

Projet CLAVINNOV 2018-2021

AMÉLIORATION DE LA DÉTECTION ET DE LA PROTECTION RAISONNÉE CONTRE LE CHANCRE BACTÉRIEN DE LA TOMATE (*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*)



Projet PEI financé avec le concours de l'Union européenne avec le Fonds Européen Agricole pour le Développement Rural



Projet labélisé par le GIS PIClég



Contexte

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, agent responsable du chancre bactérien de la tomate

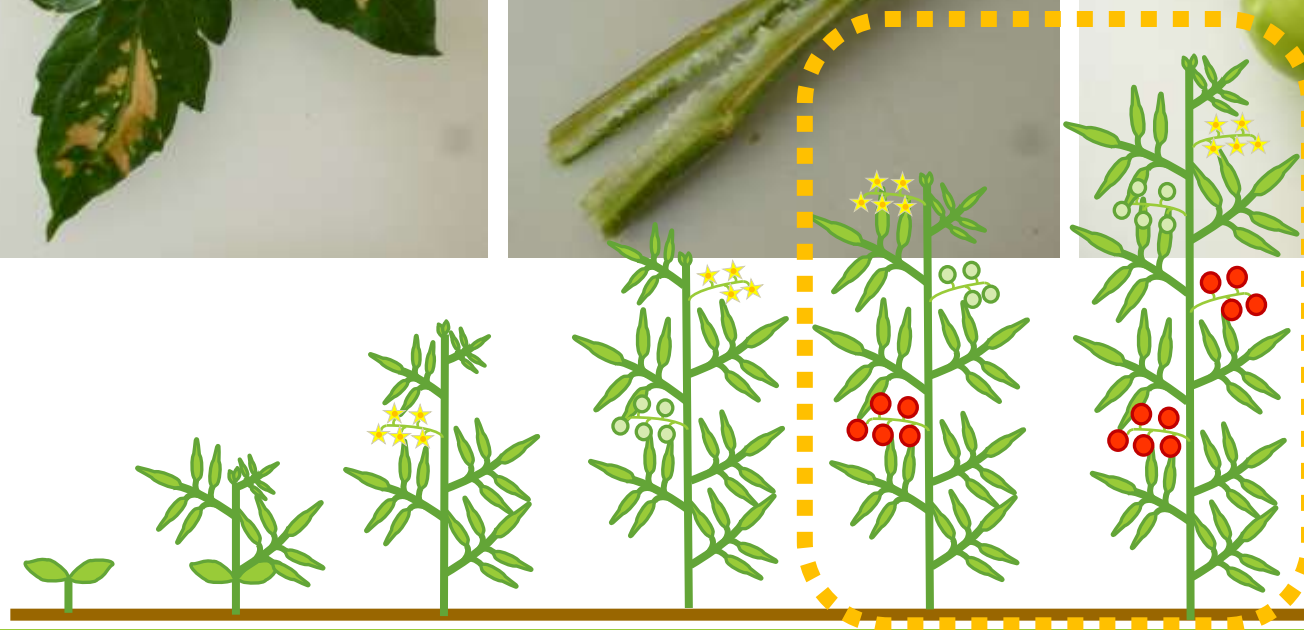
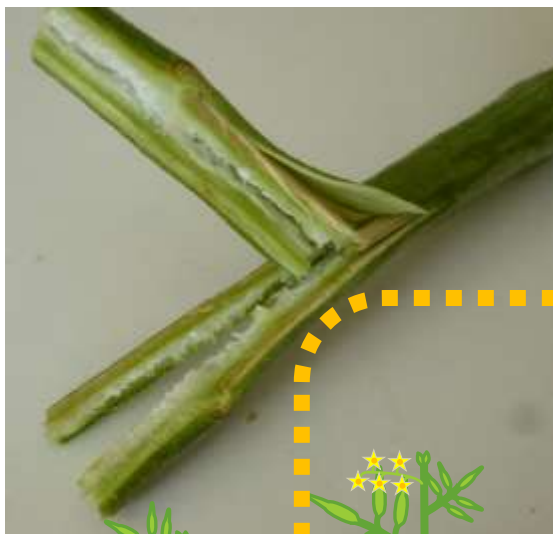
Symptômes



Contexte

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, agent responsable du chancre bactérien de la tomate

Symptômes



Contexte

Transmission

Par contact

Perte de rendement jusqu'à 100%

Méthodes de lutte

- ✓ Certification des semences
- ✗ Pas de résistance génétique
- ✗ Pas de méthode curative
- ✓ Prophylaxie : élimination des plants atteints, balisage, désinfection...

