

**DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE PCR EN TEMPS REEL AFIN DE DETECTER ET DE QUANTIFIER
VERTICILLIUM DAHLIAE DANS LE SOL**

D. PAUMIER⁽¹⁾, C. PIERREPACK⁽¹⁾, G. GAZEAU⁽¹⁾, R. VALADE⁽¹⁾

⁽¹⁾ ARVALIS Institut du végétal
Laboratoire de pathologie végétale
Domaine AgroParisTech, Bât. INRA BIOGER CCP
78850 Thiverval Grignon – FRANCE
r.valade@arvalisinstitutduvegetal.fr

RÉSUMÉ

La verticilliose du lin est une maladie tellurique provoquée par le champignon *Verticillium dahliae*, dont les symptômes spécifiques apparaissent tardivement. Il n'existe pas de traitements fongicides ni de variétés tolérantes à cette maladie. Le champignon se conservant dans le sol sous forme de microsclérotés, un test moléculaire prédictif du risque verticilliose d'une parcelle peut être envisagé. Cette étude se propose de développer une méthode de quantification par qPCR spécifique de *V. dahliae*. La présence potentielle dans les sols d'un champignon diploïde, non pathogène du lin et hybride de *V. dahliae*, *V. longisporum*, a nécessité la mise au point de deux couples d'amorces et de sondes, placés sur l'allèle spécifique de *V. longisporum* d'une part, et sur l'allèle commun aux deux champignons d'autre part. Le dosage de *V. dahliae* s'effectue par soustraction des signaux. La méthode développée est fiable et pourrait permettre de quantifier le potentiel infectieux des sols et ainsi proposer des préconisations limitant le risque verticilliose.

Mots-clés : *Verticillium dahliae*, lin, PCR en temps réel, sol.

ABSTRACT

DEVELOPPEMENT OF A REAL TIME PCR METHOD TO DETECT AND QUANTIFY VERTICILLIUM DAHLIAE IN SOIL

Verticillium wilt of flax is a telluric disease caused by the fungus *Verticillium dahliae*. Specific symptoms can be observed only at a very late stage and there isn't any fungicide treatment nor tolerant varieties to this disease. The fungus is preserved as microsclerotia into the soils. A predictive molecular test can be developed to assess the *Verticillium* wilt risk in a plot of flax. The purpose of the present work is the development of a specific real time PCR method for *V. dahliae*. Because of the possible co-existence of an hybrid diploid fungus into the soils, *V. longisporum*, that is not flax pathogenic, it has been necessary to set two pairs of primers and probes. One set of them is specifically used to quantify *V. longisporum*, while the other focuses on the common allele of both fungi. Then the quantification of *V. dahliae* is obtained by subtracting the two signals. The developed method is accurate and could permit to quantify infectious potential of soils and so propose preconisations to control wilt of flax

Keywords: *Verticillium dahliae*, flax, real time PCR, soil.

INTRODUCTION

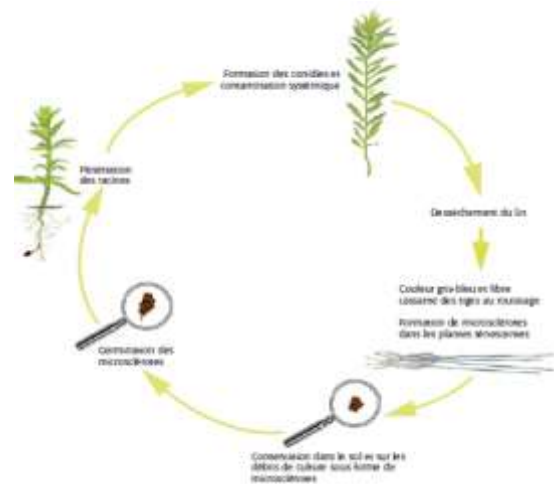
La France est le premier pays producteur de lin fibre au monde (98 000 tonnes de lin teillé; 75% du lin mondial (COURTOIS K. et al., 2012)) devant la Belgique et les Pays Bas. En France, la culture de lin fibre est localisée principalement dans les départements du Nord-Ouest. Elle s'étend de la Normandie jusqu'au Nord-Pas de Calais.

La verticilliose, causée par le champignon tellurique *Verticillium dahliae*, est une maladie en recrudescence sur les cultures de lin. Elle touche toutes les régions de culture et peut compromettre la récolte. Les symptômes sont visibles en fin de cycle. Sur pied, on observe un dessèchement et un jaunissement de la tige avec une coloration gris-bleu encore plus flagrante au moment du rouissage. La fibre issue des plantes malades devient cassante et est fortement dépréciée.

Actuellement, il n'existe pas de méthode de lutte pour combattre *V. dahliae*. L'utilisation de fongicides ne présente aucun résultat satisfaisant et il n'existe pas de variétés tolérantes.

