



HAL
open science

Etude de la durabilité du gène de résistance Vat chez le melon

Noemie Carles

► **To cite this version:**

Noemie Carles. Etude de la durabilité du gène de résistance Vat chez le melon : Article et Annexes. [Stage] France. AGROCAMPUS OUEST, FRA. 2012, 22 p. hal-02810793

HAL Id: hal-02810793

<https://hal.inrae.fr/hal-02810793>

Submitted on 6 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.

2012

Carles Noémie, Agrocampus Ouest centre d'Angers

Stage de M1 Horticulture

INRA PACA, UR Pathologie Végétale, F 84143 Montfavet cedex

Maître de stage : Hervé Lecoq



Etude de la durabilité du gène de résistance *Vat* chez le melon

Article et Annexes



2012

Etude de la durabilité du gène de résistance *Vat* chez le melon

Carles Noémie

INRA PACA, UR Pathologie Végétale, F 84143 Montfavet cedex

Maître de stage : Hervé Lecoq

RESUME

Le gène *Vat* du melon confère certaines résistances vis à vis des virus lorsqu'ils sont transmis par le puceron *Aphis gossypii*. Un essai au champ a été réalisé pour déterminer l'incidence de ce gène sur la dissémination de quatre virus, et pour étudier l'influence de paramètres agronomiques adaptés sur la résistance. Le gène *Vat* a permis de réduire les contaminations par le CABYV, virus transmis par les pucerons selon le mode persistant, mais pas par le CMV, le WMV et le ZYMV, virus transmis selon le mode non-persistant. L'explication avancée est le rôle secondaire joué par *Aphis gossypii* dans la transmission de ces derniers virus, et son rôle majeur dans la transmission du CABYV. L'utilisation de bandes enherbées et fleuries comme protections n'a pas permis d'observer de réduction de contamination par ces quatre virus. Ceci serait explicable par la présence d'autres parcelles expérimentales très proches et sources de virus, ainsi que par des pressions d'inoculum importantes pour le CMV. Ce dernier virus a en effet été très précoce, comparé aux années précédentes.

ABSTRACT

The *Vat* gene confers resistances against viruses, when they are transmitted by the aphid *Aphis gossypii*. A field experiment has been designed to determine the effect of this gene on the epidemics of four viruses and to study the incidence of adapted agronomic practices on this resistance. The *Vat* gene induced a reduction of CABYV contamination, a virus which is transmitted by aphids in the persistent manner, but not on CMV, WMV and ZYMV epidemics, three viruses which are transmitted in the non-persistent manner. The proposed explanation is that *Aphis gossypii* played a minor role in these three viruses transmission, and a major role in CABYV transmission. The use of grass and flowers bands as protections did not yield in any reduction of contamination by these four viruses. This could be explained by the proximity of other experimental fields, sources of viruses, and by important CMV inoculum pressure. Indeed, the presence of this virus was detected early, compared with previous years.

INTRODUCTION

Il existe une grande diversité de virus capables de contaminer les plants de melons (*Cucumis melo*), occasionnant ainsi d'importantes baisses de rendement dans les cultures, voire même la perte totale des fruits. Ces virus sont transmis par pucerons et aleurodes (Lecoq & Desbiez, 2012). Ceux transmis par pucerons sont en général classés en deux groupes principaux, en fonction de leur mode de transmission : les virus transmis selon le mode non-persistant et les virus transmis selon le mode persistant.

Les virus transmis selon le mode non-persistants se fixent à l'extrémité du stylet du puceron. L'acquisition par le puceron a lieu au cours des piqûres d'épreuve, au niveau des cellules épidermiques de la plante. La transmission à une autre plante-hôte a lieu lors d'une

nouvelle piqûre d'épreuve. Ces virus restent peu de temps fixés au stylet du puceron vecteur. Le passage du puceron sur plusieurs plantes saines peut ainsi débarrasser le stylet des virus. Ils sont souvent transmis par une grande diversité d'espèces de pucerons. (Astier et al, 2001)

Les virus transmis selon le mode persistants restent dans le corps du puceron entre plusieurs jours et toute sa vie. L'acquisition a lieu au moment des piqûres d'alimentation, au niveau du phloème. Certains peuvent même se multiplier dans le corps de l'insecte. Ils sont souvent spécifiques d'une ou de quelques espèces de pucerons. (Astier et al, 2001) (cf. annexe)

Les virus étudiés ici sont le CMV (*Cucumber mosaic virus*), du genre *Cucumovirus*, le WMV (*Watermelon mosaic virus*) et le ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*), du genre *Potyvirus*, trois virus non-persistants, ainsi que le CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*), un virus persistant du genre *Polerovirus*. Tous les quatre peuvent être transmis par *Aphis gossypii* (cf. annexe) (Lecoq et al, 1982 ; Lecoq et al, 1992 ; Desbiez & Lecoq, 1997).

Certaines variétés de melons, dont la variété Margot, possèdent un gène particulier, le gène *Vat* (pour Virus aphid transmission), qui leur confère une résistance à la transmission de virus. En effet, ces variétés sont totalement résistantes aux virus non-persistants (Pitrat & Lecoq, 1982), tels le CMV, le WMV (Lecoq et al, 1980) et le ZYMV, et partiellement résistantes au CABYV, lorsqu'ils sont transmis par *Aphis gossypii* (Lecoq, communication personnelle). De plus, les plants de melons portant *Vat* ont un effet d'antixénose, ou « non-préférence » (le puceron ne s'installe généralement pas sur la plante) et d'antibiose (la croissance et la multiplication du puceron sont réduites) sur *Aphis gossypii*. (Lecoq et al, 1982.) Cette résistance a été mise en évidence en 1979, au cours d'un programme de recherche de résistance du melon au CMV, et le gène *Vat* a été découvert et baptisé en 1982 chez une variété de melon d'origine coréenne, PI 161375, ' Songwhan charmi ' (Lecoq et al, 1979 ; Pitrat & Lecoq, 1982). Ce gène présente donc le double intérêt de protéger la plante de l'installation de colonies d'*Aphis gossypii*, qui pourraient l'affaiblir, et des virus lorsqu'ils sont transmis par ce puceron. Il est aujourd'hui présent dans près de la moitié des variétés de melons cultivés en France (Lecoq, communication personnelle).

Deux problèmes se posent alors : d'une part, *Aphis gossypii* pourrait s'adapter à cette résistance et devenir capable de se nourrir des plants de melons porteurs de ce gène, et de s'y développer ; d'autre part, compte tenu de leur forte plasticité génétique, les virus pourraient également s'adapter et contourner ces résistances. Limiter la pression aphidienne et virale sur les melons de ces variétés apparaît comme le premier moyen à mettre en œuvre pour minimiser les risques d'adaptation des pucerons et virus à ce type de résistance.

Cette étude s'intéresse uniquement à la question des virus. Elle a ainsi pour objectifs d'évaluer, d'une part, l'incidence du gène *Vat* sur les épidémies de virus dans cette culture, et d'autre part dans quelles mesures on peut réduire la pression virale sur les plants de melon par des pratiques culturales adaptées.

Deux variétés, l'une résistante, portant le gène *Vat*, l'autre sensible, sans ce gène, ont été cultivées. Une première hypothèse est ainsi avancée : la variété résistante sera moins touchée par les virus, compte tenu des résistances conférées par le gène *Vat* vis-à-vis d'*Aphis gossypii*. Afin de limiter la pression virale sur la culture, des bandes enherbées et des bandes fleuries ont été placées au Nord et au Sud de la parcelle, afin de constituer des protections contre les pucerons. Une seconde hypothèse est ainsi avancée : ces bandes doivent permettre le déchargement des stylets de pucerons en virus non-persistants, lorsque ces insectes pratiquent des piqûres d'épreuve en visitant l'herbe ou les plantes fleuries, avant d'atteindre les plants de melons. De plus, les bandes fleuries peuvent abriter des

insectes prédateurs de pucerons. Cette étude a pour but d'analyser l'impact de ces paramètres pour limiter les épidémies de CMV, WMV, ZYMV et CABYV. L'essai est réalisé dans le cadre du projet Parcel R, financé par l'Association Nationale pour la Recherche (ANR).

MATERIELS ET METHODES

Matériel Végétal : Le développement des épidémies de virus a été suivi sur une parcelle expérimentale de 5000 m² de l'INRA à Montfavet, près d'Avignon. Pour étudier l'importance du gène *Vat*, deux variétés de melon sont cultivées : une variété sensible, Védrantais (Vat S), ne possédant pas *Vat*, et une variété résistante, Margot (Vat R), possédant *Vat*. Les taux de contamination virale de ces deux variétés sont comparés dans ce document. Les melons sont plantés en plein champ après une semaine de culture en pots. La parcelle compte 720 melons de la variété Vat R, et 720 melons de la variété Vat S. Ces plants sont répartis en trois sous-parcelles : 240 de Vat R et 240 de Vat S sont délimités, au Nord et au Sud, par des bandes enherbées (BE) de 3 m de large, 240 de Vat R et 240 de Vat S sont délimités par des bandes fleuries (BF), enfin 240 de Vat R et 240 de Vat S sont délimités par des bandes de sol nu. Chacune des modalités « Bandes » est séparée des autres par des zones tampon constituées de 320 plants de melons de la variété Cisco, possédant *Vat*, et 320 de la variété Féline, ne le possédant pas. (cf. plan en annexe) La variété sensible, Vat S, joue le rôle de témoin, en indiquant qu'il y a bien eu arrivée des virus sur la parcelle, et en permettant d'étudier l'influence de *Vat* sur la dissémination des virus. Les bandes sont placées au Nord et au Sud de la parcelle afin de faire obstacle au Mistral, provenant du Nord-Ouest.

