

PROGRAMME INNOV'ACTION
AGROALIMENTAIRE



RAPPORT D'ÉTAPE

SECTION 1 – IDENTIFICATION DU PROJET

Numéro de projet :	IA217776	Date de remise :	30 mars 2018
Titre du projet :	Développement d'un test pétale pour la détection de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en production de haricots de transformation		
Responsable scientifique :	Hervé Van Der Heyden, Phytodata	Établissement :	Fédération québécoise des fruits et légumes de transformation
Nom du responsable de l'établissement :	Judith Lupien		

SECTION 2 – CALENDRIER DE RÉALISATION

Inscrire les étapes comme prévu dans l'acceptation du projet.

	Objectifs ou activités	Date de réalisation prévue	Date réelle de réalisation	Avancement
1	Élaboration des protocoles Choix des sites Préparation du matériel d'échantillonnage	Avril 2017 Avril 2017 et mai 2017 Avril 2018 et mai 2018	Avril 2017 Avril 2017	À jour
2	Sélection des marqueurs moléculaire - tests de sensibilité - tests de spécificité	Avril 2017- mai 2017	Avril 2017- mai 2017	À jour
3	Validation en conditions contrôlées	Mai 2017	Mai 2017	À jour
4	Échantillonnage des pétales	Mai 2017 - juin 2017 Mai 2018 - juin 2018	Juillet 2017 - août 2017	À jour
5	Évaluation des symptômes	Juin 2017 - juillet 2017 Juin 2018 - juillet 2018	Juillet 2017 - août 2017	À jour
6	Réalisation des tests -milieu semi-sélectif -PCR	Juin 2017 - juillet 2017 Juin 2018 - juillet 2018	Juillet 2017 – mars 2018	À jour, en cours
7	Analyse et rédaction du rapport d'étape	Janvier-Février 2018 Janvier-Février 2019	Mars 2017	À jour, en cour

SECTION 3 – AVANCEMENT (maximum 2 pages)

Reprendre chacune des activités ou chacun des objectifs inscrits à la section précédente et indiquer l'état d'avancement ou les raisons pour lesquelles ils n'ont pas été réalisés, (retardés pour [inscrire la raison], prévus plus tard dans le projet, annulés par le comité d'évaluation, etc.)

Le premier objectif de ce projet est d'adapter et de valider un test de détection moléculaire permettant de caractériser et de quantifier l'inoculum de *Sclerotinia sclerotiorum* sur les pétales de haricots. Le second objectif consiste à déterminer la relation entre l'ADN de *S. sclerotiorum* estimé grâce au test pétale sur pétri et par PCR, et enfin, déterminer l'incidence de la maladie en lien avec les niveaux d'infection au champ.

Étape 1 : Élaboration des protocoles, choix des sites, préparation du matériel d'échantillonnage (Statut : à jour, en continu) :

Les protocoles ont été élaborés pour toute la durée du projet.

Étapes 2 et 3 : Sélection des marqueurs moléculaires et validation en conditions contrôlées (Statut : à jour, en continu) :

Les marqueurs moléculaires utilisés par Phytodata pour tester les concentrations aériennes de spores de *S. sclerotiorum* ont été adaptés pour une utilisation sur des extractions de pétales de haricots. À cette étape les courbes standards ont été préparées et un contrôle de leur spécificité, visant à s'assurer que le marqueur ne procure pas un signal positif pour d'autres agents pathogènes du haricot, a été réalisé. Pour le marqueur de type LAMP, ces étapes ont également été réalisées.

Étapes 4 et 5 : Échantillonnage des pétales et évaluation des symptômes (Statut : à jour, en continu) :

En 2017, 10 champs ont été sélectionnés et échantillonnés à chaque semaine du 13 juillet au 15 août. À chaque échantillonnage entre 10 et 17 échantillons de pétales ont été prélevés dans chacun des champs pour un total de 745 échantillons de pétales. Chacun des échantillons de pétales a été divisé en deux parties et regroupés de façon à obtenir six groupes par site pour chacune des dates. À chaque semaine, un dépistage des apothécies a été réalisé au sol en inspectant 5 sections linéaires de 1m pour chacune des parcelles. En second lieu, un dépistage des plants a été réalisé sur 5 sections linéaires de 1m de rang.