Le cycle biologique de la verticilliose est bien connu (Figure 1) : le champignon se conserve dans le sol pendant de très nombreuses années sous forme de microsclérotés. Ces formes de survie germent au contact des plantes hôtes ou non hôtes. L'agent pathogène pénètre les racines du lin, et colonise le système vasculaire de la plante qui se dessèche et meurt. Dans les tissus en sénescence, *V. dahliae* produit des microsclérotés qui seront relâchés dans le sol lors de la décomposition de la plante et qui constitueront l'inoculum primaire de la maladie lors de la prochaine culture.

Figure 1 : Etapes de l'infection du lin fibre par *V. dahliae* (ARVALIS Institut du Végétal, 2014)
V. dahliae contamination steps in flax



Le champignon *V. dahliae* étant présent dans le sol, il est théoriquement possible de pouvoir quantifier et anticiper le risque verticilliose d'une parcelle, notamment grâce aux techniques d'analyses moléculaires comme la PCR quantitative. Un test prédictif du risque verticilliose pourrait permettre d'adapter l'itinéraire technique cultural. En effet, en arrachant le lin plus tôt, on entraîne un rouissage plus précoce et la maladie a ainsi moins de temps pour se développer. On pourrait aller jusqu'à conseiller de ne plus cultiver de lin sur les parcelles trop infectées.

Le développement de la qPCR a nécessité une approche originale. Le génome de *V. dahliae* a été décrypté et publié en 2011 (Klosterman et al., 2011). Néanmoins, il est impossible de détecter *V. dahliae* directement par PCR, car *V. dahliae* est le parent d'un autre champignon : *Verticillium longisporum*. Ce dernier est un hybride, pouvant être formé par plusieurs parents ; l'espèce A1 apporte toujours la moitié du génome du champignon. L'autre partie est apportée soit par l'espèce D1, soit par *V. dahliae* lignée D2, soit par *V. dahliae* lignée D3 (Inderbitzin et al. 2011). *V. longisporum* est donc diploïde et peut avoir un génotype A1/D1, A1/D2 ou A1/D3. Par conséquent et avec les données moléculaires disponibles dans les bases de données, il n'est pas possible de dessiner des amorces spécifiques de *V. dahliae*. Pour chaque locus fréquemment utilisé dans des méthodes de quantification moléculaire (EF1- α , actine, glyceraldehyde-3-phosphate, protéine de transport de l'oxalate mitochondrial et tryptophane), des allèles sont communs entre les deux espèces. Or, *V. longisporum*, champignon non pathogène du lin, est également présent dans les sols ce qui implique

des biais dans la caractérisation des sols en utilisant une méthode classique de qPCR. Une technique de qPCR originale a été mise au point par Debode et al., (2011). Cette méthode permet de quantifier *V. dahliae* en combinant deux qPCR indépendantes, une spécifique de *V. longisporum* (amorces et sonde placées sur le brin A1) et une spécifique de *V. longisporum* + *V. dahliae*. La comparaison des deux résultats permet de détecter et quantifier la présence de *V. dahliae*. Néanmoins, elle présente des limites car le gène utilisé est la bêta-tubuline. Or, ce gène est présent en multicopie et le nombre peut être variable selon les espèces et les génotypes (Clews et al., 2008 ; Collado-Romero et al., 2010 ; Inderbitzin et al. 2011) ce qui peut entraîner un biais dans la quantification. Nous avons donc décidé, de développer un outil moléculaire fiable, robuste et précis avec la même stratégie que Debode et al., (2011) sur un gène monocopie.

MATERIELS ET MÉTHODES

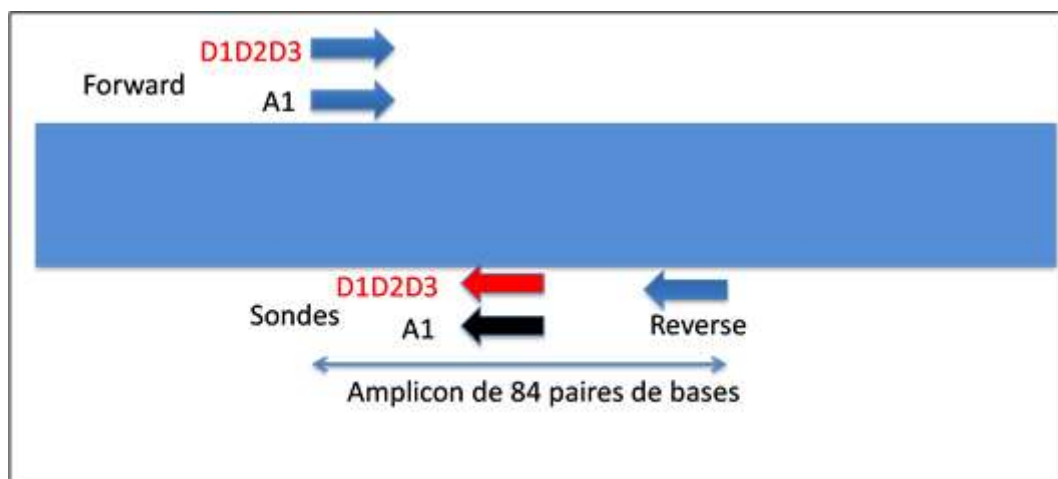
DESSIN DES SONDAS ET AMORCES

Peu de séquences de *Verticillium* isolé du lin étant disponibles sur le NCBI, huit souches disponibles au laboratoire ont été séquencées.

