

Compte rendu technique du projet « Accélération du Biocontrôle et des Agroéquipements pour la Protection Intégrée des Cultures (ABA PIC) »

Détection et quantification de *Pythium oligandrum*, *Trichoderma atroviride* en culture de pépinière hors-sol

ITA concerné : Astredhor

Auteurs : Camille Soulard

Objectif du projet concerné :

- Développer et tester des outils de suivi des organismes et substances de biocontrôle dans l'agrosystème (Microorganismes et/ ou COV)
- Développer et tester des méthodes d'étude des facteurs qui conditionnent le succès d'utilisation du biocontrôle (facteurs abiotiques, état physiologique des plantes, compatibilité)

OBJECTIF(S)

- Mettre au point une gamme d'outils/méthodes permettant de tracer la présence d'un micro-organisme et ses densités dans l'agrosystème.
- Dans le cadre de ce volet, l'impact de différents paramètres environnementaux abiotiques sur le devenir et l'efficacité des solutions de biocontrôle sera analysé.
- Evaluer l'impact des facteurs liés à l'état physiologique des plantes sur l'efficacité des solutions de biocontrôle.

Action 1 : Projets d'amélioration du savoir-faire méthodologique pour le développement et l'utilisation du biocontrôle

Objectif 1 : Développer et tester des outils de suivi des organismes et substances de biocontrôle dans l'agrosystème

Volet suivi des micro-organismes

NB : Les outils présentés ont été développés en partenariat avec l'unité AGYLE d'Unilasalle

MATERIEL & METHODE

- CADRE THEORIQUE & CONCEPTION

L'approche moléculaire choisie est la PCR en temps réel. Cette technologie permet de quantifier une quantité initiale d'ADN cible dans un échantillon complexe. La PCR en temps réel repose sur le suivi en continu de l'amplification PCR par mesure de la fluorescence émise par les produits PCR en formation. Différentes approches peuvent être utilisés soit via une technologie de type Taqman avec la mise en œuvre d'une sonde moléculaire spécifique en plus des amorces PCR ou par mesure de la fluorescence émise par les produits PCR en formation grâce à l'utilisation d'un fluorochrome type SYBR green. La mesure en temps réel permet de déterminer une valeur de cycle seuil (Ct), dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon, en lien avec la réalisation d'une gamme étalon à partir d'une solution d'ADN extrait précédemment.

- MATERIEL

Extraction de l'ADN des organisme étudiés via des kits d'extraction spécifique pour les sols ex : MP Bio « FastDNA Spin Kit for Soil » ou via DNeasy PowerSoil Pro Kit de chez Quiagen selon recommandation du fournisseur.

Quantification de l'ADN extrait et de sa qualité via dosage par spectrophotométrie : nanodrop ou quantification grâce à un fluorochrome spécifique, kit Invitrogen « Molecular Probes Quant-iT PicoGreen dsDNA selon recommandation fournisseur.

Test de l'efficacité des primers en fonction d'une gamme de dilution d'ADN, validité des primers si l'efficacité est supérieure à 90%.

Utilisation de primer associé à un fluorochrome Taqman ou primer « simple » couplé à un fluorochrome SYBR green.

- POPULATION A L'ETUDE

BCA étudié : *Pythium oligandrum*, *Trichoderma atroviride*

Culture cible : *Choisya* en conteneur (pépinière hors-sol)

