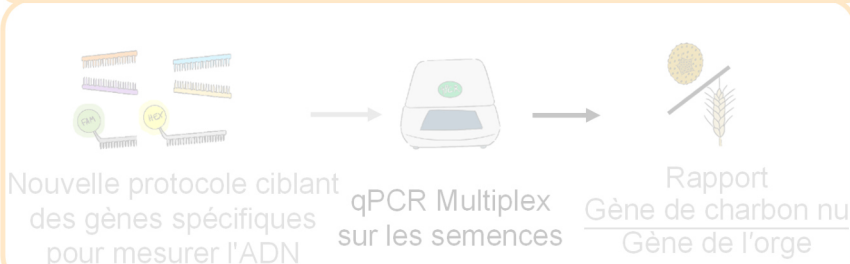
- Efficace en termes de temps
- Application à grande échelle

## 🇨🇭 Processus de développement des méthodes

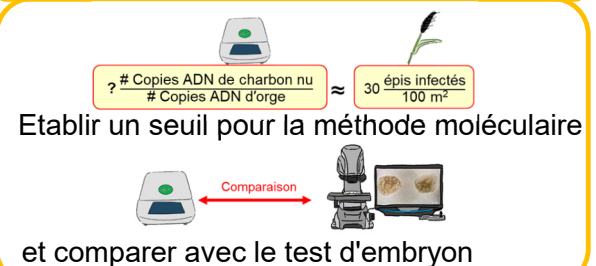
Etablir un échantillon représentatif



Optimisation de la méthode moléculaire



Prochaines étapes

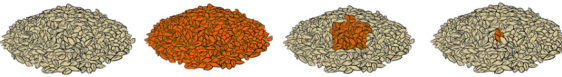






# Etablir le seuil d'acceptation pour la méthode moléculaire

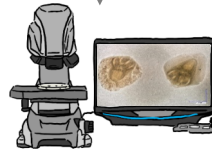
Lot «sain»    Lot «infecté»    10% «inf.» + 90% «sain»    1% «inf.» + 99% «sain»



Testé avec 3 variétés

## Objectifs d'essai:

1. Etablir quelle méthode reflète mieux l'infection sur le champ
2. Dériver le seuil d'acceptation pour la méthode moléculaire