A l'aide de ces séquences et des nombreuses séquences de *Verticillium* obtenues par l'équipe de P. Inderbitzin (2013), deux couples d'amorces et sondes ont été dessinés manuellement et vérifiés à l'aide des logiciels SeqBuilder (DNASTar, USA), Primer Select (DNASTar, USA), Primer Probe Test tool (Primer Express 3.0 et OligoAnalyser 3.1 (integrated DNA Technologies) et Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Un couple d'amorce et sonde permet de doser *V. longisporum* (nommé sonde A1), l'autre dose *V. dahliae* et *V. longisporum* (nommé sonde D1D2D3).

Les deux couples d'amorces et sondes ont été dessinées sur le gène EF1-alpha (Figure 2), afin de quantifier l'allèle EF1-alpha spécifique à *V. longisporum* (A1) et l'allèle EF1-alpha partagé entre *V. longisporum* et *V. dahliae* (D1D2D3). Le signal de fluorescence obtenu par qPCR pour l'allèle partagé (amplification spécifique de *V. longisporum* et *V. dahliae*) sera soustrait au signal de fluorescence de l'allèle spécifique à *V. longisporum* pour quantifier *V. dahliae*.

Figure 2 : Position des amorces et des sondes des deux qPCR, dessinées sur le gène EF1-alpha. Probes and primers location on EF1-alpha gene.



VERIFICATION DE LA ROBUSTESSE DES QPCR

Le programme de ces deux qPCR se compose d'une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, puis de 40 cycles de 15 secondes à 95°C et d'une minute à 62°C. Il a été mis au point sur l'appareil BIORAD CFX 96TM – Real Time System, C1000TM Thermal Cycler. Le mix qPCR provient de la société Eurogentec, les amorces et les sondes sont synthétisées par Eurogentec (Seraing, Belgique).

Après avoir optimisé la concentration en amorces et en sonde, différents paramètres ont été étudiés et validés selon le guide COFRAC et la norme AFNOR NF V03-110 : la spécificité, la linéarité, les limites de détection et de quantification, la répétabilité et la reproductibilité de chacun de deux systèmes. De plus, des droites de calibration ont été effectuées avec plusieurs souches d'une même espèce et comparées entre-elles.

Optimisation de la concentration en amorce

Chaque point de la gamme (5ng, 0.5ng, 0.05ng, 0.005ng) a été dosé en SYBR GREEN en triplicate avec chacune des combinaisons possibles entre les amorces pour des concentrations de 150nM, 300nM, 600nM et 900nM. Une courbe de dissociation a été effectuée en fin de qPCR. La meilleure concentration est celle qui donne la valeur de Ct la plus faible. La courbe de dissociation a permis de vérifier l'absence de dimères d'amorces pour les concentrations en amorces choisies.

Optimisation de la concentration en sonde

Chaque point de la gamme (5ng, 0.5ng, 0.05ng, 0.005ng) a été dosé en triplicate avec des concentrations en sonde de 50nM, 100nM, 200nM et 250nM. La meilleure concentration est celle qui donne la valeur de Ct la plus faible.

TEST DE LA METHODE PAR SOUSTRACTION

Afin de permettre la calibration des mélanges, trois gammes de quatre points (5ng, 0.5ng, 0.05ng et 0.005ng) dosés chacun en triplicata, ont été réalisées. La première a été effectuée avec une souche de *V. dahliae* et a été dosée avec la sonde D1D2D3. Pour la seconde, une souche de *V. longisporum* a été utilisée, la gamme a été dosée avec la sonde D1D2D3 également. La troisième droite est obtenue avec une souche de *V. longisporum* dosée avec la sonde A1.

Des puits contenant différentes quantités de *V. longisporum* seul et de *V. dahliae* seul ont permis des comparaisons avec des puits contenant un mélange de ces deux champignons aux mêmes quantités. Certains mélanges se composaient de *V. longisporum* majoritairement ; pour d'autres, le champignon majoritaire était *V. dahliae*. Le champignon majoritaire a été testé aux quantités de 4, 0.4, 0.04, 0.004ng d'ADN, le champignon minoritaire aux quantités de 1, 0.1, 0.01, 0.001ng. Les échantillons contenant un mélange de champignons ont été dosés en triplicata, les autres en duplicata.

Les trois géotypes de *V. longisporum* (A1D1, A1D2, et A1D3) ont été testés.

