



DIAGNOSTIC DE LA TACHE ANGULAIRE « ANGULAR LEAF SPOT » CHEZ LE FRAISIER CAUSÉE PAR *XANTHOMONAS FRAGARIAE* À L'AIDE DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE « POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) »

Cindy Dallaire, agronome-phytopathologiste
Marrion Berrouard, technicienne de laboratoire
Ann-Marie Breton, technicienne de laboratoire

Direction de l'innovation scientifique et technologique

La bactérie gram-négative *Xanthomonas fragariae* cause la tache angulaire chez le fraisier (angular leaf spot). Cette maladie a été diagnostiquée pour la première fois au Minnesota, en 1960 (Heidenreich et Turechek). Aujourd'hui, on la retrouve en Amérique, en Afrique, en Europe et en Asie (Diagnostic protocols for organism harmful to plants, Diagnosis of *Xanthomonas fragariae*; EPPO et CABI; Maas, 1984; Pests and diseases image library).

Cette maladie est importante chez le fraisier (Lambert *et al.*, 2007). Une diminution du rendement peut être occasionnée amenant jusqu'à 75% de la perte des fruits (Diagnostic protocols for organism harmful to plants; EPPO et CABI). En plus du fraisier, la bactérie s'attaque à la potentille (Diagnostic protocols for organism harmful to plants).

L'infection est favorisée par une humidité élevée, de fortes pluies, l'irrigation, la rosée, des températures se situant entre 15 et 20°C le jour, et près du point de congélation (2 à 4°C) la nuit (EPPO et CABI; Lambert *et al.*, 2007; Maas, 1984; Pests and diseases image library; Strand, 1994; University of Florida). La bactérie peut survivre sur les feuilles mortes et initier les

premières infections. En effet, elle est très résistante à la dessiccation, ce qui lui permet de survivre pendant de longues périodes dans des feuilles sèches, infectées ou enfouies dans le sol. Pendant la saison, des infections secondaires surviennent. Les bactéries émergent des lésions lors de forte humidité et elles sont alors disséminées sur les plants par des éclaboussures comme la pluie ou l'irrigation, la rosée et le vent (Lambert *et al.*, 2007; Maas, 1984). Elle peut infecter les feuilles par les stomates et quelques fois les fleurs, les sépales des fruits et le collet (EPPO et CABI).

SYMPTÔMES

Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, *Xanthomonas fragariae* a été détecté à 48 reprises dans les feuilles, de 1988 à 2007. La bactérie cause plus rarement des symptômes au niveau des fleurs et du collet (Diagnostic protocols for organism harmful to plants). Ce sont les plus jeunes et les plus vieilles feuilles du plant qui sont résistantes à l'infection (Diagnostic protocols for organism harmful to plants).

Comme l'indique le nom de la maladie, les premiers symptômes sont des taches angulaires, d'un vert translucide à la face inférieure des feuilles et petites (un diamètre variant entre 1 et 4 mm). À ce stade, les taches sont transparentes et la lumière traverse celles-ci (photos a, b, c et d). Par la suite, elles s'agrandissent et forment des brûlures (Gérard Gilbert, communication personnelle). Sous des conditions humides, les taches ont un aspect visqueux et libèrent un exsudat bactérien. Tandis que sous des conditions sèches, l'exsudat prend plutôt la forme d'un film blanchâtre et écailleux (Maas, 1984). Deux semaines après l'apparition des premiers symptômes, les taches deviennent visibles à la face supérieure des feuilles. Elles sont irrégulières, de couleur rouge-brun et opaque (photos e et f) (EPPO et CABI; Maas, 1984; Lambert *et al.*, 2007; Strand, 1994). Quelques fois, un halo jaune peut être observé autour de la tache. Ce symptôme peut être confondu avec des taches causées par d'autres agents pathogènes tels que *Marssonina* (la tache pourpre) et *Ramularia* (la tache commune) (Maas, 1984). Il arrive que *Xanthomonas fragariae* envahisse le collet et il est facile de confondre les symptômes avec ceux de la pourriture amère (*Phytophthora cactorum*) (Maas, 1984; Strand, 1994). Les feuilles, très infectées, continueront à jaunir, à brunir et à se dessécher. Les fruits ne sont pas affectés, sauf leurs sépales qui brunissent et se dessèchent (photo g), les rendant ainsi invendables (Heidenreich et Turechek, Cornell University; Lambert *et al.*, 2007).