Nécessité d'un diagnostic précoce et fiable



Objectifs

Proposer un outil innovant de détection précoce du Cmm utilisable sur le terrain



Améliorer la gestion de la maladie du chancre bactérien

Actions

Elaboration d'un nouvel
outil de détection du Cmm



Transfert de l'outil au terrain

Recherche de solutions de
de gestion de Cmm

Elaboration de l'outil

Choix méthodologiques

Traitement de l'échantillon



Amplification isothermique ADN ou ARN



- LAMP
 - PSR
 - NASBA
- } ADN
- ARN

Lecture des résultats



Critères d'évaluation

Sensibilité (i.e. seuil de détection)

- Tests sur différents substrats

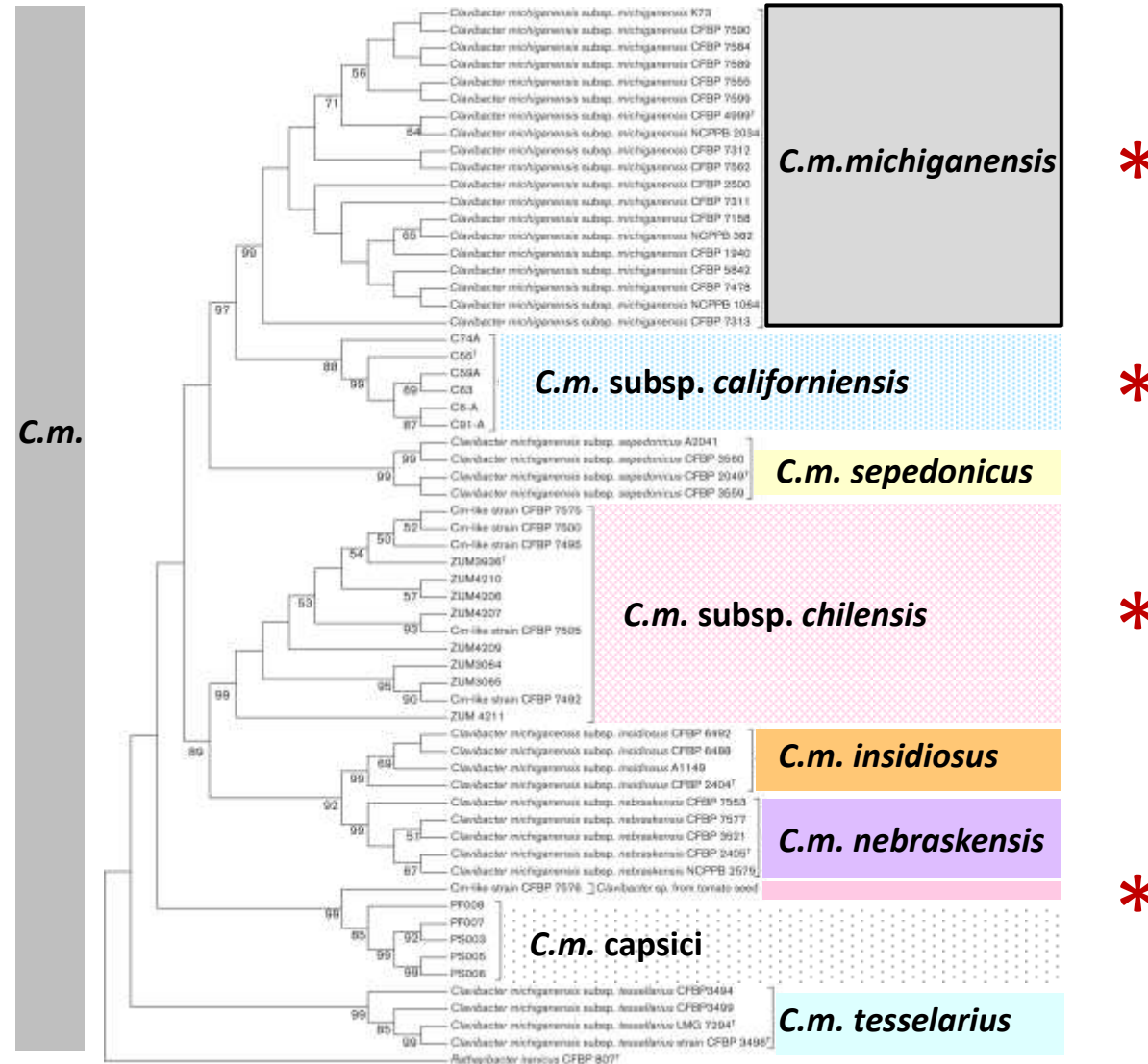
Spécificité (i.e. 100% vrais + et -)

