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

UNIVERSITÉ LAVAL

Ocean Spray

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

Introduction

- **La pourriture du fruit de canneberge (P.F.C)**

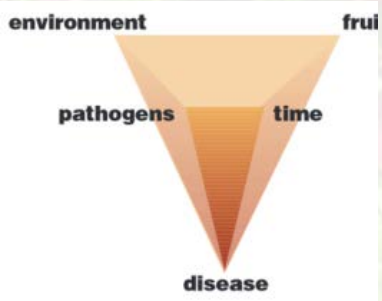
  - **Apparition** : lors de la culture et de l'entreposage

  - **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

Figure 5. Sunscald in late August.

Figure 6. Berries damaged by hail.

- 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**

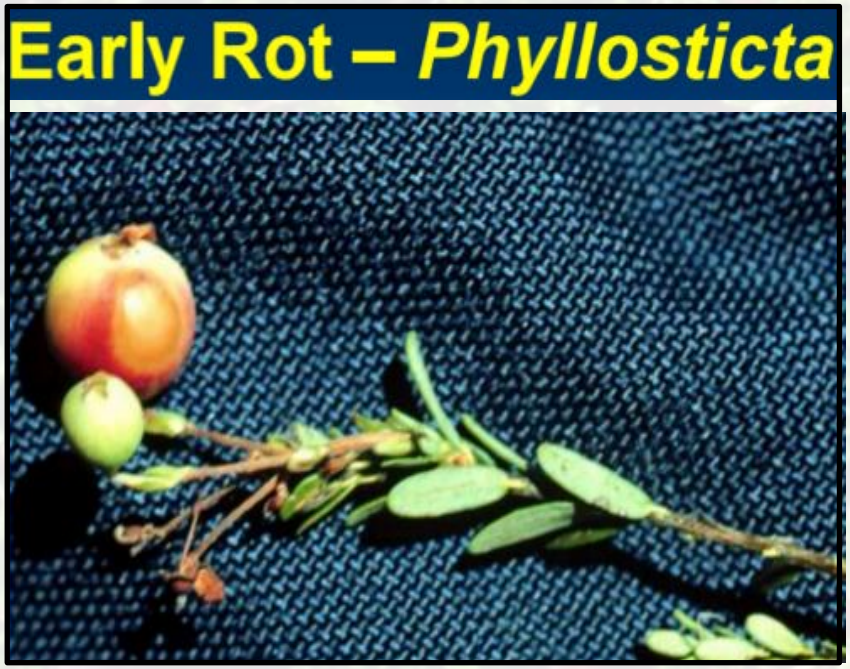
*Allantophomopsis***	*Penicillium*
Botryosphaeria	*Pestalotia*
Botrytis	*Phomopsis***
*Coleophoma***	*Phyllosticta***
Colletotrichum	*Physalospora***
*Fusicoccum***	*Synchronoblastia*

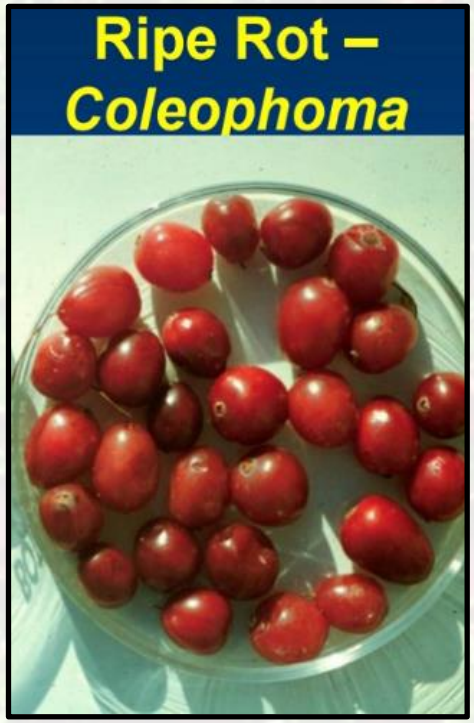
- Classification : stade du développement du fruit; couleur de la pourriture; autres..

Introduction

- Classification : stade du développement du fruit

Disease	Fungus	Field rot	Storage rot
Early rot	Phylosticta vaccinii	x	
Ripe Rot	Coleophoma empetri	x	x





Introduction

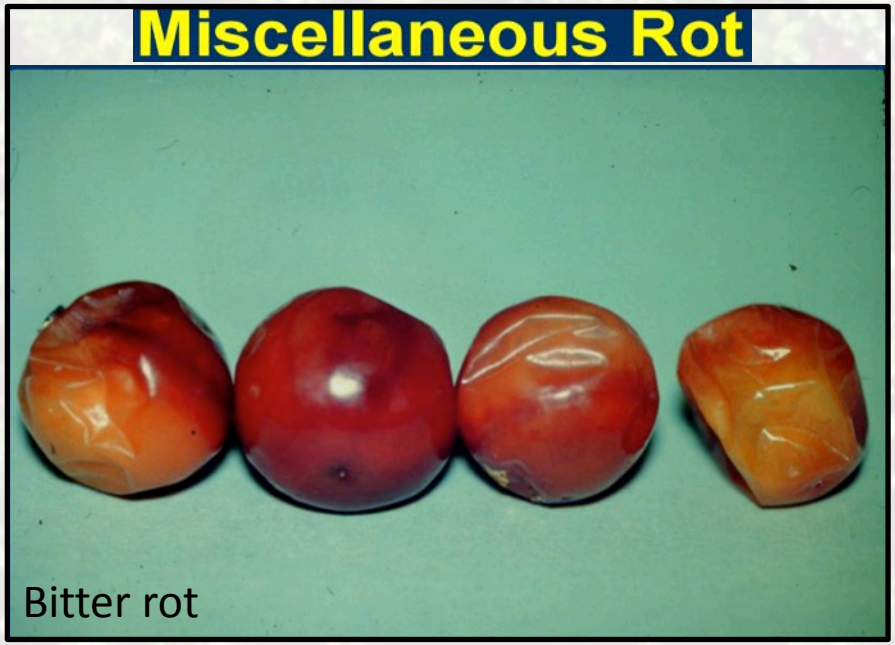
- Classification : couleur du fruit

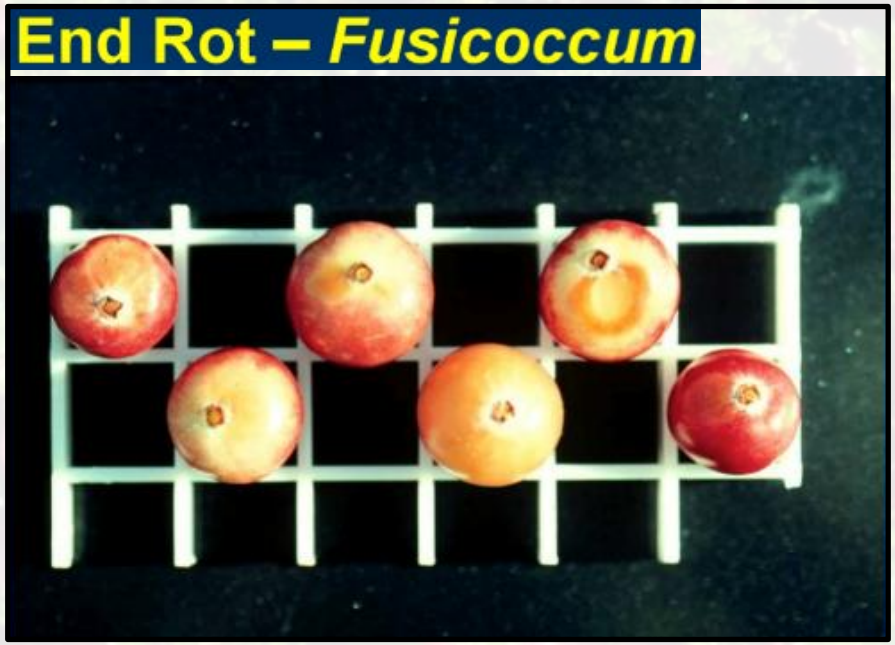
Disease	Fungus	Field rot	Storage rot
Berry Speckle	Botryosphaeria vaccinii	x	x
Blotch Rot	Physalospora vaccinii	x	x
Black Rot	Allantophomopsis Lycopodina		x

Introduction

- Classification : autres

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





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

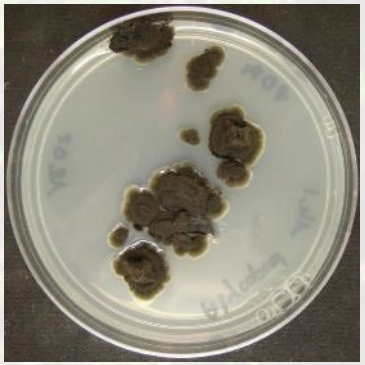
Problématique

- 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 boite 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