Les bandes enherbées sont constituées de ray-grass (*Lolium perenne*), plante n'étant hôte ni des virus étudiés, ni d'*Aphis gossypii*. Elles sont semées 2 mois avant les melons. Les bandes fleuries sont également constituées de plantes non-hôtes de ces virus et de ce puceron : pimprenelle (*Sanguisorba minor*), sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), bleuet (*Centaurea cyanus*), gesse (*Lathyrus sativus*) et marjolaine (*Origanum majorana*). Elles sont semées 2 mois avant les melons.

Méthode d'échantillonnage : Pour chaque couple de modalités [Variété ; Bandes], 40 plantes sont prélevées, en récoltant, dans un sachet en plastique, une jeune feuille, si possible toujours sur le même rameau. Les feuilles prélevées ne sont pas touchées à main nue afin d'éviter toute contamination entre les échantillons. Les prélèvements ont lieu chaque semaine, et sont, au total, au nombre de huit. Les plantes à prélever ont été choisies de façon semi-aléatoire : un programme informatique a choisi, pour chaque couple de ligne de plantation, 5 échantillons au hasard (cf. plan en Annexe). Les plantes sont repérées par des piquets annotés, et les rameaux par des rue-balises. Les échantillons du premier prélèvement n'ont été testés que si les plantes correspondantes étaient contaminées, au second prélèvement, par un ou des virus, puisqu'en début de culture, il y avait moins de chances pour que les plantes soient contaminées.

Six échantillons de chaque plante des bandes enherbées et fleuries ont également été prélevés et testés pour vérifier l'absence des virus.

Méthode de détection des virus : Chaque échantillon est broyé au moyen d'un broyeur à rouleaux (cf. annexe) dans 4ml de tampon de broyage, solution aqueuse constituée de 0,03 M de Na₂HPO₄ et de 0,2% de diethyldithiocarbamate (DIECA) (cf. composition en annexe). Le broyat est récupéré dans un tube à essai. Les tubes de broyats

sont conservés dans un réfrigérateur à 6°C. Entre chaque broyage, les rouleaux sont brossés avec une solution de RBS T 105.

Le seuil de positivité est défini de la façon suivante : les échantillons à densité optique (DO) entre 0,1 et 1 sont considérés comme contaminés par le virus testé, et les échantillons à DO supérieure à 1 sont considérés comme fortement contaminés.

Les quatre virus sont détectés au moyen de la méthode Enzyme linked immunosorbent essay (ELISA) (cf. protocole en Annexe). Les dilutions d'Immunoglobulines G (IgG) sont les suivantes : 1/2000 pour le ZYMV, le WMV et le CABYV, 1/4000 pour le CMV. Les dilutions d'IgG conjuguées à la phosphatase alcaline sont les suivantes : 1/8000 pour le ZYMV et le CMV, 1/4000 pour le WMV et le CABYV. La densité optique (DO) des plaques utilisées est mesurée par spectrophotométrie. Pour chaque échantillon, le résultat retenu est la moyenne de DO de deux répétitions sur la plaque ELISA. Seuls les échantillons contaminés par au moins un virus, au second prélèvement, sont testés pour le premier prélèvement. En effet, en début de culture, la probabilité de détecter des virus dans la parcelle est faible.

Pour le CMV, des précautions ont été prises à partir du 4^{ème} prélèvement, en raison des contaminations de puits à puits observées : les rinçages de broyats sur plaques ELISA sont réalisés au moyen d'un aspirateur multicanaux, dont les embouts sont rincés entre l'aspiration de chaque colonne. De plus, ce virus n'est testé par la méthode ELISA que jusqu'au prélèvement 6, puisque 100% des échantillons sont positifs aux prélèvements 5 et 6 pour toutes les modalités.

Lorsque certains échantillons apparaissaient douteux au vue des résultats, le broyage de ces plantes, au prélèvement suivant, a été réalisé en sachets avec 4mL de tampon de broyage, au moyen d'un broyeur à bille (cf. annexe).

RESULTATS

Comparaison de l'évolution des différents virus (Fig. 1) : On constate que le CMV arrive et se répand le plus rapidement sur la parcelle. Tous les échantillons sont contaminés par ce virus dès le 5^{ème} prélèvement. Le CABYV évolue rapidement, mais moins que le CMV. Le ZYMV et le WMV n'ont pas une répartition homogène sur les trois parcelles.

Efficacité du gène *Vat* sur la culture : Pour le CMV, (fig. 2 A, B et C) on n'observe pas d'influence nette du gène *Vat* : pour les modalités BE et BF, les proportions d'échantillons contaminés par le CMV atteignent 100% dès 27 jours, au 4^{ème} prélèvement, chez la variété *Vat S* comme chez la variété *Vat R*, et entre bandes de sol nu, dès le 5^{ème} prélèvement. Cette influence de *Vat* n'est pas non plus nettement visible pour le ZYMV (fig. 2 D, E et F) et le WMV (fig. 2 G, H et I).

En revanche, pour le CABYV (fig. 2 J, K et L), pour chaque modalité, la proportion de plantes contaminées reste plus basse chez la variété résistante que chez la variété sensible. Pour la modalité BE, 62,5% des échantillons sensibles sont contaminés au bout du 4^{ème} prélèvement, tandis que 35% seulement des échantillons résistants sont contaminés à cette même date.

Efficacité des bandes pour le CMV (Fig.3 A et B) : On n'observe pas d'effet notable des bandes, chez la variété *Vat S* comme chez la variété *Vat R* : les proportions d'échantillons infectés par le CMV sont sensiblement les mêmes pour les melons cultivés avec des bandes enherbées, des bandes fleuries ou des bandes de sol nu. Le CMV a contaminé 100% des échantillons des modalités BE et BF dès le 4^{ème} prélèvement, et

100% des échantillons de la modalité SN dès le 5ème prélèvement. Cette différence n'est pas significative, notamment en raison de l'erreur due à l'échantillonnage.

Efficacité des bandes pour le WMV (Fig. 3 C et D) : Chez les deux variétés, les plants de melons entre bandes enherbées et fleuries sont les moins touchés par le WMV, tandis que ceux entre bande de sol nu sont les plus touchés. Cependant ces différences ne s'observent qu'à partir du troisième prélèvement, soit 20 jours après la plantation. Chez *Vat R*, au huitième prélèvement, 60% des échantillons sont contaminés dans la modalité BE, tandis qu'ils sont 35% avec BF, et 82,5% avec SN.

