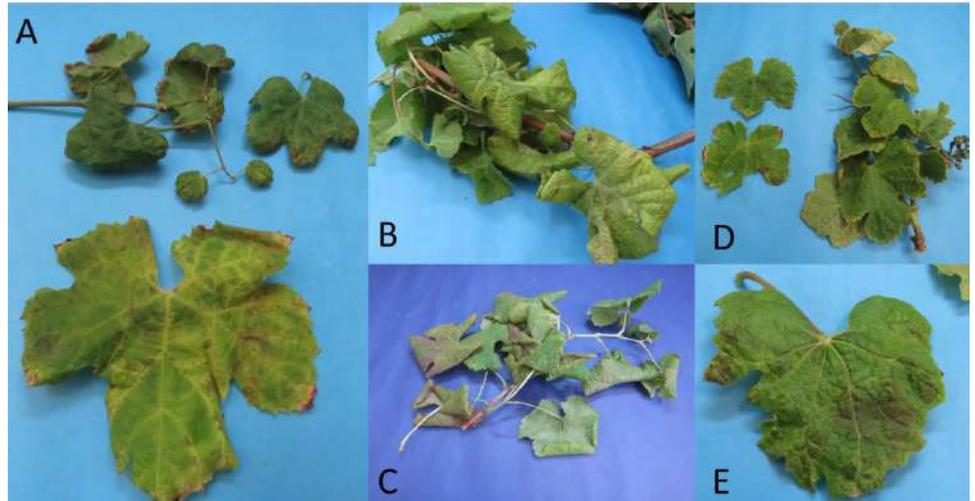




### ■ LA PROBLÉMATIQUE

## Mise en évidence des phytoplasmes de la vigne

Dans les différentes régions viticoles du monde, les phytoplasmes provoquent des pertes allant de 13 à 100%, en fonction essentiellement de la virulence de l'agent pathogène et de la sensibilité variétale. La lutte est essentiellement basée sur la prévention de la propagation de l'agent pathogène. Les outils de gestion les plus efficaces sont donc l'utilisation de matériel sain pour la lutte contre les insectes vecteurs et l'élimination des sources d'inoculum de l'agent pathogène, y compris des plantes hôtes alternatives. Dans ce but, l'identification des phytoplasmes présents dans les vignobles est de la plus haute priorité et de la plus haute importance afin de concentrer les efforts de gestion des maladies dans les différents pays impliqués dans le projet, car elle fournira les informations appropriées sur les insectes vecteurs à contrôler et les plantes hôtes alternatives à éliminer, pour réduire la présence de l'agent pathogène et réduire l'utilisation de pesticides.

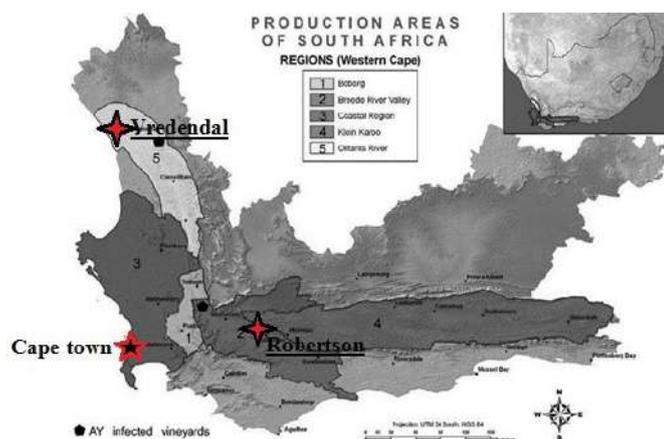


- Symptômes sur les feuilles de cinq échantillons de vigne positifs pour la présence de phytoplasmes au Chili. A) Variété VN17- Chardonnay avec enroulement vers le bas et jaunissement des nervures. B) VN12- variété País avec enroulement vers le bas et jaunissement. C) VN29- variété Tintorera avec roulage vers le bas et rougissement. D) VN69- variété Semillón avec des petites feuilles qui s'enroulent vers le bas. E) Feuille de la variété VN32-Sauvignon blanc avec enroulement vers le bas et déformation.

