

Mesures d'adaptation aux changements
climatiques en phytoprotection

FICHE

SYNTHÈSE

Sous-volet 3.2 – Approche interrégionale

Développement de nouveaux outils de détection moléculaire des maladies à *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Fusarium* pour les cultures de laitue, carotte et oignon.**ORGANISME** Cie de Recherche phytodata**COLLABORATEURS** Antoine Dionne, (MAPAQ), Conseillers, (PRISME),
Elisabeth Fortier, (APMQ), André Lévesque, (ACIA),
Guillaume Bilodeau, (ACIA).**AUTEURS** Hervé Van der Heyden, Thérèse Wallon

INTRODUCTION. Depuis plus d'une décennie, les changements climatiques favorisent un allongement de la saison de croissance et par conséquent, une intensification de la production, en particulier dans le secteur maraîcher. Ces changements climatiques ont également comme effet d'augmenter l'incidence et la sévérité de certaines maladies, comme c'est le cas notamment pour les maladies de sol. En production maraîchère, les principaux agents pathogènes responsables des maladies de sol appartiennent aux genres *Pythium*, *Fusarium* et *Rhizoctonia*. Les *Pythiums*, appartenant à la classe des oomycètes, représentent un des genres les plus diversifiés. On retrouve des *Pythiums* phytopathogènes dans tous les groupes de cultures. Certains, comme *Pythium ultimum*, peuvent affecter plus de 335 plantes hôtes, tandis que d'autres comme *P. tracheiphilum* n'ont que trois ou quatre plantes hôtes reconnues. Les résultats d'une étude réalisée au Québec en 2010 et 2011 par l'équipe de Phytodata en collaboration avec l'équipe du Dr. André Lévesque (AAFC), ont démontré que les principales espèces de *Pythium* retrouvées dans les tissus infectés de laitues étaient *P. tracheiphilum*, *P. ultimum*, *P. sylvaticum* et *P. irregulare*. En production de carottes, d'autres travaux ont démontré que *P. sulcatum* et *P. sylvaticum* étaient prédominants dans les échantillons recueillis dans la grande région de Québec. De leur côté, les espèces du genre *Fusarium*, particulièrement *F. oxysporum* et *F. solani*, sont également polyphages et affectent une multitude de plantes maraîchères. Ces espèces, généralement ubiquistes, sont des agents pathogènes opportunistes présents en complexes difficiles à diagnostiquer, même à l'aide de méthodes conventionnelles. *Rhizoctonia solani* est caractérisé par une division en 13 groupes anastomotiques chacun ayant des profils de pathogénicité différents. Les espèces pathogènes de *Pythium*, *Fusarium* et *Rhizocotnia* peuvent être associées à des maladies spécifiques comme l'affaissement pythien (*P. tracheiphilum*), la pourriture sèche (*Fusarium* spp.) ou la pourriture basale (*R. solani*), mais elles peuvent également être associées à des complexes racinaires provoquant la fonte des semis. Ces maladies racinaires représentent une importante contrainte pour les producteurs maraîchers du Québec et l'efficacité des stratégies de gestion intégrée mises en place reposent sur l'exactitude des méthodes de détection et de diagnostic.

OBJECTIFS. L'objectif de ce projet consistait à mettre au point des méthodes moléculaires précises et rapides permettant l'identification et la quantification de certaines espèces de *Pythium* sp., *Fusarium* sp. et *Rhizoctonia* sp affectant les cultures de laitue, de carotte et d'oignon. Les outils développés dans le cadre de ce projet sont destinés à une utilisation tant pour des fins de diagnostic, pour identifier précisément les agents pathogènes responsables des symptômes observés, qu'en tant qu'indicateurs de risque permettant de prédire les risques d'infection avant d'implanter les cultures.

MÉTHODOLOGIE. Dans le cadre de ce projet, le développement des outils moléculaires a été réalisé selon un processus comprenant neuf étapes distinctes (Figure 1). La première étape de réalisation du projet consistait à constituer une banque de souches composée d'organismes pathogènes et non pathogènes recueillis au Québec et ailleurs au Canada. Ces souches ont servi de référence pour le développement des tests et pour leur validation. Suite à l'isolement, ces souches ont également été séquencées pour différentes régions (ex. : ITS1-2, COI, EF1-2). Les séquences obtenues, alignées à des séquences de référence, ont permis de confirmer l'identité des souches isolées et ont été utilisées pour concevoir les amorces et sondes spécifiques aux espèces ciblées. Les amorces et sondes développées dans le cadre de ce projet ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Express (V3.0.1) et ajustées manuellement afin d'uniformiser les conditions de réaction de chacun des tests.

La spécificité des amorces a ensuite été éprouvée à l'aide de l'ADN des souches de la banque et de l'ADN de référence, de l'herbier national de mycologie du Canada (DAOM) ou provenant du laboratoire du Dr. André Lévesque (AAC). Par la suite, lorsque la spécificité des amorces et sondes a été validée, la sensibilité du test a été évaluée à l'aide de courbes standards réalisées à l'aide de dilutions en séries d'ADN génomique (ADNg), en spores et en ADN synthétique puis, ces courbes standards ont été superposées pour n'utiliser que la courbe en ADN synthétique. Par la suite, un système de contrôle interne a été ajouté aux systèmes afin de détecter la présence d'inhibiteurs de la réaction de PCR. Lorsque toutes ces étapes ont été terminées, certains tests ont été optimisés pour pouvoir être utilisés en multiplex et permettre la détection de deux micro-organismes dans la même réaction. Enfin, tous les tests ont été validés à l'aide d'échantillons environnementaux (sols, tissus, etc.).

