

CHAPITRE V

RESISTANCE DES PLANTES AUX VIRUS

EVALUATION DE LA RESISTANCE DE LA POMME DE TERRE AUX VIRUS

*Jean Paul Dantec¹, Michel Bozec¹, Marie Ange Dantec¹, François Monot¹,
Roland Pellé¹, Jacques Soyer², Daniel Ellissèche¹*

Les maladies à virus peuvent causer des dommages importants aux cultures de pomme de terre. En particulier les pertes de rendement dues aux symptômes graves des virus Y (PVY), A (PVA) et de l'enroulement (PLRV) peuvent atteindre 50% et même davantage chez les variétés sensibles (Reestman, 1970). Le seul moyen de combattre leur extension est de produire et d'utiliser des plants sains. Le règlement technique de production, contrôle et certification impose des normes très strictes d'état sanitaire (pourcentages de contamination très faibles à nuls).

Il existe chez la pomme de terre plusieurs formes de résistance vis-à-vis des différents virus susceptibles de la contaminer: la résistance à l'infection, l'hypersensibilité et la résistance extrême (Pérennec, 1982) :

- La résistance à l'infection caractérise les différences variétales de comportement à l'égard d'une contamination naturelle par un virus. Elle se traduit, selon les variétés par un pourcentage de contamination plus ou moins élevé après une ou plusieurs années de culture dans un milieu favorable à cette contamination : quelques unités pour cent pour les variétés résistantes à 100% pour les variétés très sensibles. C'est la seule forme de résistance connue vis-à-vis de PLRV et elle existe également vis-à-vis de PVY.

- Dans le cas de l'hypersensibilité, le virus peut pénétrer dans la plante et s'y multiplier mais très rapidement les cellules-hôtes se nécrosent et la multiplication du virus s'arrête. En conditions de contamination naturelle, les variétés hypersensibles ne sont pas contaminées par le virus : l'hypersensibilité leur confère une « immunité pratique » au champ. Sur les feuilles contaminées mécaniquement, il se forme des tâches nécrotiques. Le greffage d'une plante sensible porteuse du virus sur une plante hypersensible entraîne chez cette dernière la nécrose du sommet végétatif, et dans certains cas une nécrose généralisée pouvant aller jusqu'à la mort prématurée de la plante. L'hypersensibilité a été mise en évidence vis-à-vis du virus A (PVA), d'une souche du virus Y (PVY) et de certains pathotypes du virus X (PVX).

- La résistance extrême ou « immunité » se distingue de l'hypersensibilité par l'absence de toute réaction tissulaire quand le virus est inoculé aux plantes par voie mécanique ou par greffage. Cette forme de résistance est connue vis-à-vis de PVA, PVX, et PVY.

Les méthodes de test dépendent de la forme de résistance qui est évaluée.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Evaluation de la résistance à l'infection

1.1.a. Matériel végétal. Le matériel végétal nécessaire comprend 1) les géotypes et/ou les variétés à tester, 2) des variétés témoins représentatives de différents niveaux de résistance.

Les tubercules de tous ces géotypes auront été conservés et préparés de la même façon avant plantation (exemple : conservation hivernale à +2, +4°C suivie d'une pré germination d'environ quatre semaines) afin de ne pas introduire un biais expérimental qui serait dû à une hétérogénéité de levée des plantes d'un géotype à l'autre.

¹ INRA, UMR INRA-Agrocampus Rennes APBV, Keraiber, F-29260 Ploudaniel, France

² GEVES, La Minière, F – 78285 Guyancourt Cedex, France

1.1.b. Conduite de l'essai. L'essai concerne l'évaluation de la résistance à l'infection vis-à-vis de PLRV ou de PVY (souche Y⁰). L'essai est conduit comme une culture normale de pomme de terre, à l'exception des traitements aphicides (PLRV) ou aux huiles minérales (PVY) qui limiteraient la pression de contamination.

1.1.c. Dispositif expérimental. Le principe du dispositif expérimental est de mailler le terrain à l'aide d'une variété sensible et dont les plants ont été tous contaminés par une souche de virus identifiée et serviront de source de contamination primaire. Des témoins de comportement connu, représentatifs de différents niveaux de résistance sont répartis dans ce dispositif. Chaque variété témoin ou génotype à tester occupe un rang de 30 plantes qui est au contact d'un rang de la variété contaminatrice (figure 1).

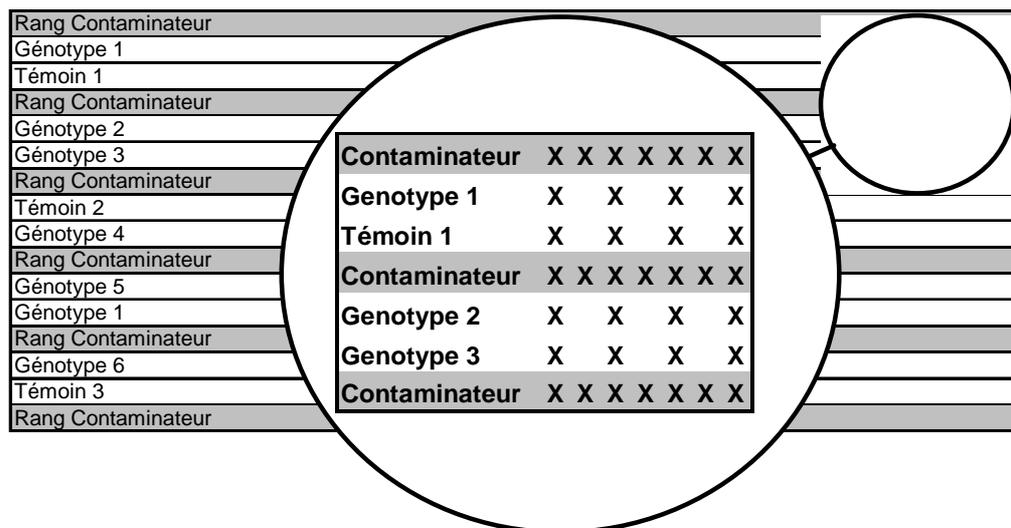


Figure 1 : Evaluation de la résistance aux virus de la Pomme de Terre. Exemple de disposition sur le terrain expérimental

Les plantes contaminatrices sont plantées à densité normale sur le rang (0.32 m) tandis que les génotypes à évaluer et les témoins sont distants d'un espace double (0.64 m) afin de faciliter les opérations de récolte en touffes individualisées.

