



■ LA PROBLÉMATIQUE

Détection des deux souches prédominantes de phytoplasmes du jaunissement mortel au Mexique

Le cocotier est une espèce de palmier cultivée dans le monde entier. Il est très important car plusieurs produits peuvent être obtenus à partir de ses différents organes, et notamment à partir du fruit. Les marchés des produits de la noix de coco (eau de coco, huile vierge et autres) connaissent actuellement une croissance très rapide. Malheureusement, la production de fruits ralentit, principalement en raison de problèmes phytosanitaires et de la vieillesse des plantations. Le principal problème phytosanitaire est le jaunissement mortel, une maladie dévastatrice associée à la présence de phytoplasmes. En Amérique, le jaunissement mortel affecte plusieurs espèces de palmiers en plus du cocotier, notamment *Adonidia merrillii*, *Pritchardia pacifica*, *Phoenix canariensis*.

Au Mexique, il existe deux souches prédominantes de phytoplasmes du jaunissement mortel, correspondant aux sous-groupes 16SrIV-A et 16SrIV-D. Elles sont largement distribuées dans tout le pays et infectent différentes espèces de palmiers. Habituellement, pour déterminer la présence de différentes souches de phytoplasmes responsables de jaunissement mortel, des échantillons d'ADN provenant de la plante ou de l'insecte sont soumis à deux séries d'amplification PCR (PCR emboîtées) et au séquençage des produits du gène 16S rRNA. Mais ce processus est long et coûteux.



- Symptômes de jaunissement mortel sur des palmiers de Manille (*Adonidia merrillii*) au Yucatán, Mexique. Brunissement des feuilles (A). Inflorescences nécrosées (B). Un palmier avec une nécrose de la lance (C) et un gros plan de la lance nécrosée (D). Palmier avec la plupart de la couronne affectée (E). Palmier asymptomatique non infecté (F) et inflorescences correspondantes (G). Les palmiers de Manille peuvent être infectés par les souches 16SrIV-A et 16SrIV-D du phytoplasme.

■ LA PRATIQUE / INNOVATION PROPOSÉE PAR TROPICSAFE

Amélioration de la détection de deux souches de phytoplasmes du jaunissement mortel

Un nouveau test de PCR quantitative (qPCR) a été développé pour faciliter la détection et l'identification de deux souches du phytoplasme du jaunissement mortel 16SrIV-A et -D. La procédure est basée sur leurs différences génétiques, et réduit le temps de traitement. Elle augmente l'efficacité des ressources en éliminant les étapes nécessaires à l'exécution de la PCR emboîtée, à la digestion de ses produits par des enzymes de restriction et à la détermination des profils de digestion, ou au séquençage des amplicons.



■ COMMENT CELA EST-IL MIS EN OEUVRE DANS TROPICSAFE ?

Développement d'un nouveau test qPCR pour la détection des phytoplasmes des sous-groupes 16SrIV-A et -D dans un seul tube

Avec l'objectif de détecter deux souches de phytoplasmes responsables de jaunissement mortel prédominantes au Mexique (16SrIV-A et -D) de manière plus simple et plus rapide, le nouveau protocole de test a été conçu pour être réalisé dans le même tube avec une seule réaction de qPCR.

La spécificité et la sensibilité du nouveau test ont été évaluées. Il a permis de détecter les souches 16SrIV-A et -D, mais aucun autre phytoplasme, et il est capable de détecter 0,01 ng d'ADN de phytoplasme. Ainsi, le test représente une amélioration de la spécificité et de la sensibilité ou des deux par rapport aux tests précédemment décrits (Bahder *et al.*, 2017 ; Cordova *et al.*, 2014 ; Harrison *et al.*, 1999).