Etablir la relation  
et dériver le seuil d'acceptation

Etablir la relation

# Copies ADN de charbon nu  
# Copies ADN d'orge

# épis infectés  
100 m<sup>2</sup>

# embryons infectés  
1000 embryons

Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

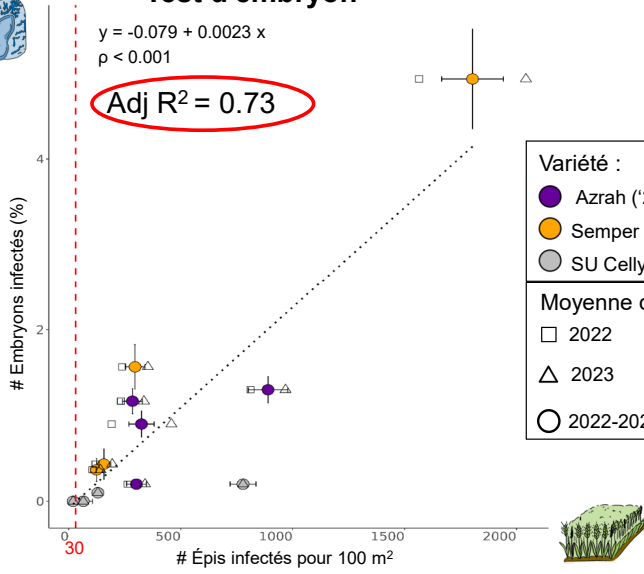


# Etablir quelle méthode reflète mieux l'infection sur le champ

## Test d'embryon

$y = -0.079 + 0.0023x$   
 $p < 0.001$

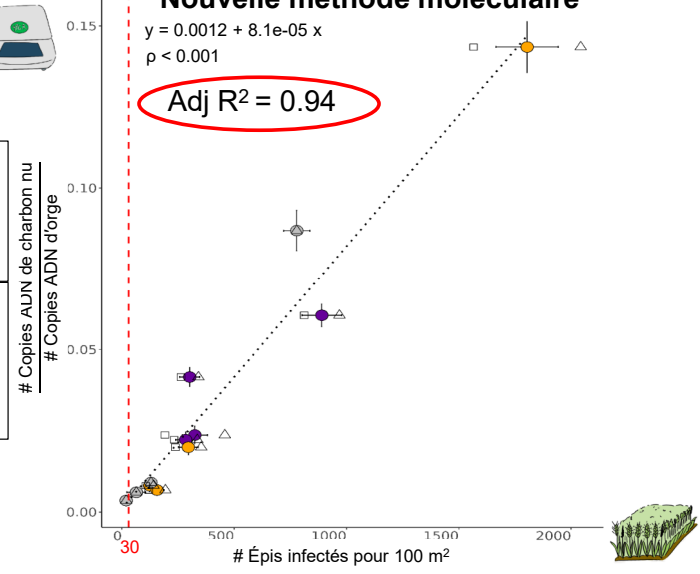
Adj R<sup>2</sup> = 0.73



## Nouvelle méthode moléculaire

$y = 0.0012 + 8.1e-05x$   
 $p < 0.001$

Adj R<sup>2</sup> = 0.94

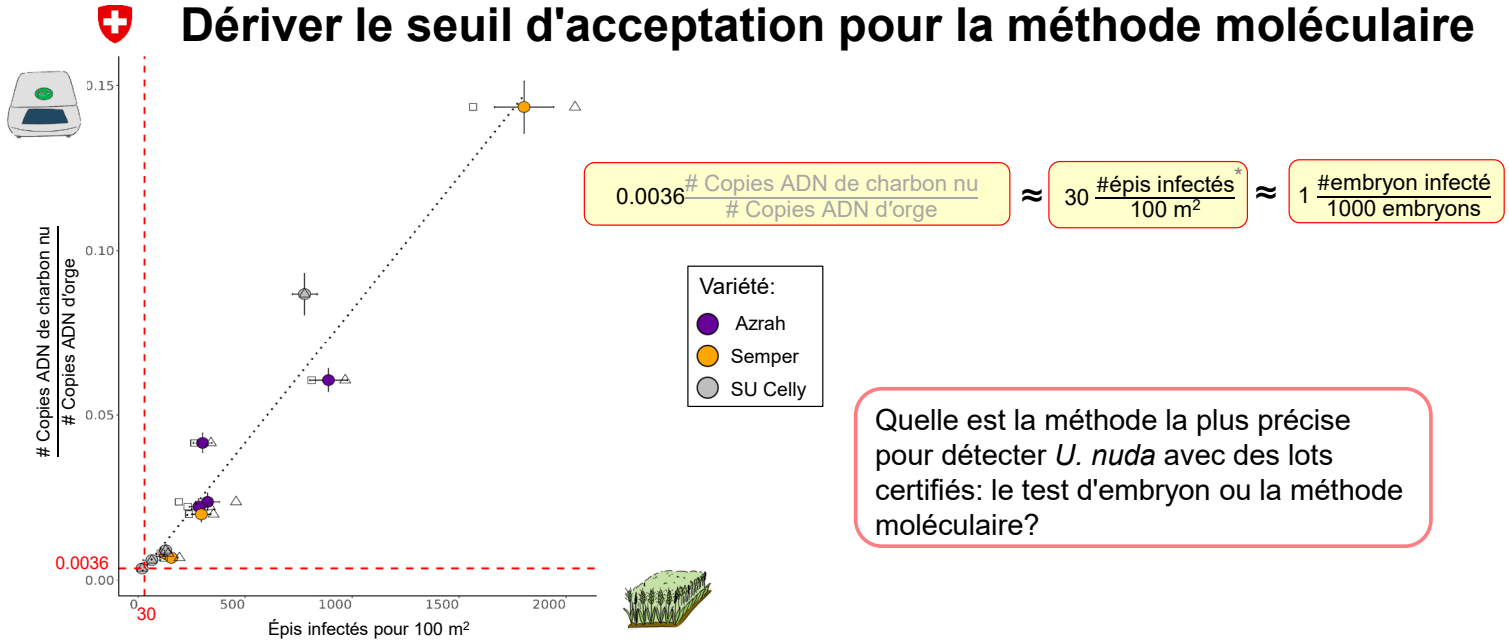


La méthode moléculaire a une corrélation plus forte avec les résultats au champ que le test de l'embryon

Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

Barre d'erreur = erreur standard

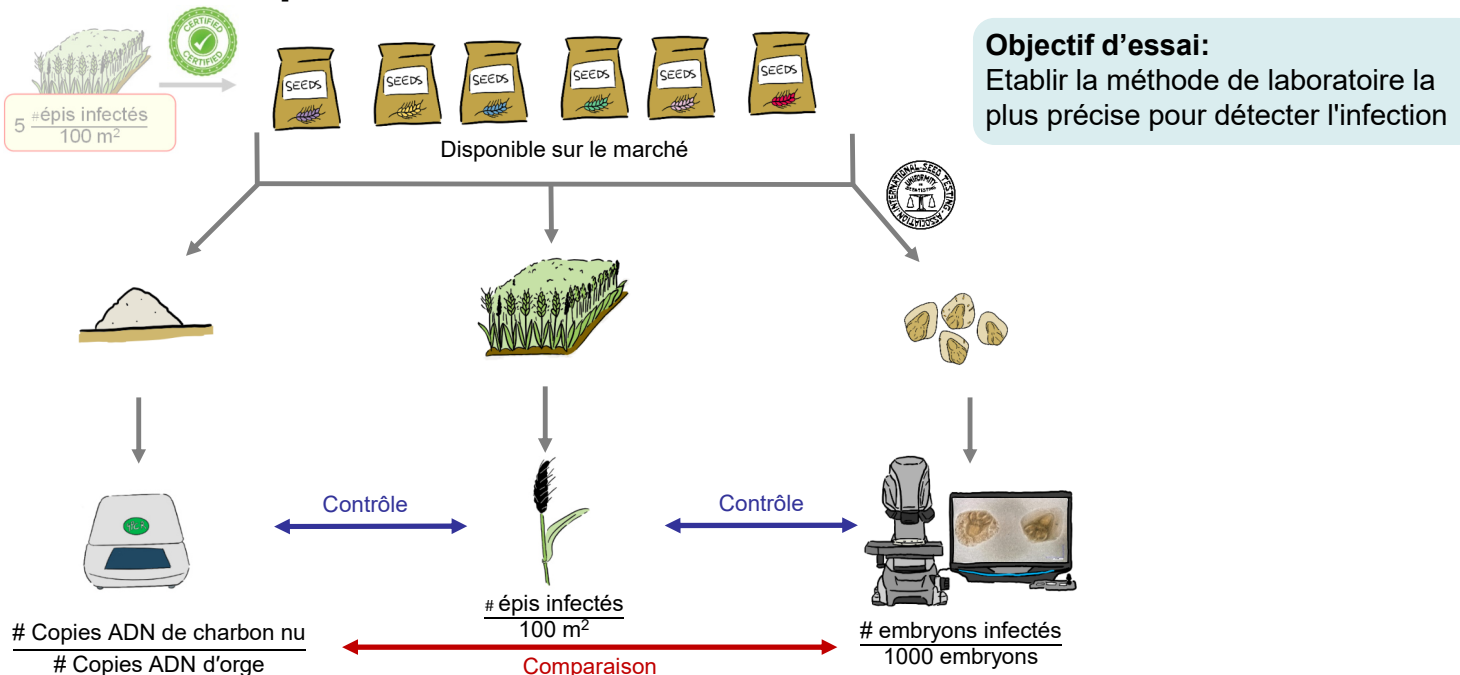
# Dériver le seuil d'acceptation pour la méthode moléculaire



Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

11  
Barre d'erreur = erreur standard  
\* densité de semis 300  $\frac{\text{graines}}{\text{m}^2}$

# Comparer les méthodes de détection



Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

12

Ces 6 lots ont été semés pour une deuxième année. Les résultats seront disponibles en mai 2024



# Etablir la méthode de laboratoire plus précise



# épis infectés  
100 m<sup>2</sup>



# ADN charbon nu  
# ADN orge



# embryons infectés  
1000 embryons

	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F
# épis infectés 100 m <sup>2</sup>	2.6 ± 2.58	13.0 ± 1.53	12.9 ± 4.46	0.0 ± 0.00	148.1 ± 25.14	34.6 ± 15.16
# ADN charbon nu # ADN orge	0.00032 ± 0.000032	0.00033 ± 0.000025	0.00076 ± 0.000073	0.00041 ± 0.000046	0.056 ± 0.0080	0.0057 ± 0.00045
# embryons infectés 1000 embryons	0	1	0	1	0	0

Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

13

\* densité de semis 300  $\frac{\text{graines}}{\text{m}^2}$



# Etablir la méthode de laboratoire plus précise

Seuil d'acceptation

✘ Au dessus le seuil  
✔ Au dessous le seuil



30 # épis infectés  
100 m<sup>2</sup>



0.0036 # ADN charbon nu  
# ADN orge



1 # embryon infecté  
1000 embryons

	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F
# épis infectés 100 m <sup>2</sup>	2.6 ± 2.58 ✔	13.0 ± 1.53 ✔	12.9 ± 4.46 ✔	0.0 ± 0.00 ✔	148.1 ± 25.14 ✘	34.6 ± 15.16 ✘
# ADN charbon nu # ADN orge	0.00032 ± 0.000032 ✔	0.00033 ± 0.000025 ✔	0.00076 ± 0.000073 ✔	0.00041 ± 0.000046 ✔	0.056 ± 0.0080 ✘	0.0057 ± 0.00045 ✘
# embryons infectés 1000 embryons	0 ✔	1 ✘	0 ✔	1 ✘	0 ✔	0 ✔

Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

14

\* densité de semis 300  $\frac{\text{graines}}{\text{m}^2}$

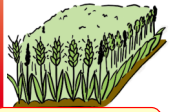


# Etablir la méthode de laboratoire plus précise

Seuil d'acceptation

✗ Au dessus le seuil

PCA [2]33 ✗ Au dessous le seuil



30 # épis infectés / 100 m<sup>2</sup>



0.0036 # ADN charbon nu / # ADN orge



1 # embryon infecté / 1000 embryons

	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Correspondant à la référence
	2.6 ± 2.58 ✓	13.0 ± 1.53 ✓	12.9 ± 4.46 ✓	0.0 ± 0.00 ✓	148.1 ± 25.14 ✗	34.6 ± 15.16 ✗	Référence
	0.00032 ± 0.000032 ✓	0.00033 ± 0.000025 ✓	0.00076 ± 0.000073 ✓	0.00041 ± 0.000046 ✓	0.056 ± 0.0080 ✗	0.0057 ± 0.00045 ✗	6/6
	0 ✓	1 ✗	0 ✓	1 ✗	0 ✓	0 ✓	2/6

Journée phytosanitaire grandes cultures ; 12.01.2024 ; Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

15

\* densité de semis 300  $\frac{\text{graines}}{\text{m}^2}$

Slide 15

PCA [2]33 Metti in chiaro quale metodo è piu preciso/migliore  
Panzetti Cecilia AGROSCOPE; 09.01.2024



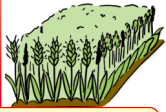
# Etablir la méthode de laboratoire plus précise

Seuil d'acceptation

- Au dessus le seuil
- Au dessous le seuil

Seuil de certification

5 # épis infectés / 100 m<sup>2</sup>



30 # épis infectés / 100 m<sup>2</sup>



0.0036 # ADN charbon nu / # ADN orge



1 # embryon infecté / 1000 embryons

	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Correspondant à la référence
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Référence
	± 2.58 ✓	± 1.53 ✓	± 4.46 ✓	± 0.00 ✓	± 25.14 ✗	± 15.16 ✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	± 0.000032 ✓	± 0.000025 ✓	± 0.000073 ✓	± 0.000046 ✓	± 0.0080 ✗	± 0.00045 ✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

Journée phytosanitaire grandes cultures | 12.01.2024 | Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

16

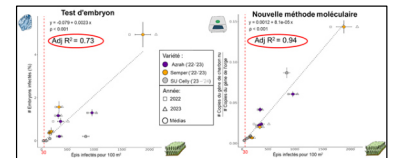
\* densité de semis 300 graines / m<sup>2</sup>



## Conclusions

La méthode moléculaire:

- reflète bien l'infection sur le champ
- est plus soignée que le test d'embryon
- pourrait être utilisée pour vérifier le niveau d'infection des semences certifiées



	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Correspondant à la référence
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Référence
	✓	✓	✓	✓	✗	✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	✓	✓	✓	✓	✗	✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