Étape 6 : Réalisation des tests pétris et PCR (Statut : à jour, en continu):

La présence de *S. sclerotiorum* a été testée pour chacun des échantillons de pétales et ce, de trois façons :

- **Milieu semi-sélectif**

Les milieux semi-sélectifs ont été préparés au fur et à mesure selon le protocole de Perez et al. (2001). Les pétales recueillis au champ ont été placés sur les boîtes de pétris de 90mm et incubés à température pièce pour une période de 10 jours. Une première observation des pétris a été réalisée après 4 jours et une seconde observation, après 10 jours d'incubation. Cette étape s'est faite en temps réel, immédiatement après l'échantillonnage au champ.

- **PCR en temps réel (qPCR) et LAMP-PCR**

La seconde moitié des échantillons a tout d'abord été soumise à un protocole d'extraction d'ADN (cette étape est complétée) et les ADN congelés jusqu'à utilisation. Chacun des échantillons d'ADN a ensuite été testé à l'aide des outils moléculaires qPCR et LAMP adaptés plus tôt.

Étape 7: Analyse et rédaction du rapport d'étape (Statut : à jour, en continu):

Les analyses préliminaires ont été réalisées et la rédaction du rapport d'avancement a été complétée.

SECTION 4 – PRINCIPAUX RÉSULTATS (maximum 4 pages)

Présenter les principaux résultats préliminaires. Utiliser des tableaux et des graphiques au besoin. Cette section, comme le reste du rapport, restera strictement confidentielle.

Objectif 1 : Adaptation des marqueurs moléculaires et du milieu semi-sélectif

Le marqueur moléculaire adapté du test développé pour les capteurs de spores, s'est avéré sensible et spécifique à *S. sclerotiorum*. Comme attendu, le marqueur permet une amplification linéaire de *S. sclerotiorum* pour une quantité de 2.7×10^{-6} à 2.7×10^{-1} (figure 1 A) avec une efficacité au PCR de 103.98%, ce qui est conforme aux normes de développement de tels essais (Bustin et al. 2009). De la même façon, la courbe standard utilisée à l'aide du PCR-LAMP est également linéaire pour des concentrations d'ADN variant de 1.75×10^0 à 1.76×10^{-4} ng d'ADN génomique (figure 1B). Pour le LAMP-PCR, la réaction était positive à l'intérieur d'un délai de 21 minutes (figure 1B). La réaction de LAMP-PCR était trop rapide pour pouvoir comparer avec le qPCR en temps réel, l'efficacité de la réaction LAMP-PCR étant de près de 200%. Aussi, pour permettre la comparaison entre l'efficacité des deux méthodes, différentes polymérases sont actuellement à l'essai.