- Choix et design des amorces
- Sélection de souches

Répétabilité Rapidité Simplicité

Cible de l'outil

➤ Arbre phylogénétique



Jacques et al. (2012), EPPO 7/42 (2013), Yasuhara-Bell et al. (2015b), Oh et al. (2016), Gonzalez & Trapiello et al. (2014)

Sélection de souches pour tests de spécificité

Cmm

44 souches

Cm

Bactéries proches

Bactéries présentes sur tomate

Taxonomie	CFBP
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1460
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1464
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1714
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1940
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2108
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2492
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2494
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2496
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2352 (CFBP 4999)
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5842
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5843
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 6885
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7158
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7584
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7552
Clavibacter michiganensis subsp californiensis	CFBP 8216
Clavibacter michiganensis subsp nebraskensis	CFBP 2405
Clavibacter michiganensis subsp nebraskensis	CFBP 3521
Clavibacter michiganensis subsp insidiosus	CFBP 2404
Clavibacter michiganensis subsp insidiosus	CFBP 6488
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7492
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7495
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7505
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 8217
Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus	CFBP 2049
Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus	CFBP 3559
Clavibacter michiganensis subsp tessellarius	CFBP 3494
Clavibacter michiganensis subsp tessellarius	CFBP 3496
Clavibacter michiganensis (subsp capsici?)	CFBP 7576
Curtobacterium	CFBP 7556
Curtobacterium flaccumfaciens pv flaccumfaciens	CFBP 1378
Curtobacterium flaccumfaciens pv oortii	CFBP 1384
Rathayibacter iranicus	CFBP 807
Rathayibacter tritici	CFBP 1385
Pectobacterium atrosepticum	CFBP 1453
Pseudomonas syringae pv. tomato	CFBP 2212
Ralstonia solanacearum	CFBP 2957
Bacillus subtilis	CFBP 4228
Ralstonia pseudosolanacearum	CFBP 6424
Xanthomonas campestris pv vesicatoria	CFBP 6681
Xanthomonas euvesicatoria 9.2/Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli 9.4	CFBP 6682
Agrobacterium tumefaciens	CFBP 7336
Pseudomonas syringae pv. tomato	DC3000 (CFBP 7438)

