

## DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE DÉTECTION

# FICHE SYNTHÈSE

## Sous-volet 3.2 – Approche interrégionale

### TITRE

DÉVELOPPEMENT ET MISE À NIVEAU DE MÉTHODES DE DÉTECTION DES CHAMPIGNONS PATHOGÈNES DES TISSUS LIGNEUX DE LA VIGNE AU QUÉBEC

**ORGANISME** Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel

**COLLABORATEURS** INRS-Institut-Armand-Frappier

**AUTEURS** Caroline Provost, Koyomi Ozaki, Claude Guertin, Eric Déziel

MAPAQ

### INTRODUCTION

Les maladies du bois de la vigne sont très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole dans toutes les grandes régions viticoles du monde. Une multitude de champignons responsables de ces maladies provoquent plusieurs symptômes observés sur les différentes parties de la plante. La viticulture au Québec est relativement récente et encore en pleine expansion. Les maladies du bois de la vigne peuvent affecter les jeunes plantations comme les vignobles vieillissant, dans les deux cas, les risques de présence de ces maladies sont en croissance dans les vignobles du Québec. De plus, avec les modifications climatiques anticipées dans les prochaines années, de nouveaux cépages seront certainement implantés au Québec pouvant ainsi favoriser l'introduction de variétés de vigne plus susceptibles aux maladies du bois dans nos vignobles. Les modifications climatiques peuvent favoriser la propagation de ces maladies, notamment les températures supérieures à 30 degrés Celsius et les précipitations abondantes. Dans ce contexte, il est important d'avoir des méthodes de détection précises qui permettront l'identification et la quantification des organismes pathogènes. Actuellement, des informations concernant la détection des maladies du bois de la vigne selon différentes méthodes de laboratoire sont disponibles, mais une mise au point des techniques avec les espèces retrouvées au Québec et en Amérique du Nord est nécessaire.

### OBJECTIFS

L'objectif principal du projet était de développer des méthodes de détection de dix espèces fongiques qui sont responsables de cinq maladies du bois de la vigne au Québec. Les objectifs spécifiques étaient : 1) identifier les amorces nécessaires à l'identification des champignons; 2) mettre au point des méthodes de laboratoire pour la détection simultanée des champignons pathogènes du bois de la vigne (PCR multiplex, qPCR, Tagman); et 3) développer un protocole d'échantillonnage des tissus sur le terrain. Pour ce faire, une approche de biologie moléculaire basée sur la technique qPCR en temps réel multiplexe a été préconisée.

### MÉTHODOLOGIE

Au total, vingt-six souches de dix espèces fongiques différentes ont été étudiées au cours de ce projet. Parmi celles-ci, vingt-deux souches nous ont été envoyées directement par le Dr José Ramón Urbez-Torres, un chercheur au Summerland research and development centre (Centre de Recherche et de Développement de Summerland) en Colombie-Britannique. Une souche de *Phomopsis viticola*, un champignon précédemment collecté par le Dr Urbez-Torres, nous a été fournie par le Dr Florent Trouillas de l'Université de Californie à Davis. De plus, trois souches de *Cylindrocarpon pauciseptatum* ont été isolées à partir des racines des vignes des cépages Vidal, Baltica et Radisson, provenant de l'Île-d'Orléans, qui ont été échantillonnées en été 2016.

En considérant le principe qu'une paire d'amorces permet l'amplification de l'ADN fongique, celle-ci est couplée à une sonde d'hybridation de type TaqMan® ce qui permet la détection par l'émission de lumière fluorescente. Ainsi, la sonde est une séquence complémentaire à son ADN cible, dont l'extrémité 5' est attachée à un fluorochrome qui est maintenu non-fluorescent par une molécule d'agent d'extinction (quencher molecule) qui est liée à l'extrémité 3'. Durant les étapes d'amplification, l'ADN polymérase clive ce fluorochrome, ce qui se traduit par l'émission d'une lumière fluorescente d'une certaine couleur. Comme la sonde est conçue pour qu'elle soit spécifique à une espèce seulement, il est possible de développer un système de détection simultanée de plusieurs champignons en ajoutant plusieurs sondes, chacune attachée à un fluorochrome de couleur différente, dans une même réaction. Ainsi, il est possible de vérifier la présence ou l'absence des espèces cibles dans un échantillon environnemental, en regardant la présence ou l'absence de l'émission de fluorescence. Les détails de la méthodologie pour chacune des étapes et des maladies est décrite dans le mémoire de Mme Ozaki.

## RÉSULTATS

Les dix champignons responsables des cinq maladies du bois de la vigne ont été d'abord classifiés en quatre groupes différents, selon les symptômes causés (Tableau 1). Sur la base de cette classification, quatre troupes multiplexes permettant la détection ont été développées. Chacune d'elle assure le diagnostic de la présence de deux à trois espèces fongiques phytopathogènes de manière simultanée et rapide. L'approche préconisée pour chacune des réactions (ou systèmes) multiplexes est l'utilisation d'une seule paire d'amorces permettant d'amplifier une région commune de l'ADN de toutes les espèces ciblées. Cette région est par la suite soumise à des sondes spécifiques propres à chacune des espèces fongiques recherchées. Cette approche a l'avantage de réduire le coût de son utilisation et de la rendre plus conviviale.

