

Phytoplasmoses en arboriculture fruitière: diagnostic par PCR en temps réel ou par PCR nichée?

Hélène JOHNSTON¹, Mauro GENINI², Markus BUENTER³ et Santiago SCHAERER¹

¹Agroscope, 1260 Nyon

²Service de l'agriculture, office de l'arboriculture, 1950 Châteauneuf/Sion

³Agroscope, 8820 Wädenswil

Renseignements: Santiago Schaerer, e-mail: santiago.schaerer@agroscope.admin.ch, tél. +41 22 363 43 60, www.agroscope.ch

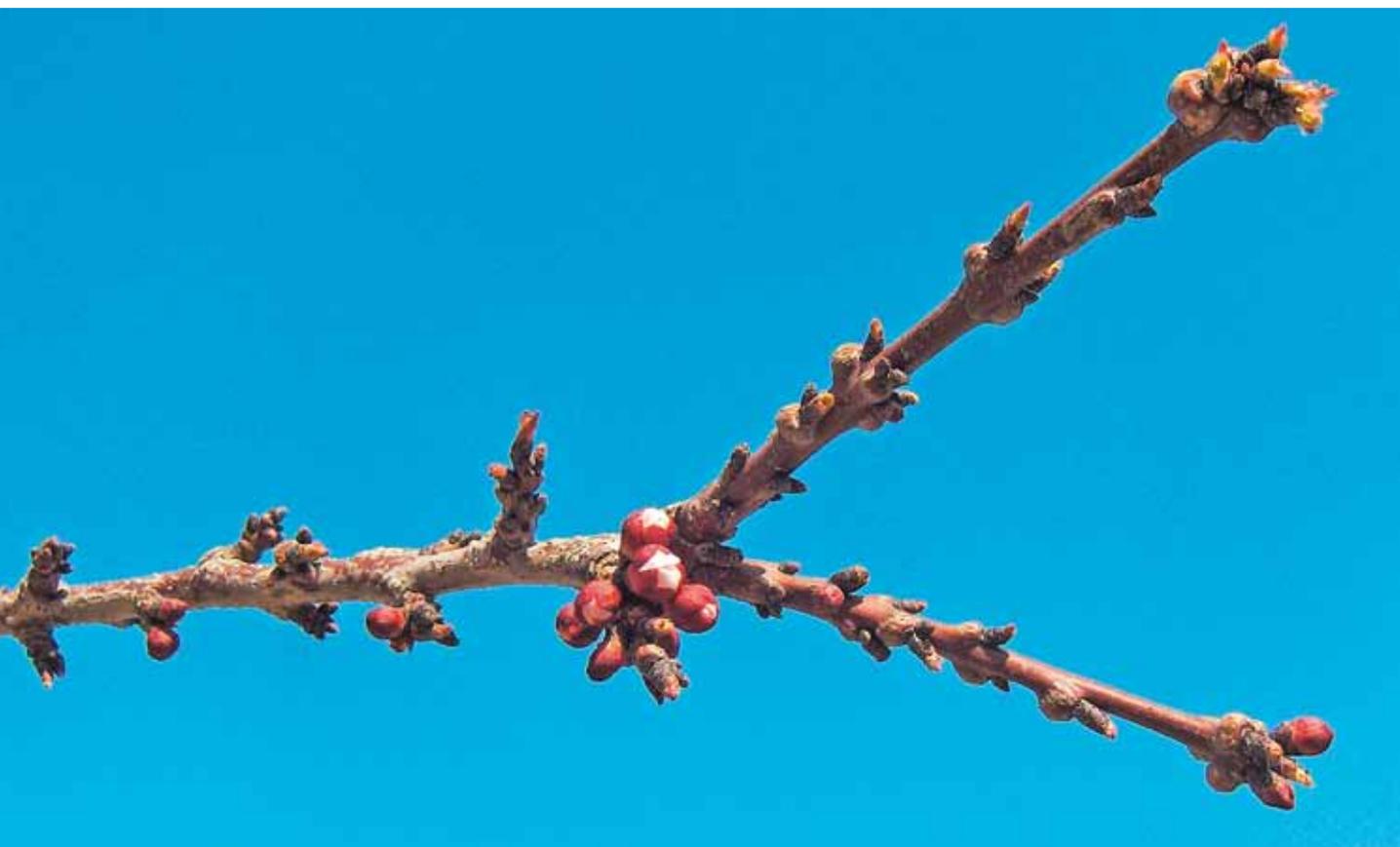


Figure 1 | Débournement précoce sur abricotier Bergarouge (photo Mauro Genini).