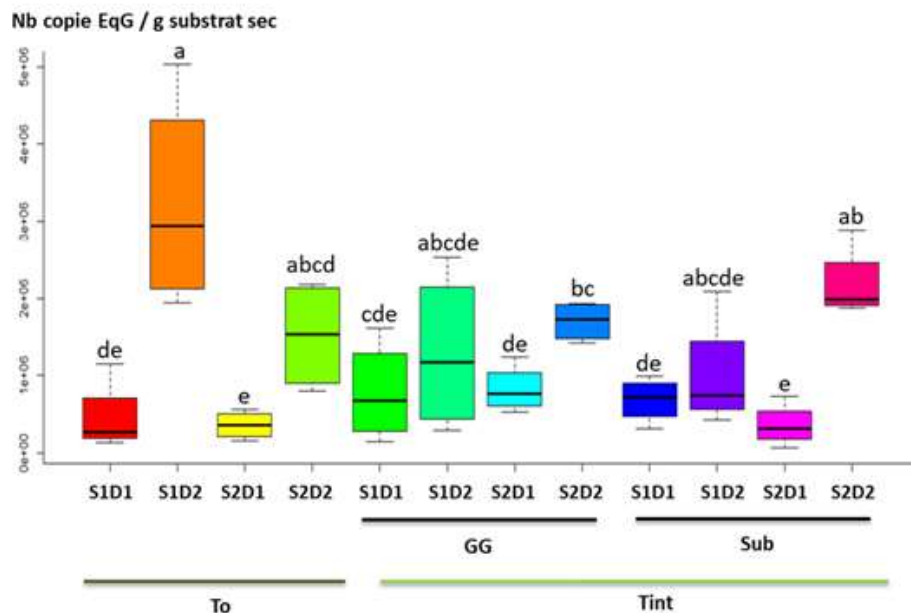
Pathogène cible : *Phytophthora*

LES RESULTATS

- AXE METHODE

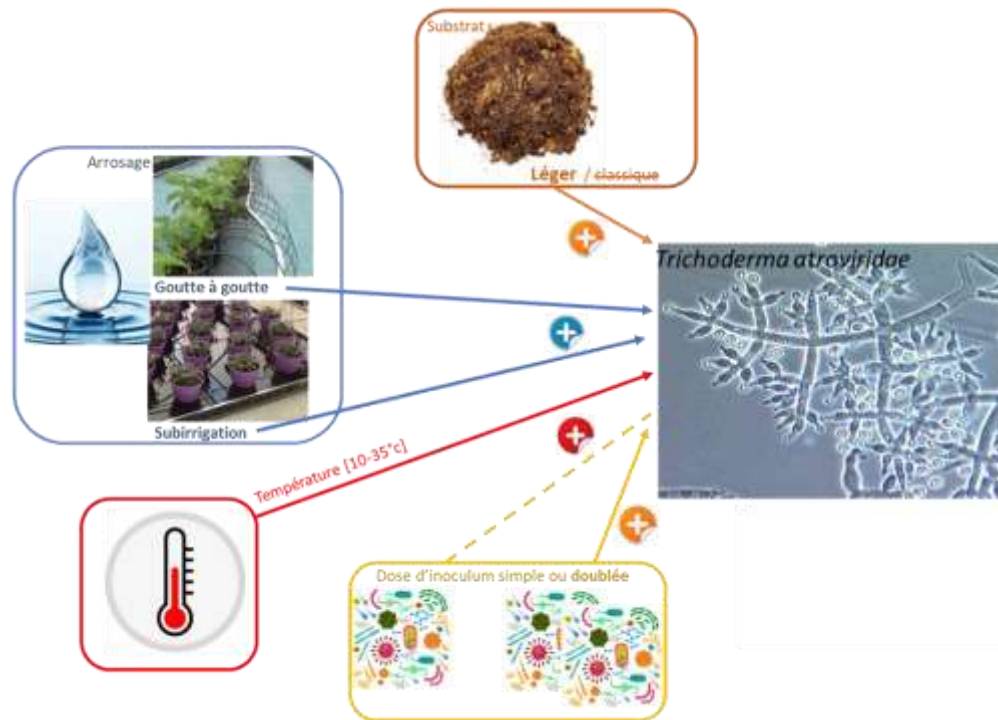
L'outil moléculaire permet une détection spécifique et une quantification précise des différents agents de biocontrôles dans les matrices complexes des substrats horticoles. La mise en œuvre de cet outil présente de nombreux intérêts pour une meilleure compréhension des systèmes et des mécanismes d'action des BCAs.

- RESULTATS DE L'ETUDE
-
- Facteurs étudiés : mode d'arrosage, type de substrat, dose d'inoculation, espèce étudiée
- Exemple de résultats :
-