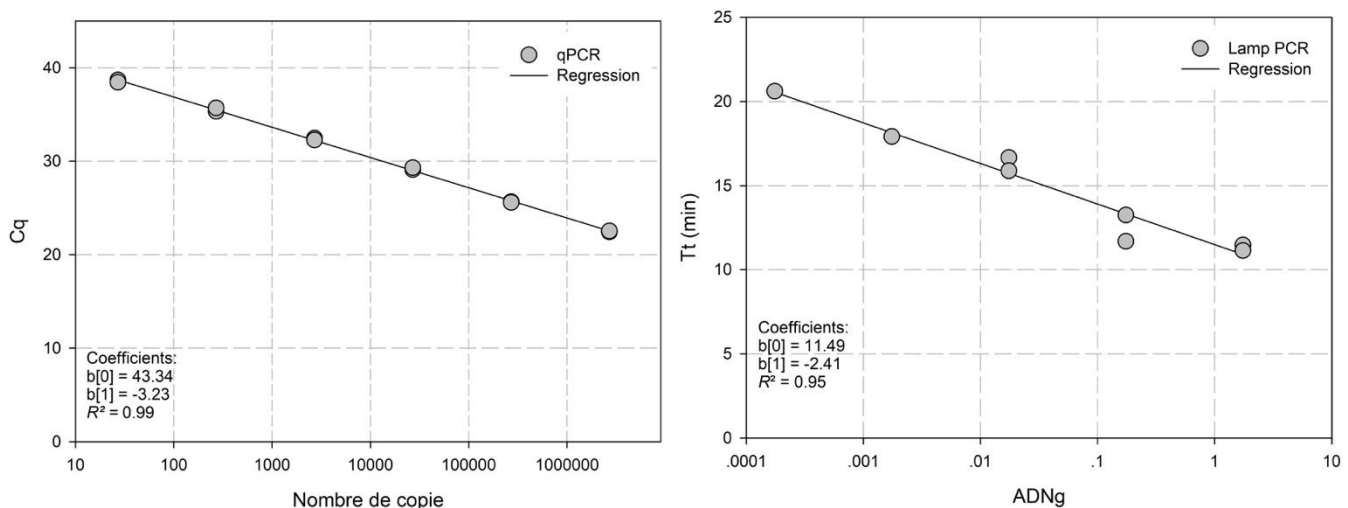


Figure 1: A) Courbe standard en nombre de copie du gène ITS obtenue par PCR en temps réel et B) courbe standard en ADN génomique obtenu par LAMP-PCR.

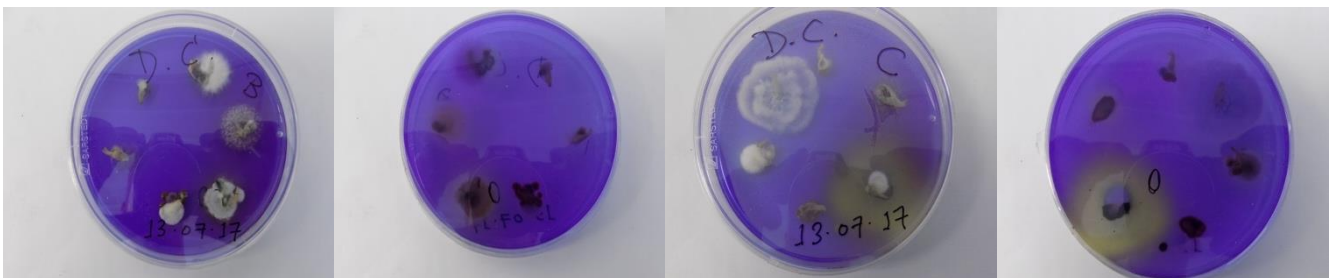


Figure 2: Exemple de milieu d'échantillons de pétales utilisés sur milieu semi-sélectif. Les sections ayant viré au jaune indiquent la présence d'acide oxalique, sécrété par *S. sclerotiorum*.

Le milieu semi-sélectif utilisé dans le cadre de ce projet, a démontré être spécifique à *S. sclerotiorum* dans la majorité des cas (Figure 2). Ce milieu réagit en passant du mauve au jaune lorsqu'il y a production d'acide oxalique par *S. sclerotiorum*. Toutefois, un certain nombre d'échantillons n'ayant pas viré au jaune sur le milieu semi-sélectif se sont avérés être contaminés par *S. sclerotiorum* et quelques autres échantillons ayant fait virer le milieu au jaune étaient contaminés par une autre espèce. Ainsi, il était nécessaire d'attendre la formation de sclérotés par *S. sclerotiorum* pour pouvoir confirmer l'identité du pathogène présent sur les pétales déposés à la surface des milieux de culture.

Objectif 2 : Déterminer la relation entre l'ADN de *S. sclerotiorum* estimé grâce au test pétale sur pétris et par PCR.

