

Impact des allèles du gène de résistance « va » sur le pouvoir pathogène des populations de virus Y de la pomme de terre (PVY)

Christelle LACROIX^{1,2}, Camille KERLAN¹, Jean-Louis VERRIER², Laurent GLAIS³ et Emmanuel JACQUOT¹.

¹INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes1, UMR1099 Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, BP 35327, 35650 Le Rheu Cedex France

²ALTADIS - Institut du Tabac, 769, route de Sainte Alvère, 24100 Bergerac, France

³FNPPPT (Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre), 43-45 rue de Naples, 75008 Paris, France

Résumé

Le virus Y de la pomme de terre (PVY, espèce-type du genre Potyvirus) infecte une large gamme de plantes hôtes dont des Solanacées d'intérêt agronomique tel que le tabac. Le PVY peut induire sur cet hôte des symptômes de nécroses foliaires, responsables d'importantes pertes de rendements. Toutefois, de nombreuses variétés de tabac, porteuses d'un des allèles (0, 1 ou 2) du gène récessif de résistance "va", sont capables de limiter l'expression de nécroses dues au PVY avec une efficacité variable en fonction de l'allèle en présence. Aussi, compte tenu de l'absence d'alternatives au gène "va" pour la lutte contre le PVY chez le tabac, il est important de déterminer l'impact respectif des différents allèles de ce gène sur le processus évolutif du PVY. Deux actions complémentaires visant i) à caractériser la variabilité naturelle du PVY sur tabac et ii) à étudier le processus d'adaptation du PVY aux pressions imposées par les allèles du gène "va" ont été réalisées.

Ainsi, la virulence (capacité d'infection) d'une collection de 86 isolats, issus d'une prospection effectuée en France en 2007, a été caractérisée en utilisant des génotypes de tabac porteurs ou non d'un allèle du gène "va". Les isolats testés se répartissent dans huit pathotypes. Les deux-tiers des isolats, étant capables d'infecter les trois génotypes porteurs d'un allèle du gène "va", appartiennent au pathotype le plus virulent. Afin d'analyser la dynamique d'adaptation du PVY au gène "va", un clone infectieux de PVY a été inoculé à deux variétés résistantes portant respectivement l'allèle 0 et 2 du gène "va". La descendance virale obtenue a été utilisée comme inoculum pour une nouvelle série d'inoculations de ces variétés résistantes. Les données de virulence associées à ces populations virales montrent qu'un seul passage du clone infectieux sur une variété porteuse de l'allèle 2 du gène "va" peut suffire pour augmenter la virulence de ce clone au point d'être capable de surmonter la résistance des deux allèles.

Ainsi, les résultats associés au pathotypage de la collection d'isolats de PVY et aux caractéristiques des populations virales issues des passages en série du clone infectieux sur des variétés résistantes contribuent à mieux caractériser l'interaction virus/plante hôte dans le cadre du pathosystème PVY/tabac.

Mots clefs : *Potyvirus*, tabac, adaptation à l'hôte, pathotypes

Abstract

Potato virus Y (PVY), type-member of the *Potyvirus* genus, infects a wide range of plant species belonging to *Solanaceae* family. PVY is the most damaging virus affecting tobacco. Three allelic forms (0, 1 and 2) of the “*va*” recessive resistance gene to PVY, with different levels of efficiency, have been introduced in *Nicotiana tabacum* genotypes. To test the impact of the “*va*” gene on the evolution of PVY natural populations, the virulence of PVY isolates collected from tobacco plants has been characterized and the adaptation process of PVY to the “*va*” gene has been studied. Eighty-six PVY isolates collected in 2007 from French tobacco fields were inoculated to susceptible and “*va*” resistant tobacco genotypes. Tested isolates are distributed in eight pathotypes, most of them (N=55) belonging to the most virulent pathotype, *va*0-1-2. To assess the adaptation of PVY isolates to the “*va*” gene, serial passage of a PVY infectious clone was initiated on tobacco genotypes carrying allele 0 or 2 of the “*va*” gene. Infected plants obtained from the first passage were used as inoculum in a second passage. Resulting data revealed that a single passage of the infectious clone on tobacco genotype carrying allele 2 of the “*va*” gene produces viral populations which are able to efficiently infect both allele 2 and 0 of the “*va*” gene. All these data about biological characterization and host plant adaptation of PVY isolates improve our knowledge on virus/host interactions involved in the PVY/tobacco pathosystem. In the future, these data could be used to develop new genetic strategies to control PVY infection in tobacco crops by an appropriate management of alleles of the recessive resistance “*va*” gene.

