



Faire le point sur les maladies du collet du fraisier

Richard Hogue, Ph.D. biologiste
Laboratoire d'analyse biologique

Journée petits fruits Lanaudière 26 janvier 2017



Objectifs de la présentation

Présenter trois projets pour lesquels des collets de fraisiers étaient analysés

- Détection classique et moléculaire de champignons pathogènes
- Différenciation des symptômes et des champignons pathogènes

- *Phytophthora cactorum* (coeur rouge)
- *Colletotrichum* sp. (*C. acutatum*, *C. gleosporioides* et *C. fragariae*)
- Complexe de champignons pathogènes (cas de dépérissement)



Collaborateurs et collaboratrices

IRDA – Laboratoire d'analyse biologique - Nathalie Daigle



MAPAQ- Liette Lambert et Stéphanie Tellier

➤ Agronomes et producteurs et productrices

Projet	Année	Sites	Régions	Agronomes	Producteurs
Dépérissage du fraisier	2014	30	13	15	23
Dépérissage du fraisier	2015	34	10	11	28
PADAAR – P. cactorum	2015	55	9	14	43
FAARAP – Collets fraisier	2016	17	6	8	15
FAARAP – Anthracnose	2016	20	4	7	20



Collaborateurs et collaboratrices

Région	Partenaire	Projet IA113-103 Dépérissement	PADAAR 2015 + FAARAP 2016 P. cactorum	FAARAP 2016 Anthracnose
Bas-Saint-Laurent	Laure Boulet	X	X	
Capitale-nationale	Denis Giroux	X	X	
Capitale-nationale	Marine Marel			X
Capitale-nationale	Stéphanie Tellier	X	X	X
Capitale-nationale	Patrice Thibault			X
Centre-du-Québec	Marie-Josée Cyr	X	X	
Centre-du-Québec	Jacques Painchaud	X	X	
Chaudière-Appalaches	François Demers	X	X	X
Chaudière-Appalaches	Jacinthe Drouin		X	
Chaudière-Appalaches	Christian Lacroix	X		
Estrie	Dominique Choquette	X	X	
Estrie	Geneviève Legault		X	
Estrie	Julie Marcoux	X	X	
Gaspésie	Dominique Martin	X		
Lanaudière	Marie Gaudreau	X	X	X
Laurentides	Larbi Zerouala	X	X	X
Mauricie	Marie-Ève Dion	X		
Mauricie	Guy-Anne Landry	X	X	
Montérégie Est	Catherine Girard			
Montérégie Est	Marianne Lefebvre	X		
Montérégie Ouest	Liette Lambert	X	X	
Montérégie Ouest	Nadia Surdek		X	
Montréal-Laval	Isabelle Dubé		X	X
Outaouais	Louis La Terreur	X		
Saguenay-Lac-Saint-Jean	Marie-Pascale Beaudoin	X		

2015-2016 - Programme d'appui au développement de l'agriculture et de l'alimentation en région (PADAAR)

- Liette Lambert – Montérégie ouest - projet impliquant neuf régions
- ***Dépistage d'un champignon pathogène responsable de dépérissement dans le fraisier – cœur rouge (*Phytophthora cactorum*).***
- ✓ *Des échantillons de collets de fraisier montrent des symptômes de cœur rouge lorsque tranchés au champ, mais la détection classique sur géloses spécifiques de champignons pathogènes parvient rarement à détecter le *P. cactorum* dans des collets symptomatiques .*
- ❖ *Un protocole de détection PCR spécifique du *P. cactorum* est utilisé avec succès.*



Projet et Partenaire financier

2016-2017 - Fonds d'appui aux activités du RAP (FAARAP)

- Liette Lambert – Montérégie ouest- projet impliquant six régions
- ***Identification PCR des champignons pathogènes du collet des fraisiers et développement de fiches techniques d'aide au dépistage des maladies du collet.***
- ✓ *Des collets de fraisiers dépéris localement en champs montrent des symptômes atypiques au cœur rouge (*P. cactorum*).*
- ❖ *Des protocoles de détection PCR spécifique à plusieurs champignons pathogènes seront évalués pour réaliser les investigations.*
 - *Colletotrichum acutatum, C. gleosporioides, C. fragariae*
 - *Macrophomina phaseolina*
 - *Verticillium sp.*



PADAAR - Collet 2015

Pourcentage de PCR positives selon la classe du % de plants affaissés au champ en 2015