Introduction

La présence des phytoplasmes est attestée dès les débuts de l'arboriculture fruitière suisse (voir pour exemple Ramel *et al.* 2001). Parmi les principales maladies à phytoplasmes, citons la prolifération du pommier (ou *apple proliferation AP*), le dépérissement du poirier (ou *pear decline PD*), l'enroulement chlorotique de l'abricotier (ou *European stone fruit yellows ESFY* ou *ECA*). L'agent causal impliqué, un phytoplasme, est *Candidatus phytoplasma mali* pour les pommiers, *C. phytoplasma pyri* pour les poiriers et *C. phytoplasma pruno-*

rum pour les abricotiers. Depuis 2001, ces phytoplasmes sont classés comme organismes de quarantaine.

Bactéries sans paroi, les phytoplasmes se multiplient exclusivement dans le phloème des hôtes végétaux qu'ils parasitent. Leur dissémination, dans la nature ou dans les vergers, est assurée par plusieurs voies: la vécition par des insectes piqueurs-suceurs (psylles), l'utilisation de matériel de greffage contaminé et très probablement l'anastomose racinaire. Les phytoplasmes sont distribués de manière diffuse sur le territoire suisse et touchent particulièrement les vergers à haute-tige (Bünter et Schaerer 2012) de pommiers et de poiriers,

provoquant des pertes considérables par l'arrachage des arbres contaminés, de l'ordre de 35 % (pommiers) et 80 % (poiriers), ainsi qu'en culture d'abricotiers dans le canton du Valais, avec des pertes annuelles estimées à CHF 500 000.–.

Chez les hôtes ligneux, le titre (la concentration) en phytoplasmes est dramatiquement plus bas que chez les plantes herbacées. De plus, la distribution des phytoplasmes n'est pas homogène dans l'arbre et fluctue grandement en fonction des saisons. Ces facteurs rendent le diagnostic difficile en laboratoire et les méthodes sérologiques (ELISA) ou moléculaires (PCR) classiques n'ont pas toujours la sensibilité critique nécessaire pour détecter ces micro-organismes de façon routinière et fiable. Dans le laboratoire de phytoplas-mologie d'Agroscope, à Changins, la méthode de réfé-rence utilisée pour le diagnostic des milliers d'échantil-lons reçus annuellement est la PCR nichée (PCR gigo-gne, PCR emboîtée, nested PCR, abrégée nPCR). La PCR nichée est réalisée en deux étapes successives, avec deux couples d'amorces différents: le premier cible des parties stables du génome des phytoplasmes en géné-ral, tandis que le deuxième couple amplifie à l'intérieur du premier amplicon un ADN permettant d'identifier à quel groupe appartient un phytoplasme donné. Ces dernières années, la question a été soulevée par des milieux phytosanitaires et professionnels concernés, de savoir si la nPCR est, *in fine*, suffisamment sensible, notamment par rapport à certaines évolutions techno-logiques réputées ultra-sensibles, comme la PCR en temps réel (*real time* PCR ou *quantitative real time* PCR, abrégée qPCR). Cet article décrit et analyse une comparaison entre la nPCR et une variante de qPCR, réalisée sur un peu plus d'une centaine d'échantillons prélevés sur des arbres symptomatiques et non sympto-matiques, reçus dans notre laboratoire dans le cadre de contrôles de passeports phytosanitaires et du diagnos-tic de matériel certifié (pépinières arboricoles privées et Agroscope).

