



HAL
open science

Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes

Kahsay Gebre Selassie, Georges Marchoux, Brigitte Delecolle, E. Pochard

► To cite this version:

Kahsay Gebre Selassie, Georges Marchoux, Brigitte Delecolle, E. Pochard. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. *Agronomie*, 1985, 5 (7), pp.621-630. 10.1051/agro:19850708 . hal-02726834

HAL Id: hal-02726834

<https://hal.inrae.fr/hal-02726834v1>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes

Kahsay GEBRE SELASSIE, Georges MARCHOUX, Brigitte DELECOLLE & Edmond POCHARD (*)

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale

() Station d'Amélioration des Plantes maraîchères, Centre de Recherches d'Avignon, F 84140 Montfavet*

RÉSUMÉ

Les populations du PVY existant en France méridionale présentent une importante variabilité. Il semble possible, grâce aux différents niveaux de résistance connus chez le piment, de classer les composants de la population de PVY de la région en 3 pathotypes hiérarchisés. Si les souches communes appartiennent au pathotype zéro PVY-0, le PVY-1 est virulent sur la variété de piment « Yolo Y », le PVY-1-2 est virulent sur les variétés « Yolo Y » et « Florida VR-2 ».

D'autre part, une étroite homologie des propriétés sérologiques relie toutes les souches de PVY éprouvées alors qu'il y a absence de parenté (ID SDS) ou parenté très éloignée (IEM) entre PVY et d'autres potyvirus des Solanacées (TEV, PeMV, PVMV).

L'étude de la multiplication du PVY par des méthodes biologique et sérologique (méthode ELISA avec l'immunsérum qui réagit avec les 3 pathotypes) indique que, chez les variétés résistantes, le virus reste localisé sans phénomène nécrotique dans les organes inoculés où sa multiplication semble insuffisante pour se généraliser.

Les populations de PVY récoltées sur piment, tomate et chez les hôtes spontanés (*Portulaca oleracea*, *Solanum nigrum*, *S. dulcamara* et *Senecio vulgaris*) appartiennent, dans leur grande majorité, au pathotype zéro, nécrotique sur les variétés « Bastidon » et « Doux des Landes ».

Cependant, un certain nombre d'isolats révèle aussi, notamment après un temps de multiplication prolongé sur les variétés résistantes, les pathotypes évolués 1 et 1-2. Ces derniers sont en revanche les plus nombreux dans plusieurs régions inter-tropicales.

Enfin, sont discutées les conséquences de l'important potentiel de variabilité du PVY sur les stratégies de création et d'utilisation des variétés résistantes.

Mots clés additionnels : Capsicum, diagnostic, résistance, hôtes.

SUMMARY

Variability of natural strains of potato virus Y infecting peppers in South-Eastern France. Characterization and classification into 3 pathotypes.

The potato virus Y (PVY) population existing naturally in South-Eastern France is rather complex. Based on the response of pepper genotypes with different levels of resistance, it was possible to classify the population into the following 3 pathotypes :

Pathotype-zero, (PVY-O) : strains infecting 'Bastidon' and related varieties.

Pathotype-1, (PVY-1) : strains infecting 'Bastidon', 'Yolo Y' and related varieties.

Pathotype-2, (PVY-1-2) : strains infecting the above varieties, 'Florida VR-2' and related varieties.

The different strains of the different pathotypes showed a very close serological relationship with the type strain To-72. However they either showed no relationship (ID-SDS) or were only distantly related (IEM) to other potyviruses, i.e. TEV, PeMV and PVMV.

Biological and serological (ELISA) studies on the multiplication of the different pathotypes in the different resistant varieties showed that the virus could not be detected beyond the inoculated organs. Virus multiplication was not sufficient to become systemic.

Populations collected over the last 6 years from peppers, tomatoes and weeds (*Solanum nigrum*, *S. dulcamara*, *Portulaca oleracea* and *Senecio vulgaris*) mainly belonged to the zero-pathotype and were severely necrotic on local varieties like 'Bastidon', 'Doux des Landes'. However, some isolates were a composite of one or more of the "evolved" pathotypes : i.e. : PVY-1 and PVY-1-2. The preexistence of such strain complexes was revealed only after repeated and successive inoculations to resistant pepper varieties, or after a long latency period in the same varieties. Evolved strains were relatively more dominant in tropical and semi-tropical countries than in our region.

The impact of these results on the strategy for creating resistant varieties is discussed.

Additional key words : Capsicum, variability, resistance, host.

I. INTRODUCTION

Il y a une quinzaine d'années, le virus Y de la pomme de terre (PVY) était encore inconnu dans les cultures de poivron en France méridionale. Les souches de PVY communes ou nécrotiques de la pomme de terre, inoculées artificiellement, se révélaient peu ou non pathogènes sur *Capsicum annuum* L. (MARCHOUX *et al.*, 1965).

C'est en 1972 que le PVY a fait une apparition brutale dans les cultures provençales (MARCHOUX *et al.*, 1974) après avoir été signalé en Italie du Sud (RAGOZZINO *et al.*, 1971 ; RANA *et al.*, 1971) puis au Piémont (CONTI *et al.*, 1972).

L'étude du PVY chez le piment a été entreprise sous différents aspects et des résultats préliminaires ont été publiés. Ils concernent la caractérisation biologique (GEBRE SELASSIE *et al.*, 1975), l'épidémiologie (MARCHOUX *et al.*, 1976) et la résistance variétale (MARCHOUX *et al.*, 1974, 1983 ; POCHARD, 1977).

Le présent travail concerne la caractérisation biologique et sérologique de quelques souches de PVY, leur distribution suivie pendant 8 ans, chez le piment et quelques espèces cultivées ou spontanées, enfin leur évolution après inoculations répétées chez plusieurs variétés de piment résistantes.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans les expériences comprenait diverses variétés de *C. annuum*, éprouvées comme résistantes ou sensibles au PVY, et divers hôtes différentiels appartenant aux espèces suivantes : *Datura stramonium* L., *D. metel* L., *Nicotiana tabacum* L. var. « Xanthi nc », *Solanum tuberosum* L. var. « Bintje », *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.

Pour le piment, nous avons fait appel aux variétés résistantes suivantes : Puerto-Rico Wonder, Porto-Rico (RIOLLANO *et al.*, 1948) ; P11 (PI 264 281), Floride (COOK & ANDERSON, 1959) ; Yolo Y, Floride (COOK, 1963) ; Avelar & Casca dura, Brésil (NAGAI & SMITH, 1968) ; LP1, Louisiane (BARRIOS *et al.*, 1971) ; Agronomico-8, Ikeda et Moura, Brésil (NAGAI & COSTA, 1971) ; Florida VR-2, Floride (COOK *et al.*, 1976) ; Serrano Vera Cruz, France (POCHARD, 1977) ; Anaheim F₆, Arizona (NELSON & WHEELER, 1981).

