

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	Géotypes	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 géotype 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 géotypes 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.

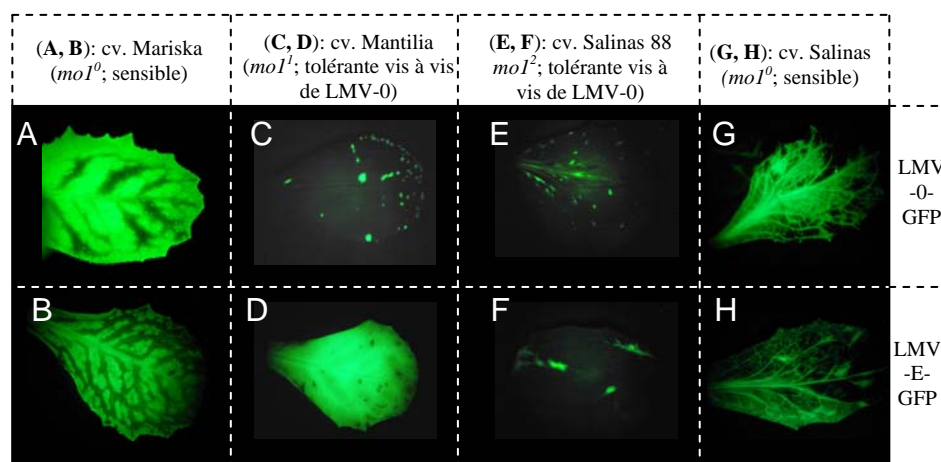


Figure 1 : Vues au stéréomicroscope de la fluorescence détectée sur des feuilles de différents cultivars de laitues, 40 jours après inoculation

De façon intéressante, il est possible de différencier les deux allèles de résistance moI^1 et moI^2 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