### ■ DERNIERS RÉSULTATS DE RECHERCHE

## Que sait-on de l'identité des phytoplasmes associés aux jaunissements de la vigne au Chili, en Italie et en Afrique du Sud ?

Les agents pathogènes responsables des jaunissements de la vigne sont généralement bien connus en Europe, alors qu'on dispose de moins de données et d'informations pour d'autres pays, comme le Chili et l'Afrique du Sud. En Afrique du Sud, l'agent pathogène et son principal insecte vecteur ont été découverts récemment, tandis qu'au Chili, différents phytoplasmes de la vigne et insectes abritant certains de ces phytoplasmes ont été identifiés. Dans la majorité des pays de l'Europe, les phytoplasmes associés aux jaunissements de la vigne sont le bois noir et la flavescence dorée, le dernier étant un organisme de quarantaine (Angelini *et al.*, 2018). Les prospections réalisées en Italie ont permis la détection de nouveaux phytoplasmes et de nouveaux insectes vecteurs potentiels dans certaines des principales régions viticoles (Zambon *et al.*, 2018). Il est donc clair que seule une surveillance constante permettra de détecter rapidement les phytoplasmes existants ou les nouveaux phytoplasmes pouvant infecter les plants de vigne. En outre, une surveillance est nécessaire pour déterminer si les phytoplasmes endémiques se propagent. Ces informations constituent la base des mesures de contrôle. Enfin, la connaissance des souches de phytoplasme responsable des jaunissements de la vigne dans les trois pays est la base pour améliorer les techniques de détection.



- Zones d'Afrique du Sud où '*Candidatus Phytoplasma asteris*' associé aux jaunissements de la vigne a été identifié.



- Zones italiennes où des nouveaux phytoplasmas associés aux jaunissements de la vigne ont été détectés.

## ■ L'ACTIVITÉ RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT TROPICSAFE

# Techniques d'identification moléculaire des phytoplasmes associés aux jaunissements de la vigne

Des échantillons de vignes cultivées commercialement dans les zones affectées des trois pays ont été collectés pendant les étés et automnes 2017 et 2018 et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour être analysés. La présence de phytoplasmes a été détectée après l'extraction des acides nucléiques et la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), suivie d'une analyse par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et d'un séquençage. Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR sont présentées dans le Tableau 1 pour les trois zones, le Tableau 2 pour le Chili et le Tableau 3 pour l'Italie et l'Afrique du Sud.

Au Chili, la prospection a été menée dans les régions de Maule et Valparaiso. Quarante-vingt-dix échantillons ont été prélevés et analysés par PCR imbriquée à l'aide d'amorces ciblant le gène de la sous-unité ribosomique 50S, définies par le laboratoire de fitovirologie de l'Université du Chili (Tableau 2). Les produits d'amplification de quatre échantillons ont été séquencés pour identifier les phytoplasmes présents. Les résultats ont été confirmés par PCR imbriquée avec les amorces P1/P7, suivies des amorces R16F2n/R2 (Tableau 1). En Italie, les acides nucléiques totaux ont été extraits à l'aide d'un protocole au phénol-chloroforme pour 103 échantillons de vignes symptomatiques prélevés dans diverses régions et utilisés pour des tests PCR avec la paire d'amorces universelle phytoplasmes P1/P7, suivie d'une PCR imbriquée avec les amorces R16F2n/R2. D'autres tests PCR imbriqués ont été effectués à l'aide des amorces R16(I)F1/R1 (Tableau 3). L'identité du phytoplasme a été détectée par des



- Régions chiliennes prospectées et lieux où les phytoplasmes ont été détectés dans les vignobles.



