



# L'UTILISATION DE LA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION), UN TEST DE LABORATOIRE PLUS RAPIDE POUR DÉTECTER *ERWINIA TRACHEIPHILA*, BACTÉRIE RESPONSABLE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN CHEZ LES CUCURBITACÉES

Cindy Dallaire, agronome-phytopathologiste  
Direction de la phytoprotection

## PLANTES HÔTES ET SYMPTÔMES

La bactérie *Erwinia tracheiphila* est responsable du flétrissement bactérien (« bacterial wilt ») chez certaines cucurbitacées. Les principaux hôtes de la bactérie sont le concombre, la courge, le zucchini et la citrouille (Blancard *et al.*, 1991; Factsheet Cornell University; Ferreira et Boley, 1992). Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, *Erwinia tracheiphila* a été détecté à 90 reprises majoritairement dans la culture du concombre et de la courge, moins fréquemment chez la citrouille et le zucchini et très rarement chez le cantaloup et le melon d'eau. La bactérie est rapportée en Amérique du Nord, au nord de l'Europe, au sud de l'Afrique et au Japon (Blancard *et al.*, 1991; Ferreira et Boley, 1992).

Les plants affectés par *Erwinia tracheiphila* présentent un flétrissement ainsi que des plages vert foncé sur les feuilles. Par la suite, le flétrissement s'intensifie et des brûlures brunes entre les nervures secondaires formant un « V » peuvent être observées suivi de la mort éventuelle de la plante (photos a, b et c) (Blancard *et al.*, 1991; Petoseed, 1988; Zitter *et al.*, 1996). Les symptômes apparaissent durant tout le développement du plant, mais le flétrissement est plus sévère tôt en saison lorsque les plants sont en pleine croissance. *Erwinia tracheiphila* n'est pas pectinolytique, il n'y a donc pas de pourriture molle. Par contre, les symptômes peuvent être confondus avec d'autres maladies vasculaires causées par des champignons tels que *Fusarium oxysporum* et *Verticillium dahliae*.



a) Brûlures brunes entre les nervures secondaires

Source : T.A. Zitter, Cornell University



b) Flétrissement des plants causé par la bactérie *Erwinia tracheiphila*

Source : R.X. Latin, Purdue University



c) Brûlures brunes entre les nervures secondaires

Source : T.A. Zitter, Cornell University

## CYCLE DE VIE

La bactérie est transmise par des insectes bien connus qui se nourrissent de ces plantes. Ces vecteurs sont la chrysomèle rayée (*Acalymma vittatum*) et la chrysomèle maculée (*Diabrotica undecimpunctata*). *Erwinia tracheiphila* se loge dans le tube digestif de la chrysomèle et elle peut ainsi survivre tout l'hiver parce que ces insectes hivernent sous la forme d'adultes (Blancard *et al.*, 1991) (figure 1 a). Elle peut aussi subsister d'un à trois mois dans des résidus végétaux, mais sans plus. Au printemps, la bactérie est dispersée d'un plant à l'autre par la contamination fécale ou par des blessures d'alimentation des chrysomèles (figure 1 b). Contrairement à d'autres maladies vasculaires, *Erwinia tracheiphila* descend vers les pétioles et

les tiges (Blancard *et al.*, 1991; Riggs *et al.*, 2003). Elle se multiplie dans le xylème et cause le blocage du transport de l'eau dans le système et le flétrissement débute (figure 1 c). La bactérie se propage dans toutes les parties aériennes par les vaisseaux conducteurs, le plant entier flétrit et meurt (figure 1 c). La maladie n'est pas transmise par la semence (Blancard *et al.*, 1991). Le taux de multiplication des bactéries est très rapide lorsque les plants sont jeunes et succulents (Zitter *et al.*, 1996). Au Laboratoire de diagnostic, afin de vérifier la présence de la bactérie, un examen microscopique est effectué. La tige est coupée transversalement et une sécrétion laiteuse, parfois gluante, se transforme en un fil s'étirant d'une coupe à l'autre (figure 1 d) (Blancard *et al.*, 1991; Factsheet Cornell University; Petoseed, 1988).

