

ASSAINISSEMENT DE LA POMME DE TERRE INFECTÉE PAR LE VIRUS PVY^{NTN} PAR CULTURE DE MÉRISTÈMES

L. Chalak, A. Elbitar, W. Masaad, E. Choueiri
Institut de Recherches Agronomiques, B.P. 287, Zahlé, Liban
lamischalak@hotmail.com

(Received 4 August 2003 - Accepted 8 January 2004)

RÉSUMÉ

Ce travail a consisté en une mise au point technique d'un protocole d'assainissement de 3 variétés de pommes de terre Xantia, Odessa et Burren cultivées au Liban et infectées par une souche du virus Y de la pomme de terre (PVY^{NTN}) et ceci par la culture de méristèmes. Les cultures ont été établies sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) dépourvu de régulateurs de croissance avec des taux de reprise variant de 89 à 99% selon les variétés. Le test ELISA, effectué sur l'ensemble des têtes de clones régénérés à partir de méristèmes, n'a décelé aucun virus. L'élimination du virus a été confirmée plus tard au niveau des plantes acclimatées en serre, aussi bien par test ELISA que par transmission mécanique sur tabac.

Mots clés: pomme de terre, virus PVY, culture *in vitro*, méristème

ABSTRACT

This work aims at developing a sanitation protocol of 3 varieties of potato Xantia, Odessa and Burren cultivated in Lebanon and infected by a new isolate of Potato Virus Y (PVY^{NTN}) by the technique of meristem culture. Cultures were successfully initiated on Murashige and Skoog medium (1962) deprived of growth regulators with rates varying from 89 to 99% depending on varieties. All the new shoots regenerated from meristems were checked for viral infection by DAS-ELISA and were shown to be virus-free. The eradication of the virus was confirmed later on the hardened plants in the greenhouse conditions either by DAS-ELISA test or mechanical transmission on tobacco plants.

Keywords: potato, PVY virus, *in vitro* culture, meristem

INTRODUCTION

Au Liban, la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) constitue l'une des plus importantes cultures maraîchères. Elle est produite sur l'ensemble du territoire libanais en particulier dans la Békaa et à Akkar. Toutefois, cette culture se heurte souvent à des problèmes phytosanitaires, plus particulièrement d'origine virale (Abou-Jawdah *et al.*, 2001).

L'absence de programme de certification, l'introduction et l'échange de semences non certifiées ainsi que l'absence de mesures de quarantaine ont contribué à l'expansion des maladies virales.

Déclarée pour la première fois au Liban en 1990 (Le Romancer et Kerlan, 1991), la maladie des nécroses annulaires superficielles des tubercules (PTNRD) s'est de nouveau manifestée dans la Békaa au cours de l'été 2001, menaçant la culture de la pomme de terre dans cette région. L'agent causal de cette maladie est le virus Y de la pomme de terre. Il s'agit précisément d'un isolat particulier de ce virus dénommé Y^{NTN} (Choueiri *et al.*, 2002). La maladie se traduit essentiellement par l'apparition, sur le feuillage, de mosaïques et de frisolées d'intensité variable et, sur les tubercules, de bourrelets bruns le plus souvent en arcs ou en anneaux apparaissant au moment de la récolte ou au cours des premières semaines de conservation (Beczner *et al.*, 1984; Weidmann, 1985; Le Romancer et Kerlan, 1991; Le Romancer et Nedellec, 1997).

D'une façon générale, l'éradication des virus a été réussie chez de nombreuses variétés de pommes de terre par la culture *in vitro* de méristèmes associée ou non à la thermothérapie et/ou la chimiothérapie (Faccioli, 2001). La culture de sections nodales couplée à la thermothérapie et/ou la chimiothérapie 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; Faccioli et Colalongo, 2002). Parmi les virus de la pomme de terre qui ont été éliminés de plants infectés, citons PVX, PVS, PVY, PVM, PVA et PLRV (virus de l'enroulement foliaire de la pomme de terre) (Faccioli, 2001).

