

## Développement de nouveaux outils de détection moléculaire des maladies à *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Fusarium* pour les cultures de laitue, carotte et oignon.

PV-3.2-DP-PHYT-6

MARS 2015-DÉCEMBRE 2018

### RAPPORT FINAL

#### Réalisé par :

Hervé Van der Heyden, Phytodata

Thérèse Wallon, Phytodata

#### Collaborateurs:

Antoine Dionne, (MAPAQ)

Conseillers, (PRISME)

Élisabeth Fortier, (APMQ)

André Lévesque, (ACIA)

Guillaume Bilodeau, (ACIA)

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

## **Développement de nouveaux outils de détection moléculaire des maladies à *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Fusarium* pour les cultures de laitue, carotte et oignon.**

### **RÉSUMÉ DU PROJET**

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. C'est le cas notamment pour les maladies de sol, causées notamment par les pathogènes appartenant aux genres *Pythium*, *Fusarium* et *Rhizoctonia*. Ces espèces 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 d'ailleurs. De plus, l'efficacité des stratégies de gestion intégrée mises en place à la ferme reposent sur l'exactitude des méthodes de détection et de diagnostic. Ainsi, 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 moléculaires quantitatifs développés dans le cadre de ce projet sont destinés à une utilisation tant pour des fins de diagnostic que pour des fins de détection et quantification. Au terme de ce projet, 2815 souches ont été isolées et 1035 d'entre elles ont été mises en conservation à long terme. Des outils moléculaires spécifiques et quantitatifs ont été développés pour *Pythium tracheiphilum*, *P. ultimum*, *P. sulcatum*, *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare*, *P. sylvaticum*, *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-1-IB, *R. solani* AG-3, *Fusarium oxysporum*, *F. commune* et *F. solani*. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont conduit à la publication d'un article scientifique 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.

### **OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE**

Dans le cadre de ce projet, le développement des outils moléculaires a été réalisé selon un processus comprenant neuf étapes distinctes. 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). Une fois la spécificité des amorces et sondes 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 complétées, 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.).

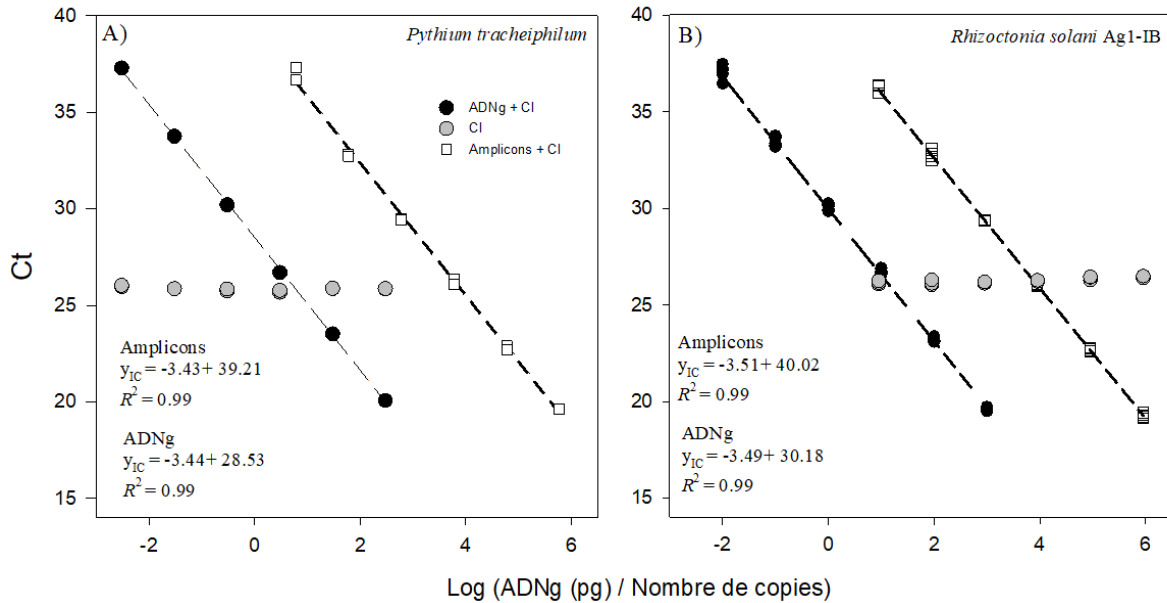
## RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

**Isolation, souches et séquençage.** Au terme de ce projet, nous avons isolé 2815 souches et 1035 d'entre elles ont été mises en conservation à long terme. Au total, 625 séquences ITS, 161 séquences EF et 27 séquences COI ont été générées et consignées dans une base de données interne. L'alignement des séquences obtenues dans le cadre du projet avec les séquences de référence, combiné aux analyses de parcimonies, ont permis d'une part d'identifier des régions uniques aux espèces ciblées, en plus d'identifier les espèces proches à utiliser pour les tests de spécificité. Au total, 229 souches de *Pythium* représentant 19 espèces ont été séquencées pour ITS et, jusqu'à présent, 66 séquences de *Pythium* spp. ont été déposées dans la banque de séquences publique GenBank (numéros d'accèsion MH023325 à MH023389). Pour *Rhizoctonia solani*, 161 souches ont été séquencées pour ITS, représentant 10 AG-multinucléés et 6 AG-binucléés. Enfin, 157 souches de *Fusarium* spp. représentant 17 espèces ont été séquencées pour une portion du facteur d'élongation (EF1).

