

DETECTION ET QUANTIFICATION D'APHANOMYCES EUTEICHES PAR PCR QUANTITATIVE DANS LES PARCELLES DE POIS PROTEAGINEUX

H.Sauvage^(1,2) K.Laval⁽¹⁾ F.Bois⁽²⁾ S.Barray⁽³⁾

¹ Laboratoire BioSol- 13 rue du Nord 76000 Rouen- France

² A.BIO.C- Route de Samadet 64410 Arzacq- France

³ Laboratoire de Microbiologie du Froid- UFR Sciences, Université de Rouen 76130 Mont Saint Aignan- France

Mots clés : PCR quantitative en temps réel , phytopathogènes, sol, oomycètes.

Les applications récentes de l'amplification génique (PCR) dans les domaines du clinique, de la sécurité alimentaire, et de l'agronomie nous encouragent à transférer cette approche pour la détection et la quantification d'organismes phytopathogènes dans les sols, et en particulier *Aphanomyces euteiches*. Nos travaux visent à transférer l'outil moléculaire proposé par Vandemark (détection et quantification d'*Aphanomyces euteiches* dans les plantes) [1, 2] à la problématique suivante : détection et quantification de souches françaises d'*Aphanomyces euteiches* dans les parcelles de pois protéagineux. Les résultats présentés s'inscrivent dans une démarche dont l'objectif vise à proposer un outil de diagnostic.

Nous avons dans un premier temps vérifié la spécificité de l'outil moléculaire (couple d'amorces, et sonde TaqMan) sur un ensemble de souches représentatives de régions infestées de la sole française. Une centaine de souches ont ainsi été testées, après avoir extrait l'ADN à partir de mycélium en culture sur milieu Corn Meal Agar. A contrario nous avons vérifié l'absence d'hybridation croisée avec des espèces potentiellement inféodées à des échantillons de l'environnement.

Dans un deuxième temps il s'agissait de déterminer le nombre de copies du marqueur moléculaire de 76pb envisagé pour l'amplification en temps réel, et de vérifier que ce nombre de copies était constant chez l'espèce, afin d'interpréter des résultats en nombre de génome et de pouvoir comparer les échantillons entre eux. D'autre part nos résultats valident l'approche quantitative de l'outil moléculaire : en effet une corrélation linéaire a été établie entre le nombre d'oospores et l'amplification génique, validant d'une part la reproductibilité de la méthode d'extraction et d'autre part confirmant la corrélation entre nombre d'oospores/quantité d'ADN extraite et amplification génique. De la même manière, cette corrélation a été validée sur sols inoculés artificiellement. En parallèle une gamme plasmidique a été réalisée (plasmide contenant le marqueur de 76pb) en vue d'interpréter le signal en nombre de copies et de déterminer les seuils de détection de la méthode moléculaire en s'affranchissant de l'étape d'extraction, il s'agit d'avoir un étalon interne.

Les perspectives de ces travaux consistent à transférer la méthode envisagée à des sols naturellement contaminés, il s'agira d'établir la corrélation entre quantité d'ADN extraite, amplification génique et symptômes observés. Ainsi l'utilisation de l'outil moléculaire pourrait être un plus en terme d'aide à la décision pour la profession, et la méthode transférable à de nombreuses problématiques en pathologies végétales afin d'évaluer, diagnostiquer, et anticiper des dégâts importants sur des cultures commercialement incontournables.

1. Vandemark G.J., et al., *A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of aphanomyces euteiches*. Phytopathology, 2000. **90**(10): p. 1137-1144.
2. Vandemark G.J., Barker B.M., and Gritsenko M.A., *Quantifying aphanomyces euteiches in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay*. The American phytopathological society, 2002. **92**(3): p. 265-272.