Souche de phytoplasme (sous-groupe ribosomal)		Test qPCR		PCR emboîtée		
		16SrIV-A	16SrIV-D			
Phytoplasmes dans les palmiers	Dépérissement létal du cocotier, Tanzanie ^A	16SrIV-C	-	-	+	
	Jaunissement mortel du cocotier, Mozambique ^A	16SrXXII-A	-	-	+	
	Jaunissement mortel du cocotier, Floride ^A	16SrIV-A	+	-	+	
	Jaunissement mortel du cocotier, Mexique ^B	16SrIV-A	+	-	+	
	<i>Prichardia pacifica</i> , jaunissement mortel, Mexique ^B	16SrIV-D	-	+	+	
	<i>Adonidia merrillii</i> , jaunissement mortel, Mexique ^B	16SrIV-D	-	+	+	
	Cocotier sain, Mexique ^B	-	-	-	-	
	Cocotier sain, Mozambique ^A	-	-	-	-	
	Autres phytoplasmes	' <i>Ca. P. pruni</i> ', souche PWX ^A	16SrIII-A	-	-	+
		' <i>Ca. P. ulmi</i> ', souche EY ^A	16SrV-A	-	-	+
' <i>Ca. P. ziziphi</i> ', souche JWB ^A		16SrV-B	-	-	+	
' <i>Ca. P. trifolii</i> ', souche BLTVA ^A		16SrVI-A	-	-	+	
' <i>Ca. P. fraxini</i> ', souche ASHY ^A		16SrVII-A	-	-	+	
' <i>Ca. P. hispanicum</i> ', souche MPV ^A		16SrXIII-A	-	-	+	
Pétales verts de fraisier, souche SGP ^A		16SrXIII-B	-	-	+	
' <i>Ca. P. cynodontis</i> ', souche BGWL ^A		16SrXIV-A	-	-	+	

Testé en double. (-) non détecté ; (+) phytoplasme détecté ; 'Ca. P.' '*Candidatus* Phytoplasma'. Sources d'ADN de phytoplasma : (^A) Dr. Nigel Harrison, Université de Floride, FL 33314, USA; and (^B) CICY, Mérida, Yucatán, 97205 Mexique.

- Détection spécifique des phytoplasmes de différents groupes et sous-groupes ribosomiques avec le nouveau test qPCR par rapport au test standard par PCR emboîtée.

Limite de détection de l'essai qPCR

ADN (ng)	100	10	1	0,1	0,01
16SrIV-A	20,3 ± 0,1	23,5 ± 0,1	27,0 ± 0,1	30,0 ± 0,1	34,0 ± 0,0
16SrIV-D	22,2 ± 0,0	24,8 ± 0,3	28,1 ± 0,1	31,2 ± 0,1	35,0 ± 0,1

Testé en double. Ct : seuil de cycle. SD : écart-type. Les échantillons ont été considérés comme négatifs si la valeur Ct était ≥ 37.

- Évaluation de la sensibilité du nouveau protocole de test qPCR pour la détection des phytoplasmes des sous-groupes 16SrIV-A et 16SrIV-D. Les échantillons d'ADN utilisés provenaient d'un cocotier infecté pour le 16SrIV-A et d'un palmier *Adonidia merrillii* infecté pour le 16SrIV-D, testés dans un seul tube.

■ COMMENT ÇA MARCHE ?

Evaluation du test qPCR pour la détection des phytoplasmes des sous-groupes 16SrIV-A et -D dans un unique tube

Afin d'évaluer le fonctionnement du nouveau test qPCR, un ensemble d'échantillons d'ADN obtenus à partir de tissus de troncs, prélevés sur différentes espèces de palmiers présentant des symptômes de jaunissement mortel, ont été analysés et se sont révélés positifs pour les phytoplasmes 16SrIV-A ou 16SrIV-D. Ces résultats coïncident avec l'analyse de séquençage effectuée séparément. Par conséquent, ces résultats confirment la capacité du test à détecter spécifiquement l'ADN des phytoplasmes 16SrIV-A ou 16SrIV-D dans un seul tube et avec une seule réaction qPCR. Ce test est utile pour la recherche et à des fins épidémiologiques.



Ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne en vertu de la convention de subvention N° 727459

www.tropicsafe.eu

Cette fiche d'information est produite dans le cadre du projet TROPICSAFE. Bien que l'auteur ait travaillé sur la meilleure information disponible, ni l'auteur ni l'UE ne sont en aucun cas responsables des pertes, dommages ou préjudices subis directement ou indirectement en rapport avec le projet.