Type de détection PCR	5 % et moins	> 5 % et ≤ 10 %	> 10 % et ≤ 20 %	> 20 % et ≤ 40 %	Plus de 40 %	Total
P cactorum	37,2%	18,6%	34,9%	2,3%	7,0%	27,0%
Oomycètes	40,4%	17,0%	31,9%	2,1%	8,5%	29,6%
Colletotrichum sp.	50,0%	41,7%			8,3%	7,5%
P.cactorum + Colletotrichum	50,0%	50,0%				2,5%
Champignon simple	34,5%	25,5%	20,0%	14,5%	5,5%	34,6%
Champignons complexes	26,5%	22,4%	28,6%	10,2%	12,2%	30,8%
Plantations 2015	32,3%	29,0%	24,2%	9,7%	4,8%	39,0%
Plantations 2014	31,3%	17,5%	33,8%	15,0%	2,5%	50,3%
Plantations 2011-2013	52,9%		11,8%		35,3%	10,7%
Nombre de collets testés	54	32	44	18	11	159

- Moins du tiers des collets testés en 2015 sont infectés par *P.hypoththora cactorum*
- Moins de 8 % des collets testés sont infectés par *Colletotrichum acutatum*
- Moins du tiers des collets testés en 2015 n'étaient pas infectés par un champignon

- 50 % des collets testés ont été prélevés dans des fraiseraies plantées depuis 1 an
- 90 % des collets testés ont été prélevés dans des fraisiers dépéris à moins de 40% dans des fraisières implantées en 2014 ou 2015.
- Aucune détection de *Macrophomina phaseolina*.



FAARAP - Collet 2016

Pourcentage de PCR positives selon la classe du % de plants affaissés au champ en 2016

Type de détection PCR	5 % et moins	> 5 % et ≤ 10 %	> 10 % et ≤ 20 %	> 20 % et ≤ 40 %	Plus de 40 %	Total
P. cactorum			100%			4%
Oomycètes			100%			4%
Colletotrichum sp.	41%	18%	18%	24%		18%
P. cactorum + Colletotrichum			100%			3%
Plantations 2016	6%	50%	21%	12%	12%	37%
Plantations 2015		26%	19%		56%	29%
Plantations 2014	25%	31%	19%		25%	34%
Nombre Collets testés	10	34	18	4	27	93

- 4 % des collets testés en 2016 sont infectés par *P.hypoththora cactorum*
- Moins de 20 % des collets testés sont infectés par *Colletotrichum sp. (C. acutatum)*

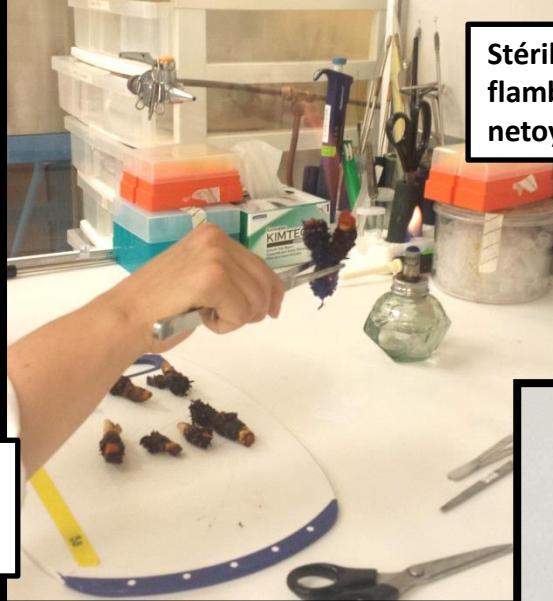
- 29 % des collets testés ont été prélevés dans des fraiseraies plantées depuis 1 an
- 88 % des collets de 2016 ont été prélevés dans des fraisiers dépéris à moins de 40% alors que c'était 44% des collets de fraisières implantées en 2015



Méthode – Échantillons - Diagnostic



Prélever le collet en coupant les racines et les feuilles et rinçer abondamment en retirant tous les débris pour libérer le collet



Stériliser le collet en trempant dans l'alcool, flamber et placer sur une planche nettoyée à l'acool.



Avec des instruments stériles, couper le collet sur le long.



Verticillium :
Prélever dans le sys. vasculaire de petites pièces avec un scalpel stérile et déposer sur la gélose SNA

Phytophthora:
Prélever dans la moelle de petites pièces avec un scalpel stérile et déposer sur la gélose PHY





Méthode – Échantillons - PCR

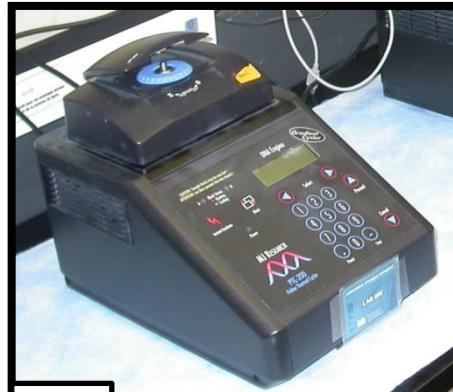


Même préparation des collet puis une fois coupé sur le long, on recoupe une tranche mince que l'on coupe en petits morceaux pour l'extraction de l'ADN.
Deux billes de plomb stérile sont ajoutées au tube pour le broyage au FastPrep