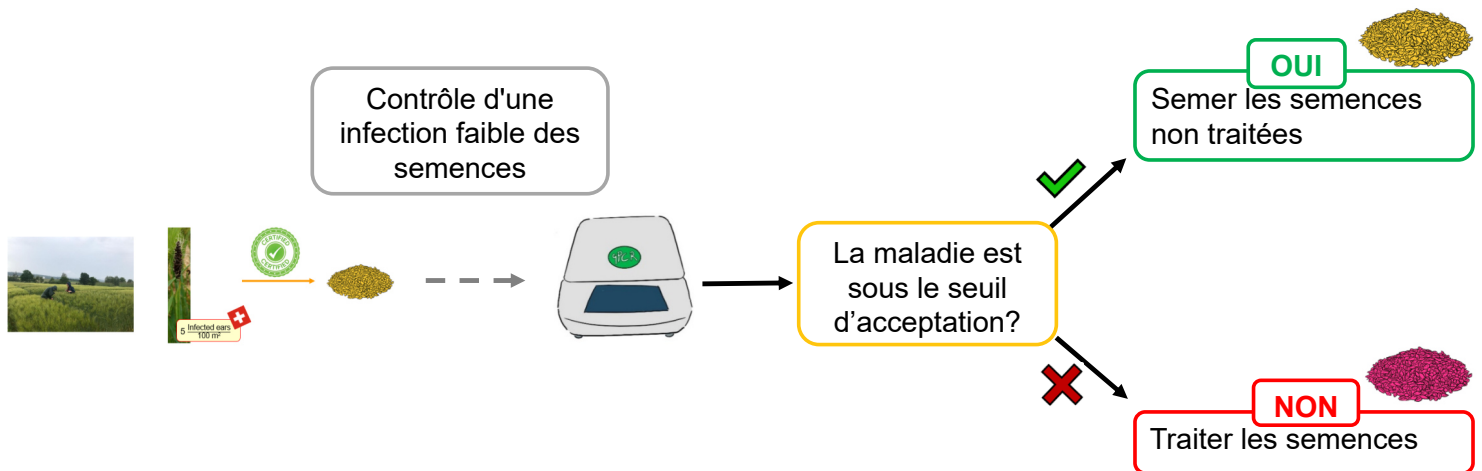
	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Correspondant à la référence
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Référence
	✓	✓	✓	✓	✗	✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	✓	✓	✓	✓	✗	✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

Journée phytosanitaire grandes cultures | 12.01.2024 | Bienne - Biel  
Cecilia Panzetti

17



## Perspective



- Réduction de l'utilisation prophylactique des fongicides synthétiques
- Contribution à la réalisation de l'i. p. 19.475

## Remerciements



Superviseur du PhD:  
Karen Sullam  
Écologie moléculaire



Superviseur académique du PhD:  
Daniel Croll  
Université de Neuchâtel

### Groupes de recherche Agroscope :



Écologie moléculaire:

Tout le groupe en particulier:

- Franco Widmer
- Jürg Enkerli
- Tabea Koch
- Florian Gschwend



Qualité des semences:

- Thomas Hebeisen
- Nicole Bischofberger
- Damian Amrein



Extension grandes cultures:

- Susanne Vogelgsang
- Irene Bänziger
- Eveline Jenny
- Andreas Kägi
- Francesco Bassi
- Magnus Wagner

### Groupe de recherche externe:



Le centre de recherche agricole de l'État de Bavière (Lfl):

- Peter Büttner

### Financement:



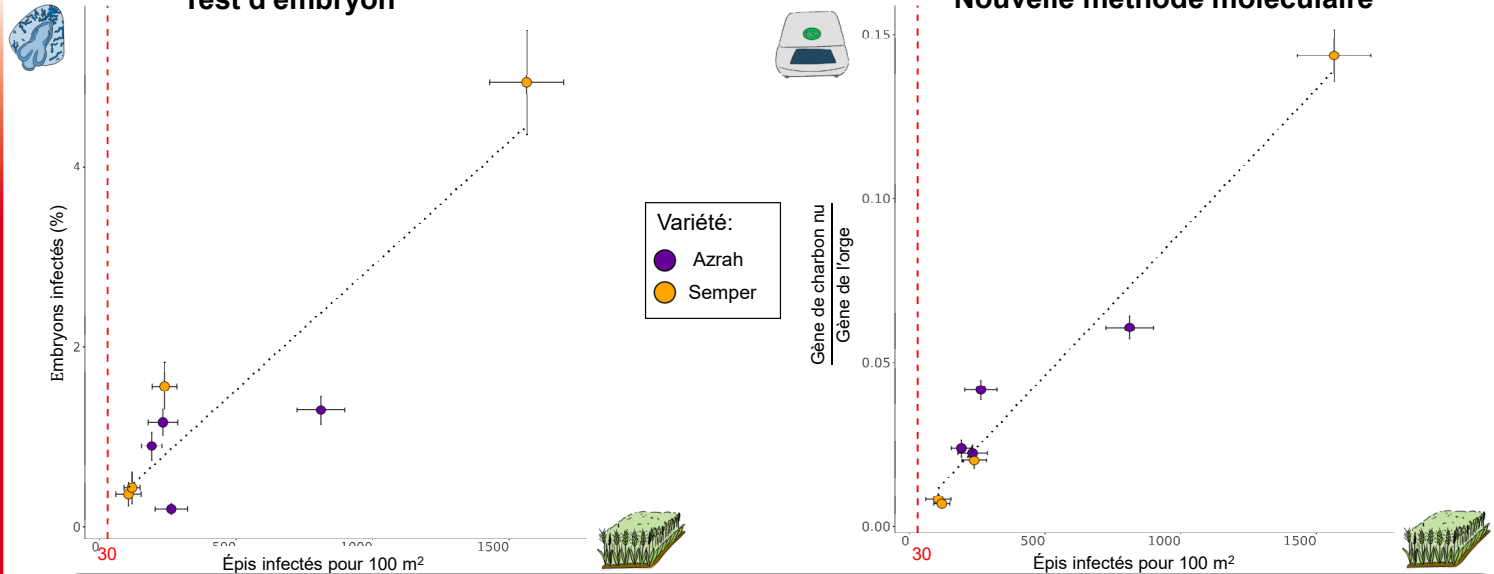


# Corrélation entre les méthodes (2022)



Test d'embryon

Nouvelle méthode moléculaire



Même les lots de semences certifiées étaient au-dessus du seuil de 30 épis infectés par 100 m2.  
Nouvelle variété (SU Celly) ajoutée pour 2023



