

QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL DU DEVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS *ALTERNARIA BRASSICICOLA* ET *BOTRYTIS CINEREA* SUR *Arabidopsis thaliana*.

Claire Gachon¹, Patrick Saindrenan¹

Dans les pathosystèmes *Arabidopsis/Alternaria* et *Arabidopsis/Botrytis*, la plupart des tests de résistance actuellement utilisés reposent sur la mesure du diamètre des lésions. Lourds à mettre oeuvre, ces tests souffrent d'une variabilité importante, susceptible de masquer des variations significatives de niveaux de résistance des plantes ou d'agressivité de l'agent pathogène. Le suivi *in planta* du développement des champignons par PCR en temps réel constitue une alternative sensible, robuste, et simple à mettre en oeuvre par rapport aux tests actuels.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel végétal et inoculation

L'inoculation est réalisée sur des plantes âgées de 6 à 7 semaines, cultivées en jours courts (8 h), à 20° C, et sous une humidité relative de 75%. La souche d'*Alternaria brassicicola* MUCL20297 provient de W.F. Brokaert (Université de Louvain, Belgique). La souche de *Botrytis cinerea* est un don de Thierry Barchietto (société Biotransfer). Les inoculations sont réalisées en déposant 3 gouttes de 3 µL sur chaque feuille. Les plantes inoculées avec *Botrytis* sont également blessées avec une aiguille de seringue. Après inoculation, les plantes sont maintenues sous humidité saturante.

1.2. Extraction d'ADN

L'ADN est extrait selon la technique d'Edward *et al.* (1991), avec quelques modifications. Chaque échantillon contient 4 feuilles congelées et broyées dans l'azote liquide. 1,6 mL de tampon d'extraction (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) y est ensuite ajouté. Les échantillons sont incubés une heure à température ambiante, puis centrifugés 10 min à 13.000 g. 300 µL de surnageant sont prélevés et mélangés en proportion égale avec de l'isopropanol. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13.000 g pendant 10 min. Le culot (souvent de couleur brunâtre) est lavé deux fois avec de l'éthanol 70% (v/v), puis repris dans 500 µL d'eau.

1.3. PCR en temps réel

Chaque réaction de PCR est composée de 10 µL de chaque échantillon d'ADN, de 12,5 µL de SybrTMGreen Mastermix (Eurogentech, Serain, Belgique), et des amorces adéquates à la concentration finale de 300 nM. Le volume final est fixé à 25 µL. Les réactions sont réalisées en duplicates, et les échantillons sont quantifiés à partir d'une gamme étalon tracée à partir de dilutions sériées d'ADN génomique de chaque espèce étudiée. Le programme de PCR est le suivant : 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C, et 40 cycles de 15 s à 95 °C et 1 min à 60 °C. La réaction de PCR est suivie par l'acquisition d'une courbe de dissociation entre 60 et 95 °C

¹ Institut de Biotechnologie des Plantes, UMR 8618, Université Paris XI-CNRS, Bâtiment 630, 91405 ORSAY Cedex, France. Tel : 33 (0)1 69 15 33 64. Fax : 33 (0)1 69 15 34 24. mél : saindrenan@ibp.u-psud.fr

destinée à vérifier la spécificité de l'amplification. La séquence des amorces utilisées ainsi que leur cible est précisée dans le Tableau 1.

Séquence cible	N° d'accension	Nom de l'amorce	Séquence (de 5' en 3')
α -Shaggy Kinase <i>Arabidopsis</i>	<u>At5g26751</u>	iASK1	CTTATCGGATTTCTCTATGTTTGGC
		iASK2	GAGCTCCTGTTTATTTAACTTGACATACC
cutinase A <i>A. brassicicola</i>	<u>ABU03393</u>	CG9	GCATGTCCGCTCACCAATATC
		CG10	GCCTGGGATCTTGGAATGC
cutinase A <i>B. cinerea</i>	<u>Z69264</u>	CG11	AGCCTTATGTCCCTTCCCTTG
		CG12	GAAGAGAAATGGAAAATGGTGAG

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées dans ce travail.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Principe de la quantification

La méthode présentée ici a été décrite en détail par Gachon *et al* (2004). Elle repose sur la quantification relative dans chaque échantillon de l'ADN de plante et de l'ADN fongique par la réalisation de deux réactions de PCR en temps réel, l'une dirigée contre un gène de plante (une α -Shaggy kinase-like, iASK), l'autre contre un gène fongique (la cutinase A, cutA). Le rapport des deux (cutA/iASK) est influencé à la fois par le développement du champignon et par la dégradation éventuelle de l'ADN de plante liée à la progression des symptômes. Ce rapport n'est donc pas une mesure de la biomasse fongique présente sur la plante, mais un indicateur intégrant à la fois le développement de l'agent pathogène et la réponse de la plante hôte. Il est donc très adapté à l'évaluation de la résistance de plantes contre un agent pathogène ou à la mesure de l'agressivité de différentes souches de champignon.