**Sondes et amorces spécifiques.** Pour les Pythiums, trois marqueurs ont été récupérés et validés à partir de la littérature scientifique tandis que quatre marqueurs ont été conçus dans le cadre de ce projet. La spécificité de chacun des tests a été validée à l'aide d'un jeu de 39 souches de *Pythium* spp. n'ayant pas servi à la conception des marqueurs. Les souches choisies appartenaient aux clades A, B, F, H, I et J tel que décrit par (Lévesque and De Cock 2004; Robideau et al. 2011). De cette façon, la spécificité des marqueurs a pu être évaluée à l'aide d'espèces proches appartenant aux mêmes clades. Chacun des marqueurs a également été testé contre une dizaine d'isolats appartenant à d'autres genres (*Phytophthora* spp., *Peronospora* spp., *Botrytis* spp., *R. solani*, *S. sclerotiorum*, etc.). Ainsi, les marqueurs présentés sont spécifiques aux espèces ciblées. Pour *R. solani*, une sonde TaqMan a été conçue et combinée aux amorces de PCR développés par Johanson et al. (1998). Ce jeu d'amorces et sonde est destiné à la détection de toutes les souches de *R. solani*, sans considération pour leur groupe anastomotique. Ainsi, ce jeu d'amorces et sonde est spécifique à *R. solani* mais ne permet pas de distinguer les groupes anastomotiques auxquels ils appartiennent. L'association des groupes anastomotiques à des cultures spécifiques suggère toutefois une plus grande susceptibilité à certains groupes anastomotiques. C'est le cas de la laitue, pour qui le principal groupe anastomotique isolé était AG-1-1B et pour la pomme de terre, pour qui le principal groupe anastomotique était AG-3. Dans ce contexte, un marqueur a été développé pour une détection spécifique du groupe AG-1-1B, prédominant en production de laitue, et un marqueur publié préalablement par Lees et al. (2002) a été validé pour AG-3 dans le cadre du projet. Pour *Fusarium oxysporum* et *F. commune*, des marqueurs développés antérieurement par Leon (2014) ont été évalués. Ces marqueurs ont été testés contre 13 espèces de *Fusarium* spp. et contre 15 autres espèces n'appartenant pas au genre *Fusarium*. Pour *F. solani*, aucun marqueur ne satisfaisant les critères de spécificité, de nouvelles amorces et sonde ont été conçues et validées. La validation pour le marqueur *F. solani* a été réalisée avec les mêmes souches que pour *F. commune* et *F. oxysporum*.

**Contrôle interne et Courbes standards.** Chaque test a été conçu pour fonctionner avec un contrôle interne (CI) publié antérieurement (Fall et al. 2015; Van der Heyden et al. 2018). La concentration de CI n'affectant pas la réaction de qPCR a été fixée à 400 copies/ul pour *R. solani*, *R. solani* AG-3, *R. solani* AG-1-1B, *F. oxysporum*, *F. commune*, *F. solani*, *P. ultimum*, *P. sulcatum*, *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare* et *P. sylvaticum* et à 600 copies/ul pour *P. tracheiphilum*. Pour tous les essais développés, l'efficacité de la réaction de qPCR variait entre 95% et 104% avec des valeurs de pente de régression correspondantes entre -3.45 et -3.23 (voir exemple figure 1). Pour les marqueurs *Pythium*, la limite de détection a été fixée à 6 copies de l'amplicon et 30 fg d'ADN; pour les marqueurs *Fusarium*, la limite de détection était de 6 copies de l'amplicon et 3000 fg d'ADNg (elle