1.1.d. Notation de la maladie sur les génotypes. Les conditions environnementales ne permettent pas forcément pas de voir apparaître les symptômes résultant des contaminations de l'année même, sauf en milieu continental et/ou si les températures de la fin du printemps et de l'été sont très élevées.

Les notations sont donc réalisées sur des plantes issues de tubercules récoltés dans l'essai, et cultivées en serre pendant l'hiver suivant.

A cet effet 3 tubercules-fils de chacune des plantes des témoins et des génotypes à tester sont récoltés. Ils sont choisis dans les plus gros calibres : ces gros tubercules ont des chances de provenir de différentes tiges principales de la plante et d'être représentatifs de la contamination, qui peut ne pas atteindre toutes les tiges principales de cette plante. Après une pré germination d'environ 5 à 6 semaines, un œil de chaque tubercule est prélevé à l'aide d'une cuillère à œilletons désinfectée dans du Teepol ou de l'eau de Javel. Les œilletons sont plantés dans des plaques à alvéoles (28 alvéoles d'environ 7 cm d'arête) et dans un mélange de tourbe blonde (50%), de sable grossier (35%) et d'écorce de pin (15%). Dans la serre, la température est maintenue à 16°C – 17°C et la photopériode ajustée à 16 heures à l'aide de tubes fluorescents « lumière blanche » (référence : Mazda TFP 36 watts JR/865 NG). Les plantes sont alimentées par fertirrigation (engrais composé enrichi en magnésium). Les plantes sont monotiges, ce qui facilite la lecture des symptômes. Dans ces conditions la lecture

visuelle des symptômes est possible au bout de 4 semaines sur les plantes exprimant bien la contamination. Vérification est faite à l'aide de tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ; Maat et Huttinga, 1987) sur la sève d'une jeune feuille (prélevée près de l'apex) par plante.

1.2. Identification de la résistance par hypersensibilité

1.2.a. Matériel végétal. Il comprend les géotypes à tester, un témoin sensible et un témoin qui ne sera pas inoculé (témoin sain). Ce test peut s'appliquer à des plantes issues de tubercules ou de graines, et à des plantules issues de culture in vitro.

1.2.b. Conduite de l'essai. Les plantes sont conduites en serre comme indiqué (cf 1.1.d) ci-dessus, si ce n'est que le test peut être conduit en période habituelle de culture (printemps-été). Au stade 4-5 feuilles, la contamination est réalisée par frottement avec une solution composée notamment de sève de plantes contaminées, de poudre de carborundum servant d'abrasif et de charbon de bois comme antioxydant.

1.2.c. Notation de la maladie sur les géotypes. La lecture visuelle des symptômes (nécroses foliaires) est réalisée 4 semaines après inoculation. Elle est suivie d'un test ELISA pour confirmation, certains symptômes pouvant être faiblement exprimés ou douteux et aussi pour pouvoir utiliser si besoin les données de densités optiques (DO) mesurées au spectrophotomètre.

1.3. Identification de la résistance extrême

1.3.a. Matériel végétal. Il comprend les variétés ou géotypes à tester, un témoin sensible, un témoin sain et les plantes infectées servant de plantes mères des greffons utilisées pour réaliser le test.

1.3.b. Conduite de l'essai. Le principe du test consiste à identifier sur les plantes à tester l'effet de greffons virosés. Les plantes à tester sont cultivées en serre, à époque normale de culture, dans des godets individuels cubiques de 11 cm d'arête. La préparation des tubercules, le prélèvement des œilletons et la conduite des plantes sont réalisés comme déjà indiqué. Les plantes mères de greffons sont produites en alvéoles et plantées environ 10 jours après les plantes à tester afin que les deux partenaires de la greffe soient chacun au stade physiologique optimal. La greffe est une greffe latérale et le greffon est inséré au niveau de la 3^{ème} feuille en partant de la base. Le greffon est ligaturé à la plante à l'aide de ruban Parafilm® M-PM 996. Deux semaines après le greffage, les plantes à tester sont écimées afin de permettre l'émission de rameaux axillaires, parties jeunes de la plante sur lesquelles les symptômes éventuels s'exprimeront nettement. La vérification de la bonne implantation du greffon est indispensable à la réussite du test.

1.3.c. Notation de la maladie sur les géotypes. La lecture visuelle des symptômes est effectuée régulièrement, en même temps que la vérification de la bonne implantation du greffon, à partir de 2 semaines après le greffage. On observe alors soit une absence de symptômes, soit des symptômes viraux plus ou moins accentués allant éventuellement jusqu'à la mort de la plante. Ces observations visuelles sont vérifiées par des tests ELISA.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les tests présentés ici s'appliquent à deux types de matériel végétal : ou bien c'est un matériel dont on ne sait rien et dont on veut connaître le niveau et la forme de résistance, ou bien c'est un matériel faisant partie d'un programme d'amélioration de la résistance au virus dans lequel on veut trier les individus résistants.

Dans le premier cas, il y a lieu d'appliquer d'abord le test au champ de résistance à l'infection et c'est seulement aux génotypes présentant un pourcentage de contamination nul que l'on fera subir ensuite les tests d'identification de l'hypersensibilité et de la résistance extrême, sachant que chacune de ces deux formes de résistance confère aux génotypes qui la possèdent une immunité pratique au champ. D'ailleurs, le test d'identification de la résistance extrême permet par défaut d'identifier l'hypersensibilité.

Dans le second cas, le test est à choisir en fonction de la forme de résistance que l'on essaie d'exploiter (à titre d'exemples, dans la pratique c'est plutôt la résistance à l'infection vis-à-vis de PLRV et la résistance extrême vis-à-vis de PVA et de PVY).

Les résultats des tests d'identification de l'hypersensibilité ou de la résistance extrême étant une réponse par oui ou par non : résistant ou sensible, nous préférons présenter ici un exemple d'évaluation de la résistance à l'infection, en l'occurrence par une souche Y^O de PVY.