Matériel et méthodes

Provenance du matériel végétal

Les échantillons végétaux de pommiers et de poiriers se présentent sous forme de feuilles (quatre feuilles prélevées par arbre et trois arbres groupés par échan-tillon), collectées sous la supervision de Markus Bün-ter d'Agroscope. Ces arbres faisaient l'objet de contrôles de passeports phytosanitaires auprès d'un pépinière et dans le cadre d'une collection liée à un projet Plan d'ac-tion national (PAN). Les échantillons d'abricotier, des racines, sont prélevés sous la supervision de Mauro

Résumé

La PCR nichée et la PCR en temps réel sont des techniques utilisées en routine pour diagnostiquer les phytoplasmoses en arboriculture fruitière. La première méthode, utilisée dans le laboratoire de phytoplas-mologie d'Agroscope, à Changins, a été comparée à la deuxième sur cent seize pommiers, poiriers et abricotiers. Le test montre que la PCR en temps réel est un peu plus précise. Cette faible différence peut cependant avoir un impact important dans la production de matériel végétal arboricole certifié. Cependant, le facteur d'imprécision le plus déterminant se révèle lié au mode d'échantillonnage choisi.

Genini, du Service de l'agriculture du canton du Valais. Ces échantillons font partie des collections d'Agroscope (site de Conthey) et cantonales (à Châteauneuf). Les échantillons ont été collectés entre septembre 2011 et mars 2012.

Préparation des ADN

Les échantillons végétaux (500 mg de pétioles et de nervures pour les feuilles, ou 500 mg de copeaux raci-naires pris juste sous le cortex) sont broyés à l'aide d'un homogénéisateur Homex 6 (Bioreba) dans 5 ml de tam-pou d'extraction (200 mM Tris.Cl pH 8.0, 100 mM EDTA, 0,5 % Tween 20, 50 µg/ml protéinase K). Une fraction brute de 1 ml par échantillon est transférée dans un tube, congelée à l'azote liquide et déstructurée par sonication (1 min à 30 Hz) dans une station TissueLyser (Qiagen). Après deux incubations (30 min à 50 °C, puis 20 min à 85 °), les tubes sont centrifugés (7500 rpm, 5 min). Pour chaque échantillon, 200 µl de surnageant sont transférés dans une station de purification Bio-Sprint 96 (Qiagen), où les ADN purifiés sont resuspen-dus dans 200 µl d'eau, puis conservés à -20 °C.

Amplification par nPCR

La première amplification est réalisée dans un thermo-cycleur TProfessional (Biometra), dans un volume réac-tionnel de 25 µl, comprenant entre autres 2 µl d'ADN purifié (~80 ng), 1 U de GoTaq polymérase (Promega) et les amorces universelles P1 et P7 (Schneider *et al.* 1995) à 1 µM. Les paramètres d'amplification sont: dénatura-tion initiale de 2 min à 94 °C, suivie de 35 cycles de dé-naturation (94 °C, 1 min), hybridation (57 °C, 1 min) et polymérisation (72 °C, 1,5 min). La deuxième amplifica-tion est réalisée dans un volume de 25 µl, comprenant

entre autres 1 μ l du produit d'amplification P1/P7, 1 U de GoTaq polymérase (Promega) et les amorces spécifiques fO1 et rO1 (Lorenz *et al.* 1995) à 1 μ M. Les paramètres d'amplification sont: dénaturation initiale de 1 min à 94 °C, suivie de 40 cycles de dénaturation (94 °C, 15sec), hybridation (52 °C, 15sec) et polymérisation (72 °C, 30sec). Les amplicons (taille attendue: 1071 pb) sont visualisés en lumière UV sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium.

Amplification par qPCR

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research). La réaction (25 μ l) comprend le mélange réactionnel SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline), 20 ng d'ADN purifié, l'amorce universelle P1 et l'amorce spécifique R16(X)F1r (Torres *et al.* 2005), toutes deux à 0,2 μ M. Les conditions d'amplification sont: pré-dénaturation de 10 min à 95 °C, suivie de 35 cycles de dénaturation (95 °C, 15sec), hybridation (60 °C, 30sec) et polymérisation (72 °C, 30sec). L'identité du produit amplifié (217 pb) peut être visualisée sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium.

Résultats

Amplification d'ADN par PCR nichée ou en temps réel

Les figures 2, 3 et 4 présentent des exemples de réactions, sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium ou après analyse dans le Rotor-Gene.