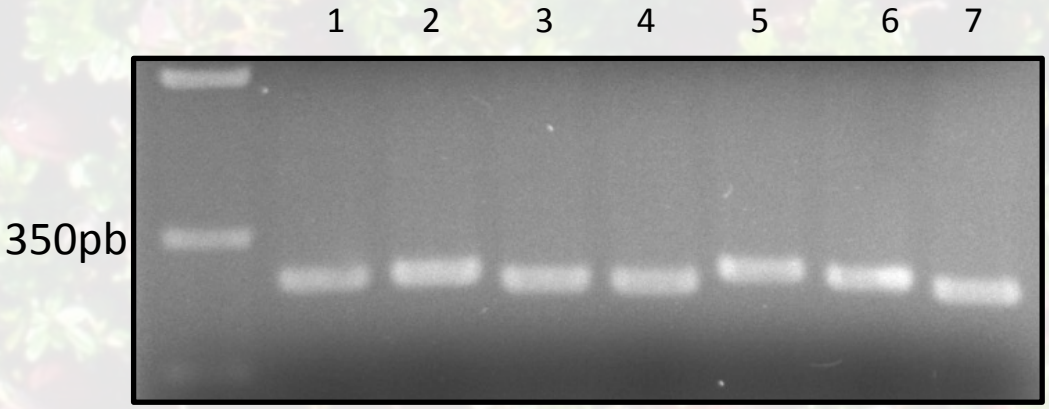
- Objectifs principaux

  - 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

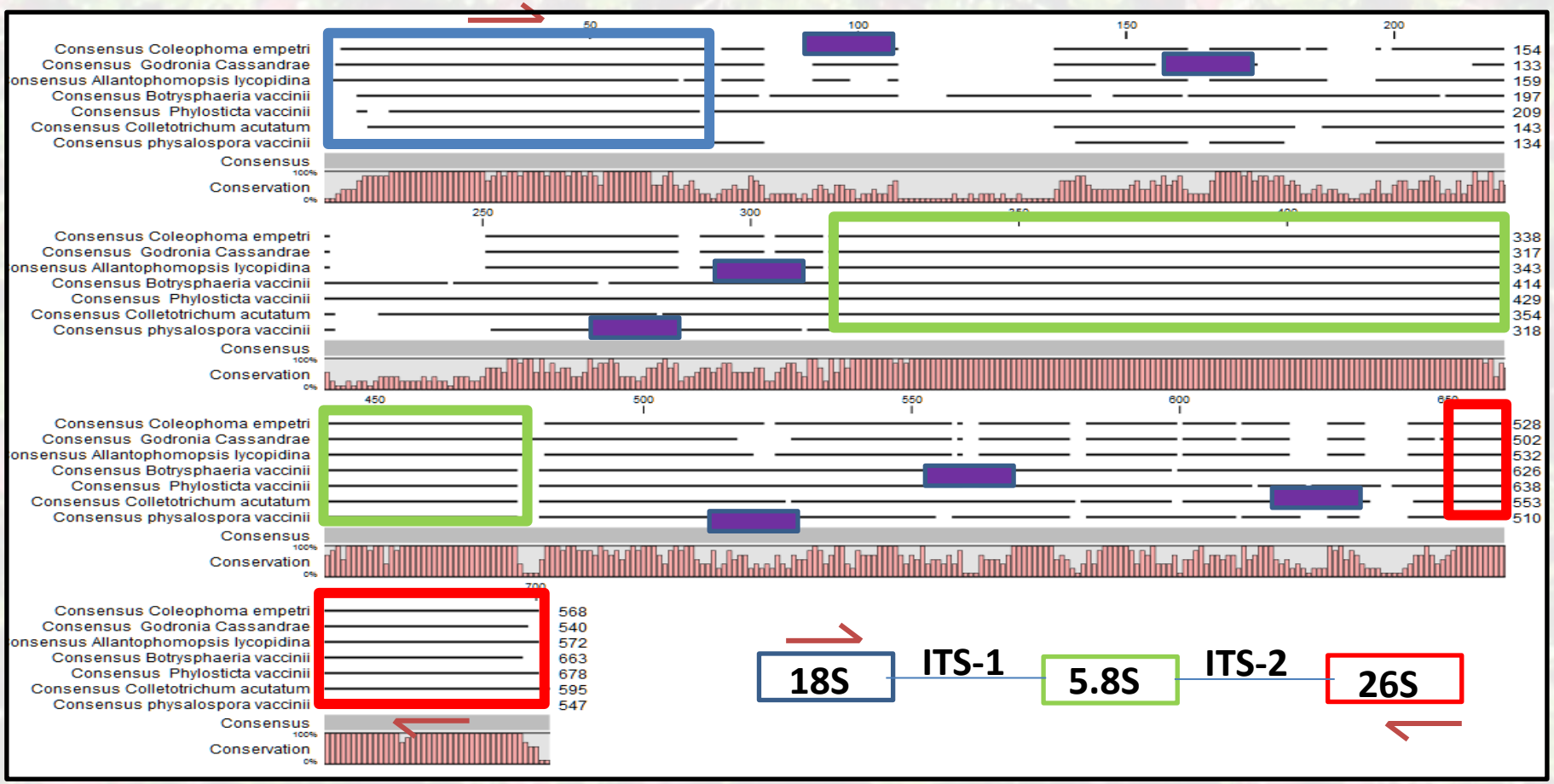
- Amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique consensus des 7 champignons à l'aide d'amorces universelles



1- Phyllosticta vaccinii
2- Botryosphaeria vaccinii
3- Physalospora vaccinii
4- Godrionia cassandrae
5- Coleophoma empetri
6- Allantophomopsis lycopodina
7- Colletotrichum acutatum

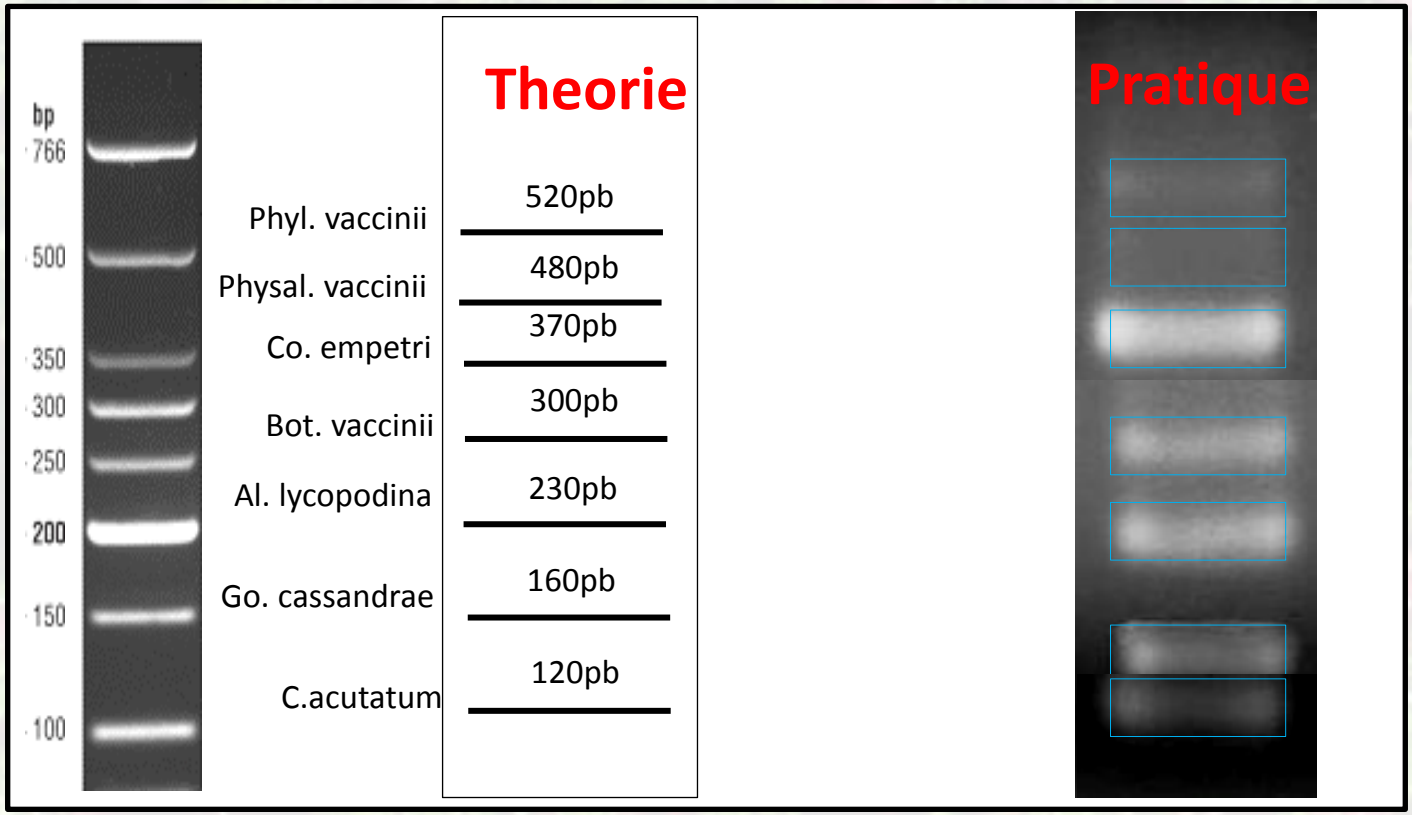
1-Mise en place du Test multiplex PCR

- 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

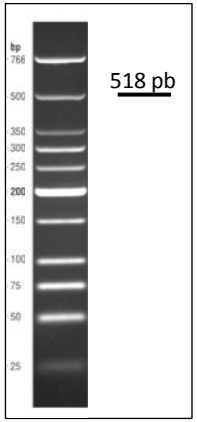
1- Phyllosticta vaccinii
2- Botryosphaeria vaccinii