Variétés	Années			
	2000	2001	2002	2003
Clivia	0	0	0	0
Pentland Crown	4	0	0	0
Prevalent	2	12	*	19
Ackersegen	12	13	33	32
Bintje	34	43	27	43
Sirtema	33	36	54	33

* Variété non évaluée en 2002

Tableau 1 : Pourcentages de Contamination par PVY^O

Ces résultats montrent bien des différences de résistance à l'infection entre les variétés, certaines comme Bintje, reconnue comme sensible, présentant des pourcentages de contamination élevés alors que d'autres, comme Pentland Crown et Clivia présentant des pourcentages de contaminations très faibles à nuls (néanmoins, il n'est pas confirmé que ces variétés possèdent la résistance extrême). On voit également un effet de l'année qui tient aux différences de pression de contamination et de réceptivité des plantes et qui plaide en faveur d'une re-conduite du test plusieurs années de suite.

3. CONCLUSION

Si les tests réalisés en serre ne posent pas de problèmes particuliers en dehors de la maîtrise d'une certaine technicité, en revanche l'efficacité des tests d'évaluation de la résistance à l'infection dépendent beaucoup du milieu. En situation de contaminations très faibles ou très fortes, les différences de niveau de résistance entre variétés n'apparaîtront pas.

BIBLIOGRAPHIE

- Maat D.Z., Huttinga H., 1987. Serology. *In* : Viruses of potatoes and seed-potato production, J.A. de Box and J.P.H. van der Want Eds, Pudoc, Wageningen.
- Pérennec P., 1982. Amélioration de la résistance aux virus chez la pomme de terre. *Cryptog., Mycol.*, 3, 377-384.
- Reestman A.J., 1970. Importance of the degree of virus infection for the production of ware potatoes. *Potato Res.*, 13, 248-268.

OUTIL DE SELECTION EVALUANT LA SENSIBILITE VARIETALE A LA MALADIE DES NECROSES ANNULAIRES DES TUBERCULES CAUSEE PAR LE VIRUS Y DE LA POMME DE TERRE

Karine Charlet-Ramage¹, Camille Kerlan²

Le variant Y^{NTN} du virus Y de la pomme de terre (PVY) (Le Romancer *et al*, 1994) transmissible par pucerons, provoque la maladie des nécroses annulaires superficielles des tubercules de pomme de terre (PTNRD) (Beczner *et al*, 1984). La maladie est économiquement préjudiciable à la culture de pomme de terre de semence et de consommation à l'échelle mondiale. La lutte génétique se révèle être la plus efficace, elle repose sur une sélection variétale en amont de la filière.

Afin de sélectionner du matériel résistant ou tolérant, les créateurs de variétés nouvelles peuvent aujourd'hui utiliser un outil validé. Il permet d'évaluer en conditions naturelles, le comportement de géotypes en cours de sélection et révèle ainsi un critère supplémentaire indispensable, pour mener à bien une réflexion sur le choix des géotypes avant toute inscription au catalogue officiel français.

1. MATERIEL

1.1. Matériel végétal

Sept variétés de pomme de terre sont utilisées en tant que témoins positifs et négatifs de la PTNRD. Les géotypes testés appartiennent aux sélectionneurs français de variétés nouvelles ; leur nombre est en augmentation chaque année (49 en 1996, 120 en 2004).

1.2. Inoculum

L'inoculum est un isolat viral référencé PVY^{NTN} Frorl, il dérive d'un isolement réalisé en 1983 dans une culture de pomme de terre du centre de la France. Il a été bien caractérisé et il est conservé à l'unité BiO 3P du centre INRA de Rennes.

Il est apporté sur le dispositif sous forme de tubercules infecteurs. Ces tubercules sont produits en conditions contrôlées l'année précédant l'expérimentation :

Des tubercules sains d'une variété fortement sensible à la PTNRD sont plantés en pot dans un terreau stérile, sous serre. Au stade végétatif de 4 feuilles, la plante est inoculée mécaniquement par frottis avec l'isolat viral conservé sur un plant de *Nicotiana tabacum*. Le virus est ainsi transmis aux tubercules naissants, qui une fois récoltés serviront d'infecteurs.

2. METHODES

2.1. Chronologie : L'expérimentation est présentée sous forme de schéma chronologique en page suivante (figure 1).

2.2. Conditions expérimentales

L'expérimentation est réalisée en plein champ dans la région sud-ouest de la France. Le choix géographique est dû à la présence d'un potentiel d'espèces aphidiennes vectrices du PVY.

¹ INRA, UMR BiO3P, 35650 Le Rheu

² G NIS, 44 rue du Louvre, 75001 Paris

Il est également dû aux conditions environnementales favorables au développement de la maladie, notamment la température.

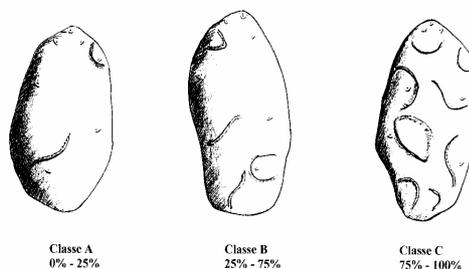
Le dispositif de l'essai alterne les rangs de génotypes à tester et les rangs dits « infecteurs ». Les variétés témoins sont répétées une fois, à raison de 10 tubercules par variété. Les génotypes sont évalués avec 10 tubercules sans répétition et ils sont disposés de manière aléatoire au sein de la surface de l'essai

2.3. Notations en végétation et sur tubercules

2.3.a. Lors des notations en cours de culture, la levée des plantes ainsi que l'état sanitaire général sont appréciés. Chaque génotype est observé sur l'ensemble des 10 pieds. Les plantes exprimant des viroses sont comptabilisées, avec une description des symptômes. Ils peuvent être de plusieurs natures :

- mosaïque
- gaufrage et frisolée
- nécroses nervaires, lésions nécrotiques (halos, feuilles de chêne...)
- bigarrure (nanisme, mosaïque, rigidité, nécroses, gaufrage...)

2.3.b. Les notations sur tubercules sont effectuées à la récolte et deux mois après une période de conservation à température ambiante et en semi obscurité. Les tubercules sont notés individuellement. La sévérité de la PTNRD est appréciée en répertoriant les tubercules atteints en trois classes A, B et C selon le pourcentage de la surface nécrosée.



