

Université Rutgers

Université Laval

Ocean Spray company

Nouvelle méthode d'identification génétique des principaux pathogènes responsables de la pourriture du fruit de Canneberge

Julien Vivancos

Julien.vivancos.1@ulaval.ca

Journée INPACQ : jeudi 28 janvier 2015



Plan de l'intervention proposée

- I. Introduction : La pourriture du fruit de canneberge (P.F.C)
- II. Mise en place d'une nouvelle méthode génétique d'identification des champignons responsables de la P.F.C
- III. Résultats d'identification obtenus au Québec (saison 2015)
- IV. Avantages / Limites de la detection génétique des champignons responsables de la P.F.C
- V. Bilan / Perspectives
- VI. Remerciements

Journée INPACQ : jeudi 28 janvier 2015

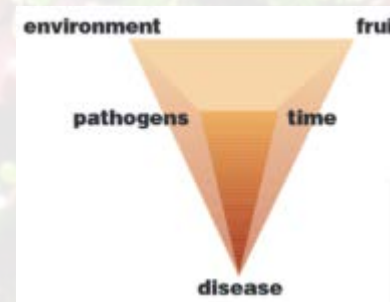


Introduction

- **La pourriture du fruit de canneberge (P.F.C)**
 - **Apparition** : lors de la culture et de l'entreposage
 - **Induit** de nombreuses pertes : 0-15% / an



- **Implique** de nombreux pathogènes :
virus, bactéries, levures
champignons pathogènes



Introduction

- Confusion stress environnementaux et pourriture fruit de canneberge



- La pourriture fruit de canneberge est causée principalement par des **champignons pathogènes**

Introduction

- Champignons pathogènes responsable pourriture de la canneberge

- < 10 : identifié au Québec
- **Ascomycètes**



- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| • <i>Allantophomopsis</i> ** | • <i>Penicillium</i> |
| • <i>Botryosphaeria</i> | • <i>Pestalotia</i> |
| • <i>Botrytis</i> | • <i>Phomopsis</i> ** |
| • <i>Coleophoma</i> ** | • <i>Phyllosticta</i> ** |
| • <i>Colletotrichum</i> | • <i>Physalospora</i> ** |
| • <i>Fusicoccum</i> ** | • <i>Synchronoblastia</i> |



- **Classification** : stade du développement du fruit; couleur de la pourriture; autres..



Introduction

- Classification : stade du développement du fruit

Disease	Fungus	Field rot	Storage rot
Early rot	<i>Phyllosticta vaccinii</i>	x	
Ripe Rot	<i>Coleophoma empetri</i>	x	x

Early Rot – *Phyllosticta*



Ripe Rot – *Coleophoma*



Introduction

- Classification : couleur du fruit

Disease	Fungus	Field rot	Storage rot
Berry Speckle	<i>Botryosphaeria vaccinii</i>	X	X
Blotch Rot	<i>Physalospora vaccinii</i>	X	X
Black Rot	<i>Allantophomopsis Lycopodina</i>		X

Black Rot – *Allantophomopsis*



Introduction

- Classification : autres

Disease	Fungus	Field rot	Storage rot
Bitter rot	Colletotrichum acutatum	X	
End Rot	Godronia cassandrae	X	X

Miscellaneous Rot



End Rot – *Fusicoccum*



Introduction

- Moyens de lutte contre la pourriture du fruit
 - **Améliorer pratiques culturales** : Amélioration drainage du sol et séchage du feuillage; sablage du sol en hiver et taille du plan..
 - **Améliorer pratiques de stockage** :
 - * Fruit frais : manipulation des fruits; diminution temps de contact des fruits avec l'eau
 - * Transformation : favoriser la congélation ou la déshydratation des fruits..
 - **Sélection variétale** de cultivars résistants
 - **Application de fongicides** à large spectre au cours de la saison (Bravo, Proline, Quadris, Topaz, Ferban.) entre 1 à 6 fois / an



Problématique

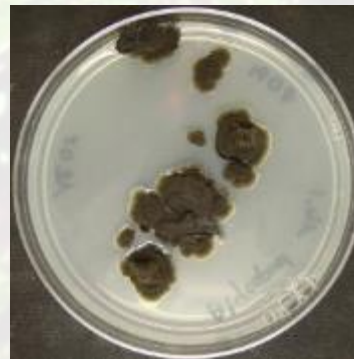
- Limiter l'application de fongicides en champs

- **Surexploitation** des fongicides en agriculture (pollution)

Toxicité pour la santé humaine?

- **Nécessité d'identifier rapidement** les champignons responsables :

- * Pb : La méthode traditionnelle (isolement sur boîte de pétri) est longue, coûteuse



Allantophomopsis lycopodina
(1 mois de culture)

- * Améliorer la technique d'identification



Projet de la Compagnie Ocean Spray



- **Projet de recherche**

- Développer un test génétique (PCR multiplex) pour identifier les principaux champignons responsables de la pourriture du fruit de Canneberge

- **Objectifs principaux**

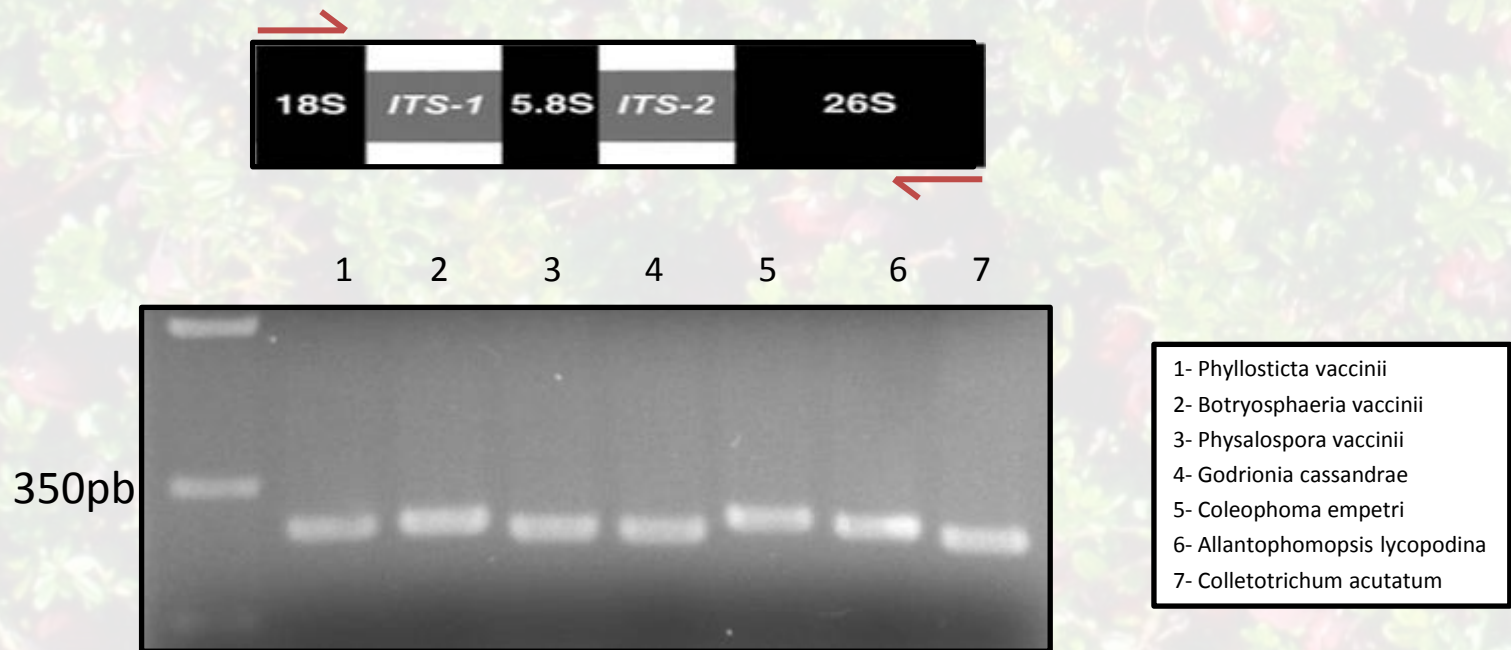
- Identification par PCR des 7 principaux champignons sur des fruits pourris provenant d'échantillons de la région de Québec (saison 2015)

- Comparer résultats génétiques obtenus avec ceux obtenus avec la méthode traditionnelle



