

FICHE SYNTHÈSE

Sous-volet 2.2 – Approche interrégionale

TITRE

INNOVATIONS DANS LES MÉTHODOLOGIES DE DÉTECTION DES MALADIES DE LA VIGNE: DÉTECTION SIMULTANÉE, IDENTIFICATION DE LA RÉSISTANCE AUX FONGICIDES ET OUTIL D'AIDE AU PRÉ-DIAGNOSTIC AU CHAMP.

ORGANISME Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel
AUTEURS Caroline Provost, chercheur CRAM
Pierre-Olivier Hébert, professionnel AAC
Audrey-Anne Durand, post-doctorante, INRS-AFSB
Odile Carisse, chercheur AAC
Philippe Constant, professeur INRS- AFSB

COLLABORATEURS
Hervé Van Der Heyden, chercheur AAC

INTRODUCTION

Les maladies susceptibles de causer des dommages à la vigne sont causées par un large éventail d'organismes: phytoplasmes, virus, bactéries, levures, pseudochampignons et champignons. Ces organismes affectent les différents organes de la vigne soit les racines, bois, sarments, feuilles et baies. Les symptômes visuels varient selon les conditions météorologiques, l'état de santé de la vigne (stress, carence), l'âge des organes affectés et la population de l'agent pathogène (taille et diversité génétique). Le diagnostic de ces organismes et des maladies qu'ils causent est donc complexe d'autant que certains de ces organismes peuvent être dans un stade 'latent' sans causer de symptômes apparents ou être plusieurs à affecter simultanément la vigne. De plus, certains des champignons pathogènes se sont adaptés aux fongicides, adaptation généralement exprimée par des mutations dans leur génome. Les individus résistants présentent des phénotypes semblables ce qui rend le diagnostic visuel impossible. Par contre, il est possible de détecter les individus résistants à l'aide de tests moléculaires. C'est dans ce contexte que le projet a été réalisé et visait à développer des tests moléculaires qui permettent de détecter et d'identifier ces organismes ainsi que les mutations liées à la résistance aux fongicides. Les champignons ciblés sont les nouvelles espèces de *Botrytis cinerea* (pourriture de la grappe/moisissure grise), *Elsinoë ampelina* (anthracnose), *Erysiphe necator* (blanc), *Guignardia bidwellii* (pourriture noire), *Phomopsis viticola* (excoriose), les nouvelles sous-espèces de *Plasmopara viticola* *riparia*, *P.v. aestivalis* et *P.v. vinifera* (mildiou), *Colletotrichum* spp. (pourriture de maturité des baies), *Greeneria uvicola* (pourriture amère), *Pilidiella diploidiella* (rot blanc) et *Pseudopeziza tracheiphila* (rougeot parasitaire).

OBJECTIFS

L'objectif principal du projet était de développer et d'adapter des tests de diagnostic moléculaire pour les champignons pathogènes de la vigne et la résistance aux fongicides qui soient rapides, fiables et peu coûteux. Les objectifs secondaires étaient:

1. Répertoire et identifier les amorces (séquences) nécessaires à l'identification des champignons et des résistances aux fongicides;
2. Mettre au point des méthodes d'extraction d'ADN à partir de différents types d'échantillons (bois, feuilles, baies);
3. Mettre au point des tests de détection simultanée de plusieurs champignons pathogènes de la vigne et des mutations liées à la résistance aux fongicides en utilisant les méthodes de séquençage par nanopores;
4. Développer des outils d'aide au diagnostic au champ (séquençage par nanopores).

MÉTHODOLOGIE

Les différentes étapes réalisées dans le cadre du projet sont:

Étape 1. Méthode d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de bois aouté, bois vert, feuilles et baies.

Une revue de littérature sur les différentes méthodes d'extraction d'ADN de champignon à partir de différents types d'échantillons incluant la liste des inhibiteurs potentiels a été complétée. Une méthode a été mise au point pour l'inoculation des tiges, baies et feuilles avec *B. cinerea*, *P. viticola* et *E. ampelina* et des méthodes d'extraction ont été évaluées avec 2 trousses commerciales.

Étape 2. Développement de nouveaux tests de diagnostic (qPCR).

Des protocoles qPCR ont été développés pour tous les champignons ciblés, autant en simplex (15) qu'en multiplex (4) (Tab. I).

Étape 3. Validation des tests.

En plus de la validation faite à partir d'inoculations artificielles, une validation a été faite avec des échantillons terrain. Le diagnostic sur ces échantillons a été fait selon les méthodes non moléculaires et comparé aux tests développés dans ce projet.

Étape 4. Développement de nouveaux tests de détection de champignon pathogène et mutations liées à la résistance aux fongicides selon la méthode de séquençage par Nanopore.

Une preuve de concept de diagnostique par séquençage Nanopore des champignons et oomycètes pathogènes de la vigne a été complétée. Des protocoles ont été développés pour les différents champignons de la vigne.

Étape 5 Adapter les tests de diagnostics moléculaires pour le prédiagnostic au champ ou dans des laboratoires de proximités.

Puisque les tests de diagnostic basés sur les méthodes de LAMP-PCR sont portables, une validation de ces méthodes pour le prédiagnostic directement au champ a été faite par l'équipe.