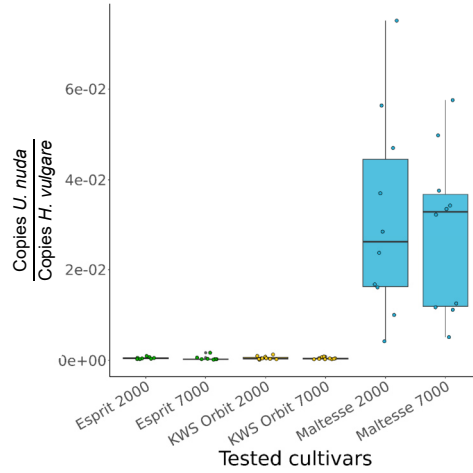
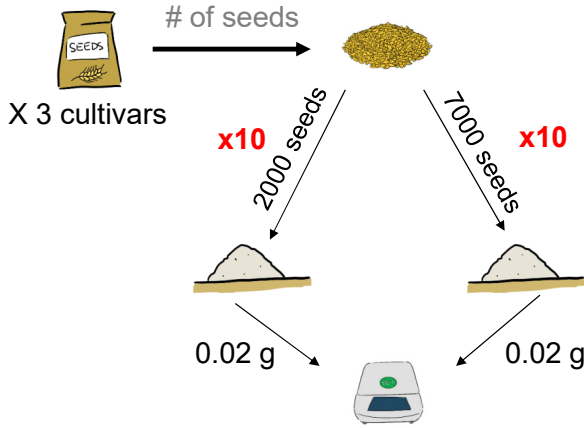
# Method establishment process



Develop the qPCR protocol



Establish a representative sample



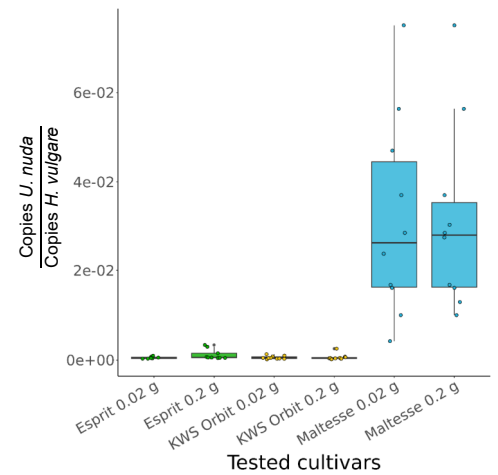
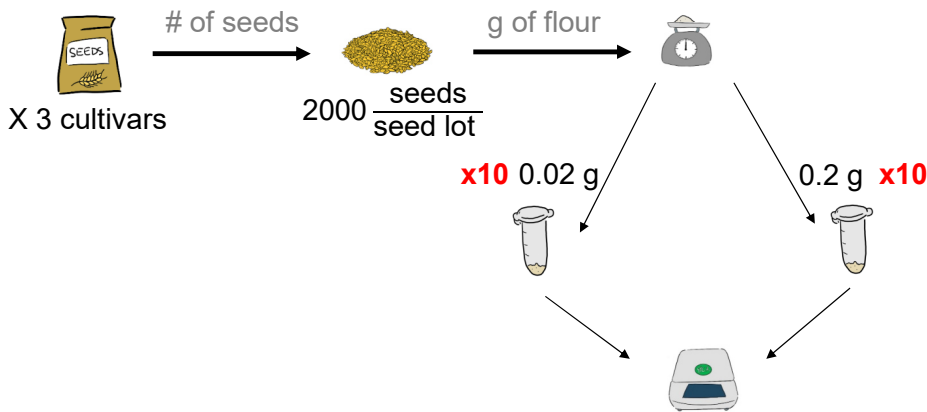
# Method establishment process



Develop the qPCR protocol



Establish a representative sample

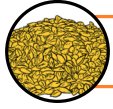




# Method establishment process



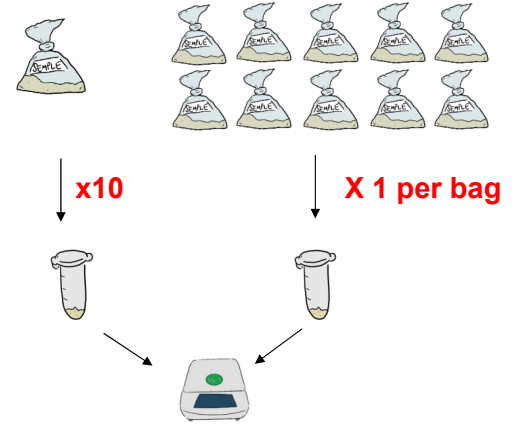
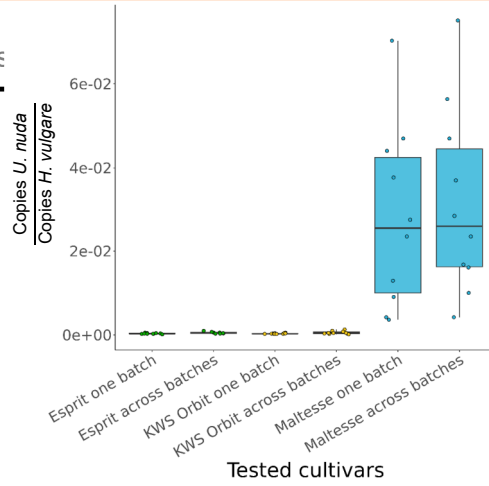
Develop the qPCR protocol