analyses RFLP. Des échantillons sélectionnés ont ensuite été séquencés pour confirmer l'identité du phytoplasme par RFLP virtuel et phylogénie. En Afrique du Sud, l'échantillonnage a été réalisé sur le cultivar blanc Colombard. Des échantillons de plantes asymptomatiques et symptomatiques ont été prélevés et traités en prélevant des tissus du phloème dont l'ADN a été extrait selon un protocole CTAB. L'ADN extrait a été quantifié au nanodrop et les paramètres de qualité des échantillons étaient les suivants pour le rapport A260/280: 1,73-2,02 et pour le rapport A260/230: 0,80-1,86, les concentrations variant de 69 à 352 ng/μl. La qualité de l'ADN a été évaluée aussi par électrophorèse sur gel d'agarose. Le diagnostic de phytoplasmes du groupe des jaunissements de l'aster a été effectué à l'aide du test PCR présenté au Tableau 3.

Tableau 1. Amorces générales utilisées pour la détection des phytoplasmes dans les vignes au Chili, en Italie et en Afrique du Sud

| Test        | Couple d'amorces | Taille de l'amplicon (pb) | Littérature                                  |
|-------------|------------------|---------------------------|--|
| PCR         | P1/P7            | 1.792                     | Deng et Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995 |
| Nested PCR1 | R16F2n/R16R2     | 1.244                     | Gundersen et Lee 1996                        |
| Nested PCR2 | U5/U3            | 800                       | Lorenz et al., 1995                          |

Tableau 2. Amorces générales utilisées pour la détection des phytoplasmes dans les vignes au Chili

| Test       | Couple d'amorces | Taille de l'amplicon (pb) | Littérature                   |
|------------|------------------|---------------------------|-------------------------------|
| PCR        | LSu2pF/LSu2pR    | 1.700                     | Zamorano et Flore, non publié |
| Nested PCR | LSu2pFn/ Su2pRn  | 1.280                     |                               |

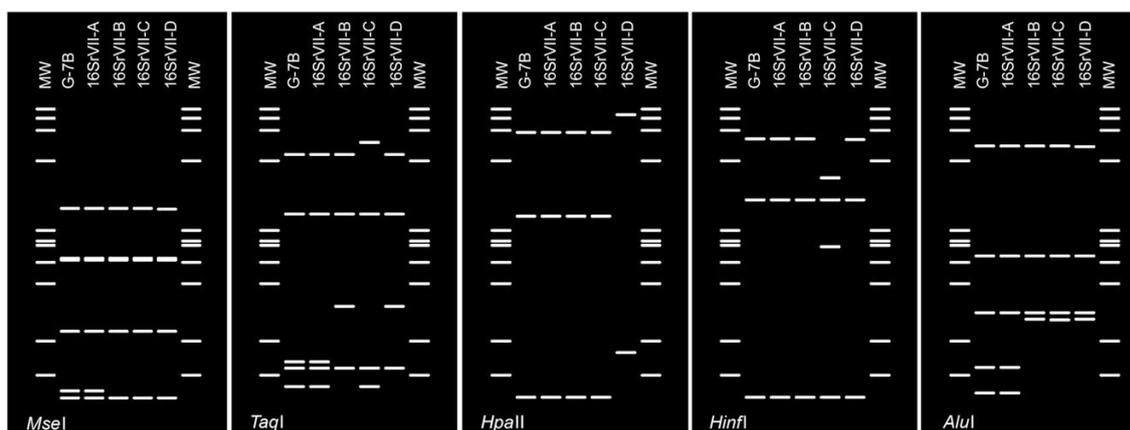
Tableau 3. Amorces utilisées pour la détection des phytoplasmes dans les vignes en Italie et en Afrique du Sud

| Test         | Couple d'amorces  | Taille de l'amplicon (pb) | Littérature                                  |
|--------------|-------------------|---------------------------|--|
| PCR          | P1/P7             | 1.792                     | Deng et Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995 |
| PCR nested 1 | R16F2n/R16R2      | 1.244                     | Gundersen et Lee 1996                        |
| PCR nested 2 | R16(I)F1/R16(I)R1 | 1.100                     | Lee et al., 1994                             |