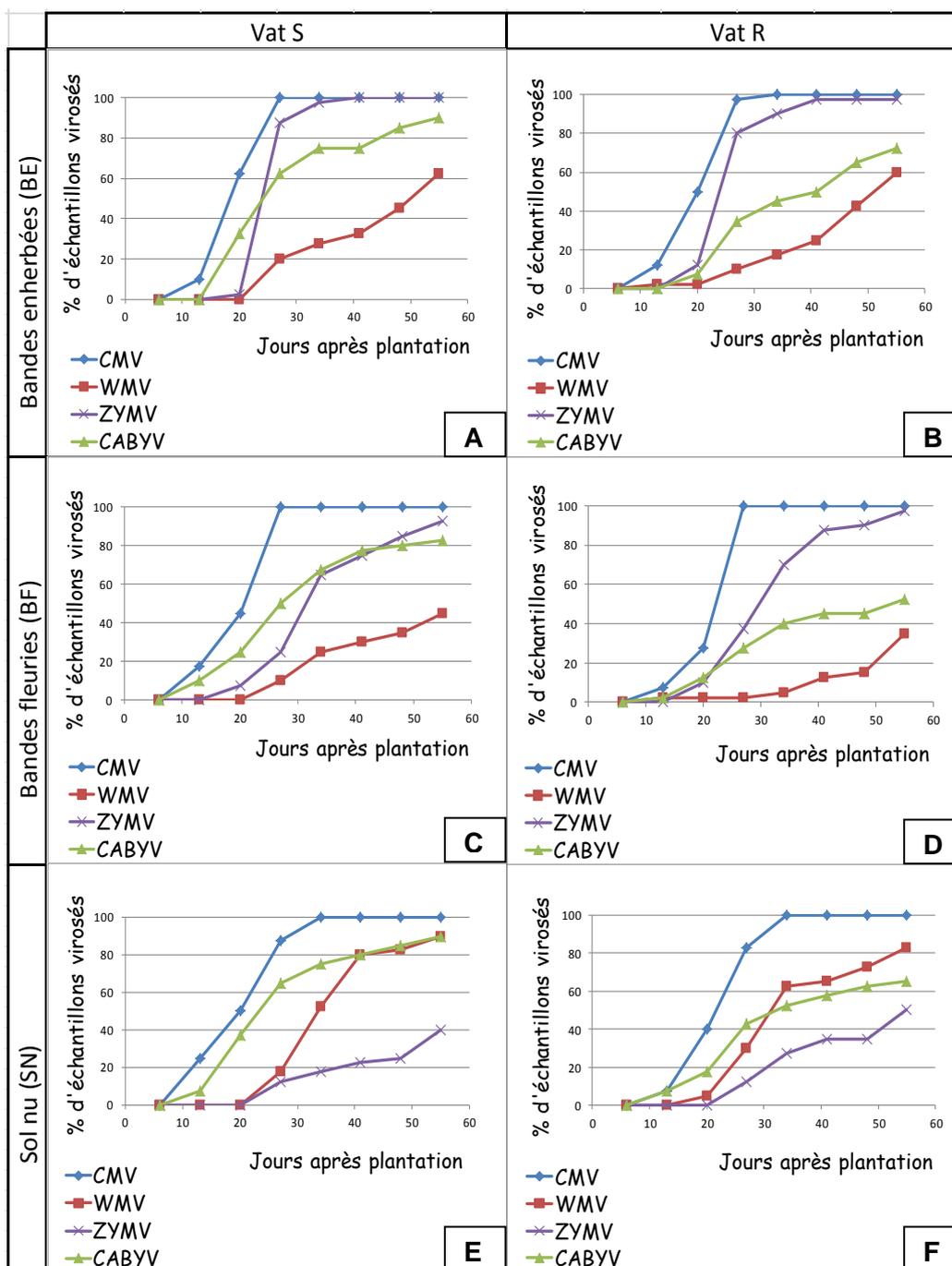


Figure 1 Comparaison du développement des épidémies virales. Avec bandes enherbées A) Chez *Vat S* et B) chez *Vat R* ; Avec bandes fleuries C) Chez *Vat S* et D) chez *Vat R* ; Avec bandes de sol nu E) Chez *Vat S* et F) chez *Vat R*.

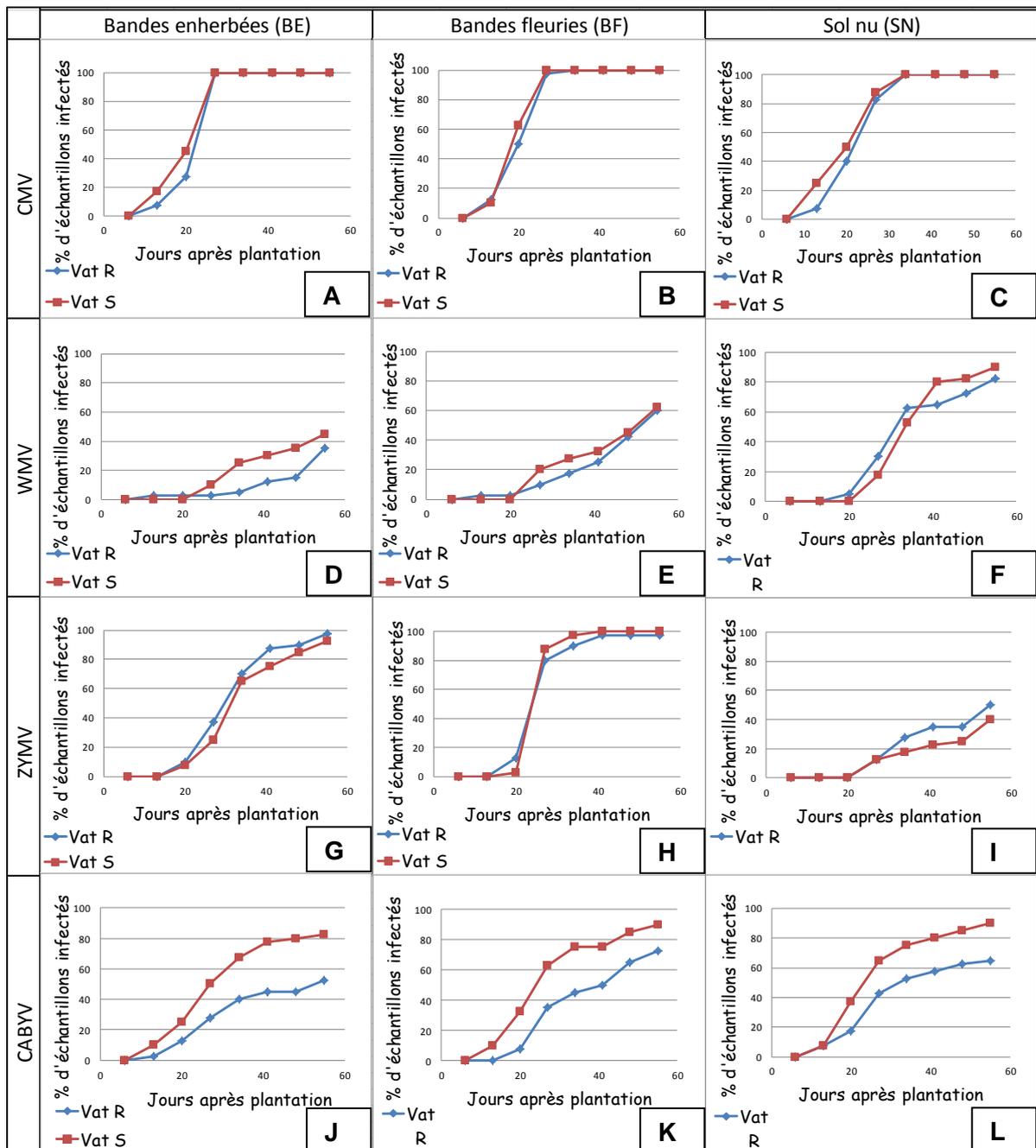


Figure 2 Comparaison du développement des épidémies virales chez les variétés Vat R et Vat S. CMV avec A) bandes enherbées, B) bandes fleuries et C) CMV bandes de sol nu; WMV avec D) bandes enherbées, E) bandes fleuries et F) bandes de sol nu; ZYMV avec G) bandes enherbées, H) bandes fleuries et I) bandes de sol nu; CABYV avec J) bandes enherbées, K) bandes fleuries et L) bandes de sol nu.

Efficacité des bandes pour le ZYMV (Fig. 3 E et F) : Aucune plante n'étant positive en ZYMV au second prélèvement, le premier n'a pas été testé, tous les échantillons sont alors considérés comme négatifs.

Des différences sont observables entre les trois modalités, BE, BF et SN. Chez les deux variétés, les plants de melons entre bandes de sol nu sont les moins touchés par le ZYMV, tandis que les melons entre bandes enherbées sont les plus touchés. Avec BE, le taux d'infection augmente brutalement entre le troisième et le quatrième prélèvement, et se

stabilise, au sixième prélèvement pour *Vat R*, BE, à 97,5%. A cette même date, pour *Vat R*, BF, 87,2% des échantillons sont contaminés, et 35% pour *Vat R*, SN. Ce résultat est contraire à ce qui était attendu, puisqu'on pensait que les BE et BF ralentiraient les épidémies virales.

