

Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés *in vitro* en vue de l'élimination de trois types de particules virales (CLSV, PDV et NRSV).

J.-M. DEOGRATIAS, A. LUTZ et Françoise DOSBA*

MICROGREFFAGE D'APEX DE CERISIERS (*PRUNUS AVIUM* L.) MULTIPLIÉS *IN VITRO* EN VUE DE L'ÉLIMINATION DE TROIS TYPES DE PARTICULES VIRALES (CLSV, PDV et NRSV).

J.-M. DEOGRATIAS, A. LUTZ et Françoise DOSBA.

Fruits, Nov. 1986, vol. 41, n° 11, p. 675-680.

RESUME - Le cerisier supporte mal les traitements par thérapie et certains virus ne peuvent être éliminés par cette méthode. Pour pallier cet inconvénient, nous avons tenté de mettre au point, pour cette espèce, la technique de microgreffage d'apex *in vitro*, dans le but d'éliminer un ou plusieurs virus, présents chez les différents clones étudiés. A cet égard, des apex d'une taille de 0,4 à 1 mm ont été prélevés sur des arbres malades en âge de production et greffés sur des porte-greffe sains issus de semis. Les apex provenant de bourgeons dormants ou de pousses herbacées de l'année se développent difficilement. Par contre, le taux de réussite est très nettement augmenté lorsque les prélèvements se font à partir de matériel multiplié *in vitro*. Des contrôles sérologiques (tests ELISA) ont été effectués sur tout le matériel obtenu par greffage. C'est sur celui issu d'apex provenant de pousses cultivées *in vitro* que les résultats ont été concluants. Alors âgées de 3 mois, ces dernières n'ont révélé aucune présence de particules virales.

Parallèlement à ces travaux sur le microgreffage, des plantes produites directement à partir de matériel multiplié *in vitro* ont été soumises au même test.

INTRODUCTION

Les maladies à virus constituent un dommage préjudiciable à l'arboriculture fruitière, surtout lorsqu'elles sont présentes chez de jeunes arbres. Actuellement, aucun moyen curatif n'est à la disposition du producteur pour détruire les agents pathogènes présents dans les vergers. La production de matériel sain peut être réalisée en utilisant la

thérapie. Mais le cerisier est une espèce très sensible à ce traitement et, de ce fait, il est très difficile d'éradiquer certains complexes viraux.

A la suite des travaux de LIMASSET et CORNUET (1949), et MOREL et MARTIN (1952), la culture du méristème caulinaire permet l'assainissement de plantes malades. Mais cette technique s'avère fort délicate lorsque l'on s'adresse aux arbres fruitiers (BOXUS et QUOIRIN, 1974, 1977). La technique de microgreffage d'apex, mise au point pour les agrumes par MURASHIGE *et al.*, (1972) et améliorée par NAVARRO *et al.*, (1975) a permis de contourner ce problème. En nous appuyant sur des travaux récents (MOSELLA, 1980 ; NAVARRO, 1983) ayant trait au

* - Jean-Marc DEOGRATIAS et Albert LUTZ - Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université de BORDEAUX II - 33405 TALENCE.
Françoise DOSBA - Institut national de la Recherche agronomique (INRA) - Station de Recherches d'Arboriculture fruitière - La Grande Ferrade - 33140 PONT DE LA MAYE

microgreffage d'apex de pêcher GF 305 auquel on avait inoculé différentes viroses, nous avons essayé d'obtenir la guérison de clones de cerisiers (*Prunus avium* L.) contaminés par un Closterovirus : Chlorotic leaf spot virus (CLSV) et par 2 virus du groupe ILAR : Necrotic ring spot virus (NRSV) et Prune dwarf virus (PDV).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal.

● **Le porte-greffe**: Le porte greffe est constitué par une plantule produite *in vitro* à partir de semis de merisier (clone V 1813). Le bon état sanitaire des arbres producteurs des semences a été vérifié. Ces arbres sont indemnes de virose.

● **Les greffons**: Quatre clones de cerisier contaminés par un ou plusieurs virus ont été utilisés comme donneurs de greffons.

- le clone V 1608 de la variété Noire de Meched contaminé par le CLSV,

- le clone V 1944 de la variété Vittoria contaminé par le NRSV,

- l'hybride V 2220 obtenu par l'INRA et infesté par le PDV.