Espèces de palmiers	Symptômes	qPCR non spécifique (Ct)	qPCR de détection spécifique (Ct)		Sous-groupe selon le test qPCR
			16SrIV-A	16SrIV-D	
Cocotier	Non	ND	ND	ND	-
Cocotier	Oui	16,6	16,5	ND	16SrIV-A*
Cocotier	Oui	23,3	22,9	ND	16SrIV-A*
Cocotier	Oui	18,24	30,9	ND	16SrIV-A*
<i>Thrinax radiata</i>	Oui	14,58	25,6	ND	16SrIV-A*
<i>Phoenix canariensis</i>	Oui	21,5	ND	28,2	16SrIV-D*
<i>Phoenix canariensis</i>	Oui	23,2	ND	35,1	16SrIV-D*
<i>Phoenix canariensis</i>	Oui	25,7	ND	21,7	16SrIV-D*
<i>Phoenix canariensis</i>	Oui	22,2	ND	19,2	16SrIV-D*

Ct : seuil de cycle ; ND : aucune amplification détectée. Les échantillons ont été considérés comme négatifs si la valeur Ct était ≥ 37 . Test qPCR non spécifique tel que rapport par Cordova *et al.*, 2014. (*) Sous-groupe confirmé par l'analyse des séquences.

- Détection des souches de phytoplasme 16SrIV-A et 16SrIV-D dans des échantillons d'ADN de troncs de palmiers à l'aide du nouveau test qPCR. Les échantillons d'ADN ont été obtenus à partir de palmiers de l'état du Yucatan (cocotier et *Thrinax radiata*) et de l'état de Coahuila (*Phoenix canariensis*) au Mexique.

MOTS CLÉS

Jaunissement mortel, phytoplasmes, palmiers, PCR quantitative

INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

Bahder B.W., Helmick E.E., Harrison N. 2017. Detecting and differentiating phytoplasmas belonging to subgroups 16SrIV-A and 16SrIV-D associated with lethal declines of palms in Florida using qPCR and high-resolution melt analysis (HRMA). *Plant Disease* 101(8), 1449-1454.

Cordova I., Oropeza C., Puch-Hau C., Harrison N., Collí-Rodríguez A., Narvaez M., Nic-Matos G., Reyes C., Sáenz L. 2014. A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16SrIV subgroups -A, -D and -E found in the Americas. *Journal of Plant Pathology* 96, 343-352.

Córdova I., Oropeza C., Harrison N., Ku-Rodríguez S., Puch H.C., Narvaez M., Sáenz L. 2019. Simultaneous detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas (group 16SrIV) by real-time PCR assays using 16Sr- and groEL-based TaqMan probes. *Journal of Plant Pathology* 101(3), 609-619.

Harrison N.A., Cordova I., Richardson P., Di Bonito R., 1999. Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: Oropeza C., Verdeil J-L., Ashburner G.R., Cardeña R., Santamaria J.M. (eds). *Current Advances in Coconut Biotechnology*, pp. 183- 196. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

CRÉDITS

Luis Sáenz Carbonell Centre de recherche scientifique du Yucatan, Mérida, Mexique vyca@cicy.mx

Iván Córdova Lara Centre de recherche scientifique du Yucatan, Mérida, Mexique cordoval@cicy.mx

Antonio Graciano Puch-Hau Centre de recherche scientifique du Yucatan, Mérida, Mexique antoniopuch71@gmail.com

Germán Nic-Matos Centre de recherche scientifique du Yucatan, Mérida, Mexique gnicmatos@gmail.com

Carlos Oropeza Salin Centre de recherche scientifique du Yucatan, Mérida, Mexique cos@cicy.mx

Novembre, 2021



Ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne en vertu de la convention de subvention N° 727459

www.tropicsafe.eu

Cette fiche d'information est produite dans le cadre du projet TROPICSAFE. Bien que l'auteur ait travaillé sur la meilleure information disponible, ni l'auteur ni l'UE ne sont en aucun cas responsables des pertes, dommages ou préjudices subis directement ou indirectement en rapport avec le projet.