

DÉVELOPPEMENT D'UN TEST PÉTALE POUR LA DÉTECTION DE *SCLÉROTINIA SCLEROTIURUM* EN PRODUCTION DE HARICOTS DE TRANSFORMATION

Hervé Van der Heyden et Myriam Gagnon

Projet : IA217776

Durée : 04/2017 – 04/2019

FAITS SAILLANTS

Sclerotinia sclerotiorum est un champignon pathogène d'importance économique responsable de la pourriture blanche dans plusieurs productions maraîchères incluant le haricot. La table filière des légumes de transformation a ciblé, dans son plan stratégique, la recherche de solutions aux maladies dont la pourriture blanche. *S. sclerotiorum* survit dans les sols sous forme de sclérotés plusieurs années, parfois plus de 10 ans. Lorsque les conditions sont favorables, elles produisent des ascospores qui infecteront les inflorescences. La période de floraison est donc critique pour un contrôle adéquat de cette maladie. En moyenne, 2 à 3 applications de fongicides sont effectuées par période de semis sans tenir compte de la présence de l'agent infectieux. Malgré ces applications, des pertes de rendements attribuées à cette maladie sont rapportées et ces pertes, en plus d'occasionner des baisses de revenus aux producteurs, entraînent des problèmes d'approvisionnement pour la transformation. Il existe actuellement une trousse permettant de vérifier la présence de *S. sclerotiorum* sur les pétales des fleurs. Cette trousse pétale repose sur l'utilisation d'un milieu de culture et son délai de réponse peut dépasser 5 jours, ce qui réduit considérablement son utilité au champ. D'autre part, des marqueurs moléculaires destinés à la détection de *S. sclerotiorum* existent et pourraient représenter une alternative rapide et précise à la trousse pétales sur pétri. L'objectif principal de ce projet vise donc à adapter et valider un test de détection moléculaire permettant de caractériser et de quantifier l'inoculum de *Sclerotinia sclerotiorum* sur les pétales de haricots. Plus précisément ce projet consiste à déterminer la relation entre l'ADN de *S. sclerotiorum* estimé par PCR et l'incidence finale de la pourriture blanche. Le milieu semi-sélectif utilisé dans le cadre de ce projet s'est avéré spécifique à *S. sclerotiorum* dans la majorité des cas. Ce milieu réagit en passant du mauve au jaune lorsqu'il y a production d'acide oxalique par *S. sclerotiorum*. Toutefois, un certain nombre d'échantillons n'ayant pas viré au jaune sur le milieu semi-sélectif se sont avérés contaminés par *S. sclerotiorum* et quelques échantillons ayant fait virer le milieu au jaune se sont avérés contaminés par une autre espèce. Ainsi, il était nécessaire d'attendre la formation de sclérotés par *S. sclerotiorum* afin de confirmer l'identité du pathogène présent sur les pétales déposés à la surface des milieux de cultures. En condition de champ, la détection par PCR était plus sensible que la détection sur pétri. De façon générale, nous avons détecté l'agent pathogène 15 jours plus tôt à l'aide de la méthode moléculaire, par rapport à la méthode conventionnelle sur pétri.

OBJECTIF ET MÉTHODOLOGIE

L'objectif principal de ce projet visait l'adaptation et la validation d'un test de détection moléculaire permettant de caractériser et de quantifier l'inoculum de *Sclerotinia sclerotiorum* sur les pétales de haricots. Plus précisément ce projet consiste à déterminer la relation entre l'ADN de *S. sclerotiorum* estimé par PCR et l'incidence finale de la pourriture blanche. En 2017 et 2018, 10 champs ont été sélectionnés et échantillonnés à chaque semaine du 13 juillet au 15 août. À chaque échantillonnage, cinq parcelles ont été échantillonnées à l'intérieur desquelles 10 échantillons de pétales ont été prélevés pour former un échantillon composite. Un total de 295 échantillons de pétales ont été analysés. La présence de *S. sclerotiorum* a été testée pour chacun des échantillons de pétales qui ont été testés de trois façons : sur des milieux (semi)-sélectifs, par qPCR et par LAMP-PCR. Les résultats obtenus avec les trois méthodes ont ensuite été comparés.