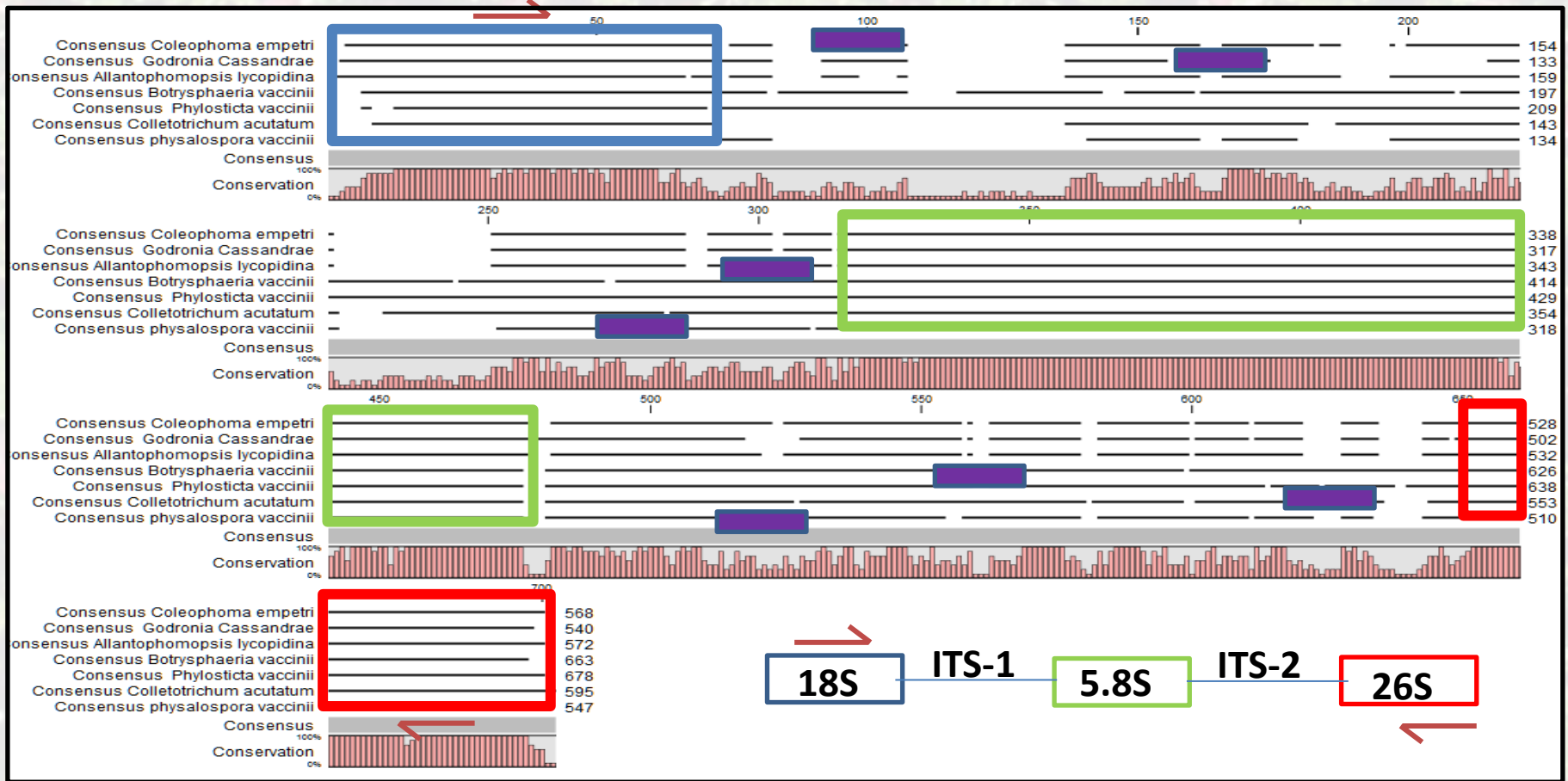
1-Mise en place du Test multiplex PCR

- Amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique consensus des 7 champignons à l'aide d'amorces universelles



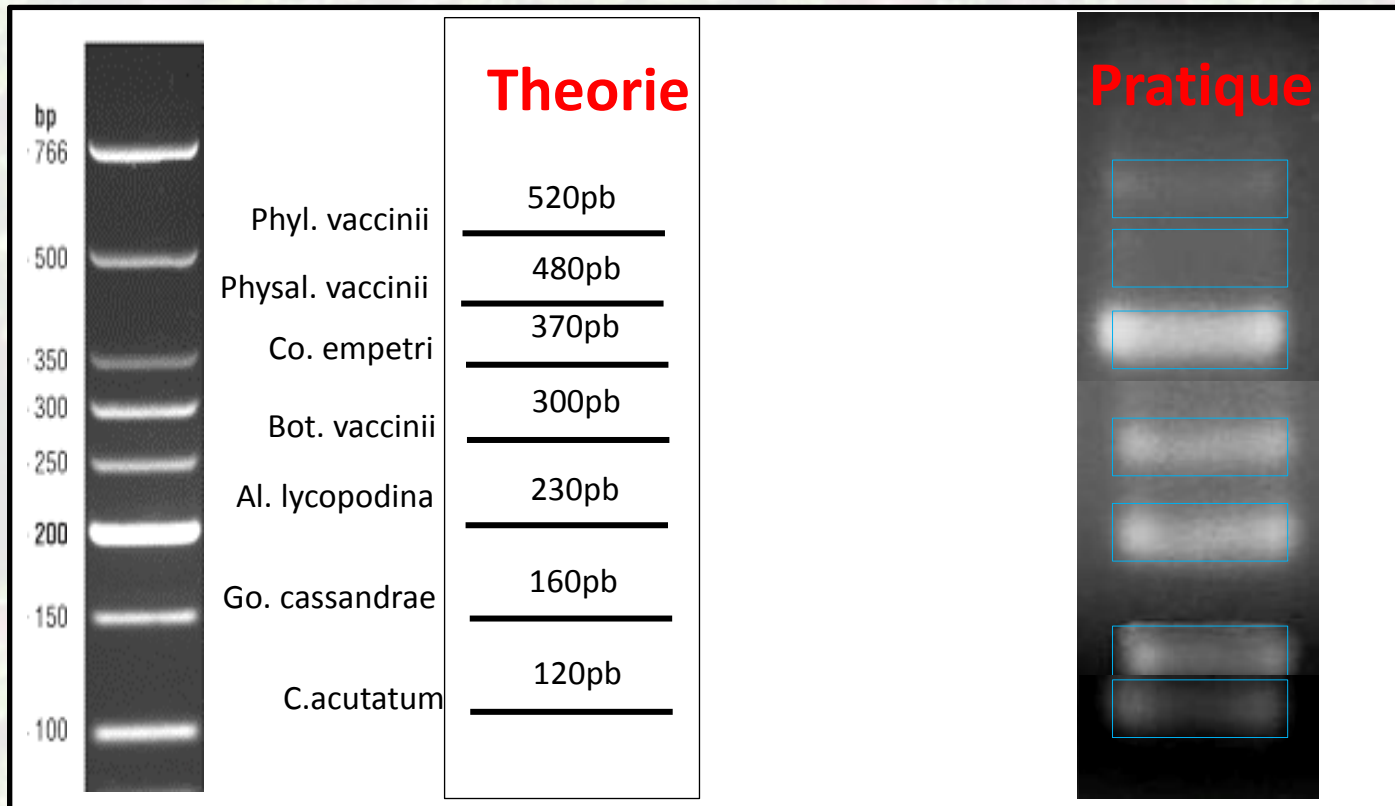
1-Mise en place du Test multiplex PCR

- séquençage des fragments d'ARN ribosomique afin de créer des amorces spécifiques au 7 champignons



1-Mise en place du Test multiplex PCR

Approche multiplex-PCR



Profil spécifique

2-Efficacité du test multiplex-PCR

Limite au nombre de champignons pouvant être détecté ?

1- *Phyllosticta vaccinii*

1- *Phyllosticta vaccinii*

2- *Botryosphaeria vaccinii*

1- *Phyllosticta vaccinii*

2- *Botryosphaeria vaccinii*

3- *Physalospora vaccinii*

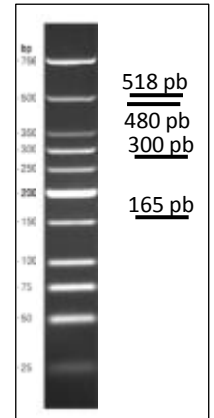
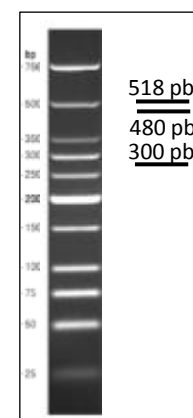
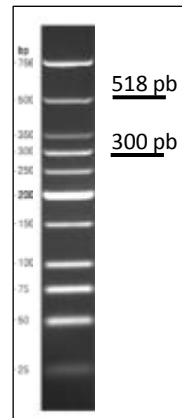
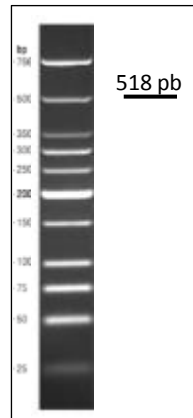
1- *Phyllosticta vaccinii*

2- *Botryosphaeria vaccinii*

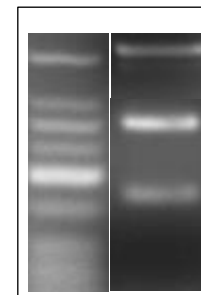
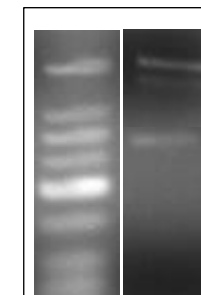
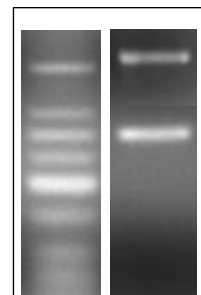
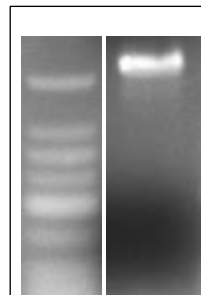
3- *Physalospora vaccinii*

4- *Godronia cassandrae*

Theorie



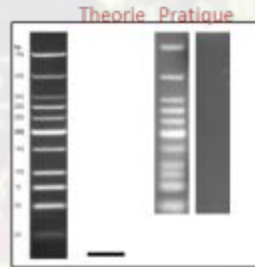
Pratique



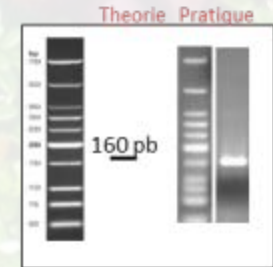
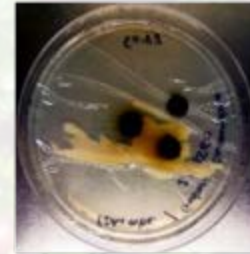
2-Efficacité du test multiplex-PCR

Spécificité génétique du champignon pathogène identifié ?