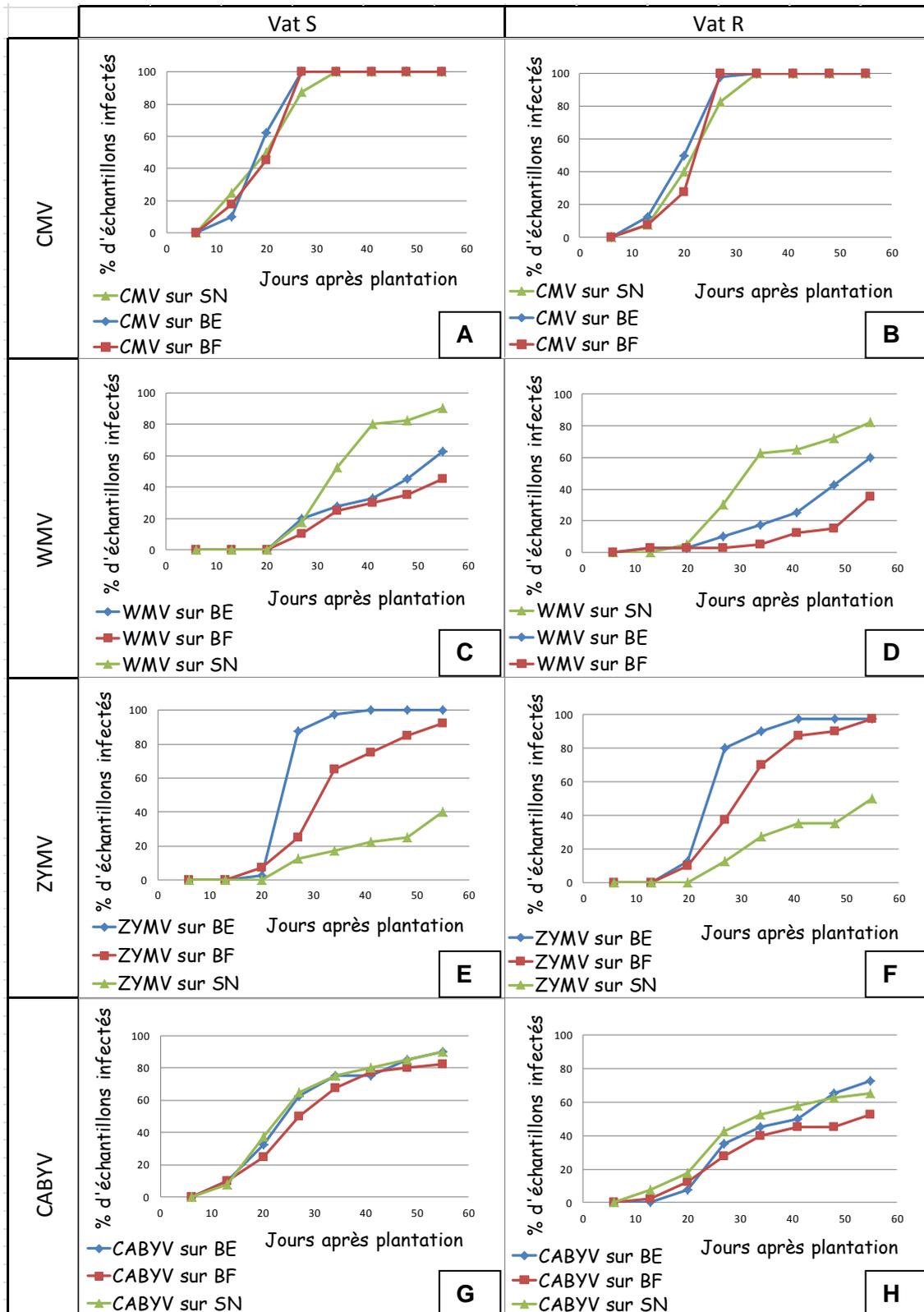


Figure 3 Comparaison des épidémies virales selon les modalités « bandes » A) CMV chez Vat S; B) CMV chez Vat R; C) WMV chez Vat S; D) WMV chez Vat R; E) ZYMV chez Vat S; F) ZYMV chez Vat R; G) CABYV chez Vat S; H) CABYV chez Vat R.

Efficacité des bandes pour le CABYV (Fig. 3 : G et H) : On n'observe pas d'effet des bandes sur la contamination par le CABYV, chez la variété résistante comme chez la variété sensible. Chez *Vat S*, le CABYV a contaminé 80% des échantillons entre le 6^{ème} et le 7^{ème} prélèvement, pour les trois modalités, avant de se stabiliser entre 80 et 90%.

Analyse des bandes enherbées et fleuries : Les plantes choisies pour les bandes enherbées et fleuries ne sont en théorie hôtes ni des virus ni d'*Aphis gossypii*. Un test ELISA a été fait sur un échantillonnage de 6 individus de chaque espèce afin de s'assurer que ces virus en soient bien absents. Conformément aux attentes, les quatre virus n'ont pas été détectés chez ces plantes.

DISCUSSION

La précision des résultats obtenus est limitée par l'échantillonnage, qui permet seulement d'estimer les taux de contamination de la parcelle.

Le gène *Vat* conférant la résistance aux virus étudiés, lorsqu'ils sont transmis par *Aphis gossypii*, il est attendu que la variété sensible, *Vat S*, soit davantage contaminée par ces virus que la variété résistante, *Vat R*.

Seul le CABYV permet d'observer une différence nette entre les plants de melons *Vat S* et les plants de melon *Vat R*. La variété sensible, *Vat S*, a en effet été contaminée plus rapidement que la variété résistante. L'efficacité partielle de *Vat* dans la résistance au CABYV transmis par *Aphis gossypii* confirme les études antérieures réalisées à ce sujet (Lecoq, communication personnelle). Cette différence indique qu'*Aphis gossypii* a été l'un des vecteurs principaux de ce virus, tandis qu'il n'a joué qu'un rôle mineur dans la transmission des trois virus non-persistants. Une étude parallèle des pucerons ailés visitant la parcelle a été réalisée, et, en effet, il apparaît qu'*Aphis gossypii* ne représentait en moyenne que 5,7 % du nombre total de pucerons au cours de la période d'étude. (Rapport de stage de Maëlle Deshoux, 2012. Cf. Annexe) De plus, les virus persistants, comme le CABYV, ne peuvent être transmis que par certaines espèces de pucerons. Ceci explique que, malgré les nombreuses espèces de pucerons piégés sur la parcelle, *Aphis gossypii* ai joué un rôle prépondérant dans la dissémination du CABYV. En revanche, lorsqu'il arrive sur des plants de melons sensibles, ce puceron a tendance à s'installer définitivement sur la plante. Il peut donc être responsable de la formation de foyers primaires principalement, à partir de CABYV acquis sur des plantes sauvages environnantes. Le fait que peu de foyers secondaires puissent se former induit des épidémies plus lentes.

Les bandes enherbées et fleuries ont été installées dans le but de permettre le déchargement des pucerons en virus non-persistants, et les bandes fleuries doivent également abriter des prédateurs de pucerons. Ainsi, les plants de melons situés entre ces bandes devraient être moins virosés que ceux placés entre les bandes de sol nu.

Pour le CMV et le CABYV, aucune influence précise des bandes fleuries et enherbées ne peut être observée. De plus, l'échantillonnage induit un écart entre les valeurs de proportion de contamination estimées et les valeurs réelles. Concernant le CMV, cela peut toutefois s'expliquer par le fait que ce virus est arrivé sur la culture de façon très précoce, par comparaison aux autres années, et s'est développé très rapidement. Ceci est probablement dû à une forte pression d'inoculum dans l'environnement de la culture. Cette présence importante du virus peut expliquer l'inefficacité des bandes à limiter la contamination de la parcelle. Pour le CABYV, également arrivé tôt sur la culture, les bandes végétales ne peuvent pas permettre de déchargement des pucerons, puisque ce virus est

transmis selon le mode persistant et ne sera pas perdu après une ou quelques piqûres d'épreuve sur des plantes non-hôtes. Il est donc normal de ne pas constater de différence entre les trois modalités, bien qu'on ait pu penser que les bandes fleuries abritent des prédateurs d'*Aphis gossypii*.

Le ZYMV présente un gradient de répartition d'Est en Ouest. Ainsi, les melons de la modalité BE sont les plus touchés, alors que les melons de la modalité SN sont les moins touchés, ce qui est en contradiction avec ce qui était attendu. Cependant, un autre essai de culture de melons (Viraphid), qui était placé à proximité de Parcel-R, a été contaminé par le ZYMV. Cet essai, présent avant Parcel-R, était initialement couvert d'un voile non-tissé (Agryl P17) qui l'isolait des insectes. Ce voile a été retiré le 11 Mai, soit 20 jours avant la plantation de Parcel-R, ce qui a rendu la parcelle Viraphid accessible aux insectes et aux virus. En effet, cette parcelle a été contaminée très tôt par le ZYMV, il est donc très probable qu'il s'agisse de l'origine du gradient de ZYMV.

Le WMV présente un gradient de répartition d'Ouest en Est. Les melons de la modalité SN sont les plus touchés, tandis que les melons de la modalité BF sont les moins contaminés. On pourrait se demander si les bandes ont une influence sur l'expansion de ce virus, mais une culture expérimentale de courgettes est placée à proximité de la parcelle SN et était fortement infectée par le WMV. Or, cette culture a été implantée le 12 Juin, tandis que le WMV s'est rapidement dispersé à partir du troisième prélèvement, le 20 Juin. De plus, on sait que le WMV et le ZYMV appartiennent tous deux à la famille des Potyvirus (Desbiez et Lecoq, 1997), et peuvent avoir, l'un sur l'autre un effet de compétition. Ainsi, le ZYMV, arrivé avant le WMV, a pu être limité dans son expansion dans la partie Est de la parcelle. Il n'est donc pas possible de juger de l'effet des bandes pour ce virus.

D'autres facteurs environnementaux ont pu avoir une influence sur l'arrivée et l'expansion de ces virus. Les bandes étaient installées uniquement sur les côtés Nord et Sud de l'essai, afin de faire obstacle aux pucerons portés par le Mistral, en provenance du Nord-Ouest. Or, non seulement ce vent a été faible cette année, mais une haie de cyprès est également présente au Nord de la culture, favorisant des mouvements d'air d'Ouest en Est, et limitant les arrivées de pucerons par le Nord. Ainsi, les bandes n'ont pas fait obstacle aux pucerons arrivant des côtés Est et Ouest de l'essai.

De plus, pour les trois virus non-persistants, les variétés *Vat S* et *Vat R* ne présentent pas de différence significative en termes de contamination, ce qui signifie que *Aphis gossypii* n'est pas responsable d'une part importante des transmissions. Et en effet, de multiples espèces de pucerons ont été recensées sur la parcelle par une étude parallèle (Deshoux Maëlle, 2012. Cf. annexes). Ces virus peuvent donc avoir été transmis par plusieurs espèces de pucerons. Par conséquent, un pool important de vecteurs de ces virus a pu, outre les autres facteurs environnementaux, empêcher les bandes de jouer un rôle efficace. Finalement, en raison de ces divers facteurs environnementaux, aucun des virus étudiés ne permet de juger de l'influence des bandes sur le développement des épidémies.