Ces notations sont exploitées par un calcul de pourcentage de tubercules nécrosés et par un calcul d'Indice de Maladie (IM). Cet indice, allant de 0 à 1 est plus représentatif de la sévérité de la maladie, dans le sens où il prend en compte le nombre de tubercules nécrosés et le pourcentage de surface nécrosée ; il est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\frac{(\text{nombre de tubercules nécrosés} \times \text{coefficient A}) + (\text{nb tub} \times \text{coeff. B}) + (\text{nb tub} \times \text{coeff. C})}{\text{Nombre total de tubercules}} \times \frac{1}{0,875}$$

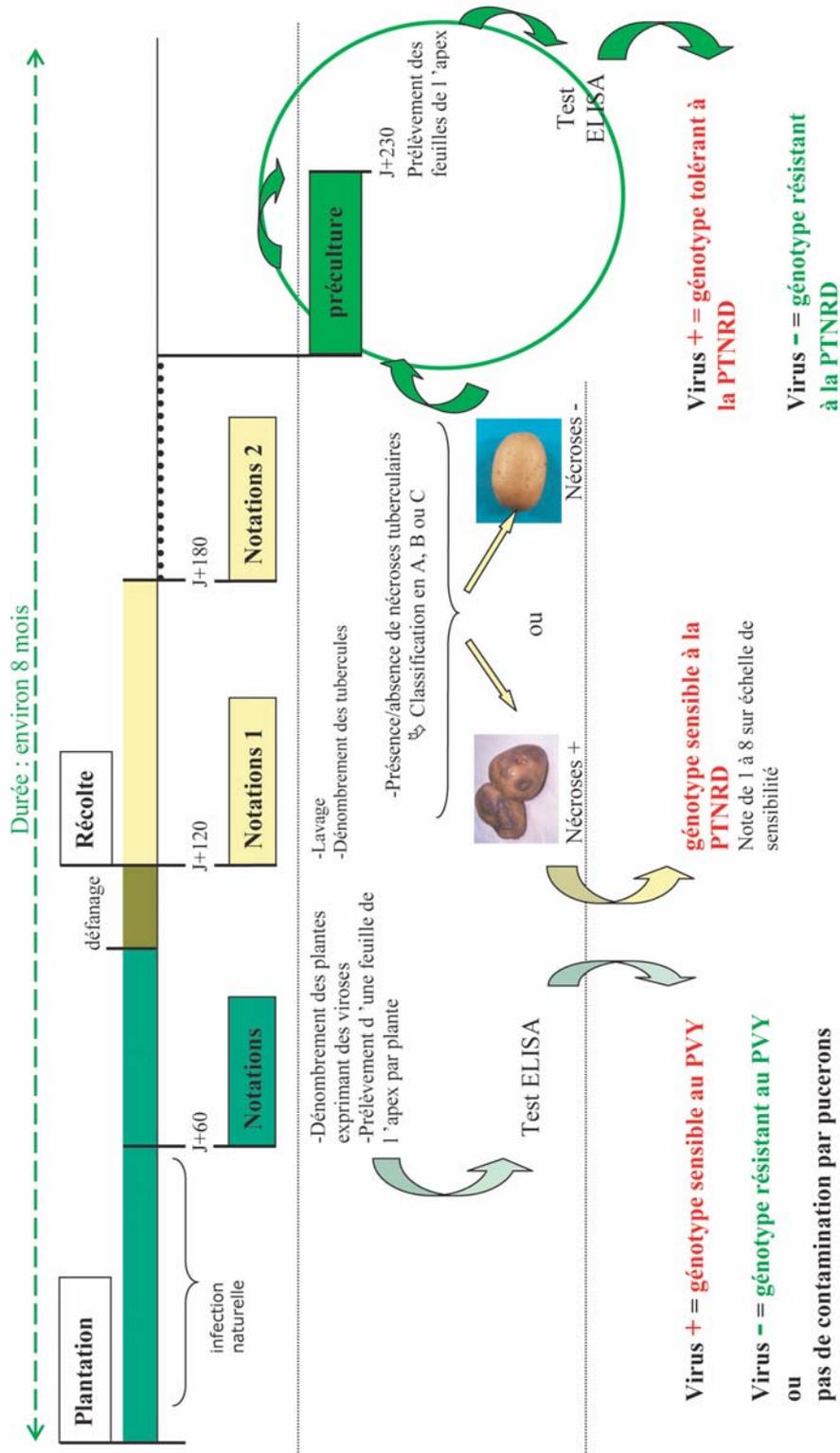
Les coefficients sont pour la classe A de 0,125, pour B de 0,50 et pour C de 0,875.

note	indice de maladie
1	0.875 - 1
2	0.750 - 0.875
3	0.625 - 0.750
4	0.500 - 0.625
5	0.375 - 0.500
6	0.250 - 0.375
7	0.125 - 0.250
8	0 - 0.125
9	0

Avec cet IM, les génotypes sont classés sur une **échelle de sensibilité à la PTNRD** allant de 9 (non sensible) à 1 (très sensible).

2.4 Préculture

Tous les génotypes n'exprimant pas le phénotype de nécroses sur tubercules (note 9) subissent une préculture. Elle est réalisée après la deuxième notation sur tubercules sur un échantillon de 25% des tubercules-fils pour chaque génotype.



Chronologie de l'expérimentation

La préculture est une opération qui consiste à mettre en culture des œilletons prélevés sur tubercules (un œilleton est égal à un œil, soit un germe). Le prélèvement s'effectue à l'aide d'une gouge. Un traitement de levée de dormance des œilletons est effectué par de l'acide gibbérellique avant leur plantation dans un terreau stérile et sous serre hermétique aux pucerons. Ce traitement provoque la levée du repos végétatif et entraîne la germination ainsi qu'une forte multiplication virale et une distribution plus homogène du virus dans les différents tissus. La fiabilité des tests de détection du virus est ainsi portée à un niveau optimal.

2.5. Contrôles sérologiques en cours de culture et en préculture

Afin d'évaluer le comportement des géotypes, il est indispensable de rechercher la présence du virus sur les plantes en cours de culture et sur les tubercules notés indemnes de nécroses (note 9).

Le test sérologique utilisé est le DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Il permet de détecter le virus Y^N auquel appartient le variant Y^{NTN}.

- **En végétation**, le test est réalisé sur les feuilles prélevées lors de la notation.
- **En préculture**, chaque apex des plantules issues des œilletons est prélevé, puis testé en sérologie.