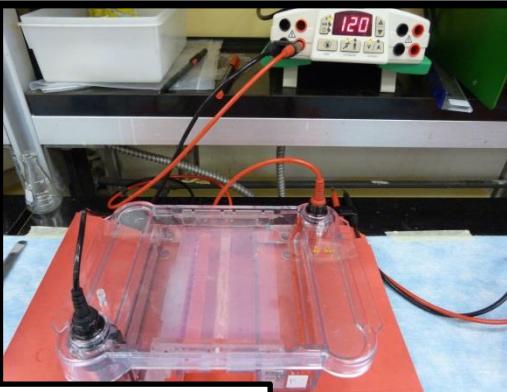




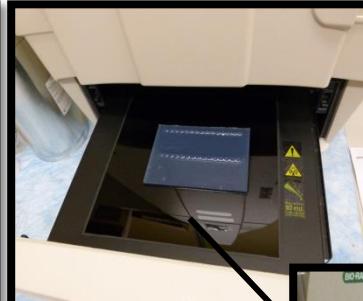
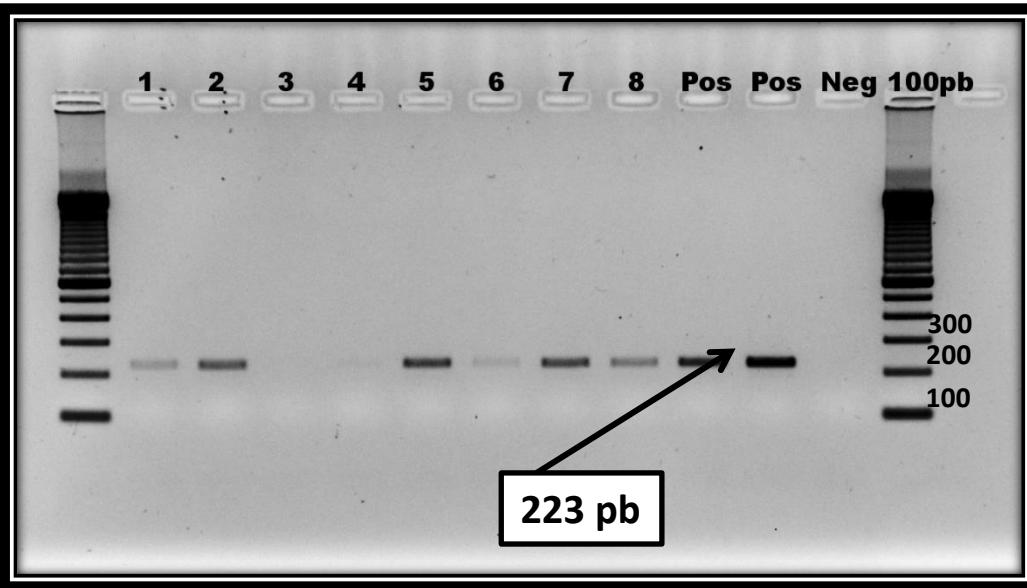
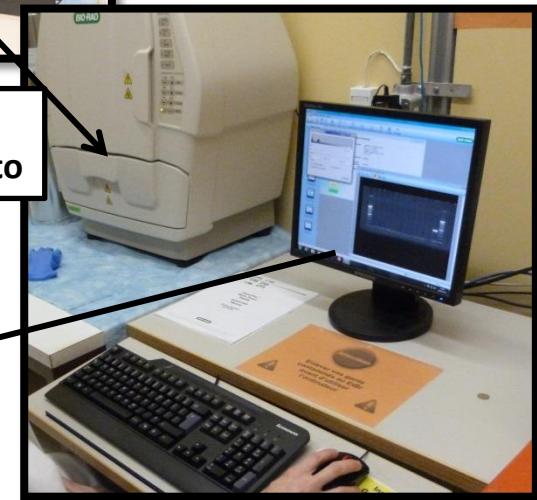
Méthode – Échantillons - PCR



