

DATA FORUM

**ASSAINISSEMENT DE VARIETES DE *PRUNUS*
INFECTEES PAR *PRUNUS* NECROTIC
RINGSPOV VIRUS**

L. Chalak, A. Elbitar, T. Chehade, S. El Zammar¹, F. Jreijiri¹, E. Choueiri¹
Institut de Recherches Agronomiques, Département de biotechnologie, P.O. Box 287, Zahlé,
Liban

¹ Institut de Recherches Agronomiques, Département de protection des plantes, P.O. Box 287,
Zahlé, Liban
lchalak@lari.gov.lb

(Received 13 September 2006 - Accepted 31 May 2007)

RESUME

Deux variétés d'amandier et une variété de prunier infectées par le Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) ont été assainies par culture de méristèmes avec ou sans traitement thermique préalable. L'élimination du virus a été examinée par test ELISA sur les plantules régénérées in vitro et confirmée ultérieurement en serre par transmission mécanique sur des semis de concombre.

Mots clés: *Prunus*, virus PNRSV, culture *in vitro*, méristème

ABSTRACT

Two varieties of almond and one variety of plum infected by Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) were freed from virus infection by meristem culture with or without thermotherapy. Virus elimination was checked on shoots regenerated in vitro by ELISA test then confirmed later in the greenhouse conditions by mechanical transmission on cucumber seedlings.

Keywords: *Prunus*, PNRSV virus, *in vitro* culture, meristem

INTRODUCTION

Les *Prunus* constituent l'une des principales composantes de l'arboriculture fruitière libanaise. Toutefois, leur culture se heurte souvent à des problèmes phytosanitaires, plus particulièrement d'origine virale (Jawhar *et al.*, 1996; Choueiri *et al.*, 2001; 2003). Parmi les virus décelés au Liban, le *Prunus* necrotic ringspot virus (PNRSV) a été le plus répandu dans les vergers commerciaux d'amandier et de prunier avec une incidence de 76% du total des arbres infectés (Kanaan-Atallah *et al.*, 2001). L'ampleur des symptômes varie d'une espèce à l'autre, se traduisant essentiellement par des dessins chlorotiques en arabesques sur les feuilles, par un avortement des bourgeons apicaux chez l'amandier, et par des taches

nécrotiques perforantes ou des taches linéaires assez systémiques de couleur jaune vif chez le prunier (Desvignes, 1999). Ces dégâts risquent d'entraîner un dépérissement généralisé de l'arbre et d'affecter sérieusement la production (Nemeth, 1986; Karen, 1991).

L'absence de mesures de quarantaine, l'introduction et l'échange de matériel non certifié ont longtemps contribué à l'expansion des maladies virales. De plus, la multiplication des *Prunus* par les voies végétatives classiques (greffage et bouturage) est un excellent moyen pour disséminer ces virus, ce qui a jusque-là favorisé la distribution non contrôlée de matériel de plantation infecté. Ce problème a été résolu dans les grands pays producteurs par la mise en œuvre d'un programme de production de plants certifiés, faisant appel aux outils de la culture *in vitro*. En effet, l'éradication des virus a été réussie chez de nombreuses espèces par la culture *in vitro* de méristèmes associée ou non à la thermothérapie (Walkey, 1980; Faccioli, 2001; Manganaris *et al.*, 2003; Laimer *et al.*, 2006). La culture de sections nodales associée à la thermothérapie a été également utilisée, mais avec moins de succès, comme une technique alternative à la culture de méristèmes (Griffith *et al.*, 1990; Sanchez *et al.*, 1991; Chalak *et al.*, 2005). Le microgreffage d'apex a été employé pour régénérer des plants exempts de virus chez les agrumes (Navarro *et al.*, 1975; Nicoli, 1985), le pêcher (Mosella *et al.*, 1980), le cerisier (Deogratias *et al.*, 1986) et la vigne (Cupidi & Barba, 1993).

