

# UTILISATION DU SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION POUR LA CARACTÉRISATION DES MICROBIOMES DE PLANTES INFECTÉES PAR PHYTOPLASMES / "HUANGLONGBING"

Microbiomes bactériens dans des végétaux et des insectes infectés par différentes espèces de '*Candidatus Liberibacter*' et de '*Candidatus Phytoplasma*'.

## ■ LA PROBLÉMATIQUE

### Vérification des populations bactériennes

Les plantes sont habitées par une grande diversité de micro-organismes, bénéfiques ou nuisibles, tels que des champignons, des bactéries et des virus. Ces micro-organismes, le microbiome, interagissent étroitement dans des réseaux qui peuvent être par exemple antagonistes ou symbiotiques. Les espèces '*Candidatus Phytoplasmas*' et '*Ca. Liberibacter*' font partie de ce réseau et entrent en compétition avec le reste du microbiome pour les nutriments et l'espace en interagissant avec les autres microorganismes associés aux plantes. Ces interactions pourraient jouer un rôle important dans le succès des infections et dans la capacité des bactéries à se propager de plante à plante par des insectes vecteurs. En outre, la variabilité génétique de ces bactéries, souvent négligée par les méthodes actuelles, pourrait être importante pour la survie des agents pathogènes, le développement des symptômes et la transmission par les insectes vecteurs. Un grand nombre d'échantillons provenant de divers lieux géographiques, de diverses espèces de plantes et d'insectes infectés par les bactéries pathogènes, confirmées par un test PCR gigogne, a été utilisé pour la détermination du microbiome.

Espèce hôte	Pays d'origine	Collecteur	Nombre d'échantillons
Agrumes	Guadeloupe	ASSO	15
Agrumes	Jamaïque	CIB	5
Agrumes	Mexique	COLPO	9
Agrumes	Cuba	IIFT	24
Agrumes	Afrique du Sud	PTHSL	8
Insectes	Mexique	COLPO	46
Insectes	Cuba	IIFT	30
Cocotier	Jamaïque	CIB	19
Cocotier	Mexique	CICY	14
Cocotier	Mexique	COLPO	12
Cocotier	Ghana	CSIR	49
Cocotier	Cuba	IIFT	6
Vigne	Chile	UCHIL	14
Vigne	Italie	UNIBO	84

- Tableau. Liste des échantillons utilisés dans l'étude du microbiome fournie par Youri Uneau (ADDO, Guadeloupe), Wayne Myrie (CIB, Jamaïque), Carlos Fredy Ortiz (COLPO, Mexique), Ndede Yankey (CSIR, Ghana), Carlos Oropeza (CICY, Mexique), Maritza Luis-Pantoja (IIFT, Cuba), Camilo Paredes-Tomás (IIFT, Cuba), Gert Pietersen (PTHSL, Afrique du Sud), Gerhard Pietersen (SU, Afrique du Sud), Nicola Fiore (UCHIL, Chili).

## ■ LA METHODE / INNOVATION PROPOSÉE PAR TROPICSAFE

## Mise en place de méthodes pour la caractérisation du microbiome

Pour la caractérisation des microbiomes associés à '*Ca. Phytoplasma*' et '*Ca. Liberibacter*', le profilage par séquençage de l'ADN pourrait être une approche efficace. Le développement et la mise en œuvre des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) a révolutionné les méthodologies d'écologie microbienne en permettant le profilage à haute résolution des communautés. Des méthodes et des amorces pour l'analyse des bactéries existent déjà et ont été utilisées de manière intensive. Lorsque cela est possible, il est préférable d'utiliser des amorces spécifiques de la cible, qui amplifient les séquences d'ADN 16Sr bactériennes tout en évitant l'amplification des séquences d'ADN des organites végétaux. Pour ces raisons, un ensemble d'amorces (799F et 1193R) conçu pour l'analyse des communautés bactériennes associées aux plantes (Hu *et al.*, 2018), a été initialement testé. Cependant, l'ADN de phytoplasme ne correspond pas complètement à cette paire d'amorces et les séquences d'amorces ont donc été optimisées.