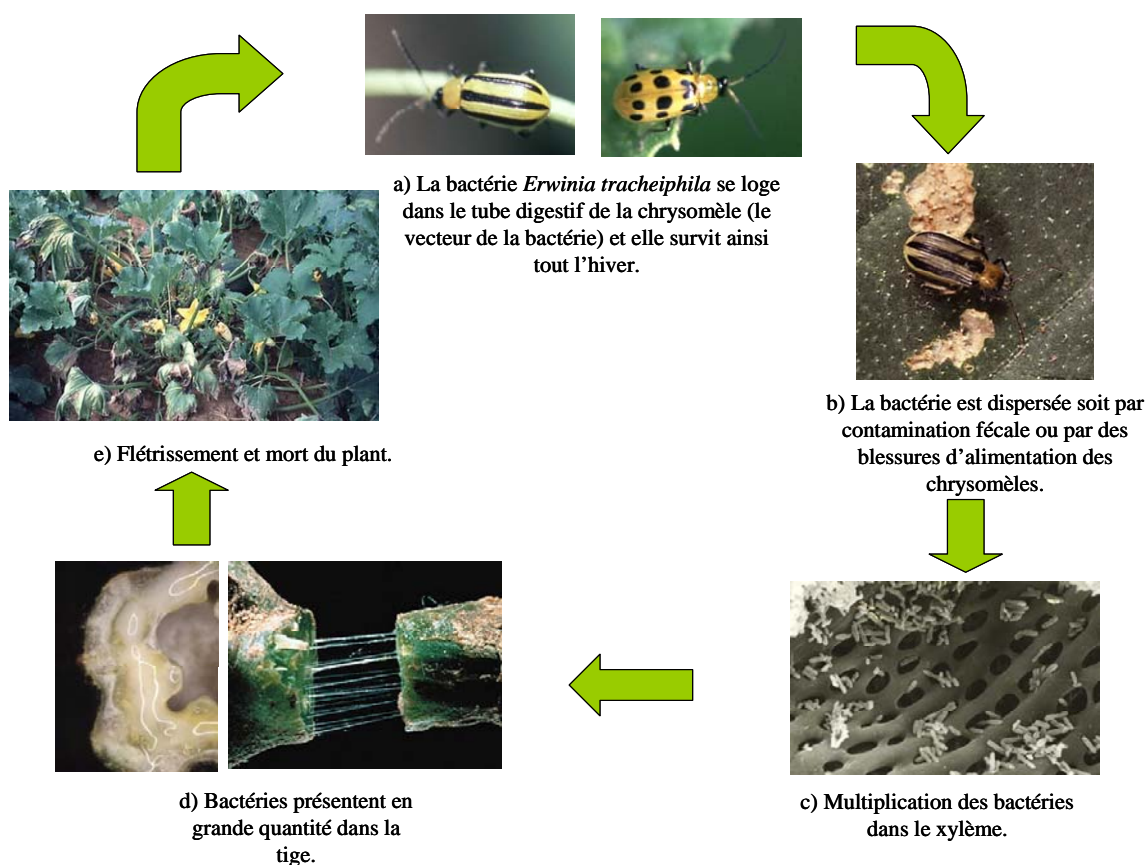


Figure 1 a), b), c), d) et e) : Cycle de vie de la bactérie *Erwinia tracheiphila*.

Tiré de : Poster de T.A. Zitter et M.M. Kennelly, Department of plant pathology, Cornell University (<http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/factsheets/BWCyclePoster.htm>)

Des segments de tige lavés sont ensuite mis à tremper dans très peu d'eau et la suspension est examinée au microscope après quelques heures pour rechercher des bactéries. La bactérie étant difficile à faire croître sur gélose, nous vérifions son pouvoir pathogène par une inoculation sur des plantules de concombre. Une incubation de 7 à 14 jours est nécessaire pour l'obtention d'un résultat. À partir du printemps 2010, un nouveau test PCR sera disponible pour la détection d'*Erwinia tracheiphila*. Ce nouvel outil de diagnostic pour détecter le flétrissement bactérien chez les cucurbitacées sera plus rapide et fiable.