- le clone 2 D de la variété Van contaminé par le complexe ILAR : PDV + NRSV.

Les apex sont prélevés à partir de trois types de matériel végétal :

- des bourgeons dormants (les rameaux sont prélevés en janvier et conservés en chambre froide jusqu'en avril-mai,

- des pousses herbacées de l'année prélevées en mai-juin sur des arbres en verger et sur des pousses provenant d'arbres placés en serre,

- des pousses multipliées *in vitro*.

Les techniques utilisées.

Afin de pouvoir utiliser à volonté des prélèvements d'apex, nous avons été amenés à multiplier *in vitro* des cerisiers malades, d'autant qu'un matériel soumis à une multiplication intense était susceptible d'intervenir sur la zone d'invasion du virus et de laisser entrevoir la possibilité d'augmenter à la fois le taux de réussite des greffes ainsi que les chances de guérison.

Multiplication *in vitro* des différents clones. La technique de micropropagation se réalise en général pour les plantes

ligneuses grâce à une multiplication rapide et continue des bourgeons axillaires (QUOIRIN *et al.*, 1977 ; RIFFAUD et CORNU, 1981 ; SNIR, 1982).

● **La stérilisation**: Les rameaux de cerisiers comportant les bourgeons axillaires sont stérilisés par trempage dans une solution de chlorure mercurique à 0,25 p. 100 pendant 20 minutes, suivi de 2 rinçages dans une solution stérile de CaCl₂ à 0,25 p. 100. Ils sont alors rincés 2 fois à l'eau stérile. Chaque bourgeon axillaire est enfin mis en culture dans des tubes contenant le milieu nutritif.

● **Milieux de culture**: Pour assurer la micropropagation des cerisiers malades ainsi que l'obtention de plantes nouvelles, nous avons été amenés à mettre au point différents milieux de culture.

Le milieu de culture de base (MB) comprend :

- les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (MS), (1962) où seule la concentration en NH₄NO₃ a été modifiée et ramenée à 825 mg/l.

- les microéléments de MS (les concentrations FeSO₄·7H₂O et Na₂EDTA y sont doublées).

- un mélange vitaminique : thiamine HCl (1 mg/l) ; acide nicotinique (1 mg/l) ; pyridoxine HCl (1 mg/l), biotine (0,01 mg/l), pantothénate de calcium (1 mg/l),

- myoinositol (50 mg/l),

- saccharose (30 g/l).

Le pH du milieu complet est ajusté à 5,5 ± 1.

A partir de ce milieu MB, nous avons réalisé quatre types de milieux différents entre eux par leur composition hormonale et qualifiés respectivement de MB₁, MB₂, MB₃, MB₄.

- MB₁ : milieu d'ensemencement des bourgeons axillaires,

- MB₂ : milieu de multiplication des pousses obtenues,

- MB₃ : phase d'allongement,

- MB₄ : phase d'enracinement des pousses individualisées.

Les différentes compositions hormonales pour chacun des quatre milieux sont représentées dans le tableau 1.

Notons que les cultures sont entreposées dans une salle avec une photopériode de 14 h/10 h, la température est de 23°C le jour et de 20°C la nuit.

La technique de microgreffage *in vitro*. La préparation du porte-greffe, le prélèvement de l'apex ainsi que l'étude des différents paramètres sur les meilleures conditions de microgreffage ont été décrits en détail antérieurement (DEOGRATIAS *et al.*, 1985). Nous rappellerons brièvement la technique de microgreffage.

Un apex d'une taille de 0,4 à 1 mm est disséqué dans des

TABLEAU 1 - Composition hormonale du milieu des différentes phases.

MB ₁	MB ₂	MB ₃	MB ₄
MB	MB	MB	MB avec macroéléments/3
BAP 2 mg/l	BAP 1 mg/l 2IF 1 mg/l Kin 1 mg/l Adénine sulfate 50 mg/l AIA 0,1 mg/l	BAP 0,1 mg/l AIA 0,2 mg/l GA ₃ 5 mg/l	AIB 1 mg/l
Agar Difco 6 g/l	Agar Difco 6 g/l	Agar Difco 6 g/l	Support Milcap(R) * (mottes ou flocons)

* - Le support Milcap(R) est un substrat synthétique à base de fibres de polypropylène, inerte et stérilisable à l'autoclave.

conditions rigoureusement aseptiques. Parallèlement, on procède à la préparation du porte-greffe, qui est débarrassé de ses cotylédons. L'apex greffon est ensuite déposé sur cette surface décapitée en contact avec la zone cambiale de la tige sectionnée. Les microgreffes sont ensuite placées dans des tubes de culture contenant un support imbibé de solution nutritive, puis installées dans une salle de culture à 25°C avec une intensité lumineuse de 5 μ einstein sec⁻¹.m⁻².