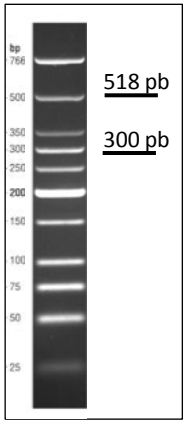
1- Phyllosticta vaccinii
2- Botryosphaeria vaccinii
3- Physalospora vaccinii

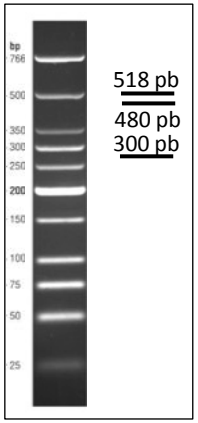
1- Phyllosticta vaccinii
2- Botryosphaeria vaccinii
3- Physalospora vaccinii
4- Godrionia cassandrae

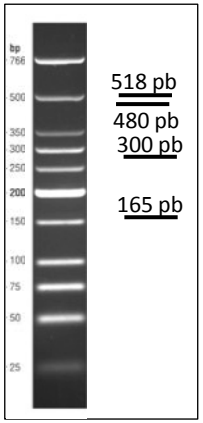
Theorie

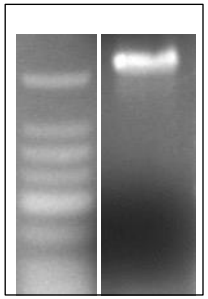
Pratique

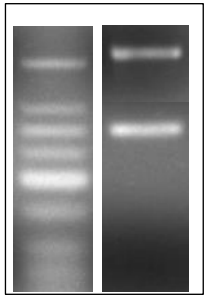


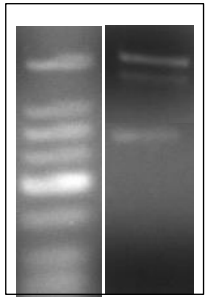


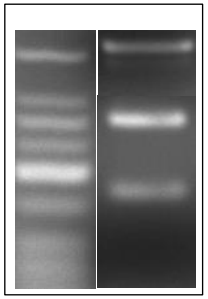








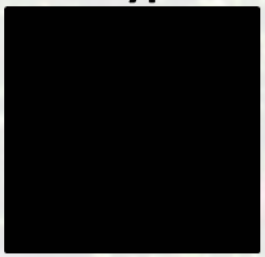


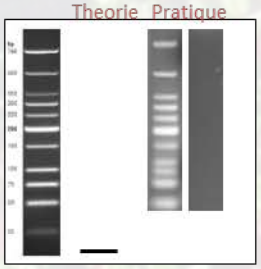


2-Efficacité du test multiplex-PCR

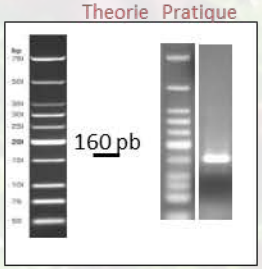
Spécificité génétique du champignon pathogène identifié ?