Une méthodologie détaillée a été développée et testée sur des échantillons provenant du terrain. Cette méthodologie spécifique pour les cinq maladies du bois ciblées a été transférée au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ. La liste des souches et des sondes démontre les séquences et régions ciblées pour établir un multiplex spécifique pour chacune des maladies (Tab. 2). De plus, un protocole d'échantillonnage sur le terrain a été élaboré afin de spécifier les conditions d'envoi au laboratoire des plants à tester.

Tableau 1. Regroupement de champignons étudiés dans le présent projet

Maladies	Champignons associés	Groupe
Maladie de Pétri/ Esca	<i>Phaeoconiella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> <i>Fomitiporia polymorpha</i>	Multiplexe 1 (Bois/ Feuilles)
Pied Noir	<i>Ilyonectria liriodendri</i> <i>Ilyonectria macrodidyma</i> <i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	Multiplexe 2 (Racine)
Black Dead Arm	<i>Botryosphaeria dothidea</i> <i>Diplodia seriata</i> <i>Neofusicoccum parvum</i>	Multiplexe 3 (Feuilles)
Eutypiose	<i>Eutypa lata</i>	Multiplexe 4 (Bois/Feuilles)
Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i>	

Tableau 2 : Liste des sondes employées pour toutes les espèces fongiques étudiées, ainsi que les paires de fluorochromes et *quencher*s qui y sont attachés (issue du mémoire de K. Ozaki)

Groupe (maladie)	Espèces responsables	Nom de la sonde (Séquence 5'→3')	Gène ou région cible	Fluorophore/ Quencher
Multiplex 1 (esca)	<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	PC2 (TCCTCTGGGCC CGATCTCCA)	ITS1	5'Cy5/ 3' IBRQ-Sp
	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	PA2 (CCTGCCGGAGG GCACAGACT)	ITS1	5'HEX/ 3' IBFQ
Multiplex 2 (pied noir)	<i>Ilyonectria liriodendri</i>	LIR1 (TTTCTCTGCGC CGACCTGAC)	Histone 3	5'Cy5/ 3' IBFQ
	<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	MAC1 (ATGGCCGGCGC GCCATTTA)	Histone 3	5'ROX/ 3' IBFQ
	<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>	PAU1 (CCCACCGCATC ATCGTACTGACC)	Histone 3	5'HEX/ 3' IBFQ
Multiplex 3 (black dead arm)	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BD1 (TCCTTTGCGGG CGCGCCTC)	ITS2	5'HEX/ 3' IBFQ
	<i>Diplodia seriata</i>	DS1 (TGTT CAGCCCTC AAGCGTAGTAG)	ITS2	5'ROX/ 3' IBFQ
	<i>Neofusicoccum parvum</i>	NP2 (TCCACGGACGC GCCTT)	ITS2	5'Cy5/ 3' IBFQ
Multiplex 4 (excoriose et eutypiose)	<i>Phomopsis viticola</i>	PHO1 (ACTCATACCTTA CCGTTGCCTCGG)	ITS1	5'Cy5/ 3' IBRQ-Sp
	<i>Eutypa lata</i>	EUT1 (CCCGGTACCTA CCCTGTAGCTAC C)	ITS1	5'HEX/ 3' IBFQ

Légende : Cy5 = cyanine 5; HEX = hexachloro-6-carboxyfluorescein; ROX = 6-carboxyl-X-rhodamine; IBRQ-Sp = Iowa black red quencher IBFQ = Iowa black fluorescein quencher.

## IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Ce projet contribue à l'avancement des connaissances concernant les champignons phytopathogènes retrouvés dans les tissus ligneux de la vigne. Les retombées de ce projet sont importantes puisque les méthodes de détection des maladies de la vigne n'étaient pas au point et plusieurs diagnostics négatifs étaient obtenus avec des symptômes évidents de maladie. La précision des techniques de détection en laboratoire était donc essentielle pour l'émission d'un diagnostic fiable. La méthode de détection par qPCR multiplex permet une détection simultanée de plusieurs champignons pathogènes à l'aide d'un seul test. Cette méthode est privilégiée car elle est très spécifique, fiable et elle réduit les manipulations. De plus, l'élaboration du protocole d'échantillonnage au champ permet l'envoi d'échantillon dans les meilleures conditions favorisant ainsi la détection des maladies au laboratoire. Les méthodes de détection développées dans le cadre de ce projet ont été transférées au laboratoire de diagnostic du MAPAQ, ainsi les professionnels du MAPAQ disposent de méthodes spécifiques et rapides pour la détection de ces cinq maladies du bois de la vigne. Ainsi tous les intervenants et les producteurs peuvent profiter des retombées de ce projet en ayant accès à des méthodes de détection précises.

**DÉBUT ET FIN DU PROJET**  
Mai 2015 à septembre 2018.

**POUR INFORMATION**  
Caroline Provost, Ph. D.,  
Chercheure et Directrice  
Courriel : cprovost@cram-mirabel.com  
Tél. : (450) 434-8150 poste 5744

Claude Guertin, Ph. D.,  
Professeur INRS-IAF  
Courriel : claude.guertin@iaf.inrs.ca  
Tél. : (450) 687-5010 poste 4234