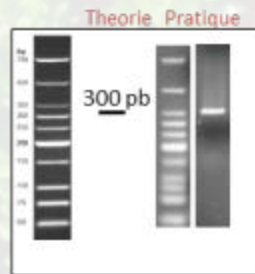
Wild type



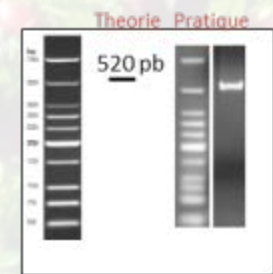
Godronia cassandrae



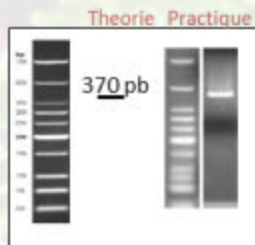
Botryosphaeria vaccinii



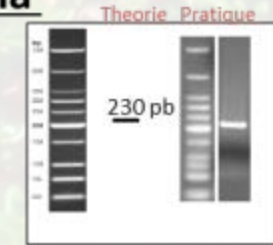
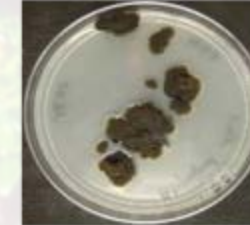
Phyllosticta vaccinii



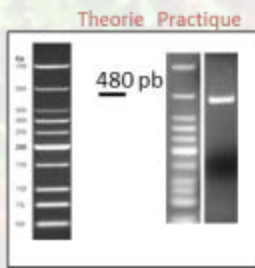
Coleophoma empetri



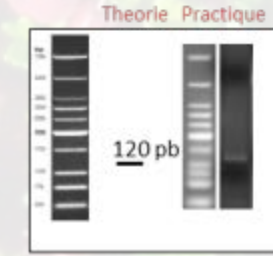
Allantophomopsis lycopodina



Physalospora vaccinii

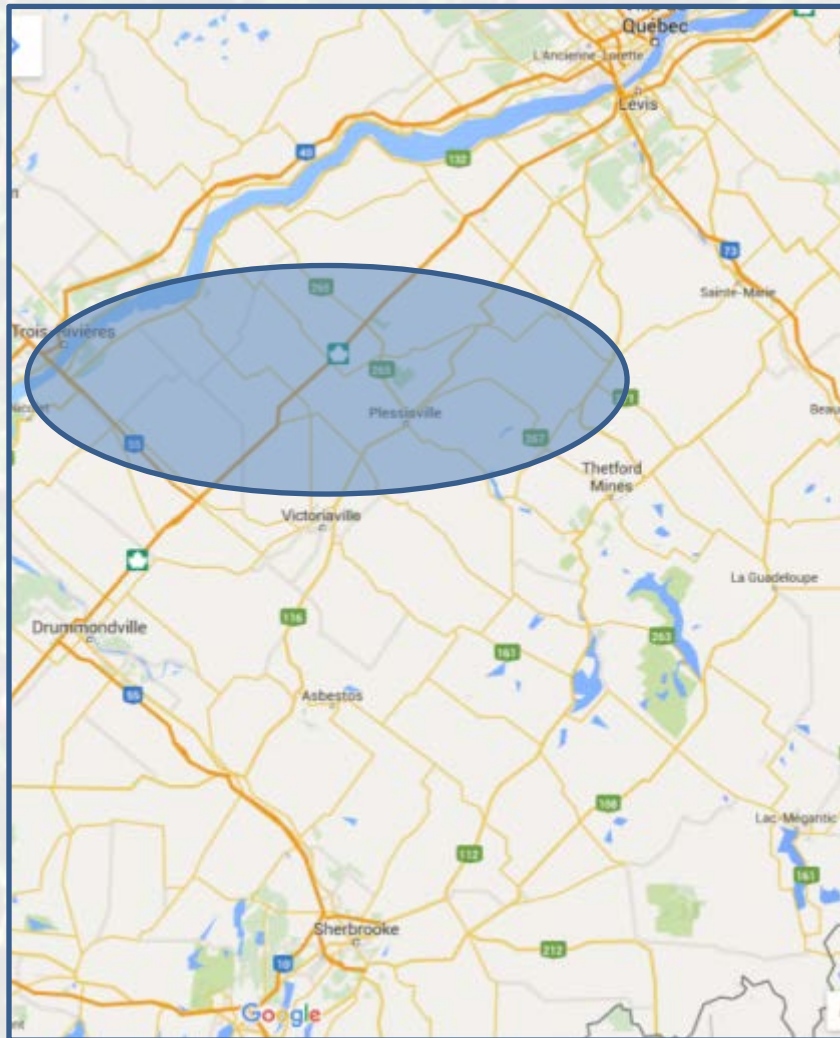


Colletotrichum acutatum

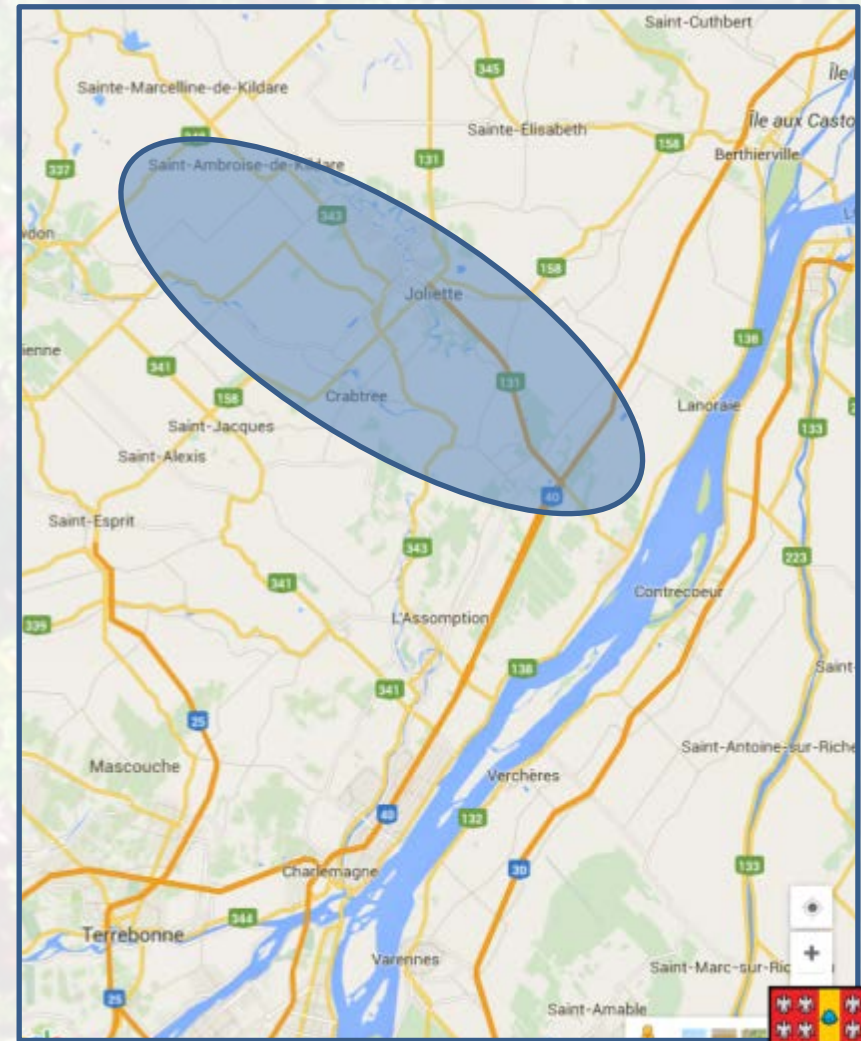


3- Fréquence des champignons responsables de la P.F.C sur des fruits pourris en champs et post-récolte (2015)