RETOMBÉES SIGNIFICATIVES POUR L'INDUSTRIE

L'approche proposée dans le cadre de ce projet visait à remplacer le test de détection sur pétalis (test pétale) par un test moléculaire portable (LAMP-PCR). Pour valider l'approche, des pétales de haricots de haricot ont été prélevés hebdomadairement dans 10 champs par saison. Les pétales ont été mis en culture sur un milieu sélectif qui change de couleur lorsque *Sclerotinia sclerotiorum* pousse sur le milieu ; ils ont ensuite été testés à l'aide du test portable (LAMP-PCR) et à l'aide du test de référence de laboratoire (qPCR) (Figure 1).

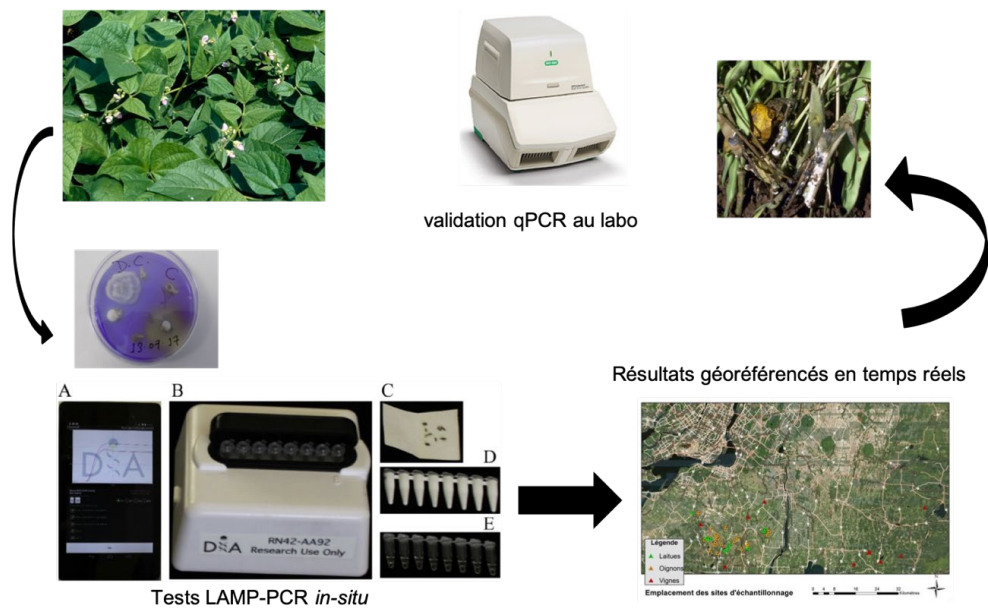


Figure 1 : Résumé schématique de la procédure évaluée.

Le milieu semi-sélectif utilisé dans le cadre de ce projet s'est avéré spécifique à *S. sclerotiorum* dans la majorité des cas (Figure 2). Ce milieu réagit en passant du mauve au jaune lorsqu'il y a production d'acide oxalique par *S. sclerotiorum*. Toutefois, un certain nombre d'échantillons n'ayant pas viré au jaune sur le milieu semi-sélectif se sont avérés contaminés par *S. sclerotiorum* et quelques échantillons ayant fait virer le milieu au jaune se sont avérés contaminés par une autre espèce fongique. Ainsi, il était nécessaire d'attendre la formation de

sclérotés par *S. sclerotiorum* afin de confirmer l'identité du pathogène présent sur les pétales déposés à la surface des milieux de cultures.