Les témoins sensibles utilisés ont été « Bastidon », « Doux des Landes », « Lamu », « Yolo Wonder » et l'hybride entre ces 2 dernières, « Lamuyo ». Toutes ces plantes après le repiquage en pots ont été cultivées dans un compartiment de serre « insect proof » dont la température varie entre 17 et 26 °C.

B. Souches de virus et méthode d'inoculation

1. *Les souches de références* étudiées sont :

- PVY⁰ : souche commune de pomme de terre.
- PVY^N : souche nécrotique de pomme de terre (qui provoque des nécroses sur tabac).

Ces souches proviennent de Landerneau (Bretagne) et nous ont été communiquées par la Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de terre.

- Pi-72 : isolée de piment en Provence.
- To-72 : isolée de tomate en Provence.
- SON-41 : isolée de *Solanum nigrum* L. également en Provence.
- « Israël-82 » : souche communiquée par le laboratoire de virologie de Bet Dagan.
- VR-2 : obtenue par repiquages successifs de la souche SON-41 sur la variété de piment « Florida VR-2 ».

Les différentes souches sont multipliées soit sur tabac var. « Xanthi nc », soit sur piment var. « Yolo Wonder » ; ces 2 hôtes permettent d'éviter les contaminations par le virus de la mosaïque du tabac.

Les tissus foliaires, infectés depuis 12 à 14 j, sont finement découpés, homogénéisés et desséchés sur un lit de chlorure de calcium à 4 °C et constituent des inoculums.

1 g de feuilles est broyé dans 4 ml de phosphate disodique 0,03 M contenant 2 p. 1 000 de diéthyl-dithiocarbamate de sodium (DIECA).

L'inoculation est effectuée en présence de carborundum et de charbon végétal activé (75 mg/ml) soit sur les cotylédons de plantules au stade 1^{re} feuille, soit sur les 2 plus jeunes feuilles étalées des plantes au stade 5-6 feuilles.

2. *Les isolats naturels* provenant de différentes variétés de piment, de tomate, de *Solanum nigrum* L., *S. dulcamara* L., *Portulaca oleracea* L. et *Senecio vulgaris* L. sont comparés aux souches de référence après une première multiplication sur tabac « Xanthi nc ».

C. Méthode de purification du PVY

La souche To-72 a été purifiée à partir de tabacs « Xanthi nc » inoculés depuis 14 j. Après des essais comparatifs, nous avons opté pour une méthode combinant celle de DAMIRDAGH & SHEPHERD (1970) avec les apports techniques proposés par HIEBERT (comm. pers.) et LOT (comm. pers.). Environ 200 g de feuilles sont homogénéisés dans 500 ml d'une solution 0,3 M de citrate trisodique renfermant 0,3 p. 100 de 2 mercaptoéthanol (pH 7,8). Après filtration sur étamine, 8,5 p. 100 de n-butanol sont ajoutés et agités lentement à 4 °C pendant la nuit. Le surnageant de centrifugation (10 mn à 9 400 g) est filtré sur coton de verre. Le virus sédimenté à 47 000 g pendant 2 h 30, est repris dans un tampon citrate-phosphate (T.C.P.) 0,02 M pH 8, puis clarifié par centrifugation à 4 000 g.

Le surnageant additionné de chlorure de césium (360 mg/ml) est ultracentrifugé à 110 000 g pendant 16 h à 20 °C. Les bandes de virus sont reprises dans le T.C.P. et ultracentrifugées à nouveau pendant 2 h à 110 000 g. Les culots finaux sont repris dans le T.C.P.

Cette méthode relativement simple permet d'obtenir une préparation très pure de virions entiers et stables à 4 °C. Le rendement est voisin de 25 mg par kg de feuilles.

D. Sérologie

1. Préparation d'un sérum anti-PVY souche To-72

Un lapin a été immunisé par 7 injections intramusculaires espacées d'une semaine avec 0,5 ml de la suspension de virus à 1 mg/ml additionnée (V/V) d'adjuvant incomplet de FREUND.

2. Autres antisérums de PVY et de Potyvirus proches

— Anti-PVY⁰ (MAURY, I.N.R.A. - Versailles - France).

— Anti-PVY-« A 85 I » (LUISONI, I.F.A. - Turin - Italie).

— Anti-PVY-Epé et « To 1 » (LEISER, Institut d'Aschersleben - Allemagne de l'Est).

— Anti-PeMV : Pepper Mottle Virus (NELSON, Un. Arizona - U.S.A.).

— Anti-PVMV : Pepper Veinal Mottle Virus (BRUNT, G.C.R. - Ghana ; THOUVENEL, ORSTOM - Côte-d'Ivoire).

3. Antigènes témoins

Les antigènes homologues ont été reçus des auteurs précédents en même temps que les immunosérums à l'exception du PeMV que nous n'avons pu nous procurer. En revanche, nous avons éprouvé le Tobacco Etch Virus (TEV) comme antigène, bien que nous ne disposions pas de l'immunosérum homologue.

4. Tests sérologiques

Trois méthodes ont été utilisées :

a) Double immuno-diffusion (ID-SDS)

La réaction est réalisée en milieu gélosé (0,8 p. 100) en présence de 0,5 p. 100 de dodécylsulfate de sodium (SDS) et azoture de sodium à 1 p. 100 selon la méthode de GOODING (1975), PURCIFULL & BACHELOR (1977).

b) Test immunoenzymatique (ELISA)

La purification des gamma-globulines des sérums anti-PVY-To-72 et anti-PVY⁰ et leur conjugaison avec la phosphatase alcaline sont réalisées selon la méthode de CLARK & ADAMS (1977).

Les IgG sont appliquées à la concentration de 0,7 µg/ml et les IgG conjuguées à l'enzyme sont utilisées à 10⁻³ mg/ml.

La réaction s'effectue sur plaques de microtitration Dynatech M-29-A. La lecture des résultats est réalisée à l'aide d'un photomètre « Titertek multiskan » après 90 mn de réaction.

c) Immunoelectromicroscopie (IEM)

La méthode de DERRICK (1973), qui permet une répartition homogène des particules virales sur la préparation, est utilisée en combinaison avec la méthode de la décoration (ROBERTS, comm. pers.). De cette façon, on évite la formation d'agrégats ou « clumping » des particules virales et on obtient une meilleure appréciation de la réaction sérologique. Par cette méthode, il est possible d'utiliser des antisérums dilués

au 1/2 et d'étudier leur limite de dilution qui permet de préciser le degré de parenté pouvant exister entre souches de virus.