Région centre du Québec

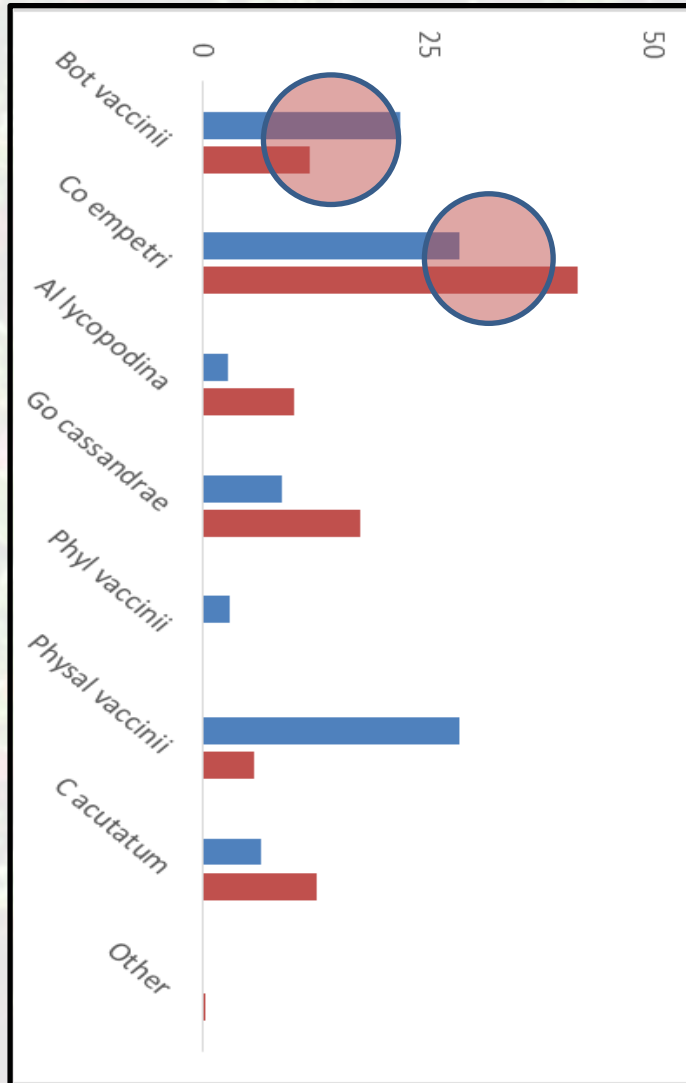


Région Lanaudière

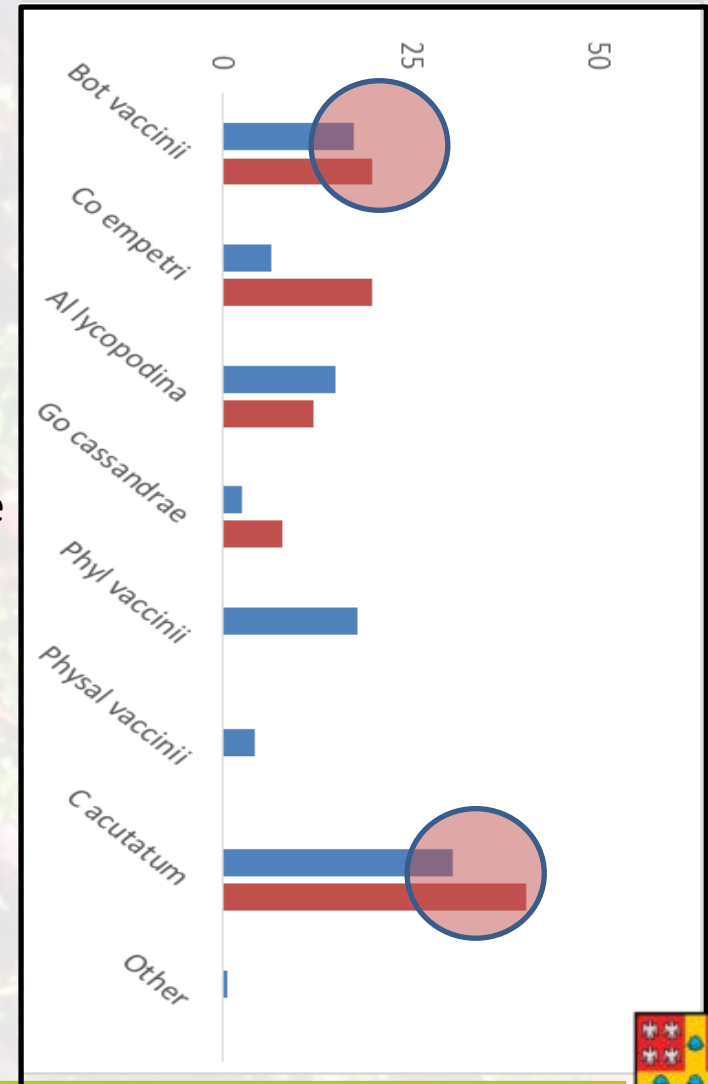


3- Fréquence des champignons responsables de la P.F.C sur des fruits pourris en champs et post-récolte (2015)

