



**HAL**  
open science

# Diversité de la réponse d'accessions de vigne à deux protocoles d'assainissement vis-à-vis des virus : cryothérapie et effet de l'acide salicylique

Rafaela Rodrigues Pinheiro

► **To cite this version:**

Rafaela Rodrigues Pinheiro. Diversité de la réponse d'accessions de vigne à deux protocoles d'assainissement vis-à-vis des virus : cryothérapie et effet de l'acide salicylique. *Agronomie*. 2023. dumas-04552697

**HAL Id: dumas-04552697**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04552697v1>**

Submitted on 19 Apr 2024

**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.

## Mémoire de fin d'études

Présenté pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur Agronome

Spécialité Amélioration des plantes et Ingénierie Végétale  
Méditerranéennes et Tropicales (APIMET)

Diversité de la réponse d'accessions de vigne à deux protocoles  
d'assainissement vis-à-vis des virus : cryothérapie et effet de l'acide  
salicylique.



Par Rafaela RODRIGUES PINHEIRO

Année de soutenance : 2023

### Organisme d'accueil

Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE  
Diversité, Adaptation et Amélioration de la Vigne - DAAV

# **Mémoire de fin d'études**

**Présenté pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur Agronome**

**Spécialité Amélioration des plantes et Ingénierie Végétale  
Méditerranéennes et Tropicales (APIMET)**

**Diversité de la réponse d'accessions de vigne à deux protocoles  
d'assainissement vis-à-vis des virus : cryothérapie et effet de l'acide  
salicylique.**



**par Rafaela RODRIGUES PINHEIRO**

**Année de soutenance : 2023**

**Mémoire préparé sous la direction  
de : Véronique MARIE-JEANNE**

**Présenté le : 21/09/2023**

**devant le jury :**

**Pierre BERTHOMIEU**

**Jean-Jacques KELNER**

**Anne Sophie SPILMONT**

**Organisme d'accueil : INRAE – centre de  
recherche Montpellier- Occitanie**

**Maître de stage : Philippe  
CHATELET**

## RESUME

La vigne représente l'un des fruits les plus importants sur le plan économique et historique. La production de plants exempts de virus revêt une importance cruciale pour contrôler les maladies virales. La collection de Vassal, située dans le domaine de Vassal, illustre la vaste biodiversité de la vigne. Cependant, en raison de l'élévation du niveau de la mer et de la salinisation des sols, un projet de transfert vers Pech Rouge est en cours. Avant le transfert, il est nécessaire de les assainir. Afin de garantir la préservation de la diversité génétique de la vigne et de faciliter son exportation, ce projet propose de comparer deux méthodes d'assainissement contre les virus : la chimiothérapie et la cryothérapie. Les méthodes de cryothérapie, selon le protocole de Vitrification, et de chimiothérapie avec l'ajout d'acide salicylique dans le milieu de culture et de la zeatine riboside (AS+ZR), et l'autre uniquement avec de la zeatine riboside (ZR), ont été mises en œuvre pour évaluer le taux d'assainissement vis-à-vis des virus Grapevine fleck virus (GFkV) et Rupestris Stem Pitting (RSP). L'identification des virus a été réalisée en utilisant de l'ARN total et la méthode rt-qPCR. En ce qui concerne le nombre de plantes survivantes contaminées par le virus GFkV, le traitement avec AS+ZR a entraîné la survie de 61 % des plantes, tandis que le traitement avec ZR a permis la survie de 83 % des plantes. Le traitement avec AS+ZR a également permis d'obtenir un taux de 55 % de plantes exemptes du virus GFkV, contre 70 % avec ZR seul. Une plante a été assainie avec la méthode de chimiothérapie utilisant ZR pour le virus RSP. Pour la cryothérapie, le taux de survie le plus élevé a été obtenu en utilisant une pré-culture avec AS+ZR et un milieu de régénération contenant uniquement ZR. Pour le protocole de cryothérapie, on a des résultats indéterminés en rt-qPCR en raison de contraintes dans la chambre de culture. Les résultats indiquent que le traitement par chimiothérapie avec ZR et AS+ZR se montre prometteur pour le virus GFkV.

### Mots clés

Vigne, Assainissement, Acide salicylique, Cryothérapie.

Pour citer ce document : [Rodrigues Pinheiro, Rafaela, 2023. Diversité de la réponse d'accessions de vigne à deux protocoles d'assainissement vis-à-vis des virus : cryothérapie et effet de l'acide salicylique. Mémoire de fin d'études, Diplôme d'ingénieur agronome, Spécialité Amélioration des plantes et Ingénierie Végétale Méditerranéennes et Tropicales (APIMET), L'Institut Agro Montpellier. 48 pages.]

## ABSTRACT

**Title :** Diversity of the response of grapevine accessions to two virus sanitation protocols: cryotherapy and the effect of salicylic acid.

Grapevine is one of the most economically and historically significant fruit species worldwide. Producing virus-free plants is crucial for controlling viral diseases. The Vassal collection, currently located at the Vassal estate in Marseillan (Hérault), showcases the extensive biodiversity of grapevines. However, due to rising sea levels and soil salinization, a project is underway until 2032 to transfer this collection to another location, Pech Rouge. Before the transfer, it is necessary to sanitize these plants. Therefore, to ensure the preservation of grapevine genetic diversity and facilitate its exportation, this internship project proposes to compare two virus sanitation methods: chemotherapy and cryotherapy. Cryotherapy methods, following the Vitrification protocol, and chemotherapy, involving the addition of salicylic acid to the culture medium, were implemented to evaluate the sanitation rate against Grapevine fleck virus (GFkV) and Rupestris Stem Pitting (RSP) viruses. Virus identification was performed using total RNA and the rt-qPCR method. For the chemotherapy method, two culture media were used: one with salicylic acid and zeatin riboside (AS+ZR), and the other with zeatin riboside only (ZR). Regarding the number of surviving plants contaminated with the GFkV virus, treatment with AS+ZR resulted in the survival of 61% of plants, while treatment with ZR alone allowed 83% of plants to survive. Treatment with AS+ZR also achieved a rate of 55% of virus-free GFkV plants, compared to 70% with ZR alone. Only one plant was sanitized using the chemotherapy method with ZR for the RSP virus. Concerning cryotherapy, the highest survival rate was obtained using a pre-culture with AS+ZR and a regeneration medium containing ZR only. However, virus-contaminated plants treated with the cryotherapy protocol yielded indeterminate results in rt-qPCR due to constraints in the culture chamber. The results indicate that chemotherapy treatment with ZR and AS+ZR shows promise for the GFkV virus.

### Key words

Vigne, Sanitation, Salicylic Acid, Cryotherapy.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la Coordination de l'amélioration du personnel de l'enseignement supérieur - CAPES et le gouvernement brésilien pour avoir financé mes études à l'Institut Agro et m'avoir permis de réaliser un rêve, de me surpasser et de grandir en tant que personne. Je remercie également l'Université d'État de Londrina et les enseignants responsables du programme Brafagri à l'UEL, en particulier la professeure Sandra Galbeiro.

Je remercie aussi ma tutrice de stage, Mme Véronique Marie-Jeanne, ainsi que mon encadrant, Philippe Chatelet, et la technicienne Béatrice Ramora, qui m'ont aidée tout au long de mon stage, même avec mes doutes et mes difficultés, ils étaient là pour m'enseigner.

Je suis très reconnaissante à Audrey Weber et Sylvain Santoni de m'avoir accueillie et encadrée au laboratoire de génotypage.

Je remercie également l'Institut Français de la Vigne et du Vin en la personne d'Anne-Frédérique Sevin pour la fourniture de sondes et amorces ainsi que de leur mode.

Un grand merci à Dominique This, Patrice This et toute l'équipe DAAV qui m'ont accueillie. Si ce n'était pas pour vous, je n'aurais pas eu l'incroyable opportunité de stage que j'ai eue.

Je remercie l'équipe d'échange de l'Institut Agro, en particulier Mme Claudia Medina, qui m'a aidée dans le processus d'échange, dès avant mon arrivée à Montpellier.

Merci à toute l'équipe du bâtiment ARCAD. J'ai eu des moments très spéciaux avec vous, je me suis sentie très bien accueillie. Vous avez rendu mes journées meilleures et plus joyeuses.

Je remercie beaucoup mes collègues APIMET, qui ont été avec moi tous les jours, m'ont aidée dans mes doutes, dans les travaux et dans la vie quotidienne.