Ce travail présente aussi l'intérêt de caractériser l'importance de la pression d'inoculum des virus par rapport à celles des années précédentes. Enfin, on peut également s'intéresser aux souches présentes cette année, et les comparer à celles des autres années, ce qui pourrait peut-être permettre de retracer le déplacement de ces souches virales, voire de connaître leur origine géographique. Ceci pourrait aussi permettre de connaître leurs plantes réservoirs pendant l'hiver et en absence de culture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y. & Lecoq, H. 2001. Principes de virologie végétale, INRA Editions.
- Desbiez, C. & Lecoq, H. 1997. Zucchini yellow mosaic virus, *Plant Pathology*, 46: 809-829.
- Lecoq, H., Cohen, S., Pitrat, M. & Labonne, G., 1979. Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids in *Cucumis melo*, *Phytopathology*, 69: 1223-1225.
- Lecoq, H. & Desbiez, C., 2012. Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region : An Ever-Changing Picture. *Advances in Virus Research*, 84: 67-126.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O. & Herrbach, E., 1992. A new yellowing disease of cucurbit caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus, *Plant Pathology*, 41: 749-761.
- Lecoq, H., Labonne, G. & Pitrat, M., 1980. Specificity of resistance to virus transmission by aphids in *Cucumis melo*, *Ann. Phytopathol*, 12 :139-144.
- Lecoq, H., Pitrat, M. & Pansart, M.-J., 1982. La résistance au puceron du melon et son interaction avec les virus chez le melon. In *Les pucerons des cultures*, ACTA éditions
- Pitrat, M. & H. Lecoq, 1982. Relations génétiques entre les résistances par non-acceptation et par antibiose du melon à *Aphis gossypii*. *Recherche de liaisons avec d'autres gènes*, *Agronomie*, 2 : 503-508.

REMERCIEMENTS

Merci à Hervé Lecoq pour son accueil, ses corrections et pour avoir partagé ses connaissances passionnantes sur la transmission des virus phytopathogènes.

Merci à Cindy Morris, Directrice de l'unité Pathologie végétale de l'INRA PACA, pour son accueil dans l'établissement.

Merci à Catherine Rys Wipf-Scheibel, pour son encadrement lors des tests ELISA, ses conseils d'efficacité et de rigueur scientifique, ainsi que ses divers enseignements.

Merci à Pauline Millot pour son accueil, ses conseils et sa bonne-humeur.

Merci à Maëlle, Hanna, Yuko, Elsa, Julie, Jonathan, qui ont également contribué à rendre cette période agréable.

Enfin, merci à toute l'équipe de virologie, qui sait aussi bien faire part d'une bonne-humeur et d'un enthousiasme stimulants, que de conseils de sécurité avisés.

Annexes

1- Protocole expérimental.....	2
1A- Composition des solutions.....	2
<i>Tampons pour le test ELISA</i>	2
<i>Solutions d'IgG et d'IgG conjuguées à la phosphatase alcaline.</i>	3
1B-Broyeurs utilisés pour les échantillons	3
1C-Protocole du test ELISA.....	3
1D-Plan de Parcel-R.....	4
1E-Plan de l'environnement de Parcel-R.....	5
1F-Analyse des plantes des bandes enherbées et fleuries.....	6
2-Pucerons et transmission de virus	7
2A-Transmission des virus par <i>Aphis gossypii</i>	7
2B-Symptômes et particularités des virus étudiés.....	7
<i>Le CMV, Cucumber mosaic virus, un Cucumovirus</i>	7
<i>Des Potyvirus : WMV, Watermelon mosaic virus, et ZYMV, Zucchini yellow mosaic virus</i>	7
<i>Le CABYV, Cucurbit aphid-borne yellows virus, un Polerovirus</i>	8
2C- Les pucerons recensés sur la parcelle.....	8
3-Résultats de la parcelle de Moissac	9

Annexes

1- Protocole expérimental

1A- Composition des solutions

Tampons pour le test ELISA

	PBS 1	PBS 20	
H ₂ O distillée	q.s.p 1 litre	q.s.p 5 litre	
NaCl	8 g	800 g	
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2,9 g	290 g	
KH ₂ PO ₄	0,2 g	20 g	
KCl	0,2 g	20 g	
TAMPON DE RINCAGE PBS TWEEN	PBS 1 TWEEN 20	q.s.p 1 litre 0,5 ml	pH 7,4
TAMPON DE DILUTION DES IgG	H ₂ O distillée Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃	q.s.p 1 litre 1,6 g 3 g	pH 9,6
TAMPON DE DILUTION DU CONJUGUE	PVP OVALBUMINE NaN PBS TWEEN	20 g 2g 0.2g ajuster à 1 litre	pH 7,1-7,3
TAMPON SUBSTRAT	H ₂ O distillée DIETHANOLAMINE	800 ml 97 ml	amener à pH 9,8 avec HCl fumant. Ajuster à 1 litre
TAMPON D'EXTRACTION Na ₂ HPO ₄ 0,03M + 0,2% DIECA			

Dilutions d'emploi des solutions d'IgG et d'IgG conjuguées à la phosphatase alcaline.

Tableau 1 Dilution d'emploi des solutions d'IgG

	Dilution des IgG	Dilution des IgG conjuguées
CMV	1/2000	1/8000
ZYMV	1/2000	1/4000
WMV	1/4000	1/8000
CABYV	1/2000	1/4000

1B-Broyeurs utilisés pour les échantillons

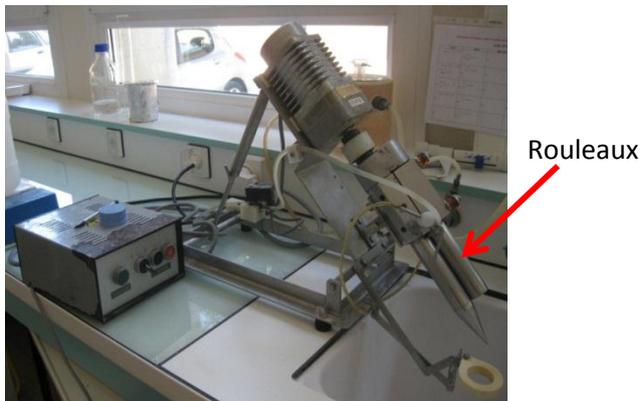


Figure 1 Broyeur à rouleaux. Les échantillons sont broyés entre les deux rouleaux en rotation.

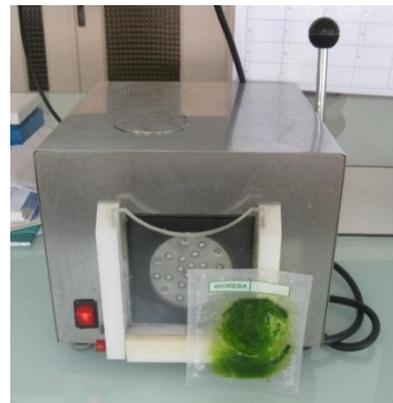


Figure 2 Broyeur à billes. Les échantillons durs sont broyés dans des sachets placés entre les billes en rotation et la plaque de plexiglas.

1C-Protocole du test ELISA

- 1-Dépôt des IgG spécifiques aux virus à tester : 150 μ L par puits, à la pipette électronique multicanaux. Les IgG sont en solution selon les concentrations indiquées dans le tableau 1.
- 2-Incubation des plaques à 37°C pendant 3H.
- 3-Rinçage : deux fois à l'eau du robinet, une fois au PBS-Tween.
- 4-Dépôt des broyats : 150 μ L par puits, deux puits par échantillon. Une pipette électronique est utilisée.
- 5-Incubation entre 4 et 6°C pendant une nuit.
- 6-Rinçage : aspiration des broyats à l'aspirateur multicanaux, puis rinçage deux fois à l'eau du robinet, une fois au PBS-Tween. Dans le cas de virus en fortes concentrations et risquant de contaminer les puits voisins, l'aspirateur multicanaux est rincé entre chaque colonne, et un premier rinçage au PBS-Tween est effectué avant les rinçages habituels.
- 7-Dépôt des IgG couplés à la phosphatase alcaline : 150 μ L par puits, à la pipette électronique multicanaux. Les IgG sont en solution selon les concentrations indiquées dans le tableau.
- 8- Incubation des plaques à 37°C pendant 3H.
- 9-Rinçage : aspiration des broyats à l'aspirateur multicanaux, puis rinçage deux fois à l'eau du robinet, une fois au PBS-Tween.
- 10-Dépôt du substrat de l'enzyme, le paranitrophénylphosphate : 150 μ L par puits.
- 11-Lecture des densités optiques (DO) au bout d'1 heure, de 2 heures et de 3 heures, avec un spectrophotomètre à 405 nm. Avant la lecture, Le dessous des plaques est essuyé afin d'en éliminer la buée.