Photo a : Les premiers symptômes par *Xanthomonas fragariae* : des taches angulaires et translucides sous les feuilles

Source : Scottish Agricultural Science Agency (SASA)



Photo b : Les premiers symptômes par *Xanthomonas fragariae* : des taches angulaires et translucides sous les feuilles

Source : APS net, Plant Pathology online



Photo c : Les premiers symptômes par *Xanthomonas fragariae* : des taches angulaires et translucides sous les feuilles

Source : University of Florida IFAS Extension



Photo e : Symptômes de *Xanthomonas fragariae* deux semaines après l'apparition des premiers symptômes : taches rouge-brun sur les feuilles

Source : University Florida Extension IFAS

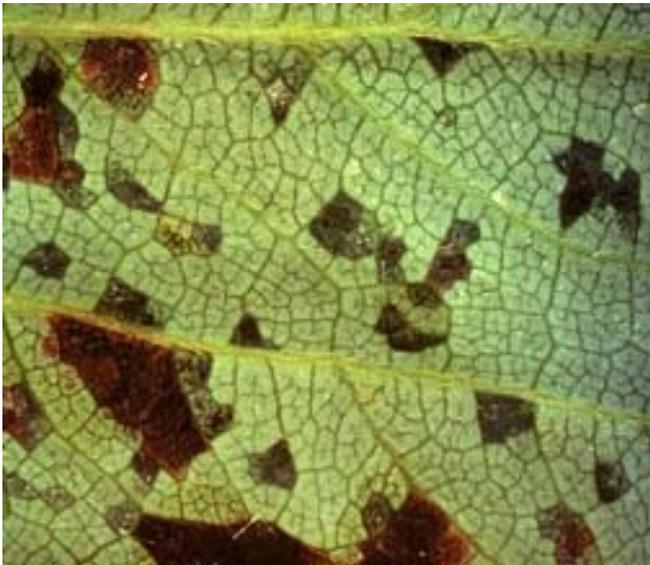


Photo d : Les premiers symptômes par *Xanthomonas fragariae* : des taches angulaires et translucides sous les feuilles

Source : EPPO Gallery



Photo f : Symptômes de *Xanthomonas fragariae* deux semaines après l'apparition des premiers symptômes : taches rouge-brun sur les feuilles

Source : Pests and diseases image library (PaDIL)



Photo g : Sépales bruns et sèches causées par *Xanthomonas fragariae*
Source : Pests and diseases image library (PaDIL)

PROTOCOLE UTILISÉ AU LABORATOIRE POUR DÉTECTER LA BACTÉRIE *XANTHOMONAS FRAGARIAE*

Dans la littérature (Diagnostic protocols for organism harmful to plants), on rapporte que la bactérie peut être isolée sur le milieu de culture LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) et ensuite identifiée par un test sérologique ELISA. Au Laboratoire, nous avons tenté d'isoler cette bactérie, mais sans succès. C'est pourquoi, une technique en biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction (PCR)) a été adaptée à partir de différents articles scientifiques.