PCR



Électrophorèse

Alpha Imager:
prise de la photo

PCR P.cactorum

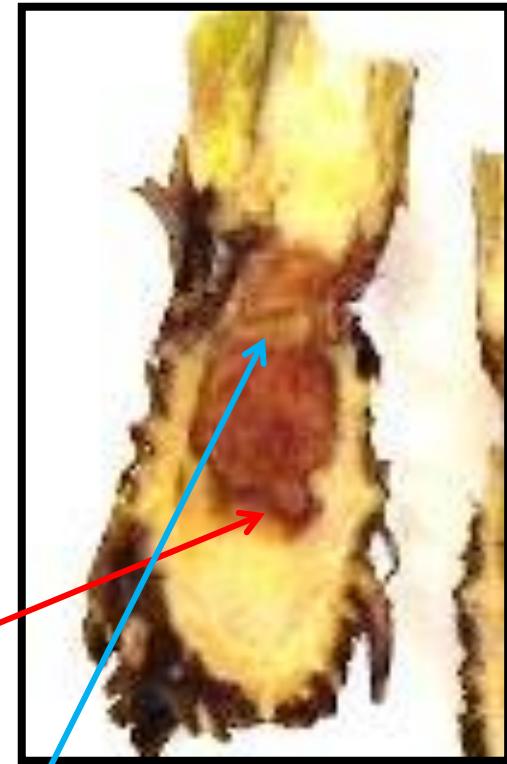
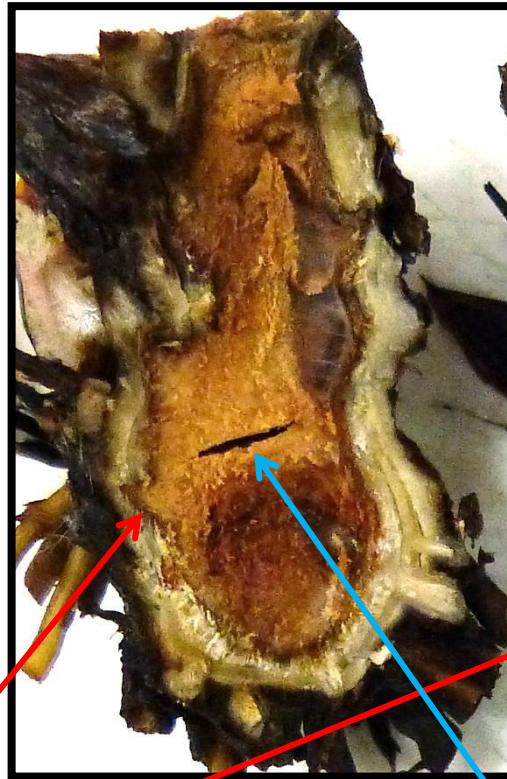
Cible : gène Ypt1

Amorces : Cac-F3/ Cac-R3-2

Longeur : 223 pb



Symptômes types – P. cactorum

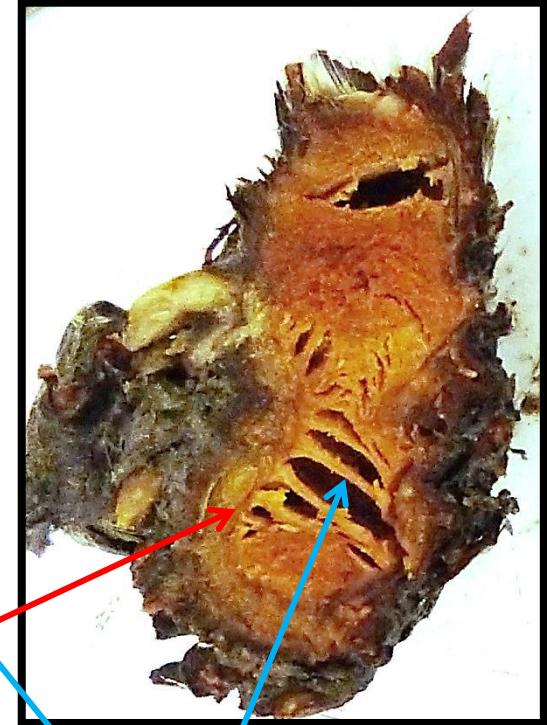
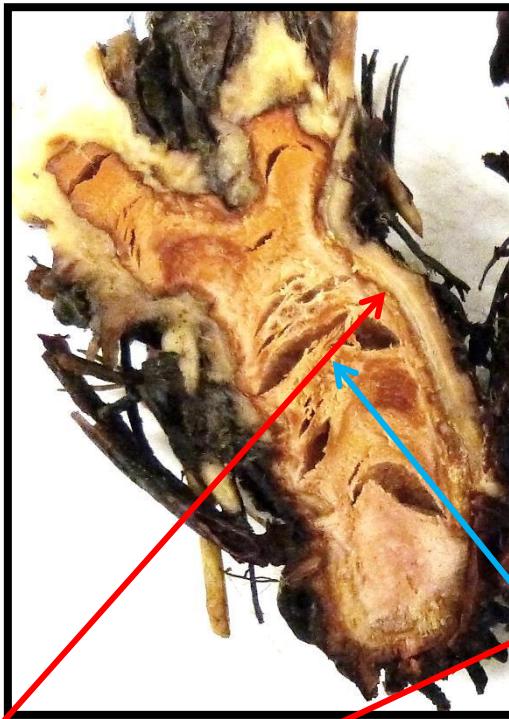
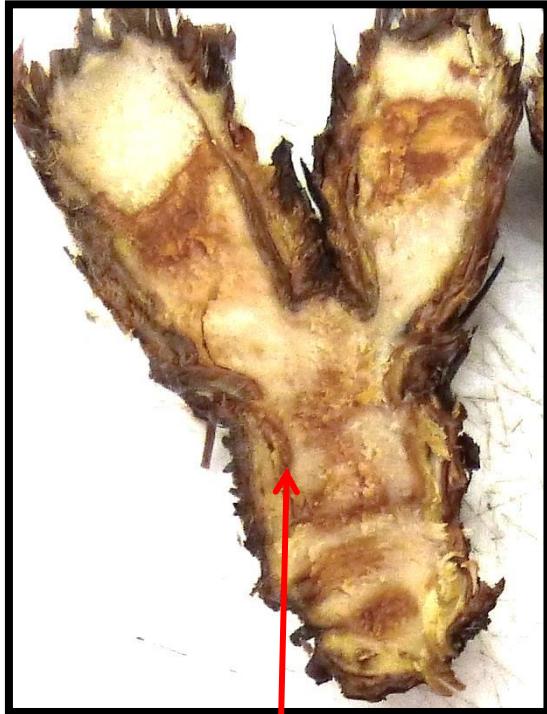