1D-Plan de Parcel-R

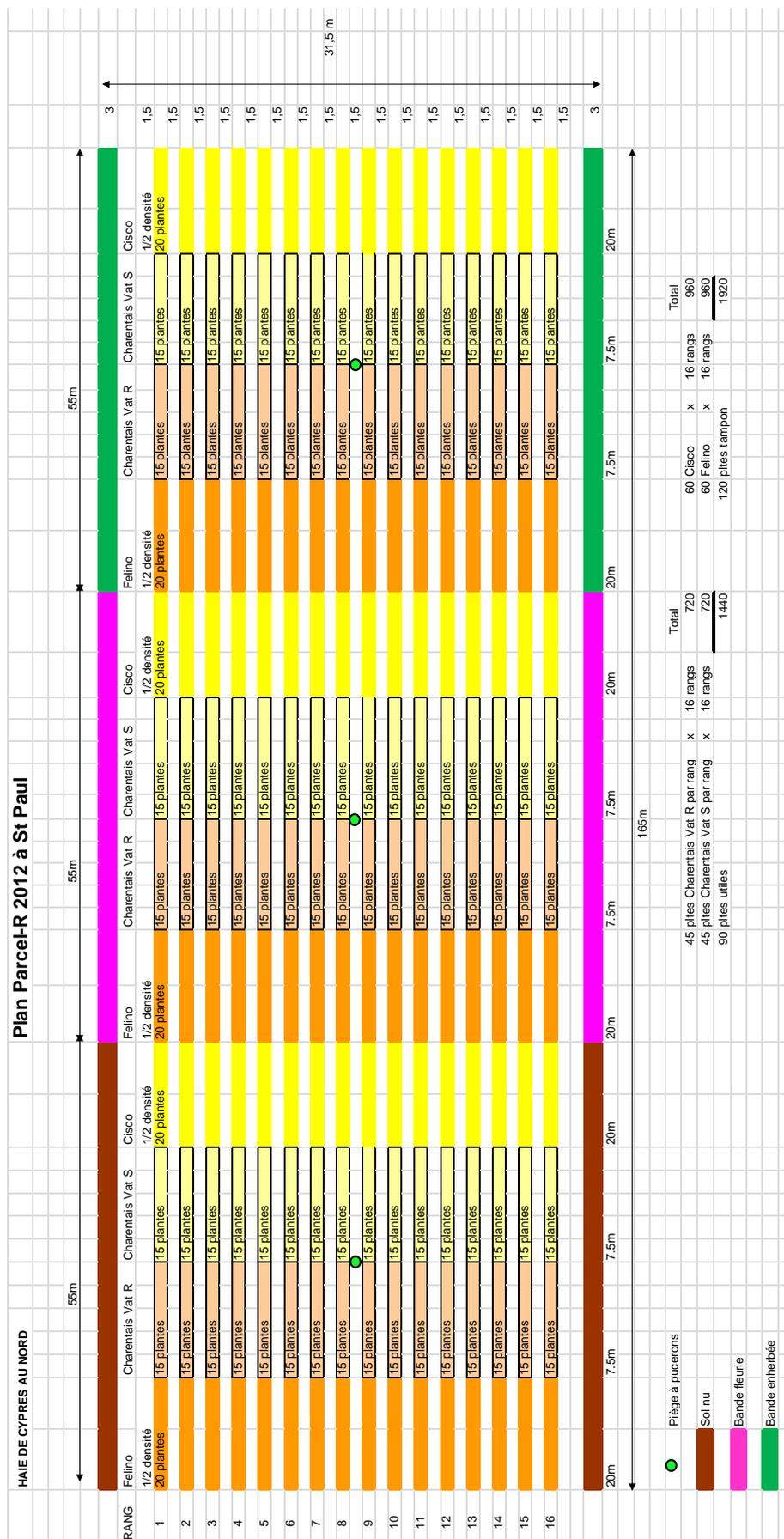


Figure 3 Plan détaillé du dispositif expérimental à Saint Paul

1E-Plan de l'environnement de Parcel-R

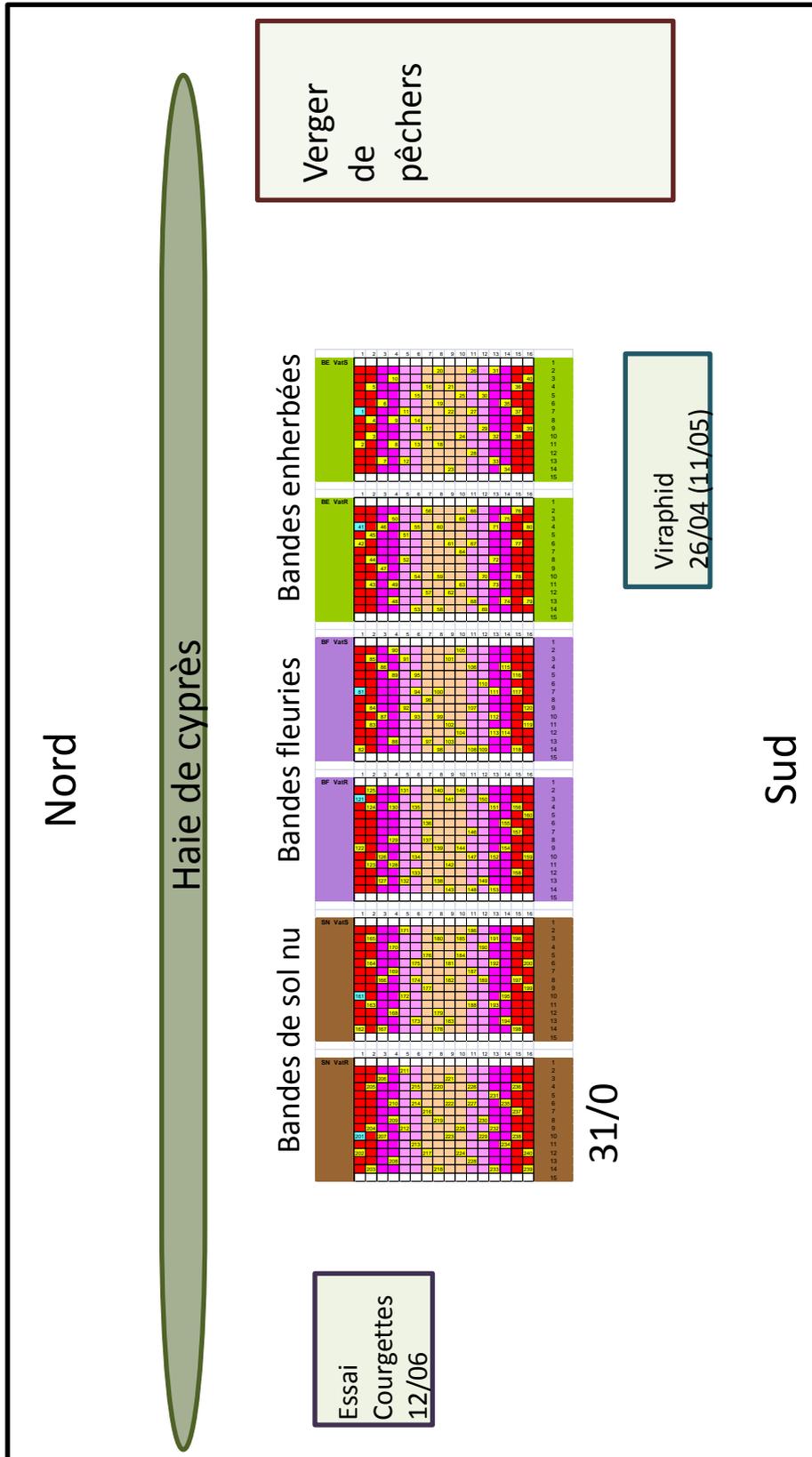


Figure 4 Plan de l'environnement de l'essai Parcel-R

1F-Recherche de virus dans des plantes des bandes enherbées et fleuries

Tableau 2 Densités optiques obtenues en ELISA pour les plantes des bandes fleuries et enherbées

	CTPS Saint-Paul	ZYMV6-2H BF, BE	WMV6-2H BF, BE	CABYV6-2H BF, BE	CMV6-2H BF, BE
		-0,001833333	0,0385	0,0155	0,00566667
	TS mel	0,00	0,02	0,00	-0,01
	TM	0,46	1,07	2,07	2,09
Bande fleurie et enherbée de Parcelle R Saint-Paul	sainfoin N-1	0,00	-0,01	0,00	-0,01
	sainfoin N-2	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
	sainfoin N-3	0,00	0,00	-0,01	-0,01
	sainfoin S-1	0,00	0,00	0,00	-0,01
	sainfoin S-2	0,00	-0,01	-0,01	-0,01
	sainfoin S-3	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
	gesse N-1	0,00	0,00	0,00	-0,02
	gesse N-2	0,00	0,00	0,01	0,00
	gesse N-3	0,00	0,01	0,01	-0,01
	gesse S-1	0,00	0,01	0,01	-0,01
	gesse S-2	0,00	0,02	0,01	-0,01
	gesse S-3	0,01	0,02	0,02	-0,01
	pimprenelle N-1	0,00	-0,01	0,00	-0,01
	pimprenelle N-2	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
	pimprenelle N-3	-0,01	0,00	-0,01	-0,01
	pimprenelle S-1	0,00	-0,01	0,00	-0,01
	pimprenelle S-2	0,00	-0,01	-0,01	-0,01
	pimprenelle S-3	-0,01	-0,01	0,00	-0,01
	bleuet N-1	0,00	0,00	0,00	-0,01
	bleuet N-2	0,00	-0,01	0,01	-0,01
	bleuet N-3	0,00	0,00	0,01	-0,01
	bleuet S-1	0,00	0,03	0,01	0,00
	bleuet S-2	0,00	0,01	0,00	-0,01
	bleuet S-3	0,00	0,00	0,00	-0,01
	marjolaine N-1	0,00	0,00	0,00	-0,01
	marjolaine N-2	-0,01	0,00	0,00	-0,01
	marjolaine N-3	0,00	0,01	0,00	-0,01
	marjolaine S-1	-0,01	0,00	0,00	-0,01
	marjolaine S-2	0,00	0,00	0,00	-0,01
	marjolaine S-3	-0,01	0,01	0,00	-0,01
	ray-grass N-1	0,01	0,01	0,02	-0,02
	ray-grass N-2	0,00	0,00	0,01	-0,01
	ray-grass N-3	0,00	0,00	0,01	-0,01
ray-grass S-1	0,00	0,00	0,01	-0,01	
ray-grass S-2	0,00	0,02	0,00	-0,02	
ray-grass S-3	0,00	0,00	0,03	-0,02	
-	0,00	0,00	0,00	-0,01	
-	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	
-	0,00	0,00	0,00	-0,01	
-	0,00	0,00	0,01	-0,01	
-	0,00	0,00	0,01	-0,01	
-	0,00	0,00	0,00	-0,01	