## ■ COMMENT TROPICSAFE LE MET-IL EN ŒUVRE ?

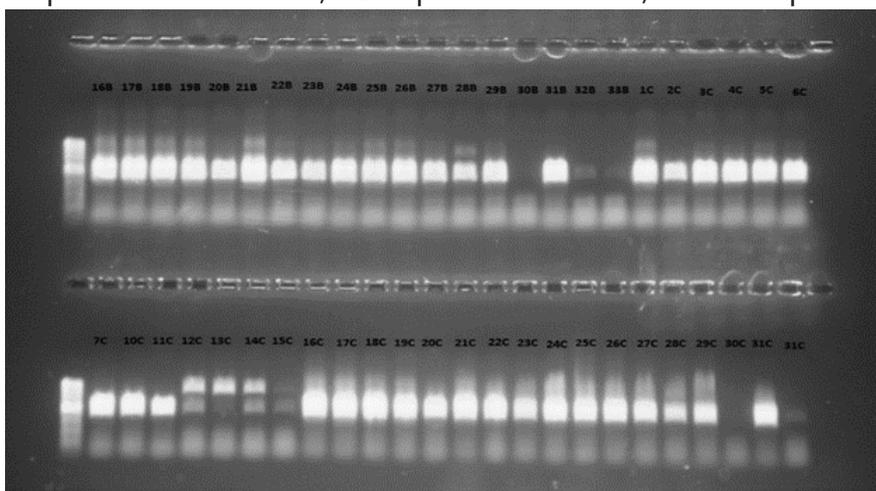
### Procédures d'amplification et de séquençage

Des variantes des amorces 799F et 1193R ont été optimisées sur la base des alignements de nucléotides de '*Ca. Phytoplasma*' et de '*Ca. Liberibacter*'. Ces amorces optimisées contiennent des nucléotides dégénérés afin de tenir compte de leur variation de séquence par rapport à d'autres bactéries. Les nucléotides indiqués en rouge sont spécifiques de la cible tandis que les nucléotides en noir sont spécifiques à la procédure de séquençage. Les nucléotides dégénérés sont soulignés.

BacF1-799/1193 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACMGGATTAGATACCKG

BacR1-799/1193 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACGTNRTCCYCACCTCC

Ces amorces ont été testées en utilisant l'ADN d'un certain nombre de plantes hôtes infectées par '*Ca. Phytoplasma*' et '*Ca. Liberibacter*', en utilisant un protocole d'amplification PCR optimisé : 94°C pendant 5 minutes suivi de 25 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 minute, et une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 minutes. Cela a permis d'obtenir des bandes d'ADN claires à la taille attendue. Après optimisation, les échantillons provenant principalement d'Italie, du Ghana, de Cuba, d'Afrique du Sud, mais aussi d'autres pays qui avaient été collectés par les partenaires du projet, ont été caractérisés par séquençage Illumina et les reads de séquençage ont été traités informatiquement et analysés par statistique. Au total, environ 400 échantillons provenant de la vigne, de palmiers et d'agrumes, ainsi que des échantillons de plantes hôtes alternatives et d'insectes vecteurs ont été analysés.



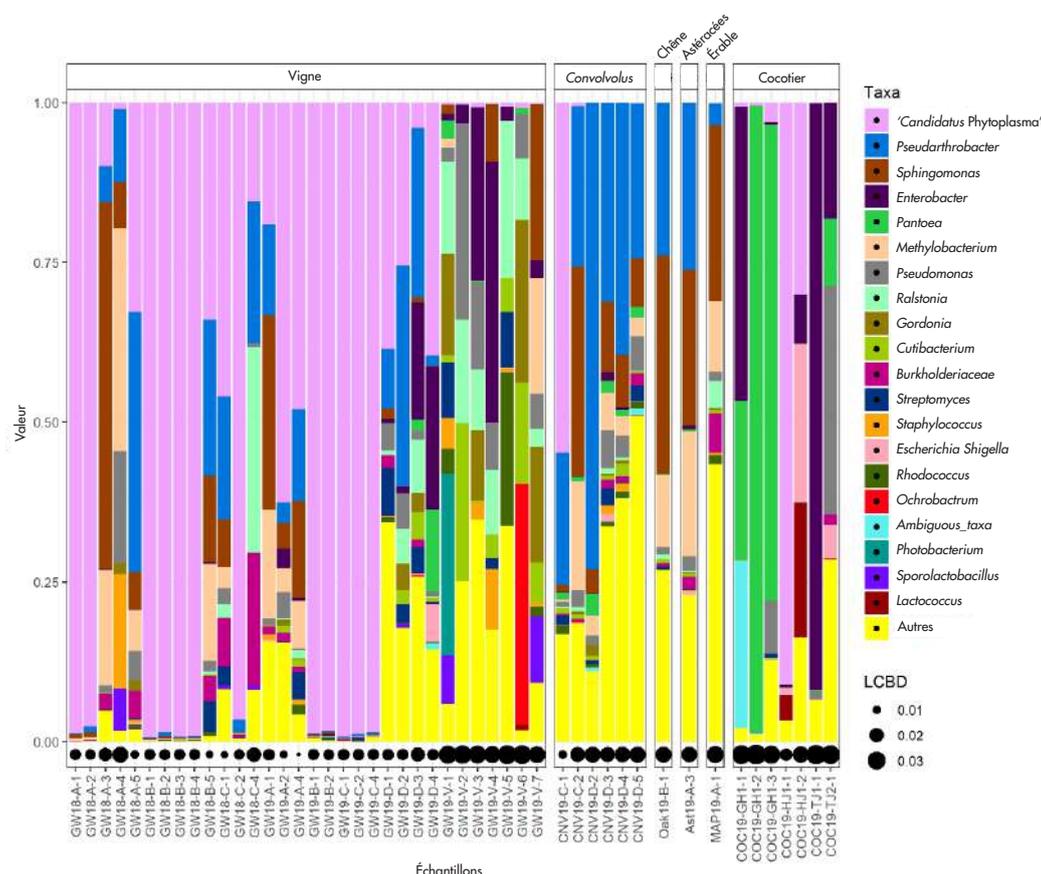
- Exemple d'amplification utilisant les amorces dégénérées optimisées 799/1193 sur une série d'échantillons d'ADN provenant de différentes plantes hôtes (vigne et palmier). La bande d'intérêt est la bande forte à environ 500 pb. Sur le côté gauche de chaque gel, un marqueur moléculaire est représenté.