Le présent travail a consisté en une élimination du virus PVY^{NTN} chez 3 variétés infectées de pomme de terre cultivées au Liban, en utilisant la technique de culture de méristèmes sans traitement supplémentaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Des tubercules de 3 variétés de pommes de terre, Xantia, Odessa et Burren, cultivés dans des champs de la Békaa Centrale et présentant des symptômes typiques de l'infection par le virus PVY^{NTN}, ont été choisis. Leur état sanitaire a été vérifié par test ELISA (Clark et Adams, 1977) et immunocapture-RT-PCR (Weidmann et Maiss, 1996). Ces tubercules ont été mis à germer au laboratoire, à température ambiante et à l'obscurité. Au bout de 10 j, les germes ont été sectionnés à leur base et désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (11%) pendant 10 min, puis rincés dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile pendant 5, 10 et 15 min respectivement.

Etablissement des clones à partir de méristèmes

Suite à la désinfection des germes, des méristèmes de 1 mm de long environ (dôme apical plus 3 à 4 primordia foliaires) 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 boîtes de Pétri (100 x

20 mm) contenant 10 ml de milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) dépourvu de régulateurs de croissance, à raison de 5 explants par boîte. Au total, 320 méristèmes ont été mis en culture. Les pourcentages de reprise des explants ont été évalués 60 j après la mise en culture. Les cultures ont été placées dans la salle de culture sous une température variant de 27 à 30°C et une photopériode de 16 h/j avec une intensité lumineuse de 4000 lux.

Environ 60 j après la mise en culture des méristèmes, les nouvelles tiges régénérées chez les 3 variétés ont été considérées comme têtes de clones et conduites en phase de multiplication. Tous les 40 j, les tiges ont été fractionnées en sections nodales (2 noeuds), lesquelles ont été transplantées par groupe de 4 dans des bocaux (300 cm³) contenant 75 ml de milieu MS additionné de kinétine (2,32 µM), d'acide indole acétique (1,15 µM) et d'acide gibbérellique (1 µM). Cette opération de subculture a été répétée 3 fois pour assurer l'obtention d'une quantité suffisante de tiges enracinées.

Les tiges enracinées issues de la 3^{ème} subculture ont été transférées dans une serre protégée contre les insectes par un filet (insect proof) où elles ont été repiquées dans un bac situé à 1 m du sol contenant un substrat constitué d'un mélange de terreau, tourbe et perlite (1:1:1), selon des tracés 25 x 25 cm. Pendant les 15 premiers jours, une humidité relativement élevée (70%, mist system) a été maintenue afin d'éviter le dessèchement des microboutures. Elle a été abaissée progressivement par la suite pour leur permettre de s'adapter aux conditions extérieures. La température en serre a varié entre 27 et 32°C. Par ailleurs, des traitements phytosanitaires à base de carbamate de méthyle (8 mM) et de monocrotophos (7 mM) ont été régulièrement appliqués pour éviter les attaques parasitaires. De plus, des engrais minéraux (20-20-20) ont été apportés par pulvérisation foliaire au fur et à mesure du développement des plantes.

Contrôle sanitaire

La totalité des têtes de clones, régénérées au bout de 60 j à partir de méristèmes, a été testée au niveau de la partie basale de la plantule (feuilles, tige et racines), vis-à-vis du virus PVY (anticorps Biorad, France) par la technique DAS-ELISA (Clark et Adams, 1977). Des échantillons foliaires 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 Biorad. La réaction a été détectée par un photomètre (Titertek 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.

Environ 100 j après l'acclimatation du matériel en serre, un échantillon de 572 plantules (4%) prises au hasard et comprenant 390 plantules de Xantia, 86 plantules d'Odessa et 96 plantules de Burren, a subi un premier contrôle par le test ELISA vis-à-vis du PVY, mais aussi de PVX, PVA et PLRV. Un second contrôle a été effectué par transmission mécanique sur des plants de tabac (*Nicotiana tabacum* cv. White Burley) âgés de 21 j et ceci sur la moitié de l'effectif des plantes préalablement testées par ELISA (2%). Les symptômes ont été vérifiés au bout de 10, 15 et de 25 j respectivement.