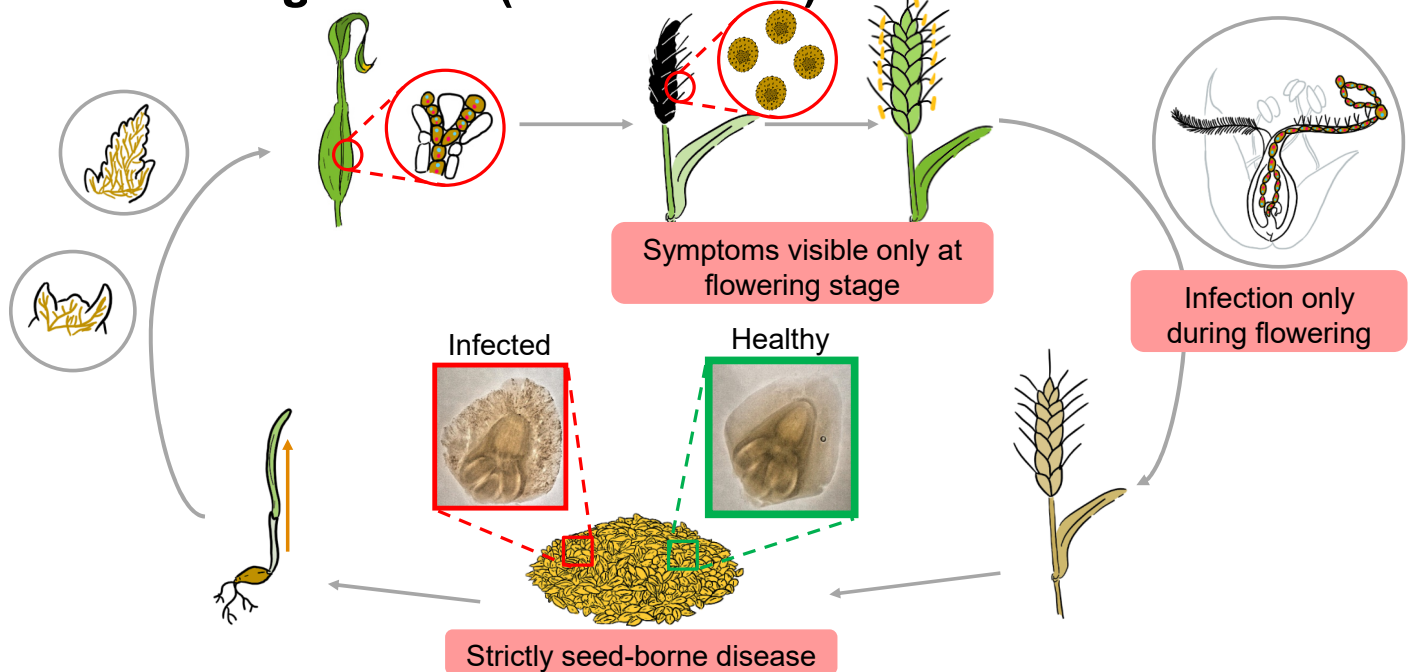
Establish a representative sample

X 3 cultivars

# of seeds



# *Ustilago nuda* (Loose smut)







# Compare the detection methods



✗ Over the threshold  
✓ Under the threshold



30 Infected ears / 100 m<sup>2</sup>



1 Infected embryo / 1000 embryos



0.00336 copies *U. nuda* / copies *H. vulgare*

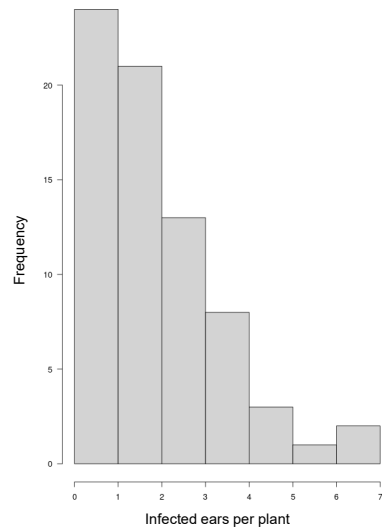
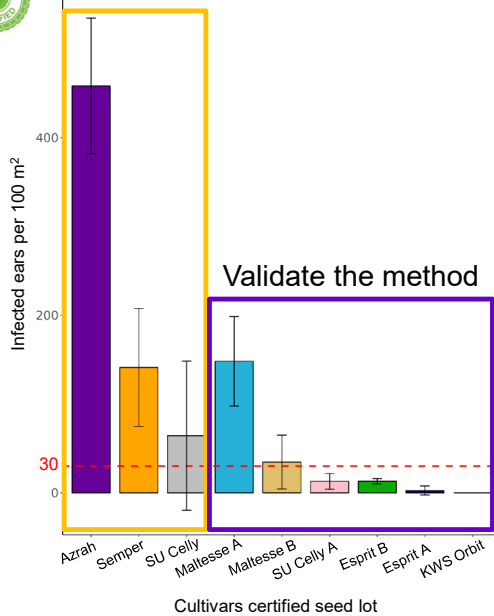
	Esprit A	Esprit B	SU Celly	KWS Orbit	Maltesse A	Maltesse B	Method/field
30 Infected ears / 100 m <sup>2</sup>	2.57 ± 5.15 ✓	12.97 ± 3.07 ✓	12.87 ± 8.91 ✓	0 ± 0 ✓	148.12 ± 50.28 ✗	34.63 ± 30.31 ✗	Benchmark
1 Infected embryo / 1000 embryos	0 ✓	1 ✗	0 ✓	1 ✗	0 ✓	0 ✓	Sensitivity = 50% Specificity = 0% Precision = 50%
0.00336 copies <i>U. nuda</i> / copies <i>H. vulgare</i>	0.00032 ± 0.00017 ✓	0.00033 ± 0.00014 ✓	0.00076 ± 0.00040 ✓	0.00041 ± 0.00025 ✓	0.056 ± 0.039 ✗	0.0057 ± 0.0025 ✗	Sensitivity = 100% Specificity = 100% Precision = 100%