Ainsi, les quantités de *V. dahliae* des mélanges ont été obtenues en soustrayant la quantité obtenue avec la sonde A1 (qui ne dose que *V. longisporum*) à la quantité obtenue avec la sonde D1D2D3 (système qui dose *V. longisporum* et *V. dahliae*). Cette quantité calculée est comparée à celle obtenue dans le puits contenant la même quantité de *V. dahliae* seul d'une part et à la quantité théorique d'autre part.

TEST PERMETTANT D'EVALUER LA FIABILITE DU DOSAGE DE L'ADN DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* DANS LE SOL

Un échantillon de terre provenant d'une parcelle sur laquelle aucun symptôme de verticilliose n'a été observé a été sélectionné. Une solution de microsclérotés a été préparée et dosée à l'aide d'une cellule de Malassez. Des quantités connues de microsclérotés ont été ajoutées à quatre échantillons

de terre en duplica : 34 microscélérotés ont été ajoutés à deux échantillons de 100 g de sol, 300 microscélérotés à deux autres, 1000 microscélérotés pour les deux suivants puis 2000 pour les derniers.

Les échantillons de terre ainsi obtenus ont été homogénéisés et filtrés selon la méthode de J. Debode (2011) puis l'ADN a été extrait, purifié à l'aide de colonnes de PVPP et dosé par qPCR.

En parallèle, l'ADN des solutions contenant 34, 300, 1000, et 2000 microscélérotés a été extrait, purifié à l'aide de colonnes de PVPP et dosé.

RESULTATS

La méthode de concentration des microscélérotés utilisée par Jane Debode et al. (2011) a été utilisée. Plusieurs kits d'extraction ont été testés (résultats non présentés ici), le NucleoSpin Soil kit® de chez Masherey-Nagel a été retenu, avec quelques modifications de protocole. Le broyage a été effectué à l'aide du broyeur à billes Vibro-broyeur MM 400, (RETSCH) pendant 2 minutes à 30 Hz en disposant dans chaque tube deux billes de 3 mm de diamètre à la place du FastPrep®. L'élimination des inhibiteurs de PCR à l'aide de colonnes de PVPP s'est avérée efficace et a été utilisée pour l'extraction des sols.

VERIFICATION DE LA ROBUSTESSE DES QPCR

Vérification de la spécificité du système, détermination des limites de quantification et de détection

Après avoir optimisé la concentration en amorces (600nM) et en sonde (100nM) et vérifié que les amorces ne s'hybridaient pas entre elles en présence d'échantillon, des tests de limites de détection et de quantification ont permis de définir une limite de détection de 36.3 Cq et une limite de quantification de 32.8 Cq pour le système permettant de doser *V. longisporum* seul (sonde A1) et une limite de détection de 37.4 Cq et une limite de quantification de 34.1 Cq pour le système permettant de doser *V. dahliae* et *V. longisporum* (sonde D1D2D3). Le test de spécificité a permis de montrer qu'aucune souche différente de *V. dahliae* et *V. longisporum* ne donnait un Cq supérieur aux limites de détection tout en détectant bien *V. dahliae* (six souches testées) et *V. longisporum* (sept souches testées, dont les trois génotypes A1/D1, A/D2 et A1/D3). De nombreuses souches ont été testées, des souches de *Verticillium* (*V. nubilum*, *V. isaacii*, *V. alfalfae*, *V. albo-atrum*), fournies par K. Subbarao, des souches de la mycothèque ARVALIS (*Alternaria*, *Botrytis*, *Chalara elegans*, *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Microdochium majus*, *Phoma lini*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*), une souche fournie par MUCL (*Kabatiella lini*) et une souche fournie par Terres Inovia (*Leptosphaeria maculans*). Ce test a également permis de vérifier que la sonde A1 ne détectait pas *V. dahliae*.

Validation de la droite de calibration et vérification de la normalité et de la linéarité des deux systèmes

Des gammes de calibration ont été effectuées avec plusieurs souches d'une même espèce et comparées entre-elles. Leurs efficacités ont été supérieures ou proche de 90% et l'écart-type des efficacités inférieur à 3.5%. Leurs R² ont été supérieurs à 0,990. L'écart-type des y-intercept a été inférieur à 0,5, ce qui participe à la validation des deux qPCR. Le tableau 1 présente les résultats avec la sonde D1D2D3, obtenu avec cinq souches de *V. dahliae*.

Tableau I : Comparaison de cinq droites de calibration obtenues avec cinq souches de *V. dahliae*.
Comparison of five calibration curves made from five *V. dahliae* strains.

Nom de la souche	Efficacité	y_intercept	linéarité (R ²)	moyenne du Ct du point à 5ng
VE12008-7	90.0	26.461	0.996	24.15
VE05001	93.8	26.783	0.992	24.73
VE08001	96.8	26.310	0.995	24.14
VE08007	93.4	25.567	0.996	23.26
VE08009	89.8	26.660	0.993	24.26
Moyenne	92.76	26.36		
Ecart-type	2.92	0.477		

Par ailleurs, les linéarités des droites de calibration ont été vérifiées suivant un test statistique sur la régression linéaire après analyse des variances. Seule la qPCR A1, dont la probabilité de 0,0478 était légèrement inférieure à la probabilité de non linéarité au risque 5% (Tableau 2) n'est pas statistiquement validée mais le résultat est très probablement due à un biais expérimental sur une des gammes testées (linéarité acceptée avec les 4 autres réplicats).