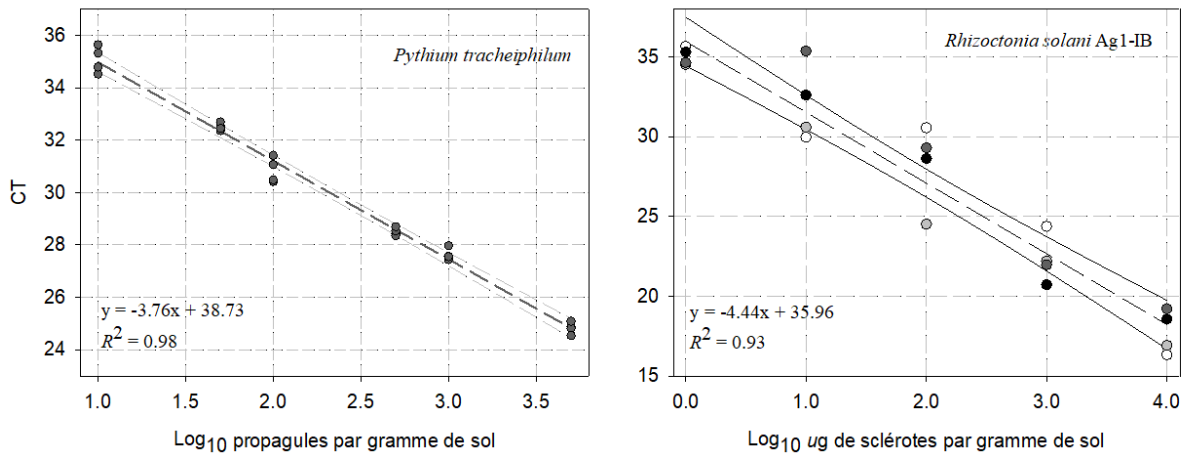
pourrait être inférieure à 3000 fg, mais des concentrations comprises entre 300 et 3000 fg n'ont pas été testées), tandis que pour les *Rhizoctonia solani* la limite de détection était de 9 copies de l'amplicon et 100 fg d'ADNg.



**Figure 1:** Exemples de courbes standards obtenues pour A) *Pythium tracheiphilum* et B) *Rhizoctonia solani* AG1-1B en ADNg, ainsi qu'en amplicons.

**Validation.** Pour cette expérience, l'ADN des sols a été extraite d'échantillons de sol organique stérilisé et inoculé avec différentes concentrations d'inoculum (spores, oospores, microsclérotés). Pour les marqueurs *Pythium*, toutes les pentes de régression obtenues variaient entre -2.72 et -3.76 avec des coefficients de détermination  $R^2$  compris entre 0.88 et 0.98 (voir exemple figure 2). Les analyses de variances ont également permis de démontrer que les différences de Ct obtenues pour chaque concentration étaient significatives ( $P < 0,0001$ ). Ainsi, la limite de détection fixée pour les marqueurs destinés à la détection des *Pythium* a été fixée à 10 propagules/g de sol sec. Pour les marqueurs *R. solani*, toutes les pentes de régression obtenues variaient entre -3.22 et -4.44 avec des coefficients de détermination  $R^2$  compris entre 0.92 et 0.98 (voir exemple figure 2). Les analyses de variances ont également permis de démontrer que les différences de Ct obtenues pour chaque concentration étaient significatives ( $P < 0,0001$ ). La limite de détection pour les marqueurs destinés à la détection des *R. solani* a été fixée à 0.1 ug de sclérote par gramme de sol sec pour les sols minéraux et 1 ug de sclérote par gramme de sol sec pour les sols organiques (voir exemple figure 2). Cette différence de sensibilité entre les sols organiques et les sols minéraux vient entre autres du fait que les extractions d'ADN des sols organiques sont réalisées sur 0.2 g de sol alors que les extractions d'ADN des sols minéraux sont réalisées sur 0.5 g de sol. Pour les marqueurs *Fusarium*, les limites de détection obtenues pour les sols sont supérieures à celles obtenues pour les autres agents pathogènes ciblés dans le cadre de ce projet. Ainsi, la limite de détection a été fixée à 10000 spores par gramme de sol sec pour *F. oxysporum* et *F. commune* tandis qu'elle a été fixée à 1000 spores par gramme de sol sec pour *F. solani*. Contrairement à la région ITS, utilisée pour le développement des marqueurs *Pythium* et *Rhizoctonia* et présente en plusieurs dizaines de copies par génome, la région EF1 codant pour le facteur d'élongation n'est présente qu'en une seule copie par génome, ce qui réduit la sensibilité des marqueurs développés sur ce gène. Le facteur d'élongation demeure toutefois le principal code à barre utilisé pour

différencier les espèces de *Fusarium*. Récemment, la région IGS (Intergenic spacer) a également été envisagée pour le développement de marqueurs spécifiques à *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (Okubara et al. 2013). Toutefois, des problèmes de spécificité sont rapportés pour ce marqueur, qui amplifie cinq autres *formae speciales* de *F. oxysporum*, limitant son utilisation, ainsi que le pouvoir discriminant d'IGS pour identifier les espèces pathogènes et non pathogènes de *Fusarium* (Okubar et al. 2013). Les approches de séquençage de troisième génération pourraient devenir une alternative particulièrement intéressante pour les espèces du genre *Fusarium*.