Amélioration apportée à la technique initiale. Les premières expériences sur le microgreffage ont été menées selon la technique de NAVARRO mise au point sur les *Citrus* ; les plantules greffées étaient alors cultivées sur un milieu liquide. Mais, compte tenu des phénomènes d'asphyxie racinaire observés chez les porte-greffe lors de ces cultures en milieu liquide, nous avons cherché à adjoindre un support aéré, condition susceptible de permettre un meilleur développement des plantules greffées. Cette amélioration a été apportée, grâce à l'utilisation du support MILCAP(R). Ce substrat, humidifié par le milieu nutritif, a pour effet, d'une part de simplifier les manipulations initiales (gain de temps, facilité de transfert en tube) ; d'autre part, de permettre un développement harmonieux du système racinaire du porte-greffe dont la vigueur se répercute sur la reprise du greffon.

Transfert des plantules greffées en conditions non stériles.

Après le développement et l'enracinement *in vitro*, les

jeunes plantes sont sorties des tubes et repiquées sur un mélange de tourbe/terreau/perlite/vermiculite (1/1/1/1), non stérilisé, mais imbibé d'une solution minérale contenant un fongicide (cryptonol 2 p. 1000). Elles sont ensuite placées dans des miniserres où l'hygrométrie est maintenue à environ 80 p. 100 et l'humidification du substrat est assurée par pulvérisation. Ces miniserres sont installées dans des salles climatisées avec une photopériode de 14/10 heures et une thermopériode de 23°C pendant le jour et 19°C pendant la nuit.

Les contrôles sanitaires.

L'état sanitaire des plantes greffées a été apprécié en utilisant la technique immunoenzymatique E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) mise au point par CLARK et ADAMS (1977). Les plantes ont été indexées à la sortie des tubes et après leur passage en terre.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Evolution des greffes.

La reprise au microgreffage est variable et dépend du support sur lequel sont cultivées les plantes greffées et de l'origine de l'apex (tableau 2).

Le support Milcap (R), humecté avec la solution nutri-

TABLEAU 2 - Pourcentage de reprise des microgreffes en fonction de l'origine de l'apex et du support utilisé pour le porte-greffe.

	Matériel adulte			Matériel juvénile
	pousses herbacées de l'année	bourgeons dormants	pousses <i>in vitro</i>	semis V 1813
Support liquide	0	0,5	-	5
Support Milcap	3	20	40	50 à 60

tive, réunit les conditions les plus favorables au développement des apex greffés. Par contre, le milieu liquide ne donne que des résultats très médiocres.

Le microgreffage d'apex provenant de matériel végétal au stade adulte a été comparé à celui réalisé avec des apex issus de matériel juvénile (DEOGRATIAS *et al.*, 1985). Il s'agit, dans ce dernier cas d'apex prélevés sur des semis de merisier V 1813 âgés de 4 à 6 mois. C'est avec ce type de matériel que nous avons obtenu les meilleurs résultats (50-60 p. 100). Il est certain que le matériel juvénile est nettement plus malléable en culture *in vitro* que son homologue adulte. D'ailleurs, certains auteurs (MOSELLA *et al.*, 1980 ; NAVARRO *et al.*, 1983), ont montré que le taux de succès du microgreffage d'apex prélevés sur des jeunes GF 305 inoculés par différents virus pouvait atteindre 70 à 80 p. 100. Par contre, le comportement d'apex de certaines variétés adultes de *Prunus* soumis à cette même technique est très différent et plus difficilement réalisable (LLACER, com. pers.). Il est toutefois possible d'obtenir des résultats intéressants avec le matériel adulte, ceux-ci ont été obtenus avec des apex prélevés sur des pousses multipliées *in vitro*. En effet, dans ce cas, le taux de succès de microgreffage se rapproche sensiblement de celui enregistré avec le matériel juvénile. Il n'en est pas de même, si les apex proviennent de bourgeons dormants ou de pousses herbacées de l'année. Dans le premier cas, le taux de réussite n'excède pas 20 p. 100, dans le second il est très faible (tableau 2).