Tableau II : Valeurs des probabilités après analyses des variances pour les tests de linéarité.
Probability values obtained from variances analyses for linearity tests.

Système de détection	Cible	Probabilité du test	Linéarité (>5%)
Sonde D1D2D3	<i>V. dahliae</i>	0,384	Acceptée
	<i>V. longisporum</i>	0,499	Acceptée
Sonde A1	<i>V. longisporum</i>	0,0478	Refusée au seuil de 5%

Vérification de la fidélité des deux qPCR

Pour chacune des deux sondes A1 et D1D2D3, les CV des tests de reproductibilité et de répétabilité sont conformes aux normes du guide COFRAC (CV inférieur respectivement à 35% et à 25%). Effectivement les CV obtenus lors du test de répétabilité de trois échantillons de concentrations différentes ont été de 21.7%, 24.1% et 21.8% avec la sonde D1D2D3. Pour le test de reproductibilité, les CV obtenus ont été de 23.3%, 30.3% et 32.9%. Pour la sonde A1, les CV obtenus ont été de 15% et 17.4% en répétabilité et de 26.3% et 29.9% en reproductibilité.

TEST DE LA METHODE PAR SOUSTRACTION

Le tableau 3 montre que la quantité de *V. dahliae* obtenue par la méthode de soustraction est très proche de la quantité attendue quand *V. dahliae* est majoritaire dans les mélanges. La quantification de *V. dahliae* est moins précise quand il est minoritaire (tableau 4).

Tableau III : Quantités d'ADN de *V. dahliae* obtenues expérimentalement par soustraction quand *V. dahliae* est présent majoritairement dans le mélange.

V. dahliae DNA quantities experimentally obtained by subtraction when the mix is mostly made up of *V. dahliae*.

Champignon minoritaire	Quantité expérimentale d'ADN de <i>V. dahliae</i> (Quantité SystèmeD1D2D3 - Quantité Système A1) ¹	Quantité théorique attendue d'ADN de <i>V. dahliae</i> ²	Quantité expérimentale d'ADN de <i>V. dahliae</i> obtenue dans les puits ne contenant que <i>V. dahliae</i> ³
<i>V. longisporum</i> A1/D3	4,3 ng	4 ng	3,7 ng
	0,4 ng	0,4 ng	0,4 ng
	0,04 ng	0,04 ng	0,05 ng
	0,005 ng	0,004 ng	0,004 ng
<i>V. longisporum</i> A1/D2	3,5 ng	4 ng	2,7 ng
	0,4 ng	0,4 ng	0,30 ng
	0,04 ng	0,04 ng	0,029 ng
	0,003 ng	0,004 ng	0,003 ng
<i>V. longisporum</i> A1/D1	4,7 ng	4 ng	3,7 ng
	0,5 ng	0,4 ng	0,4 ng
	0,06 ng	0,04 ng	0,04 ng
	0,005 ng	0,004 ng	0,004 ng

Tableau IV : Quantités d'ADN de *V. dahliae* obtenues expérimentalement par soustraction quand *V. longisporum* est présent majoritairement dans le mélange.

V. dahliae DNA quantities experimentally obtained by subtraction when the mix is mostly made up of *V. longisporum* (A1/D3).

Champignon majoritaire	Quantité expérimentale d'ADN de <i>V. dahliae</i> (Quantité SystèmeD1D2D3 - Quantité Système A1) ¹	Quantité théorique attendue d'ADN de <i>V. dahliae</i> ²	Quantité expérimentale d'ADN de <i>V. dahliae</i> obtenue dans les puits ne contenant que <i>V. dahliae</i> ³
<i>V. longisporum</i> A1/D3	2,1 ng	1 ng	0,9 ng
	0,26 ng	0,1 ng	0,1 ng
	0,027 ng	0,01 ng	0,01 ng
	0,003 ng	0,001 ng	0,0007 ng
<i>V. longisporum</i> A1/D2	2,98 ng	1 ng	0,9 ng
	0,24 ng	0,1 ng	0,09 ng
	0,026 ng	0,01 ng	0,01 ng
	0,001 ng	0,001 ng	0,001 ng
<i>V. longisporum</i> A1/D1	1,8 ng	1 ng	1 ng
	0,26 ng	0,1 ng	0,1 ng
	0,03 ng	0,01 ng	0,01 ng
	0,002 ng	0,001 ng	0,001 ng

¹ : quantité expérimentale de *V. dahliae* obtenue en soustrayant les quantités de *V. dahliae* et *V. longisporum* dosées par la sonde D1D2D3 dans les puits contenant les mélanges d'espèces, par les quantités de *V. longisporum* dosées par la sonde A1 dans les puits contenant les mélanges d'espèces.