-Ligne plus foncée qui délimite toute la périphérie de la tache du collet

-Apparition de crevasse(s) et nécrose(s) dans le collet à un stade plus avancé



Symptômes types - P. cactorum

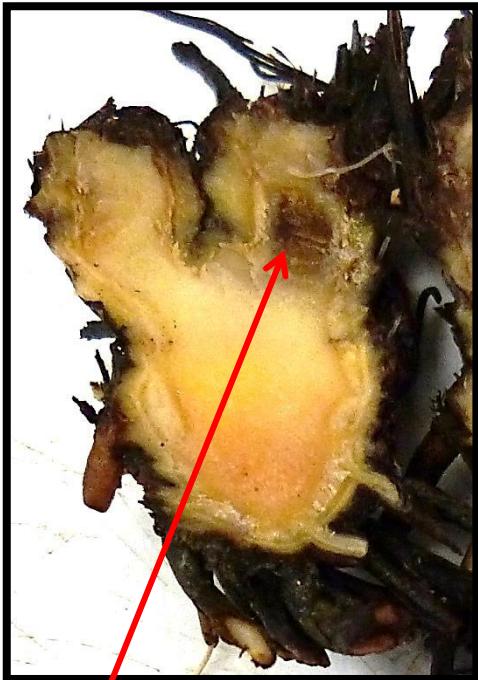


-Ligne plus foncée qui délimite toute la préraphérie de la tache
-Coloration interne inégale de la tache

- Stade plus avancé : les crevasses et la nécrose peuvent être plus importantes et nombreuses



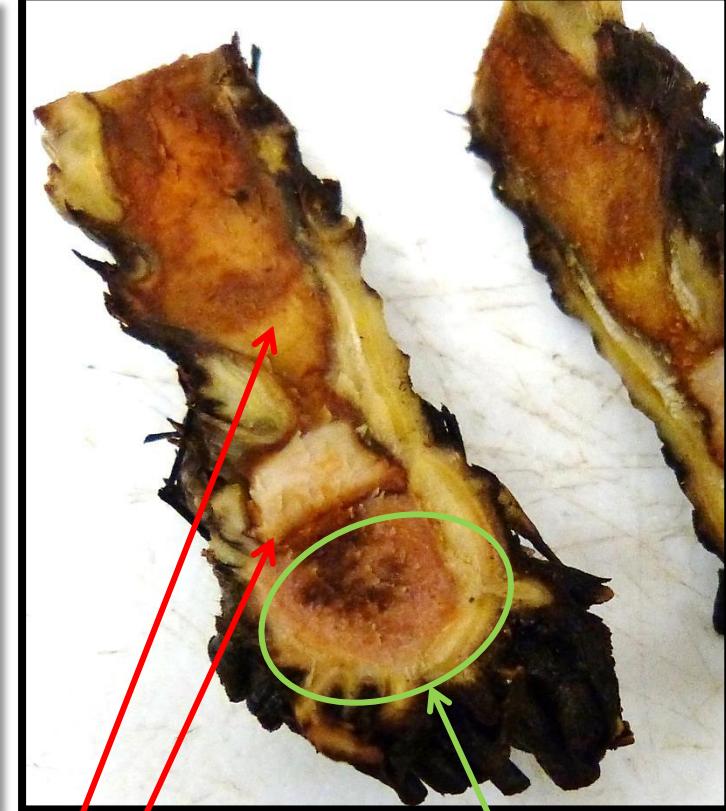
Symptômes types - P. cactorum



- Début P. cactorum



- Point d'entrée (racine)
- Contour très délimité
- Coloration inégale
- Crevasse et nécrose