— Méthode de DERRICK (1973)

Les grilles sont sensibilisées par les antisérums utilisés à une dilution proche de leur titre : 1/2 000 pour l'antisérum PVY et 1/1 000 pour l'antisérum PVMV. Le captage des particules virales sur les grilles sensibilisées s'effectue pendant 2 à 3 h à 20 °C.

— Méthode de la décoration

Les particules virales, captées sur les grilles sensibilisées, sont décorées par dépôt sur une goutte de sérum à des dilutions allant du 1/2 à 1/2 000. La réaction s'effectue à 37 °C pendant 30 mn. Elle est observée au microscope électronique après coloration au molybdate d'ammonium à 1 p. 100, pH 7,0.

III. RÉSULTATS

A. Propriétés biologiques des souches de PVY

1. Réactions sur une gamme d'hôtes différentiels

Le tableau 1 résume les réactions différentielles qui permettent chez une gamme restreinte d'hôtes de distinguer le PVY des autres potyvirus : PVMV, PeMV et TEV. On relèvera notamment qu'aucune de nos souches de PVY (seulement 4 sont présentées, mais les résultats peuvent être étendus à l'ensemble) n'induit sur *Capsicum frutescens* L. var. « Tabasco » des symptômes de nécrose (N) ou de flétrissement (F) caractéristiques du PeMV et du TEV.

Les souches de PVY-Piment se distinguent aussi du PVMV par le fait qu'elles produisent des lésions locales (LL) suivies de nécrose (N) chez *C. annuum* var. « Anaheim F₆ ». De plus, et contrairement au PVMV, les souches de PVY induisent des symptômes de mosaïque (M) et (ou) de nécrose nerveaire (N) sur le tabac « Xanthi nc ». Pour la séparation éventuelle de ces virus en complexe, on voit que *Datura metel* permet d'éliminer le PeMV et que *D. stramonium* n'est infecté que par le TEV.

Notons enfin qu'outre *Chenopodium amaranticolor*, *C. annuum* var. « Anaheim F₆ » qui produit des lésions locales, permet le clonage des souches de PVY-Piment (fig. 1A, B).

Soulignons aussi que toutes les souches de PVY ne provenant pas de la pomme de terre ne sont pas pathogènes sur cette plante. Elles ne s'y multiplient pas comme le montrent les résultats négatifs des tests sérologiques ELISA réalisés sur les plantes inoculées et les rétro-inoculations sur tabac ou piment.

2. Propriétés pathogènes sur différentes variétés de piment

Les souches de PVY ont été inoculées aux différentes variétés de piment, certaines sensibles, d'autres considérées comme résistantes (Cf. Matériel et méthodes).

TABLEAU 1

Réactions différentielles des souches de PVY et des autres potyvirus du piment chez 6 plantes indicatrices.
Reactions of 6 selected indicator plants used to differentiate PVY strains and other potyviruses infections on peppers.

	PVY ^O	PVY ^N	To-72	Pi-72	PVMV ^(a)	PeMV ^(b)	TEV ^(b)	Plantes-filtres
<i>Capsicum annuum</i> var. « Anaheim F6 »	—	—	LL/N	LL/N	m	m	MN	
<i>C. frutescens</i> var. « Tabasco »	—	—	M	M	M	LL/M,N,+	F+	
<i>Datura stramonium</i>	—	—	—	—	—	—	M	Tous sauf TEV PeMV
<i>Datura metel</i>	M	M	M	M	M	—	M	
<i>N. tabacum</i> var. « Xanthi » n.c.	M	MN	M	MN	(m)	M	M	
<i>Solanum tuberosum</i> var. « Bintje »	M	M	—	—	—	—	—	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	

Symboles : — = pas de réaction
LL = lésions locales nécrotiques
N = nécroses nervaires qui se généralisent
m = marbrure
M = mosaïque
F = flétrissement
+ = mort
() = aléatoire

Symbols : — = no reaction
LL = local lesions
N = vein necrotic systemic reaction
m = mottle
M = mosaic
F = wilt
+ = dead
() = variable.

(a) : d'après BRUNT *et al.* (1978) ; (b) : d'après NELSON & WHEELER (1978).



Figure 1

A - Lésions locales chlorotiques sur feuille de *Chenopodium amaranticolor* inoculée avec le PVY souche To-72.

Chlorotic local lesions on *C. amaranticolor* leaf infected with PVY - To-72 strain.

B - Lésions locales nécrotiques sur feuille de *Capsicum annuum* var. « Anaheim F₆ » infectée par la souche To-72 de PVY.

Necrotic local lesions on *C. annuum* var. "Anaheim F₆" leaf infected with PVY - To-72 strain.

TABLEAU 2

Réactions des souches de PVY sur *Solanum tuberosum* et sur les variétés différentielles de *Capsicum* : caractérisation des pathotypes.
 Reactions of PVY strains on *Solanum tuberosum* and selected pepper varieties : characterization of pathotypes.

Hôtes différentiels	Souches		To-72	SON-41	Pi-72	Israel-82	VR-2	N 17-E
	Groupe	PVY ^O PVY ^N						
<i>Solanum tuberosum</i>								
var. Bintje		M	R	R	R	R	R	R
<i>Capsicum annuum</i>								
var. Anaheim F6	1a	R	LL	LL	LL	LL	LL	M
Bastidon	1a	R	NM	NM	NM	M	NM	M
Yolo Wonder	1b	R	N	N	M	M	N	M
Yolo Y	2	R	M	M	M	M	M	M
Florida VR-2	3	R	R	R	R	R	M	M
Serrano V.C.	4	R	R	R	R	R	R	R
Pathotypes			PVY-0	PVY-1			PVY-1-2	

Symboles : LL : lésions locales

N : nécroses nervaires qui se généralisent

M : mosaïque en liséré le long des nervures de 10 à 15 j après l'inoculation

R : résistant.

Symbols : LL : local lesions

N : systemic vein necrosis

M : vein banding - 10 to 15 days after inoculation

R : resistant.

Les résultats obtenus et donnés dans le tableau 2 permettent de distinguer 4 groupes de comportement :

Groupe 1

variété type « Bastidon » et comprenant « Doux des Landes », « Lamu », « Lamuyo », « Anaheim F₆ », constituent le sous-groupe 1a.

La variété « Yolo-Wonder » qui se distingue des précédentes uniquement par l'absence de nécrose, représente le sous-groupe 1b.

Groupe 2

variété type « Yolo Y » comprenant « Puerto Rico Wonder », « Doux d'Alger », « Avelar », « Casca Dura », « Ikeda », « Moura ».

Groupe 3

variété type « Florida VR-2 » « LP1 », « Agronomico-8 », « P11 ».

Groupe 4

variété type « Serrano Vera-Cruz » (*Serrano-V.C.*).