EXTRACTION DE L'ADN BACTÉRIEN

La première étape consiste à extraire l'ADN de la bactérie *Xanthomonas fragariae*. Les morceaux de feuilles et de tiges symptomatiques sont coupés en petits morceaux et placés dans un tube. Ils sont alors recouverts d'un tampon d'extraction-PCR. Après une agitation de 30 minutes à température de la pièce, une partie du tampon d'extraction est récupérée et centrifugée pour séparer les particules végétales. Le surnageant est récupéré et incubé dans un bain à 93°C afin de dénaturer les cellules. Suite à ce choc thermique, l'échantillon est centrifugé. Une partie du

surnageant est récupérée et autant d'isopropanol froid y est ajouté. Une fois la solution bien agitée, elle est incubée pendant 1 heure à -20°C pour permettre à l'ADN de précipiter. Ensuite, les échantillons sont centrifugés. La dernière étape consiste à laver le culot d'ADN à l'éthanol 95 %. L'éthanol est décanté et l'ADN est séché dans un dessiccateur rotatif (« speed vac ») (photo h). Le culot d'ADN est solubilisé en y ajoutant de l'eau HPLC stérile.



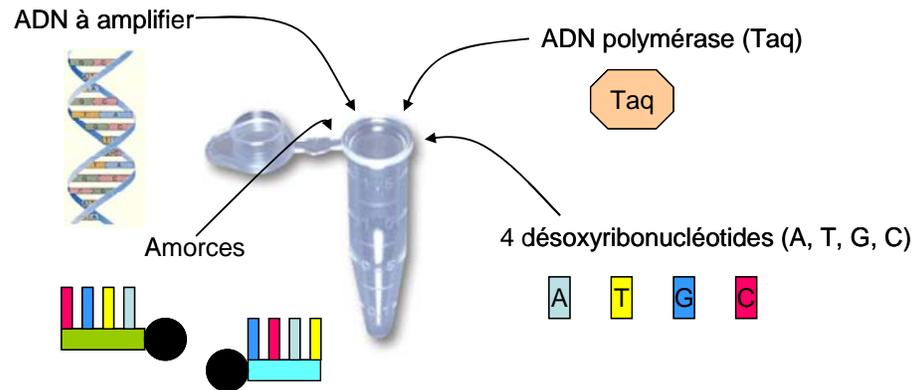
Photo H : Dessiccateur rotatif («speed vac»)
Source : Chantal Malenfant, Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

AMPLIFICATION DES FRAGMENTS CIBLES DE L'ADN

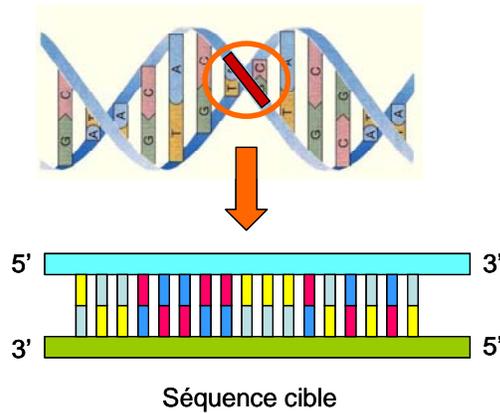
L'amplification des fragments (PCR) est une technique en biologie moléculaire, inventée par K. Mullis en 1985 (Wikipédia). PCR est l'abréviation de l'expression anglaise « Polymerase Chain reaction » (réaction en chaîne par polymérase). Cette technique permet, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'obtenir rapidement des millions de copies d'un segment précis d'ADN, en quelques heures (La PCR, 2002). La technique permet de chercher une aiguille dans une meule de foin. Dans notre situation, il s'agit de l'ADN d'intérêt.