### PROTOCOLE DE LA PCR UTILISÉE AU LABORATOIRE POUR DÉTECTER LA BACTÉRIE *ERWINIA TRACHEIPHILA*

La technique de vérification du pouvoir pathogène mentionnée ci-dessus est fiable, mais le résultat du test est trop long à obtenir. C'est pourquoi la PCR (polymerase chain reaction) a été développée en se basant sur l'article scientifique de Bruton *et al.* (1999) et une communication personnelle avec Monsieur Ron Marble (Lane-Ag Center).

### EXTRACTION DE L'ADN BACTÉRIEN

La première étape consiste à extraire l'ADN de la bactérie *Erwinia tracheiphila*. Les morceaux de tiges symptomatiques sont coupés et broyés dans la saline. Ceci permet de briser les cellules et de libérer ainsi la bactérie. Par la suite, 300 µl du broyat sont récupérés et mélangés à 1 ml du réactif DNAzol afin d'extraire l'ADN. Le mélange est centrifugé et le surnageant est récupéré et mélangé à de l'éthanol 100 % afin de précipiter l'ADN extrait. L'ADN est alors lavé avec de l'éthanol 95 % et séché à l'aide d'un dessiccateur rotatif (« speed vac »). Finalement, il est solubilisé avec du NaOH et du HEPES.

### AMPLIFICATION DES FRAGMENTS CIBLES DE L'ADN

Après l'extraction de l'ADN, il y a amplification du fragment cible par PCR. Afin de mieux comprendre les différentes étapes de la PCR, vous pourrez consulter l'actualité sur le site Agri-Réseau qui sera en ligne prochainement.

Un mélange des réactifs suivants est nécessaire pour réaliser la PCR : eau HPLC stérile, tampon polymérase (1 X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), blotto (0,2 %), des désoxyribonucléotides communément appelés DNTP's (200 µM), la paire d'amorces ET-1 et ET-2 (0,2 µM), Taq (5 U) et l'ADN bactérien extrait. Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, les amorces choisies pour détecter l'ADN cible d'*Erwinia tracheiphila* correspondent à la référence Bruton *et al.* (1999) et Ron Marble (communication personnelle). Voici la séquence de la paire d'amorces :

ET-1 : 5' – TGA GTT CCC GAC CAA AT – 3'  
ET-2 : 5' – GGG AGG AAG GGA CGC TG – 3'

Une fois le mélange réalisé, il est distribué dans des microtubes.

Afin de valider les résultats, des témoins sont toujours utilisés :

- Un témoin négatif d'amplification : eau HPLC stérile.
- Un témoin positif d'amplification : ADN déjà extrait et identifié par PCR.
- Un témoin positif d'extraction : plant de concombre flétri inoculé avec la bactérie *Erwinia tracheiphila*.

Les microtubes contenant le mélange de réactifs et l'ADN extrait sont déposés dans un thermocycleur, aussi appelé cycleur thermique, afin de multiplier en grande quantité la séquence cible. Des cycles répétés de dénaturation, d'hybridation et d'élongation y sont opérés (tableau 1).

**Tableau 1. Cycle d'amplification de l'ADN d'*Erwinia tracheiphila*.**

Étapes	Température (°C)	Temps (minutes)
Dénaturation initiale des brins d'ADN	94	3
Dénaturation*	94	1 minute et 30 secondes
Hybridation*	55	1 minute et 30 secondes
Élongation*	72	1 minute et 30 secondes
Élongation finale	72	10

\* Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont refaites 35 fois.

## VISUALISATION DE L'ADN BACTÉRIEN

La visualisation de la présence ou non de l'ADN d'*Erwinia tracheiphila* dans un échantillon se fait par la technique électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose 2 %.