RÉSULTATS

Etablissement des clones issus de méristèmes

Soixante jours après la mise en culture des méristèmes, les taux de reprise correspondant aux pourcentages d'explants réactifs ayant régénéré des plantules ont été particulièrement élevés, variant entre 89 et 99 % selon les variétés (Tableau 1). Le nombre moyen de nouvelles tiges par explant a été de l'ordre d'une tige par méristème. Au total, sur 320 méristèmes mis en culture, 300 ont été réactifs et ont conduit à la régénération de 300 têtes de clones (Tableau 1).

TABLEAU 1

Initiation de Clones de 3 Variétés de Pommes de Terre (Xantia, Odessa et Burren) à Partir de Méristèmes

Taux de reprise (%) et nombre de têtes de clones régénérés 60 j après la mise en culture sur le milieu MS dépourvu de régulateurs de croissance.

Variétés	Nombre de méristèmes mis en culture	Taux de reprise (%)	Nombre de têtes de clones régénérées
Xantia	120	99,1	119
Odessa	100	89,0	89
Burren	100	92,0	92

Ce matériel de base a été cloné au cours de 3 subcultures successives sur le milieu de culture MS enrichi en régulateurs de croissance (kinétine, acide indole acétique et acide gibbérellique). La prolifération des tiges n'a commencé qu'à la seconde subculture. A la troisième subculture, les coefficients de multiplication des tiges ont été particulièrement élevés. Il a été observé entre 6.2 (variété Odessa) et 11.2 (variété Xantia) nouvelles tiges par explant. Ainsi 14 295 tiges racinées ont été obtenues (Tableau 2). Par la suite, l'acclimatation en serre de ce matériel issu de la 3^{ème} subculture a été parfaitement réussie pour les 3 variétés.

TABLEAU 2

Multiplication des Tiges de 3 Variétés de Pommes de Terre (Xantia, Odessa et Burren) durant 3 Subcultures Successives

Coefficients de multiplication (moyenne \pm écart type de 10 répétitions de 5 explants chacune) et nombre total de tiges obtenues à la fin de la 3^{ème} subculture.

Variétés	Coefficients de multiplication			Nombre total de tiges obtenues
	Subculture 1	Subculture 2	Subculture 3	
Xantia	1,0 \pm 0	7,3 \pm 3	11,2 \pm 2	9 729
Odessa	1,0 \pm 0	3,9 \pm 2	6,2 \pm 1	2 152
Burren	1,1 \pm 0	3,2 \pm 0	8,2 \pm 1	2 414

Contrôle sanitaire

Le test ELISA, effectué pour les 300 têtes de clones régénérées à partir des méristèmes, n'a pas décelé le virus PVY sur les 3 variétés (Tableau 3). Le même test, établi plus tard pour un échantillon de 572 plantes acclimatées en serre vis-à-vis des virus PVY, PVX, PVA et PLRV, a révélé des résultats négatifs. Ces résultats ont été confirmés par le test de transmission mécanique sur des plants de tabac qui n'ont manifesté aucun symptôme spécifique de viroses (Tableau 3).

TABLEAU 3

Contrôle de l'Élimination du Virus PVY^{NTN} chez 3 Variétés de Pomme de Terre (Xantia, Odessa et Burren) Micropropagées par Culture de Méristèmes, par Test ELISA et Transmission Mécanique sur Tabac

Variétés	Têtes de clones <i>in vitro</i>		Plantes acclimatées en serre	
	ELISA	ELISA**	Transmission sur tabac**	
Xantia	0/119*	0/390	0/195	
Odessa	0/89	0/86	0/43	
Burren	0/92	0/96	0/48	

*, Résultat obtenu / nombre de plantes testées.

