

**Intitulé du stage :** Effet de facteurs climatiques (i.e. température et humidité relative) sur la taille de populations intra plante de souches de *P. syringae* pv. *actinidiae* analysée par qPCR, et sur la sévérité des symptômes induits au sein de plants de kiwis (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*).

**Intitulé de poste :** stage pour étudiant.e de niveau équivalent Master 2

**Type de contrat :** stage

**Rémunération :** selon grille salariale de l'INRA et la présence effective du ou de la stagiaire

**Date de prise de fonction :** A définir, idéalement démarrage début 2025

**Durée :** 6 mois selon possibilités

**Unité d'accueil :** Unité de recherche INRA Pathologie végétale

[https://www6.paca.inra.fr/pathologie\\_vegetale/](https://www6.paca.inra.fr/pathologie_vegetale/)

**Equipe d'accueil :** MISTRAL

**Lieu d'exercice :** 67 Allée des Chênes, CS 60094 - Domaine Saint Maurice, F84143 Montfavet Cedex

**Contact :** Christelle Lacroix ([christelle.lacroix@inrae.fr](mailto:christelle.lacroix@inrae.fr))

### Contexte

*P. syringae* correspond à un complexe d'espèces ubiquistes. Les souches peuvent se multiplier de façon épiphyte et/ou pathogène sur une large gamme de plantes hôtes Angiospermes dans des régions tempérées<sup>1-4</sup>. Des souches, dites *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), appartenant à l'un des groupes phylogénétiques de ce complexe d'espèces<sup>5,6</sup>, sont responsables de la maladie du chancre bactérien en culture de kiwi en France et au niveau mondial<sup>1,4</sup>. Ces souches Psa sont réparties en différents biovars (1 à 6) en fonction de leurs caractéristiques biologiques et phylogénétiques<sup>7</sup>. Les souches du biovar 3 sont les plus agressives, et sont responsables de l'épidémie actuelle et mondiale de la maladie du chancre bactérien. Cependant, des souches de ces différents biovars ont été responsables de différents épisodes d'émergence de cette maladie.

Il n'existe pas de moyens de lutte directs, efficaces et durables contre cette maladie. La gestion en verger du chancre bactérien repose principalement sur des méthodes de prophylaxie (e.g. désinfection des outils de taille, élagage de branches malades, usage de produits chimiques à base de composés cupriques)<sup>1</sup>. Ces méthodes sont mises en place en prévention et dès l'observation de symptômes de la maladie (e.g. nécroses foliaires, chancres au niveau du bois des troncs ou des branches, exsudats)<sup>1,4,8</sup>.

La sévérité des symptômes et l'intensité des dégâts induits sur la qualité de la production restent difficilement prédictibles sur le terrain, ce qui complique la gestion de la maladie. Les conditions de température fraîches et humides sont généralement décrites dans la littérature comme étant favorables à la multiplication des souches Psa. Cependant, ces postulats ne permettent pas de bien anticiper et prédire la sévérité de la maladie, qui reste très variable au cours des saisons et des années. Cette variabilité pourrait être au moins en partie expliquée par des fluctuations de la taille des populations de bactéries au sein d'arbres de kiwis, qui peuvent rester infectés plusieurs mois voire plusieurs années. Il est donc crucial d'élucider précisément l'influence de facteurs environnementaux, tels que ceux liés au climat, sur la taille et la dynamique intra-plante de populations de souches Psa biovar 3, et sur la santé des plantes.

## Objectifs et missions

L'objectif du stage est de déterminer l'effet de facteurs climatiques (i.e. température et humidité relative) sur la taille de populations de souches de *P. syringae* pv. *actinidiae* du biovar 3 au sein de plants de kiwis verts (*A. chinensis* cv. *deliciosa* cv. Hayward), via l'optimisation d'une méthode de qPCR. Ces données apporteront une dimension originale et complémentaire à des données déjà acquises sur les effets de ces paramètres abiotiques sur la sévérité de la maladie du chancre bactérien sur kiwi.

Le stage sera structuré en deux parties dont les objectifs consisteront à i) terminer la mise au point d'un protocole de quantification absolue par qPCR de souches Psa biovar 3, et ii) de mettre en œuvre ce protocole pour analyser la taille de populations de bactéries au sein d'échantillons prélevés sur des plants de kiwis lors de précédentes expérimentations et stockés au -80°C.

Plus précisément, le premier objectif vise à contribuer à l'optimisation du protocole d'extraction d'ADN, et d'évaluer la sensibilité du protocole de qPCR.

La détection et la quantification absolue a été mise au point sur la base d'amorces publiées dans la littérature<sup>9</sup>, du design d'une sonde de type TaqMan-MGB, et de standards correspondant à des dilutions sériées d'extraits d'ADN génomique d'une souche représentative des souches Psa biovar 3. La spécificité de ce protocole pour le biovar 3 a été vérifiée sur la base de suspensions pures d'une large gamme de souches au sein du complexe d'espèces *P. syringae*. Les premiers essais réalisés, à nouveau sur la base de suspensions bactériennes pures, ont montré une sensibilité de détection qui se situe entre  $10^{-4}/10^{-5}$  ng d'ADN. Plusieurs protocoles ont été testés et optimisés pour extraire l'ADN bactérien au sein d'échantillons plus complexes (i.e. limbe foliaire broyé dans du tampon et du glycérol) en tubes individuels. Il s'agira de terminer cette mise au point de façon à sélectionner le protocole qui permettra de i) maximiser la concentration d'ADN extraite tout en limitant la présence de molécules potentiellement inhibitrices de la réaction d'amplification., et de ii) d'augmenter le débit d'analyse *via* la réalisation d'extraction d'ADN en plaques 96 puits, et de qPCR en plaques 384 puits. La dernière étape correspondra en l'évaluation de la sensibilité de détection et de quantification sur le base de divers échantillons, et de déterminer en quelle mesure la quantité d'ADN (ng/ $\mu$ l) de souche Psa biovar 3 estimée en qPCR peut être traduite en une estimation de la taille de la population de bactéries (i.e. CFU/g de matière fraîche).