Origine de l'isolement

Espèce de plante	Tissu	Origine géographique	Année d'isolement
Solanum lycopersicum	NA	France	1956
Solanum lycopersicum	NA	France	1974
Solanum lycopersicum	NA	France	1975
Solanum lycopersicum	NA	France	1975
Solanum lycopersicum	NA	Spain	1978
Solanum lycopersicum	NA	France	1981
Solanum lycopersicum	NA	Algeria	1985
Solanum lycopersicum	NA	Algeria	1984
Solanum lycopersicum	NA	Algeria	1978
Solanum lycopersicum	NA	Hungary	1957
Capsicum annum	NA	Brazil	1993
Solanum lycopersicum	NA	Brazil	1994
Solanum lycopersicum	Branche	France	2004
Solanum lycopersicum	NA	New Zealand	1968
Solanum lycopersicum	Graines	South Africa (The Netherlands?)	2008
Solanum lycopersicum	Graines	Taiwan (China)	NA
Solanum lycopersicum	Graines	USA	2000
Zea Mays	NA	USA	1971
Zea mays	Feuilles	USA	1979
Medicago sativa	NA	USA	1955
Medicago sativa	NA	Czech Republic	1998
Solanum lycopersicum	Graines	India	2000
Solanum lycopersicum	Graines	Chile	2007
Solanum lycopersicum	Graines	France	2009
Solanum lycopersicum	Graines	The Netherlands	2007
Solanum tuberosum	NA	Canada	1968
Solanum tuberosum	NA	France	1993
Triticum aestivum	NA	NA	1978
Triticum aestivum	NA	NA	1982; 1978
Solanum lycopersicum	Graines	NA	1997
Solanum lycopersicum	Graines	The Netherlands	2008
Phaseolus vulgaris	NA	USA	1958
Tulipa gesneriana	NA	The Netherlands	1967
Triticum aestivum	NA	Iran	1966
Triticum aestivum	NA	Egypt	1952
Solanum lycopersicum	NA	Solanum lycopersicum	1973
Solanum lycopersicum	NA	United Kingdom	1960
Solanum lycopersicum	NA	France (Martinique)	1987
NA	NA	NA	NA
Solanum lycopersicum	NA	Guyane	NA
Solanum lycopersicum	NA	Cuba	NA
Phaseolus vulgaris	NA	Cuba	NA
Soil	NA	France	2010
NA	NA	United Kingdom	NA

Projet CLAVINNOV

Amorces et protocoles choisis

Primers	Paire d'amorces	5 amorces
	<u>Cmm</u>	<u>Cmm</u>
	↓	↓
	<u>PCR</u>	<u>LAMP</u>
Méthodes		
Amplification		
- Nb étapes	3 * 30-35 + 2	1
- T°C	55-95°C	60-65°C
- Temps	1h30-2h	30-60 min
Matrice	ADN	ADN
Primers		
- Nb	2	4-6
- Design	Simple	Complexe
Tolérance inhibiteurs	Non	Oui

Taxonomie	CFBP	Description	LAMP Cmm
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1460	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1464	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1714	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1940	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2108	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2492	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2494	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2496	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2352 (CFBP 4999)	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5842	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5843	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 6885	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7158	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7584	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7552	Cmm	+
Clavibacter michiganensis subsp californiensis	CFBP 8216	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp nebraskensis	CFBP 2405	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp nebraskensis	CFBP 3521	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp insidiosus	CFBP 2404	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp insidiosus	CFBP 6488	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7492	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7495	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7505	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 8217	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus	CFBP 2049	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus	CFBP 3559	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp tessellarius	CFBP 3494	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis subsp tessellarius	CFBP 3496	Cm autres	-
Clavibacter michiganensis (subsp capsici?)	CFBP 7576	Cm autres	-
Curtobacterium	CFBP 7556	Cm autres	-
Curtobacterium flaccumfaciens pv flaccumfaciens	CFBP 1378	Outgroup	-
Curtobacterium flaccumfaciens pv oortii	CFBP 1384	Outgroup	-
Rathayibacter iranicus	CFBP 807	Outgroup	-
Rathayibacter tritici	CFBP 1385	Outgroup	-
Pectobacterium atrosepticum	CFBP 1453	Agent infectieux	-
Pseudomonas syringae pv. tomato	CFBP 2212	Agent infectieux	-
Ralstonia solanacearum	CFBP 2957	Agent infectieux	-
Bacillus subtilis	CFBP 4228	Agent infectieux	-
Ralstonia pseudosolanacearum	CFBP 6424	Agent infectieux	-
Xanthomonas campestris pv vesicatoria	CFBP 6681	Agent infectieux	-
Xanthomonas euvesicatoria 9.2/Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli 9.4	CFBP 6682	Agent infectieux	-
Agrobacterium tumefaciens	CFBP 7336	Agent infectieux	-
Pseudomonas syringae pv. tomato	DC3000 (CFBP 7438)	Agent infectieux	-