## ■ COMMENT ÇA MARCHE ?

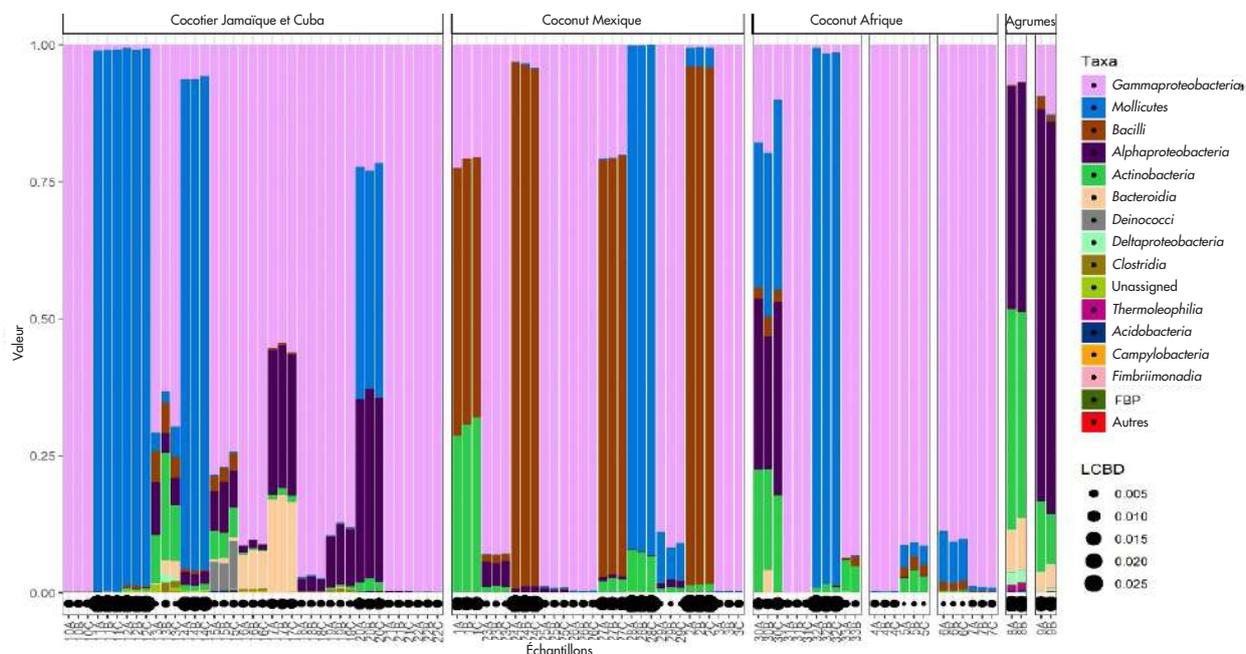
# Résultats de la différenciation bactérienne