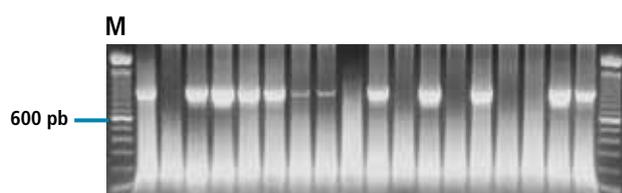


Figure 2 | Amplicons obtenus en nPCR à partir d'échantillons racinaires d'abricotier.
M = marqueurs de taille moléculaire, pb = paires de bases.

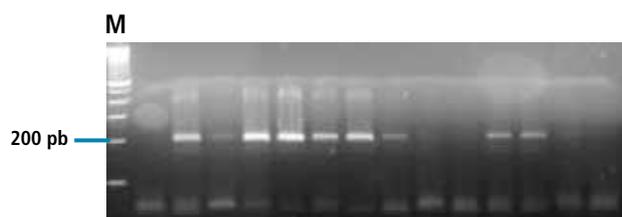


Figure 3 | Vérification de la conformité des amplicons obtenus par qPCR à partir d'échantillons d'abricotier.
M = marqueurs de taille moléculaire, pb = paires de bases.

En nPCR, la présence ou l'absence d'un amplicon de taille attendue (1071 paires de bases) détermine si un échantillon est positif ou négatif. En cas de doute, l'analyse est répétée. En qPCR, une réaction positive se détecte par l'accumulation d'un signal fluorescent (SYBR Green). Le seuil Ct (cycle threshold) définit le nombre de cycles d'amplification requis pour que le signal fluorescent dépasse la valeur du bruit de fond. Les valeurs de Ct étant inversement proportionnelles à la quantité initiale d'ADN cible, des Ct <29 caractérisent des échantillons fortement positifs; des Ct compris entre 30 et 37 correspondent à des échantillons positifs; des Ct de 38 à 40 indiquent des échantillons très faiblement positifs à douteux.

Comparaison entre nPCR et qPCR

Cent seize échantillons prélevés sur des pommiers, des poiriers et des abricotiers, préalablement analysés dans le cadre du diagnostic de matériel de collection (vieilles accessions) ou certifié, ont été repris pour cette étude comparative (tabl.1).

La plupart des échantillons ont été déclarés négatifs à la première analyse, même si certains arbres montraient des symptômes les différenciant clairement des arbres sains.

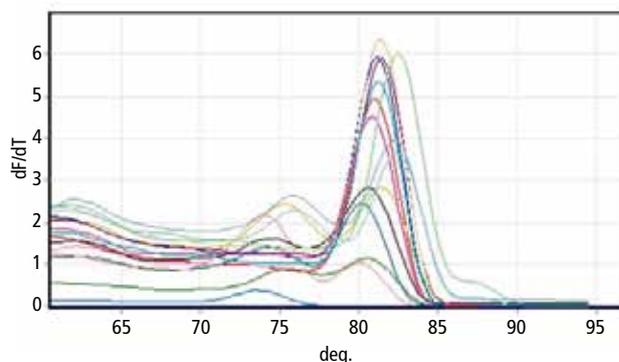


Figure 4 | Courbes de melting (= dissociation de deux brins homologues d'ADN) obtenues en qPCR à partir d'échantillons d'abricotier.

Tableau 1 | Nombre d'échantillons positifs diagnostiqués sur pommiers, poiriers et abricotiers, après analyse par nPCR et qPCR

Arbre	Nombre	Organe prélevé	Positifs en nPCR	Positifs en qPCR
Pommier	23	feuilles	1	1
Poirier	3	feuilles	0	0
Abricotier	30	feuilles	9	11
Abricotier	60	racines	18	21

Les ADN, conservés à -20°C , ont été ré-analysés en nPCR, avec des résultats identiques (les échantillons positifs restent positifs, les échantillons négatifs sont toujours négatifs). L'analyse de ces mêmes ADN en qPCR confirme le diagnostic précédent, dans ce sens que tous les échantillons positifs en nPCR le sont aussi en qPCR. Par contre, cinq échantillons auparavant négatifs sont diagnostiqués positifs en qPCR, avec des Ct oscillant entre 35 et 36. Sur la base de ces données, nous concluons que la PCR en temps réel (en SYBR Green) détecte davantage de positifs que la PCR nichée. La différence, cinq arbres sur 116, est de 4,3 %.