**Figure 2:** Exemples de courbes standards réalisées pour A) *Pythium tracheiphilum* et B) *Rhizoctonia solani* AG1-1B, à l'aide de sols inoculés artificiellement.

La dernière étape de validation a été réalisée à l'aide d'échantillons environnementaux recueillis par l'équipe de réalisation et par les conseillers collaborateurs. Dans un premier temps, des sols prélevés dans différents champs et différents contextes ont été analysés à l'aide de la méthode développée dans le cadre de ce projet. Les résultats sont cohérents avec les hypothèses de travail. Par exemple, aucune détection de *P. tracheiphilum*, une espèce hautement spécifique à la laitue, n'a été rapportée pour des champs n'ayant jamais été cultivés en laitue, tandis que pour *P. ultimum*, une espèce polyphage, les concentrations d'inoculum variaient de 0 à  $10^5$  propagules par gramme de sol sec. Cette validation a également été réalisée pour les autres agents pathogènes à l'étude.

La validation des marqueurs développés a également été réalisée à l'aide de plantes affectées recueillies au champ, notamment par les conseillers de PRISME. Les échantillons ont été séparés en deux et les agents pathogènes responsables ont été isolés sur milieux de culture, en plus d'être analysés à l'aide des marqueurs développés dans le cadre du projet. Cette étape de validation a été réalisée pour les trois groupes de marqueurs développés. De façon générale, les espèces obtenues par qPCR et par isolement étaient les mêmes. Dans tous les cas, le marqueur *R. solani* était positif pour les échantillons positifs pour AG-3 ou AG-1-1B. Pour les *Fusarium* toutefois, plusieurs phénotypes ont été observés sur milieux de culture sans que l'identité de l'espèce ne soit confirmée par séquençage. *Fusarium oxysporum* et *F. commune* étaient présents en même temps que *F. solani*.

**Coûts d'analyses :** Le coût brut pour un échantillon de sol sont de 40.80\$ avec courbe standard et 38.35\$ sans courbe standard, tandis que les coûts pour un échantillon de tissus sont de 38,91\$ avec courbe standard et de 36.46\$ sans courbe standard. Ces coûts peuvent varier selon les équipements et les fournisseurs et ne comptent pas le temps pour l'analyse des résultats. Cet estimé ne tient pas non plus compte de l'amortissement sur les instruments. Il s'agit uniquement d'estimer le coût des manipulations et des consommables de laboratoire.

## **DIFFUSION DES RÉSULTATS**

En plus des deux présentations faites au comité de suivi, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont été diffusés de nombreuses façons. Dans un premier temps, ils ont été présentés au personnel du laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection (LEDP). La diffusion au LEDP s'est d'abord faite à travers deux ateliers de transfert au cours desquels une présentation expliquant les étapes de développement a été donnée. De plus, une journée de formation a été donnée en décembre 2018 dans le laboratoire de Phytodata. Les résultats ont également été diffusés lors de conférences données aux Journées horticoles de St-Rémi (en 2016 et 2018) ainsi qu'aux journées d'information annuelles organisées par PRISME (hiver 2017). Le projet a également été présenté lors de conférences plus générales, notamment au comité recherche de l'APMQ (2016), à Adelaïde en Australie en 2016 et à Saint-Pol de Léon en Bretagne en 2018. Une affiche scientifique a été présentée au congrès annuel de la SPPQ en 2016 et les résultats ont fait l'objet d'une publication en mars 2019 dans la revue scientifique Plant Disease. Deux autres articles scientifiques seront soumis pour publications en 2019. Un article de vulgarisation sera publié dans le numéro du printemps 2019 de la revue Primeurs Maraichères. La fiche de transfert a été déposée sur le site Agri-Réseau ainsi que sur le site de PRISME.

## **APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE**

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 présent dans les sols. L'efficacité des stratégies de LI et des approches d'atténuation pour réduire l'impact des maladies d'origine tellurique 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'agents pathogènes. De plus, le succès des agents de biocontrôle utilisés dans le cadre d'une stratégie de LI peut être influencé, notamment, par l'abondance des espèces pathogènes. 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 contre les maladies de sol.

## **POINT DE CONTACT POUR INFORMATION**

### **Hervé Van Der Heyden**

Phytopathologie et épidémiologie quantitative

Phytodata

291 rue de la Coopérative

Sherrington

514-617-4986

[hvanderheyden@phytodata.ca](mailto:hvanderheyden@phytodata.ca)

## **REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS**

Ce projet a été réalisé dans le cadre du volet 3.2 du programme Prime-Vert avec une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation par l'entremise du fond vert. L'équipe de réalisation souhaite également remercier les fermes membres du consortium PRISME, les collaborateurs impliqués à tous les niveaux et toute l'équipe de PRISME et de Phytodata pour leur précieuse collaboration.