## ■ DONNÉES SCIENTIFIQUES ET PREMIERS RÉSULTATS

# Identification de différents phytoplasmes responsables des maladies des jaunissements de la vigne

Les prospections menées dans les trois pays ont confirmé la présence de divers phytoplasmes prévalents. Au Chili, les échantillons examinés étaient infectés par une souche apparentée à '*Candidatus Phytoplasma pruni*' classée dans le sous-groupe 16SrIII-J; avec une souche apparentée à '*Ca. P. ulmi*' (16SrV-A); avec souche apparentée à '*Ca. P. fraxini*' (16SrVII-A); et une souche apparentée à '*Ca. P. solani*' (16SrXII-A). La situation au Chili, avec la présence constante de ces phytoplasmes dans les vignobles étudiés, reste inchangée. En Italie, les principaux phytoplasmes détectés étaient apparentés à '*Ca. P. solani*' et à '*Ca. P. asteris*' (16SrI-B). D'autres phytoplasmes ont également été détectés: apparentés à '*Ca. P. fraxini*' (16SrVII-A); flavescence dorée (16SrV-C et -D); apparentés à '*Ca. P. trifolii*' (16SrVI); apparentés à '*Ca. P. phoenicium*' (16SrIX); apparentés à '*Ca. P. pruni*' (16SrIII); apparentés à '*Ca. P. prunorum*' (16SrX-B). Des échantillons présentant une co-infection avec deux de ces phytoplasmes ont également été enregistrés. La présence croissante d'un phytoplasme apparenté à '*Ca. P. asteris*' doit être surveillé au moyen d'outils de détection spécifiques afin d'être en mesure de gérer l'éventuelle augmentation d'une épidémie liée à la dissémination du phytoplasme. En Afrique du Sud, la présence de souches apparentées à '*Ca. P. asteris*' (16SrI-B et 16SrI-C) a été confirmée dans la zone où la maladie a été signalée pour la première fois il y a plusieurs années, confirmant la présence sévère de ce phytoplasme dans les jaunissements de la vigne.



- Analyses de polymorphisme de longueur de fragments de restriction virtuelle sur l'amplicon de vigne R16F2n/R2 (GenBank numéro d'accès KY454858) et sur souches de référence en utilisant l'outil interactif en ligne *iPhyClassifier* (Zambon *et al.*, 2018).

### MOTS CLÉS

PCR imbriquée, identification de phytoplasmes, contrôle des phytoplasmes

### INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

Angelini E., Constable F., Duduk B., Fiore N., Quaglino F., Bertaccini A. 2018. Grapevine phytoplasmas. In: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I. Characterization and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*. Eds. G.P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore, L. Liefing. Chapitre 5. Pag. 123-151. Springer, Singapore.

Smyth N., van der Vyver A., Zambon Y., Contaldo N., Bertaccini A., Burger J. 2015. The genetic variability of AY in South African vineyards and its spatial and temporal distribution in individual vines. *18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*. September 7-11, Ankara, Turkey, 128-129.

Zambon Y., Canel A., Bertaccini A., Contaldo N. 2018. Molecular diversity of phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in North-Eastern Italy. *Phytopathology* 108, 206-214.

### CRÉDITS

**Nicola Fiore** Université du Chili, Faculté des Sciences Agricoles, Département de la Santé des Végétaux, Santiago, Chili [nfiore@uchile.cl](mailto:nfiore@uchile.cl)

**Assunta Bertaccini** *Alma Mater Studiorum* - Université de Bologne, Département des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Bologne, Italie [assunta.bertaccini@unibo.it](mailto:assunta.bertaccini@unibo.it)

**Kerstin Kruger** Université de Pretoria, Département de Zoologie et Entomologie, Pretoria, Afrique du Sud [kruger@zoology.up.ac.za](mailto:kruger@zoology.up.ac.za)

Février, 2019