Voici les différentes étapes de la PCR (La PCR, 2002) :

1- Ajouter tous les réactifs dans le tube



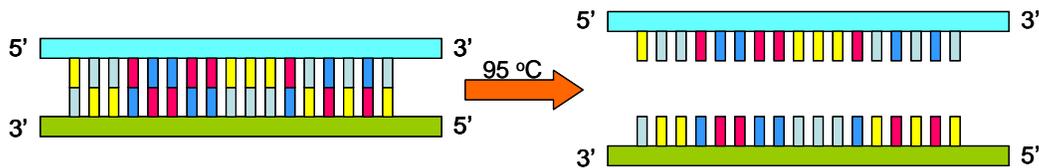
2- Séquence cible de l'ADN que l'on veut amplifier



3- Le cycle PCR: la dénaturation, l'hybridation et l'élongation

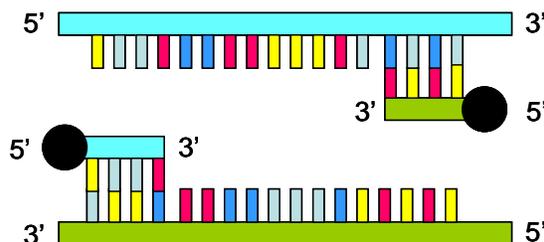
a) Dénaturation

Chauffer à une température de 95 °C et les liaisons de la double hélice d'ADN sont rompues = 2 brins d'ADN



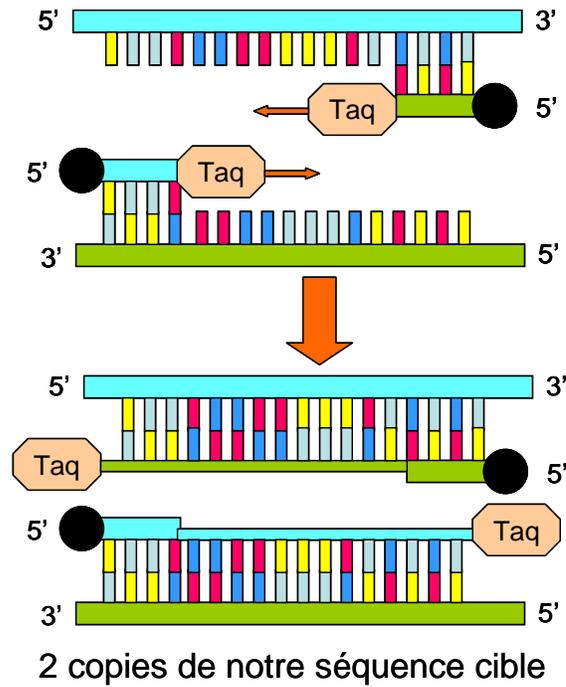
b) Hybridation

La température redescend entre 40 et 65 °C tout dépend de la température appropriée des amorces. Elles se fixent à la séquence ciblée.