² : quantité théorique de *V. dahliae* (ng) attendue par l'expérimentateur après soustraction des signaux émis par la sonde D1D2D3 par ceux de la sonde A1 pour les puits contenant les mélanges d'espèces.

³ : quantité expérimentale de *V. dahliae* (ng) dosée par la sonde D1D2D3 dans les puits contenant seulement l'espèce *V. dahliae*. Cette quantité correspond à la quantité de *V. dahliae* réellement présente dans les mélanges d'espèces, elle prend en compte les éventuelles imprécisions de manipulation lors des dilutions.

TESTS PERMETTANT D'ÉVALUER LA FIABILITÉ DU DOSAGE DE L'ADN DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* DANS LE SOL

Le tableau 5 présente le dosage de *V. dahliae* par qPCR des échantillons de terre additionnés de différentes quantités de microsclérotés. La quantité de *V. longisporum* dans la terre avant addition de microsclérotés a été dosée à l'aide du système A1. Cette terre ne contenait pas de *V. longisporum*. Ainsi, la valeur obtenue avec la sonde D1D2D3 est suffisante pour déterminer la quantité de *V. dahliae*. Le tableau 6 présente le dosage par qPCR des mêmes quantités de microsclérotés non incorporées dans le sol, le système de concentration des microsclérotés de J. Debode (2011) n'est donc pas utilisé ici.

Ces résultats ont permis de tracer deux droites : la quantité d'ADN de *V. dahliae* en fonction du nombre de microsclérotés (figure 3), et le nombre théorique de microsclérotés présents dans l'échantillon par g de sol en fonction de la quantité expérimentale d'ADN de *V. dahliae* en pg/g de sol (figure 4). Les fortes corrélations obtenues montrent la reproductibilité de la méthode même à partir d'échantillons de sol.

Tableau V : Dosage de l'ADN de *V. dahliae* dans des sols auxquels on a ajouté une quantité connue de microsclérotés (ms).

Quantification of *V. dahliae* DNA from soils mixed with a known microsclerotia quantity.

système utilisé pour le dosage	échantillon	SQ moy en ng	Moyenne des répétitions en ng	Ecart-type des répétitions	pg de <i>V. dahliae</i> par g sol
D1D2D3	100g terre + 34 ms rep1	0.4134	0.399	0.020	3.993
D1D2D3	100g terre + 34 ms rep2	0.3852			
D1D2D3	100g terre + 300 ms rep1	0.47235	0.392	0.114	3.915
D1D2D3	100g terre + 300 ms rep2	0.310695			
D1D2D3	100g terre + 1000 ms rep 1	0.73215	0.654	0.110	6.544
D1D2D3	100g terre + 1000 ms rep2	0.28833			
D1D2D3	100g terre + 2000 ms rep1	0.86235	0.768	0.133	7.681
D1D2D3	100g terre + 2000 ms rep2	0.6738			

Tableau VI : Dosage de l'ADN de *V. dahliae* de quantités connues de microsclérotés. Quantification of *V. dahliae* DNA from a known microsclerotia quantity.

système utilisé pour le dosage	échantillon	SQ moy en ng	Moyenne des répétitions en ng	Ecart-type des répétitions	pg de <i>Verticillium dahliae</i> par g sol
D1D2D3	34 ms rep 1	0.06080	0.032047	0.041	0.32
D1D2D3	34 ms rep 2	0.00330			
D1D2D3	300 ms rep1	0.37755	0.462900	0.121	4.63
D1D2D3	300 ms rep2	0.54825			
D1D2D3	1000 ms rep1	1.44120	1.702125	0.369	17.02
D1D2D3	1000 ms rep2	1.96305			
D1D2D3	2000 ms rep1	3.77850	3.702750	0.107	37.03
D1D2D3	2000 ms rep2	3.62700			

Figure 3 : Quantités d'ADN de *V. dahliae* en fonction du nombre de microscélérotés.
V. dahliae DNA quantities depending upon microsclerotia number.

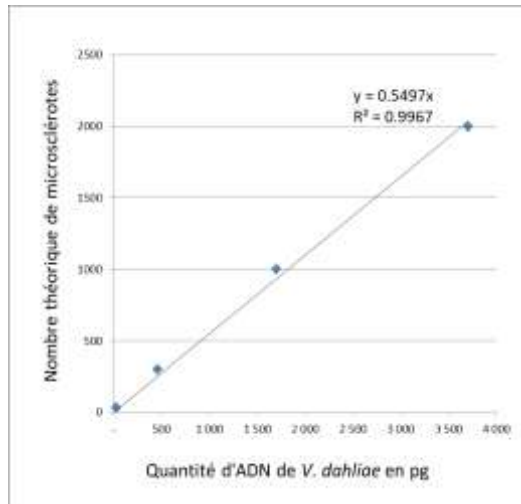
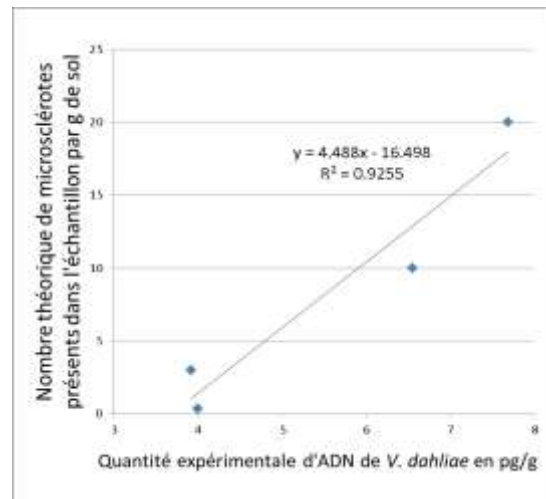