Wild type

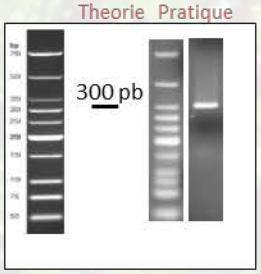




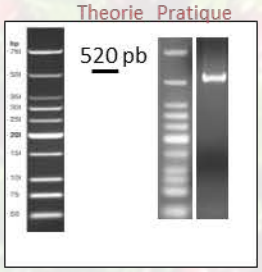
Godronia cassandrae



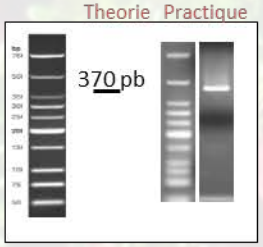
Botryosphaeria vaccinii



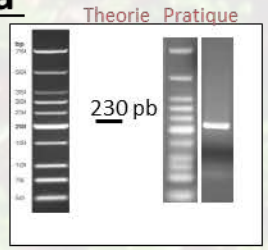
Phyllosticta vaccinii



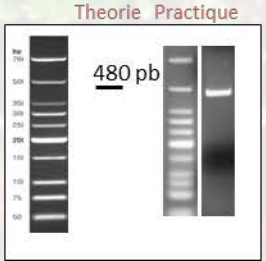
Coleophoma empetri



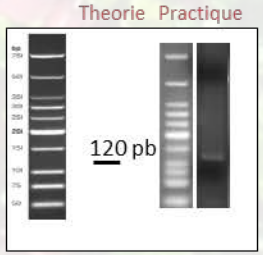
Allantophomopsis lycopodina



Physalospora vaccinii

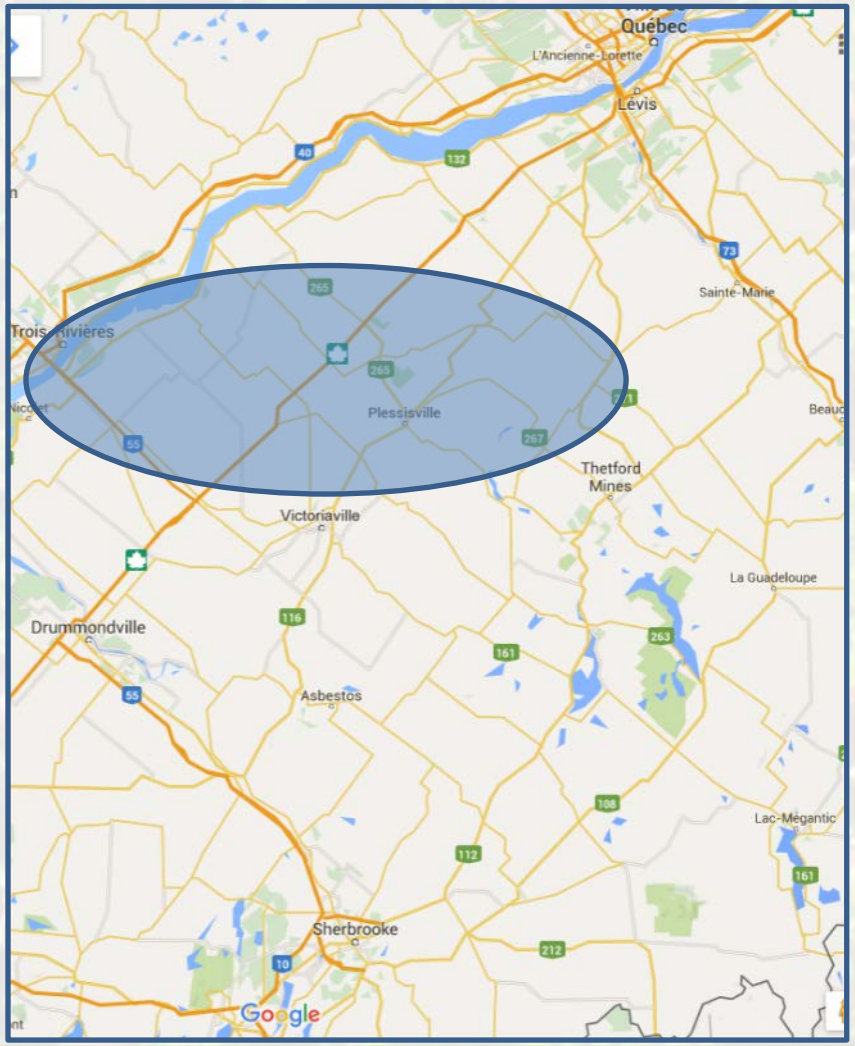


Colletotrichum acutatum

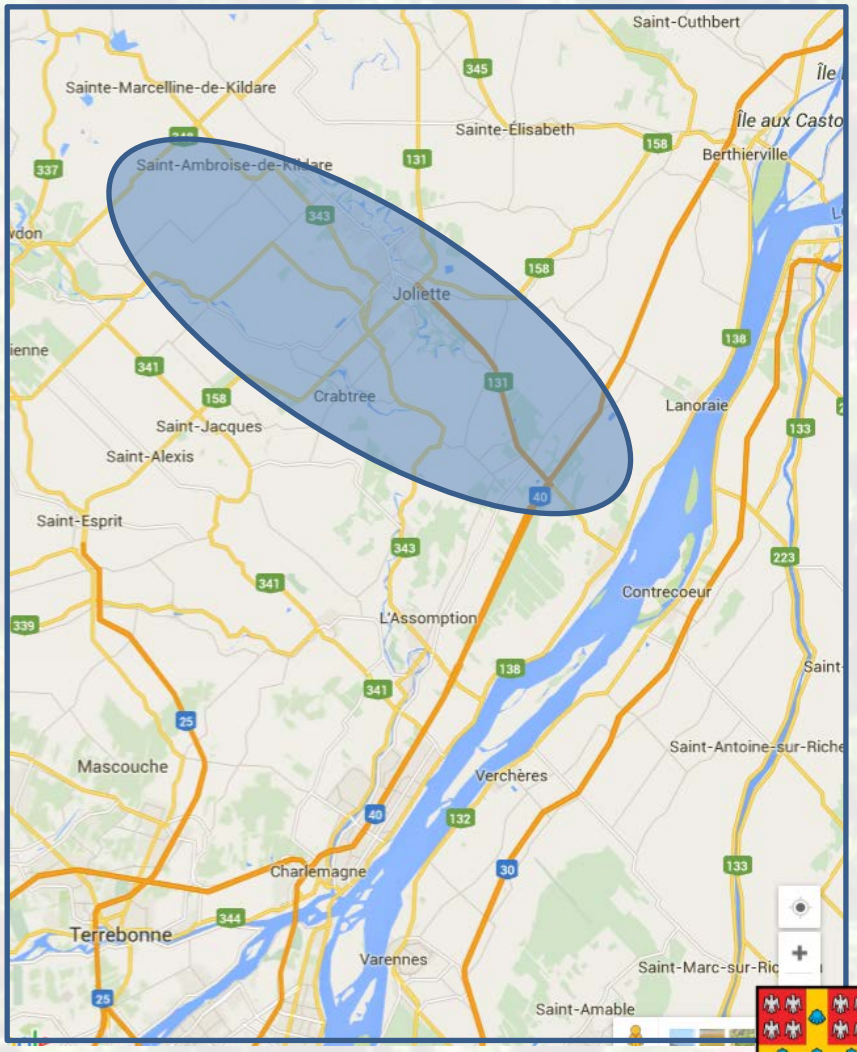


3- Fréquence des champignons responsables de la P.F.C sur des fruits pourris en champs et post-récolte (2015)

Région centre du Québec

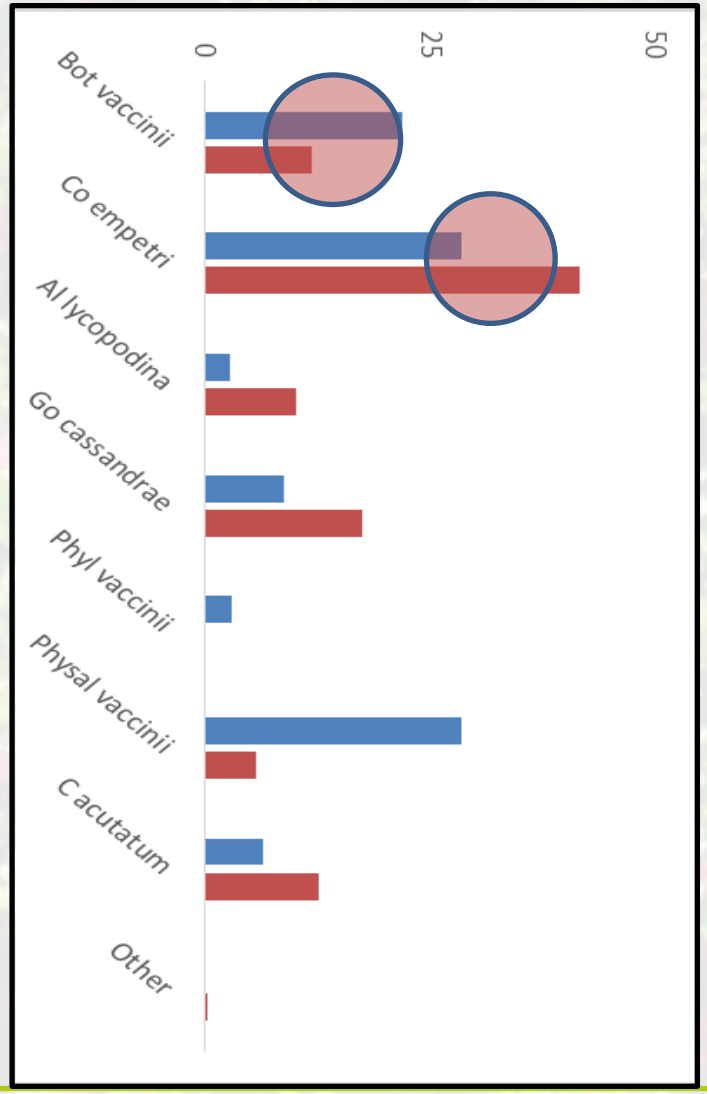


Région Lanaudière

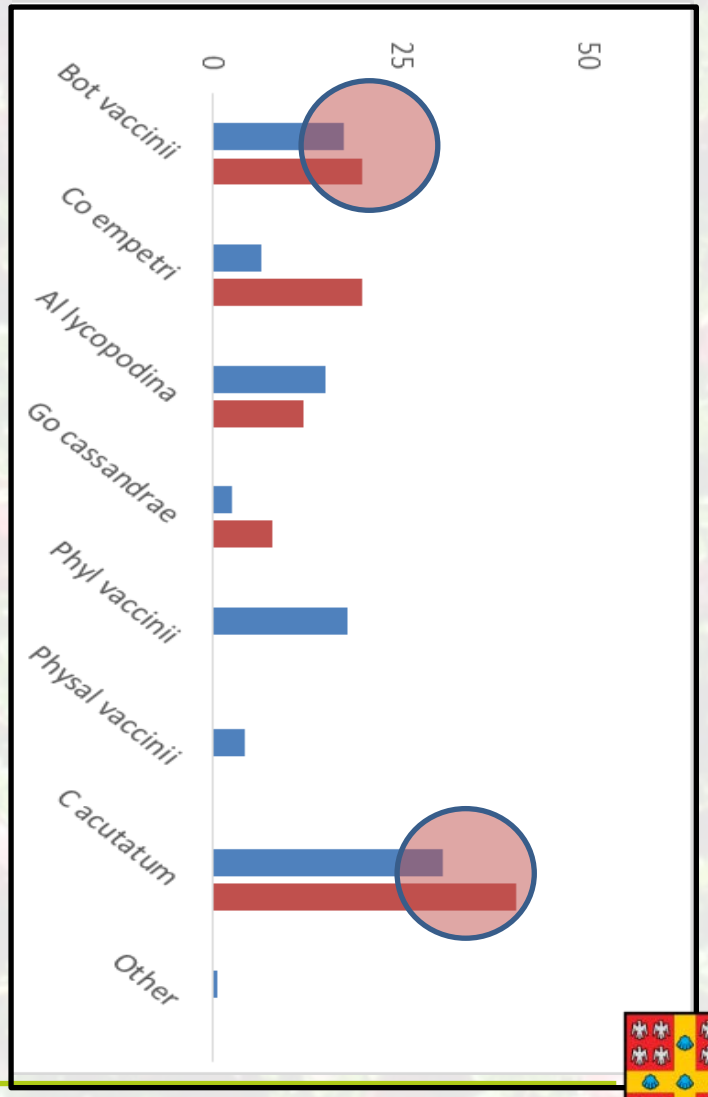


3- Fréquence des champignons responsables de la P.F.C sur des fruits pourris en champs et post-récolte (2015)