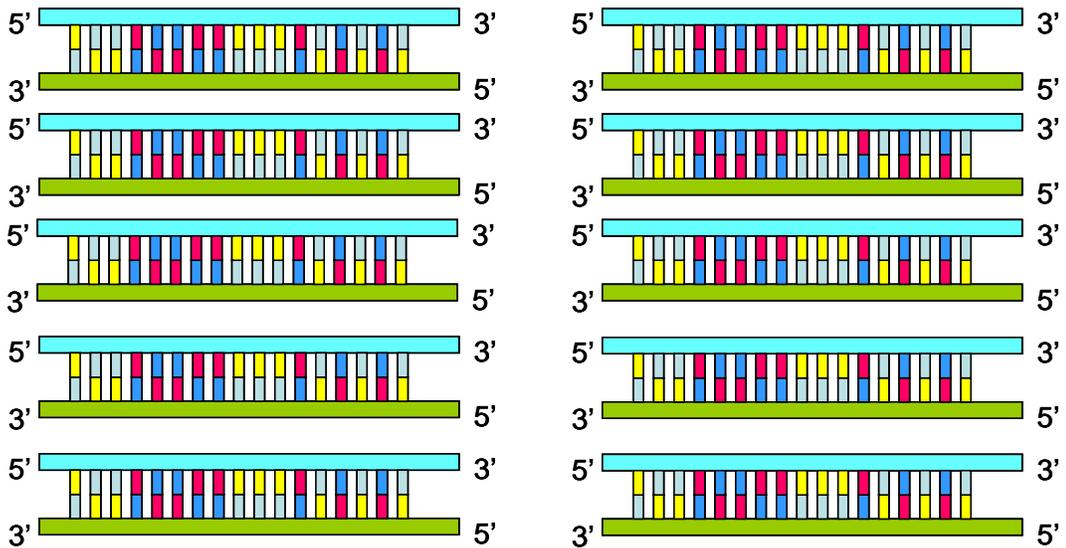


c) Élongation

À une température de 72 °C, l'ADN polymérase (Taq) vient se fixer aux amorces et des désoxyribonucléotides sont ajoutés = 2 copies de notre séquence cible de départ.



d) Le cycle est répété plusieurs fois afin d'obtenir plusieurs copies de notre ADN cible



Et encore plusieurs autres copies ...

Le Laboratoire a élaboré son protocole selon les articles de Mahuku et Goodwin (1997), Pooler *et al.* (1996), Robert *et al.* (1996) et Stöger et Ruppitsch (2004). Comme il a été expliqué précédemment (étape 1), un mélange des réactifs suivants est nécessaire pour réaliser la PCR : eau, tampon polymérase (1 X), MgCl₂ (1,5 mM), des désoxyribonucléotides communément appelés DNTP's (0,2 mM), la paire d'amorces XF-10 et XF-12 (0,5 µM), Taq (0,025 U) et l'ADN bactérien extrait. Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, les amorces choisies pour détecter l'ADN cible de *Xanthomonas fragariae* correspondent aux références de Mahuku et Goodwin (1997), Pooler *et al.* (1996), Robert *et al.* (1996) et Stöger et Ruppitsch (2004). Voici la séquence de la paire d'amorces :

XF-10 : 5' – TGG AAC TGT GTG GCG AGC CAG – 3'
 XF-12 : 5' – TCC CAG CAA CCC AGA TCC G – 3'

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

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

- Un témoin négatif d'amplification : eau stérile.
- Un témoin positif d'amplification : ADN déjà extrait et identifié par PCR.
- Un témoin positif d'extraction : culture pure de *Xanthomonas fragariae*.

Les témoins sont essentiels puisqu'ils permettent d'affirmer que le test a bien fonctionné.

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



Photo i : Thermocycleur
Source : Chantal Malenfant, Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

Tableau 1. Cycle d'amplification de l'ADN de *Xanthomonas fragariae*.

Étapes	Température (°C)	Temps (minutes)
Dénaturation initiale des brins d'ADN	95	2
Dénaturation*	95	1
Hybridation*	58	1
Élongation*	72	1 minute et 30 secondes
Élongation finale	72	5

* Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont refaites durant 35 cycles.

VISUALISATION DE L'ADN BACTÉRIEN

La visualisation de la présence ou non de l'ADN *Xanthomonas fragariae* dans un échantillon se fait par la technique de l'électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose 1 %. La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques (ADN) chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique (photo j). La séparation s'effectue à travers un gel d'agarose (photos k). Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migrent plus loin que les molécules de plus grandes tailles (Wikipédia).

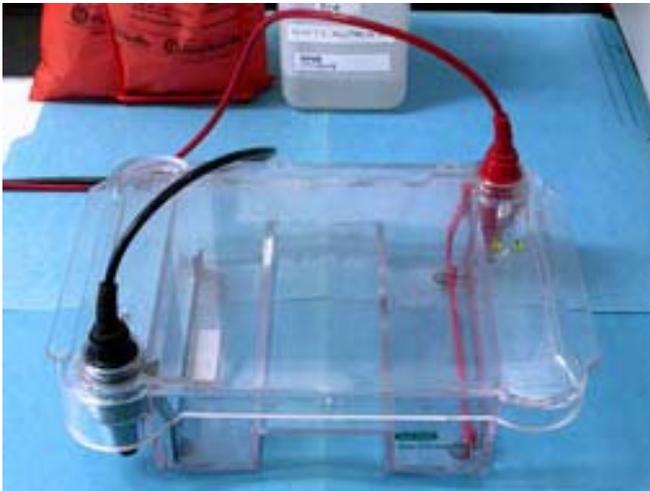


Photo j : Électrophorèse sur gel
Source : Chantal Malenfant, Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