La saison 2017 n'a pas été très favorable au développement de la maladie au champ. Les températures moyennes étaient légèrement en dessous de 20°C au début du mois d'août (figure 3), ce qui peut avoir affecté la capacité de germination des spores et la progression de la maladie post infection. Il a, en effet, été démontré que la germination de *S. sclerotiorum* et la progression de la maladie sont optimales entre 20 et 25°C (Clarkson et al. 2014). De plus, de récents travaux ont clairement démontré que des températures de sol situées entre 21.5 et 23.5°C étaient optimum pour la formation des apothécies (Fall et al. 2018). Par ailleurs, il a également été illustré que la formation des apothécies est optimale lorsque la canopée est fermée à plus de 60% (Fall et al. 2018). En 2017, ce stade a été atteint vers le 7 août, précisément lorsque les températures moyennes étaient inférieures à 20°C (figure 1).

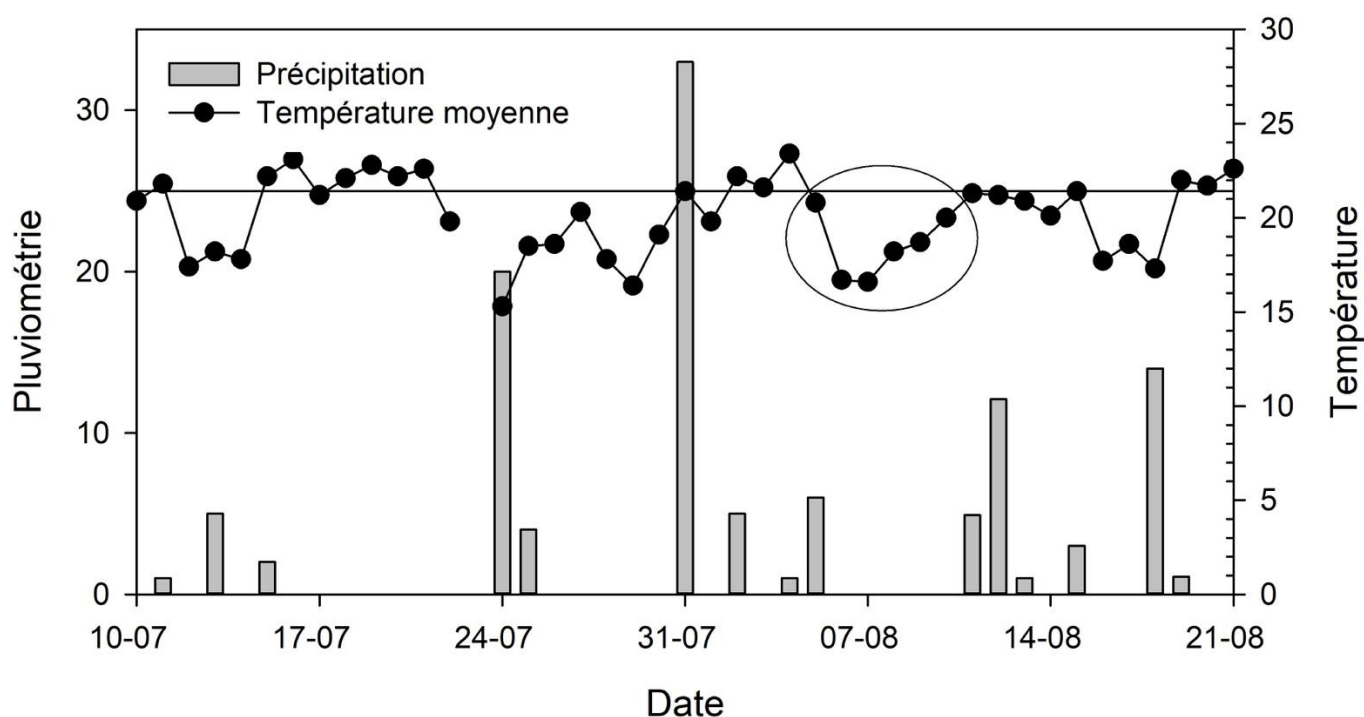


Figure 3: Pluviométrie et températures moyennes pour la période de l'essai au champ.