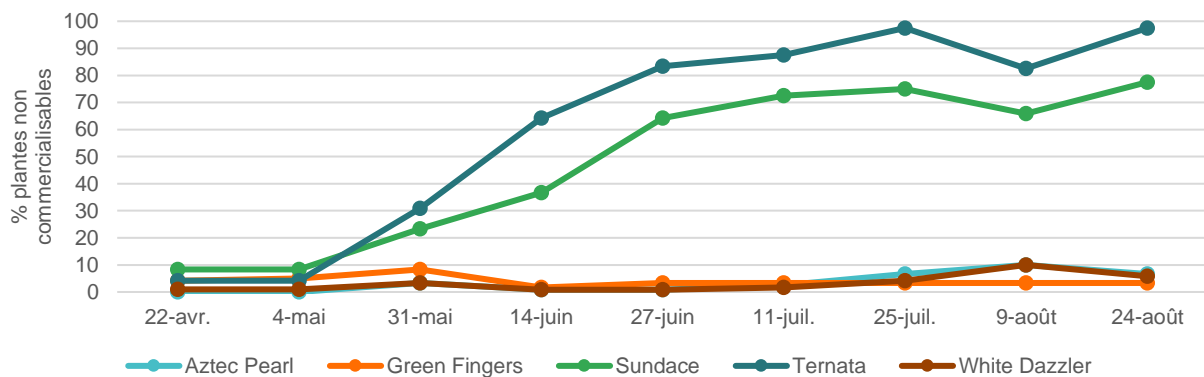


-
- Détection et quantification de *T. atroviride* dans le substrat des plants de *Choisya ternata* au moment de l'application des BCA (T0) et 1 mois et demi après (Tint), exprimé en nombre d'équivalent génome par gramme de substrat sec. S1 : Substrat 1 (Dipladenia®), S2 : Substrat 2 (AERATEUR®), GG : arrosage par goutteurs, Sub : arrosage par sub-irrigation, à deux doses d'inoculation D1 : dose 1 et D2 : dose 2.
- L'outil développé a permis l'identification des paramètres optimaux pour le développement de *Trichoderma* : Substrat léger, faible rétention en eau (fibre de coco, écorce compostée, perlite), le mode d'arrosage n'influence pas le développement de l'agent de biocontrôle. L'outil réponds bien également lorsque l'on applique une dose doublée de produit.

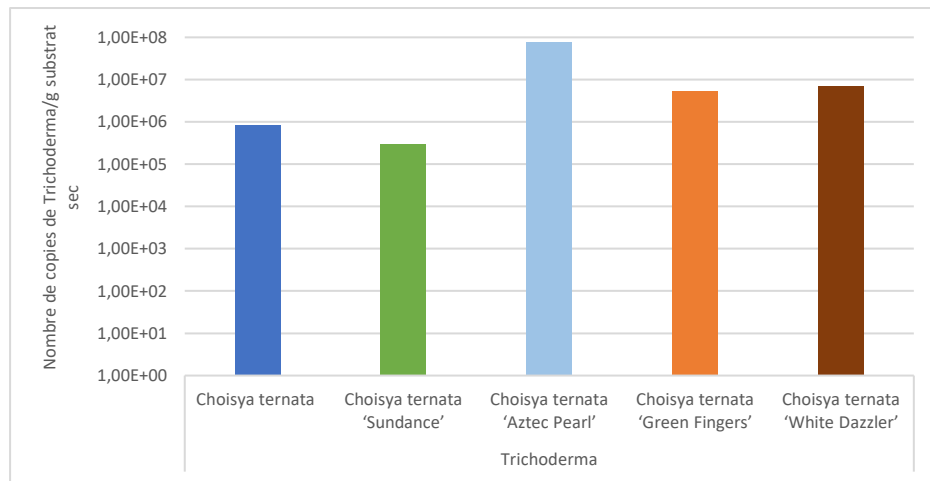
Schéma de synthèse concernant les facteurs de développement de *Trichoderma atroviridae* :



Etude du facteur génétique dans la résistance à Phytophthora et au développement des agents de biocontrôle :