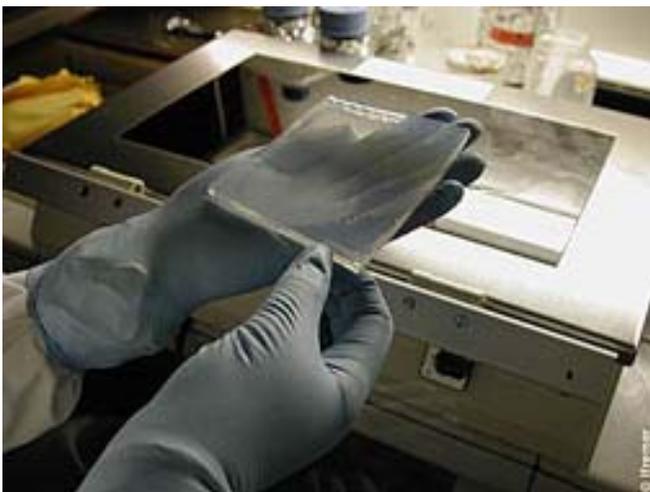


Photo k : Gel d'agarose
Source : Wikipédia. L'encyclopédie libre, MAPAQ

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 qui sont obtenues et vérifier si elles correspondent à l'ADN de *Xanthomonas fragariae*. La migration est d'une durée d'environ 30 minutes lorsque l'intensité est réglée à 100 volts. La migration est arrêtée lorsque l'indicateur bleu (Bleu Endo-R-Stop) est à 1 cm de la base du gel.

Afin de visualiser les bandes sur le gel d'agarose, celui-ci est coloré au bromure d'éthidium (2 µg/mL). Pour ce faire, le gel est submergé de cette solution entre 10 et 20 minutes en l'agitant doucement à la noirceur. Ensuite, le gel est rincé durant 20 minutes dans l'eau distillée toujours en l'agitant. Puis, une photographie est prise avec le programme AlphaImager qui permet de révéler les bandes à la lumière ultra-violette (photos l).

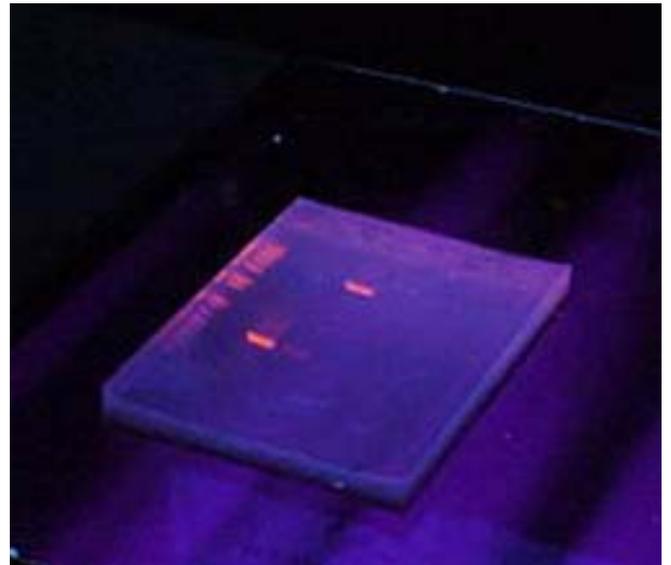


Photo l : Le gel est exposé à des rayonnements ultraviolets
Source : Wikipédia. L'encyclopédie libre

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le fragment de l'ADN de *Xanthomonas fragariae* amplifié avec les amorces XF-10 et XF-12 contient environ 450 paires de bases (pb) (photo m). 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, un total d'environ 2 jours est nécessaire pour l'obtention des résultats.