Ceci conduit à distinguer plusieurs pathotypes de PVY (tabl. 2) :

a) *Pathotype zéro* = PVY-0 : souches PVY^O, PVY^N, To-72

Les souches appartenant à ce pathotype n'attaquent aucune variété résistante. Parmi elles, les souches « pomme de terre » se distinguent par le fait qu'elles ne sont pas non plus pathogènes sur les variétés sensibles et la variété hypersensible « Anaheim F₆ » (tabl. 1). En revanche, la souche To-72 induit des symptômes chez ces variétés : on observe chez « Bastidon », une nécrose nerveuse qui s'étend aux pétioles et aux tiges. Il y a chute des feuilles surtout aux extrémi-

tés apicales et mort de la plante d'autant plus rapide que celle-ci est plus jeune.

La variété « Yolo Wonder » réagit par un symptôme d'éclaircissement des nervures suivi d'une mosaïque verte également nerveuse.

Les extraits préparés à partir des jeunes feuilles des plantes sans symptôme ont tous donné des résultats négatifs en ELISA.

b) *Pathotype 1* = PVY-1 : souches SON-41, Pi-72, Israël-82

Contrairement au pathotype 0, les souches appartenant au pathotype 1 attaquent la variété « Yolo Y » et toutes celles du Groupe 2. Les symptômes sont comparables à ceux obtenus sur la variété sensible « Yolo-Wonder », c'est-à-dire un éclaircissement suivi d'une mosaïque vert foncé, le long des nervures. Parmi les souches de pathotype 1, on distingue, d'une part, « Pi-72 » et « Israël-82 » qui induisent chez la variété « Bastidon » un symptôme de mosaïque comparable à celui observé sur les variétés précédentes et, d'autre part, la souche SON-41 qui, elle, est nécrogène sur cette même variété.

Les variétés des groupes 3 et 4 ne présentent pas de symptômes. Les contrôles sérologiques par ELISA sont négatifs et confirment que les souches de pathotype 1 ne sont pas pathogènes chez ces variétés.

c) *Pathotype 1-2* = PVY-1-2 : souche VR-2

Cette souche se classe dans le pathotype 1-2 car non seulement elle infecte la var. « Yolo Y » mais aussi la var. « Florida VR-2 ». Chez toutes les plantes sensibles, les symptômes sont plus tardifs et moins forts que dans les cas précédents. D'autre part, la souche VR-2 est nécrogène sur la var. « Bastidon ». Souli-

gnons l'absence de symptôme sur la var. « Serrano V.C. » qui est donc résistante à toutes les souches étudiées. Les tests ELISA donnent des résultats négatifs sur les plantes inoculées de cette variété.

B. Propriétés sérologiques des souches de PVY

1. Méthode de double immuno-diffusion-ID (SDS)

Cette méthode a été utilisée pour étudier, d'une part la parenté sérologique entre les 4 potyvirus et, d'autre part, l'existence de sérotypes différents parmi les souches de référence du PVY.

Les résultats condensés dans les figures 2a, b, c, d, montrent, dans nos conditions, une absence de parenté étroite entre PVY, PVMV, TEV (seulement l'antigène), PeMV (seulement l'anti-sérum).

Nous constatons aussi que les arcs de précipités obtenus avec les différentes souches de PVY vis-à-vis de l'antisérum PVY To-72 se raccordent sans former d'éperons. Il en est de même avec les autres anti-sérum du PVY.

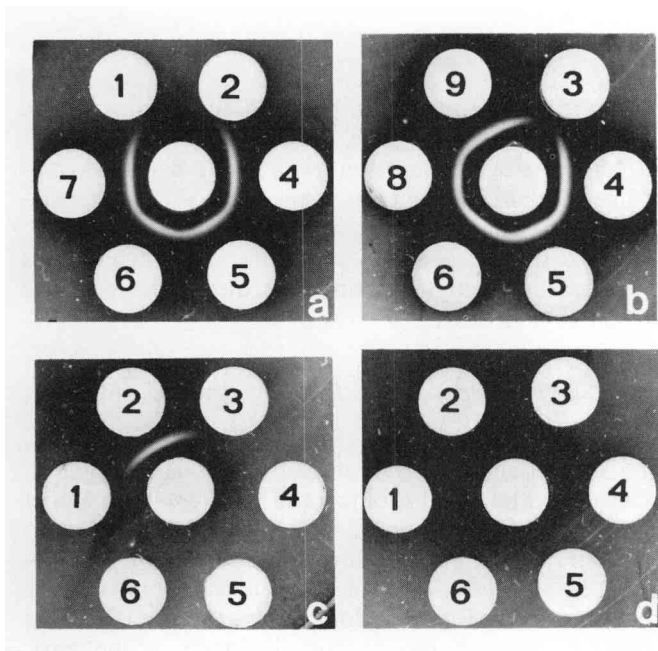


Figure 2

Réactions sérologiques en immunodiffusion SDS

Immunsérums bruts déposés dans les puits centraux :
a et b : anti-PVY To-72 ; c : anti-PVMV ; d : anti-PeMV.

Antigènes dilués 1/2 déposés dans les puits périphériques :

1 : tabac sain

2 : PVMV de piment

3 : TEV de piment

4 à 9 : tabac infecté avec les souches respectives de PVY : To-72 ; SON 41 ; Y⁰ ; Pi-72 ; VR-2 et Israël-82.

Results of immunodiffusion SDS tests

The center wells were loaded with undiluted PVY-antiserum (a, b), PVMV-antiserum (c), and PeMV-antiserum (d).

The peripheral wells were loaded with extracts diluted 1/2 from :

(1) healthy tobacco

(2) pepper infected with PVMV

(3) tobacco infected with TEV and

(4-9) tobacco infected with PVY strains - i.e. : To-72, SON-41, Yo, Pi-72, VR-2 and Israel-82 respectively.

Ces résultats indiquent que ces souches bien différentes par leurs propriétés pathogènes, ne peuvent être distinguées par la méthode ID (SDS).

Cette méthode est en revanche appropriée pour distinguer les différents potyvirus des Solanacées dans un nombre limité d'échantillons.

2. Méthode ELISA

L'utilisation des conjugués PVY To-72 et PVY⁰ a permis, dans nos conditions, de détecter toutes les souches de PVY de références homologues et hétérologues.

Cette technique est donc bien adaptée pour les tests en grand nombre d'une étude épidémiologique. Nous avons en effet vérifié que les résultats sont reproductibles quelle que soit l'origine des extraits préparés à partir de tissu frais ou même après conservation des tissus infectés sur chlorure de calcium.

Dans le cas du piment, nous avons établi que les extraits dilués au 1/50 ou 1/100 produisaient une valeur de densité optique significativement supérieure aux extraits bruts.