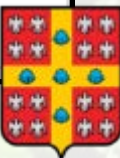
Région centre du Québec



Région Lanaudière

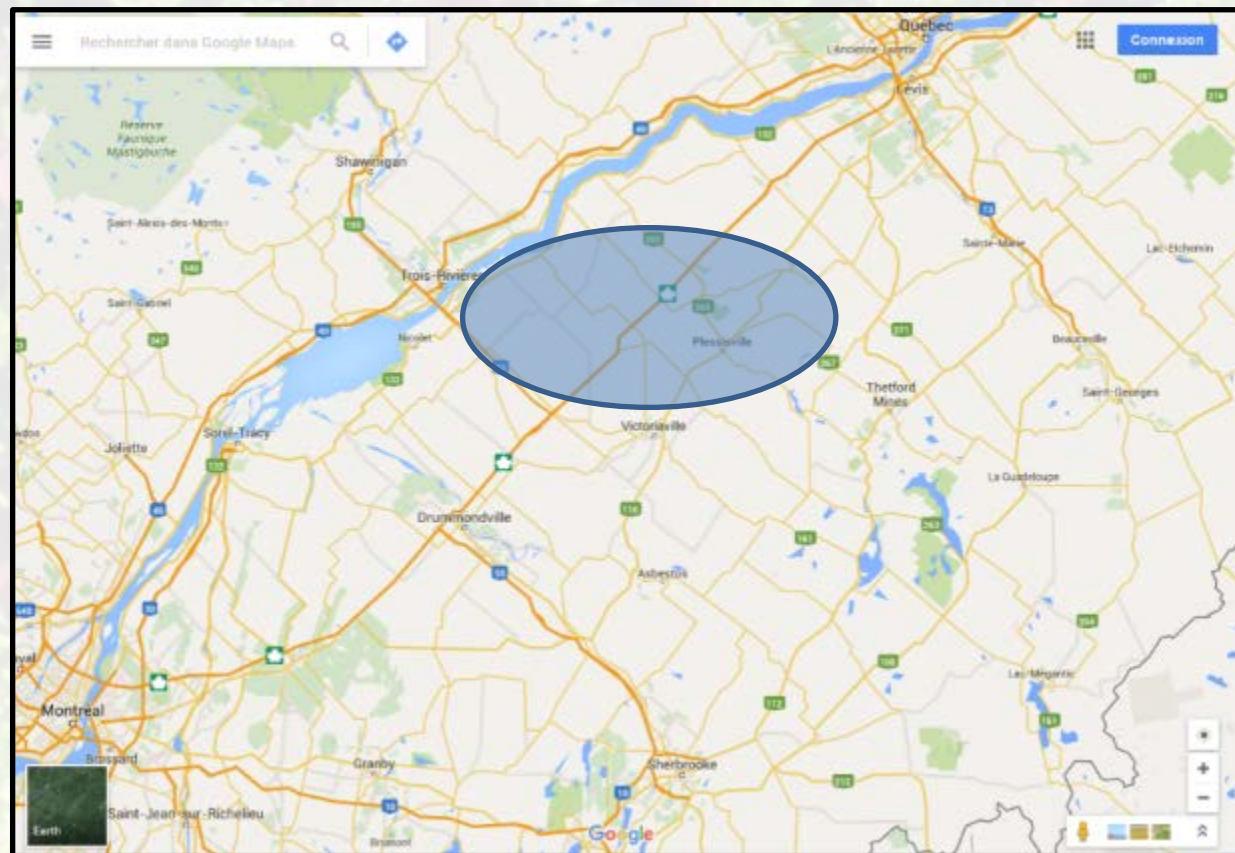


■ En champs
■ Post-récolte



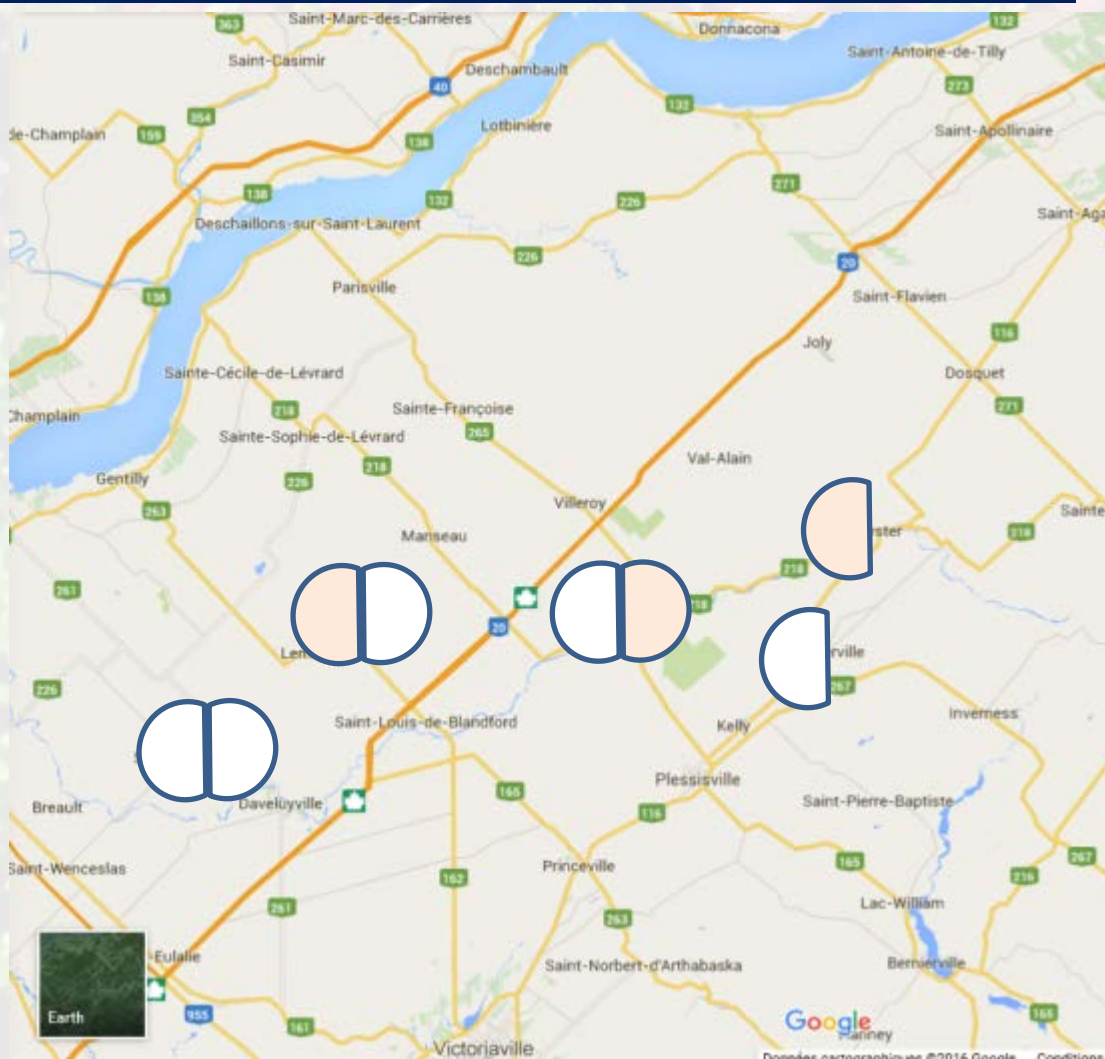
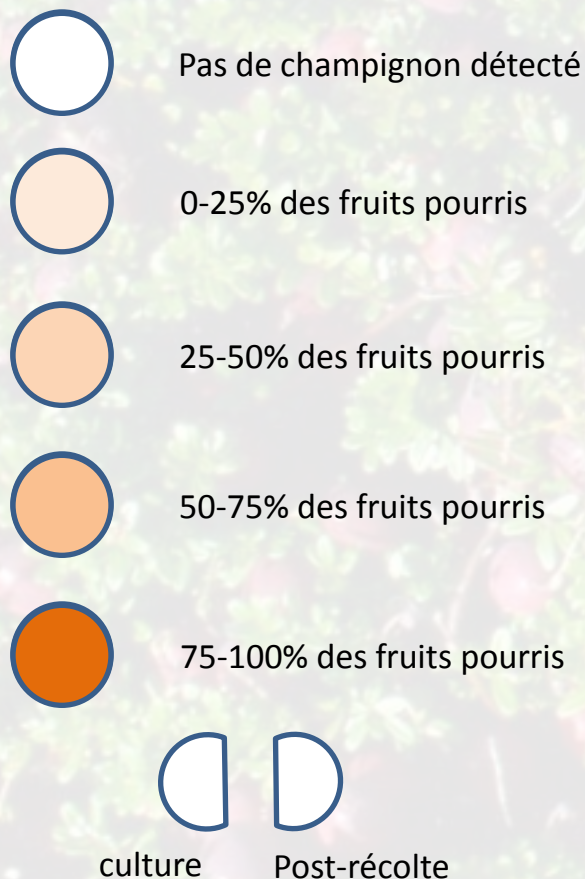
4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

Centre du Québec




4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)


Phyllosticta vaccinii





4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)


Allantophomopsis Lycopodina

 Pas de champignon détecté

 0-25% des fruits pourris

 25-50% des fruits pourris

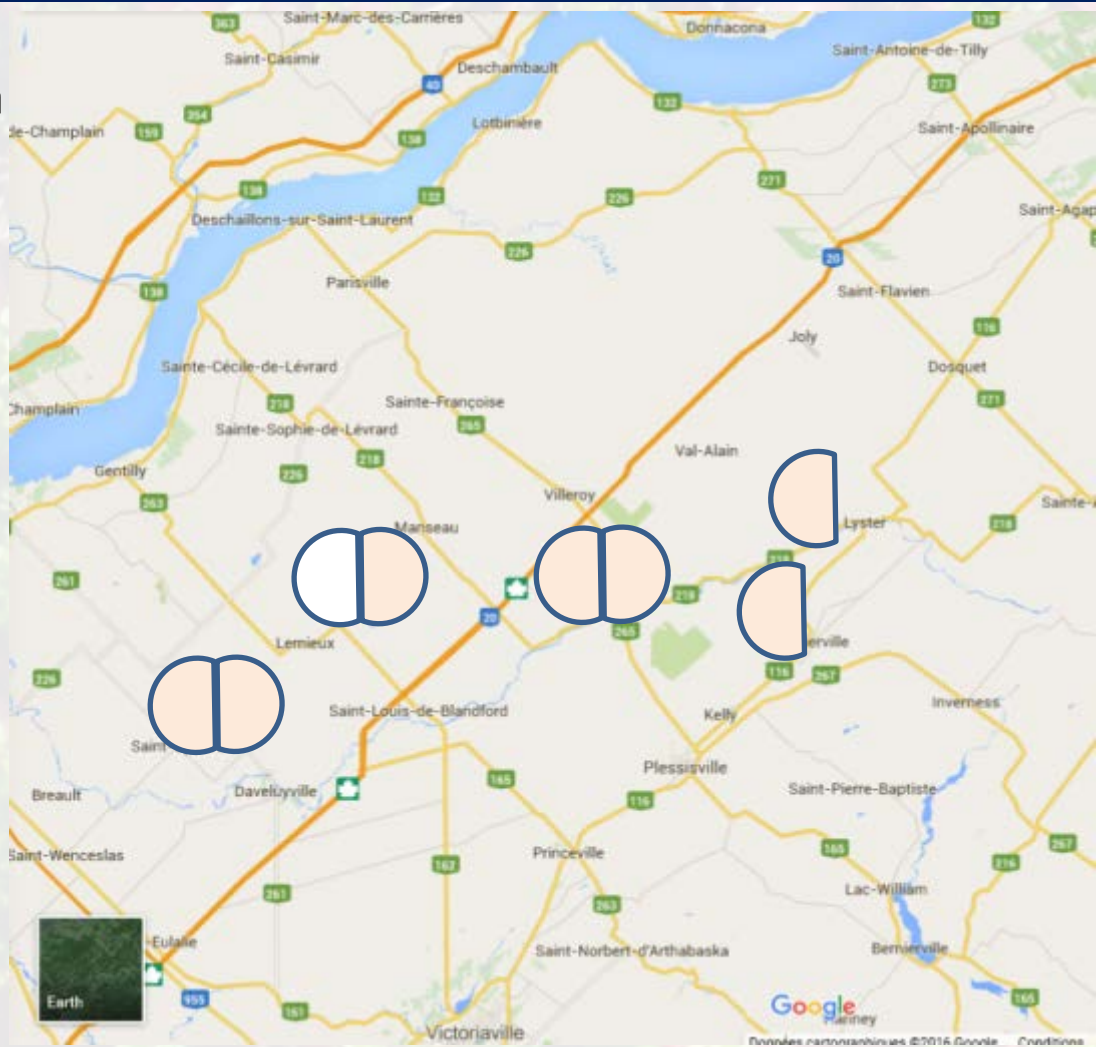
 50-75% des fruits pourris

 75-100% des fruits pourris


culture


Post-récolte





4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)