Discussion

La PCR en temps réel (en SYBR Green) présente des avantages par rapport à la PCR nichée: une seule PCR au lieu de deux, l'abandon des gels d'agarose et du bromure d'éthidium (cancérigène) au profit du traitement informatisé et instantané des résultats dans la machine, des cycles de dénaturation/hybridation/polymérisation très raccourcis. Cependant, les campagnes de diagnostic auprès des filières de production certifiée en arboriculture fruitière produisent des milliers d'échantillons à analyser (entre 2010 et 2012, 1000 à 1400 arbres ont été testés par an). Plus de 90 % du temps en laboratoire est consacré à préparer et à conditionner les tissus végétaux (étiquetage, taille et pesage), avant de pouvoir en extraire et purifier l'ADN. Sur ce point, le gain de temps offert par la qPCR est finalement minime. Les coûts respectifs des thermocycleurs utilisés sont aussi un facteur à considérer (un Rotor-Gene est environ sept fois plus cher qu'un thermocycleur classique).

La différence de cas positifs obtenue entre nPCR et qPCR est de 4,3 %. Ce faible écart n'a vraisemblablement que peu de conséquences pour les campagnes d'assainissement (éradication d'arbres malades) effectuées dans le cadre des contrôles de passeports phytosanitaires. Cependant, il pourrait avoir un impact significatif dans la production de matériel arboricole certifié, notamment au niveau des parcelles P2, où les arbres-mère peuvent produire annuellement des centaines, voire des milliers de greffons. Cependant, tous les greffons provenant d'un arbre malade ne sont pas forcément contaminés par le phytoplasme causal, comme le montre l'indexage de matériel ligneux malade, notamment sur vigne.

Même avec un diagnostic par qPCR, des arbres contaminés passeraient sûrement encore à travers les mailles du test et seraient déclarés négatifs. Cette erreur proviendrait davantage des limites rencontrées sur le terrain que de problèmes de sensibilité de la

technique analytique. Ces limites ont trait à la variabilité des symptômes liée aux variétés fruitières et aux paramètres pédoclimatiques, au comportement du phytoplasme dans la plante hôte et à la difficulté de prélever de «bons» échantillons, permettant un diagnostic fiable et précis dans 100 % des cas.

La prise d'échantillons sur des arbres n'est pas une mince affaire, puisqu'elle se base autant que possible sur la présence de symptômes qui indiquent quel arbre cibler et à quel endroit prélever sur la plante. La symptomatologie manque de clarté dans de nombreux cas et influe indéniablement et négativement sur la qualité du diagnostic. Par exemple, un symptôme typique de l'ESFY, le débourrement précoce de l'abricotier (fig.1), est rarement visible en Suisse, alors qu'on l'observe facilement plus au sud de l'Europe. A l'inverse, un symptôme plus commun tel que le rougissement prononcé d'un arbre (fig. 5) ne trahit pas spécifiquement une phytoplasme. Dans le cas du poirier, il n'existe pas de symptôme fiable pour diagnostiquer visuellement le PD (Jarausch et Jarausch 2010). Enfin, il est facile de passer à côté de stipules foliaires surdimensionnées (fig. 6), un symptôme fiable de l'AP, et de prélever à la place des feuilles normales.

L'analyse systématique de centaines d'échantillons d'abricotier prélevés sur différents tissus ou organes (racine, rameau, bois de deux ans, feuille, fleur, fruit



Figure 5 | Rougissement prononcé du feuillage dans un verger de poiriers (photo Markus Bünter).



Figure 6 | Stipules surdéveloppées sur une feuille de pommier malade (photo Südtiroler Beratungsring für Obst- und Weinbau).

vert, fruit mûr) et sur différentes variétés, à des moments différents durant la saison de culture (Genini et Schaerer, résultats non publiés), montre que la présence des phytoplasmes varie selon les saisons et les tissus ou les organes. Ainsi, un échantillon prélevé sur un arbre malade, mais au mauvais moment ou à un endroit inapproprié, peut mener à un diagnostic négatif.