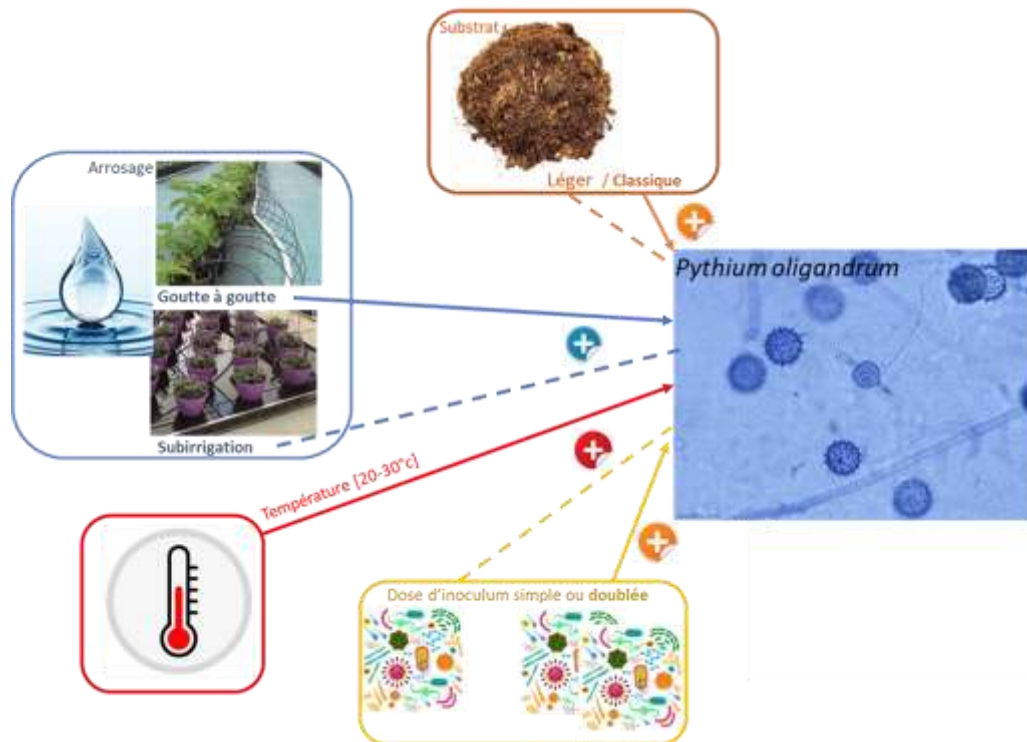
Les différents cultivars présentent une sensibilité différente face au pathogène, avec deux groupes bien distincts : le groupe des cultivars sensibles : *Choisya ternata*, *Choisya ternata* 'Sundance' face au groupe des cultivars résistantes : *Choisya ternata* 'Aztec Pearl', 'Green Fingers Lissfing' et 'White Dazzler'. Les espèces sensibles présentent entre 80 et 100% de plantes non commercialisables ce qui inclut des plantes soit mortes ou symptomatique d'un dépérissement racinaire lié à *Phytophthora*. Le groupe des espèces résistantes ne présente des taux de plantes non commercialisables inférieur à 10%



L'outil de biologie moléculaire a été utilisé pour détecter l'agent de biocontrôle *Trichoderma atroviridae* sur les différents cultivars précédemment cités. Il n'existe pas de différence significative entre le groupe des variétés plus sensibles et celles moins sensibles. Cependant nous pouvons voir une tendance à une plus grande quantité d'agent de biocontrôle dans les cultivars moins sensibles voir résistants que sont *Choisya ternata* 'Aztec Pearl', 'Green Fingers Lissfing' et 'White Dazzler. Par ailleurs l'agent de biocontrôle n'a pas été détecté dans les modalités où il n'a pas été ajouté (données non présentées). La détection de l'agent de biocontrôle (figure ci-dessus) a eu lieu plusieurs mois après son ajout dans le substrat permettant de valider la conservation de ce dernier dans le substrat

En complément de cette approche celle-ci a été comparée à une détection des agents de biocontrôle par mise en culture. Cette dernière a donné des résultats très variables au sein d'une même modalité y compris pour les témoins non traités ne permettant pas de tirer de conclusions.

Schéma de synthèse concernant les facteurs de développement de *Pythium oligandrum*



Le même travail é été réalisé pour la détection de *Cepandant* contrairement à *Pythium oligandrum* l'outil de biologie moléculaire répond bien et il est détectable comme précédemment avec le *Trichoderma*.

Lors de notre essai sur les différents cultivars de *choisya* il n'a pas été possible de détecter le *pythium* car le point de prélèvement c'est révélé trop éloigné de la dernière application et/ou les conditions météorologique n'ont pas favorisé le développement de ce BCA.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les limites de cet outil sont en lien avec les limites à la technologie de PCR en temps réel. L'amplification PCR étant sensible à la présence de co-extraits potentiellement inhibiteurs de la réaction, il convient de réaliser une étape de validation de l'outil sur tout nouveau substrat/matrice.

La qualité de l'ADN extrait va également être primordiale des « contaminations » de molécule extérieures peuvent modifier les rendements des réactifs de PCR. Il convient d'utiliser un kit d'extraction en fonction de la problématique étudiée en évitant l'élution de contaminant. Si nécessaire il conviendra de purifier à nouveau l'ADN extrait par des kits ou méthodes spécifiques

Les résultats vont être dépendant de l'efficacité et du rendement de l'extraction d'ADN réalisée à partir des échantillons de substrats. Enfin le choix des amorces est primordial afin d'être spécifique de l'organisme étudié, si la cible est présente en un seul exemplaire dans le génome cela peut limiter la détection.

Le coût de mise en place est important notamment via les couts des réactifs, des kits d'extraction, l'utilisation de machine spécifique couteuse. La mise au point ou l'adaptation peut nécessiter un temps conséquent surtout en cas de problèmes.

Concernant l'effet des agents de biocontrôle, même si nous avons pu les détecter et les quantifier les effets de ceux-ci n'ont pas montré d'effet suffisant pour le moment pour limiter la mortalité des différentes cultures cibles.