Colletotrichum acutatum

 Pas de champignon détecté

 0-25% des fruits pourris

 25-50% des fruits pourris

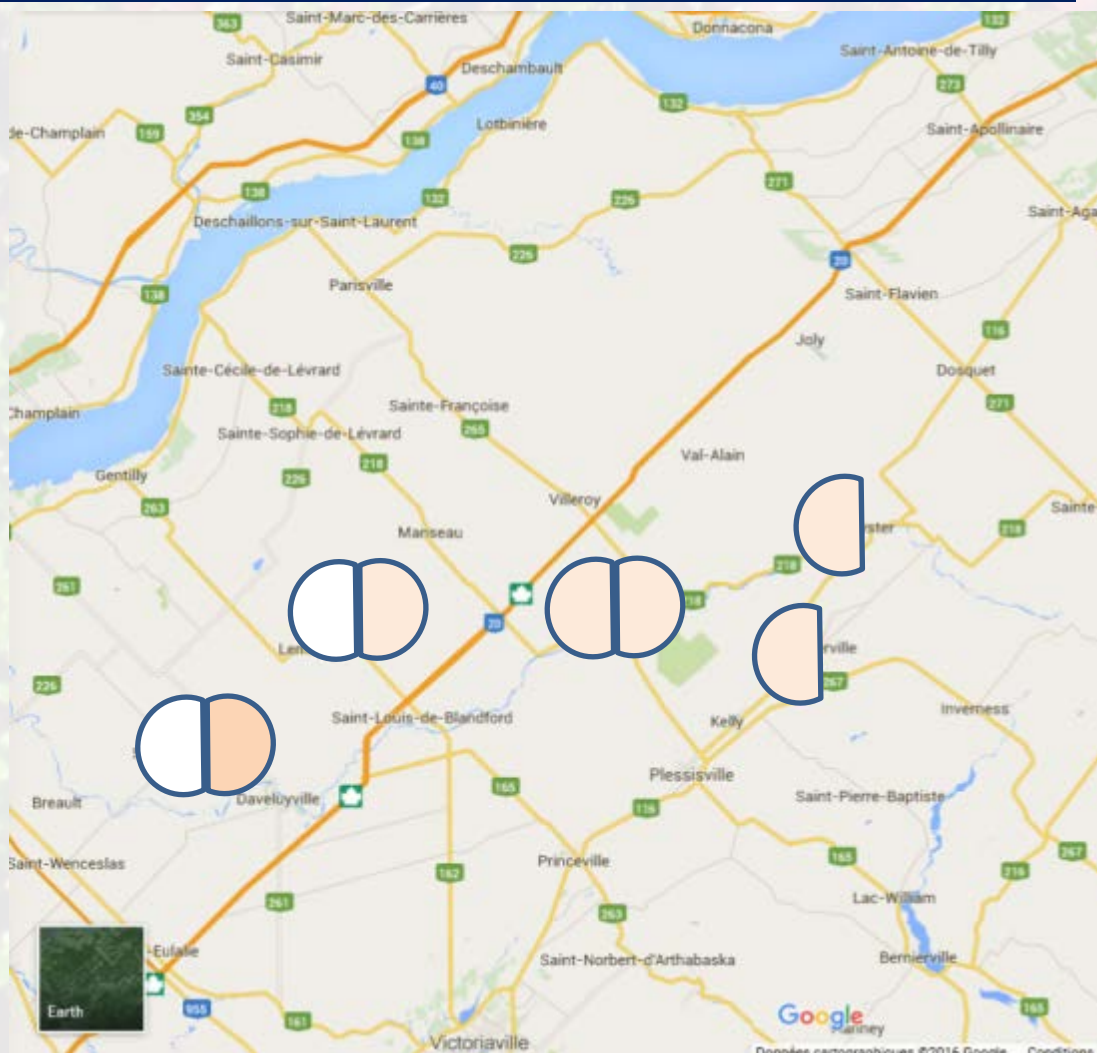
 50-75% des fruits pourris

 75-100% des fruits pourris




culture


Post-récolte





4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)


Godronia cassandrae

 Pas de champignon détecté

 0-25% des fruits pourris

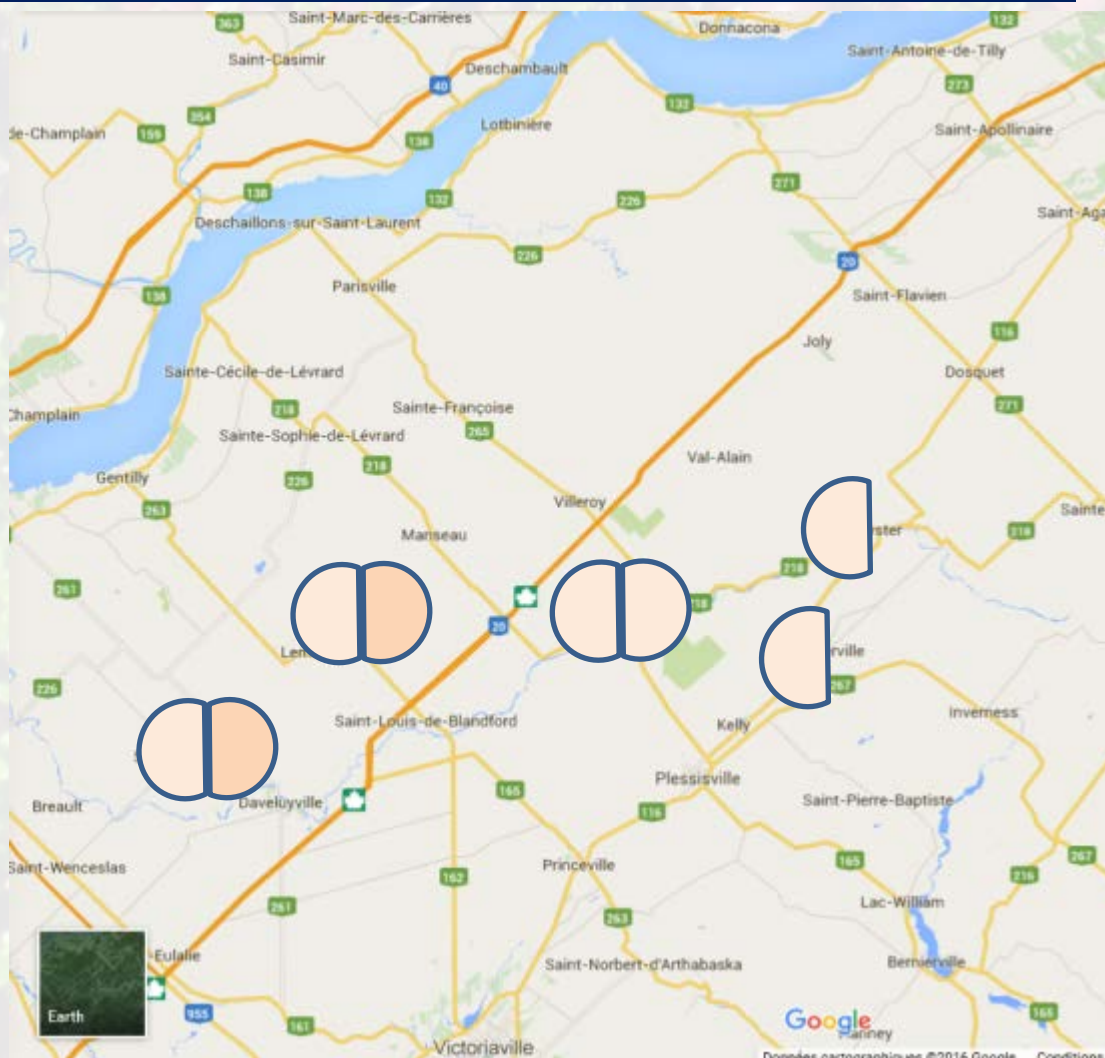
 25-50% des fruits pourris

 50-75% des fruits pourris

 75-100% des fruits pourris


 culture


 Post-récolte





4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)