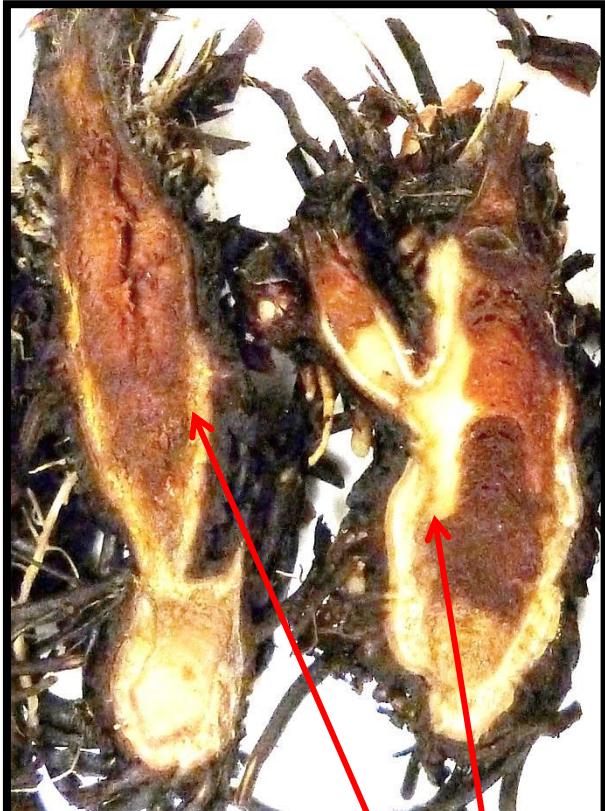
- Contour très délimité
- Coloration inégale

- Présence d'une zone différente
- Pas de contour délimité



Symptômes – Aucun P. cactorum

Collet négatif P. cactorum



Collet positif P. cactorum



Collet négatif P. cactorum



- Pas de délimitation périphérique plus foncée de la tache
- Coloration interne égale ou plus foncée que le contour

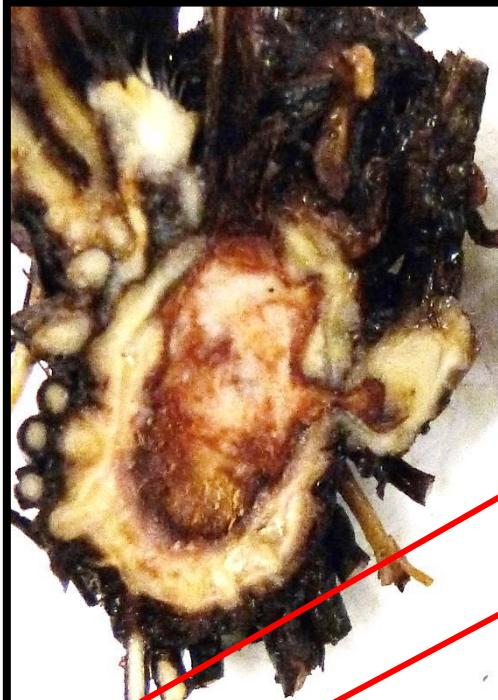


Symptômes – Aucun P. cactorum

Collet négatif P. cactorum



Collet positif P. cactorum



Collet négatif P. cactorum



- Pas de délimitation périphérique plus foncée de la tache
- Coloration interne égale ou plus foncée que le contour



Symptômes – Aucun P. cactorum

Collet négatif P. cactorum



-Coloration interne égale et uniforme

Collet positif P. cactorum



-Pas de délimitation périphérique plus foncée de la tache
-Coloration interne égale ou plus foncée que le contour

Collet négatif P. cactorum





Projet Dépérissement - Rappel

De 2014-2016, le projet IA113103 a pour objectif d'identifier les causes du dépérissement des fraisiers important durant la période 2011 – 2014.

En 2014: 30 fraisières x 2 zones (sains et dépéris) x 3 plants = 180 échantillons

En 2015: 34 fraisières x 2 zones (sains et dépéris) x 3 plants = 204 échantillons

Autant en 2014 qu'en 2015, les taux de détection de champignons pathogènes sont similaires entre les échantillons issus des zones sains versus les zones dépéris.

Le *P. cactorum* est détecté sur 2 collets parmi les 384 échantillons testés.

Les champignons les plus détectés sont par ordre décroissant:

Acremonium > *Fusarium* > *Rhizoctonia* > *Cylindrocarpon* (pourriture des racines)



Coeur rouge vs Dépérissement

Coeur rouge



Coeur rouge



Dépérissement



Conclusion – Coeur rouge

Les symptômes typiques de coeur rouge causé par le Phytophthora cactorum sont:

- Délimitation périphérique de la tache
- Couleur inégale de la tache et contour plus foncé
- Des crevasses et nécroses peuvent se faire en stade avancée de la maladie
- Habituellement, la tache est dans les parties basses/médianes du collet alors que les taches de C. acutatum sont dans la partie supérieur du collet.