Région centre du Québec



Région Lanaudière

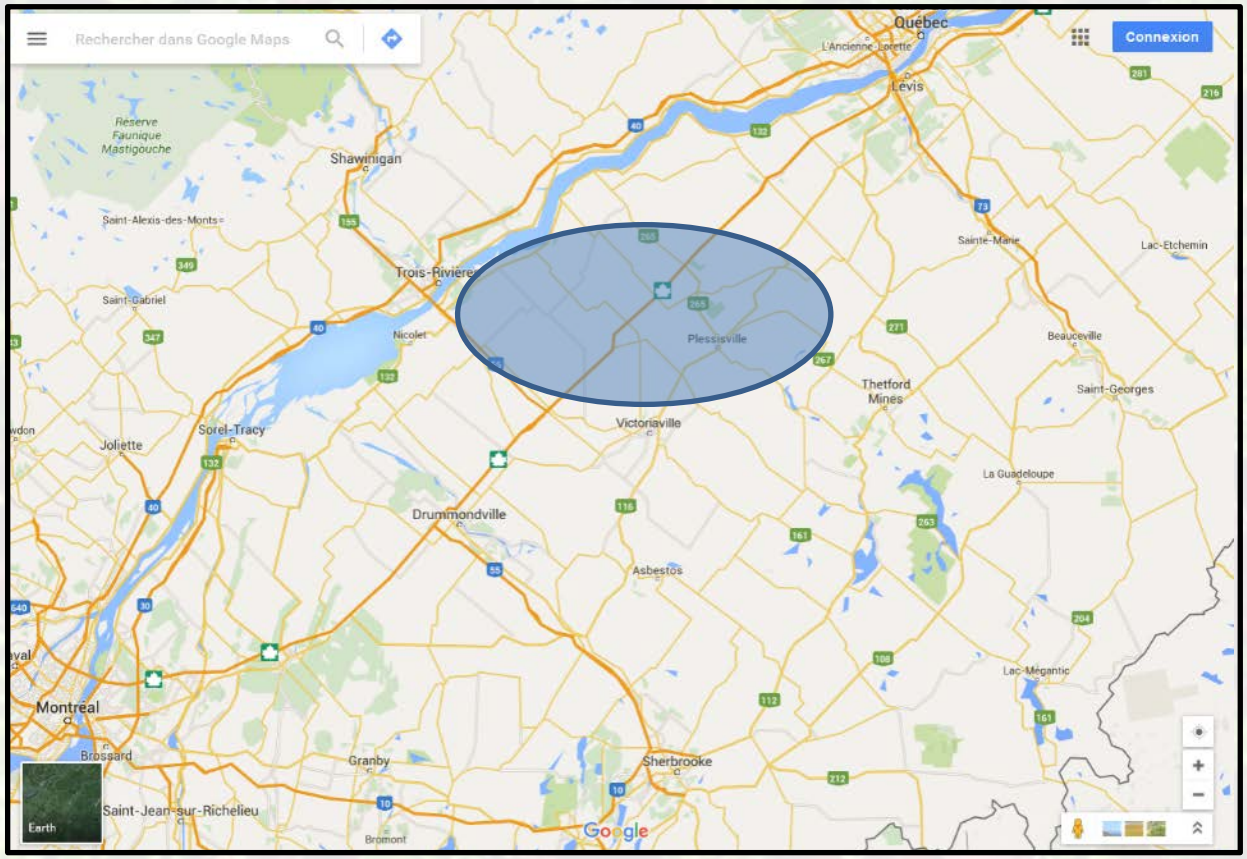


En champs

Post-récolte

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

Centre du Québec

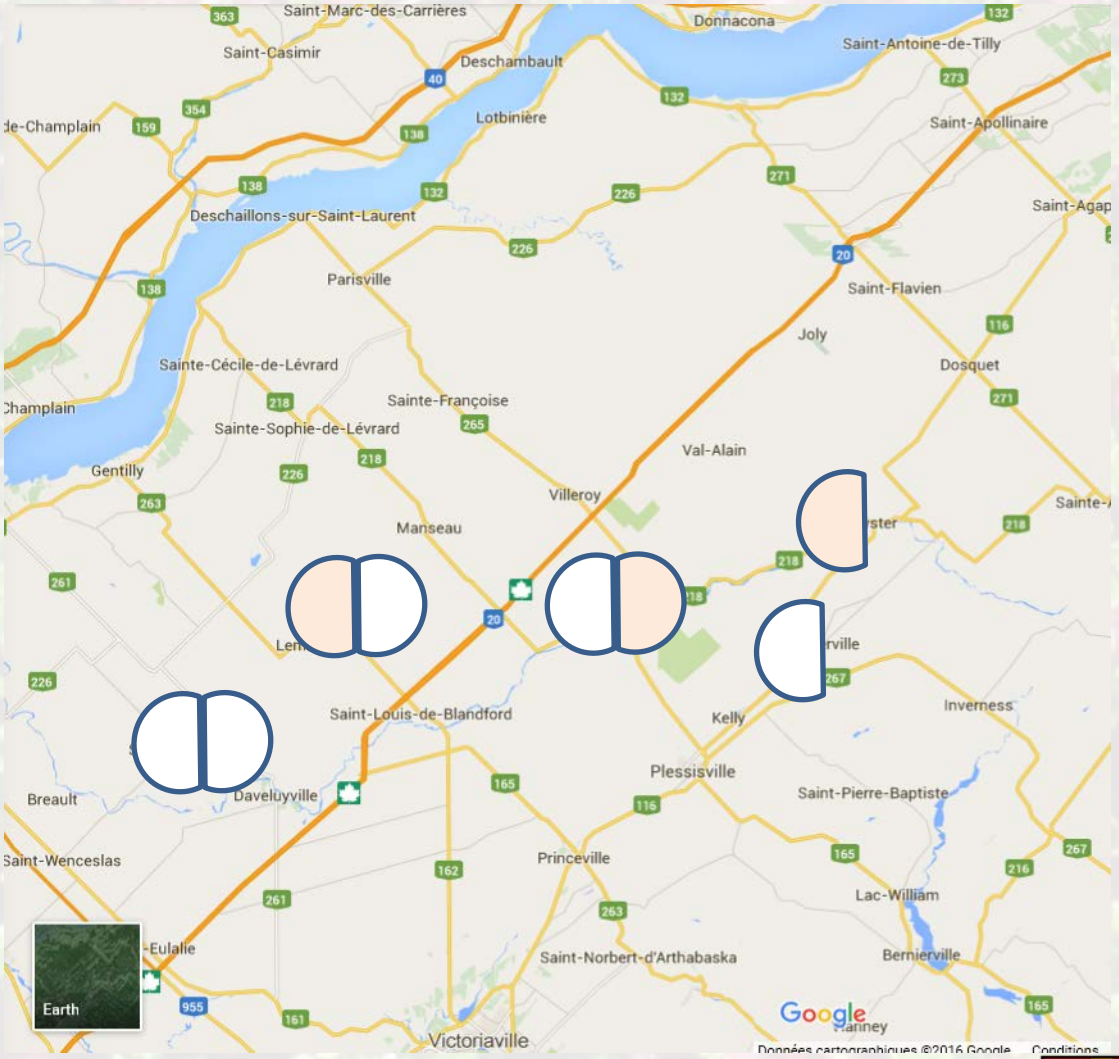


4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

Phyllosticta vaccinii

- 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)