Je remercie tous les professeurs APIMET pour leur patience à mon égard, malgré mes difficultés avec le cours et la langue, vous avez faites des efforts pour m'aider à avoir la meilleure expérience possible.

Enfin, Je remercie les Brésiliens qui étaient là avec moi en 2022-2023, vous avez été ma famille à Montpellier.

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	3
ABSTRACT .....	4
REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES.....	6
AVANT-PROPOS .....	7
GLOSSAIRE.....	8
SIGLES ET ACRONYMES.....	9
Introduction.....	10
1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1.1. Les méthodes d'assainissement.....	11
1.1.1. La migrogreffage d'apex.....	11
1.1.2. La cryothérapie : méthode issue de la cryopréservation .....	12
1.1.3. La chimiothérapie .....	13
1.2. Stabilité génétique .....	13
1.3. Problematique et objectif du stage .....	14
2. MATERIELS ET METHODES.....	15
2.1. Matériel utilisé.....	15
2.2. Preparation de plantes pour les méthodes d'assainissement utilisés...	15
2.3. Protocole de cryothérapie.....	16
2.4. Chimiothérapie avec Acide salicylique (AS) .....	17
2.5. Identification des virus .....	18
2.6. Analyse Statistique .....	18
3. RESULTATS ET DISCUSSION .....	18
3.1. Variation Somaclonale.....	18
3.2. Chimiothérapie avec AS + ZR .....	19
3.2.1. % de plantes survivantes .....	19
3.2.2. % de plantes assainis.....	20
3.3. Cryothérapie .....	23
CONCLUSION .....	26
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	28
ANNEXES .....	32

## AVANT-PROPOS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour tout ce que j'ai vécu au cours de mon année 2022-2023 à l'Institut Agro et à l'INRAE. Je me sens privilégiée d'avoir vécu d'incroyables moments, d'avoir rencontré des personnes merveilleuses et de m'être challengée au quotidien. Mon parcours jusqu'ici n'a pas été facile, mais j'ai donné le meilleur de moi-même.

Je poursuis désormais mon chemin à la recherche de l'amélioration personnelle, dans l'espoir qu'un jour je puisse devenir une grande chercheuse. J'espère qu'avec ma carrière et mon expérience, je pourrai contribuer à la société et à l'environnement.

Avec tout cela, je suis reconnaissante envers ceux qui ont été à mes côtés jusqu'à présent, envers chaque personne qui a croisé ma route et m'a transformée en la personne que je suis aujourd'hui

Sapere aude!

## GLOSSAIRE

**Microgreffage d'apex** : le processus de prise d'un apex exempt de virus à partir d'une plante infectée, suivi de son greffage in vitro sur un hypocotyle d'un plant issu de semis.

**Chimiothérapie** : une méthode qui utilise des substances antivirales.

**Cryoconservation** : une méthode qui permet le stockage de cellules vivantes, de tissus et d'organes dans de l'azote liquide.

**Cryothérapie** : découle des protocoles de cryoconservation et vise à éliminer les virus dans les plantes en utilisant des cultures de méristèmes apicaux.

**Variation somaclonale** : se caractérise par la variation phénotypique observée après la culture in vitro, qui peut être causée par des variations génétiques ou être due à des effets épigénétiques.

**Culture de méristème** : une méthode qui consiste à prélever le cœur d'un bourgeon ou l'extrémité d'une racine où se trouve le méristème, une zone de cellules qui se divisent activement pour assurer la croissance de la plante.

**Thermothérapie** : le traitement des plantes à des températures élevées pendant une période prolongée.

## SIGLES ET ACRONYMES

**AS** : Acide salicylique

**ZR** : Zeatine Riboside

**MS** : Murashige et Skoog

**CP** : Chee et Pool

**LS** : Loading Solution (solution de chargement)

**US**: Unloading solution (solution de rançage)

**PVS 2** : Plant vitrification solution 2

**GRSPaV** : Grapevine rupestris stem pitting-associated virus

**RSP** : Rupestris Stem Pitting virus

**GLRaV** : Grapevine leafroll-associated virus

**GFLV** : Grapevine Fanleaf Virus

**GFkV**: Grapevine fleck virus

**LN** : azote liquide

**RAPD** : Marqueur de polymorphisme aléatoire amplifié

**qPCR** : PCR quantitative

## INTRODUCTION

La vigne (genre *Vitis*) est l'un des fruits les plus importants sur le plan économique et historique dans le monde entier. En 2021, la surface totale plantée en vigne dans le monde est estimée à 7,3 millions d'hectares, englobant toutes les plantations de vignes destinées à la production de vin, de jus, de raisins de table et de raisins secs (OIV, 2022). Cultivé depuis l'Antiquité, le genre *Vitis* compte environ 80 espèces et 5000 cultivars de *Vitis vinifera* disponibles dans le monde entier (This et al., 2006).

La vigne est une plante propagée de manière végétative, notamment par bouturage et greffage. Cette méthode de propagation a entraîné la transmission de virus de génération en génération, provoquant une accumulation de titres viraux due à des événements de propagation. De plus, les boutures contaminées peuvent transmettre le virus par greffage à l'autre partenaire de l'assemblage porte-greffe/variété. Comme la vigne est une plante pérenne, elle a tendance à accumuler les agents infectieux, causant des pertes économiques en raison de leurs effets négatifs sur le rendement et la qualité (BI et al., 2017).

En effet, la vigne peut être infectée par plus de 80 entités virales différentes, qui causent ou sont associées à des maladies économiquement dommageables (Martelli, 2017). Selon la réglementation européenne (Directive 1968/193/CEE), le matériel sélectionné ne doit pas être porteur de viroses telles que la maladie de l'enroulement Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV type 1 et 3), le court-noué provoqué par les virus Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) et Arabis Mosaic Virus (ArMV) et la marbrure Grapevine fleck virus (GFkV), uniquement pour les porte-greffes.

La production de plantes exemptes de virus est cruciale pour contrôler les maladies virales, importer de nouveaux cultivars d'autres pays, échanger des matériaux de sélection entre pays ou régions, et préserver le germplasma végétal. Les techniques *in vitro* sont considérées comme les approches les plus efficaces pour assainir les plantes (WANG et al., 2018). Les méthodes standard pour obtenir des plants de vigne exempts de virus comprennent la thermothérapie, la chimiothérapie, la culture de méristème et le micro-greffage d'apex, qui présentent différentes efficacités d'assainissement en fonction du virus et du génotype de la plante (Annexe 1) (Nuzzo, 2022).

La collection de Vassal est un exemple de la vaste biodiversité de la vigne, cette collection compte plus de 8500 accessions provenant de 50 pays différents. Actuellement, la collection est située dans le domaine de Vassal à Marseillan (Hérault) sur le cordon littoral sableux indemne d'agents pathogènes tels que Phylloxéra et le nématode *Xiphinema index*. Le domaine permet donc de cultiver la vigne franche de pied et d'éviter le greffage. Cependant, en raison de l'élévation du niveau de la mer et de la salinisation des sols, un projet est en cours jusqu'en 2032 pour la transférer à Pech Rouge, protégeant ainsi cette diversité génétique, qui présente un fort potentiel d'amélioration variétale pour la vigne. Selon Névine Kocher, cheffe du projet de transfert, deux tiers des pieds portent des virus et avant de les réimplanter, il faut les assainir, les débarrasser des virus et les regreffer, car l'assainissement et le greffage sont rendus obligatoires du fait de l'implantation du matériel sur un sol non sableux. Ainsi, pour garantir la préservation de la diversité génétique de la vigne et faciliter son exportation, ce projet de stage propose de comparer deux méthodes d'assainissement contre les virus : la chimiothérapie et la cryothérapie. En proposant des méthodes d'assainissement efficaces, l'objectif est de faciliter la réimplantation de la vigne.