Les plants atteint de coeur rouge sont plus localisés, les feuilles et les pétioles desséchés sont souvent affaissés et de couleur brunâtre relativement égale.

Les plants atteint de dépérissement sont moins localisés, les feuilles sont partiellement colorées avec un contour chlorosé qui devient rougeâtre avec la maturité de la feuille et la Combinaison de deux virus ou plus qui infectent les feuilles. Les pétioles ne se déssèchent pas rapidement et sont inégalement affaissées et les stolons sont peu abondant.



Projet et Partenaire financier

2016-2017 - Fonds d'appui aux activités du RAP (FAARAP)

- Stéphanie Tellier – Capitale-Nationale – projet impliquant quatre régions
- ***Identification des espèces de Colletotrichum causant l'antracnose du fraisier suite au dépistage moléculaire par PCR de différents organes porteurs de la maladie ou asymptomatiques.***
- ✓ *Vise à soumettre divers organes du fraisier (collet, stolon, feuille, pétiole, fleur, fruit) à la détection PCR des espèces de Colletotrichum, champignons pathogènes causant l'antracnose.*
- ❖ *Des protocoles de détection PCR spécifique à chacune de trois espèces du Colletotrichum pathogène, C. acutatum, C. gleosporioides et C. fragariae, sont utilisés sur divers organes du fraisier et diverses sources de plants asymptomatiques ou atteints d'antracnose la saison précédente.*



FAARAP - Anthracnose 2016

Résultats de détection du *Colletotrichum* sp. et du *C. acutatum* selon les organes du fraisier

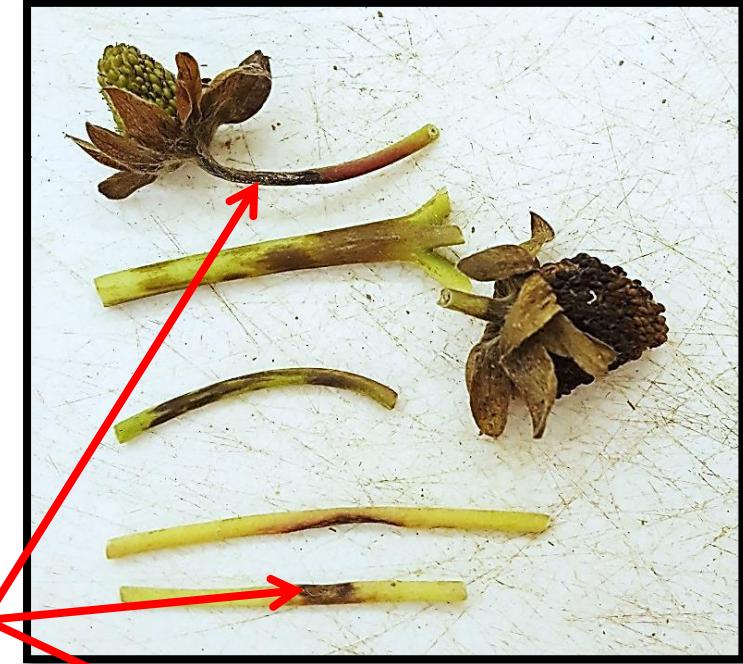
Étiquettes de lignes	Collet	Fraise	Feuille	Pétiole+tige	Total
Nombre échantillons testés	41	28	36	34	139
PCR <i>Colletotrichum</i> positif	23	17	10	14	63
qPCR <i>C. acutatum</i> positif	18	11	1	2	32
Validation qPCR vs PCR	17	9	1	2	29

Les 139 échantillons proviennent de 15 sites

- 45 % des tissus testés en 2016 sont infectés par *Colletotrichum*
- 50 % des tissus positifs *Colletotrichum* sont positifs au qPCR *C. acutatum*
 - ✓ *La confirmation C. acutatum dans les tissus atteint 74% (collet) et 53 % (fruit)*
 - ✓ *La confirmation C. acutatum dans les tissus atteint 10% (feuille) et 14% (pétiole+tige)*
- Il y aurait davantage d'inhibiteurs de qPCR dans les feuilles, les pétioles et les tiges
- Les tests qPCR *C. acutatum* n'ont pas tous été réalisés
- Des modifications au protocole d'extraction des ADN des feuilles, tiges et pétioles seront évaluées pour améliorer la fréquence de détection.