Le présent travail a consisté en l'élimination du virus PNRSV chez deux variétés d'amandier et une variété de prunier, cultivées dans la Békaa et présentant des symptômes d'infection, en expérimentant la technique de culture de méristèmes ainsi que la culture de sections nodales avec ou sans thermothérapie.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Des arbres de deux variétés d'amandier "Tuono" et "Ferki" et d'une variété de prunier "Méríbosa", plantées dans la Békaa et présentant des symptômes typiques de l'infection par PNRSV ont été choisis. Leur état sanitaire a été vérifié par test ELISA (Clark & Adams, 1977). Des rameaux de l'année ont été prélevés sur ces arbres (courant mai), fragmentés en portions de 2-3 cm et désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (11 g/l) diluée dans l'eau 1:4 (V:V) pendant 10 mn, puis rincés dans quatre bains successifs d'eau distillée stérile pendant 5, 10, 15 et 20 mn respectivement.

Traitements

Suite à la désinfection des rameaux, des sections nodales (longueur 1 cm) et des méristèmes (0,6-0,8 mm environ) ont été isolés sous la hotte à flux laminaire à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement x 20 x 40) et mis en culture dans des tubes à essais ou des boîtes de Pétri (100 x 20 mm) respectivement. Le milieu de culture utilisé a été celui de Murashige and Skoog (1962) additionné de benzyl-amino-purine (0.5 mg/l), d'acide naphthalène acétique (0,01 mg/l), de saccharose (30 g/l) et d'agar-agar (Sigma, 8 g/l). Les cultures ont été placées dans la salle de culture sous une photopériode de 16 h/j avec une intensité lumineuse de 4000 lux et à une température de 23-25°C. Quatre traitements ont été testés : (i) culture de sections nodales avec et sans thermothérapie (35 ± 2°C) pendant 30 jours; (ii) culture de méristèmes avec et sans thermothérapie (35 ± 2°C) pendant 30 jours (méristèmes prélevés sur des sections nodales ayant été soumises à une température de 35 ±

2°C pendant 30 jours). Au bout de 30 jours, les tiges régénérées à partir des différents traitements ont été repiquées sur le même milieu et dans les mêmes conditions de culture décrites précédemment pour 30 jours supplémentaires afin de favoriser leur développement.

Contrôle sanitaire

Les tiges régénérées au bout de 60 j à partir de méristèmes et de sections nodales avec ou sans thérapie, ont été testées au niveau de la partie basale (tige et feuilles), vis-à-vis du virus PNRSV (anticorps Loewe, Allemagne) par la technique DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977). Les échantillons ont été broyés dans un tampon d'extraction PBS-Tween (pH 7,4) (1:10 poids/volume). Deux puits ont été utilisés par échantillon. Les témoins positifs et négatifs ont été fournis par Loewe. La réaction a été détectée par un photomètre (Titerteck Multiskan PLUSMK II) à une longueur d'onde de 405 nm. Le test est considéré positif lorsque la valeur moyenne d'absorption est au moins deux fois plus importante que celle du témoin négatif. Les plantules préalablement testées par ELISA et dont le résultat a été négatif ont subi un second contrôle qui est la transmission mécanique. Des tiges et/ou des feuilles ont été broyées dans un tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2 contenant 2.5% de nicotine et inoculées en serre sur des semis de concombre (*Cucumis sativus*) âgés de 10 jours. Les symptômes ont été vérifiés au bout de 10 et 21 jours respectivement.

RESULTATS

Le Tableau 1 présente, pour les trois variétés, "Tuono", "Ferki" et "Méribosa", le nombre de tiges régénérées à partir des explants ainsi que le taux de tiges révélées exemptes de virus par le test ELISA. Selon les explants d'origine, certains explants ont été perdus suite à des symptômes de brunissement généralisé (2-19%), mais tous ceux qui ont survécu, ont régénéré des tiges.

D'une façon générale, et par comparaison aux tiges issues des sections nodales saines (témoin négatif), les tiges régénérées à partir des explants infectés (témoin positif) ont présenté un développement lent avec un feuillage vert jaunâtre.