Les résultats encourageants obtenus avec les apex prélevés sur des pousses multipliées *in vitro* peuvent être expliqués par le fait que le passage répété par la culture *in vitro* entraîne un rajeunissement du matériel adulte, hypothèse émise par FRANCKET (1981) dans le cas de nombreux arbres forestiers.

La figure 1 vient étayer cette hypothèse puisque nous pouvons constater que la reprise et la croissance du greffon sont différentes selon le nombre de subcultures du matériel donneur d'apex. Ainsi le développement de l'apex prélevé sur une 5ème ou une 7ème subculture, se produit 8 jours après le microgreffage avec une croissance continue du greffon. Par contre, le développement des apex issus d'une 3ème subculture est moins rapide et la croissance ne devient importante que 46 jours après le microgreffage.

Passage en terre des plantes obtenues.

Les microgreffes réussies avec des greffons provenant de matériel adulte sont maintenues dans leur tube d'origine jusqu'à ce que ces derniers aient atteint une taille supérieure à 2 cm. La transplantation en terre de tels plants est souvent fort délicate et les reprises exceptionnelles. Par contre, l'utilisation du support Milcap(R) a facilité considérablement les opérations de transfert et la reprise en terre grâce à la qualité du système racinaire. Dans ce cas, 60 à 70 p. 100 des plantes greffées sont conservées.

Contrôle par test ELISA de l'état sanitaire des plantules greffées.

Les premiers contrôles sérologiques ont été effectués sur le matériel greffé dès sa sortie des tubes de culture en comparaison avec des témoins sains et des témoins malades. Tous les témoins sains ont donné des réponses négatives ; tous les témoins malades, des réponses positives. Les résultats des tests sont regroupés dans le tableau 3.

Le microgreffage d'apex prélevés sur des pousses herba-

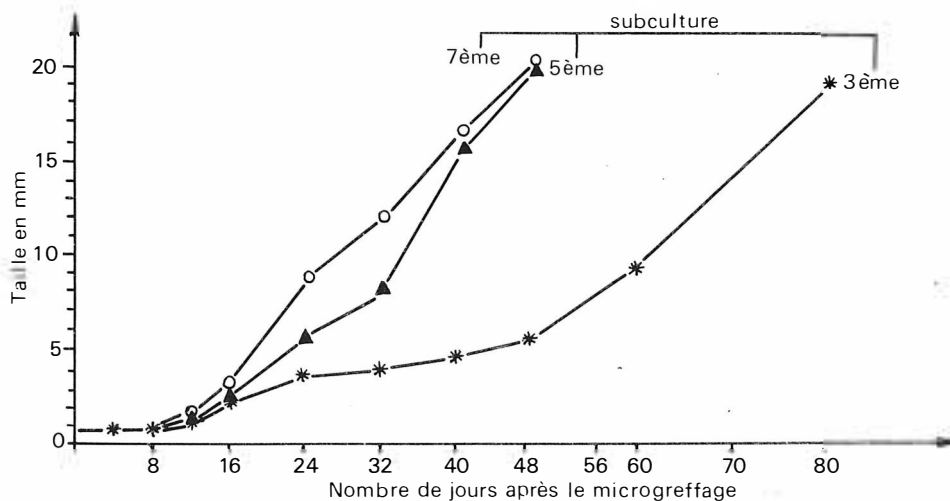


Figure 1 - Etude de la croissance des greffons en fonction du temps et suivant le nombre de subcultures du matériel donneur d'apex.

TABLEAU 3 - Etat sanitaire des plantules greffées - Test ELISA.

