



Centre de référence en agriculture
et agroalimentaire du Québec

Comité pomme de terre

Colloque sur la pomme de terre
LA QUALITÉ, ON NE PEUT S'EN PASSER!

Le vendredi 10 novembre 2006, Hôtel Québec Inn, Québec

La qualité des semences : un nouveau protocole d'analyses post-récolte

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

IRDA, Québec

Conférence préparée avec la collaboration de :

Édit Plante, B.Sc., microbiologie, et **Nathalie Daigle**, M.Sc., biologie d.t.a.
IRDA, Québec

Note : Cette conférence a été présentée lors de l'événement et a été publiée
dans le cahier des conférences.

Pour commander le cahier des conférences, consultez
le catalogue des publications du CRAAQ



TITRE DE LA PRÉSENTATION :

La qualité des semences : un nouveau protocole d'analyses post-récolte

AUTEUR :

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

COLLABORATRICES :

Édith Plante, B.Sc., microbiologie, et
Nathalie Daigle, M.Sc., biologie
IRDA, Québec



DÉPISTAGE POST-RÉCOLTE DES VIRUS PVY ET PLRV

La qualité des semences de pomme de terre peut être estimée à la suite de la réalisation de tests post-récolte qui ciblent un ou plusieurs agents pathogènes importants de la pomme de terre. Au Québec, les producteurs procèdent à un échantillonnage aléatoire de quelques centaines de tubercules par champ cultivé lors de la récolte des pommes de terre. Le nombre de tubercules échantillonnés est fonction de la surface du champ récolté. Les tests post-récolte ciblent deux virus indicateurs de la qualité de la semence, soit le virus de l'enroulement des feuilles (*acronyme anglais* : PLRV) et le virus de la mosaïque Y (*acronyme anglais* : PVY). Les pucerons sont les vecteurs de transmission exclusifs du virus PLRV qui envahit principalement les tissus des vaisseaux vasculaires. Les virus PVY peuvent être transmis par les pucerons, mais également par tout contact qui cause une blessure au plant de pomme de terre. Le virus PVY envahit la majorité des tissus d'un plant et il existe au moins six souches différentes du virus PVY, chacune exprimant des symptômes spécifiques. Finalement, les plants de pomme de terre peuvent être infectés par plus d'un type de virus à mosaïque (Ex. : PVY + PVS ou PVY + PVX), ce qui rend difficile l'estimation visuelle des infections du virus PVY.

Trois méthodes de détection des virus PVY et PLRV peuvent être employées pour le dépistage post-récolte : (1) L'inspection visuelle des symptômes; (2) La méthode immunologique ELISA; (3) La méthode moléculaire RT-PCR.

À l'initiative du Comité semences de la Fédération des producteurs de pommes de terre du Québec, un partenariat de recherche a été constitué avec des représentants des producteurs de semences, de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) et du Laboratoire d'analyse biologique de l'IRDA pour obtenir l'aide financière du MAPAQ via le Programme de soutien à l'initiative horticole (PSIH). Le projet de recherche avait pour but de comparer l'efficacité des trois méthodes de détection post-récolte.

Puisque les résultats obtenus des expériences réalisées en 2004 sont similaires à ceux obtenus en 2005, la conférence présentera les principaux résultats obtenus en 2005. Je discuterai brièvement des perspectives d'application pour l'industrie de la semence, plus particulièrement de l'élaboration d'un protocole novateur pour l'évaluation post-récolte des taux d'infection des virus PVY et PLRV des semences de pomme de terre.