# Cultivars certified seed lot all available on the market



Set threshold

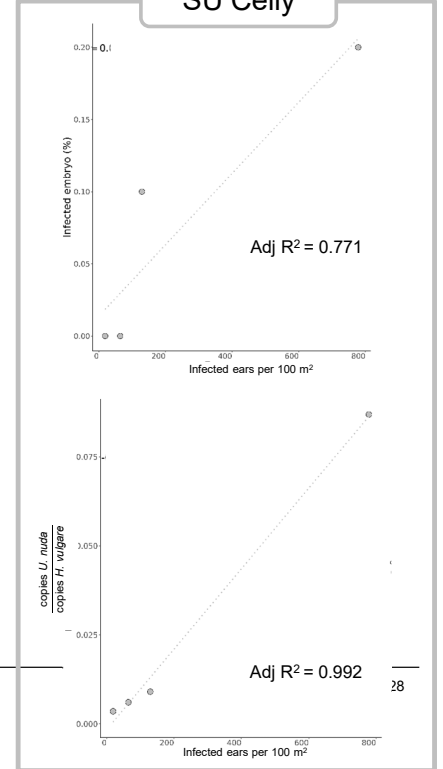
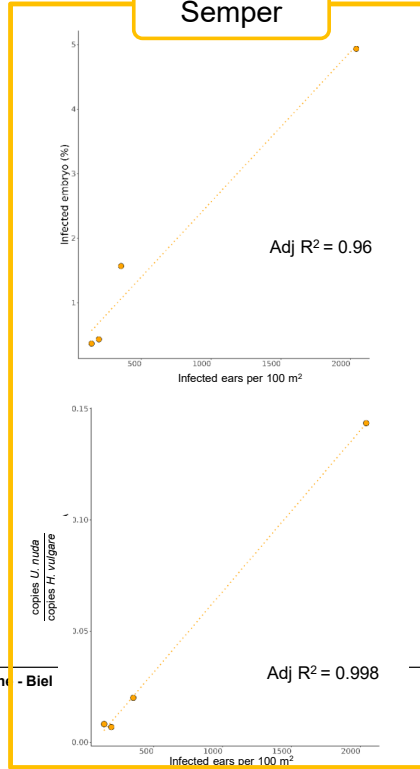
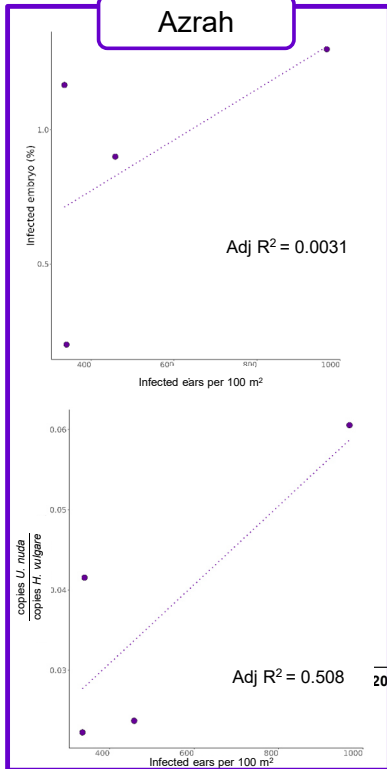






# Set threshold correlation in the cultivars

Agroscope



2024 | Bienn - Biel

28



## Why 1 infected embryo/1000 correspond to 30 infected ears/100 m<sup>2</sup>?

$$\text{Surface cover by seed tested in embryo test} = \frac{\text{Number of seed}}{\text{Sown density used in our trial}} = \frac{1000 \text{ seed}}{300 \frac{\text{seed}}{\text{m}^2}} = 3.33 \text{ m}^2$$

$$\begin{aligned} \text{Minimum number of allowed} \\ \text{infected embryos per 100 m}^2 &= \frac{\text{Field monitoring surface}}{\text{Surface cover by seed tested in embryo test}} * \text{allowed infected embryos} \\ &= \frac{100\text{m}^2}{3.33\text{m}^2} * 1 \text{ infected embryo} = 30 \text{ infeced embryo} \end{aligned}$$

$$\text{Minimum number of infected ears} = 30 \text{ infeced embryo} * 1 \text{ ears/embryo} = 30 \text{ infected ears}$$

$$\text{Maximum number of infected ears} = 30 \text{ infeced embryo} * \text{average barley ears per seed (6)} = 180 \text{ infected ears}$$