Allantophomopsis Lycopodina

Pas de champignon détecté

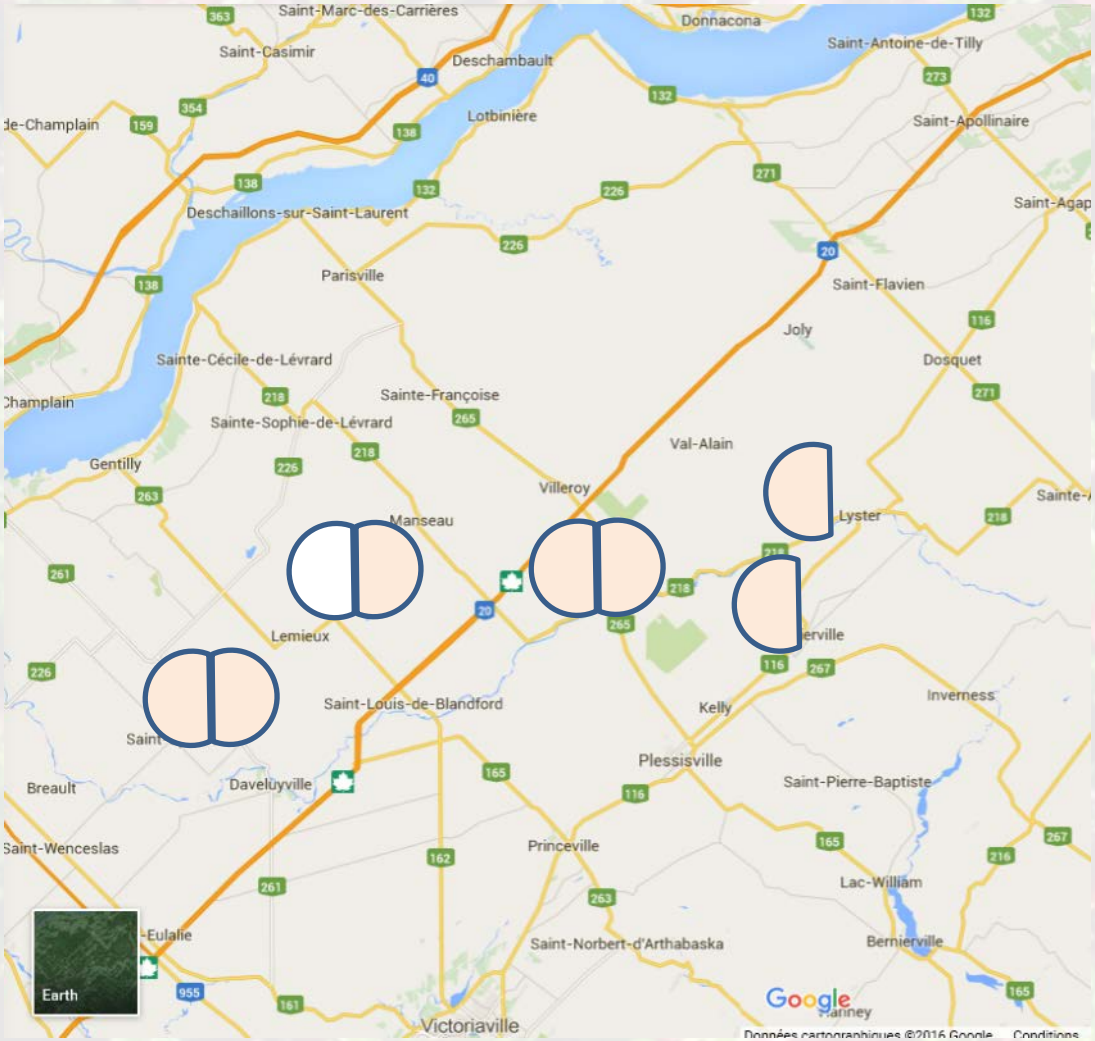
0-25% des fruits pourris

25-50% des fruits pourris

50-75% des fruits pourris

75-100% des fruits pourris

culture Post-récolte

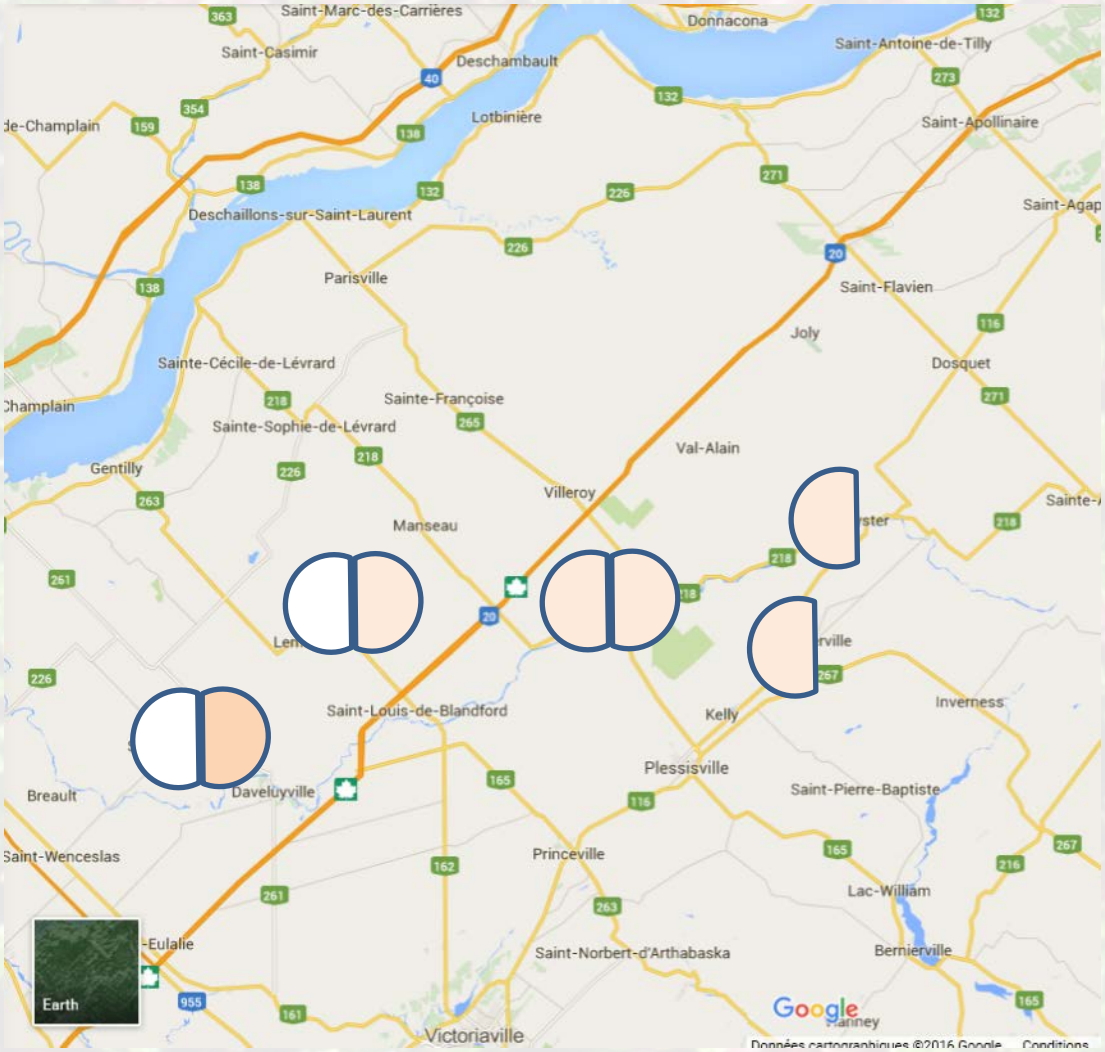


4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

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

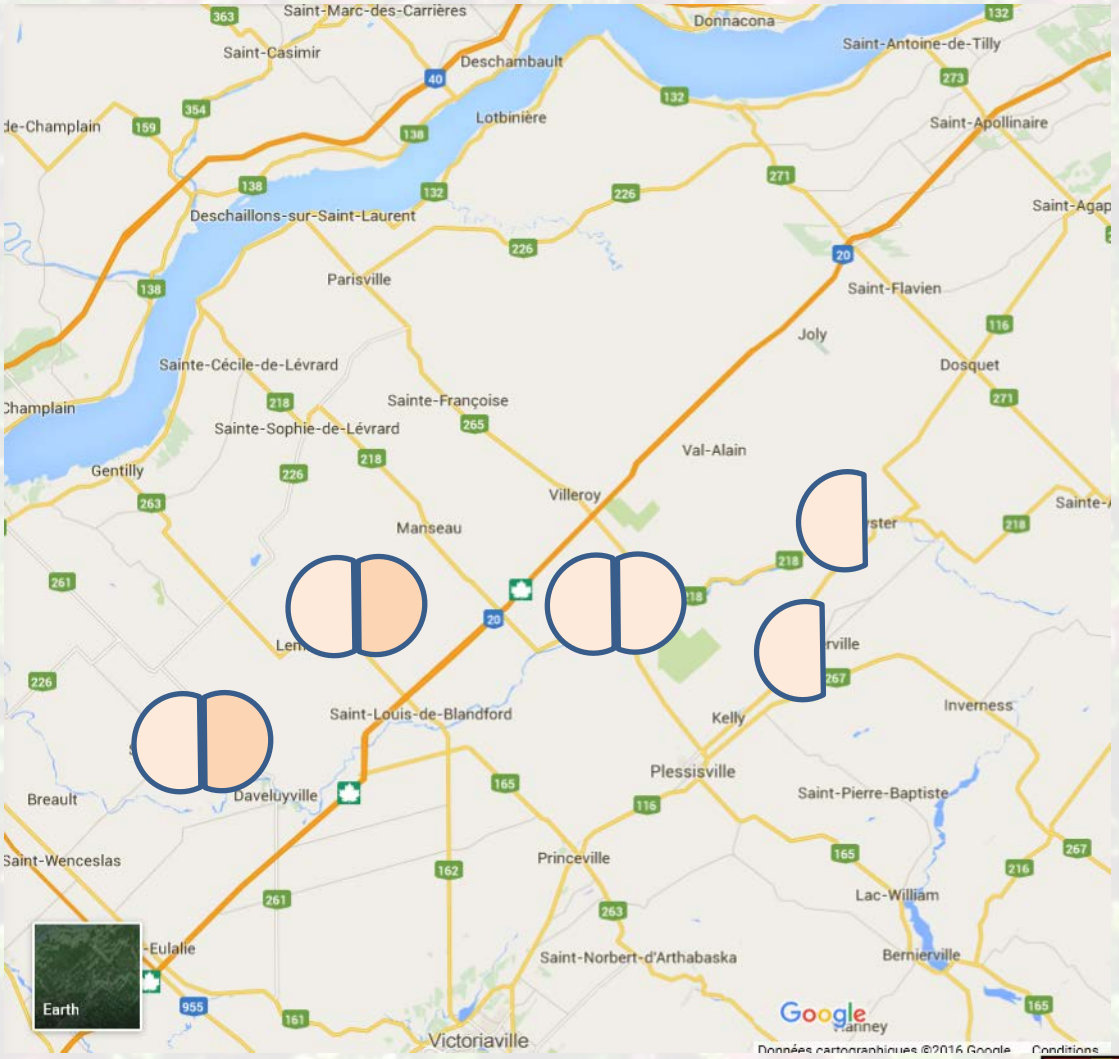
0-25% des fruits pourris

25-50% des fruits pourris

50-75% des fruits pourris

75-100% des fruits pourris

culture Post-récolte

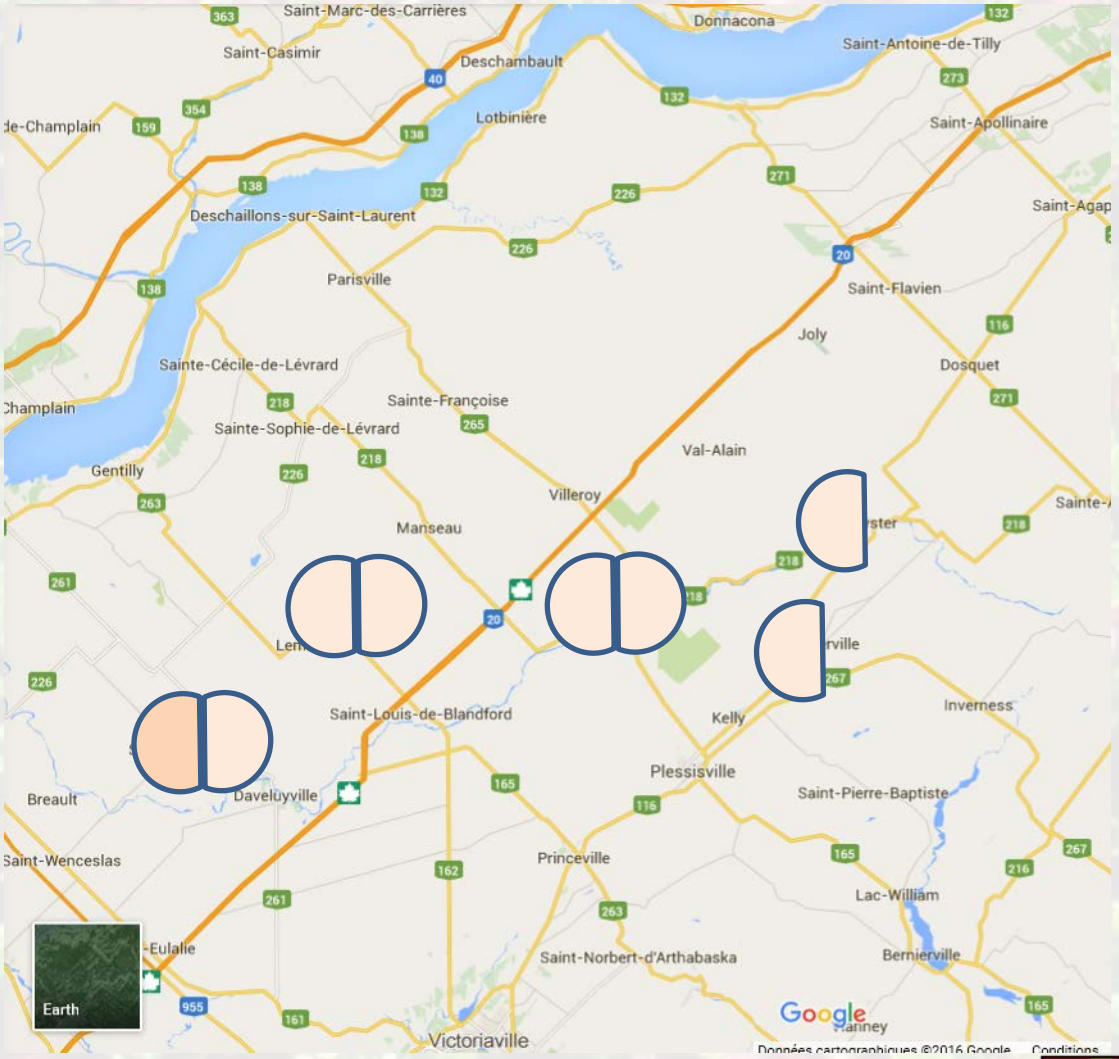


4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

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

Pas de champignon détecté

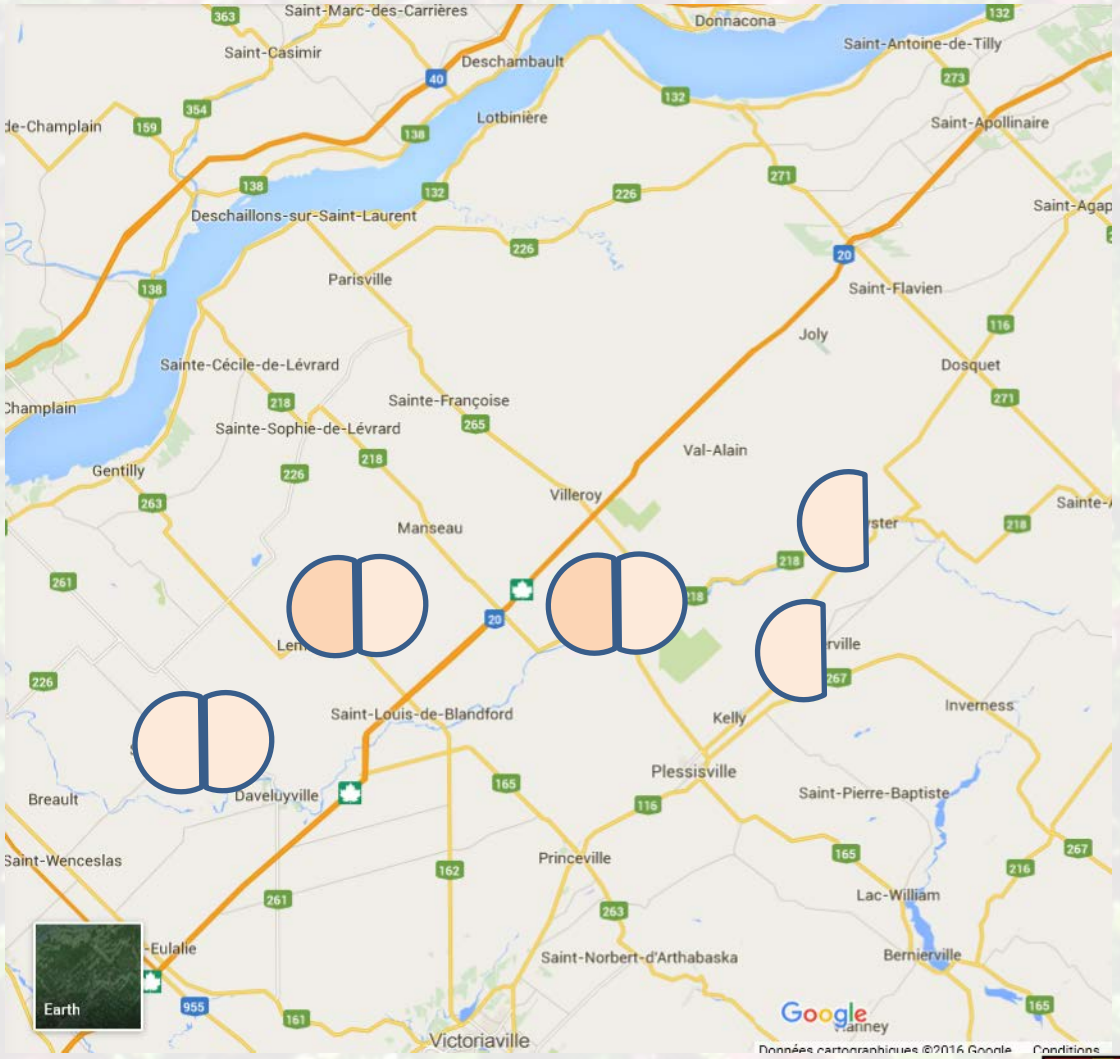
0-25% des fruits pourris

25-50% des fruits pourris

50-75% des fruits pourris

75-100% des fruits pourris