## **1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1.1. Les méthodes d'assainissement**

#### **1.1.1. La migrogreffage d'apex**

Actuellement, la méthode la plus couramment utilisée en France pour produire des plantes exemptes de virus est le micro-greffage d'apex en combinaison avec la thermothérapie. De nombreux clones certifiés diffusés en France ont été obtenus par cette technique, qui a été confirmée comme étant efficace pour éliminer 7 virus importants de la vigne (Spilmont et al., 2012). Cette approche implique la prise d'un apex exempt de virus à partir d'une plante infectée, suivi de son greffage in vitro sur un hypocotyle d'un plant issu de semis. Une étude menée par Miljanić et al (2022) a obtenu des taux élevés d'élimination de 8 viroses et 2 viroïdes dans 6 cultivars de vignes ; cependant, seuls 51 plants ont été régénérés à partir de 598 méristèmes microgreffés. Ces faibles taux de régénération peuvent être attribués au fait que les petits méristèmes ont des taux de survie faibles et peuvent également être liés au fait que l'isolement des méristèmes et les techniques de microgreffage sont difficiles à manipuler et nécessitent un haut niveau d'expertise ainsi qu'une manipulation rapide

pour éviter le dessèchement des explants et les problèmes d'oxydation (Miljanić et al., 2022).

### **1.1.2. La cryothérapie : méthode issue de la cryopréservation**

La cryoconservation est une méthode qui permet le stockage des cellules vivantes, de tissus et d'organes dans l'azote liquide et, lorsqu'ils sont conservés à de telles températures, la division cellulaire et les processus métaboliques sont interrompus et peuvent être conservés théoriquement pour un temps indéfini (Wang et al., 2014). La cryothérapie découle des protocoles de cryoconservation et vise à éliminer les virus dans les plantes en utilisant des cultures de méristèmes apicaux. L'assainissement est réalisé lorsque l'exposition à l'azote liquide à  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  élimine les cellules plus âgées et fortement vacuolisées qui portent l'infection, tandis que les cellules méristématiques plus petites et hautement compactes, avec un rapport noyau/cytoplasme élevé dans le méristème apical, sont généralement exemptes de virus et peuvent régénérer des plantes saines (Bhojwani et al., 2013). Par rapport à d'autres méthodes d'éradication des virus, la cryothérapie présente des avantages tels que la facilité de manipulation des méristèmes, l'absence de besoin d'équipements spéciaux et coûteux, ainsi que la capacité à traiter un grand nombre d'échantillons. Néanmoins, elle nécessite la manipulation et le stockage d'azote liquide. La principale limitation de la cryothérapie pour produire du matériel végétal exempt de virus réside dans la réponse variable de chaque génotype aux traitements cryogéniques.

Plusieurs méthodes sont utilisées en cryothérapie, telles que l'encapsulation-déshydratation, la vitrification, la vitrification en gouttes et l'encapsulation-vitrification. Chaque protocole utilise des éléments pour éliminer l'eau des cellules, réduisant ainsi les dommages causés par la formation de cristaux de glace (Kaczmarczyk et al., 2012). Le protocole de cryothérapie utilisé pendant la période de stage était la vitrification. Cette technique consiste à traiter des tissus avec un mélange concentré de cryoprotecteurs puis à les refroidir dans de l'azote liquide. Cette méthode empêche la nucléation de l'eau et la formation de cristaux de glace grâce à la combinaison de concentrations élevées de solutés intracellulaires et à un refroidissement rapide (Bettoni et al., 2021). Cette méthode est largement utilisée pour la cryoconservation grâce à sa facilité d'utilisation, la reproductibilité et la grande variété d'espèces à

structure tissulaire complexe (comme les méristèmes et les embryons) qui ont été soumises à cette procédure (Kaczmarczyk et al., 2012).

### **1.1.3. La chimiothérapie**

La chimiothérapie est une méthode qui utilise des substances antivirales, parfois combinées avec d'autres méthodes telles que la thermothérapie. Dans le cas de la vigne, l'un des produits les plus couramment utilisés en chimiothérapie est la Ribavirine. Cependant, des études ont démontré que ces substances chimiques ont un effet phytotoxique sur la croissance et le développement des plantes in vitro (Panattoni et al., 2007). En réponse à cela, d'autres produits sont testés, tels que l'acide salicylique.

L'utilisation de l'acide salicylique dans les études a augmenté en raison de son effet sur l'augmentation du taux de régénération des plantes après la cryothérapie (Pathirana et al., 2016), ainsi que de son action antivirale. L'application exogène d'acide salicylique déclenche la mise en place de systèmes antioxydants pour réduire le stress oxydatif causé par les infections pathogènes, notamment les virus. La biosynthèse de l'acide salicylique est activée lorsque les effecteurs viraux sont reconnus par les produits des gènes R. Cette activation de l'interaction induit plusieurs réponses pour inhiber la multiplication du virus sur le site d'infection (Dempsey et al., 2011). Dans une étude, Kidulile et al. (2018) ont testé l'effet de l'acide salicylique comme méthode d'élimination des begomovirus de la mosaïque du manioc (CMBs). Dans cet article, ils ont obtenu une élimination de 88,9 % des CMBs en utilisant une concentration de 30 mg/L d'acide salicylique, mais seulement 18,8 % des plantes ont survécu. Ils ont observé que l'augmentation de la concentration antivirale réduisait le pourcentage de survie des plantes. Le nombre de plantes régénérées à partir du traitement à l'acide salicylique à 10 mg/L était de 66,7 % et l'élimination du virus était de 68,8 %. En ce qui concerne la vigne, aucune étude n'a été faite en utilisant l'acide salicylique comme méthode d'assainissement.

## **1.2. Stabilité génétique**

La variation somaclonale se caractérise par la variation phénotypique observée après la culture in vitro, qui peut être causée par des variations génétiques, c'est-à-

dire, un changement de la séquence de l'ADN ; ou être due à des effets épigénétiques, où il y a une variation de l'expression du gène due à la méthylation des bases sans changer la séquence de l'ADN. La fréquence de variation somaclonale induite in vitro est déterminée par plusieurs facteurs, tels que l'origine et la composition génétique de l'explant, la durée de culture, l'ajout des régulateurs de croissance et le stress oxydatif (Emaru et Rwotonen, 2021). Cependant, la variation de l'expression des gènes peut également être liée à une infection virale. Par exemple, Cui et al. (2017) ont étudié l'infection par GLRaV-3 comme le facteur déterminant dans l'augmentation de l'accumulation d'anthocyanes en amplifiant les niveaux d'expression de deux gènes clés : UFGT et MYBA1. Ils ont utilisé le système de culture in vitro qui a fourni un environnement stable pour étudier les effets d'une seule souche de virus et du stress hydrique sur la teneur en anthocyanes et les niveaux d'expression des gènes associés dans les feuilles de vigne. Ils ont constaté que l'impact du stress hydrique renforçait encore l'accumulation d'anthocyanes dans les feuilles de vitroplants de vigne 'Cabernet Sauvignon' en association avec l'infection par GLRaV-3.

En ce qui concerne la cryothérapie, des études indiquent que le risque de variation somaclonale lors d'une cryothérapie à court terme est minime. Cependant, il est crucial de vérifier la stabilité génétique des plantes régénérées (Jiroutová et Sedlák, 2020). Par exemple, une étude portant sur des boutures des cultivars "Cabernet franc", "Chardonnay", "Fengh 51" et "LN3", cryoconservées par la méthode d'encapsulation-déshydratation, n'a révélé aucune différence dans les schémas d'ADN entre les plantules témoins et les plantules cryoconservées, utilisant un marqueur de polymorphisme aléatoire amplifié (RAPD). Cependant, il convient de noter que les marqueurs utilisés ne couvraient qu'une petite partie du génome, environ 0,004 à 0,06 % (Zhai et al., 2003).

### **1.3. Problématique et objectif du stage**

Étant donné le potentiel du traitement à l'acide salicylique et de la cryothérapie en tant que méthodes d'obtention de plants de vigne exempts de virus, le présent travail vise à comparer ces deux techniques, seules ou en combinaison, en tant que moyens d'assainissement et à proposer des méthodes de désinfection efficaces pour faciliter l'obtention des plantes saines. De plus, cette recherche contribuera aux études sur la cryothérapie et la cryoconservation des vignes, en particulier pour les vignes

sauvages qui ont été peu étudiées dans ce contexte. De même, l'utilisation de l'acide salicylique comme moyen d'assainissement, qui n'a jamais été testé sur la vigne, sera explorée. L'objectif est donc de proposer des protocoles alternatifs pour l'obtention de vignes saines, tant pour les espèces cultivées que pour les espèces sauvages, tout en préservant la diversité génétique.