La proportion de pétales contaminés n'a pas dépassé 55% en moyenne (figure 4). Le pourcentage de pétales infectés a culminé le 4 août après quoi les proportions de pétales contaminés ont régressé jusqu'au 15 août, décrivant une fonction gaussienne significative ($P= 0.0048$ et $R^2 = 0.78$).

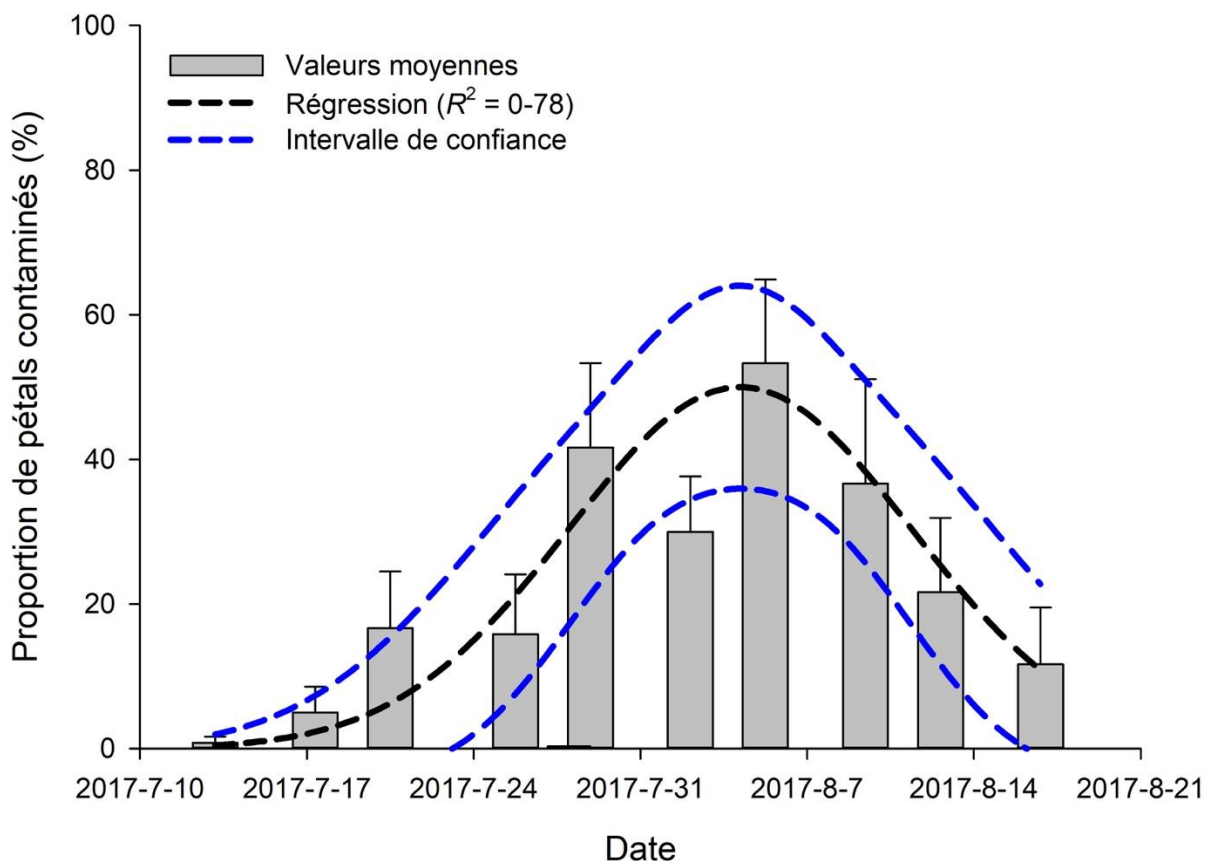


Figure 4: Proportion de pétales contaminés et proportion cumulative de pétales contaminés en fonction de la date d'échantillonnage.