De façon générale, la symptomatologie – et ainsi la prise d'échantillons – des arbres malades est délicate à établir à cause de la présence irrégulière et intermittente des phytoplasmes dans leurs hôtes ligneux (Rekab *et al.* 2010). De plus, le titre en phytoplasmes est beaucoup plus faible chez les hôtes ligneux que chez les plantes herbacées; les mêmes auteurs ne relèvent pas de corrélation directe entre le titre en phytoplasmes dans le phloème et la sévérité de la maladie ou l'expression de symptômes.

Chez de nombreuses Rosacées ligneuses (Seemüller et Harries 2010; Schaerer et Bünter 2013), les faisceaux libériens dégénèrent en hiver: le phytoplasme est contraint de migrer dans le système racinaire, où des éléments fonctionnels de phloème persistent tout au long de l'année. La tige et la frondaison sont recolonisées par le phytoplasme au printemps suivant. Cette recolonisation extrêmement variable influe également sur l'expression des symptômes, et donc sur la prise d'échantillons. Enfin, une rémission plus ou moins durable des symptômes, au bout de quelques années, est possible et observée. Les arbres restent cependant infectés, à l'état latent (porteurs sains).

Compte tenu de toutes ces restrictions, comment faire pour améliorer la qualité du diagnostic? Une approche consiste à prélever suffisamment de matériel par arbre, par exemple une centaine (ou plus) de feuilles réparties sur l'ensemble du feuillage. Si cette approche maximise la probabilité de détecter le phytoplasme, elle est en revanche très gourmande en ressources. Vu les quantités de matériel végétal à traiter, l'automatisation de l'extraction et celle de la purification d'ADN deviennent impraticables, si bien que seuls un nombre réduit d'échantillons peuvent être traités simultanément.

L'amélioration du diagnostic passe aussi par le choix de l'organe ou du tissu le plus susceptible de révéler la contamination par le phytoplasme. Ainsi, pour l'abricotier et dans les conditions du Valais, c'est la racine, en fin d'automne, qui donne les meilleurs résultats (Genini et Schaerer, résultats non publiés). Dans le sud de la France, le tissu le plus communément prélevé est le bois de deuxième année (Nicolas Sauvion, INRA Montpellier, comm. pers.). Cependant, le prélèvement et l'extraction de racines ou de bois mobilisent davantage de ressources, sur le terrain comme en laboratoire.

Les phytoplasmoses sont des maladies complexes, dont la difficulté d'échantillonner ne représente qu'une des facettes. A l'heure actuelle, le type d'échantillonnage est plus déterminant que la technique d'analyse. L'échantillonnage conditionne ce que l'on veut montrer. Par exemple, le prélèvement d'un nombre réduit de feuilles par arbre, sur tous les arbres d'une pépinière, fournira une vue détaillée (arbre par arbre) de l'état phytosanitaire de l'exploitation, mais avec une certaine imprécision vu le peu de matériel prélevé par arbre. Prélever davantage de feuilles par arbre, mais sur seulement 5 ou 10 % des arbres (sondage), fournira une autre information sur l'état phytosanitaire du verger, avec une imprécision cette fois-ci liée au nombre restreint d'arbres analysés. Ces imprécisions restent pour l'instant inévitables, malgré les efforts constants consentis pour en diminuer l'impact.

Conclusions

- Un test comparatif entre PCR nichée et PCR en temps réel (SYBR Green) portant sur 116 arbres fruitiers montre que la qPCR est plus précise que la nPCR.
- La différence enregistrée entre les deux techniques est de cinq arbres, soit 4,3 % des échantillons testés.
- Cette différence de sensibilité a vraisemblablement peu d'importance pour les campagnes d'assainissement dans le cadre des contrôles de passeports phytosanitaires, mais peut avoir un impact significatif dans la production de matériel arboricole certifié, notamment au niveau d'un conservatoire et des parcelles P1 et P2.
- Plus que ces deux techniques ultra-sensibles, il s'avère que c'est le type d'échantillonnage qui détermine le degré de précision du contrôle phytosanitaire d'un verger donné. ■

Remerciements

Les auteurs remercient Gérard Devènes (Agroscope Conthey) pour son assistance dans la récolte et la préparation des échantillons racinaires.