Origine de l'apex	Virus	Réponse positive par test ELISA
Pousses herbacées	CLSV	non effectué
	NRSV	100 p. 100
	PDV	100 p. 100
Bourgeons dormants	CLSV	30 p. 100
	NRSV	60 p. 100
	PDV	60 p. 100
Pousses <i>in vitro</i>	CLSV	0 p. 100
	NRSV	0 p. 100
	PDV	0 p. 100

cées ne nous a pas permis d'éliminer les particules virales. D'autre part, les plants microgreffés à partir d'apex provenant de bourgeons dormants donnent entre 30 et 60 p. 100 de réponses positives. Signalons que le CLSV est plus facilement éliminé que les PDV et NRSV. D'ailleurs, NAVARRO (1983) montre que les Closterovirus sont plus aisément éradiqués par microgreffage d'apex de pêcher que les virus du groupe ILAR. Les microgreffages d'apex prélevés sur les pousses multipliées *in vitro* sont particulièrement intéressants, les réponses au test ELISA ayant toujours été négatives ; dans aucun cas, nous n'avons pu détecter de particules virales. Des tests systématiques effectués ensuite sur des plants âgés de 15 jours à 3 mois ont confirmé les premières analyses.

Le passage des plants donneurs d'apex en culture *in vitro* semble limiter considérablement les possibilités de multiplication des virus dans les apex. Il nous a donc paru intéressant d'étudier le devenir des virus au cours de la micropropagation des différents clones malades.

Etat sanitaire des clones de cerisiers multipliés *in vitro*.

Tests ELISA effectués sur le matériel à sa sortie de tube.

Trois clones (V 1944 - V 1608 - Van 2D) multipliés *in vitro* ont été indexés. Ce contrôle a été effectué pour chacun des trois virus, c'est-à-dire le CLSV, le PDV et le NRSV, sur 50 tubes de culture. Nous n'avons, dans aucun cas, détecté de particules infectieuses.

Tests ELISA, un mois après le passage en terre des vitroplants.

Les contrôles ont été réalisés sur 15 plantes de la variété Van 2D. Parmi ces plantes, 3 ont répondu positivement : deux au PDV et une au NRSV. Ainsi les virus qui n'avaient pu être détectés sur le matériel à la sortie des tubes s'expriment lorsque les plantes se développent en terre et retrouvent leurs conditions normales de croissance. Compte tenu de cette constatation, il s'avère nécessaire de pratiquer, après quelques mois, de nouveaux contrôles sur les autres plantes, avant d'affirmer qu'elles sont exemptes de particules infectieuses.

La culture *in vitro* de bourgeons axillaires issus de tiges infectées donne des résultats intéressants voire surprenants. Il est en effet curieux de constater l'absence de réponse positive au test ELISA, pour les trois virus recherchés, dans les pousses se multipliant *in vitro*. L'interprétation la plus plausible est que les virus sont présents, au départ dans le bourgeon, mais peuvent disparaître lorsque celui-ci est cultivé *in vitro*. Le milieu, selon sa composition, pourrait influencer la virulence des particules virales (QUAK, 1970). Rappelons que notre milieu de multiplication des bourgeons axillaires est riche en hormones (4 cytokinines, 1 auxine et 1 gibbérelline). Or, certains auteurs ont montré que des hormones de croissance pouvaient avoir un effet inhibiteur sur la multiplication de certains virus (KURIGER et AGRIOS, 1977 ; TOLIMSON, 1982). De plus, la culture *in vitro* entraîne une multiplication et une croissance active des éléments cultivés. Les divisions sont intenses et la régulation des mécanismes de synthèse se ferait en faveur d'une production de nucléoprotéines cellulaires qui entrerait en compétition avec la synthèse des protéines virales. Ainsi la mise en culture de pousses issues de plantes malades peut conduire à une dilution de la teneur en particules virales, voire à l'élimination complète de l'agent pathogène, notamment par le jeu des repiquages successifs.

CONCLUSIONS

Le microgreffage d'apex prélevés sur du matériel multiplié *in vitro* a donné des résultats très encourageants. En comparaison avec les autres origines d'apex, nous avons obtenu une augmentation du taux de reprise au greffage. De plus, aucun des trois virus testés n'a été détecté par test ELISA, quelle que soit la taille de l'apex (0,4 à 1 mm) alors que généralement le taux d'élimination des virus est inversement proportionnel à la taille des implants primaires. La distribution des particules virales dans les apex peut varier selon l'espèce végétale et la nature du virus (MORI et HOSOKAWA, 1977). Nous montrons qu'elle varie aussi en fonction de l'origine des apex utilisés pour le microgreffage.

La reprise au greffage a aussi été facilitée grâce à l'utili-

sation du support Milcap(R). Ce support permet le passage, sans choc, de l'*in vitro* à l'*in vivo*. Les plantes sorties des tubes sont repiquées en terre directement avec le support, sans subir d'altération du système racinaire.

