
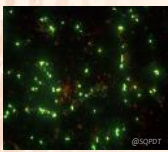

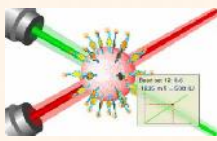


WP1 : Renforcer le statut sanitaire des plants et territoires de production




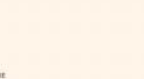
DETECTION DES BIOAGRESSEURS DANS DES MATRICES COMPLEXES POUR PRÉSERVER LA QUALITÉ SANITAIRE DU PLANT DE POMME DE TERRE






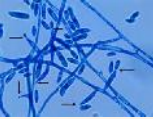

Anne-Claire Le Roux , Emilie Huchet, Laure Berton

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014

Contexte général

• **Un cortège parasitaire très large**

				
Nématodes	Bactéries, phytoplasmes	Virus, viroïdes	Champignons / Oomycètes	Ravageurs
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Globodera pallida</i> et <i>G. rostochiensis</i> • <i>Meloidogyne fallax</i> et <i>M. chitwoodi</i> • <i>Ditylenchus</i> sp. • <i>Pratylenchus</i>, ... 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pectobacterium</i> sp. • <i>Dickeya</i> sp. • <i>Ralstonia solanacearum</i> • <i>Clavibacter m. sepedonicus</i> • <i>Stolbur</i>, • <i>Steptomyces</i> sp. ... 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>PVY, PVX, PVA, PVS, ...</i> • <i>PLRV</i>, • <i>Mop Top</i> • <i>TRV</i> • <i>TSWV</i> • <i>PSTVd</i> ... 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Phytophthora infestans</i>, • <i>Rhizoctonia solani</i> • <i>Fusarium</i> sp. • <i>Alternaria</i> • <i>Pythium</i> sp. • <i>Spongospora subterranea</i> • <i>Synchytrium endobioticum</i> ... 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Doryphore</i>, • <i>Teigne</i> • <i>Taupins</i> • <i>Altises</i> • <i>Psylles</i> ...

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT



Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014




Contexte général

- Expression des symptômes sur différents parties de la plante




- Conséquences :
- ✓ Pertes de rendements - Refus et déclassements - Problèmes de présentation et/ou de conservation - Litiges
- ✓ Destruction de lots - Interdiction de cultures pour les ONQ

= pertes économiques importantes !

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT
Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014






Enjeux pour la filière Plant

- ➔ **Maintien de l'état sanitaire des cultures et de l'environnement vis-à-vis de ces parasites**


- ✓ Dans un contexte de réduction des intrants (Ecophyto 2018) ;
- ✓ Réchauffement climatique (émergences de souches, variants,...) ;
- ✓ Intensification des échanges commerciaux (risque d'introduction) ;
- ✓ Concurrence commerciale de plus en plus forte avec des exigences accrues des pays importateurs (cahier des charges à respecter) ;
- ✓ Producteurs sollicités pour utiliser des apports extérieurs

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT
Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014



Enjeux pour la filière Plant

➔ **Eviter l'introduction, la multiplication et la dissémination des pathogènes dans les parcelles et l'environnement**

- ✓ Utilisation de semences certifiées
- ✓ Contrôles phytosanitaires import/export (PPE) 
- ✓ Pratiques culturales, conditions de stockage, ITK adaptés
- ✓ Méthodes de lutte adaptées... quand elles existent !


➔ **Outils de détection / identification performants**

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT
Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014





Sources de contamination


ENVIRONNEMENT




TECHNIQUES CULTURALES




MATERIEL VEGETAL




INDUSTRIES, USINES



EAU




SOL




Apports extérieurs

Précédent

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT
Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014




FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE



Méthodes de détection


✓ **Biologiques**

Isolements



CVP, SMSA


Piégeage



Tomates Morelles


✓ **Sérologiques**

ELISA




Virus

IF



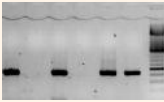
Bactéries

LUMINEX

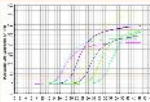


✓ **Moléculaires**

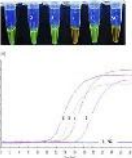
PCR & dérivées



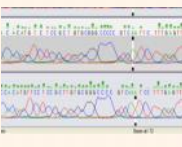
PCR temps réel



LAMP




Séquençage




Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014



FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE



Méthodes de détection


➔ **Evaluation et validation des méthodes / réactifs (OEPP, MOA)**

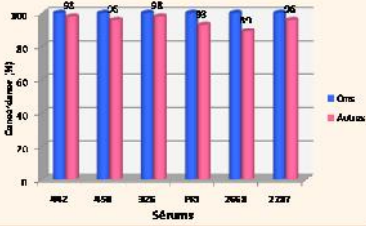
✓ **Spécificité :**

- La méthode doit permettre la détection de la cible dans un milieu lorsqu'elle est présente et ce indépendamment de sa forme = **inclusivité** ;
- La méthode ne doit pas détecter la cible lorsqu'elle n'est pas présente = **sélectivité**

Evaluation de réactifs sérologiques dirigés contre *Cms* :

- *Clavibacter m. sepedonicus*
- Autres *C. michiganensis*
- "*Erwinia* sp"
- *Ralstonia solanacearum*
- Autres espèces






Le Hingrat *et al*, 2012


Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014

4



FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE



Méthodes de détection

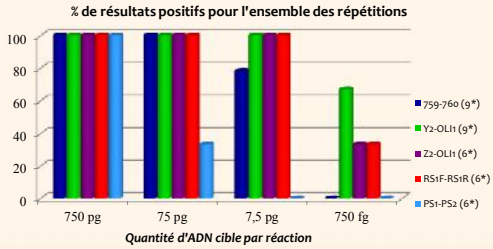
➔ **Evaluation et validation des méthodes / réactifs (OEPP, MOA)**