** , Le contrôle sanitaire des plantes acclimatées en serre (total de 14 295 plantes) a été effectué par test DAS-ELISA sur un échantillon de 572 plantes (4%) et par transmission mécanique sur la moitié de l'effectif des plantes préalablement testées par ELISA (2%).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La méthode traditionnelle de culture de méristèmes a été parfaitement efficace pour assainir 3 variétés de pommes de terre, Xantia, Odessa et Burren, infectées par l'isolat NTN du virus PVY. En effet, le matériel régénéré à partir de méristèmes de 1 mm de long (dôme apical plus 3 à 4 primordia foliaires), s'est révélé exempt du virus tout au long des différentes étapes de son développement *in vitro* et en serre. Des résultats similaires ont été également obtenus par Faccioli et Rubies-Autonell (1982) pour les variétés Kennebec et Majestic infectées par un autre isolat du virus PVY et, ce, en partant de méristèmes de 1 mm de long.

Dans cette étude, l'élimination du virus PVY a été radicale comparativement aux travaux rapportés par d'autres auteurs qui ont employé des explants de plus petite taille. Quak (1972), a utilisé des méristèmes munis d'un seul primordia foliaire, ce qui a conduit seulement à 80% de plantes exemptes de PVY. Mariani et Pisi (1977) ont utilisé des méristèmes de 0,3 mm de long issus des variétés Primura et Spunta, ce qui leur a permis d'obtenir seulement 84,6% de plantes saines.

Par ailleurs, des approches alternatives à la culture de méristèmes et faisant appel à la culture de sections nodales couplée à la chimiothérapie (ribavirine notamment) et à la thermothérapie à la fois, ont permis de réduire au quadruple la concentration du virus PVY

sans pour autant l'éliminer (Griffith *et al.*, 1990). Sanchez *et al.* (1991) ont obtenu 25,9% seulement de plantes exemptes de PVY en appliquant la thermothérapie aux sections nodales de 11 variétés de pommes de terre. De même, Faccioli et Colalongo (2002) n'ont pu régénérer que 13,8 à 50% de plantes assainies suite à une chimiothérapie appliquée sur des sections nodales pour 6 variétés de pommes de terre.

En conclusion, la culture de méristèmes, rapportée ici, se révèle être la technique la plus efficace pour assainir des pommes de terre infectées par le virus PVY.

RÉFÉRENCES

- Abou-Jawdah, Y., Sobh H., Saad A.T., 2001. Incidence of potato virus diseases and their significance for a seed certification program in Lebanon. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 113-118.
- Beczner, L., Horvath, H., Romhanyi, I., Forster, H., 1984. Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27: 339-352.
- Choueiri, E., El-Zammar, S., Jreijiri, F., Saad, A.T., Afram, M.A., Varveri, C. 2002. *Journal of Plant Pathology*, 84: 139-140.
- 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.
- 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: 365-390.
- Faccioli, G., Colalongo, C. 2002. Eradication of potato virus Y and potato leafroll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 76-78.
- Faccioli, G., Rubies-Autonell, C. 1982. PVX and PVY distribution in potato meristem tips and their eradication by the use of thermotherapy and meristem tip culture. *Phytopath. Z.*, 103: 66-76.
- 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.
- Le Romancer, M., Kerlan, C. 1991. La maladie des nécroses annulaires superficielles des tubercules: une affection de la pomme de terre due au virus Y. *Agronomie*, 11: 889-900.
- Le Romancer, M., Nedellec, M. 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathology*, 46: 104-111.
- Mariani, F., Pisi, A. 1977. Meristem tip culture and vegetative propagation in potato. *Acta Horticulturae*, 78: 415-424.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-97.
- Quak, F. 1972. Review of heat treatment and meristem tip culture as a method to obtain virus-free plants. *Proc. 18th Int. Hort. Congr.*, Tel Aviv, 12-25.

- 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.
- Weidmann, H.L. 1985. Ringsymptome an Kartoffellen: Kartoffelvirus y als vermutlicke Ursache, 36: 356-357.
- Weidmann, H.L., Maiss, E. 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 103: 337-345.

