

## FICHE SYNTHÈSE

### Volet 2 – Approche régionale et interrégionale

# DÉVELOPPEMENT D'OUTILS MOLÉCULAIRES QUANTITATIFS ET DE SÉQUENÇAGE DE TROISIÈME GÉNÉRATION POUR LES FORMES SPÉCIALES DE *FUSARIUM OXYSPORUM* EN PRODUCTION MARAÎCHÈRE, LES BACTÉRIES DE L'OIGNON ET LES COMPLEXES DE *PHYTOPHTORA* spp. DANS LES CULTURES DE SAPIN DE NOËL.

<b>ORGANISME</b>	<sup>a</sup> Compagnie de recherche Phytodata, <sup>b</sup> Centre de foresterie des Laurentides <sup>c</sup> Agence d'Inspection des Aliments du Canada	<b>COLLABORATEURS</b>	Antoine Dionne, LEDP Marc-Olivier Duceppe, ACIA
------------------	--	-----------------------	---

<b>AUTEURS</b>	<sup>a</sup> Andréanne Sauvageau <sup>a</sup> Anne Piuze-Paquet <sup>b</sup> Philippe Tanguay <sup>c</sup> Guillaume Bilodeau <sup>a</sup> Guillaume Charron ( <sup>a</sup> ) Hervé van der Heyden (maintenant AAC)
----------------	--

## INTRODUCTION

Les maladies des plantes causées par différents organismes phytopathogènes sont responsables de pertes économiques importantes pour une multitude d'exploitations au Québec et ailleurs. Le développement de stratégies de gestion intégrée des maladies au champ, en serre ou de programmes de la surveillance des ennemis de culture à nos frontières, nécessite des outils de diagnostic rapides et précis, permettant d'obtenir une information quantitative. Depuis une dizaine d'années, les approches moléculaires, principalement les méthodes de PCR quantitatives en temps réel (qPCR), ont permis le développement de méthodes de détection spécifiques et précises, mais relativement peu adaptées lorsqu'il s'agit de diagnostiquer des problèmes phytosanitaires complexes. Aujourd'hui, l'intégration des outils de séquençage de 3e génération pour des fins de diagnostic pourrait devenir une méthode de référence abordable et accessible pour la plupart des laboratoires.

## OBJECTIFS

Ce projet visait à développer une gamme d'outils moléculaires innovants permettant d'améliorer les capacités provinciales en matière de diagnostic et de surveillance phytosanitaire. Trois complexes pathogènes étaient visés dans le cadre de ce projet : le complexe Phytophtoréen dans la culture de sapins de Noël, le complexe de bactérioses de l'oignon, ainsi que les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraîchères.

## MÉTHODOLOGIE

Dans un premier temps des oomycètes provenant d'arbres de Noël, des bactéries provenant d'oignon ainsi que des *Fusarium oxysporum* provenant de 27 cultures différentes incluant la tomate, le concombre, la laitue, l'épinard, l'oignon, le céleri et la fraise, ont été obtenus par isolation à partir de tissus affectés. L'ADN de ces isolats a par la suite été extrait et à été utilisé dans les différentes étapes du projet. Des échantillons de sol et de racine ont également été prélevé près des arbres de Noël. Une seconde étape visait à déterminer la pathogénicité des souches isolées. Pour ce faire, différent test de pathogénicité ont été effectué sur les cultures d'intérêts afin de confirmer le postulat de Koch. Une troisième étape visait le développement d'outils moléculaires et/ou de séquençage de troisième génération pour les trois systèmes étudiés. Pour les arbres de Noël, un test de PCR quantitatif utilisant la technologie Taqman a été développé pour les espèces *Phytophthora abietivora/europeae*. De plus, un outil de séquence de troisième génération (Ion Torrent) a été développé afin d'étudier les communautés microbiennes du sol et des racines provenant d'individus malades et sains. Pour les bactéries de l'oignon, une identification par PCR-RFLP a premièrement été effectué sur les souches bactériennes isolées précédemment. Ensuite, un outil de séquençage de longs fragments utilisant la technologie Nanopore (MinIon) a été développé. Pour le complexe de *Fusarium oxysporum*, différents outils moléculaires de type PCR ou PCR quantitatifs déjà disponible dans la littérature ont été validé et utilisé pour identifier les différentes formes spéciales isolées dans les étapes précédentes. Ces marqueurs génétiques sont conçus pour la grande majorité sur des gènes de pathogénicité tels que les gènes SIX (*secreted in xylem*). Des étapes de séquençages SANGER et d'alignement avec les bases de données publiques ont été essentiels à cette étape.