2-Pucerons et transmission de virus

2A-Transmission des virus par *Aphis gossypii*

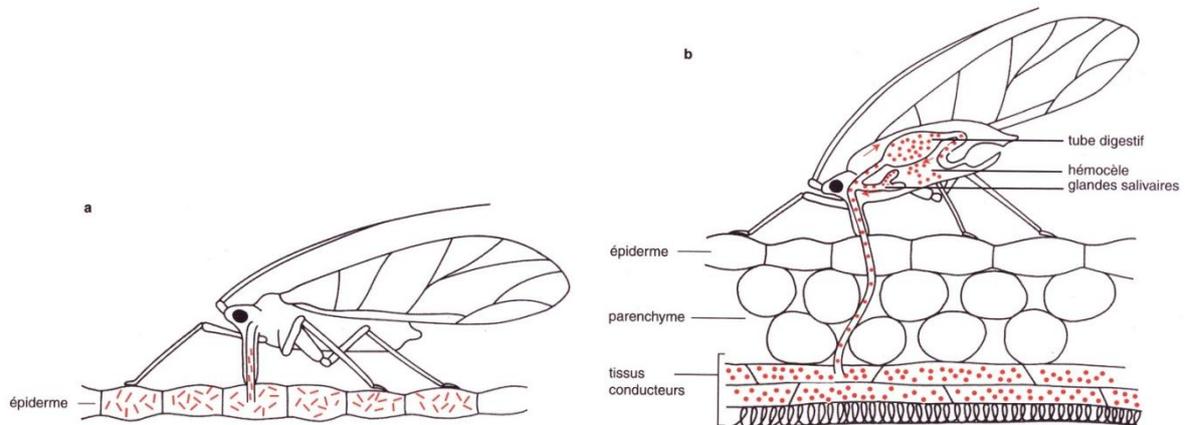


Figure 5 Représentation schématique de la transmission d'un virus par puceron: a) acquisition d'un virus non persistant par piqûre d'épreuve dans les cellules épidermiques de la plante ; b) acquisition d'un virus persistant par piqûre d'alimentation dans les vaisseaux du phloème. (Astier et al., 2001)

2B-Symptômes et particularités des virus étudiés

Le CMV, Cucumber mosaic virus, un Cucumovirus



Figure 6 Feuille de melon sain



Figure 7 CMV sur feuille de melon

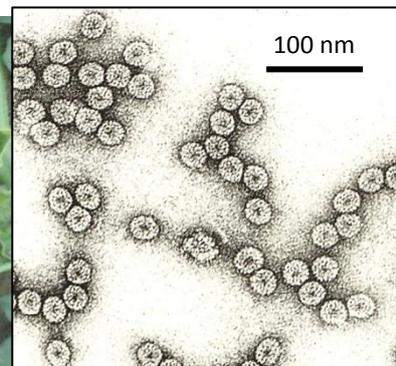


Figure 8 Particules virales de CMV observées en microscopie électronique (photo INRA)

Des Potyvirus : WMV, Watermelon mosaic virus, et ZYMV, Zucchini yellow mosaic virus



Figure 9 WMV sur feuille de melon



Figure 10 ZYMV sur feuille de melon

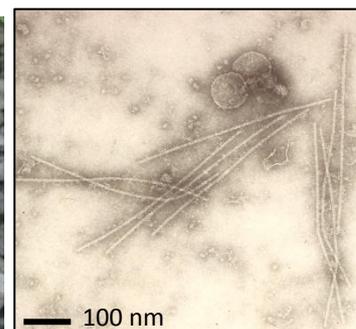


Figure 11 Particules virales de Potyvirus (WMV) observées en microscopie électronique (photo INRA)

Le CABYV, Cucurbit aphid-borne yellows virus, un Polerovirus



Figure 12 CABYV sur feuille de melon (photo INRA)

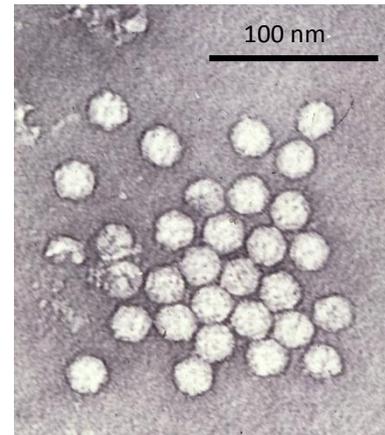


Figure 13 Particules virales de CABYV observées en microscopie électronique (photo INRA)

2C- Les pucerons recensés sur la parcelle

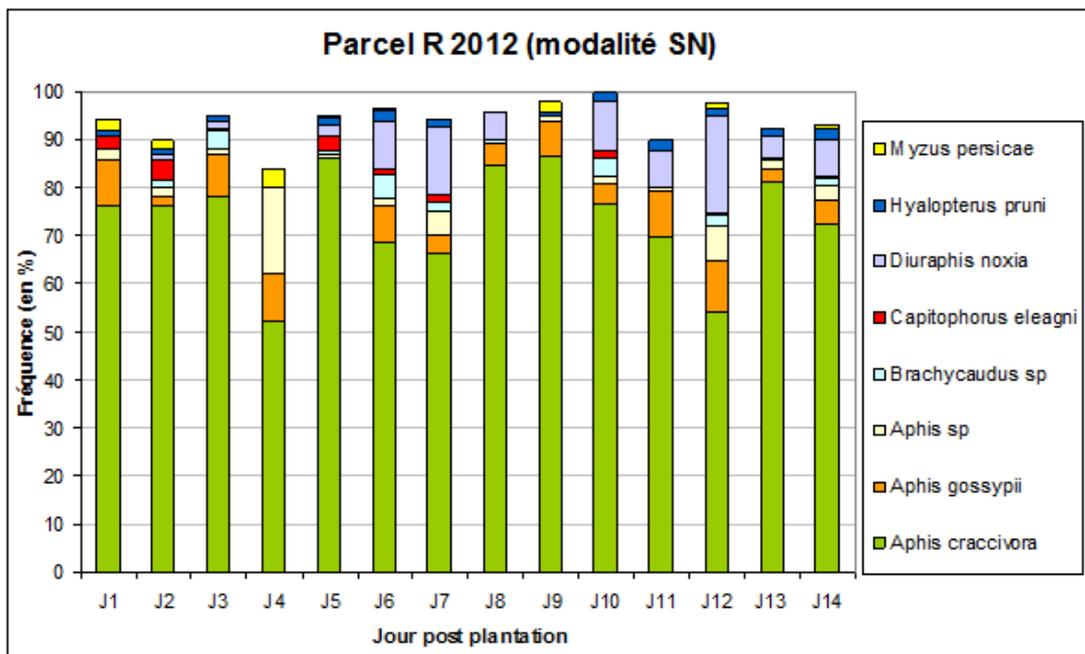


Figure 14 Pucerons collectés au moyen d'un piège à aspiration dans la parcelle SN en début de culture. (Extrait de : Deshoux Maëlle, 2012. Dynamiques de populations de pucerons dans différents environnement agroclimatiques, rapport de stage, INRA PACA.)