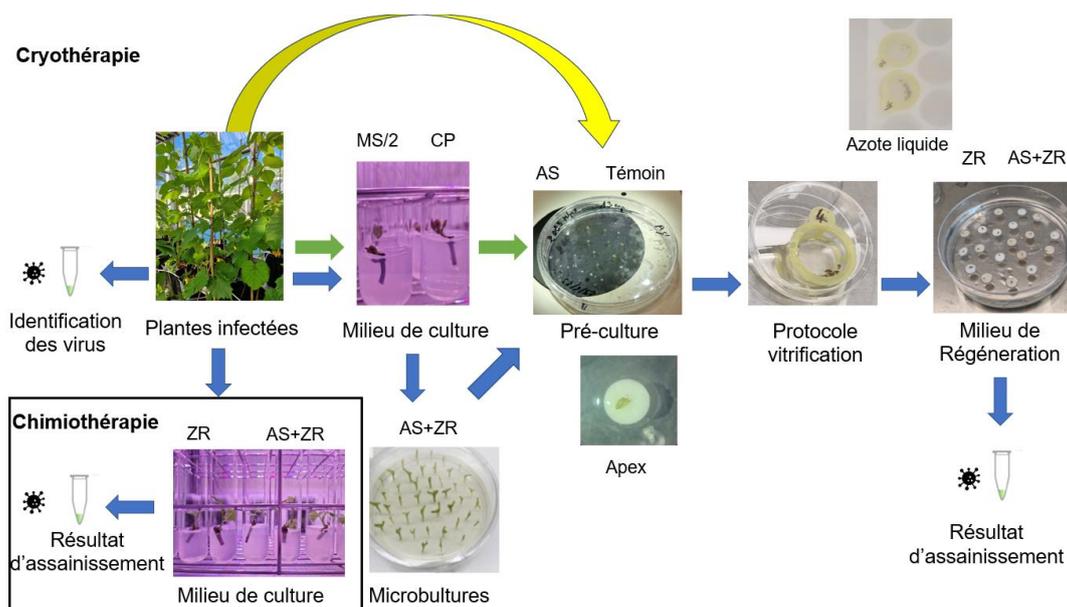
## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Matériel utilisé**

Comme indiqué dans l'annexe 2, 8 variétés différentes ont été récoltées à partir de plantes préalablement infectées par le virus de la marbrure (Grapevine fleck virus - GFkV) et le virus de la cannelure (Rupestris stem pitting - RSP). Les virus ont été identifiés chez les plantes en utilisant la méthode rt-qPCR. Les microboutures ont été prélevées dans une serre située au CIRAD – Montpellier, pour les plantes de vigne sauvage, tandis que les plantes de *Vitis vinifera* proviennent de la collection de germplasm de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Vassal en France.

### **2.2. Preparation de plantes pour les méthodes d'assainissement utilisés**

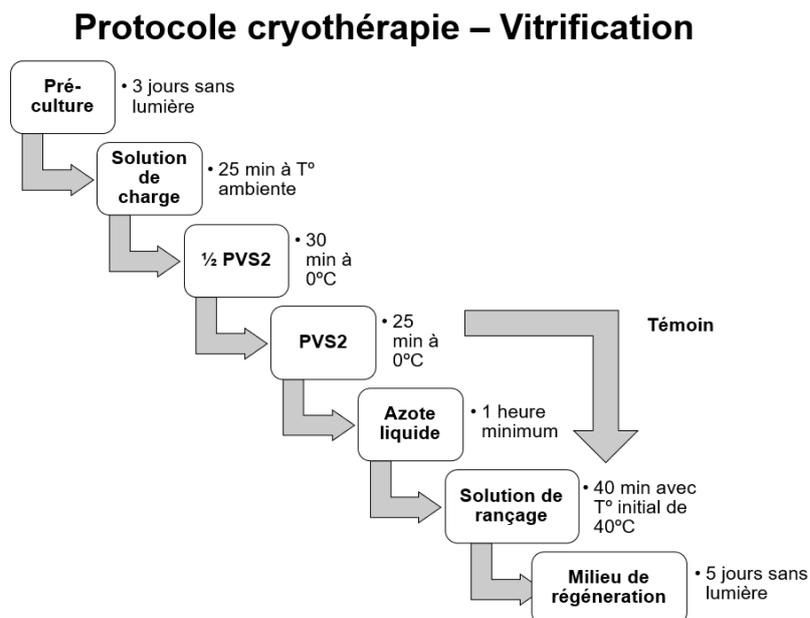
Après la récolte, les microboutures ont été extraites et cultivées dans deux milieux de culture différents : ½ MS modifié (Murashige et Skoog 1962) et Chee & Pool (1987). Les cultures ont été maintenues à  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sous un photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, avec une mélange de longueurs d'onde fournie par des lampes à LED. Les plantes in vitro ont été conservées pendant un mois avant d'être utilisées pour des expériences de cryopréservation (Figure 1).



**Figure 1.** Les étapes réalisées pour mettre en œuvre la méthodologie. Les flèches bleues correspondent au traitement "Standard", c'est-à-dire que les plantes infectées sont collectées, puis les traitements sont placés dans un milieu de culture in vitro et, après leur croissance, ils sont multipliés en microboutures avec AS. À partir de là, le traitement suit le protocole prévu et commun à tous les traitements : pré-culture (AS ou Témoin), protocole de cryothérapie, milieu de régénération (AS+ZR ou ZR) et résultat d'assainissement. Le génotype 0MTP945 et les variétés Isabelle et Israella ont suivi cette séquence. Les flèches vertes correspondent aux expériences qui n'ont pas passé par les microboutures dans les boîtes de Petri, c'est-à-dire que les apex ont été prélevés directement à partir du milieu de culture in vitro et placés directement dans le milieu de pré-culture avec AS, puis le protocole a été poursuivi. Les plantes de vigne Isabelle, Israella et Novo-Mexicana ont suivi cette procédure. La flèche jaune correspond au traitement dans lequel les apex sont prélevés et passés directement à la pré-culture, puis la méthodologie est poursuivie (flèches bleues). Les génotypes 68MTP2 et 2023MTPX ont suivis cette procédure. CP: Chee et Pool. MS/2: ½ Murashige et Skoog. As: Acide salicylique. ZR: zeatine riboside.

### 2.3. Protocole de cryothérapie

La méthode de cryothérapie, obtenue à partir du protocole de vitrification, a été mis en place comme le montre la figure 2.



**Figure 2.** Les étapes réalisées pour mettre en œuvre le protocole de cryothérapie – vitrification.

Les méristèmes apicaux ont été extraits à partir des plantes *in vitro* ou des microboutures dans des boîtes de Petri et placés dans une autre boîte de Petri avec un milieu de pré-culture, pendant 3 jours sans lumière. Après les trois jours, les explants ont été immergés dans la solution de chargement (LS) pendant 25 minutes à température ambiante. Consécutivement, les explants ont été rincés dans les paniers avec 5 ml de ½ Plant vitrification solution 2 (PVS2) glacée et laissés dans du ½ PVS2 frais pendant 30 minutes à 0°C, puis pendant 50 minutes à 0°C avec PVS2. Ensuite, le panier a été directement plongé dans l'azote liquide. Après avoir passé au moins une heure dans l'azote liquide, les échantillons ont été transférés dans la solution de rinçage préalablement chauffée à 40°C pendant 40 minutes. Les explants ont ensuite été transférés sur des disques de cellulose stériles dans le milieu de récupération, dans l'obscurité, pendant cinq jours avant d'être exposés à la lumière. Le témoin a été exposé à toutes les solutions en séquence, à l'exception de l'azote liquide.

#### 2.4. Chimiothérapie avec Acide salicylique (AS)

Les méristèmes (apex et les ramifications latérales) préalablement infectés par des virus ont été récoltés sur des plantes en pot, désinfectés et ont été mis sur ½ MS avec deux milieux de culture différents : le traitement avec 1 µMol zeatine riboside +

0.05 mM d'acide salicylique et le témoin avec seulement 1  $\mu$ Mol zeatine riboside. Les explants ont été conservés in vitro pendant 2-3 mois et après les feuilles ont été récoltées pour vérifier le résultat d'assainissement.