Ces contrôles sérologiques permettent de déterminer pour chaque géotype, sa **résistance** (géotype ayant la capacité d'empêcher la pénétration du virus) ou sa **tolérance** (géotype pouvant acquérir le virus, permettre sa multiplication et sa capacité à envahir toute la plante, mais n'exprimant aucune nécrose tuberculaire).

2.6. Validation de l'outil

Les variétés témoins de la PTNRD annuellement évaluées depuis 1996, ont donné des résultats validant la fiabilité de l'outil en matière d'homogénéité d'infection par transmission aphidienne, de reproductibilité des résultats et de conservation dans le temps du comportement face au virus (sensibilité et tolérance).

3. RESULTATS ET INTERPRETATION

3.1. Comportement des variétés témoins

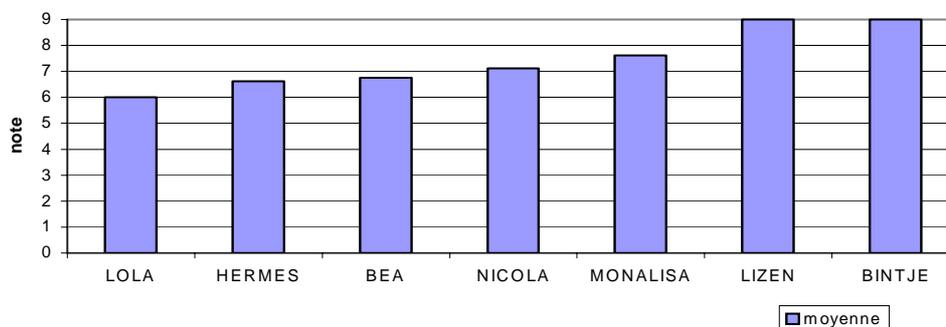
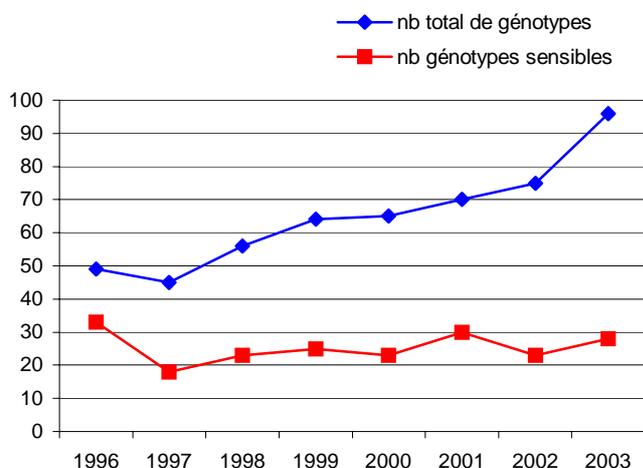


Figure 2 : Evaluation moyenne du comportement des sept variétés témoins de 1996 à 2003 (la note est déterminée en fonction de l'indice de maladie, cf 2.3.b).

3.2. Bilan sur huit années d'expérimentation

653 génotypes et variétés ont pu être testés et leur comportement à la PTNRD a été défini.



- La différence entre les deux courbes montre bien la **diminution du nombre de génotypes français sensibles**, l'outil commence donc à porter ses fruits sachant que dix années sont nécessaires pour créer une variété de pomme de terre et pour pouvoir la commercialiser.

Figure 3 : Evolution de la sensibilité du matériel français (en ordonnée le nombre de génotypes testés annuellement)

3.3. Devenir des génotypes après évaluation

Une enquête réalisée en 2001 avait pour objectif de mettre en évidence les premiers résultats concrets de **l'intérêt d'un tel outil** (Figure 4). Nous avons répertorié le nombre de génotypes conservés dans le schéma de sélection, le nombre de génotypes éliminés ainsi que les raisons de leur élimination, soit uniquement pour la sensibilité à la PTNRD, soit pour d'autres critères.

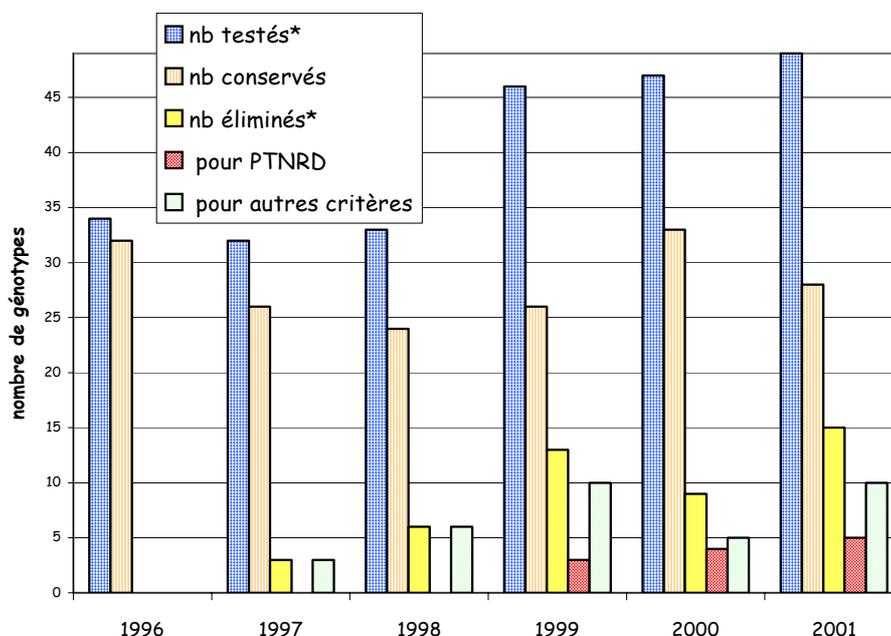


Figure 5 : Devenir des génotypes après évaluation (enquête réalisée après six années d'expérimentation)

*NB : l'histogramme est établi à partir de données partielles communiquées par les sélectionneurs.

Depuis 1996, la quantité de matériel testé augmente, ceci étant révélateur d'une **demande importante** de la part des sélectionneurs.

- L'augmentation du nombre d'hybrides éliminés - de surcroît du nombre d'hybrides éliminés uniquement sur un critère de sensibilité à la PTNRD - montre bien que la maladie des nécroses tuberculaires est de plus en plus prise en compte dans le schéma de sélection variétale. Ce nombre d'hybrides éliminés demeure cependant faible.