La culture *in vitro* du matériel malade semble exacerber au maximum la compétition entre la multiplication cellulaire et virale au sein des apex. Cette stimulation permet de freiner l'invasion des particules virales vers la zone apicale.

De ce fait, il paraît possible de disposer de greffons indemnes de virus, de plus grande taille, donc plus vigoureux, ce qui rend plus aisées les opérations de microgreffage. Par ailleurs, le fait de disposer de matériel multiplié *in vitro* rend possible la perspective d'associer cette technique à d'autres méthodes, telles la chimiothérapie ou la thérapie *in vitro* et d'augmenter ainsi les chances d'élimination des particules infectieuses.

BIBLIOGRAPHIE

- BOXUS (P.) et QUOIRIN (M.). 1974.
La culture de méristème apicaux de quelques espèces de *Prunus*.
Bull. Soc. Roy. Bot. Belg., 107, 91-101.
- CLARK (M.F.) et ADAMS (A.N.). 1977.
Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of Plant Viruses.
J. Gen. Virol., 34, 475-483.
- DEOGRATIAS (J-M), LUTZ (A.) and DOSBA (F.). 1985.
In vitro shoot-tips micrografting from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* L. Batsch to produce virus-free plants.
Acta Horticulturae 13th International Symposium on Fruit Tree Virus Disease., in press.
- FRANCIET (A.). 1981.
Rajeunissement et micropropagation des ligneux.
Colloque international sur la Culture in vitro des Essences forestières, AFOCEL, 55-64.
- KURIGER (W.E.) and AGRIOS (G.N.). 1977.
Cytokinin level and kinetin-virus interactions in Tobacco ring spot virus-infected cowpea plants.
Phytopathology, 67, 604-609.
- LIMASSET (P.) et CORNUET (P.). 1949.
Recherche du virus de la mosaïque du Tabac dans les méristèmes des plantes infectées.
C.R. Acad. Sci., Paris, 228, 1971-1972.
- MOREL (G.) et MARTIN (C.). 1952.
Guérison de dahlia atteints d'une maladie à virus.
C.R. Acad. Sci., Paris, 235, 1324-1325.
- MORI (K.) et HOSOKAWA (D.). 1977.
Localization of viruses in apical meristems and production of virus free plants by means of meristem and tissue culture.
Acta Hort., 78, 389-396.
- MOSELLA (C.), SIGNORET (P.A.) et JONARD (R.). 1980.
Sur la mise au point de technique de microgreffage d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le pêcher (*Prunus persica*, Batsch).
C.R. Acad. Sci., 290, série D, 287-290.
- MURASHIGE (T.), BITTERS (W.P.), RANGAN (T.S.), NAUER (E.M.), ROISTACHER (C.N.) and HOLLIDAY (P.B.). 1972.
A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones.
Hortscience, 7 (2), 118-119.
- MURASHIGE (T.) and SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.
- NAVARRO (L.), ROISTACHER (C.N.) and MURASHIGE (T.). 1975.
Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free Citrus.
J. Amer. Soc. Hort., Sci., 100 (5), 471-479.
- NAVARRO (L.), LLACER (G.), CAMBRA (M.), ARRÈGUI (J-M) and JUAREZ (J.). 1983.
Shoot tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch).
Acta Horticulturae, 130, 185-192.
- QUAK (F.). 1970.
Review of heat treatment and meristem-tip culture as methods to obtain virus free plants
in : *Proc. XVIII Int. Hort. Congr., Tel Aviv*, 3, 12-25.
- QUOIRIN (M.) et LEPOIVRE (P.). 1977.
Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*.
Acta Horticulturae, 78, 437-442.
- RIFFAUD (J.L.) et CORNU (D.). 1981.
Utilisation de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt.
Agronomie, 1 (8), 633-640.
- SNIR (I.). 1982.
In vitro propagation of sweet cherry cultivars.
Hortscience, 17 (2), 192-193.
- TOMLINSON (J.A.). 1981.
Chemotherapy in controlling virus diseases.
In : *Pathogens, Vectors and plant diseases : approach to control*.
Eds. K.F. HARRIS and K. MARAMOROSCH. Academic Press., 23-44.