La thérapie n'a pas vraiment affecté la reprise des méristèmes ou celle des sections nodales, ni la prolifération ultérieure des tiges obtenues. La totalité des tiges régénérées à partir des sections nodales non soumises à la thérapie sont restées infectées. En revanche, la thérapie appliquée aux sections nodales a conduit à l'assainissement d'environ 22 à 29% des tiges obtenues suite au traitement. La culture de méristèmes associée ou non à la thérapie, a conduit à l'assainissement de l'ensemble des tiges régénérées. En effet, PNRSV n'a pas été détecté par test ELISA chez 100% des tiges obtenues aussi bien chez l'amandier que chez le prunier.

Il est important de noter que les trois variétés étudiées se sont comportées d'une façon similaire lors des différents traitements. Les tiges issues de la culture de sections nodales avec thérapie et révélées infectées ont présenté un développement lent avec un feuillage vert jaunâtre comparable à celui des tiges issues du témoin positif. Les tiges révélées saines se sont développées normalement par comparaison à celles issues du témoin négatif.

Par ailleurs, le test biologique réalisé en serre sur les semis de concombre n'a révélé aucun symptôme particulier de viroses pour l'ensemble du matériel issu des différents traitements.

TABLEAU 1

Effet de Différentes Techniques de Culture de Tissus sur l'Élimination du Virus PNRSV chez Trois Variétés de *Prunus* ("Tuono", "Ferki" et "Méribosa") par Test ELISA

Traitement	Variété	Tiges régénérées / explants		Tiges révélées négatives / tiges testées	
		Nb	%	Nb	%
Sections nodales saines (Témoin négatif)	Tuono	45/50	90	20/20	100
	Ferki	42/50	84	20/20	100
	Méribosa	44/50	88	20/20	100
Sections nodales infectées (Témoin positif)	Tuono	85/100	85	0/30	0
	Ferki	86/100	86	0/30	0
	Méribosa	90/100	90	0/30	0
Sections nodales avec thermothérapie	Tuono	87/100	87	21/87	24
	Ferki	85/100	85	25/85	29
	Méribosa	90/100	90	20/90	22
Culture de méristèmes	Tuono	85/90	94	85/85	100
	Ferki	83/90	92	83/83	100
	Méribosa	81/90	90	81/81	100
Culture de méristèmes avec thermothérapie	Tuono	83/90	92	83/83	100
	Ferki	82/90	91	82/82	100
	Méribosa	84/90	93	84/84	100

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces résultats sont particulièrement encourageants, indiquant l'efficacité des techniques de culture de tissus pour l'éradication du PNRSV chez des variétés de *Prunus* infectées.

La méthode traditionnelle de culture de méristèmes, même sans thérapie, a été parfaitement efficace pour assainir deux variétés d'amandier et une variété de prunier infectées par PNRSV. Ceci serait dû à des processus d'antagonisme entre le métabolisme cellulaire et la prolifération virale, à la suite de la différenciation des méristèmes. En effet, la totalité des tiges régénérées à partir de méristèmes de 0,6-0,8 mm de diamètre (dôme apical plus trois primordia foliaires), se sont révélées exemptes du virus tout au long de deux subcultures successives *in vitro*. Des résultats similaires ont été rapportés chez le cerisier pour

l'élimination du virus PNRSV par la technique de microgreffage d'apex, mais qui, comparativement à la culture de méristèmes, est difficilement réalisable avec un taux de reprise ne dépassant pas 60% dans le meilleur des cas (Deogratias *et al.*, 1986). Chez l'amandier, le microgreffage d'apex a permis d'assainir des plants infectés par le virus PNRSV mais avec un taux de 67% seulement (Barba *et al.*, 1989). Chez le pêcher et le nectarinier, l'élimination du PNRSV et d'autres virus a été réussie par la culture de méristèmes mais seulement après thérapie (Manganaris *et al.*, 2003; Laimer *et al.*, 2006).