4. CONCLUSION

L'essai de sensibilité variétale à la PTNRD est utilisé annuellement par les sélectionneurs français depuis 1996 ; il est satisfaisant et correspond à leurs attentes. Les conditions de l'essai répondent également de façon assez optimale à l'objectif fixé. Outre sa première mission, celle de définir un comportement variétal, cet outil a permis également d'améliorer les connaissances en matière de symptomatologie sur feuillage et sur tubercules. Il a également engendré une réflexion plus profonde des sélectionneurs en rendant ce critère dévalorisant pour le génotype, voire éliminatoire dans le cas d'une sensibilité très prononcée. De plus, le fait que le caractère de tolérance puisse avoir des conséquences non négligeables sur la dissémination du virus, est un élément dont les sélectionneurs sont de plus en plus conscients aujourd'hui. **L'impact de cet essai est tel sur le schéma de sélection variétale qu'il est devenu un outil de sélection indispensable.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beczner L, Horvath J, Romhanyi I, Förster H (1984) Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res* 27 : 339-352
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay. *J Gen Virol* 34 : 475-483
- Le Romancer M, Kerlan C, Nedellec M (1994) Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol* 43 : 138-144

UNE METHODE SIMPLE ET EFFICACE POUR TESTER LA RESISTANCE AU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA LAITUE SUR DES PLANTES DE LAITUE CULTIVEES *IN VITRO*

K. Bollore¹, V. Sarnette¹, S. German-Retana², F. Flamain¹, V. Dubois¹, E. Botton¹, H. Lot³, S. Souche³,
O. Le Gall², T. Candresse², Y. Chupeau⁴, M.-C. Chupeau⁴, B. Maisonneuve¹, M. Mazier^{1,*}

Le virus de la mosaïque de la laitue (LMV) est un potyvirus potentiellement très grave pour la production de laitues. Les programmes d'étude des interactions potyvirus/plantes ont de plus en plus recours à la manipulation de matériel génétiquement modifié (virus ou plantes) ou de quarantaine. Le facteur limitant reste le nombre d'individus à cribler pour leur comportement vis-à-vis du virus dans les conditions de confinement appropriées. C'est pourquoi nous avons développé une méthode de criblage sur plantules cultivées *in vitro*.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

Différents génotypes de laitue, choisis pour posséder ou non les gènes de résistance au LMV connus, ont été utilisés. Les plantules cultivées *in vitro* sont issues soit de semis en conditions stériles soit de régénération à partir de fragments de feuilles.

Les graines sont stérilisées par trempage 30 minutes (mn) dans une solution javellisée (un disque de désinfectant industriel Inovchlore dans 800mL d'eau contenant 500µL de Teepol) et séchage sous hotte à flux laminaire. Les semis *in vitro* sont réalisés en boîtes de Pétri sur un milieu de base solide (milieu B, Chupeau et *al.*, 1989). Après 24 h à 4°C et à l'obscurité, les semis sont placés en chambre de croissance (24°C, 16h de photopériode, 60µEm⁻²s⁻¹). Après 15 à 20 jours, les plantules possédant au moins 2 feuilles étalées et un système racinaire pas encore trop développé sont directement utilisables pour les expériences d'inoculation.

Les plantules issues de régénération *in vitro* sont obtenues à partir de fragments de feuilles prélevées sur des semis en conditions stériles. Les feuilles sont sectionnées en petites parties (2 à 10 mm²) et placées dans un milieu de régénération (milieu B solide supplémenté avec 2ml/L d'oligoéléments de culture de protoplastes de peuplier (Chupeau et *al.*, 1993) et avec les régulateurs de croissance appropriés (0,15mg/L BA, 0,3mg/L IAA et 100mg/L d'adénosine)). Les explants sont maintenus 10 jours dans le noir puis placés dans les conditions de culture décrites précédemment pour les semis *in vitro*. Les bourgeons nouvellement formés (1 à 1,5 mois plus tard) sont isolés des explants et transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu d'enracinement (milieu solide B contenant 30g/L de saccharose). Les bourgeons suffisamment développés (plantes avec 2-3 feuilles, début de développement racinaire) sont utilisables pour l'inoculation *in vitro*.

¹ Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, INRA, Domaine Saint Maurice, BP94, F84143 Montfavet cedex.

² Equipe de Virologie, UMR GD2P, IBVM, INRA de Bordeaux, BP81, F33883 Villenave d'Ornon cedex.

³ Station de Pathologie Végétale, INRA, Domaine St Maurice, BP94, F84143 Montfavet cedex.

⁴ Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA, F78026 Versailles cedex.

*Correspondant: tél: 33 (04) 32 72 27 33; fax: 33 (04) 32 72 27 02 - mazier@avignon.inra.fr

1.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum de LMV stérile et infectieux est obtenu en stérilisant préalablement les feuilles de laitues, infectées 2-3 semaines auparavant avec du LMV, par trempage 30mn dans une solution javellisée (décrite pour le matériel végétal) puis rinçage soigneux avec de l'eau déionisée stérile. Un demi gramme de ce matériel est broyé dans un mortier stérile à froid, sous hotte à flux laminaire, avec 2mL (1/4, p/v) de solution tampon (Na_2HPO_4 0,03M, diéthylthiocarbamate (DIECA) 0,2%, stérilisée par filtration 0,22 μM). Ensuite, 200mg (10%, p/v) de Carborundum et de charbon actif préalablement autoclavés sont ajoutés. Différents isolats de LMV ont été utilisés pour ces expériences (LMV-0, LMV-1, LMV-9) ainsi que des virus recombinants étiquetés avec la GFP (German-Retana et al., 2000).

1.3. Inoculation et incubation

L'inoculation est réalisée sous hotte à flux laminaire sur des plantules au stade 3-4 feuilles issues de culture *in vitro* et extraites momentanément de leur milieu de culture. Un doigtier en latex, préalablement désinfecté à l'éthanol et séché, est plongé dans l'inoculum. puis passé doucement sur la surface de 2 feuilles de chaque plante. Les feuilles inoculées sont ensuite rapidement rincées avec de l'eau distillée stérile, et les plantules ainsi traitées sont placées individuellement dans des tubes de culture en Pyrex (28mm de diamètre, bouchon métallique) contenant du milieu B solide avec 30g/L de saccharose. Le matériel végétal ainsi inoculé est incubé dans une chambre de culture (16/12°C jour/nuit, 16h jour, 80 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

1.4. Méthode ELISA et détection de fluorescence

Les concentrations virales relatives sont estimées par méthode semi quantitative DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) en utilisant un antiserum polyclonal de lapin anti-LMV. Un gramme de tissu (feuille et tige) est broyé dans un broyeur à rouleau dans 4mL de tampon PBS-Tween-PVP (136,9mM NaCl, 1,47mM KH_2PO_4 , 2,68mM KCl, 8,1mM Na_2HPO_4 , 0,05% (v/v) Tween 20, 2% (p/v) PVP_{25K}). Le broyat ainsi obtenu est alors dilué 1:50 dans le même tampon avant d'être traité par le test DAS-ELISA (Clark et Adams, 1977).