RÉSULTATS. Au terme de ce projet, nous avons procédé à 2815 isolations de souches, 1035 d'entre elles ont été mises en conservation à long terme, 813 séquences d'ADN ont été générées et jusqu'à présent, 66 séquences ont été déposées dans la banque de séquences publique GenBank. Des outils moléculaires spécifiques et quantitatifs, adaptés tant à des fins de diagnostic qu'à des fins de détection quantitative ont été développés pour *P. tracheiphilum*, *P. ultimum*, *P. sulcatum*, *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare*, *P. sylvaticum*, *R. solani*, *R. solani AG-1-IB*, *R. solani AG-3*, *F. oxysporum*, *F. commune* et *F. solani*. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont conduit à la publication d'un article scientifique révisé par les pairs et feront l'objet de deux autres publications scientifiques en 2019. Les souches de référence conservées et les séquences d'ADN obtenues pourront être utilisées notamment pour développer de nouvelles approches de diagnostic.

IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET. En plus de servir à des fins de diagnostic, les outils de détection et de quantification développés dans le cadre de ce projet pourront être utilisés pour développer de nouvelles approches de lutte intégrée (LI) basées sur une estimation précise de l'inoculum présents dans les sols. L'efficacité des stratégies de LI et des approches d'atténuation pour réduire l'impact des maladies du sol sur le rendement dépend de nombreux facteurs, mais un des piliers à la base des approches de lutte intégrée consiste à identifier et surveiller avec précision les populations d'agent pathogène¹. De plus, le succès des agents de biocontrôle utilisés dans le cadre d'une stratégie de LI peut être influencé par l'abondance des espèces pathogènes^{2,3}. Par conséquent, la mise au point de ces tests pour quantifier la concentration de l'inoculum dans les sols représente la première étape vers l'élaboration d'une stratégie de LI efficace

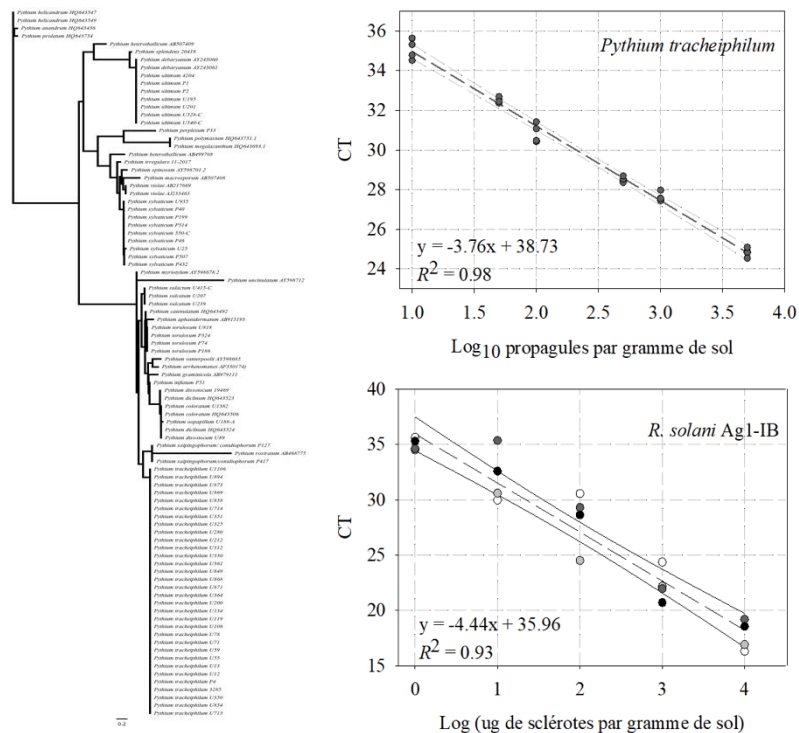


Figure 1: Exemple d'arbres utilisés pour la sélection des espèces à utiliser pour évaluer la spécificité des amorces de PCR et résultats de courbes standards utilisés pour la détection de *P. tracheiphilum* et *R. solani* dans les sols organiques.

DÉBUT ET FIN DU PROJET
 2015-2018
POUR INFORMATION

¹ Chellemi, D. O., Gamliel, A., Katan, J., and Subbarao, K. V. 2016. Development and deployment of systems-based approaches for the management of soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 106:216-225.

² Narisawa, K., Shimura, M., Usuki, F., Fukuhara, S., and Hashiba, T. 2005. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. *Plant Disease* 89:285-290.

³ Weiland, J. E. 2013. *Pythium* species and isolate diversity influence inhibition by the biological control agent *Streptomyces lydicus*. *Plant Disease* 98:653-659.