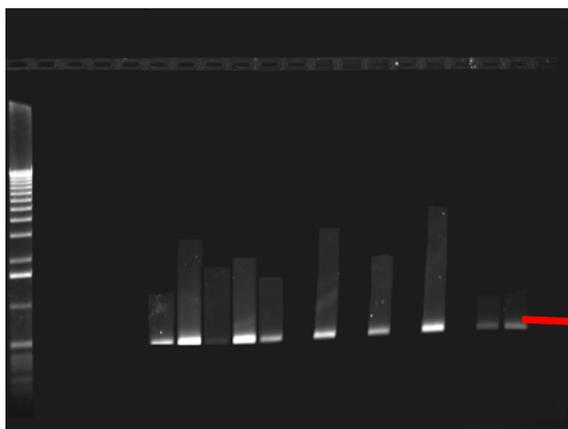


Photo m : Gel d'agarose présentant la bactérie *Xanthomonas fragariae* dans les échantillons ayant une bande à la hauteur de 450 pb

Source : Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

Pour plus de détails sur la méthode, il est possible de contacter le Laboratoire de diagnostic en phytoprotection pour obtenir le protocole en entier.

RÉFÉRENCES

APS net, Plant pathology online.
<http://www.apsnet.org/online/Archive/2006/IW000062.asp>

Diagnostic protocols for organism harmful to plants. Diagnosis of *Xanthomonas fragariae*. SMT project SMT4-CT98-2252. Pp. 34.
<http://www.csl.gov.uk/specialInterest/Xanthomonas.pdf>

Organisation européenne de la protection des plantes, EPPO, et CABI. Data sheets on quarantine pests: *Xanthomonas fragariae*. Pp. 5.

http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_fragariae/XANTFR_ds.pdf

EPPO Gallery.

<http://photos.eppo.org/index.php/image/932-xantfr-01>

Heidenreich C. et Turechek B. Bacterial Angular Leaf Spot of Strawberry. Cornell University.

<http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfab/salsmf.shtml>

Lambert L., Carisse O. et Vincent C. 2007. Maladies, ravageurs et organismes bénéfiques du fraisier, du framboisier et du bleuetier. CRAAQ. Pp. 303.

La PCR. 2002.

<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/index.html>

Les pépinières Mercier.

<http://vignovin.pwb.ro/partenaires/mercier/merciersite/Francais/Laboratoire/labohistorique.htm>

Maas J.L. 1984. Compendium of strawberry diseases. The American phytopathological society. Pp. 138.

Mahuku G.S. et Goodwin P.H. 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). Canadian journal of plant pathology 19: 366-370.

Pests and diseases image library (PaDIL)

<http://www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages.aspx?id=572>

Pooler M.R., Ritchie D.F. et Hartung J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogène. Applied environmental microbiology 62: 3121-3127.

Roberts P.D., Jones J.B., Chandler C.K., Stall R.E. et Berger R.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. Plant disease 80: 1283-1288.

Sci-bay.

<http://www.sci-bay.com/catalog.asp?prodid=499879&showprevnext=1>

Stöger A. et Ruppitsch W. 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. Journal of microbiological methods 58: 281-284.

Strand L. Larry. 1994. Integrated pest management for strawberries. University of California, publication 3351. Pp. 142.

University of Florida IFAS Extension.

<http://edis.ifas.ufl.edu/PG056>

Wikipédia, l'encyclopédie libre.

http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se_en_gel_d'agarose

Ce document a été rédigé par Cindy Dallaire, agronome-phytopathologiste.

Mise en page du document par Carolle Fortin, technicienne en administration – Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ

Sainte-Foy, le 16 octobre 2008

Vous retrouverez ce document sur le site Agrireseau.qc.ca