Figure 4 : Quantité expérimentale d'ADN de *V. dahliae* en fonction du nombre de microscélérotés dans un échantillon de sol.
V. dahliae DNA quantities experimentally obtained depending upon microsclerotia number in a soil sample.



DISCUSSION

Cette étude a permis la mise au point de deux qPCR qui, par soustraction des signaux, permettent de quantifier l'ADN de *V. dahliae* dans un mélange de *V. dahliae* et de *V. longisporum* ce qui était indispensable car d'une part, ces deux champignons peuvent être présents en mélange dans les sols, et d'autre part, *V. dahliae* seulement est à l'origine de la verticilliose du lin.

La détermination des limites de quantification et de détection, la vérification de la non-hybridation des amorces, de la spécificité, les tests de normalité, de linéarité, de fidélité ont permis de valider les méthodes qPCR.

La quantification par soustraction de *V. dahliae* présent dans les mélanges avec *V. longisporum* n'est pas tout à fait exacte mais les valeurs obtenues sont proches des valeurs théoriques et montrent que cette méthode originale de quantification est viable pour différencier et quantifier les deux espèces dans le sol. De plus, le système est plus précis quand *V. dahliae* est majoritaire, or une analyse réalisée sur 12 sols (données non présentées) a montré une présence minoritaire de *V. Longisporum* dans les sols testés. Un des facteurs les plus importants pour avoir des résultats fiables est de disposer de gammes de calibration (pour chaque sonde et espèce) qui se superposent. La qualité de l'extraction et du dosage des ADN servant à faire les gammes est donc primordiale.

Un dosage de la quantité d'ADN de solutions de microscélérotés de concentrations connues a permis de mettre en évidence une relation linéaire entre la quantité d'ADN et le nombre de microscélérotés. Les mêmes quantités connues de microscélérotés ont été ajoutées à des échantillons de terres. Pour une même quantité de microscélérotés, les quantités d'ADN de *V. dahliae* dosées dans les échantillons de terre sont nettement moins importantes que celles obtenues directement à partir des microscélérotés. Des pertes lors de la concentration des microscélérotés ont été mises en évidence : par exemple, il reste des microscélérotés sur le filtre en fin de manipulation. De nombreux tests ont été effectués dans cette étude pour diminuer cette perte (non présentés ici) mais aucun n'a permis d'obtenir de meilleurs rendements que la méthode de J. Debode (2011). Néanmoins, la reproductibilité de la méthode de filtration est bonne (données non montrées) ce qui permet donc de pouvoir comparer différents sols entre eux. La relation linéaire entre la quantité expérimentale

d'ADN de *V. dahliae* en pg/g de sol et le nombre théorique de microscélérotés présents dans l'échantillon par g de sol est forte ($R^2=0.9255$). L'ordonnée à l'origine est différente de zéro dans notre expérience, ceci peut s'expliquer par le fait que la terre qui a servi à faire ce test n'était pas exempte de *V. dahliae*. Effectivement, bien que cette parcelle ne présentait pas de symptômes de verticilliose les années précédant le prélèvement, le champignon pouvait se trouver dans le sol sans provoquer de maladie (conditions climatiques, itinéraire technique cultural...). La relation linéaire entre la quantité expérimentale d'ADN de *V. dahliae* en pg/g sol et le nombre théorique de microscélérotés présents dans l'échantillon par g de sol doit être confirmée par la réalisation de tests complémentaires.

Pour pouvoir utiliser la méthode comme indicatrice du risque verticilliose d'une parcelle, des expériences sont encore à mener. Tout d'abord, des tests de détection et quantification de *V. dahliae* par qPCR en multiplex doivent être menés afin de s'assurer que les deux systèmes sonde-amorces n'interagissent pas de manière négative une fois en mélange dans les puits.