Key words: *Potyvirus*, tobacco, host adaptation, pathotype

1. Introduction

Le virus Y de la pomme de terre (PVY, espèce-type du genre *Potyvirus*) (Kerlan, 2006), mondialement répandu, fait partie des phytopathogènes viraux les plus importants économiquement (Shukla et al., 1994; Valkonen, 2007). Le PVY est le virus le plus fréquent sur les cultures de pomme de terre (Valkonen, 2007) et de tabac (Blancard, 1998) sur lesquelles il peut causer de graves dommages. En fonction de la plante hôte d'origine, différentes classifications ont été établies (De Bokx et Huttinga, 1981 ; Brunt, 1992). Les souches « pomme de terre » ont été réparties en trois groupes, PVY^O, PVY^C, PVY^N (Cockerham, 1970 ; De Bokx and Huttinga, 1981), et en deux variants, PVY^{NTN}, PVY^N-W (Beczner, 1984 ; Chrzanowska, 1991 ; 1994 ; Le Romancer *et al.*, 1994), selon i) leur capacité ou non à induire des nécroses nervaires sur tabac (*Nicotiana tabacum*) et à surmonter des gènes de résistance de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), ii) leur sérotype et iii) les caractéristiques de leur génome (Revers *et al.*, 1996 ; Boonham et al., 1998 ; Glais et al., 2002). Contrairement aux souches PVY « pomme de terre », les caractéristiques biologiques, sérologiques et moléculaires des souches PVY « tabac » sont peu connues.

La multiplication du PVY sur tabac peut induire, en complément d'infections asymptomatiques, des éclaircissements nervaires, des mosaïques et/ou des nécroses. L'apparition de nécroses est à l'origine de conséquences agronomiques et économiques puisque les feuilles nécrosées ne peuvent être récoltées. Des épidémies de PVY, se manifestant sous la forme de nombreuses plantes nécrosées, ont eu lieu dans les années 50-60 en Europe (Endemann, 1958) puis dans plusieurs pays producteurs de tabac à travers le

monde. Compte tenu de l'importance économique des infections liées au PVY, de l'absence de méthodes de lutte directes et de systèmes efficaces de contrôle de la transmission aphidienne, la résistance génétique se présente comme le seul moyen pour limiter l'expansion de ce phytopathogène. A cette époque, les variétés de tabac cultivées étaient sensibles au PVY. Dès lors, des programmes d'introduction de résistance génétique au PVY dans le tabac ont été conduits. Ainsi, plusieurs allèles du gène récessif "va" ont été utilisés (Noguchi et al., 1999). Ces allèles, d'origine différentes (Carstens and Seehofer, 1960; Koelle, 1961) ne confèrent pas le même niveau de résistance au PVY (Ano et al., 1995). Les variétés de tabac porteuses du gène "va" limitent l'expression des symptômes, notamment nécrotiques, dues à l'infection par le PVY sans empêcher la multiplication virale (Verrier and Doroszewska, 2003). Par conséquent, ces variétés sont tolérantes et peuvent, à l'image de nombreux réservoirs viraux, permettre le maintien de populations virales sans que ces dernières n'induisent, à court termes, de conséquences économiques. Or, la production de descendance virale dans un organisme porteur d'un gène de tolérance impose des pressions de sélection pouvant conduire à l'émergence de variants plus agressifs et/ou plus virulents. Aussi, afin d'améliorer la lutte contre le PVY et de limiter la sélection de populations virales plus pathogènes, il est important de mettre en place une gestion raisonnée du gène de résistance "va". Cependant, les variétés issues de l'introgression du gène "va" sont cultivées depuis plusieurs décennies sans information sur leur impact sur l'évolution du PVY. Dès les années 1970, des isolats viraux de PVY capables d'induire des symptômes de nécroses sur les variétés porteuses du gène "va" ont été décrits (Ano et al., 1995). Compte tenu de ce constat et de l'absence d'alternatives au gène "va" dans la lutte génétique contre le PVY chez le tabac, il convient à présent de déterminer l'impact respectif des différents allèles de ce gène dans le processus évolutif du PVY sur tabac. Deux actions complémentaires visant i) à caractériser la variabilité naturelle du PVY sur tabac et ii) à étudier le processus d'adaptation du PVY aux pressions imposées par les allèles du gène "va" ont été réalisées.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel viral