Par ailleurs, la culture de sections nodales couplée à la thérapie, a permis d'obtenir jusqu'à 29% de tiges exemptes du virus PNRSV, aussi bien chez l'amandier que chez le prunier. Bien qu'ayant des résultats modestes, cette technique alternative à la culture de méristèmes peut être envisagée en cas de détresse en raison de sa plus grande simplicité de mise en œuvre.

REFERENCES

- Barba, M., Cupidi, A., Amnirabile, A. 1989. Uso del microinnesto per il risanamento del Mandorlo. *IAM Bari Quaderno*, 2: 155-156.
- Chalak, L., Elbitar, A., Rizk, R., Choueiri, E., Salar, P., Bové, J. 2005. Attempts to eliminate *Candidatus* phytoplasma phoenicium from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 85-89.
- Choueiri, E., Haddad, C., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Jreijiri, F., Issa, S., Saad, A.T., Di Terlizzi, B., Savino, V. 2001. A survey of peach viruses in Lebanon. *OEPP/EPPO Bulletin*, 31: 493-497.
- Choueiri, E., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., El Zammar, S., Jreijiri, F. 2003. Viruses of stone fruit trees in Lebanon. *In: Options Méditerranéennes N°45, virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*, eds Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., pp. 25-27. CIHEAM, Valenzano (IT).
- Clark, M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Cupidi, A., Barba, M. 1993. Ottimizzazione del microinnesto *in vitro* di piante virus-essenti. *Rivista di Frutticoltura*, 5: 25-28.
- Deogratias, J.M., Lutz, A., Dosba, F. 1986. Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés *in vitro* en vue de l'élimination de trois types de particules virales. *Fruits*, 41(11): 675-680.
- Desvignes, J.C. 1999. *Maladies à virus des arbres fruitiers*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, pp. 202.
- Faccioli, G. 2001. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. *In: Virus and virus-like diseases of potatoes and seed-potatoes*, eds G., Loebenstein, P.H., Berger, A.A., Brunt, R.G., Lawsan, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 365-390.
- Griffith, H.M., Slack, S.A., Dodds, J.H. 1990. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in *in vitro* potato plantlets. *Canadian Journal of Botany*, 68: 1515-1521.
- Jawhar, J., Di Terlizzi, B., Khoury, W., Savino, V. 1996. Preliminary account of the phytosanitary status of stone fruit trees in Lebanon. *OEPP/EPPO Bulletin*, 26: 161-166.

- Kanaan-Atallah, Z.H., Abou-Jawdah, Y., Saad, A. 2001. Virus diseases infecting almond germplasm in Lebanon. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(3): 417-422.
- Karen, B. 1991. Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) in sour cherry, symptoms, incidence in orchards and influence on fruit yield. *Report N°2142, Tidsskr. Planteavl*, 95: 223-232.
- Laimer, M., Hanzer, V., Mendonça, D., Kriston, E., Toth, E.K., Kirilla, Z., Balla, I. 2006. Elimination and detection of pathogens from tissue cultures of *Prunus* sp. *Acta Hort.* (ISHS), 725: 319-324.
- Manganaris, G.A., Economou, A.S., Boubourakas, I.N., Katis, N.I. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Report*, 22: 195-200.
- Mosella, C., Signoret, P.A., Jonard, R. 1980. Sur la mise au point technique d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). *C.R. Acad. Sci.*, 290, D: 287-290.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15: 473-97.
- Navarro, L., Roistacher, C.N., Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free *Citrus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100 (5): 471-479.
- Nemeth, M. 1986. *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of trees*. Akademiai Kiado, Budapest, pp.841.
- Nicoli, M. 1985. La régénération des agrumes en Corse par la technique du microgreffage des méristèmes *in vitro*. *Fruits*, 40(2): 113-136.
- Sanchez, G.E., Slack, S.A., Dodds, J.H. 1991. Response of selected *Solanum* species to virus eradication therapy. *American Potato Journal*, 68: 299-315.
- Walkey, D.G.A. 1980. Production of virus-free plants by tissue culture. In: *Tissue culture methods for plant pathologists*, eds D.S. Ingram et Helgeson J.P., pp. 109-117.