Lors de la mise en puits des produits d'amplification, une solution de Bleu Endo-R-Stop 10 X est ajoutée dans chacun des microtubes afin de suivre la migration des produits dans le gel d'agarose. Le premier puits contient l'échelle des standards (1 Kb) qui permet d'interpréter les bandes d'acides nucléiques obtenues et de vérifier si elles correspondent bien à l'ADN d'*Erwinia tracheiphila*.

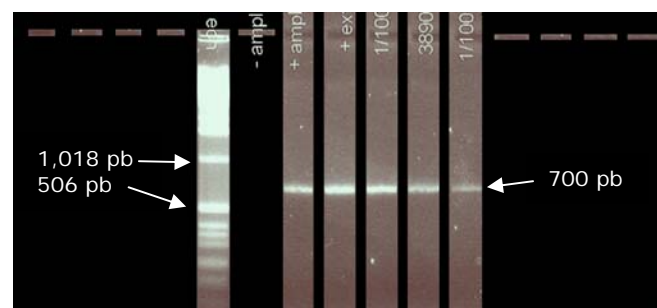
Afin de visualiser les bandes, le gel d'agarose est coloré au bromure d'éthidium (2 µg/ml) pendant 10 à 20 minutes en l'agitant doucement à la noirceur. Le gel est rincé durant 20 minutes dans l'eau distillée toujours en l'agitant. Puis, une photographie est prise au moyen du programme AlphaImager, ou un autre programme disponible sur le marché, qui permet de révéler les bandes à la lumière ultraviolette.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le fragment de l'ADN d'*Erwinia tracheiphila* amplifié avec les amorces ET-1 et ET-2 contient environ 700 paires de bases (pb) (photo 2). Il est primordial de vérifier à l'aide de l'échelle des

standards (1 Kb) si le résultat obtenu correspond à cette valeur.

De l'extraction de l'ADN à l'interprétation des résultats, un total d'environ 2 jours est nécessaire.



**Photo 2.** Gel d'agarose présentant, sous la forme de bandes, l'ADN amplifié d'*Erwinia tracheiphila*. Les témoins et les échantillons montrent une bande à la hauteur de 700 paires de base.

**Source :** Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ.

Afin d'obtenir plus de détails concernant la méthode, il est possible de contacter le Laboratoire de diagnostic en phytoprotection pour obtenir le protocole complet de réalisation.

## RÉFÉRENCES

Blancard D., Lecoq H. et Pitrat M. 1991. Maladies des cucurbitacées. Observer, identifier et lutter. INRA. Pp. 301.

Bruton B., Melcher U., Zitter T., Pair S., Fletcher J. et Mitchell. 1999. Polymerase chain reaction for detection of *Erwinia tracheiphila* in cucurbits. Phytopathology 89:S10.

Factsheet Cornell University. Plant disease diagnostic clinic. Bacterial wilt (*Erwinia tracheiphila*) of cucurbits.

Ferreira S. et Boley R. 1992. *Erwinia tracheiphila*. University of Hawaii.

<http://plantclinic.cornell.edu/factsheets/bactwiltccbts/bactwiltccbts.htm>

[http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/e\\_trach.htm](http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/e_trach.htm)

Petoseed. Cucurbit diseases. A practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. 1988. Pp. 44.

Riggs D., Robinson R., Howell J., Reiners S., McClurg C., Rouse R., Wien H., Glatz R., Morse R., Zitter T., McGrath M., Everts K., Hoffmann M., Curtis P. et Hadcock S. 2003. Pumpkin production guide. NRAES. Pp. 152.

Zitter T., Hopkins D. et Thomas C. 1996. Compendium of cucurbit diseases. APS Press. Pp. 87.

Ce document a été révisé par Gérard Gilbert, agronome-phytopathologiste et Lise Vézina, technicienne de laboratoire. Mise en page du document par Carolle Fortin, technicienne en administration. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

Québec, le 17 novembre 2009

Vous retrouverez ce document sur le site [Agrireseau.qc.ca](http://Agrireseau.qc.ca)