2.1.1 Isolats PVY naturels

Un échantillonnage de feuilles de tabac réalisé en 2007 au niveau des principales régions tabacoles de France, a permis de constituer une collection de 86 isolats de PVY. Ces isolats ont été collectés sur différents types de tabac (Virginie, Burley et Brun) porteurs ou non d'un des allèles du gène de résistance "va". Ces 86 isolats sont définis en fonction de leur origine géographique (Nord, Sud) et de leur plante hôte d'origine (résistante, sensible) (Tableau I).

Tableau I : Caractéristiques des isolats PVY utilisés

	Génotypes tabac		Nb isolats
	Résistant	Sensible	
Nord	37	0	37
Sud	6	43	49
Nb isolats	43	43	86

2.1.2 Clone infectieux

Un clone infectieux de PVY, SON41 (Moury et al., 2004) a été utilisé dans nos expérimentations. Ce clone correspond à un isolat PVY de type sérologique-C, collecté sur morelle noire (*Solanum Nigrum*).

2.2 Matériel biologique

2.2.1 Hôtes différentiels

Cinq variétés de tabac comprenant deux génotypes sensibles ("Va") au PVY (*Nicotiana tabacum* cv xanthi, MN944) et trois génotypes résistants : VAM, WISLICA, PBD6, porteurs respectivement de l'allèle 0, 1 ou 2 du gène "va" ont été inoculées mécaniquement par les 86 isolats collectés.

2.2.2 Lignées isogéniques

Deux couples de lignées quasi-isogéniques fournis par l'Institut du Tabac de Bergerac, l'un de type Burley (BYBA "Va" / BYBA "va⁰") et l'autre de type Virginie (V4K3 "Va" / V4K3 "va²") ont été utilisés. Chacun de ces couples est composé d'une variété sensible à l'infection par le PVY (allèle "Va") et d'une variété résistante portant l'allèle 0 ou 2 du gène "va".

2.3 Méthodes

2.3.1 Pathotypage

Les isolats PVY ont été préalablement maintenus sur *Nicotiana tabacum* cv xanthi. Des feuilles infectées de ces plantes ont été broyées avec de l'azote liquide, réparties en trois fractions et stockées à -20°C. Deux de ces trois fractions ont été utilisées en tant que source d'inoculum lors des deux répétitions de la procédure de typage biologique. Ces fractions ont été reprises dans 4 ml d'un tampon d'inoculation [0.05M Na₂HPO₄ 12H₂O, 0.05M KH₂PO₄, 0.2% DIECA (pH 7.2)] ; 100µl de cette suspension ont été inoculés mécaniquement sur deux feuilles de chaque plante hôte préalablement saupoudrées avec du carborundum et du charbon actif. Chaque isolat a été inoculé mécaniquement à 2x4 plantes par génotype sensible (MN944) et résistant (VAM, WISLICA, PBD6) et placé en chambre climatique (16h jour à 20°C et 8h de nuit à 18°C). L'infection systémique a été contrôlée par ELISA sur les feuilles non inoculées 30 jours après l'inoculation.