3-Développements des épidémies virales de la parcelle de Moissac

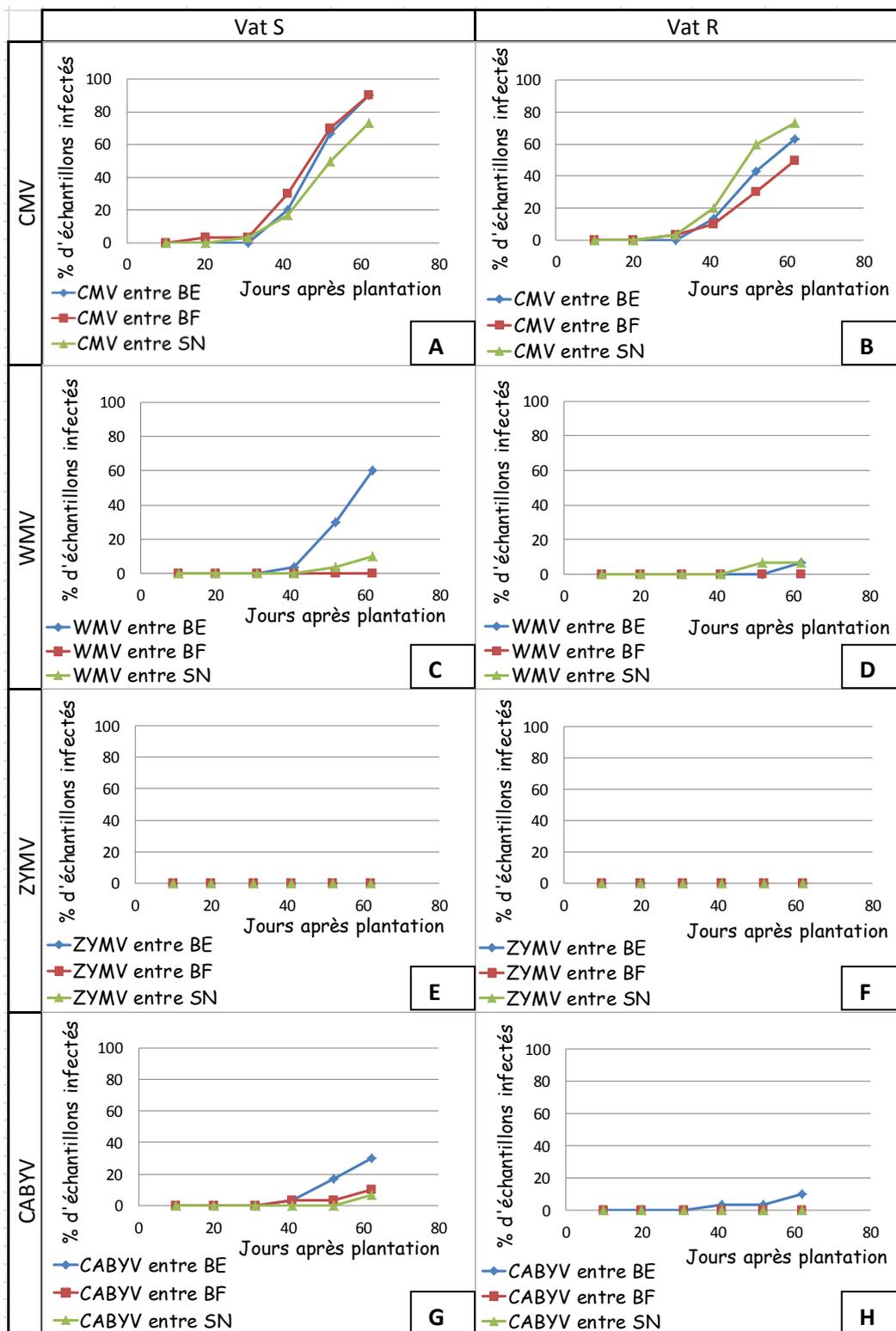


Figure 15 Comparaison des épidémies virales selon les modalités « bandes » : CMV chez A) Vat S et B) Vat R; WMV chez C) Vat S et D) Vat R; ZYMV chez E) Vat S et F) Vat R; CABYV chez G) Vat S et H) Vat R.

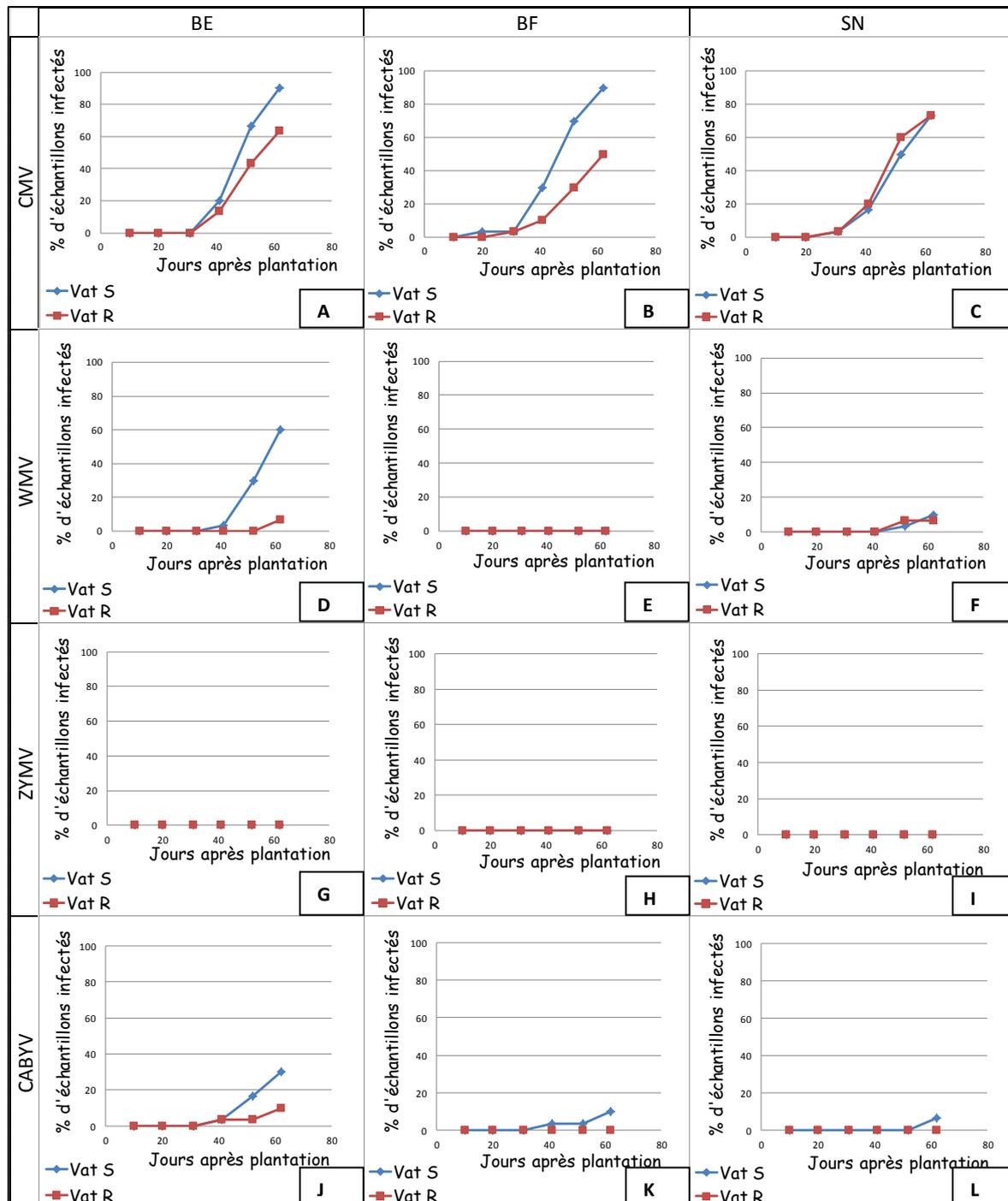


Figure 16 Parcelle de Moissac: Comparaison des épidémies virales chez Vat S et Vat R. CMV avec A) bandes enherbées, B) bandes fleuries et C) bandes de sol nu; WMV avec D) bandes enherbées, E) bandes fleuries et F) bandes de sol nu; ZYMV avec G) bandes enherbées, H) bandes fleuries et I) bandes de sol nu; CABYV avec J) bandes enherbée, K) bandes fleuries et L) bandes de sol nu.

RESUME

Le gène *Vat* du melon confère certaines résistances vis à vis des virus lorsqu'ils sont transmis par le puceron *Aphis gossypii*. Un essai au champ a été réalisé pour déterminer l'incidence de ce gène sur la dissémination de quatre virus, et pour étudier l'influence de paramètres agronomiques adaptés sur la résistance. Le gène *Vat* a permis de réduire les contaminations par le CABYV, virus transmis par les pucerons selon le mode persistant, mais pas par le CMV, le WMV et le ZYMV, virus transmis selon le mode non-persistant. L'explication avancée est le rôle secondaire joué par *Aphis gossypii* dans la transmission de ces trois derniers virus, et son rôle majeur dans la transmission du CABYV. L'utilisation de bandes enherbées et fleuries comme protections n'a pas permis d'observer de réduction de contamination par ces quatre virus. Ceci serait explicable par la présence d'autres parcelles expérimentales très proches et sources de virus, ainsi que par des pressions d'inoculum importantes pour le CMV. Ce dernier virus a en effet été très précoce, comparé aux années précédentes.

Mots-clés : Melon, gène *Vat*, résistance, puceron, *Aphis gossypii*, transmission de virus, CMV, WMV, ZYMV, CABYV, persistant, non-persistant, paramètres agronomiques.

ABSTRACT

The *Vat* gene confers resistances against viruses, when they are transmitted by the aphid *Aphis gossypii*. A field experiment has been designed to determine the effect of this gene on the epidemics of four viruses, and to study the incidence of adapted agronomic practices on this resistance. The *Vat* gene induced a reduction of CABYV contamination, a virus which is transmitted by aphids in the persistent manner, but not on CMV, WMV and ZYMV epidemics, three viruses which are transmitted in the non-persistent manner. The proposed explanation is that *Aphis gossypii* played a minor role in these three viruses transmission, and a major role in CABYV transmission. The use of grass and flowers bands as protections did not yield in any reduction of contamination by these four viruses. This could be explained by the proximity of other experimental fields, sources of viruses, and by important CMV inoculum pressure. Indeed, the presence of this virus was detected early, compared with previous years.

Keywords : Melon, *Vat* gene, resistance, aphid, *Aphis gossypii*, virus transmission, CMV, WMV, ZYMV, CABYV, persistent, non-persistent, agronomic practices.