## **2.5. Identification des virus**

25 mg de feuilles ont été prélevés de chaque échantillon pour effectuer une extraction totale d'ARN à l'aide du kit "Espectrum plant kit" de Sigma. Ensuite, les ARN ont été analysés à l'aide des équipements SPARK et Fragment Analyser pour évaluer la quantité et la qualité des ARN extraits. Pour l'identification des virus ARN GFkV et RSP, les kits Sybr Green et Luna Universal Probe Biolabs ont été respectivement utilisés, suivis d'une rt-qPCR réalisée avec l'équipement LightCycler96. Les amorces et les programmes de la rt-qPCR utilisés après la désinfection sont répertoriés dans le tableau supplémentaire 3.

En utilisant la rt-qPCR, pour déterminer si un échantillon est positif, il doit présenter une courbe positive (exprimée en nombre de cycles PCR) et une forme de courbe sigmoïde (avec une pente  $> 0,5$ ). Comme il n'y a pas de témoin de quantification permettant de déterminer si un échantillon est positif ou non, certaines courbes produisent des résultats indéterminés, comme indique l'annexe 3.

## **2.6. Analyse Statistique**

Les tests de proportions et le test t ont été utilisés avec un seuil d'erreur de 5% dans le programme R Studio pour évaluer les différences entre les taux de réussite des traitements par chimiothérapie et cryothérapie et le taux d'assainissement par chimiothérapie pour le virus GFkV.

# **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

## **3.1. Variation Somaclonale**

Comme l'objectif de ce travail est de réaliser la multiplication de clones exempts de virus tout en maintenant leur identité génétique, le protocole utilisé ici vise à minimiser les chances de survenue d'une variation somaclonale. En effet, les explants ne subissent pas de processus susceptibles d'induire une variation génétique, tels que l'utilisation de fortes doses d'hormones, la régénération à partir de cal ou une

multiplication rapide. Ainsi, dans un premier temps, cela réduit les risques de variation somaclonale. Cependant, comme mentionné précédemment, d'autres facteurs peuvent entraîner des changements génétiques ou épigénétiques, qu'ils soient préexistants, liés à l'environnement "in vitro" ou provoqués par l'infection virale.

Dans le cas pratique que nous envisageons, qui consiste à transférer les vignes de Vassal afin de vérifier l'identité génétique des plantes exemptes de virus, l'une des options serait d'utiliser des marqueurs moléculaires. Cependant, comme indiqué précédemment, ces marqueurs ne couvrent qu'une partie du génome et ne permettent pas de détecter complètement d'éventuelles altérations du génome. Une autre option serait le séquençage complet du génome, mais cela serait coûteux et peu réalisable pour toutes les explants ayant suivi le protocole d'assainissement. Ainsi, il reste la possibilité de vérifier, après avoir suivi le protocole d'assainissement, si les plantes correspondent phénotypiquement et morphologiquement aux plantes d'origine. Cependant, si des variations somaclonales sont observées phénotypiquement, afin de mieux comprendre les causes de la variation somaclonale, il est essentiel de réaliser des tests pour déterminer les possibles causes des altérations génétiques et comment minimiser cet impact.

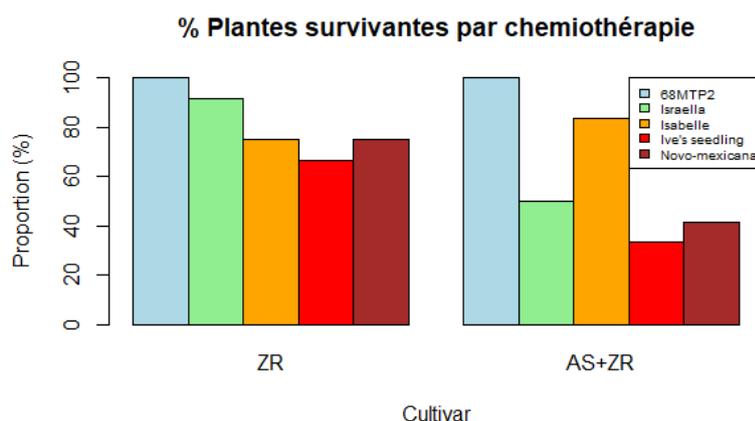
## **3.2. Chimiothérapie avec AS + ZR**

### **3.2.1. % de plantes survivantes**

Comme le montre le tableau 1 et le graphique à barres (figure 3), les plantes analysées dans le milieu de culture ZR ont présenté un taux de survie plus élevé que les plantes du milieu avec AS+ZR. Cependant, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les taux de survie des traitements AS+ZR et ZR pour les différentes variétés. Les tests de proportions et le test t n'ont pas révélé de différences significatives dans les taux de réussite entre ces deux traitements.

**Tableau 1.** Pourcentage des plantes survivantes en milieu de culture AS+ ZR ou ZR.

Espèce/Cultivar	Plantes survivantes (%)	
	ZR	AS + ZR
68Mtp2	(12/12) 100,00	(11/11) 100,00
Isabelle	91,67 (11/12)	50,00 (6/12)
Israella	75,00 (9/12)	83,33 (10/12)
Ive's seedling	66,67 (8/12)	33,33 (4/12)
Novo-mexicana	75,00 (9/12)	41,67 (5/12)
Total	83,33 (50/60)	61,01 (36/59)



**Figure 3.** Proportion de plantes survivantes en pourcentage pour différentes cultivares dans le milieu de culture avec AS+ZR ou ZR.

Il est important de noter que les différences entre les traitements et les variétés ne sont pas statistiquement significatives, bien que certaines variétés montrent des tendances à des taux de survie plus élevés que d'autres.

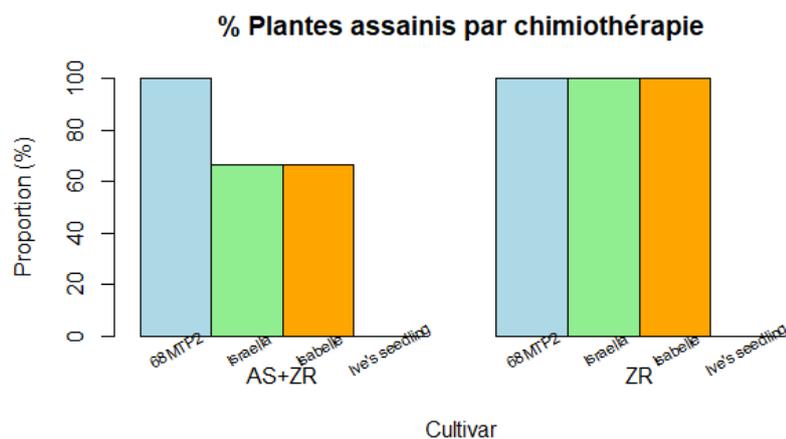
### 3.2.2. % de plantes assainis

Comme indiqué dans le graphique à barres (figure 4) et le tableau 2, les plantes analysées dans le milieu de culture ZR ont présenté un taux d'assainissement plus

élevé que les plantes du milieu avec AS+ZR pour le virus GFkV. Cependant, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les taux d'assainissement des traitements AS+ZR et ZR pour les différentes variétés. Les tests de proportions et le test t n'ont pas révélé de différences significatives dans les proportions de succès entre ces deux traitements.

**Tableau 2.** % de plantes assainis pour le virus GFkV dans le milieu de culture avec AS+ZR et ZR.

Espèce/Cultivar	% Plantes assainis	
	AS+ZR	ZR
68MTP2	(1/1) 100%	(1/1) 100%
Israella	(6/9) 66,67%	(3/3) 100%
Isabelle	(4/6) 66,67%	(3/3) 100%
Ive's Seedling	(0/4) 0%	(0/3) 0%
Total	(11/20) 55%	(7/10) 70%



**Figure 4.** Pourcentage de plantes assainies par chimiothérapie pour le virus GFkV. Le graphique à barres représente le pourcentage d'assainissement par cultivar dans les milieux de culture AS+ZR et ZR.

Comme le montre le tableau 3, pour le virus RSP, une seule plante a été assainie avec le traitement utilisant ZR. Par conséquent, en raison du faible nombre de plantes utilisées pour identifier la présence ou l'absence de virus dans les plantes traitées, il est recommandé de répéter le test. Des études montrent que, pour le virus GRSPaV, 50 % des plantes ont été assainies avec plus de 78 % de régénération en utilisant la méthode de chimiothérapie (ribavirin à 25 µg mL<sup>-1</sup>) avec thermothérapie (Hu et al., 2021), et 100 % des plantes ont été assainies par la méthode de thermothérapie in vivo et la microgreffe in vitro (Miljanić et al., 2022).