COMPARAISON DE TROIS MÉTHODES DE DÉPISTAGE POST-RÉCOLTE

Le dépistage post-récolte des virus PVY et PLRV réalisé par **la méthode de l'inspection visuelle** des symptômes nécessite que les tubercules soient traités pour lever la dormance afin d'accélérer leur germination. Sans l'emploi d'un traitement de levée de dormance, les tubercules, selon les variétés, ne germeraient qu'aux mois de février ou mars sous des conditions d'entreposage favorables à la germination. Lorsque les semences traitées sont plantées début novembre dans une région chaude, la Floride ou les îles d'Hawaï, elles germent rapidement et des inspections visuelles des jeunes plants peuvent être réalisées aux mois de décembre et janvier pour détecter les symptômes caractéristiques des maladies virales. Les principaux désavantages de cette méthode sont : (1) La toxicité du traitement chimique de levée de dormance; (2) La grande interaction entre l'expression des symptômes viraux et les variétés de pommes de terre d'une part, et les conditions environnementales d'autre part. Des variétés sont asymptomatiques et certaines conditions environnementales peuvent masquer des symptômes. De plus, l'évaluation des symptômes est subjective et la présence simultanée de plus d'une espèce de virus dans les plants peut modifier ou masquer les symptômes spécifiques au PVY ou au PLRV.

Le dépistage post-récolte des virus PVY et PLRV réalisé par **la méthode immunologique ELISA** emploie des anticorps spécifiques au virus PLRV et des anticorps spécifiques à l'ensemble des six souches connues du virus PVY. Les anticorps se fixent à des molécules localisées à la surface des virus. La méthode ELISA détecte au minimum la présence de quelques milliers de virus dans l'échantillon. Puisque les virus ne se multiplient que dans les cellules végétales physiologiquement actives, et que l'amidon contenu dans les tubercules nuit à la spécificité des anticorps, les tests post-récolte basés sur la méthode ELISA requièrent que la dormance des tubercules soit levée afin de laisser croître les germes et augmenter ainsi la quantité initiale de virus.

La méthode ELISA offre des avantages : (1) C'est une technique simple, adoptée dans les laboratoires depuis 35 ans et capable de tester plusieurs centaines d'échantillons à des coûts abordables. (2) Un vaste choix d'anticorps est disponible.

Les principaux désavantages sont : (1) Le traitement de levée de dormance est toxique; (2) De 6 à 10 semaines de germination des tubercules traités sont nécessaires pour obtenir des germes utiles au test; (3) Un test spécifique à chacun des virus doit être réalisé; (4) La présence de molécules dans les broyats de germes peuvent se fixer aux anticorps et causer

des réactions positives non spécifiques; (5) La sensibilité de détection de la méthode ne permet pas de grouper et de broyer plusieurs germes de tubercules différents par échantillon. Ainsi, un dépistage d'un lot de 200 tubercules nécessite 50 tests PVY sur des germes groupés de 4 tubercules et 100 tests PLRV sur des germes groupés de 2 tubercules, soit un total de 150 tests par lot.

Le dépistage post-récolte des virus PVY et PLRV réalisé par **la méthode moléculaire RT-PCR** nécessite d'extraire le matériel génétique des virus. Les virus PVY et PLRV ont chacun une longue molécule d'ARN qui code pour toutes les informations génétiques requises pour assurer la multiplication et la dissémination des virus. Ainsi, contrairement à l'emploi des anticorps du test ELISA qui se fixaient à l'enveloppe externe du virus, la méthode RT-PCR nécessite que l'ARN viral soit d'abord extrait. La RT-PCR emploie une paire de petites séquences, les amorces, et des enzymes qui multiplient une molécule initiale d'ARN viral en des millions de copies. Ce phénomène d'amplification de la région d'ARN comprise entre les deux amorces permet donc une très grande sensibilité de détection, de loin supérieure à celle obtenue du test ELISA.

La méthode RT-PCR offre plusieurs avantages : (1) La spécificité des amorces est supérieure à celle des anticorps et la possibilité de séquencer les produits de l'amplification permet de vérifier la spécificité de détection offrant ainsi une garantie diagnostique additionnelle. (2) La plus grande sensibilité permet la détection des virus dans les tubercules sitôt après la récolte, sans avoir à lever la dormance. (3) La technique est simple et permet la détection des virus PVY et PLRV en un seul test. (4) Elle peut traiter des centaines d'échantillons rapidement. (5) La plus grande sensibilité de détection permet de regrouper davantage d'extraits de tubercules en un même échantillon groupé. Ainsi, le dépistage des virus PVY et PLRV d'un lot de 200 tubercules nécessitera 20 tests sur des cônes de groupés de 10 tubercules.

Les principaux désavantages de la méthode RT-PCR sont : (1) L'obligation de réaliser une étape supplémentaire d'extraction des ARN viraux, et (2) d'utiliser des réactifs plus dispendieux.