2.2. Spécificité, sensibilité et robustesse du test

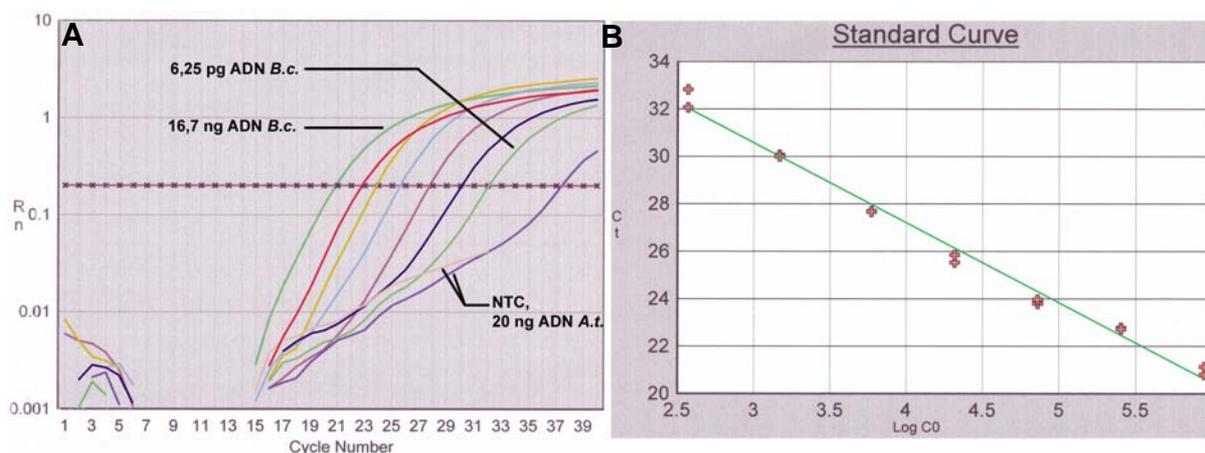


Figure 1 : A. Courbes d'amplification obtenues avec le couple d'amorces CG11/CG12 sur des dilutions sériées d'ADN génomique de *Botrytis cinerea*. Un témoin sans ADN (NTC) et un témoin contenant 20 ng d'ADN d'*Arabidopsis* sont également présentés. B. Courbe étalon déduite des courbes d'amplification présentées en A. L'unité en abscisse est proportionnelle à la quantité d'ADN génomique déposée.

Pour chaque couple d'amorces, la gamme dynamique de la quantification a été évaluée par le tracé d'une courbe étalon sur des dilutions sériées d'ADN génomique de l'espèce correspondante (Fig. 1). Pour *Alternaria* et *Botrytis*, la quantification est linéaire dans la plage 6,25 pg à 16,7 ng d'ADN. Pour *Arabidopsis*, dont l'ADN est toujours très abondant dans les

échantillons, la linéarité a été vérifiée sur une plage plus restreinte (de 1,4 à 100 ng). Pour chaque couple d'amorces, l'absence d'amplification aspécifique sur l'ADN de l'autre partenaire de l'interaction a été vérifiée. La réalisation de triplicats sur des échantillons biologiquement équivalents permet de montrer que la variabilité des résultats est faible.

2.3. Suivi du développement des champignons sur des feuilles d'*Arabidopsis* infectées

L'abondance relative des gènes ASK et cutA a été suivie chez *Arabidopsis* après inoculation par *Alternaria* et *Botrytis*. Concernant *Alternaria*, aucune variation significative du rapport cutA/iASK n'a pu être détectée sur une cinétique s'étendant sur une semaine, ce qui correspond au fait qu'*Arabidopsis* est résistante à ce champignon. En revanche, la germination et le développement de *Botrytis* sont très rapides (Figure 2), et sont associées à la formation de lésions qui s'étendent à la surface de feuille. A la fin de la cinétique (48 à 72 h a.i.), l'ADN de *Botrytis* devient même prédominant dans l'échantillon.

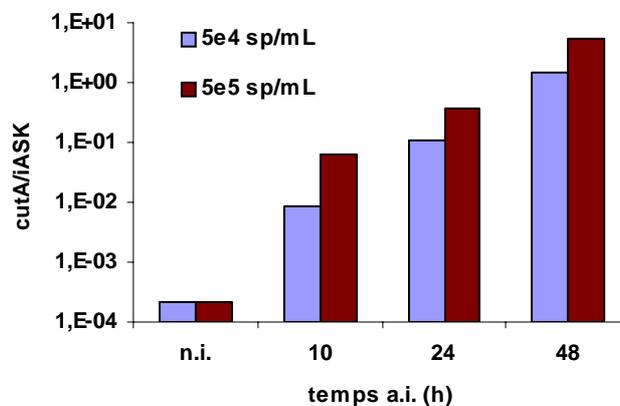


Figure 2 : Evolution du rapport cutA/iASK dans des feuilles d'*Arabidopsis* infectées par *Botrytis cinerea*. Deux inoculums ont été utilisés (5.10^4 et 5.10^5 spores/mL). n.i. : échantillon non inoculé. a.i.: après inoculation

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce test a été mis au point afin de d'évaluer la résistance de mutants d'*Arabidopsis* aux deux champignons *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Sa robustesse en fait un bon outil pour discriminer des niveaux de résistance relativement proches, alors que les test basés sur la mesure de lésions sont surtout probants pour mettre en évidence des phénotypes drastiques. Sa rapidité et sa simplicité permettent de l'utiliser à moyenne échelle pour cribler en parallèle plusieurs lignées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- K. Edwards, C. Johnstone, et C. Thompson. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl. Ac. Res. (1991) **19**:1349.
- C. Gachon et P. Saindrenan. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. Biochem. (2004) 42:367.