L'analyse des pétales par qPCR et LAMP-PCR n'était pas terminée au moment de la rédaction du rapport d'étape. Toutefois, les résultats préliminaires obtenus jusqu'à présent suggèrent qu'il est possible de détecter la présence de *S. sclerotiorum* avec les méthodes PCR avant d'en faire la détection à l'aide de l'approche par pétri. Pour le site A par exemple, les premiers pétales contaminés ont été détectés sur pétri le 1^{er} août, tandis que les premiers pétales contaminés ont été détectés par PCR deux visites plus tôt, soit le 25 juillet (figure 5).

Cette tendance reste à confirmer, mais les résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les tests PCR permettront de déceler les infections plus tôt et permettront un meilleur contrôle de la maladie au champ. La relation entre les infections détectées dans les pétales et les symptômes au champ reste à faire.

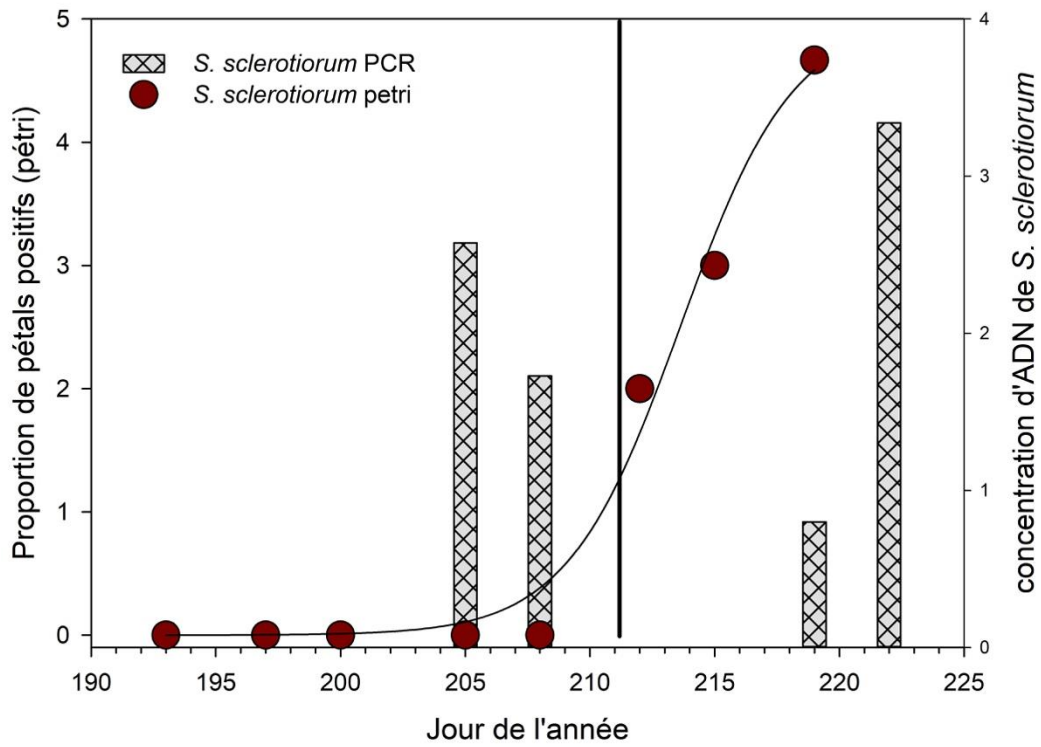


Figure 5: Comparaison des tests pétales sur pétris et en LAMP-PCR.

L'industrie a participé et contribué au projet comme prévu initialement. Sa collaboration s'est effectuée de diverses façons puisque Robert Deschamps de Bonduelle Amériques et que le centre de recherche Phytodata ont travaillé au bon déroulement du projet. Ainsi Phytodata a prêté ses équipements et ses installations ainsi que du matériel a été, et ce, sous la supervision d'Hervé Van der Heyden. De plus, M. Robert Deschamps a collaboré en déterminant le choix des sites, en participant à la relecture des protocoles et des rapports.

Faire parvenir à l'adresse : innovaction@mapaq.gouv.qc.ca.

Pour plus de renseignements, écrivez à innovaction@mapaq.gouv.qc.ca ou téléphonez au 418 380-2103.