Physalospora vaccinii

 Pas de champignon détecté

 0-25% des fruits pourris

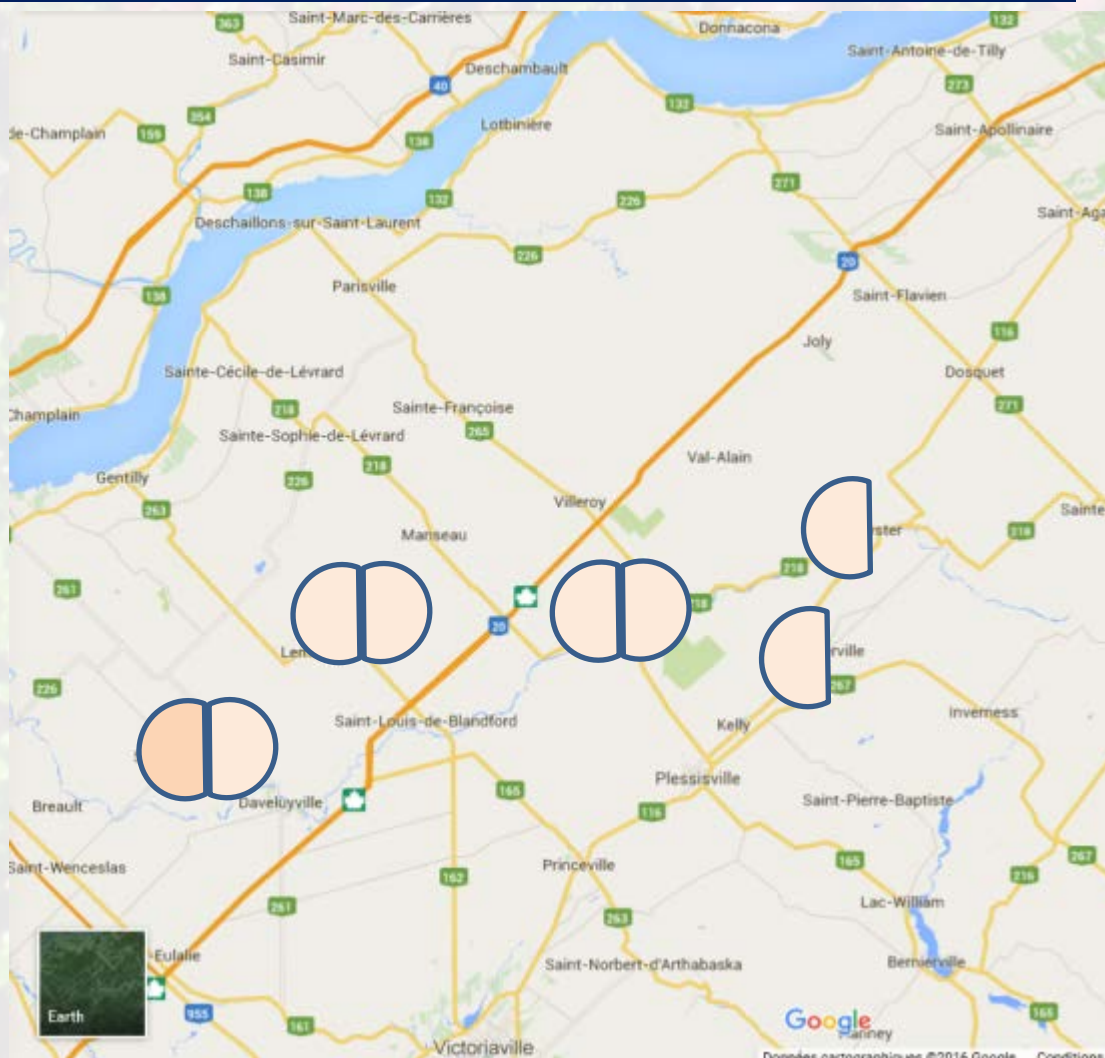
 25-50% des fruits pourris

 50-75% des fruits pourris

 75-100% des fruits pourris

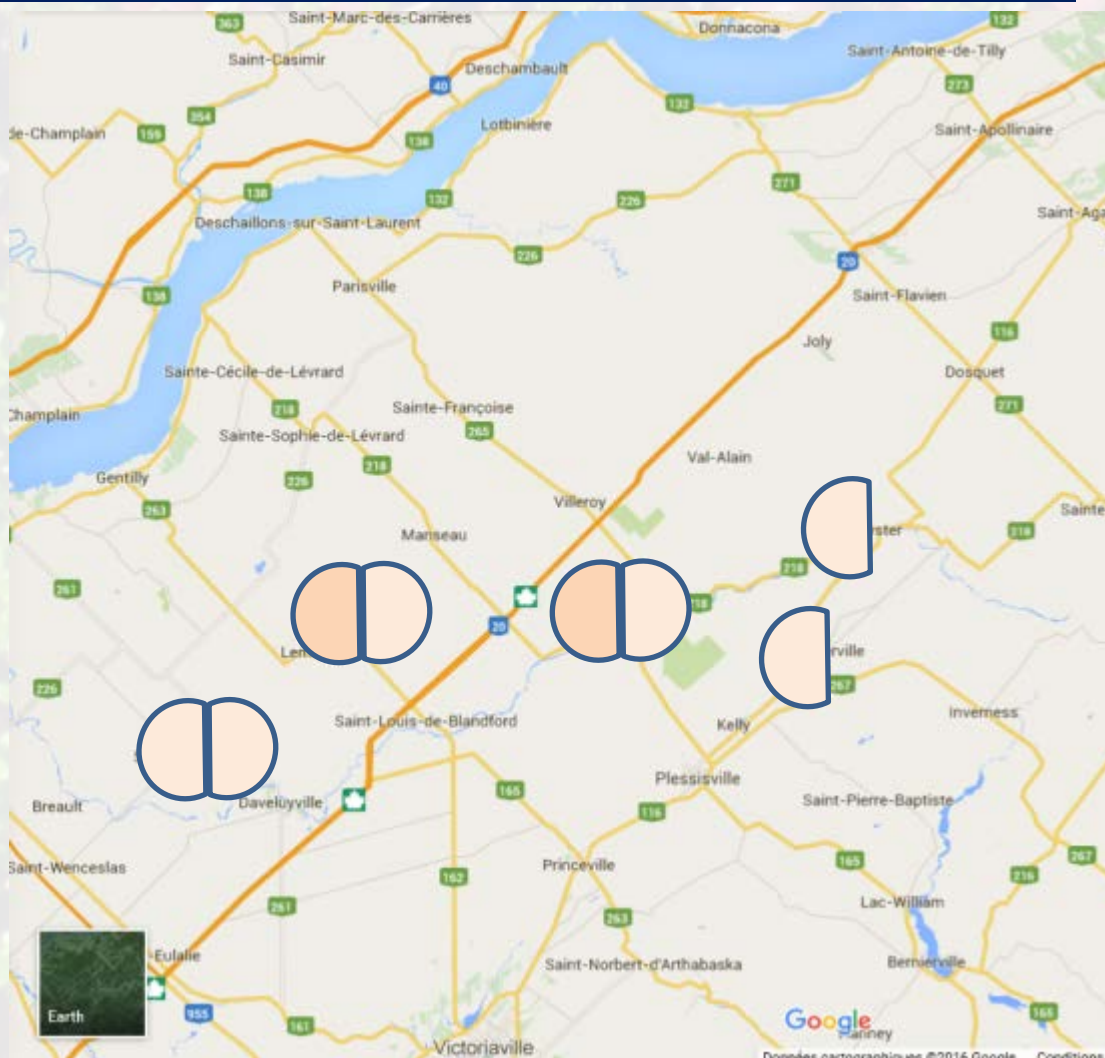
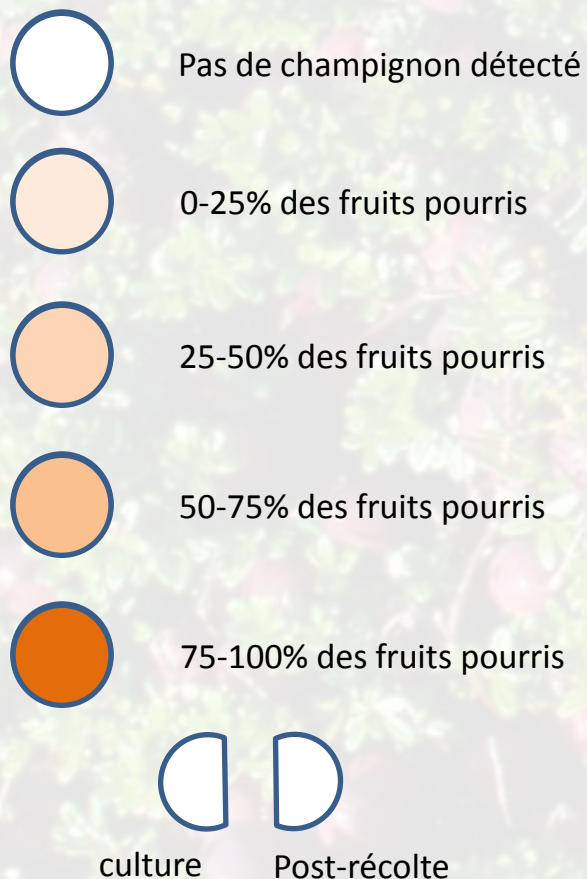
 culture