L'étude réciproque préliminaire a montré que les souches PVY⁰ et To-72 ne pouvaient pas être différenciées par la méthode ELISA directe.

Figure 3

Micrographies des « réactions » d'immuno-électromicroscopie.
Micrographs of Immuno-Electron Microscopy Serological test.

1 à 6 : Réactions de l'antigène PVY souche To-72.

Reactions of PVY To-72 strain antigens with different antisera.

1 à 4 : Immunsérum PVY souche To-72 à différentes dilutions, respectivement : 1/2048 (limite de décoration) ; 1/2 ; 1/16 ; 1/64.

5 : Immunsérum PVMV dilué au 1/2.

6 : Immunsérum PeMV dilué au 1/2.

7 à 15 : Réactions de l'antigène PVMV.

Reactions of PVMV antigens with different antisera.

7 à 10 : Immunsérum PVMV à différentes dilutions, respectivement : 1/1024 (limite de décoration) ; 1/4 ; 1/16 ; 1/64.

11 et 12 : Immunsérum PVY aux dilutions 1/2 et 1/4 respectivement.

13 à 15 : Immunsérum PMV aux dilutions respectives de 1/2 ; 1/4 ; 1/8.

16 à 19 : Réactions de l'antigène TEV avec des immunsérums hétérologues.

Reactions of TEV antigens with different antisera.

16 et 17 : Immunsérum PVY dilué au 1/2 et 1/4 respectivement.

18 : Immunsérum PVMV dilué au 1/2.

19 : Immunsérum PMV dilué au 1/2.

20 à 24 : Réactions de l'antigène PVY souche « Israël-82 ».

Reactions of PVY-Israel strain antigens with different antisera.

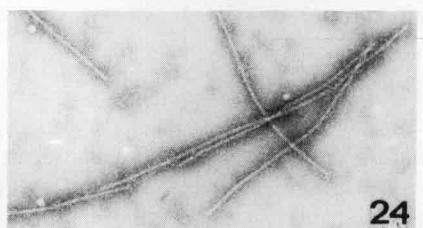
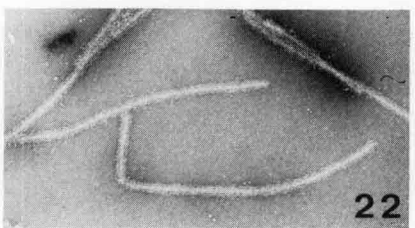
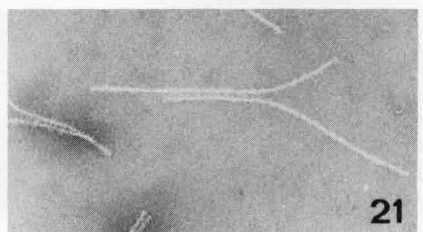
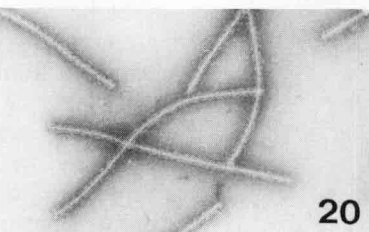
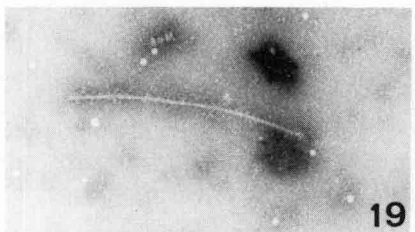
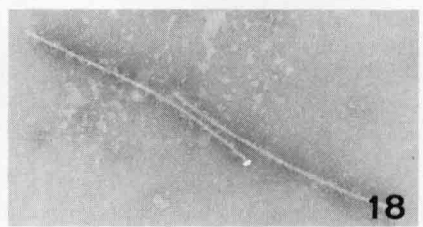
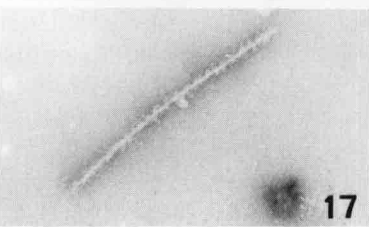
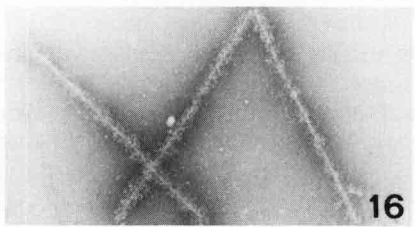
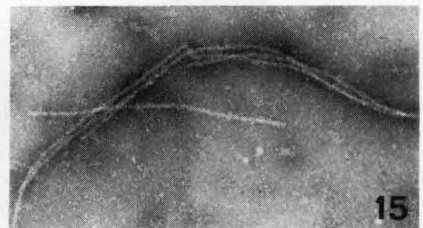
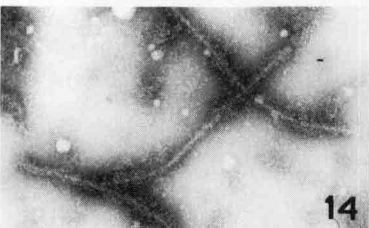
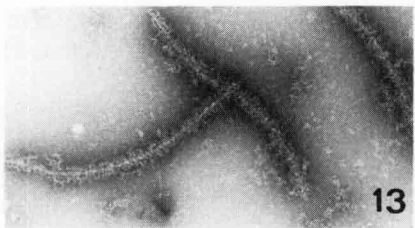
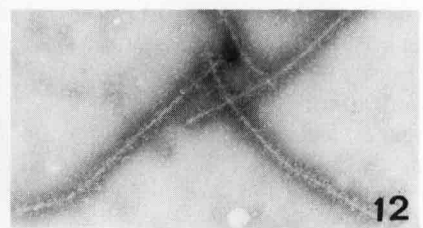
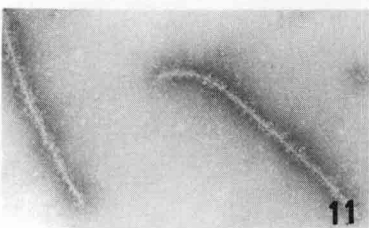
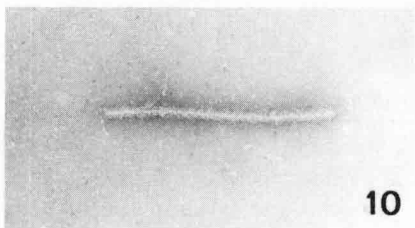
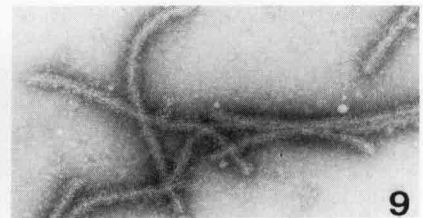
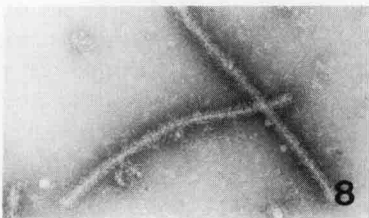
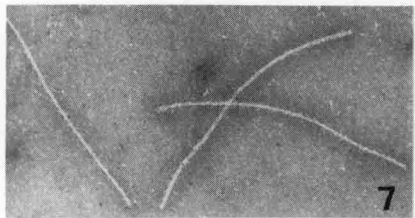
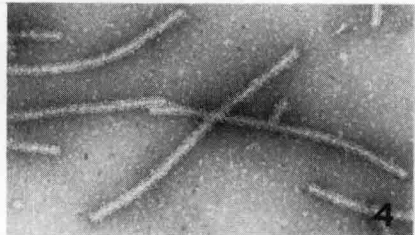
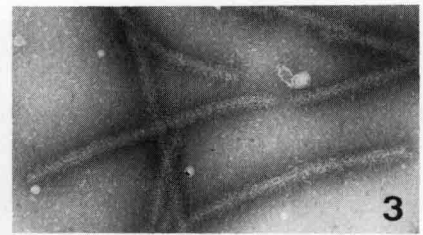
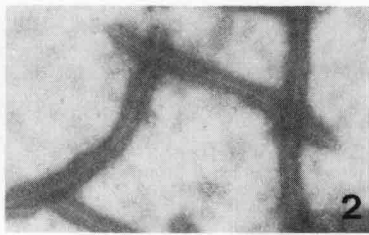
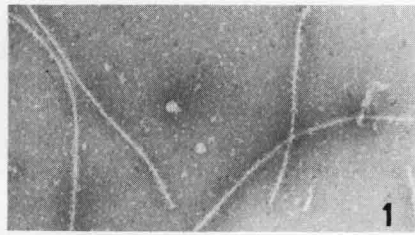
20 à 22 : Immunsérum PVY souche To-72 dilué respectivement au 1/256 ; 1024 (limite de décoration) ; 1/64.