Bibliographie

- Bünter M. & Schaerer S., 2012. Phytoplasmes en arboriculture. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **44** (1), 21.
- Jarausch B. & Jarausch W., 2010. Psyllid Vectors and their Control. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. P. G. Weintraub & P. Jones (Eds), CAB International, 250–271.
- Lorenz K.-H., Schneider B., Ahrens U. & Seemüller E., 1995. Detection of Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathology* **85** (7), 771–776.
- Ramel M.-E., Gugerli P., Bourquin J., De Meyer J. & Schaub L., 2001. Caractérisation de l'enroulement chlorotique de l'abricotier et détection du phytoplasme ESFY en Suisse romande. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **33** (5), 279–286.

Summary**Phytoplasma-related diseases in fruit growing: diagnosis by real time PCR or by nested PCR?**

Nested PCR and real time PCR are routinely used techniques for the diagnosis of phytoplasma-related diseases in fruit growing. The first variant, used in Agroscope's laboratory of phytoplasma, in Changins, was compared to the second variant, using one hundred and sixteen apple, pear and apricot trees. The test shows that real time PCR is more accurate than nested PCR, but marginally so. This small difference may have significant impact on the production of certified fruit plant material. However, the main factor determining the extent of the imprecision appears to be linked to the type of sampling chosen.

Key words: *Candidatus phytoplasma mali*, *Candidatus phytoplasma pyri*, *Candidatus phytoplasma prunorum*, apple proliferation, pear decline, European stone fruit yellows, apple, pear, apricot.

Zusammenfassung**Phytoplasmen im Obstbau: Vergleich zwischen Diagnostik mit «real time» PCR und mit «nested» PCR**

Nested PCR und real-time PCR-Techniken werden routinemässig zur Diagnose von Phytoplasmosen, wie Apfelfriebsucht, Birnenverfall und Europäische Steinobstvergilbungs-Krankheit im Obstbau verwendet. Die erste Variante, welche im Agroscope Phytoplasma Labor in Changins verwendet wird, wurde mit der zweiten Variante anhand von hundertsechzehn gleichen Apfel-, Birnen- und Aprikosen-Verdachtsproben verglichen. Der Vergleich zeigt, dass die Diagnose mit real time PCR ca. 4 % genauer ist als die Diagnose mit nested PCR. Dieser kleine Unterschied kann in P2-Edelreiserschnittgärten erhebliche Auswirkungen auf die Vermehrung von zertifiziertem Obst Jungpflanzen haben. Allerdings scheint der Termin und die Art und Weise der Probenahme noch eine viel wichtigere Auswirkung auf die Resultat-Genauigkeit zu haben als die unterschiedlichen Diagnosearten.

Riassunto**Fitoplasmii in frutticoltura: diagnostica con PCR in tempo reale o con PCR nidificata?**

La PCR nidificata e la PCR in tempo reale sono delle tecniche abitualmente utilizzate per la diagnostica di fitoplasmii in frutticoltura. La prima tecnica utilizzata nel laboratorio di fitoplasmologia di Agroscope a Changins è stata confrontata con la seconda su centosedici meli, peri e albicocchi. Il test mostra che la PCR in tempo reale è di poco più precisa. Questa debole differenza può comunque avere delle ripercussioni significative nella produzione di materiale vegetale frutticolo certificato. Tuttavia, il fattore d'imprecisione più determinante si rivela in realtà legato al modo di campionamento scelto.

- Rekad D., Pirajno G., Cettul E., De Salvador F.R. & Firrao G., 2010. On the apple proliferation symptom display and the canopy colonization pattern of "*Candidatus Phytoplasma mali*" in apple trees. *European Journal of Plant Pathology* 127, 7–12.
- Schaerer S. & Bünter M., 2013. Prolifération du pommier. Fiche 1-2-004, Ed. AMTRA.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C. D. & Kirkpatrick B. C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Vol. 1. S. Razin & J. G. Tully (Eds), Academic Press, 369–380.
- Seemüller E. & Harries H., 2010. Plant Resistance. *In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. P. G. Weintraub & P. Jones (Eds), CAB International, 147–169.
- Torres E., Bertolini E., Cambra M., Montón C. & Martín M. P., 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19, 334–340.