**Tableau 3.** Nombre de plantes exemptes de virus (négatives), contaminées (positives) ou indéterminées pour les plantes contaminées par le virus RSP, traitées avec : AS+ZR ou ZR.

Traitement	Indéfini	Positive	Negative
AS + ZR	(0/0)	(10/10)	(0/10)
ZR	(0/0)	(2/2)	(1/3)

Même les résultats ne montrant pas de différences statistiquement significatives entre les traitements avec AS+ZR et ZR, l'utilisation d'acide salicylique dans le milieu de culture peut entraîner la désinfection d'un apex. L'hypothèse de la désinfection due à la collecte du méristème uniquement est écartée, car une microbouture a été utilisée, c'est-à-dire deux entre-nœuds d'une plante contaminée. Cependant, des tests supplémentaires doivent être réalisés avec un plus grand nombre de plantes pour vérifier l'efficacité de la méthode. De plus, la désinfection des plantes avec le milieu de culture ZR s'est également révélée efficace. Des travaux récents ont révélé que les cytokinines d'origine végétale renforcent l'immunité des plantes en conjonction avec la signalisation de l'acide salicylique (SA). Ces études suggèrent que l'accumulation de cytokinines d'origine végétale conduit à une morphologie modifiée et à une résistance à l'infection virale, au moins en partie, par l'intermédiaire de l'accumulation de SA (Choi et al., 2011).

Une étude de Babosha (2019) a analysé l'application de SA et de zéatine a montré des résultats avec à la fois une augmentation significative et une diminution de la susceptibilité des plantes. Dans cette étude, 100 µM de SA ont montré une forte augmentation de la susceptibilité à 1 et 3 µM de zéatine par rapport aux données des concentrations concomitantes de zéatine sans SA. Ces résultats (100 µM de SA et 1

$\mu\text{M}$  de zéatine) correspondent exactement à la quantité utilisée pour le milieu de culture analysé, confirmant ainsi le travail antérieur selon lequel l'activité immunomodulatrice du SA peut dépendre de la régulation par la cytokinine.

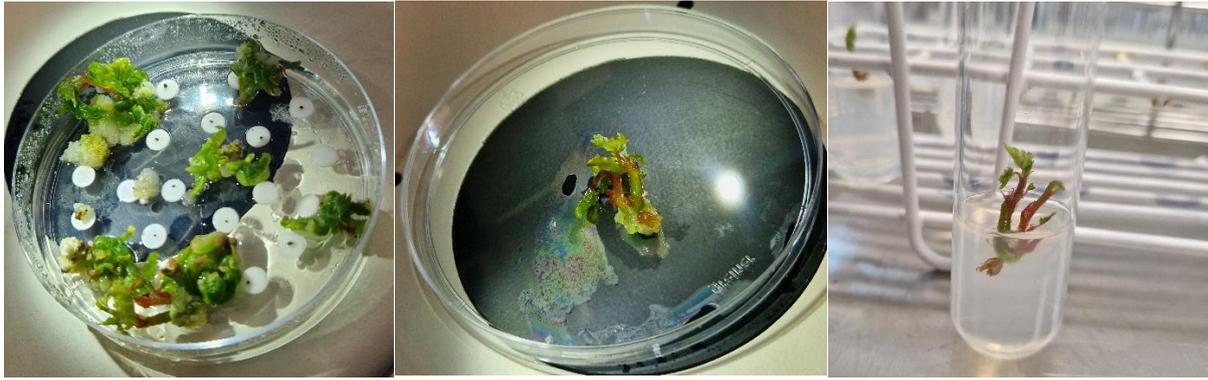
De même, Kidulile et al. (2018) ont testé l'effet de l'acide salicylique comme méthode d'élimination des begomovirus de la mosaïque du manioc (CMBs). Le nombre de plantes régénérées à partir du traitement à l'acide salicylique à 10 mg/L était de 66,7 %, et l'élimination du virus était de 68,8 %. De manière similaire à ce travail, le pourcentage de plantes survivantes a été de 83,33 % et de plantes assainies de 55 % pour le virus GFkV pour le traitement avec AS+ZR. Ainsi, la méthode de chimiothérapie a présenté des résultats encourageants pour ce type de méthode d'assainissement de la vigne, en utilisant à la fois AS+ZR ou ZR dans le milieu de culture. Cependant, la même efficacité n'a pas été observée pour le virus RSP. Si elle se révèle efficace, la méthode de chimiothérapie sera la meilleure en termes de coût, de temps, de facilité de manipulation et de régénération.

### 3.3. Cryothérapie

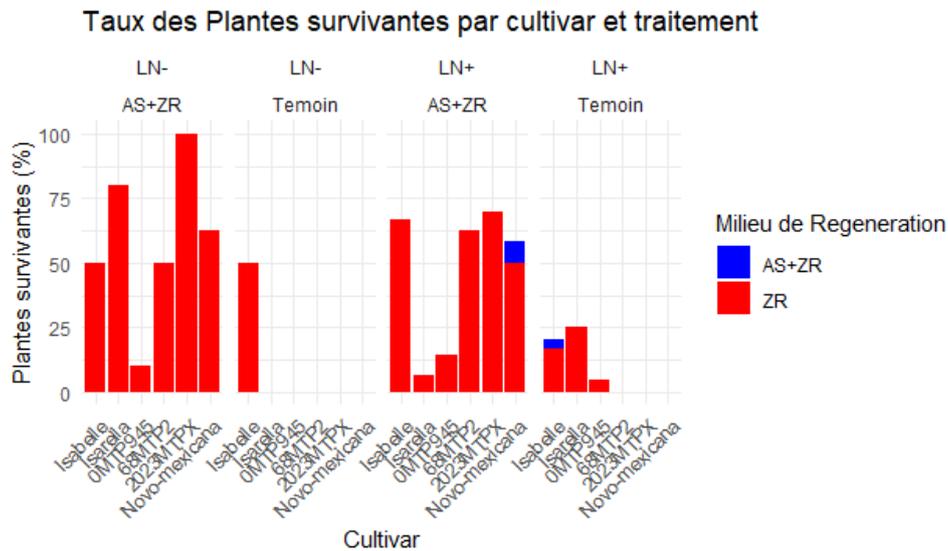
Les figures 5 et 6 montrent la formation de tigelles sur des explants trois mois après avoir subi le traitement par cryothérapie. Sur la figure 6, la tigelle de la plante après le processus de cryothérapie est présente dans le tube afin de pouvoir poursuivre le développement de la plante.



**Figure 5.** Formation de tiges à partir des apex des plantes selon le protocole de cryothérapie, photos prises le 18/07/2023. À gauche : Isabelle LN + (26/05). À droite : Novo-mexicana (26/06).



**Figure 6.** Développement de tigelles à partir de l'apex après 3 mois de mise en place du protocole de cryothérapie. De gauche à droite : boîte de régénération avec les explants issus du traitement cryogénique. La récupération des tigelles, une fois développées, dans des tubes avec un milieu de culture.



**Figure 7.** Taux de plantes survivantes selon le protocole de cryothérapie. % par rapport à chaque cultivar et au milieu de pré-culture : AS ou témoin, ainsi qu'à la passage (LN +) ou non (LN -) dans l'azote liquide. La couleur rouge représente le % de plantes survivantes ayant utilisé ZR dans le milieu de régénération, tandis que la couleur bleue indique l'utilisation de AS+ZR.

Pour le test t à un échantillon, nous avons comparé les taux de survie des plantes entre les traitements LN+ et LN- pour chaque cultivar. Les résultats montrent que, pour chaque cultivar, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les taux de survie des plantes dans les deux traitements. Les valeurs de p sont toutes supérieures à 0,05, ce qui suggère que les taux des plantes survivantes dans les deux traitements ne sont pas significativement différents.

Comme observé dans la figure 7, la plupart des plantes survivantes sont celles qui n'ont pas été soumises à l'azote liquide (LN-), ayant subi la pré-culture AS+ZR et le milieu de régénération contenant uniquement ZR. Pour les plantes ayant été exposées à l'azote liquide (LN+), elles ont été préalablement soumises à la pré-culture AS+ZR avec un milieu de régénération contenant ZR uniquement. Pour les traitements ayant utilisé AS+ZR dans le milieu de régénération, la combinaison de la pré-culture témoin x LN+ x milieu de régénération AS+ZR a obtenu 1/26 plantes pour la cultivar Isabelle, tandis que la combinaison de la pré-culture AS+ZR x LN+ x milieu de régénération AS+ZR a obtenu 1/12 pour la cultivar Novo-mexicana. Ces résultats confirment les travaux de Pathirana et al., (2016), selon lesquels l'utilisation de l'acide salicylique dans le milieu de pré-culture augmente le taux de régénération des plantes soumises à la méthode de cryothérapie.