Taxonomie	CFBP	Description	LAMP Cmm	PCR Cmm
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1460	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1464	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1714	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 1940	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2108	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2492	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2494	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2496	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 2352 (CFBP 4999)	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5842	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 5843	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 6885	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7158	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7584	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp michiganensis	CFBP 7552	Cmm	+	+
Clavibacter michiganensis subsp californiensis	CFBP 8216	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp nebraskensis	CFBP 2405	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp nebraskensis	CFBP 3521	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp insidiosus	CFBP 2404	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp insidiosus	CFBP 6488	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7492	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7495	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 7505	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp chilensis	CFBP 8217	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus	CFBP 2049	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus	CFBP 3559	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp tessellarius	CFBP 3494	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis subsp tessellarius	CFBP 3496	Cm autres	-	-
Clavibacter michiganensis (subsp capsici?)	CFBP 7576	Cm autres	-	-
Curtobacterium	CFBP 7556	Cm autres	-	-
Curtobacterium flaccumfaciens pv flaccumfaciens	CFBP 1378	Outgroup	-	-
Curtobacterium flaccumfaciens pv oortii	CFBP 1384	Outgroup	-	-
Rathayibacter iranicus	CFBP 807	Outgroup	-	-
Rathayibacter tritici	CFBP 1385	Outgroup	-	-
Pectobacterium atrosepticum	CFBP 1453	Agent infectieux	-	-
Pseudomonas syringae pv. tomato	CFBP 2212	Agent infectieux	-	-
Ralstonia solanacearum	CFBP 2957	Agent infectieux	-	-
Bacillus subtilis	CFBP 4228	Agent infectieux	-	-
Ralstonia pseudosolanacearum	CFBP 6424	Agent infectieux	-	-
Xanthomonas campestris pv vesicatoria	CFBP 6681	Agent infectieux	-	-
Xanthomonas euvesicatoria 9.2/Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli 9.4	CFBP 6682	Agent infectieux	-	-
Agrobacterium tumefaciens	CFBP 7336	Agent infectieux	-	-
Pseudomonas syringae pv. tomato	DC3000 (CFBP 7438)	Agent infectieux	-	-

Cas recensés de Cmm 2018-2019

Faible contamination <1% des plantes : 8 cas

Forte contamination > 20% des plantes : 6 cas

	Hors-sol	Sol
2018	6	2
2019	6	0

Symptômes

Flétrissement systématique

Parfois : nécroses foliaires et vitescence des fruits

Affaiblissement, perte de calibre

Test ou analyse non systématique

Mesures prises

Isolement, arrachage des plantes touchées

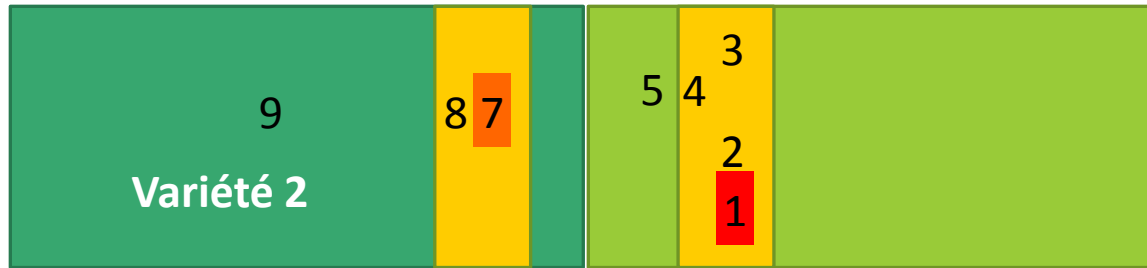
Adaptation du travail : blouses, désinfection des mains, sécateurs et chariots, travail en dernier

Formation du personnel



Echantillonnage 2019 : Cas déclaré en février serre HS – Prélèvement en avril

- > étudier la répartition des plants contaminés en fonction de la distance aux plants symptomatiques
- > étudier la répartition de la bactérie dans la plante pour affiner le protocole