RÉSULTATS

Les deux premières années du projet ont permis d'évaluer la performance de deux kits d'extraction d'ADN commerciaux fréquemment utilisés par le laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection, et de développer des méthodes qPCR pour l'identification de la plupart des organismes ciblés (Tab. I). Pour la détection des mutations responsables de la résistance aux fongicides chez le champignon pathogène *B. cinerea* la mise au point d'un protocole de séquençage par nanopore a été complété et les validations ont été réalisées. Dans le cadre de ce projet, 15 protocoles de détection simplex pour les divers champignons et 4 protocoles multiplex ont été développés et validés. Un protocole pour détecter la présence de plusieurs champignons pathogènes dans la vigne ainsi qu'un protocole pour détecter la présence de résistance de *Botrytis cinerea* à diverses matières actives de fongicides ont aussi été développés. Tous les protocoles ont été transférés au LEDP.

Tableau I : Synthèse des protocoles développés par qPCR.

Organismes ciblés	Région ciblée	Système	Amorces et sondes
<i>Elsinoë ampelina</i>	ITS	Simplex	Spécifique à <i>E. ampelina</i> (Sonde ultra spécifique, amorces « collent » sur quelques espèces d' <i>Elsinoë</i>)
<i>Erysiphe necator</i>	ITS	Simplex	Spécifiques à <i>E. necator</i>
<i>Guignardia bidwellii</i>	ITS	Simplex	Amorces spécifiques à <i>G. bidwellii</i> , sonde moins spécifique
<i>Phomopsis viticola</i>	ITS	Simplex	Amorces ITS universelles ainsi qu'une sonde TaqMan spécifique pour <i>P. viticola</i>
<i>Greeneria uvicola</i>	ITS	Simplex (2X)	Spécificité des amorces à <i>G. uvicola</i> confirmée par outils de bioinformatiques Sonde spécifique mise au point pour créer un protocole TaqMan
<i>Pilidiella diplodiella</i>	H3	Simplex	Amorces et sonde spécifiques développées pour le gène de références
<i>Pseudopezicula tracheiphila</i>	ITS	Simplex	Aucune amorce n'a pu être développée par manque de séquences ainsi que de souches.
<i>Plasmopara viticola riparia</i> , <i>P.v. aestivalis</i> , et <i>P.v. vinifera</i>	ITS	Simplex (3X) Triplex	Amorces et sondes spécifiques à <i>P. viticola</i> f.sp. <i>riparia</i> , <i>P. viticola</i> f. sp. <i>aestivalis</i> et <i>P. viticola</i> f.sp. <i>vinifera</i> (seulement la sonde pour ce dernier). Simplex et Triplex testés et fonctionnels.
<i>Botrytis pseudocinerea</i> , <i>B. cinerea sensu stricto</i>	IGS	Simplex (2X) Duplex	Simplex et Duplex testés et fonctionnels.
<i>Elsinoë ampelina</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> ,	ITS	Duplex	Duplex testé et fonctionnel.
<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , et <i>C. viniferum</i>	B-tubuline	Simplex (<i>C. acutatum</i>) Simplex (<i>C. gloeosporioides</i>) Simplex (<i>C. viniferum</i>) Triplex	Simplex et triplex testés et fonctionnels. Les systèmes pour <i>C. gloeosporioides</i> et <i>C. viniferum</i> ont seulement été testé sur gBlocks.
<i>Elsinoë ampelina</i> , <i>Phomopsis viticola</i>	ITS	Duplex	Simplex en cours

IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Les premiers résultats ont permis de déterminer les éléments optimaux pour l'extraction de l'ADN à partir de différentes parties de la vigne. Des protocoles qPCR en simplex et multiplex ont été développés, validés puis envoyés au LEDP en continu à partir de l'hiver 2020-2021 pour vérification dans leurs conditions de laboratoire avec leurs équipements spécifiques. Les phases subséquentes ont permis de développer les techniques de séquençage par Nanopores. Les techniques de séquençage par Nanopore ont aujourd'hui atteint une maturité technologique suffisante pour pouvoir être comparée aux techniques déjà existantes. Les avantages de cette méthode sont sa capacité à réaliser la lecture de longs fragments, ce qui réduit fortement le travail post-séquençage d'alignement, et aussi la possibilité de construire des dispositifs expérimentaux à la fois moins coûteux et portatifs. Un protocole utilisant la technologie LAMP a aussi été développé. Le transfert des divers protocoles au LEDP ainsi que la collaboration entre les équipes de recherche du LEDP, AAC, l'INRS-AFSB et du CRAM ont permis le développement et la mise à niveau de protocoles de détection de plusieurs maladies fongiques dans la vigne et permet ainsi au LEDP d'offrir un service d'analyse de détection précis, fiable et rapide aux producteurs et intervenants de la vigne.

DÉBUT ET FIN DU PROJET
Avril 2019 à février 2024

POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet :
Dr. Caroline Provost
Téléphone : 450-434-8150 #6064
Courriel : cprovost@cram-mirabel.com



CRAM
CENTRE DE RECHERCHE
AGROALIMENTAIRE DE MIRABEL