2.3.2 Processus d'adaptation du PVY

Selon la même procédure décrite précédemment, le clone infectieux SON41, préalablement multiplié sur *Nicotiana tabacum* cv. xanthi, a été inoculé mécaniquement à 30 plantes par lignée sensible (Burley (BYBA "Va") et Virginie (V4K3 "Va")) et 130 plantes par lignée résistante (Burley (BYBA "va⁰") et Virginie (V4K3 "va²")). A l'issue de ce premier passage, les plantes infectées de chaque lignée résistante ont servi d'inoculum pour inoculer une deuxième série de plantes (5 et 30 plantes par lignée sensible et résistante respectivement). Pour chaque passage, l'infection systémique des plantes a été contrôlée par la technique ELISA 30 jours après l'inoculation. Cette expérimentation s'est déroulée en serre insect-proof à 20°C.

3. Résultats

3.1 Pathotypage

Selon les différentes combinaisons théoriques d'infection des génotypes de tabac résistants au PVY, huit pathotypes viraux peuvent être décrits (Tableau II). Le pathotype VA regroupe les isolats capables d'infecter uniquement le génotype sensible. Les pathotypes *va0-1-2*, *va0-2*, *va0-1*, *va1-2*, *va0*, *va1* et *va2* correspondent aux isolats ayant la capacité d'infecter, en complément du génotype sensible, un ou plusieurs génotypes porteurs d'un allèle du gène "va".

L'analyse de la virulence des 86 isolats PVY sur les quatre génotypes de tabac montre qu'ils se répartissent dans tous les pathotypes théoriquement définis (Tableau I).

Tableau II : Virulence des 86 isolats PVY sélectionnés

Pathotypes	Genotypes				Nb isolat
	MN944	VAM	WISLICA	PBD6	
	"va ⁰ "	"va ¹ "	"va ² "	"va ² "	
<i>va0-1-2</i>	+	+	+	+	52
<i>va1-2</i>	+	-	+	+	18
<i>va0-2</i>	+	+	-	+	1
<i>va0-1</i>	+	+	+	-	5
<i>va2</i>	+	-	-	+	1
<i>va1</i>	+	-	+	-	3
<i>va0</i>	+	+	-	-	4
VA	+	-	-	-	2

+ : présence du PVY détectée par ELISA dans au moins une plante ; - : absence de détection du PVY

Le pathotype *va0-1-2* est le plus représenté (N=52) parmi les isolats PVY tabac caractérisés. Il regroupe des isolats provenant en majorité du Nord de la France (N=37) ; seuls 15 sont originaire du Sud. Par ailleurs, 41 isolats de ce pathotype ont été prélevés sur des génotypes de tabac résistants au PVY.

Le pathotype *va1-2*, constitué de 18 isolats, est le second pathotype le plus représenté. La totalité des isolats de ce pathotype ont été prélevés dans le Sud. La quasi-totalité de ces isolats (N=17) a été collectée sur des génotypes sensibles au PVY.

Les six autres pathotypes (*va0-2*, *va0-1*, *va2*, *va1*, *va0*, VA) ne sont composés que de un à cinq isolats PVY.

La confrontation de ces données de pathotypage avec l'origine géographique et la plante hôte d'origine de chacun des isolats PVY étudiés, indique que dans la région Nord tous les isolats provenant de variétés résistantes appartiennent au pathotype *va0-1-2*. En revanche, dans le Sud les isolats collectés sur des variétés résistantes sont de pathotype *va0*, *va1-2* ou *va0-1-2*. Dans les cultivars sensibles, présents exclusivement dans le Sud, des représentants des huit pathotypes sont observés.

3.2 Adaptation du PVY aux différents allèles du gène *va*

A l'issue d'une première série d'inoculation avec le clone infectieux SON 41, 100% des plantes appartenant aux lignées sensibles ont été infectées. Aucune infection des plantes de la lignée résistante BYBA "va⁰" n'a été détectée. Seuls 11.5% (15/130) des plantes de la lignée résistante V4K3 "va²" ont été infectées. L'inoculation de chacune des populations virales

issues de ces 15 plantes sur une deuxième série de plantes de chaque lignée conduit à l'observation de trois profils d'infection (Figure 1).