Anthracnose sur différents tissus





FAARAP - Anthracnose 2016

C.acutatum





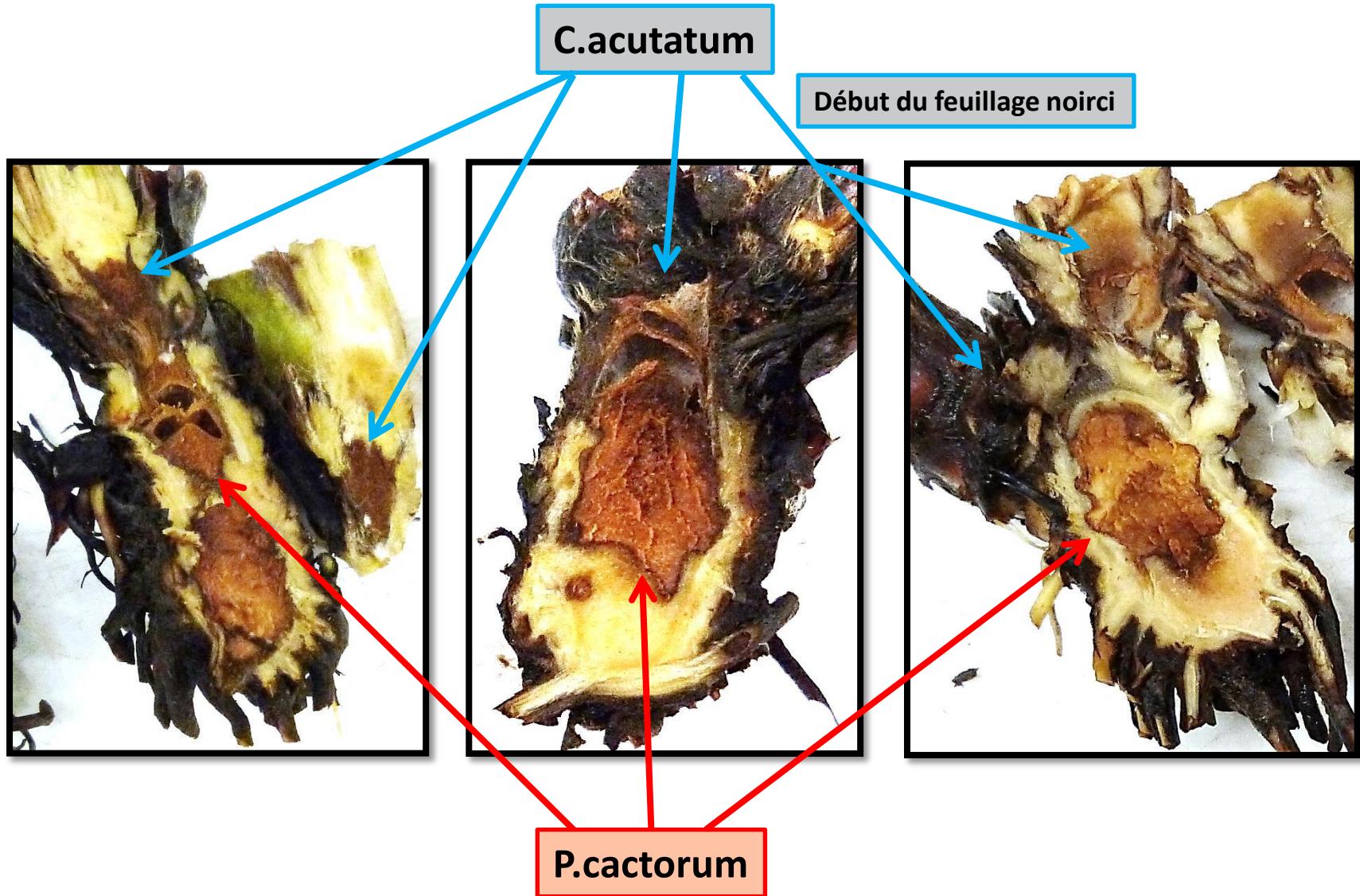
FAARAP - Anthracnose 2016

C.acutatum





FAARAP - Anthracnose 2016



C.acutatum

Début du feuillage noirci

P.cactorum



Conclusions - Anthracnose

Les protocoles de détection des trois espèces de *Colletotrichum* pouvant infecter le fraisier sont disponibles pour réaliser le dépistage des fruits ou autres organes du fraisier.

À ce jour, seul le *C. acutatum* a été détecté dans les échantillons soumis.

La présence de plusieurs champignons pathogènes ou autres stress peuvent induire des symptômes qui rendent difficile le verdict de l'anthracnose dans les collets.

La localisation des points d'infection dans le collet suggère des modifications à faire au protocole de prélèvement des tissus du collet lors des étapes de préparation des collets pour extraire les ADN fongiques et détecter les champignons pathogènes par PCR.



Merci !

Questions ?