23 : Immunsérum PVMV dilué au 1/2.

24 : Immunsérum PMV dilué au 1/2.

Grossissement : 44 000 (échelle 22 mm : 0,5 µm).

Magnification : 44 000 (scale 22 mm : 0.5 µm).



3. Méthode IEM

a) Souche PVY To-72

Les particules virales réagissent avec leur propre antisérum, dilué du 1/2 jusqu'au 1/2 048, où l'on observe encore un léger résidu de décoration (fig. 3 : 1) qui disparaît pour la dilution 1/4 096. Le manchon d'anticorps qui entoure les particules virales est d'autant plus important que le sérum est plus concentré (fig. 3 : 2, 3, 4).

Avec l'antisérum PVMV, on n'obtient qu'une très légère décoration à la dilution 1/2 (fig. 3 : 5). A la dilution de sérum de 1/16, les particules sont lisses.

Avec l'antisérum PeMV dilué au 1/2, la réaction est douteuse (fig. 3 : 6) ; elle est nulle pour la dilution 1/8.

b) Souche PVMV

Elle réagit avec son propre antisérum dilué au 1/1 024 (fig. 3 : 7). Comme dans le cas précédent, le manchon d'anticorps qui entoure le virus, très épais quand le sérum est peu dilué (par exemple 1/4), diminue d'épaisseur à mesure que les dilutions augmentent (fig. 3 : 8, 9, 10).

Avec l'antisérum PVY on observe une réaction très nette pour des dilutions de sérum 1/2, 1/4 (fig. 3 : 11, 12). Pour une dilution 1/8, il n'y a plus qu'un résidu de décoration.

Il en est de même avec l'antisérum PeMV où une réaction assez forte est observée pour la dilution 1/2 ; pour la dilution 1/4, la réaction est déjà moins nette ; elle est quasiment nulle pour la dilution 1/8 (fig. 3 : 13, 14, 15).

c) Souche TEV

On n'a pu l'éprouver que contre les antisérums PVY, PVMV et PeMV.

Elle réagit de façon certaine avec l'antisérum PVY dilué au 1/2 ; pour la dilution 1/4 il y a encore un résidu de décoration qui disparaît pour la dilution 1/16 (fig. 3 : 16, 17).

Cette souche ne réagit quasiment pas avec les antisérums PVMV et PeMV aux dilutions 1/2 (fig. 3 : 18, 19).

d) Souche PVY Israël-82

Elle présente les mêmes caractéristiques que l'isolat PVY To-72. Elle réagit fortement avec l'antisérum PVY jusqu'à une dilution 1/256, mais la limite de décoration apparaît pour la dilution 1/1 024 au lieu de 1/4 096 pour l'isolat PVY To-72 (fig. 3 : 20, 21, 22).

Cet isolat « Israël » présente également une légère réaction avec l'antisérum PVMV dilué 1/2 (fig. 3 : 23).

Avec l'antisérum PeMV dilué 1/2 on n'a qu'une réaction douteuse (fig. 3 : 24).

C. Récolte et analyse des isolats naturels

Chaque année depuis 1974, environ 100 prélèvements de feuilles sont effectués, d'une part, dans les cultures de poivron et de tomate, d'autre part, sur les

espèces spontanées reconnues comme réservoirs : *Portulaca oleracea*, *Solanum nigrum* et *S. dulcamara*. Ces prélèvements sont examinés pour la présence et l'absence de PVY.

Sur environ 800 prélèvements, 257 se sont révélés positifs. Chez le piment, ils correspondent dans 80 p. 100 des cas, à des plantes présentant des symptômes. En revanche, la tomate et les plantes spontanées peuvent être infectées de façon naturelle, sans présenter de symptômes très visibles.

Un nouvel hôte, *Senecio vulgaris* L. a été mis en évidence. Il ne présente pas non plus de symptôme.

1. Analyse des propriétés pathogènes des isolats

Quelles que soient leur origine et l'époque du prélèvement, tous les isolats induisent les symptômes caractéristiques du PVY (tabl. 1). Sur la gamme différentielle des variétés de piment, les réactions sont caractéristiques du pathotype 0.

Les symptômes sont notés entre 2 et 3 semaines après l'inoculation. A cette date, les plants des variétés résistantes ne présentent pas de symptôme. Mais si on en prolonge l'incubation au-delà de 4 et jusqu'à 7 semaines, apparaissent alors, dans environ 25 p. 100 des cas, des symptômes caractéristiques du pathotype 1.