## RÉSULTATS

Au terme de ce projet, un test de PCR quantitatif (taqman) spécifique à *Phytophthora abietivora* a été conçu et un outil de séquençage (IonTorrent) permettant la détection de plusieurs espèces du complexe a également été développé. De plus, un outil de séquençage (MinIon) a été développé pour le complexe de bactérioses dans l'oignon. Enfin, plusieurs outils moléculaires de types PCR et PCR quantitatif ont été adaptés afin de mieux comprendre et d'identifier les *Fusarium oxysporum formae speciales lycopersici, cepae, spinaciae, lactucae, radicis-cucumerinum, fragaria et apii*, responsables de la fusariose précisément dans la tomate, l'oignon, l'épinard, la laitue, le concombre, la fraise et le céleri. En plus de ces marqueurs moléculaires, les nouvelles connaissances acquises sur la génétique des *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* pourront être utilisées ultérieurement dans le développement d'outils de 3<sup>e</sup> génération, tel que le MinIon par exemple, afin d'obtenir un diagnostic rapide de la forme spéciale en question.

## TABLEAUX, GRAPHIQUES OU IMAGES



Figure 1. Résultat des tests de pathogénicité effectué des bulbes d'échalotes roses. À droite, inoculé avec une solution bactériennes, à gauche, inoculé avec *F. oxysporum* f.sp. *cepae*.

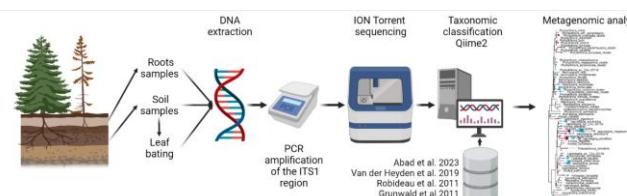


Figure 2. Aperçu du pipeline d'analyse utilisé dans cette étude, pour le développement de la technologie Ion Torrent.

## IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Plusieurs outils moléculaires innovants permettant l'amélioration des capacités provinciales en matière de diagnostic et de surveillance phytosanitaire ont été développés pour trois complexes de maladie connu comme étant des ravageurs importants dans plusieurs cultures d'importance économique au Québec. Ainsi, les forêts, les cultures d'arbres de Noël ainsi que les cultures maraîchères sont constamment menacées par différents ravageurs fongiques et bactérien ainsi que par l'arrivée de nouvelles espèces phytopathogènes envahissantes. En production d'arbres de Noël au Québec, les problèmes de pourriture racinaire sont importants et jusqu'à 25% d'incidence a été rapporté à ce jour. De la même manière, les maladies bactériennes dans la culture d'oignon est une des principales causes de déclassement à la récolte dans la culture d'oignon sec au Québec. Le Québec est la principale province productrice d'oignons secs au Canada et cette production représente une valeur économique importante, allant jusqu'à 113,5 millions de dollars pour le Québec seulement (Statistiques Canada, 2020). Enfin, le complexe de *Fusarium oxysporum* qui rassemble près de 150 formes spéciales différentes, est particulièrement dévastateurs dans le secteur maraîcher, et le transfert des gènes de pathogénicité permet à cet organisme de se spécialiser rapidement. Les outils moléculaires validés dans ce projet permettront d'obtenir un diagnostic plus approprié et plus précis en permettant l'identification des formes spéciales, et non pas seulement de l'espèce *F. oxysporum*.

### DÉBUT ET FIN DU PROJET

2019 – 2024

### POUR INFORMATION

#### Les complexes phytophtoréens dans le sapin de Noël

Guillaume J. Bilodeau, CFIA/ACIA, 3851 Fallowfield Road, Nepean, ON, K2J 4S1, Canada.

Email : guillaume.bilodeau@inspection.gc.ca

Philippe Tanguay, Centre de Foresterie des Laurentides, 055, rue Du P.E.P.S., C.P. 10380, Québec, Québec, G1V 4C7, Canada.

Email : philippe.tanguay@NRCan-RNCan.gc.ca

#### Les complexes bactériens dans l'oignon

Anne Piuze-Paquet, Compagnie de recherche Phytodata inc, 291 rue de la Coopérative, Sherrington, QC, J0L2N0, Canada.

Email : apiuze@phytodata.ca

#### Les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* dans les cultures maraîchères et la fraise

Andréanne Sauvageau, Compagnie de recherche Phytodata inc, 291 rue de la Coopérative, Sherrington, QC, J0L2N0, Canada.

Email : asauvageau@phytodata.ca