L'expression de la GFP au niveau de la plante entière peut être visualisée directement à l'oeil sur les feuilles systémiques dans une chambre noire en utilisant une lampe UV (100 Watts). Au niveau tissulaire, l'expression de la GFP est examinée avec un stéréomicroscope à fluorescence équipé d'un filtre avec une fenêtre d'excitation à 470 ± 20 nm et une barrière de filtre à 525 ± 25 nm.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Des essais préliminaires avaient été effectués sur des variétés de laitue sensibles afin de définir les conditions environnementales optimales. Ainsi, une température relativement basse (16/12°C jour/nuit) associée à une longueur de jour de 16h (80 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ étant l'intensité lumineuse maximale de notre enceinte de culture) assure le maintien *in vitro* des plantules de laitue jusqu'à 2-3 mois, tout en permettant le développement du virus à des niveaux suffisants pour sa détection par DAS-ELISA.

Isolats de virus	Génotypes	Résistance ^a	DAS-ELISA ^b		
			-	+	+++
LMV-0	Mariska	S	9/45 [20%]	1/45 [2%]	35/45 [78%]
	Malika (<i>mo1¹</i>)	R	22/22 [100%]	0/22 [0%]	0/22 [0%]
LMV-1	Mariska	S	1/7 [14%]	0/7 [0%]	6/7 [86%]
	Salinas	S	0/12 [0%]	0/12 [0%]	12/12 [100%]
	Salinas 88 (<i>mo1²</i>)	R	12/12 [100%]	0/12 [0%]	0/12 [0%]
LMV-9	Mariska	S	3/20 [15%]	1/20 [5%]	16/20 [80%]
	Malika (<i>mo1¹</i>)	S	0/7 [0%]	0/7 [0%]	7/7 [100%]
	Salinas	S	3/27 [11%]	1/27 [4%]	23/27 [85%]
	Salinas 88 (<i>mo1²</i>)	R	27/28 [96%]	1/28 [4%]	0/28 [0%]

^a : Comportement connu vis-à-vis de l'isolat de LMV considéré : R = résistant, S = sensible.

^b : Résultats totaux de 2 expériences (LMV-0 et LMV-1) ou 3 expériences (LMV-9) obtenus 2,5 mois après inoculation : nombre de plantes dans chaque catégorie de valeur de densité optique (DO) sur le nombre testé. Les pourcentages sont présentés entre parenthèses.

- = DO égale à celle obtenue sur les contrôles inoculés à blanc (moins de 0.07) ; + = 0.16 < DO < 0.6 ; +++ = 0.6 < DO (DO moyenne = 2).

Tableau 1 : Comportement de différents cultivars (régénération in vitro) vis-à-vis de 3 isolats de LMV

Les symptômes observés sont variables et dépendent du génotype et des isolats de LMV utilisés (déformations foliaires, mosaïques, nécroses et parfois mort de la plante). Au cours de ces expériences, nous avons constaté qu'il était bénéfique, pour le développement du virus (rapidité de l'infection et homogénéité) de conserver les racines des plantules (intactes ou réduites à 0,5cm de longueur si le système racinaire est très développé).

Afin d'évaluer les potentialités de la technique pour un criblage précoce de matériel pour sa résistance/sensibilité au LMV, différents isolats de LMV, capables de contourner ou non les allèles de résistance au LMV (*mo1¹* et *mo1²*) ont été inoculés à des génotypes connus. De façon générale, les résultats (Tableau 1) montrent que le comportement des cultivars testés à l'égard des différents isolats de LMV permet une bonne discrimination de leur état de résistance, comparable aux résultats obtenus par des tests conventionnels en terreau.

La fluorescence liée à la GFP (exprimée par les isolats de LMV recombinants) peut être détectée dès le troisième jour après inoculation (jpi) au stéréomicroscope sur les feuilles inoculées et à partir du dixième jpi sur les feuilles systémiques. En 2 à 3 semaines après inoculation, il est possible de différencier aisément les plantes résistantes des plantes sensibles par simple observation sous lumière ultra-violette.

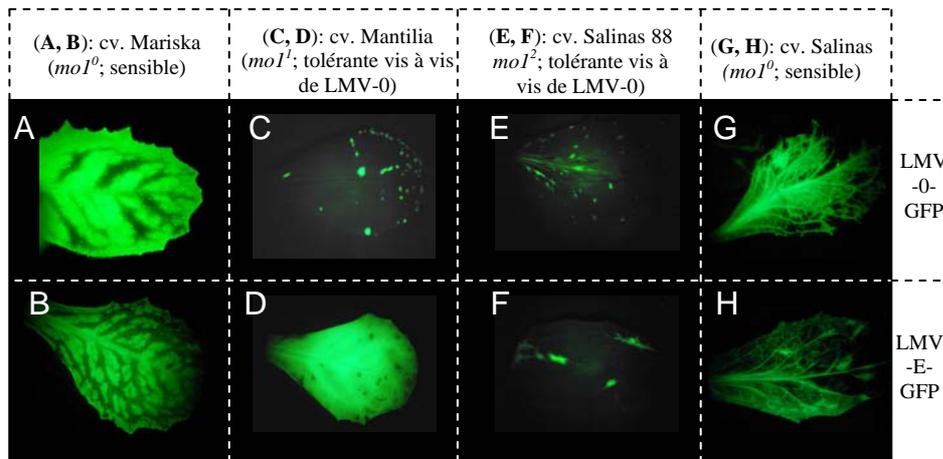


Figure 1 : Vues au stéréomicroscope de la fluorescence détectée sur des feuilles de différents cultivars de laitues, 40 jours après inoculation