culture Post-récolte

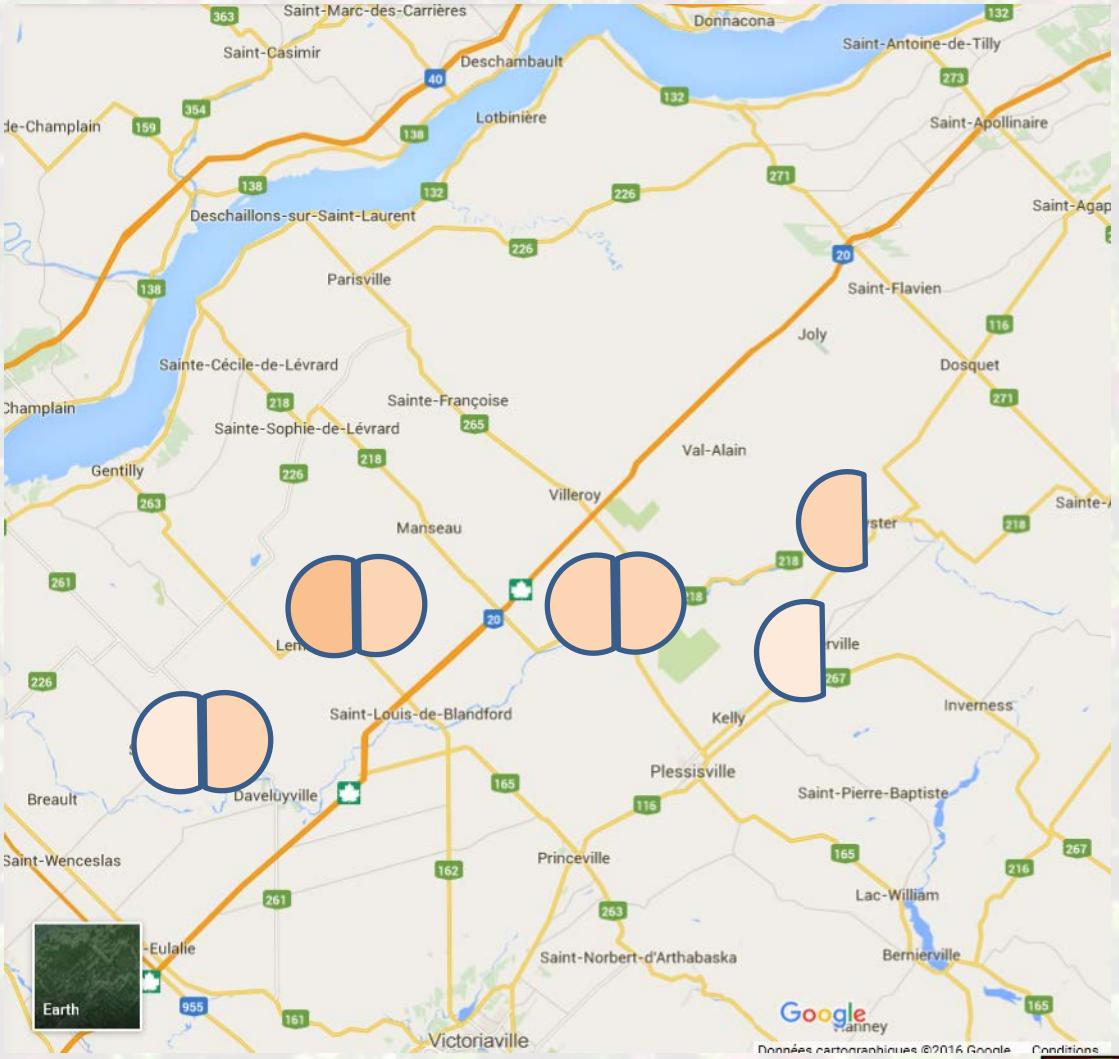


4- Étude épidémiologique sur des fruits pourris dans le centre du Québec (2015)

Colleophoma empetri

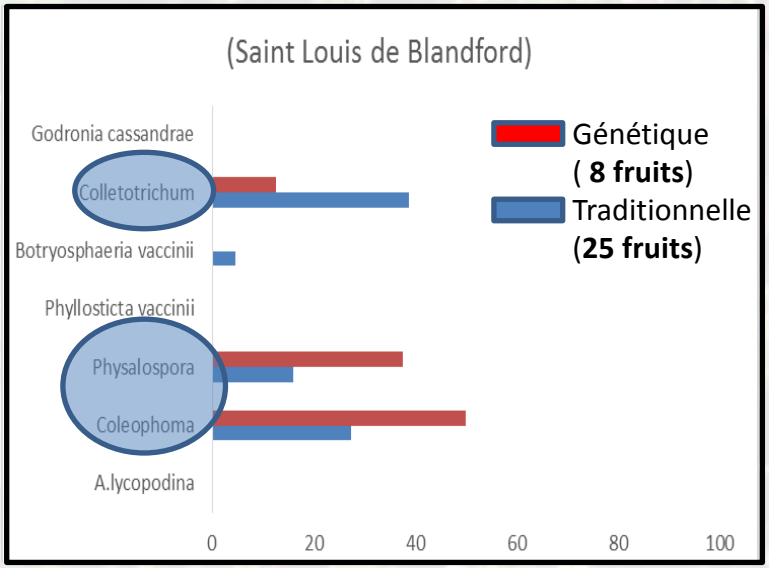
- Pas de champignon détecté
- 0-25% des fruits pourris
- 25-50% des fruits pourris
- 50-75% des fruits pourris
- 75-100% des fruits pourris

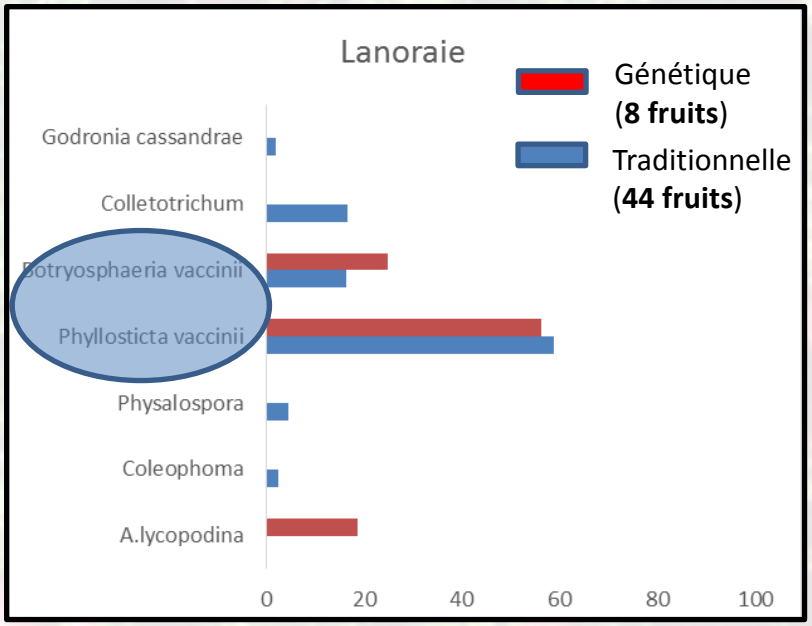
culture Post-récolte

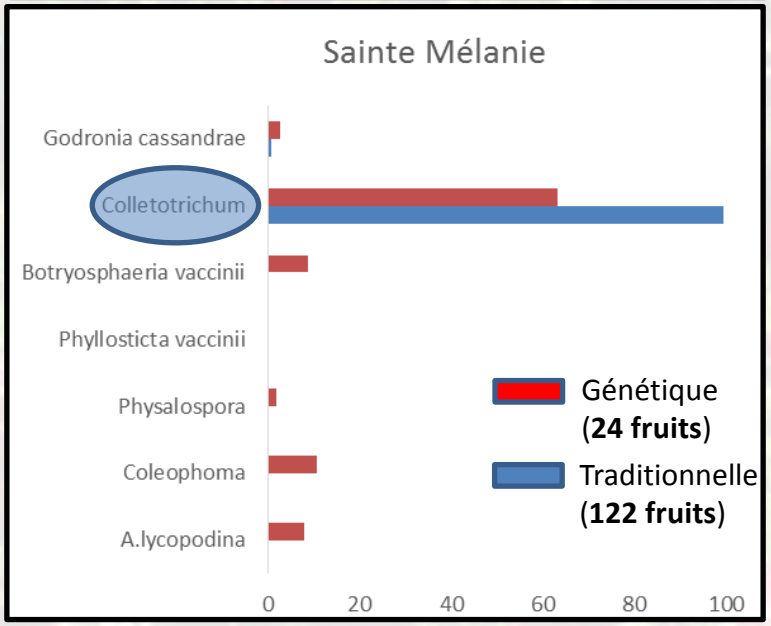


5- Comparaison méthode génétique et traditionnelle

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







Résultats d'identification obtenus au Québec pour la saison 2015

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 / Perspectives

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

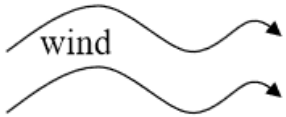
Pf Richard Bélanger

Dr Peter Oudemans

Jean-Pierre Deland

Dr Rodney Serres

Where are the pathogens hiding?



Phyllosticta elongata
Colletotrichum acutatum

(Current-year leaves)
Phyllosticta vaccinii
Phyllosticta elongata
Physalospora vaccinii

(Flowers)
Fusicoccum putrefaciens

(Green fruit)
Phyllosticta vaccinii

(Stems)
Colletotrichum gloeosporioides

(1- and 2-year leaves)
Phyllosticta vaccinii
Phyllosticta elongata
Physalospora vaccinii
Fusicoccum putrefaciens

(Current-year pedicel)
Fusicoccum putrefaciens
Phomopsis vaccinii

(Sound, red fruit)
Physalospora vaccinii
Phyllosticta elongata
Coleophoma empetri

(Rotten fruit)
Physalospora vaccinii
Coleophoma empetri

(1-year pedicel)
Fusicoccum putrefaciens
Phomopsis vaccinii

Phyllosticta elongata
Coleophoma empetri
Colletotrichum acutatum

(Duff--leaves)
Phyllosticta elongata
Coleophoma empetri
Colletotrichum gloeosporiodes

(Duff--fruit)
Coleophoma empetri