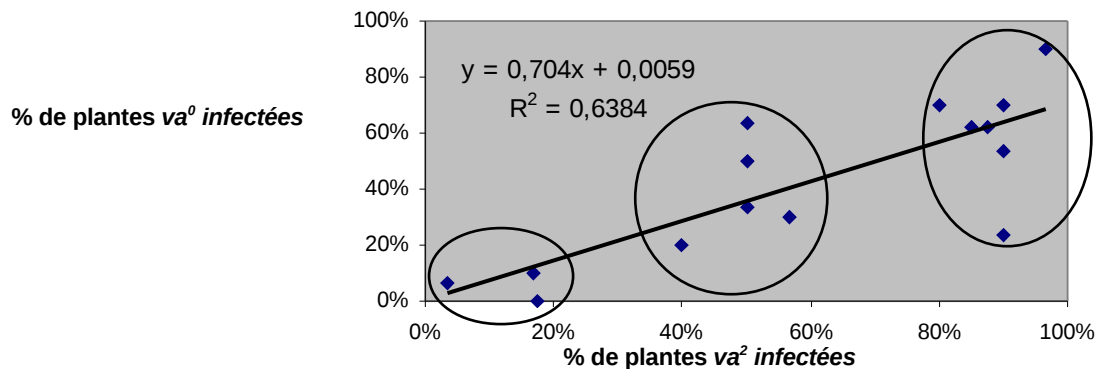


Figure 1 : Représentation graphique des pourcentages d'infections obtenus à l'issue de l'inoculation de 15 populations virales produites sur la lignée résistante au PVY (V4K3 "va²"). "va⁰/va²" : lignées BYBA "va⁰" / V4K3 "va²". Une droite de régression linéaire a été ajustée aux données et le coefficient de détermination (R²) calculé. Les cercles noirs illustrent les trois profils d'infection obtenus.

Le premier est associé à des pourcentages d'infections faibles et correspond à des populations ayant des propriétés biologiques proches de celles décrites pour le clone infectieux SON 41 (pourcentages d'infection des deux lignées inférieurs à 20%). Le deuxième groupe de points correspond à des populations ayant infecté entre 20 et 63% des plantes de la lignée BYBA "va⁰" et entre 40 et 56% de la lignée V4K3 "va²". Le troisième profil d'infection rassemble des populations ayant infecté entre 53 et 90% des plantes de la lignée BYBA "va⁰" et entre 80 et 96.7% des plantes de la lignée V4K3 "va²".

Sur la base des résultats obtenus, la comparaison des propriétés biologiques de SON 41 et des descendances virales obtenues après infection de V4K3 va² semble montrer qu'un premier passage sur la lignée résistante ("va²") permet au clone infectieux SON 41 d'infecter un plus grand nombre de plantes non seulement de la lignée portant l'allèle "va²" mais aussi de celle portant l'allèle "va⁰".

4. Conclusions - Perspectives

Les expérimentations que nous avons menées pour évaluer la virulence de 86 isolats PVY d'origine tabac montrent qu'ils se répartissent en huit pathotypes. Les deux tiers de ces isolats appartiennent au pathotype le plus virulent, va0-1-2. La prévalence du pathotype va0-1-2 pourrait en partie s'expliquer par le fait que la majorité des variétés de tabac cultivées en France possèdent l'allèle 0 ou l'allèle 2 du gène de résistance "va". Par conséquent, les données de pathotypage recueillies semblent suggérer que les populations virales de PVY se seraient adaptées aux pressions imposées par les hôtes auxquels elles sont confrontées. Afin de tester cette hypothèse et d'acquérir des connaissances sur la dynamique d'adaptation du PVY, nous avons reproduit en conditions contrôlées le processus d'adaptation du PVY au gène "va". Les données obtenues montrent qu'un seul passage sur la lignée portant l'allèle 2 du gène "va" suffit au clone infectieux SON41 pour évoluer vers des populations virales capables d'infecter efficacement les deux sources de résistance ("va⁰", "va²").