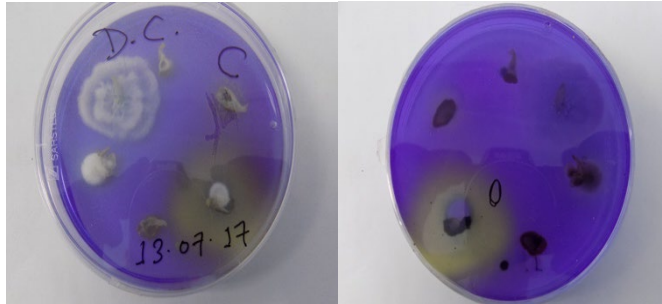


Figure 2 : Exemple de milieu d'échantillons de pétales utilisés sur le milieu semi-sélectif. Les sélections ayant viré au jaune indiquent la présence d'acide oxalique, sécrété par *S. sclerotiorum*.

En condition de champ, la détection par LAMP-PCR était plus sensible que la détection sur pétri (Figure 3). De façon générale, le test LAMP-PCR détectait l'ADN de *S. sclerotiorum* 15 jours plus tôt que la méthode conventionnelle réalisée à l'aide du milieu sélectif (Figure 3).

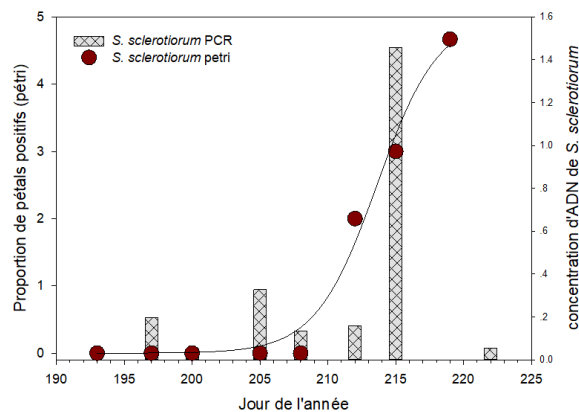


Figure 3 : Comparaison des tests pétales sur pétris et en LAMP-PCR.

Les saisons 2017 et 2018 n'ont pas été très favorables au développement de la maladie au champ. Quelques symptômes ont été rapportés en fin de saison lors des activités de dépistage en 2017, aucun symptôme n'a été rapporté en 2018 et aucune apothécie n'a été observée au sol pour 2017 ou 2018. Malgré cela, des souches de *S. sclerotiorum* ont été isolées des pétales prélevés au champ et de l'ADN de *S. sclerotiorum* a été détecté à partir des mêmes échantillons de pétales. La fréquence de détection était plus importante en 2017 qu'en 2018 de même que la sévérité de la maladie au champ.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET SUIVI À DONNER

Ce projet visait tout d'abord à bonifier nos connaissances pratiques afin d'obtenir un meilleur contrôle de la pourriture blanche du haricot occasionné par *Sclerotinia sclerotiorum*.

Concrètement, il s'agit de se doter d'une méthode précise permettant le positionnement des applications de fongicides en fonction de la présence et de l'importance de l'inoculum de *S. sclerotiorum*. Au terme du projet, nous avons développé une méthode de détection sensible et spécifique permettant d'identifier et de quantifier la présence et l'abondance de l'inoculum de *S. sclerotiorum* dans les pétales de haricots. Cette approche permettra de faire un prédiagnostic au champ à l'aide d'un LAMP-PCR réalisé avec un thermocycleur portable et la possibilité de faire par qPCR un test de confirmation au laboratoire. Bien que la méthode soit efficace pour détecter l'ADN du pathogène dans les pétales de haricots, la faible pression de maladie observée en 2017-2018 ne permet pas d'établir la relation entre le développement des symptômes au champ et la quantité d'ADN retrouvés sur les pétales. Plus d'essais seront nécessaires afin d'établir plus précisément cette corrélation.

POINT DE CONTACT

Hervé Van Der Heyden

Phytopathologie et épidémiologie quantitative

Phytodata

291 rue de la Coopérative

Sherrington

514-617-4986

hvanderheyden@phytodata.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme Innov'Action agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir 2 conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, et Agriculture et Agroalimentaire Canada.