

FICHE SYNTHÈSE

Volet 2 – Approche régionale et interrégionale

DIAGNOSTIC SIMULTANÉ DES GÈNES D'AVIRULENCE DE *PHYTOPHTHORA SOJAE* POUR UNE GESTION OPTIMALE DE LA LUTTE GÉNÉTIQUE CHEZ LE SOYA

ORGANISME Université Laval

COLLABORATEURS

CFCRA, LEDP,
GAPP

AUTEURS Caroline Labbé, Richard Bélanger

INTRODUCTION

La lutte génétique contre les maladies des végétaux est l'une des méthodes les plus efficaces et sécuritaires qui soit pour l'environnement. Dans le cas du soya, une des grandes cultures les plus importantes mondialement, il existe des variétés exprimant des gènes de résistance (*Rps*) contre la pourriture causée par l'agent pathogène *Phytophthora sojae*, un des fléaux liés à cette production. Cependant, comme cette résistance obéit au schéma gène-pour-gène, i.e. un gène de résistance (plante) pour un gène d'avirulence (*P. sojae*), il est important de pouvoir établir le pathotype de la souche présente dans un champ particulier pour être en mesure de choisir le bon cultivar de soya. L'objectif du présent projet était de développer un outil moléculaire permettant d'obtenir et de caractériser le pathotype de l'agent pathogène *P. sojae* à partir d'échantillons de sols et/ou plantes récoltés dans des champs de soya au Québec et ailleurs. Ce faisant, suivant l'identification du pathotype de l'agent pathogène dans un champ donné, cela devait permettre de choisir de façon éclairée la variété de soya exprimant le bon gène de résistance pour contrer l'agent pathogène présent.

OBJECTIFS

Les différents objectifs de ce projet étaient 1) L'optimisation d'un test moléculaire impliquant la méthodologie PCR multiplexe permettant, en une seule étape, d'identifier le pathotype d'un isolat de *Phytophthora sojae* à partir de son ADN; 2) La validation et l'étude des marqueurs moléculaires utilisés au premier objectif à l'aide de bio-essais développés précédemment par notre équipe, qui nous permettent de déterminer le pathotype d'isolats non connus de l'agent pathogène; 3) La mise au point d'une méthode d'extraction d'ADN directement à partir d'échantillons de sols ou encore, à partir de plantes présentant la pourriture phytophthoréenne, afin d'accélérer le processus de pathotypage par génotypage provenant d'échantillons de champs et 4) Le transfert du test moléculaire (PCR multiplexe) conventionnel en test q-PCR qui devrait permettre de quantifier l'inoculum à partir d'un échantillon de sol.

MÉTHODOLOGIE

Les marqueurs moléculaires retenus ont été déterminés par séquençage Illumina et analyse bio-informatique. Les différents marqueurs génétiques pour les différents gènes *Avr* connus ont servi à l'élaboration des amorces utilisées pour les différents protocoles des techniques PCR utilisées soit PCR multiplexe, PCR nichée (emboîtée) et q-PCR. Un bio-essai hydroponique permettant de phénotyper le pathotype d'isolats de *P. sojae* a été utilisé pour valider les résultats obtenus avec les analyses moléculaires. Différentes méthodologies ont été développées et utilisées afin d'obtenir l'ADN à partir d'échantillons de plantes infectées (ex : speed-baiting) ou de sols.