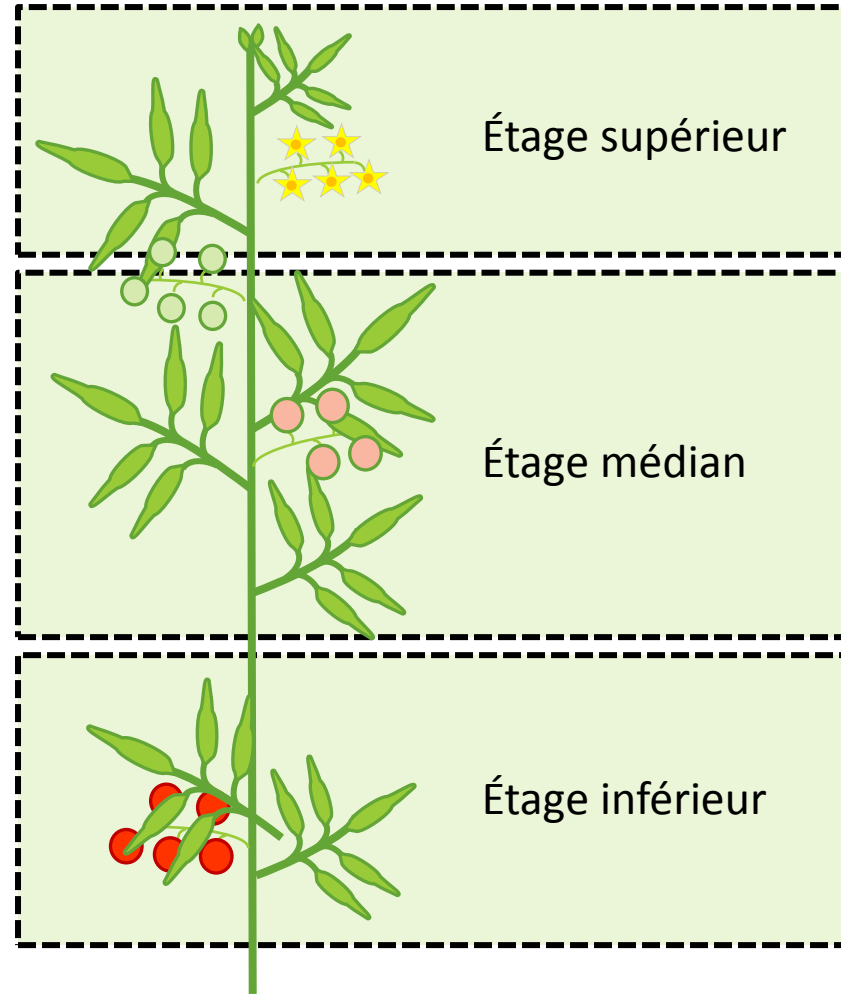


Variété 1

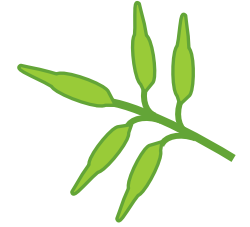
- P1 : symptômes
- P2 : à côté de P1
- P3 : bout de rang touché
- P4 : rang opposé
- P5 : limite de zone balisée
- P6 : éloignée du foyer

Variété 2

- P7 : douteuse
- P8 : rang opposé
- P9 : éloignée du foyer



5 échantillons
par plante



Perspectives de travail 2020-2021

Elaboration d'un nouvel outil de détection du Cmm

Protocoles PSR et NASBA

Traitement des échantillons

Révélation des résultats

Transfert de l'outil au terrain

Détection sur plantes

Détection de l'inoculum primaire

Test de sensibilité sur différents substrats

Affiner le protocole de prélèvement

Consolidation des stratégies de protection des cultures de tomate

Recherche de solutions de gestion de Cmm

Analyser la répartition de la bactérie autour du foyer

Evaluer les méthodes de désinfection recensées

Evaluer les solutions de biocontrôle