2. Propriétés sérologiques

Les 257 isolats ont donné, même dilués au 1/2 000, des résultats sérologiques positifs en ELISA. Quoique moins sensible, la technique en immunodiffusion a conduit également à des résultats positifs ; de plus, il y a raccordement des arcs de précipités, sans éperon, entre les divers isolats et les souches de référence placées dans des puits voisins.

D. Essais de modification des propriétés pathogènes des souches de PVY

Nous avons vu que, dans près de 25 p. 100 des cas, les populations naturelles se révèlent hétérogènes dès la 1^{re} inoculation sur les variétés possédant différents niveaux de résistance.

On peut cependant se demander si cette hétérogénéité tardive ne résulte pas d'une sélection, par l'hôte, d'une sous-population appartenant aux pathotypes évolués, apparue à la faveur de la pression de sélection exercée par l'hôte résistant.

Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en effectuant des repiquages successifs de souches apparemment homogènes, appartenant au pathotype 0, sur des plants de piment.

Les souches PVY⁰ et PVY^N provenant de pomme de terre, qui ne sont pas pathogènes sur piment, conservent cette propriété, même après des repiquages nombreux à partir de feuilles inoculées et des temps d'inoculation prolongés.

Par contre, une souche « piment », rétro-inoculée à partir de feuilles inoculées depuis 8 j ou de feuilles contaminées prélevées sur des plantes inoculées depuis 30 j, révèle l'existence de sous-populations de pathotype 1 ou 1-2 selon que la variété résistante utilisée est « Yolo Y » ou « Florida VR-2 » (GEBRE SELASSIE *et al.*, 1983).

Ces résultats indiquent que les populations naturelles de PVY renferment fréquemment une ou plusieurs sous-populations dont la présence ne peut être révélée qu'après plusieurs passages sur des variétés de piment dont les niveaux de résistance sont différents.

IV. DISCUSSION

Plusieurs souches de PVY provenant de piment, tomate, *Solanum nigrum* et *Portulaca oleracea* ont été comparées par leur réaction sur une gamme d'hôtes différentiels. Les symptômes produits par les différentes souches sont comparables sur *Capsicum annuum* var. « Anaheim F₆ », *C. frutescens* var. « Tabasco », *Datura stramonium*, *D. metel*, *Nicotiana tabacum* var. « Xanthi » et *Chenopodium amaranticolor* et permettent de les différencier des autres potyvirus des Solanacées : PeMV, PVMV et PEV (tabl. 1). Les souches pomme de terre se distinguent nettement des autres car elles sont les seules à être pathogènes sur cette espèce (var. « Bintje ») et non pathogènes sur le piment.

Le comportement des autres souches sur une gamme de variétés de piment porteuses de gènes différents de résistance révèle par contre une variabilité importante.

Ces résultats indiquent une différence nette entre les 2 groupes de souches en ce qui concerne leur gamme d'hôtes. Il semble donc peu probable que les populations de PVY qui ont envahi les cultures de piment à partir de 1972 proviennent de cultures de pomme de terre contaminées.

Les diverses souches de PVY, autres que celles de la pomme de terre, peuvent être classées en 3 pathotypes de virulence croissante sur le piment : PVY-0, PVY-1 et PVY-1-2. Le 2^e attaque les variétés du groupe « Yolo Y » ; le 3^e, les variétés du groupe « Florida VR-2 » résistantes à PVY-1.

L'analyse de 257 isolats positifs récoltés dans la basse vallée du Rhône montre que les populations de pathotype 0 sont largement dominantes par rapport aux populations de pathotype 1. Le pathotype 1-2 est très rare.

Une situation analogue mais plus ancienne est connue sur le continent américain où des souches équivalentes à notre pathotype 1 ont été décrites en Floride (COOK, 1963), puis à Porto-Rico, en Californie (NAGAI & SMITH, 1968) au Brésil (NAGAI & COSTA, 1971) aux Antilles françaises (MARCHOUX *et al.*, 1978). La souche « Israël 82 » étudiée ici appartient à ce pathotype (SHIFRISS & MARCO, 1980). Les souches que l'on peut classer dans le pathotype 1-2 sont apparues plus récemment aux Etats-Unis (SMITH, 1974) et au Brésil (NAGAI, 1983).

La mise en évidence de la variabilité du PVY et l'évolution probable des pathotypes influencent la stratégie de création variétale chez le piment. La connaissance de l'importance respective des pathotypes dans une région devrait intervenir dans la stratégie d'utilisation des variétés résistantes. Ainsi, compte tenu des résultats présentés ici, il n'est pas nécessaire de cultiver des variétés comportant le niveau le plus élevé de résistance. Cette pratique est même dangereuse car elle peut accélérer, par effet sélectif, la multiplication des populations de pathotypes évolués.

Le fait de disposer de pathotypes de PVY attaquant spécifiquement les plantes porteuses de gènes ou allèles particuliers permet, en association avec la technique d'haploïdie, d'aborder l'étude des mécanismes héréditaires de la résistance du piment au PVY et aux virus apparentés (travaux en cours).

L'étude en immunoélectromicroscopie montre que les souches de PVY isolées sont très proches les unes des autres, même celle en provenance d'Israël, et distinctes des autres potyvirus bien qu'il existe une très légère parenté sérologique entre le PVY, le PVMV et le TEV, tout comme d'ailleurs entre le PVMV et le PeMV.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par PURCIFULL & BATCHELOR (1977) en Immunodiffusion-SDS. Ces auteurs ont observé des réactions positives légères qui ont été notées avec certains sérums mais pas avec d'autres dans les combinaisons hétérologues suivantes : immunsérum PVY vis-à-vis du PeMV, immunsérum PeMV vis-à-vis du PVY et du PVMV, immunsérum TEV vis-à-vis du PeMV. En revanche, jusqu'à maintenant, aucune parenté n'avait été décelée entre ces potyvirus par la technique d'immunoélectromicroscopie (HOLLINGS & BRUNT, 1981 ; NELSON *et al.*, 1982).

Au niveau du PVY, plusieurs auteurs utilisant différents groupes de souches de pomme de terre ne sont pas parvenus à les séparer en sérologie (DE BOKX & HUTTINGA, 1981). Concernant les souches isolées sur différents hôtes dans notre région, nous avons également montré par les 2 méthodes qu'elles appartiennent au même sérotype. Seule, la souche N17 obtenue dès 1974 à partir de *P. oleracea* réagit faiblement vis-à-vis de l'immunsérum PVY To-72. L'étude de ses propriétés pathogènes (POCHARD *et al.*, 1983) et sérologiques est en cours.

L'étude plus approfondie des souches de PVY d'origines géographique et botanique diverses pourrait révéler d'autres différences notamment au niveau physicochimique. Ainsi l'étude de la migration électrophorétique des souches de PVY a révélé l'existence d'une souche particulière avec 2 composants nucléoprotéiques dont l'un migrerait plus loin en direction de l'anode (MAKKOUK & GUMPF, 1976).