Les tableaux 6 et 7 présentent le nombre de plantes contaminées (positives), exemptes de virus (négatives) et indéterminées pour les virus GFkV et RSP respectivement. Avec l'analyse par rt-qPCR, il n'a pas été possible de déterminer si l'échantillon était effectivement contaminé ou non, soit parce qu'il présentait un cycle PCR très tardif, soit parce que la pente était également très basse.

**Tableau 6.** Nombre de plantes contaminées (positives), assainies (négatives) ou présentant un statut indéterminé pour le virus GFkV dans le témoin LN- et le traitement à l'azote liquide LN+.

Traitement	Indéfini	Positive	Négative
LN -	(6/7)	(0/7)	(1/7)
LN +	(14/14)	(0/14)	(0/14)

**Tableau 7.** Nombre de plantes contaminées (positives), assainies (négatives) ou présentant un statut indéterminé pour le virus RSP dans le témoin LN- et le traitement à l'azote liquide LN+.

Traitement	Indéfini	Positive	Négative
LN -	(2/2)	(0/2)	(0/2)
LN +	(3/4)	(1/4)	(0/4)

Malheureusement, la plupart des résultats analysés par le traitement de cryothérapie se sont révélés indéterminés, ne permettant pas de déterminer s'ils sont

assainis ou non. Ce résultat est dû aux incidents survenus pendant la période de stage. Après que les explants ont subi le processus de cryothérapie, il faut attendre que les explants forment des tigelles, et à partir de celles-ci, l'analyse est réalisée pour vérifier la présence/absence de virus. Cependant, pendant la période d'attente, il y a eu une panne dans la chambre de culture et la température est montée jusqu'à 38°C, ce qui a entraîné la détérioration et la mort de certaines plantes. Les plantes qui ont été extraites ont été sacrifiées pour vérifier leur état sanitaire, cependant, beaucoup d'entre elles n'avaient pas la taille nécessaire et étaient également endommagées en raison de la haute température.

Malgré ces contraintes, le protocole de cryothérapie s'est révélé efficace pour les virus GLRaV-3, avec un taux d'assainissement de 100% (Wen-Lu Bi et al., 2018), GVA, avec un taux de 97+-3 (Wang et al., 2003), et GFLV, avec un taux de 77,8% d'assainissement (Karković et al., 2015). De plus, cette méthode permet de désinfecter un plus grand nombre de plantes en une seule fois, tout en étant plus simple.

## **CONCLUSION**

Bien que la microgreffe d'apex soit une méthode efficace, de nombreux problèmes sont encore liés à la difficulté d'assainir un apex. À travers ce stage, nous avons cherché à proposer une méthode alternative pour assainir des plantes contaminées, ainsi qu'une méthode plus simple et rapide pour faciliter la transplantation et l'assainissement des plantes de Vassal. Malgré des résultats non concluants, le traitement par chimiothérapie avec ZR et AS+ZR s'est avéré prometteur pour le virus GFkV. Cependant, d'autres tests devraient être réalisés avec et sans ces hormones dans le milieu de culture, en utilisant d'autres concentrations pour mieux comprendre à quelle résultat l'assainissement est lié. De plus, la méthode de cryothérapie se révèle prometteuse car elle est plus simple que la microgreffe d'apex. Cependant, davantage de tests devraient être effectués, et les plantes devraient être analysées à un stade plus avancé pour éviter les faux positifs. Parmi ces méthodes, la chimiothérapie s'est révélée la plus prometteuse pour l'assainissement de la vigne en raison de sa facilité de manipulation, de sa rapidité et de son taux de régénération. Cependant, la même efficacité n'a pas été observée pour le virus RSP. Si elle se révèle

efficace, la méthode de chimiothérapie sera la meilleure en termes de coût, de temps, de facilité de manipulation et de régénération.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Babosha, Alexander. Effect of some immunomodulators and zeatin on susceptibility of wheat to powdery mildew. *Turkish Journal of Botany*, v. 43, n. 3, p. 298-307, 2019.

Bayati, S., Shams-Bakhsh, M. and Moini, A. (2011). Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(3), 442-450.

Bettoni, J. C., Marković, Z., Bi, W., Volk, G. M., Matsumoto, T and Wang, Q. C. (2021). Grapevine shoot tip cryopreservation and cryotherapy: Secure storage of disease-free plants. *Plants*, 10(10), 2190.

Bhojwani, S. S., Dantu, P. K., Bhojwani, S. S. and Dantu, P. K. (2013). Production of virus-free plants. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 227-243.

Bi, W.L., Pan, C., Hao, X.Y., Cui, Z.H., Kher, M.M., Marković, Z., Wang, Q.C. and Teixeira da Silva, J.A. (2017). Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)—a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53, pp.449-460.

Brisson, M., de Boucaud, M. T., Pierronnet, A. and Dosba, F. (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science*, 123(1-2), 189-196.

Chee, R., & Pool, R. M. (1987). Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae*, 32(1-2), 85-95.

Choi J, Choi D, Lee S, Ryu CM, Hwang I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* 2011 Jul;16(7):388-94. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.003. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21470894.

Commission of the European Communities. (1968). Council Directive 68/193/EEC of 9 April 1968 on the marketing of material for the vegetative propagation of the vine. *Official Journal of the European Communities*.

- Cui, Z.H., Bi, W.L., Hao, X.Y., Li, P.M., Duan, Y., Walker, M.A., Xu, Y. and Wang, Q.C. (2017). Drought stress enhances up-regulation of anthocyanin biosynthesis in grapevine leafroll-associated virus 3-infected in vitro grapevine (*Vitis vinifera*) leaves. *Plant disease*, 101(9), pp.1606-1615.
- Dempsey, D. M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C. and Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Emaru, A. and Rwotonen, I.B., Implications of Somaclonal variation in vitro in crop management: A review. (2021). RUFORUM Working document series. No. 19 (1): 52-62.
- Faccioli, G. and Marani, F. (1998). Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. *Plant virus disease control*, 346-380.
- Hu, G. J., Dong, Y. F., Zhang, Z. P., Fan, X. D. and Fang, R. E. N. (2021). Elimination of grapevine fleck virus and grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 87-1 by ribavirin combined with thermotherapy. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2463-2470.
- Jiroutová, P. and Sedlák, J. (2020). Cryobiotechnology of plants: A hot topic not only for gene banks. *Applied Sciences*, 10(13), 4677.
- Kaczmarczyk, A., Funnekotter, B., Menon, A., Phang, P. Y., Al-Hanbali, A., Bunn, E. and Mancera, R. (2012). Current issues in plant cryopreservation. In *Current frontiers in cryobiology* (pp. 417-438). InTech.
- Kidulile, C. E., Miinda Ateka, E., Alakonya, A. E. and Ndunguru, J. C. (2018). Efficacy of chemotherapy and thermotherapy in elimination of East African cassava mosaic virus from Tanzanian cassava landrace. *Journal of Phytopathology*, 166(10), 739-745.
- Marković, Z., Preiner, D., Stupić, D., Andabaka, Ž., Šimon, S., Vončina, D., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Chatelet, P. and Engelmann, F. (2015). Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 54, 247-251.
- Maliogka, V. I., F. G. Skiada, E. P. Eleftheriou, and N. I. Katis. "Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining in vitro thermotherapy with shoot tip culture." *Scientia Horticulturae* 123, no. 2 (2009): 280-282.

Martelli, G. P. (2017). An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, 31-46.

Miguel, C. and Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of experimental botany*, 62(11), 3713-3725.

Miljanić, V., Rusjan, D., Škvarč, A., Chatelet, P. and Štajner, N. (2022). Elimination of Eight Viruses and Two Viroids from Preclonal Candidates of Six Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) through In Vivo Thermotherapy and In Vitro Meristem Tip Micrografting. *Plants*, 11(8), 1064.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Nerway, Z. A. A., Duhoky, M. M. S. and Kassim, N. A. (2020). In vitro elimination of Dahlia mosaic virus by using meristem culture, electrotherapy and chemotherapy. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 51(2), 665-674.