Le second objectif vise à déterminer l'effet de différentes conditions climatiques sur la taille de la population et sur la distribution *in planta* de bactéries de type Psa Biovar 3.

Des expérimentations ont été précédemment menées en conditions contrôlées (i.e. phytotrons) lors desquelles 240 plants de kiwis femelles (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*) ont été inoculés avec (N=120) ou sans (N=120, témoins négatifs) une suspension d'une souche Psa Biovar 3. Les plants ont été répartis au sein de différents phytotrons permettant de faire varier les régimes de température jour/nuit et l'humidité relative. Les symptômes de nécroses au point d'inoculation, et des traits phénotypiques (e.g. hauteur de plante, nombre de feuille) ont été mesurés sur l'ensemble des plants 15 et 30 jours après inoculation. A ces mêmes dates, une partie des plants a été échantillonnée de façon destructive de façon à collecter pour chaque plant des morceaux de pétioles au niveau des points d'inoculation, et d'autres morceaux de tissus (i.e. limbe foliaire et tige) en périphérie. Ces échantillons ont été broyés individuellement dans du tampon phosphate, et stockés au -80°C avec du glycérol. L'objectif est d'analyser ces échantillons selon le protocole d'extraction d'ADN et d'analyse en qPCR mis au point lors de la première phase afin de déterminer l'effet des conditions climatiques testées sur la taille de la population de bactéries inoculées.

## Activités principales

L'étudiant(e) devra mettre en œuvre ses compétences pour :

- Comprendre le sujet, s'approprier et mettre en place le protocole expérimental
- Participer à la coordination des différentes étapes
- Réaliser en autonomie ou en équipe les différentes étapes du protocole
- Saisir les données et réaliser les analyses statistiques
- Rassembler et mettre en forme les résultats
- Tenir un cahier de laboratoire
- Participer à des réunions avec les encadrants, et les chercheur.e.s, technicien.enne.s et ingénieur.e.s de l'équipe pour planifier et partager le travail
- Communiquer oralement sur son travail lors des réunions de l'équipe
- Rédiger un rapport

## Compétences recherchées

Les compétences recherchées sont :

- Biologie moléculaire (extraction d'ADN, PCR, qPCR, gel d'électrophorèse)
- Phytopathologie, Ecologie
- Microbiologie (fabrication de milieux, repiquage de souches, préparation de suspensions)
- Analyses statistiques, idéalement sur le logiciel R
- Maîtrise de l'outil informatique (pack Office)
- Bon niveau en communication orale et écrite en français ou anglais
- Rigueur scientifique
- Sens de l'organisation, de l'anticipation et du travail en équipe
- Esprit critique et de synthèse
- Adaptabilité, autonomie
- Sens de l'éthique et du relationnel, diplomatie

## Formation

Connaissances en biologie moléculaire, écologie, phytopathologie et microbiologie

Connaissances de bases en matière d'hygiène et de sécurité à respecter dans les laboratoires de microbiologie et biologie moléculaires

## Candidature

Merci d'envoyer toute demande de renseignements, ainsi que votre CV et lettre de motivation (max. 2 pages) décrivant en quoi votre formation et/ou expériences sont en adéquation avec le profil de poste à l'attention de Christelle Lacroix ([christelle.lacroix@inrae.fr](mailto:christelle.lacroix@inrae.fr)).

## Bibliographie

- 1 Lamichhane, J. R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J. M. & Morris, C. Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. *Advances in Agronomy* **126**, 235-295, doi:10.1016/B978-0-12-800132-5.00004-3 (2014).
- 2 Morris, C. E. *et al.* Expanding the Paradigms of Plant Pathogen Life History and Evolution of Parasitic Fitness beyond Agricultural Boundaries. *Plos Pathogens* **5**, e1000693, doi:10.1371/journal.ppat.1000693 (2009).
- 3 Lamichhane, J. R., Messean, A. & Morris, C. E. Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of General Plant Pathology* **81**, 331-350, doi:10.1007/s10327-015-0605-z (2015).
- 4 Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M. & Firrao, G. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular Plant Pathology* **13**, 631-640, doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00788.x (2012).

- 5 Berge, O. *et al.* A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. *PLoS ONE* **9**, e105547, doi:10.1371/journal.pone.0105547 (2014).
- 6 Donati, I. *et al.* New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Journal of Berry Research* **4**, 53-67 (2014).
- 7 Vanneste, J. L. The Scientific, Economic, and Social Impacts of the New Zealand Outbreak of Bacterial Canker of Kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Annual Review of Phytopathology* **55**, 377-399, doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035530 (2017).
- 8 Renzi, M. *et al.* Bacterial Canker on Kiwifruit in Italy: Anatomical Changes in the Wood and in the Primary Infection Sites. *Phytopathology* **102**, 827-840, doi:10.1094/phyto-02-12-0019-r (2012).
- 9 Ruinelli, M. *et al.* Comparative genomics-informed design of two LAMP assays for detection of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and discrimination of isolates belonging to the pandemic biovar 3. *Plant Pathology* **66**, 140-149, doi:https://doi.org/10.1111/ppa.12551 (2017).