Reçu le 12 juin 1984.
Accepté le 12 mars 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barrios E. P., Mosokar H. T., Black L. L.**, 1971. Inheritance of resistance to tobacco etch and cucumber mosaic viruses in *Capsicum frutescens*. *Phytopathology*, **61**, 1318.
- Bokx de J. A., Huttinga H.**, 1981. Potato virus Y. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*, n° 242.
- Brunt A. A., Kenten R. H., Sue Phillips**, 1978. Symptomatically distinct strains of Pepper Veinal Mottle Virus from four West African solanaceous crops. *Ann. Appl. Biol.*, **88**, 115-119.
- Clark M. F., Adams A. N.**, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**, 475-438.
- Conti M., Lisa V., Boccardo G.**, 1972. Preliminary results on pepper virus diseases in Piemonte and Umbria. *Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. degli Stud., Torino*, **7**, 290-301.
- Cook A. A.**, 1963. Genetics of response in pepper to three strains of potato virus Y. *Phytopathology*, **53**, 720-722.
- Cook A. A., Anderson C. W.**, 1959. Multiple virus disease resistance in a strain of *Capsicum annum*. *Phytopathology*, **49**, 198-201.
- Cook A. A., Osaki H. Y., Zitter T. A., Blazquez C. H.**, 1976. Florida VR-2. A bell pepper with resistances to three virus diseases. *Univ. Florida Gainesville, Circular S-242*. 2 p.
- Damirdagh I. S., Shepherd R. J.**, 1970. Purification of the Tobacco Etch and other Viruses of Potato Y Group. *Phytopathology*, **60**, 132-142.
- Derrick K. S.**, 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology*, **56**, 652-653.
- Gebre Selassie K., Marchoux G., Quiot J. B.**, 1975. Pathogenic properties of potato virus Y isolates (PVY). *Comm. I.S.H.S. Vegetable Viruses Meeting Avignon*, **12**.
- Gebre Selassie K., Marchoux G., Pochard E.**, 1983. Biological and serological characterization of Potato Virus Y strains affecting peppers and other related strains. *Capsicum Newsletter*, **2**, 134-136.
- Gooding G. V.**, 1975. Serological identification of Tobacco Viruses. *Tob. Sci.*, **19**, 135-138.
- Hollings M., Brunt A. A.**, 1981. Potyvirus group. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, n° 245.
- Makkouk K. M., Gumpf D. J.**, 1976. Characterization of potato virus Y strains isolated from pepper. *Phytopathology*, **66**, 576-581.
- Marchoux G., Marrou J., Migliori A.**, 1965. Réaction du poivron (*Capsicum annum* L.) à quelques virus répandus dans les cultures maraîchères françaises méridionales. *Ann. Epiphyt.*, **16**, HS, 109-117.
- Marchoux G., Pochard E., Chambonnet D., Rougier J.**, 1974. Isolation of two potato virus Y strains in pepper crops in South East France. Research for resistant genotypes. *Eucarpia Meet. "Genetics and Breeding of Capsicum"*, Budapest, July 1974, 143-151.
- Marchoux G., Gebre Selassie K., Quiot J. B.**, 1976. Observations préliminaires concernant les souches et les plantes réservoirs du virus Y de la pomme de terre dans le Sud-Est de la France. *Agric. Conspect. Scientif.*, **39**, 541-552.
- Marchoux G., Kaan F., Migliori A.**, 1978. Identification des virus et détermination des pathotypes infectant le poivron en Guadeloupe. Variétés résistantes au virus Y de la pomme de terre. *Nouv. Agron. Antilles-Guyane*, **4** (3/4), 153-164.
- Marchoux G., Pochard E., Gebre Selassie K.**, 1983. Perspectives nouvelles de lutte contre les virus affectant les piments *Capsicum* L. *Med. Fac. Landbouww., Rijksuniv. Gent*, **48/3**, 847-858.
- Nagai H.**, 1983. Melhoramento de Pimentão (*Capsicum annum* L.) visando resistência ao vírus Y. *Hort. Bras.* **1** (2), 3-9.
- Nagai H., Costa A. S.**, 1971. Four new pepper varieties resistant to virus Y in Brazil. *Ann. Fac. Sci. Agric. Univ. Stud. Torino*, **7**, 282-287.
- Nagai M., Smith P. G.**, 1968. Reaction of pepper varieties to naturally occurring viruses in California. *Plant Dis. Rep.*, **52**, 929-930.
- Nelson M. R., Wheeler R. E.**, 1978. Biological and serological characterization and separation of Potyviruses that infect Peppers. *Phytopathology*, **68**, 979-984.
- Nelson M. R., Wheeler R. E.**, 1981. A local lesion indicator for potato virus Y. *Phytopathology*, **71** (2), 245.
- Nelson M. R., Wheeler R. E., Zitter T. A.**, 1982. Pepper Mottle Virus. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*, n° 253.
- Pochard E.**, 1977. Etude de la résistance aux souches européennes de virus Y de la pomme de terre (PVY) chez le piment. *C.R. 3^e Congr. Eucarpia Piment*, Avignon, 109-118.
- Pochard E., Gebre Selassie K., Marchoux G.**, 1983. Oligogenic resistance to Potato Virus Y pathotype 1-2 in the line "Perennial". *Capsicum Newsletter*, **2**, 137-138.
- Purcifull D. E., Batchelor D. L.**, 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecylsulfate (SDS). Treated plant viruses and plant viral inclusions. *Univ. Florida, Gainesville, Bull. 788 (Technical)*, 39 p.
- Ragozzino A., Nicotina M., Caia R.**, 1971. Virus patogeni del peperone in Campania. I. — Virus del mosaico del tabacco e virus Y della patata. *Inst. Pathol. Veget. Univ. Napoli, Portici*, 134-149.
- Rana G. L., Castellano M. A., Cirulli M.**, 1971. Virus diseases of vegetable crops in Apulia. IV. — Veinal necrosis of pepper (*Capsicum annum* L.). *Phytopathol. Mediterr.*, **10**, 119-123.
- Riollano A. J., Adsuar A., Rodriguez A. X.**, 1948. Breeding peppers resistant to a Puerto Rican type of mosaic. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **51**, 415-416.
- Shiffriss C., Marco S.**, 1980. Partial dominance of resistance to Potato Virus Y in *Capsicum*. *Plant Dis.*, **64**, 57-59.
- Smith P. G.**, 1974. Resistance to the tobacco etch virus in peppers. "Genetics and breeding of Capsicum". *Rept. 2nd Eucarpia Meet.*, Budapest, July 1974, 127-135.