La méthode optimisée pour la caractérisation des populations microbiennes procaryotes dans les plantes infectées par '*Ca. Phytoplasma*' et '*Ca. Liberibacter*' a amplifié avec succès l'ADN procaryote cible, tandis qu'aucune amplification notable de l'ADN des organites végétaux n'a été observée après l'assignation taxonomique des séquence nucléotidiques. Ceci est présenté dans la figure ci-dessous où la proportion de reads de '*Ca. Phytoplasma*' (barres roses) par rapport au microbiome total dans les échantillons individuels est très variable. Les barres verticales empilées montrent la distribution des taxons microbiens dans chaque échantillon dans un exemple de comparaison entre des échantillons de palmier, de vigne et d'une gamme d'hôtes alternatifs.

En général, les échantillons de vigne ont une proportion beaucoup plus élevée de reads de '*Ca. Phytoplasma*' par rapport aux autres procaryotes, et dans plusieurs cas, le phytoplasme occupait presque 100% des reads de séquence. Au sein des reads de phytoplasme, une variation de séquence a également été observée. Dans les échantillons provenant de palmiers, 71 variants de séquence différents ont été identifiés, dont 5 variants de séquence dans plusieurs échantillons. Dans les échantillons de vigne, 82 variants de séquence différents ont été détectés, et 5 d'entre eux ont été identifiés dans plusieurs échantillons et avec des nombres de reads notables dans plus d'un échantillon. Par conséquent, ces variants de séquence sont considérés comme valides.



- Barres verticales empilées montrant l'abondance relative des taxons, présents dans chaque échantillon, au niveau de la vigne, du genre *Convolvulus*, du chêne, des astéracées, de l'érable et du cocotier. Les reads '*Ca. Phytoplasma*' sont présentés en rose. La contribution locale à la diversité bêta (LCBD) est un indice comparatif d'unicité, les grandes valeurs indiquent les échantillons qui ont des compositions d'espèces fortement différentes des autres. Les valeurs LCBD sont représentées par des bulles sous les diagrammes à barres empilées pour indiquer les échantillons dont la composition est très différente.



- Barres verticales empilées montrant l'abondance relative des taxons les plus abondants, présents dans chaque échantillon. Dans les échantillons d'agrumes (quatre dernières colonnes), HLB fait partie des *Alphaproteobacteria*, tandis que les phytoplasmes font partie des *Mollicutes*. La contribution locale à la diversité bêta (LCBD) est un indice comparatif d'unicité, les grandes valeurs indiquent les échantillons qui ont des compositions d'espèces fortement différentes des autres. Les valeurs LCBD sont représentées par des bulles sous des diagrammes à barres empilées pour indiquer les échantillons dont la composition est très différente.

## MOTS CLÉS

Microbiome, amplification, bactéries, endophytes

## INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

Bodenhansen N., Horton M.W., Bergelson J. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 8(2), e56329.

Hartmann M., Frey B., Mayer J., Mader P., Widmer F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal* 9(5), 1177-1194.

Hu L., Robert C.A.M., Cadot S., Zhang X., Ye M., Li B., Manzo D., Chervet N., Steinger T., van der Heijden M.G.A., Schlaeppli K., Erb M. 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* 9, 2738.

Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41(1), e1.

## CRÉDITS

**Mogens Nicolaisen** Institut d'agroécologie, d'entomologie et de phytopathologie, Université d'Aarhus, Danemark [mn@agro.au.dk](mailto:mn@agro.au.dk)

**Nicoletta Contaldo** Alma Mater Studiorum - Université de Bologne, Département des sciences agricoles et alimentaires, Bologne, Italie [nicoletta.contaldo2@unibo.it](mailto:nicoletta.contaldo2@unibo.it)

**Francesco Pacini** Alma Mater Studiorum - Université de Bologne, Département des sciences agricoles et alimentaires, Bologne, Italie [francesco.pacini2@unibo.it](mailto:francesco.pacini2@unibo.it)

**Giulia Feduzi** Alma Mater Studiorum - Université de Bologne, Département des sciences agricoles et alimentaires, Bologne, Italie [giulia.feduzi2@unibo.it](mailto:giulia.feduzi2@unibo.it)

**Assunta Bertaccini** Alma Mater Studiorum - Université de Bologne, Département des sciences agricoles et alimentaires, Bologne, Italie [assunta.bertaccini@unibo.it](mailto:assunta.bertaccini@unibo.it)

Décembre, 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](http://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.