## Prices and timing

### ▪ qPCR:

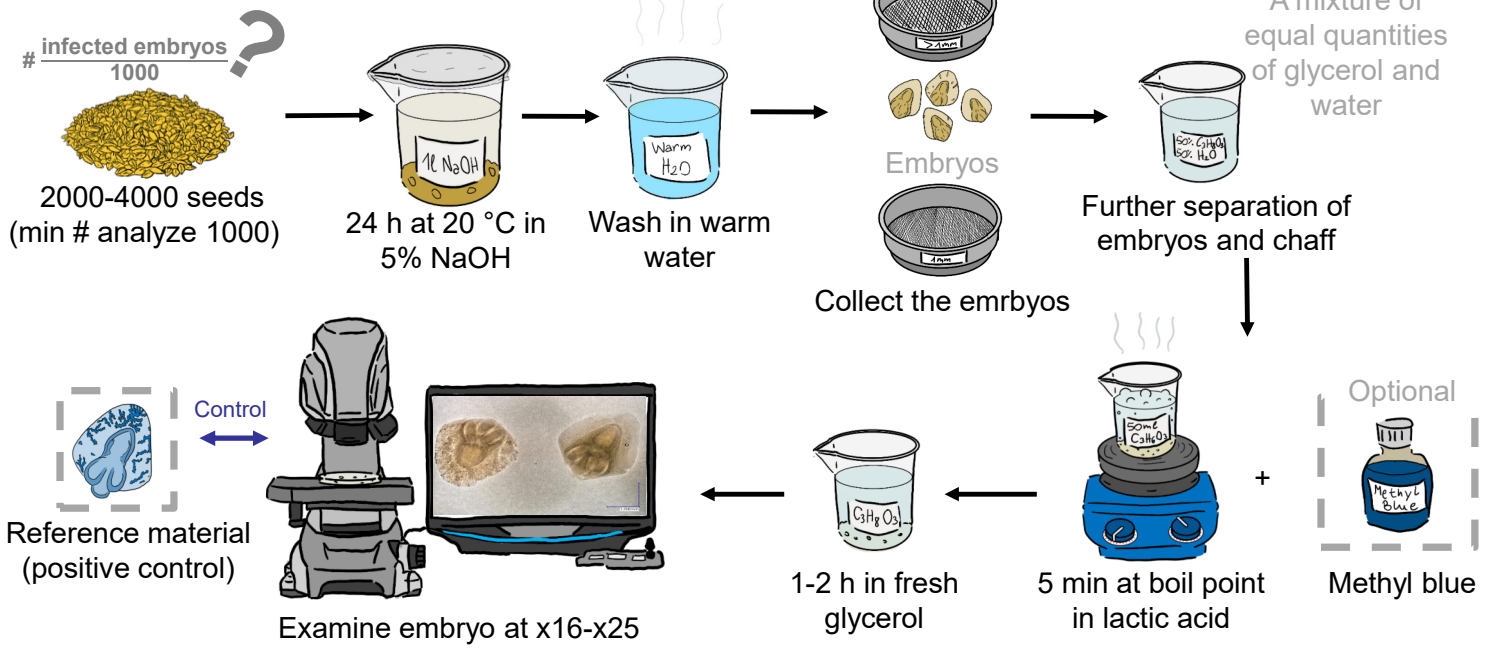
- Cost ~ 100 CHF/sample
- Time 25 samples:
  - 1 day sample preparation (count seed, mill seed, and prepare tubes with flour)
  - 1 day extraction, measure concentration, dilution and qPCR

### ▪ Embryo test:

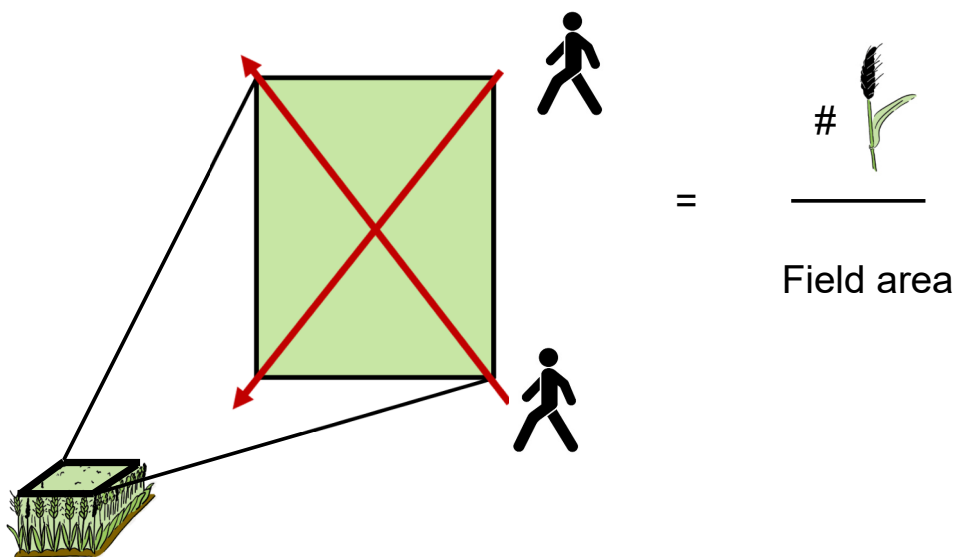
- Cost ~ 250 CHF/sample
- Time 4 samples:
  - 1 day sample preparation (up to the lab, it is possible to prepare more samples)
  - 1 day extraction and visual inspection (a worker can inspect around 4 samples per day)



# Embryo test procedure



# Field monitoring for certification





# Primer specificity (tested in silico)

Barley primers  
And probe



*H. Vulgare subsp vulgare*



*H. Vulgare subsp spontaneum*

*U. nuda* primers  
and probe



*U. nuda*



*U. hordei*



*U. bromivora*



*U. tritici*



*U. avenae*



*U. maydis*

The non-perfect specificity  
of the primers are not a  
serious problem because  
the seed must also be  
certified in purity.



*H. Vulgare subsp spontaneum*



*U. bromivora*



*U. tritici*



*U. avenae*



*Ustilago spp.*