PRINCIPAUX RÉSULTATS DU PROJET DE RECHERCHE

Notre principal objectif était de comparer l'efficacité des trois méthodes de détection post-récolte des virus PVY et PLRV pour des lots de semences dont les taux d'infection virale déterminés par les méthodes de laboratoire variaient de 0 % à plus de 10 %. Nos résultats indiquent que les trois méthodes ont une efficacité similaire lorsque les taux d'infection virale sont supérieurs à 5 %. Lorsque les taux de virus sont inférieurs à 5 %, les méthodes de laboratoire RT-PCR et ELISA sont toutefois plus sensibles. Il a été remarqué, lors des deux années du projet, que les estimations visuelles des taux de virus étaient, de façon générale, inférieures d'un facteur 4 aux estimations obtenues par les méthodes de laboratoire. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette

différence dans les estimations. Mentionnons la sensibilité supérieure des méthodes de laboratoire, la répartition des virus dans les feuilles ou les tubercules et la subjectivité de l'évaluation visuelle. Les facteurs qui affectent le dépistage visuel ont un impact beaucoup plus important comparativement aux facteurs qui influent sur les méthodes de laboratoire. Les méthodes de laboratoire sont donc davantage sensibles et nous avons observé que la méthode RT-PCR était la plus sensible lorsque les taux de virus étaient inférieurs à 3 %.

Notre deuxième objectif était de vérifier si la précision du diagnostic d'un lot de semences était influencée par le nombre de tubercules testés. Nous avons comparé l'efficacité des méthodes ELISA et RT-PCR à détecter les virus PVY et PLRV lorsque 200 ou 400 tubercules étaient échantillonnés par lot de semences. Les deux méthodes ont une efficacité comparable lorsque les lots affichent des taux d'infection PVY ou PLRV supérieurs ou équivalents à 3 %. Nous avons également observé que l'analyse de 400 tubercules pouvait fournir un verdict plus précis de la qualité des lots, surtout pour des champs infectés à moins de 2 %. Les contraintes financières liées à analyser systématiquement 400 tubercules par lot sont toutefois à considérer.

Notre troisième objectif était de déterminer le nombre de tubercules positifs pour chacun des groupés de tubercules jugés positifs au test RT-PCR. Nos résultats ont démontré qu'en moyenne un seul tubercule infecté était présent dans chacun des groupés de 10 tubercules testés positifs par RT-PCR lorsque d'une part, le nombre de groupés positifs était inférieur à 4 sur les 20 groupés testés et d'autre part, le taux d'infection virale du champ était inférieur ou égal à 3 %. De plus, une simulation statistique démontre qu'un seul tubercule infecté est présent dans des groupés de 25 tubercules lorsque 3 groupés ou moins sont positifs sur les 8 groupés d'un lot de 200 tubercules. Cette simulation est vraie 98 fois sur 100 lorsque le taux de virus du champ est inférieur à 3 %. Des tests préliminaires menés à l'IRDA ont confirmé les résultats de la simulation statistique.

PROPOSITION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE DÉPISTAGE POST-RÉCOLTE DES VIRUS PVY ET PLRV

Les résultats des projets de recherche sur les méthodes de dépistage post-récolte des maladies virales réalisés au Laboratoire d'analyse biologique de l'IRDA ont conduit à l'élaboration d'un protocole de dépistage post-récolte. Ce protocole est basé sur l'emploi de la méthode RT-PCR pour l'analyse de 8 groupés de 25 tubercules par lot. Les tubercules pourront être testés dès la récolte. Ce protocole pourra s'intégrer à un Programme de certification des semences de pomme de terre pour juger la qualité des semences au regard des maladies virales. Les résultats RT-PCR complèteront les résultats issus des deux inspections visuelles de l'ACIA en cours de saison et ceux des tests ELISA réalisés pour des lots spécifiques de semences. L'ensemble de ces outils diagnostics permettra aux producteurs du Québec d'offrir des semences d'une très grande qualité phytosanitaire. Le protocole permet à tous les producteurs de pommes de terre d'évaluer rapidement la qualité des semences en ce qui concerne les virus PVY et PLRV.