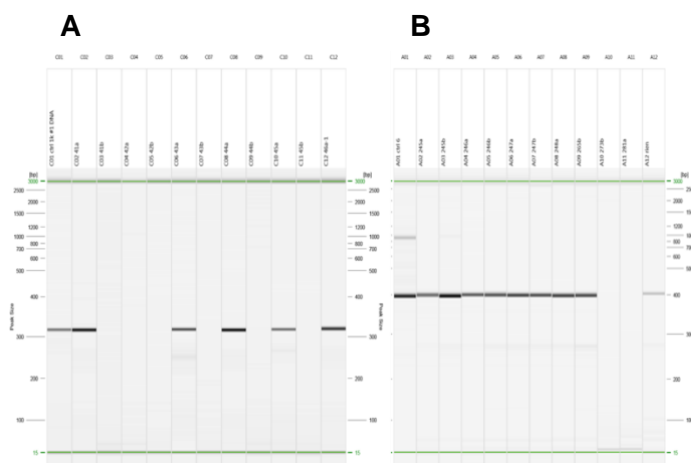
RÉSULTATS

Les travaux réalisés grâce à ce projet ont permis tout d'abord d'optimiser un test PCR multiplexe servant à trouver le pathotype d'isolats de *Phytophthora sojae* obtenus de différents champs. Les résultats des tests moléculaires obtenus ont été validés à l'aide de bio-essais en hydroponique, test développé précédemment par notre équipe de recherche. Pour tous les gènes *Avr* à l'étude, nous avons pu obtenir un score de validation supérieur à 90% lorsque l'on comparait les résultats de génotypage et de phénotypage (voir tableau). La disparité observée (9% et moins) s'expliquait grandement par le type de résultats obtenus lors des phénotypages en serre qui étaient soumis aux contraintes environnementales, à la virulence variable des isolats de *P. sojae* testés ou encore à un manque de discrimination des gènes *Rps* utilisés. Cependant, grâce à des séquençages génétiques supplémentaires, il a été permis de trouver des marqueurs génétiques qui correspondaient mieux aux résultats en phénotypage en éliminant les données aberrantes (*outliers*) pour le gène d'avirulence *Avr6*.

Le test génétique en PCR multiplexe n'a pas pu être utilisé avec des extraits d'ADN provenant directement des sols ou d'explants de soja contaminés et ce, malgré les efforts déployés en ce sens. En effet, la présence d'ADN étranger du sol, ou de la plante, interférerait avec la réaction multiplexe ne permettant pas d'obtenir un résultat clair. Un test en PCR emboîtée a été développé et des amplifications ont pu être obtenues pour chacun des gènes *Avr* à l'étude (voir figure; ex. A. *Avr1k* et B. *Avr6*) à partir d'ADN d'appâts ou de sols. Cette technique, bien que plus exigeante au niveau des étapes PCR, permettait d'éliminer toute la partie de purification des isolats de *P. sojae* à partir des sols i.e. entre un et trois mois de travail. Cette technique sera d'ailleurs celle optimisée en vue d'un test moléculaire à partir des sols. Enfin, un test q-PCR a été développé en vue d'identifier par HRM (analyse de la courbe de fusion des amplicons obtenus), l'allèle (*Avr* ou *avr*) du gène *Avr* à l'étude. Cette méthode, une fois optimisée, permettrait de s'affranchir de l'analyse par gel ou par électrophorèse capillaire à la suite de la réaction PCR.

TABLEAUX, GRAPHIQUES OU IMAGES

Gène pour gène	Confirmation	Outliers	Confirmation (%)
<i>Avr1a/Rps1a</i>	118	12	91%
<i>Avr1b/Rps1b</i>	120	10	92%
<i>Avr1c/Rps1c</i>	119	11	92%
<i>Avr1d/Rps1d</i>	119	11	92%
<i>Avr1k/Rps1k</i>	119	11	92%
<i>Avr3a/Rps3a</i>	130	0	100%
<i>Avr6/Rps6</i>	125	5	96%



IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Par l'adaptation spécifique du déploiement de gènes de résistance suite à l'identification des gènes d'avirulence, ce projet fournira une multitude de retombées avantageuses pour l'agriculture québécoise. Dans un premier temps, il permettra une réduction, voire une élimination des fongicides présentement utilisés en cas d'infection; deuxièmement, il permettra une utilisation optimale des gènes de résistance du soja contre *P. sojae*, ce qui diminuera significativement la pression de sélection et assurera la pérennité des sources de résistance; troisièmement, il fera sauver des millions de dollars aux producteurs et semenciers du Québec qui doivent éponger les pertes annuelles attribuables aux infections; quatrièmement, il permettra de détecter l'apparition de nouveaux pathotypes de *P. sojae* et d'ajuster les recommandations d'utilisation de gènes de résistance en conséquence. L'impact commercial de ce projet sera extrêmement significatif lorsqu'on considère que le marché du soja aux États-Unis et en Amérique du Sud s'élève à plus de 100 milliards \$. Pour cette raison, le bureau de liaison Université-Milieu (BLUM) de l'UL a exigé que cette technologie soit rapidement protégée par brevet. Comme ce projet l'indique, il est clair que l'objectif premier veut que les producteurs québécois et canadiens aient un accès privilégié et sans restriction à cette technologie et soient les premiers à en bénéficier. Plusieurs contacts et même contrats ont été établis avec des producteurs et semenciers québécois pour échantillonner leurs champs et leur fournir les résultats. Enfin, une entreprise en démarrage, fondée par l'un des étudiants-chercheurs de notre équipe (Ayos Technologies), a pu grâce à la technologie développée lors de ce travail, produire des rapports de pathotypage pour 400 échantillons de sols provenant du Canada et des États-Unis à la fin de l'année 2022.

DÉBUT ET FIN DU PROJET

POUR INFORMATION