Notre prochain objectif est d'identifier les bases génétiques responsables de cette adaptation. Pour acquérir ces données, le génome complet des populations virales produites dans les plantes des lignées résistantes en première et seconde génération seront séquencés et comparés à celui du clone infectieux d'origine. Dès lors que la/les région(s) du génome viral impliquée(s) dans l'interaction avec le gène "va" sera identifiée expérimentalement, les régions

correspondantes des génomes des isolats de PVY collectés dans les différentes régions tabacoles de France seront séquencées.

La confrontation des différentes données concernant la virulence, les caractéristiques génomiques et la nature de l'hôte d'origine des isolats naturels de PVY tabac, nous permettront de déterminer l'impact respectif des différents allèles du gène « va » sur la structure des populations virales de PVY en culture de tabac. A terme, ces informations pourront être utilisées afin de gérer au sein du paysage agricole le déploiement des allèles du gène de résistance "va" afin de lutter plus efficacement contre le PVY et ses variants nécrotiques.

Références bibliographiques

- Ano G, Blancard D and Cailleteau B** (1995). Mise au point sur la résistance récessive aux souches nécrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) présente chez *Nicotiana tabacum*. *Annales du Tabac*. **27**: 35-42.
- Beczner L, Horvath J, Romhanyi I and Forster H** (1984). Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*. **27**: 339-352.
- Blancard D** (1998). *Maladies du tabac. Observer, identifier, lutter*. Paris: INRA Editions.
- Boonham N, Walsh K and Barker I** (1998) Towards the detection of PVY^{NTN}. Proceedings of the 10th European Association of Potato Research, Baden (Austria). Edited by Federal Office and Research Centre of Agriculture, Austria, pp69-70.
- Brunt A A** (1992). The General-Properties of Potyvirus. *Archives of Virology Supplementum 5* :3-16.
- Carstens H and Seehofer F** (1960). How Virginia SCR is obtained and cultivated in the Federal Republic of Germany. *Coresta*. **3**: 39-43.
- Chrzanowska M** (1991). New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) found recently in Poland. *Potato Research*. **34**: 179-182.
- Chrzanowska M** (1994). Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopatologica Polonica*. **8**: 15-20.
- Cockerham G** (1970). Genetical studies on resistance to potato virus X and Y. *Heredity*. **25**: 309-348.
- De Bokx J and Hunttinga H** (1981). *CMI/AAB Descriptions of Plant viruses*. No 242
- Endemann W** (1958). Observations concerning the occurrence of the brown-rib disease in the German Democratic republic. *Proceedings of the Second International Scientific congress*. pp. 111-114
- Glais L, Tribodet M and Kerlan C** (2002). Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY) : evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Archives of Virology* **147**: 363-378.
- Kerlan C** (2006). *CMI/AAB Descriptions of Plant viruses*. No 414.
- Koelle G** (1961). Genetische analyse einer Y-virus (Rippenbraune) resistenten mutante der tobaksorte Virgin A. *Der Zuchter*. **31**: 71-72.
- Le Romancer M, Kerlan C and Nedellec M** (1994). Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*. **43**: 138-144.
- Moury B, Morel C, Johansen E, Guilbaud L, Souche S, Ayme V, Caranta C, Palloix A and Jacquemond M** (2004). Mutations in Potato virus Y Genome-Linked Protein Determine Virulence Toward Recessive Resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **17**: 322-329.
- Noguchi S, Tajima T, Yamamoto Y, Ohno T and Kubo T** (1999). Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y (PVY). *Molecular & General Genetics*. **262**: 822-829.
- Revers F, Le Gall O, Candresse T, Le Romancer M and Dunez J** (1996). Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*; **77**: 1953-1965
- Shukla D, Ward C and Burnt A** (1994). *The Potyviridae*. Cambridge: Cambridge University Press.

Valkonen J (2007). Viruses: economical losses and biotechnological potential. In *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. pp. 619-641.