✓ **Sensibilité :**

La méthode doit permettre la détection de la cible même lorsqu'elle est présente en faible quantité (ONQ, contaminations latentes)


Evaluation de la sensibilité de couples d'amorces dirigés contre *R. solanacearum* :

% de résultats positifs pour l'ensemble des répétitions




Le Hingrat *et al.*, 2012

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014



FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE



Méthodes de détection

➔ **Evaluation et validation des méthodes / réactifs (OEPP, MOA)**

✓ **Répétabilité :** Echantillon analysé plusieurs fois dans les mêmes conditions


✓ **Reproductibilité :** Echantillon analysé dans des conditions différente (opérateur, appareil, runs, réactifs,... différents)

Evaluation d'outils moléculaires (primers) dirigés contre *Meloidogyne* sp. :


	Zijlstra et al. (1995) PCR-RFLP ^a		Zijlstra (2000) SCAR PCR		Wahart et al. (2002) JMV PCR		
	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>	
Sensitivity	1 J2	100 %	100 %	33 %	100 %	100 %	100 %
	> 1 J2	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Repeatability	1 J2	25 %	50 %	nr	75 %	100 %	100 %
	2 J2	100 %	100 %	63 %	100 %	100 %	100 %
	5 J2	nr	nr	100 %	nr	nr	nr
Reproducibility	1 J2	67 %	88 %	nr	92 %	100 %	100 %
	2 J2	100 %	100 %	83 %	100 %	100 %	100 %
	5 J2	nr	nr	100 %	nr	nr	nr

Gamel *et al.*, 2013

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014




FÉDÉRATION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS DE POMME DE TERRE





Méthodes de détection

➔ Choix de la méthode d'extraction de la cible (individu ou AN)

Matrices







Extraction bact.

Warring Blender			Billes			Agitation		
Isolément sur SMSA	IF	Extraction ADN	Extraction ADN	E-SMSA + PCR	E-CIPEB + PCR	Isolément sur SMSA		
CTAB	CTAB	CTAB	CTAB					
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAamp® DNA Mini Kit	QIAamp® DNA Mini Kit	QIAamp® DNA Mini Kit					
Ranjard	Ranjard							

Filtration

Isolément sur SMSA	IF	Extraction ADN	E-SMSA + PCR	E-CIPEB + PCR
CTAB	CTAB	CTAB		
DNeasy® Plant Mini kit	DNeasy® Plant Mini kit	DNeasy® Plant Mini kit		
QIAamp				
Easy-DNA™ Kit				

Maceration


IF	Extraction ADN	E-SMSA + PCR
CTAB	CTAB	
DNeasy® Plant Mini kit		
QIAamp		
Easy-DNA™ Kit		

Maceration + centrifugation


IF	Extraction ADN	E-SMSA + PCR
CTAB	CTAB	
DNeasy® Plant Mini kit		
QIAamp		
Easy-DNA™ Kit		

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014



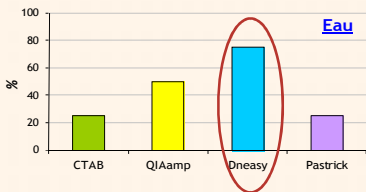
FÉDÉRATION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS DE POMME DE TERRE



Méthodes de détection

➔ Préparation des échantillons : extractions individus, ADN,...



- % d'échantillons d'eau contaminés par RS détectés positifs :


- Seuils de différentes méthodes pour la détection de RS dans des macérats :

	IF	CTAB		Easy DNA Kit		Dneasy Plant Kit (500 µl)	QIAamp (500 µl)	E-SMSA 3J	
		500 µl	100 µl	500 µl	100 µl			CTAB	Easy DNA Kit
100%	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^4$
67%	-	$8 \cdot 10^2$	-	-	-	$8 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^2$	-	-

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014






Conclusions


- ➔ Le développement d'outils de détection performants ne peut se faire que si une bonne **connaissance des agents pathogènes** existe (diversités génétique et phénotypique)
- ➔ Veille pour anticiper l'introduction de nouveaux parasites sur le territoire (émergences) = **biovigilance** (ANSES, DGAL)
- ➔ Existence de très nombreux outils & méthodes de détection des bioagresseurs :
 - Choix selon la cible visée, la matrice, la sensibilité requise ;
 - Veilles technologique et bibliographique (connaissances des pathogènes)
- ➔ Les outils de détection et de quantification sont importants pour les **études épidémiologiques**, le développement de **méthodes de lutte**
- ➔ Détection d'autant plus efficace que **l'échantillonnage** est optimal

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014

Perspectives

- ➔ Evaluation de la **performance et optimisation d'outils PCR existants**
- ➔ Mise au point d'outils **PCR temps réel, quantitatif ?** : bactéries, *Rhizoctonia solani*, *Spongopora subterranea*, nématodes
- ➔ **Multiplexage** (bactéries, virus)
- ➔ Développement de **méthodes de détection** de différents parasites dans les effluents, boues, déchets vert,...
- ➔ Projet **CASDAR NEMATOOLS** déposé et porté par l'UMT : 

"Développement d'outils pour la maîtrise durable du risque nématodes en plant de pomme de terre et cultures en rotation"

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014


Partenaires















Convention cadre avec la FN3PT








Participation aux travaux Utilisateurs (transfert et appui)

GT8

EILA et EILV

Vigilance et normes

Anne-Claire Le Roux - FN3PT / RD3PT

Carrefour de la Recherche Plant de Pomme de terre – 20 et 21 mai 2014