 Post-récolte



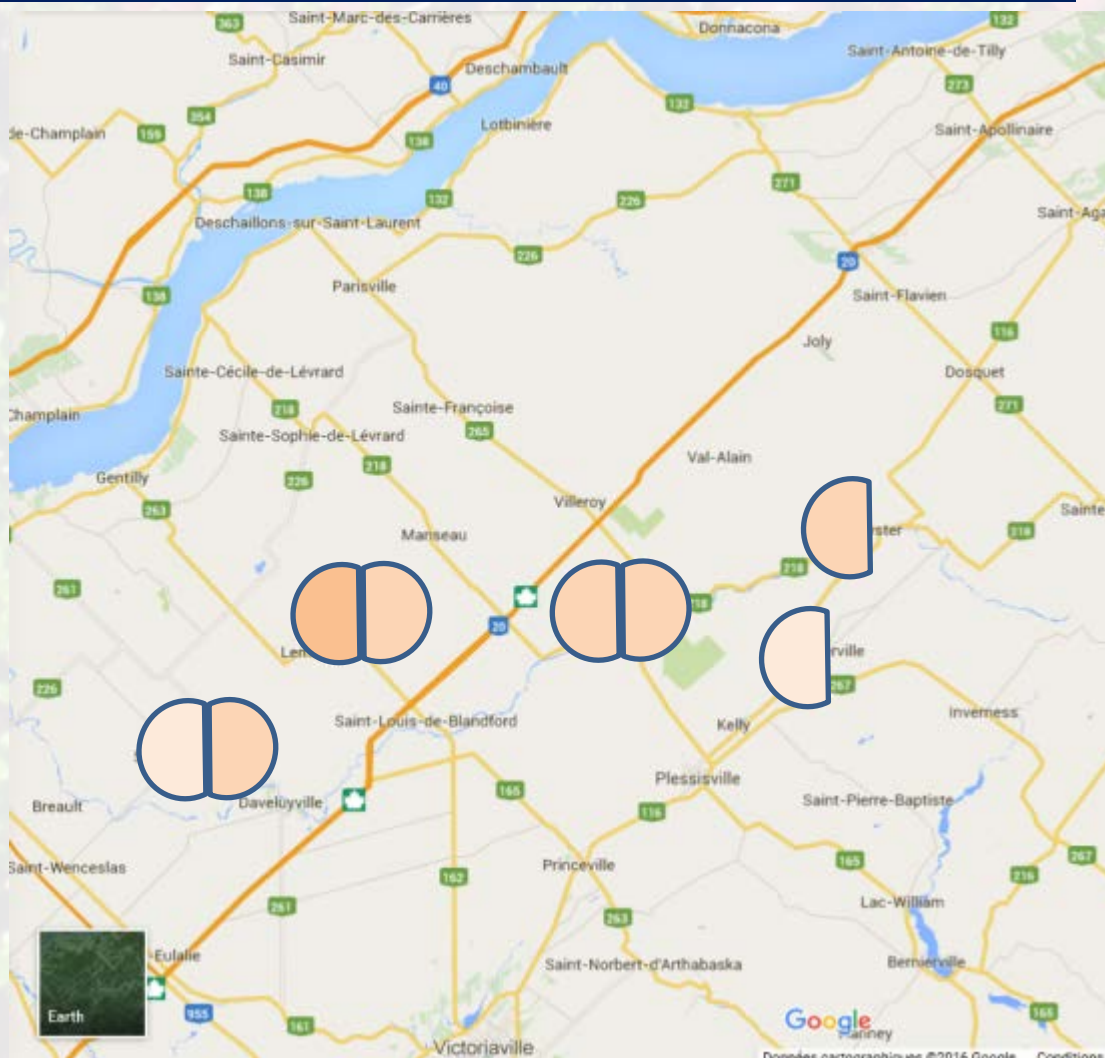
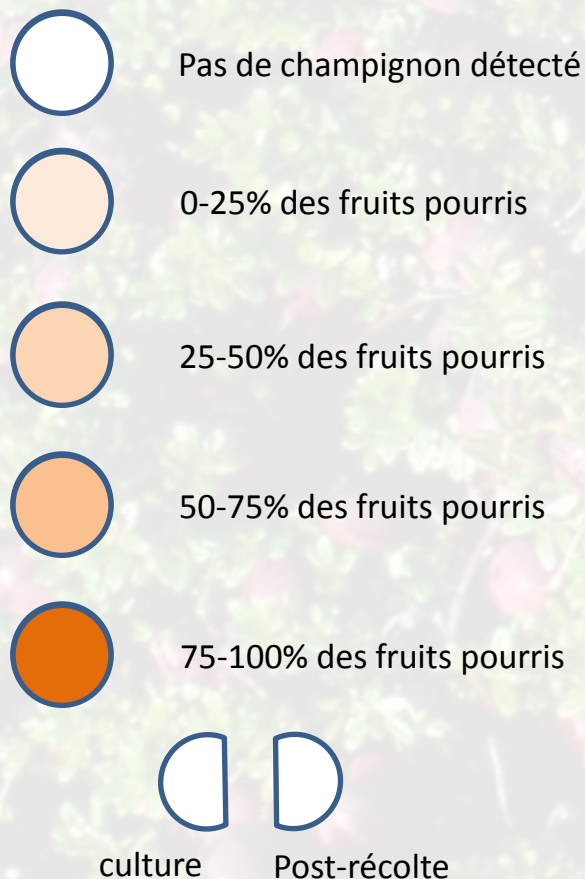
4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

Botryosphaeria vaccinii



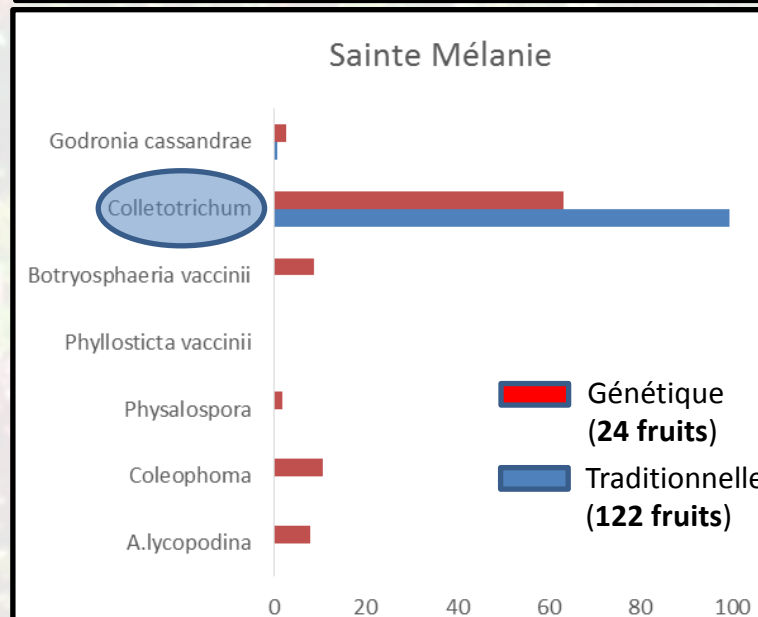
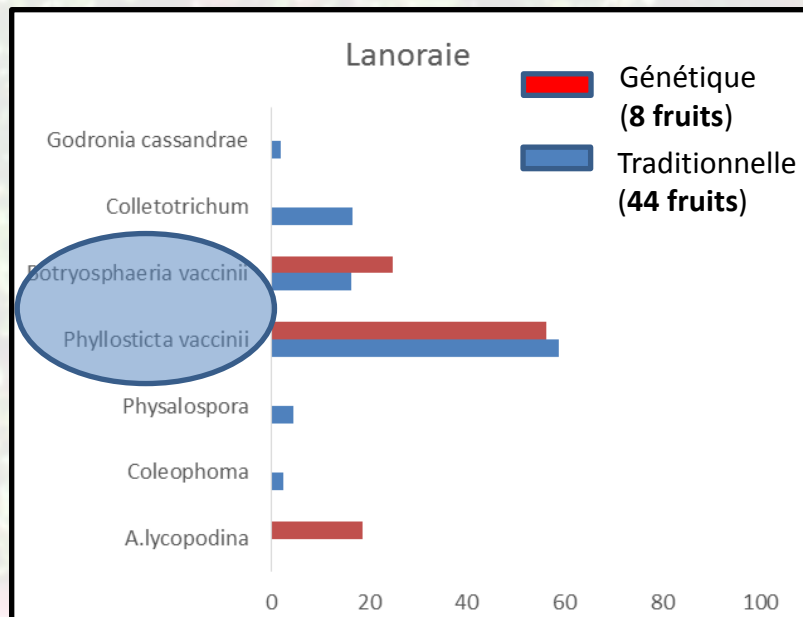
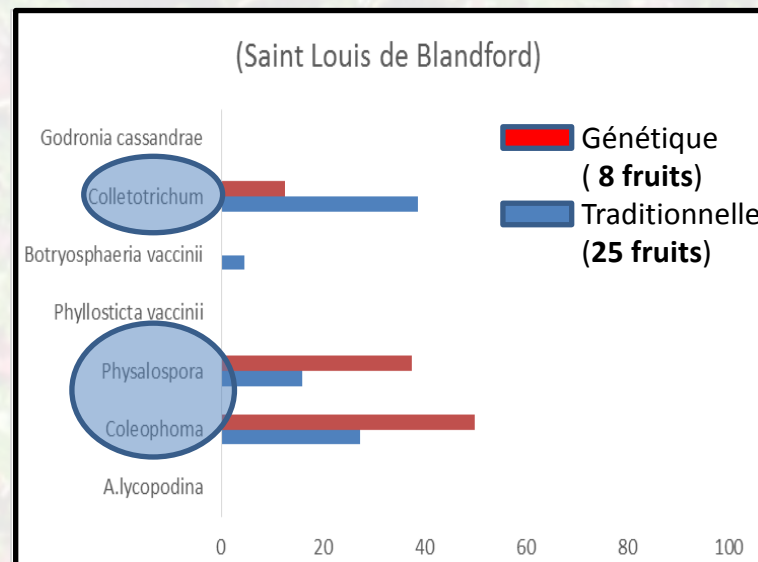
4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

Colleophoma empetri



5- Comparaison méthode génétique et traditionnelle

Les fruits pourris de 15 champs ont été analysés par la méthode traditionnelle et comparés à la méthode génétique



Avantages / limites de la méthode génétique versus la méthode traditionnelle

Avantages de la détection génétique

- Identification plus rapide (1sem / ± 1 mois)
- Coût d'identification plus bas (nécessité de moins de matériel)
- Sensibilité plus accrue

Limites de la détection génétique

- Test limité à l'identification de 7 champignons
- Identification qualitative et non quantitative de champignons / fruit
- Impossibilité de discriminer champignon vivant ou mort



Bilan de la méthode

- Méthode robuste permettant l'identification des principaux champignons responsables de la P.F.C
- Méthode rapide : Aide à la prise décisionnel des producteurs de canneberge (lutte intégrée, usage plus raisonné des fongicides)
- Nécessité d'optimiser le Test PCR dans le but d'inclure d'autres champignons pathogènes

Perspectives

- Intérêt de la méthode pour les organismes de détection des pathogènes (ex : MAPAQ)
- Vers un séquençage au débit de l'ensemble des champignons pathogènes du fruit de canneberge (NSG..)



Remerciements



Pf Richard Bélanger



Dr Peter Oudemans



Jean-Pierre Deland



Dr Rodney Serres



Where are the pathogens hiding?

wind → *Phyllosticta elongata*
 → *Colletotrichum acutatum*