De plus, nous avons déterminé la limite de détection et de quantification de la méthode qPCR avec des microscélérotés purs mais nous ne connaissons pas la sensibilité de la méthode dans des échantillons de sol. Il semblerait que nous puissions quantifier moins d'1 microscélérote par g de sol mais la terre témoin négatif utilisée n'était pas exempte de microscélérotés. Effectivement, de faibles quantités d'ADN de *Verticillium dahliae* ont été retrouvées lors de plusieurs dosages de cette terre. Ainsi, il sera donc utile de calculer la quantité minimale de scélérotés quantifiables dans un échantillon de sol afin de pouvoir déterminer si la méthode est assez sensible pour classer différents sols selon leur potentiel infectieux. Pour cela, des terres saines devront être inoculées avec différentes concentrations de microscélérotés.

Des analyses sur des plantes (qPCR, corrélation avec les notations symptômes, quantification du champignon dans la phase asymptomatique) sont également en cours afin de valider l'utilité de la méthode pour anticiper le risque verticilliose d'une parcelle.

Des échantillons de différentes parcelles, certaines saines, d'autres contaminées, situées dans des zones géographiques représentatives de la culture du lin, ont également été prélevés. La verticilliose étant répartie de façon hétérogène dans un champ contaminé, une centaine de prélèvements de 10g selon un tracé en W au sein de chaque parcelle a été effectué selon la méthode de Jennie L. Brierley and al. (2009) et Kathy Ophel-Keller et al. (2008). Des notations de symptômes ont également été effectuées sur ces parcelles. Si une corrélation est observée entre la quantification moléculaire de *V. dahliae* et les notations des symptômes des parcelles, alors la méthode pourra être validée et un test prédictif du risque verticilliose d'une parcelle proposé.

CONCLUSION

Dans cette étude, une méthode de quantification de l'ADN de *V. dahliae* par qPCR, originale, spécifique, sensible et rapide a été développée et validée. La méthode est prometteuse pour quantifier l'agent causal de la verticilliose du lin, maladie très importante du lin fibre, dans les sols mais aussi les plantes. Des tests complémentaires sont nécessaires afin de valider l'utilité de la méthode pour anticiper le risque verticilliose d'une parcelle et envisager de proposer des préconisations selon le potentiel infectieux d'un sol.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de FranceAgrimer. Nous tenons également à remercier l'équipe de K. Subbarao, Terres Inovia et Terre de Lin pour les souches de champignons qu'ils nous ont fournies. Nous remercions également Hélène Batina et Valérie Laval pour leur expertise dans la mise au point des méthodes qPCR.

BIBLIOGRAPHIE

ARVALIS Institut du végétal, 2014, *Diagnostic des accidents du lin fibre*.

Brierley J. L., Stewart J. A., Lees A. K., 2009. Quantifying potato pathogen DNA in soil. *Applied Soil Ecology*, Volume 41, Issue 2, 234-238.

Clewes E., Edwards S. G., Barbara D.J., 2008. Direct molecular evidence supports long-spores microsclerotial isolates of *Verticillium* from crucifers being interspecific hybrids. *Plant Pathol*, 57 :1047-1057.

Collado-Romero M., Jiménez-díaz R.M., Mercado-Blanco J., 2010 DNA sequence analysis of conserved genes reveals hybridization events that increase genetic diversity in *Verticillium dahliae*

Courtois K., Sorin Pao A., Huang D., 2012, Synthèse du Centre d'analyse régional des mutations de l'économie et de l'emploi (CARMEE). *Les perspectives de développement de la filière lin textile en Picardie*.

Debode J. et Van Poucke K., 2011. Detection of multiple *Verticillium* species in soil using flotation and real-time PCR. *Plant disease*.

Inderbitzin P., Davis R.M., Bostock R.M., Subbarao K.V., 2011. The Ascomycete *Verticillium longisporum* Is a Hybrid and a Plant Pathogen with an Expanded Host Range. *PLoS ONE*.

Inderbitzin P., Bostock R.M., Davis R.M., Usami T., Platt H.W., Subbarao K.V., 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE*.

Klosterman S. J., Subbarao K.V., Kang S., Veronese P., Gold S.E., Thomma B.P. H. J., Chen Z., Henrissat B., Lee Y.H., Park J., Garcia-Pedrajas M.D., Barbara D.J., Anchieta A, de Jonge R., Santhanam P., Maruthachalam K., Atallah Z., Amyotte S.G., Paz Z., Inderbitzin P., Hayes R.J., Heiman D.I., Young S., Zeng Q., Engels R., Galagan J., Cuomo C.A., Dobinson K.F., Ma L.J., 2011 Comparative Genomics Yields Insights into Niche Adaptation of Plant Vascular Wilt Pathogens. *PLoS Pathogens*.

Ophel-Keller K., McKay A., Hartley D., Herdina, Curran J., 2008. Development of a routine DNA-based testing service for soilborne diseases in Australia. Australasian. *Plant Pathology*, 243-253.

Norme et Guide :

Guide d'accréditation COFRAC concernant la détection d'ADN issus d'OGM végétaux (soja, maïs et colza). Document LAB GTA 02, Révision 01- Mars 2008.

Norme AFNOR NF V03-110 « Analyse des produits agricoles et alimentaires – procédure de validation intra laboratoire – cas de méthodes d'analyse quantitative », 2010.