De façon intéressante, il est possible de différencier les deux allèles de résistance *moI¹* et *moI²* par l'utilisation des deux clones LMV-0 et LMV-E étiquetés par la GFP (Figure 1).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces résultats montrent qu'il est possible et relativement facile d'inoculer des plantes de laitue *in vitro*, en conditions stériles, avec du LMV. Cette méthode permet une bonne discrimination des génotypes de laitue résistants ou sensibles au LMV, et offre donc la possibilité d'économiser beaucoup d'espace dans les serres confinées ou dans des enceintes climatisées. Cette technique peut être nettement améliorée par l'utilisation de clones de virus étiquetés avec la GFP, permettant de gagner beaucoup de temps, non seulement au niveau de la durée du test mais aussi au niveau de l'interprétation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chupeau MC, Bellini C, Guerche P, Maisonneuve B, Vastra G, Chupeau Y (1989) Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplast. *Bio/technology* 7 : 503-508
- Chupeau MC, Lemoine M, Chupeau Y (1993) Requirements of thidiazuron for healthy protoplast development to tree regeneration of a hybrid poplar (*Populus tremula* X *P. alba*). *J Plant Physiol* 141 : 601-609
- German-Retana S, Candresse T, Alias E, Delbos RP, Le Gall O (2000) Effects of green fluorescent protein or B-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol Plant Microb Inter* 13 : 316-324
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34 : 475-483

INOCULATION CONTROLÉE DU MELON PAR LE CABYV

*Nathalie Giovanazzo et Didier Besombes*¹

Le CABYV (Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus) est un polérovirus dont l'intensité des symptômes (jaunissement) varie énormément suivant la saison et les variétés. Il n'affecte pas la qualité des fruits mais il engendre une baisse conséquente du rendement (avortement des fleurs femelles). Ce virus est transmis par pucerons selon le mode persistant. L'inoculation mécanique du CABYV est impossible.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Préparation du matériel végétal

Les semis des plantes de melon à tester sont effectués en pots de 9 cm dans du terreau. Les jeunes plants sont élevés en serre jusqu'au stade première feuille étalée (environ deux semaines). On ajoute aux plantes à tester des témoins de sensibilité (Védrantais et/ou Ouzbègue-2) et de résistance (PI 124112 et/ou PI 414723).

1.2. Préparation de l'inoculum

Des plants de capselles (*Capsella bursa-pastoris*), plante hôte du CABYV, sont semés à intervalles réguliers en pots de 9cm (toutes les 3 semaines).

Un élevage de pucerons (*Myzus persicae*), porteurs du CABYV (souche Nérac originaire du sud-ouest de la France), est maintenu sur ces capselles. Toutes les 3 semaines, des pucerons virulifères sont prélevés pour les déposer sur des nouvelles plantules de capselles (un morceau de feuille avec environ 20 pucerons par plante). Ceci permet de maintenir en permanence l'élevage en phase de croissance. Cet élevage s'effectue en chambre climatisée avec 14h de jour (24°C) et 10h de nuit (18°C).

1.3. Inoculation et incubation

Deux inoculations sont effectuées à une semaine d'intervalle. La première est réalisée au stade 2 feuilles étalées. Un morceau de feuille de capselle infectée portant 10 à 30 pucerons virulifères de l'élevage (larves et adultes confondus) est déposé sur la plus jeune feuille étalée du plant. Les pucerons sont laissés sur la plante pour une période de transmission de 48h et sont ensuite tués avec un aphicide. Pendant l'incubation les plantes sont placées en chambre climatisée (18-25°C). Les plantes sont ensuite plantées sous tunnel plastique avec une densité de 1m entre les plants et de 2m entre les lignes. Des traitements aphicides sont régulièrement appliqués afin de prévenir l'apparition d'autres virus ou d'autres souches de CABYV.

1.4. Notations

Les symptômes de jaunissement n'apparaissent que tardivement et étant peu spécifique, la présence du virus dans les plantes est détectée par technique ELISA. Les tests (DAS-ELISA) sont pratiqués 7 et 9 semaines après inoculation. Les feuilles prélevées sont situées en 9^{ème} ou 10^{ème} position à partir de l'apex. Les résultats sur les plantes à tester sont considérés fiables quand le taux d'infection des témoins sensibles est proche de 100%.

¹ INRA, Station de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, BP 94, 84143 Montfavet Cedex

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

En 1993, 523 accessions provenant de la collection de ressources génétiques de *C. melo* ont été testées vis-à-vis du CABYV en conditions naturelles (ces géotypes ayant été choisis comme étant représentatifs de la biodiversité naturelle de *C. melo*).

En 1994, 11 accessions, sélectionnées comme étant les plus prometteuses en 93, ont été testées avec la méthode d'inoculation artificielle décrite ici.

Une semaine après inoculation, les plantes ont été plantées sous tunnel en deux blocs randomisés de 5 plantes par accessions. Les tests ELISA ont été effectués 7 et 9 semaines après inoculation.

Sept accessions se sont confirmées comme résistantes, deux sont en ségrégation et un sensible. Les résultats sont portés dans le tableau ci-dessous.

Accessions	Origine géographique	résistant	sensible
Faizabadi Phoont	Inde	10	
90625	Inde	10	
PI 124112	Inde	10	
PI 124440	Inde	10	
PI 164723	Inde	10	
PI 164797	Inde	10	
PI 255478	Corée	10	
PI 282448	Afrique du sud	10	
PI 123501	Inde	8	2
PI 164487	Inde	7	3
PI 183307	Inde	9	
Védrantais	France		10
Ouzbègue-2	Ouzbékistan		10

Tableau 1 : Résultats du typage des 11 accessions présumées résistantes.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces tests ont été utilisés pour la recherche de sources de résistance au CABYV ainsi que pour les études du déterminisme génétique de la résistance sur des populations de lignées recombinantes, F2 et Back-cross.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dogimont C., Slama S., Martin J., Lecoq H. and Pitrat M. (1996) Sources of resistance to cucurbit aphid-borne yellows luteovirus in a melon germ plasm collection. *Plant Disease*.80:1379-1382

Dogimont C., Bussemakers A., Martin J., Slama S., Lecoq H. and Pitrat M. (1997) Two complementary recessive genes conferring resistance to Cucurbit Aphid-Borne Yellows luteovirus in an Indian melon line (*Cucumis melo L.*). *Euphytica* 96 : 391-395.