Nuzzo, F., Moine, A., Nerva, L., Pagliarani, C., Perrone, I., Boccacci, P., Gribaudo, I., Chitarra, W. and Gambino, G. (2022). Grapevine virome and production of healthy plants by somatic embryogenesis. *Microbial Biotechnology*, 15(5), pp.1357-1373.

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). (2022). *Note de conjoncture vitivinicole mondiale 2021. AVRIL 2022*.

Panattoni, A., D'Anna, F., Cristani, C. and Triolo, E. (2007). Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *Journal of Virological Methods*, 146(1-2), 129-135.

Panis, B., Nagel, M. and Van den Houwe, I. (2020). Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*, 9(12), 1634.

Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B. and Carimi, F. (2016). Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 1-11.

Spilmont, A. S., Ruiz, A. and Grenan, S. (2012). Efficiency of micrografting of shoot apices as a sanitation method against seven grapevine viruses (ArMV, GFLV, GLRaV-1,-2,-3, GFkV, GVA). *ICVG 201*.

Tawar, P. N.; Sawant, R. A.; Sushir, K. V.; Devarumath, R. M.; Hapase, R. S.; Meti, N. T. (2016). VSI 434: New Sugarcane Variety Obtained Through Somaclonal Variation. *Agricultural Research*, 5(2), 127–136. doi:10.1007/s40003-016-0203-0

This, P., Lacombe, T. and Thomas, M.R., 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22(9), pp.511-519.

Valero, M., A. Ibanez, and A. Morte. "Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures." *Scientia Horticulturae* 97, no. 3-4 (2003): 289-296.

Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I., & Tanne, E. (2003). Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, 165(2), 321-327.

Wang, B., Wang, R.R., Cui, Z.H., Bi, W.L., Li, J.W., Li, B.Q., Ozudogru, E.A., Volk, G.M. and Wang, Q.C. (2014). Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. *Biotechnology advances*, 32(3), pp.583-595.

Wang, M. R., Cui, Z. H., Li, J. W., Hao, X. Y., Zhao, L. and Wang, Q. C. (2018). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant methods*, 14(1), 1-18.

Zhai, Z., Wu, Y., Engelmann, F., Chen, R. and Zhao, Y. (2003). Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved in vitro cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. *CryoLetters*, 24(5), 315-322.

## **SITOGRAFIE**

Transfert de la collection de vignes de Vassal : lancement des opérations 2022 (page consultée le 31/05/2023). URL : <https://www.inrae.fr/actualites/transfert-collection-vignes-vassal-lancement-operations>

La plus grande collection de cépages au monde déplacée par la montée des eaux 2023 (page consultée le 31/05/2023). URL : <https://reporterre.net/Le-Louvre-de-la-vigne-va-boire-la-tasse>

## ANNEXES

**Annexe 1 : Liste des recherches rapportées de 2002 à 2022 sur les vignes utilisant différentes méthodes d'assainissement.**

<b>Especification</b>	<b>Matériel</b>	<b>Virus</b>	<b>Régénération %</b>	<b>% plantes assainis</b>	<b>Référence</b>
<b>Thérmothérapie</b>					
Thérmothérapie	<i>V. vinifera</i> cv. Napoleon	GLRaV-3, GFLV	53-80	72–100 (GLRaV-3) 100 (GFLV)	Valero et al., 2002
Thérmothérapie	<i>V. vinifera</i> cv. Mantilaria	GLRaV	59.37	92.45	Maliogka et al., 2009
Thérmothérapie	<i>V. vinifera</i> cv. Mantilaria	GRSPaV	59.37	39.62	Maliogka et al., 2009
Thérmothérapie	<i>V. vinifera</i> cv. Prevezaniko	GLRaV	41.86	89.29	Maliogka et al., 2009

Thérmothérapie	<i>V. vinifera</i> cv. Prevezaniko	GRSPaV	41.86	92.85	Maliogka et al., 2009
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Rebula, Zeleni, Malvazija, Refošk, Pokalca	GRSPaV	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Rebula, Zeleni, Malvazija, Refošk, Pokalca	GPGV	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Pokalca	GFLV	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022

In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Refošk	GLRaV-3	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Rebula, Zeleni, Malvazija, Refošk	GFKV	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Rebula, Zeleni, Malvazija, Refošk, Pokalca	GRVFV	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Malvazija	GSyV-1	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022

In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling	RBDV	0 - 25	100	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Rebula, Zeleni, Malvazija, Refošk, Pokalca	HSVd	0 - 25	39.2	Miljanić et al., 2022
In vivo themothérapie et In Vitro microgreffage	Laški rizling, Rebula, Zeleni, Malvazija, Refošk, Pokalca	GYSVd-1	0 - 25	42.6	Miljanić et al., 2022
<b>Meristème de culture</b>					
Microgreffage	NS	GLRaV-1	37%	100	Spilmont et al., 2012
Microgreffage	NS	GLRaV-2	37%	100	Spilmont et al., 2012

Microgreffage	NS	GLRaV-3	37%	100	Spilmont et al., 2012
Microgreffage	NS	ArMV / GFLV	37%	81	Spilmont et al., 2012
Microgreffage	NS	GVA	37%	96	Spilmont et al., 2012
Microgreffage	NS	GFkV	37%	100	Spilmont et al., 2012
meristème de culture	<i>V. vinifera</i> L. cv. Bruti	GVA	75+-6	12	Wang et al., 2003
<b>Cryothérapie</b>					
vitrication en goutte	Chardonnay	GFLV	30.7	77.8	Marković et al., 2015
vitrication en goutte	Cabernet Sauvignon	GLRaV-3	41.6	100	Marković et al., 2015
encapsulation-déshydratation	<i>V. vinifera</i> cv. Black	GVA	59	42	Bayati et al., 2011

vitrication en goutte	Vitis vinifera "Chardonnay"	GLRaV-3	47 +- 6	100	Wen-Lu Bi et al., 2018
vitrication en goutte	<i>V. vinifera</i> × <i>Vitis labrusca</i> "Kyoho"	GLRaV-3	51+-5	100	Wen-Lu Bi et al., 2018
vitrication en goutte	<i>Vitis pseudoreticulata</i> "Hunan-1"	GLRaV-3	43+-5	100	Wen-Lu Bi et al., 2018
encapsulation-déshydratation	<i>V. vinifera</i> L. cv. Bruti	GVA	62+-6	97+-3	Wang et al., 2003
Vitrication	<i>V. vinifera</i> L. cv. Bruti	GVA	50+-5	97+-3	Wang et al., 2003
<b>Chimiothérapie</b>					
ribavirin at 15 µg mL <sup>-1</sup> + Thermothérapie	<i>V. vinifera</i> cv.'87-1'	GfKV	68.1	100	Hu et al., 2021

ribavirin at 25 µg mL <sup>-1</sup> + Thermothérapie	<i>V. vinifera</i> cv.'87-1'	GFkV	78.7	100	Hu et al., 2021
ribavirin at 15 µg mL <sup>-1</sup> + Thermothérapie	<i>V. vinifera</i> cv.'87-1'	GRSPaV	68.1	40	Hu et al., 2021
ribavirin at 25 µg mL <sup>-1</sup> + Thermothérapie	<i>V. vinifera</i> cv.'87-1'	GRSPaV	78.7	50	Hu et al., 2021
PVS2	Chardonnay	GFLV	30.7	82.4	Marković et al., 2015
PVS2	Cabernet Sauvignon	GFLV	41.6	100	Marković et al., 2015

**Annexe 2 : Les différentes espèces de matériaux utilisés, leurs codes d'accès à Vassal et les virus présents.**

Matériaux	Code d'accès	Virus
<i>Vitis vinifera</i> cv. Rocia	68Mtp2	GFkV et RSP
<i>Vitis Vinifera</i>	2023Mtpx	GFkV et RSP
<i>Vitis labrusca</i> cv. Isabelle	6541Mtp7	GFkV
<i>Vitis labrusca</i> cv. Israella	6593Mtp3	GFkV
<i>Vitis labrusca</i> cv. Ive's seedling	6594Mtp3	GFkV
<i>Vitis longii</i> cv. Novo-Mexicana	8210Mtp4	GFkV

### Annexe 3. Représentations de courbes pour l'identification d'assainissement pour les virus GFkV et RSP

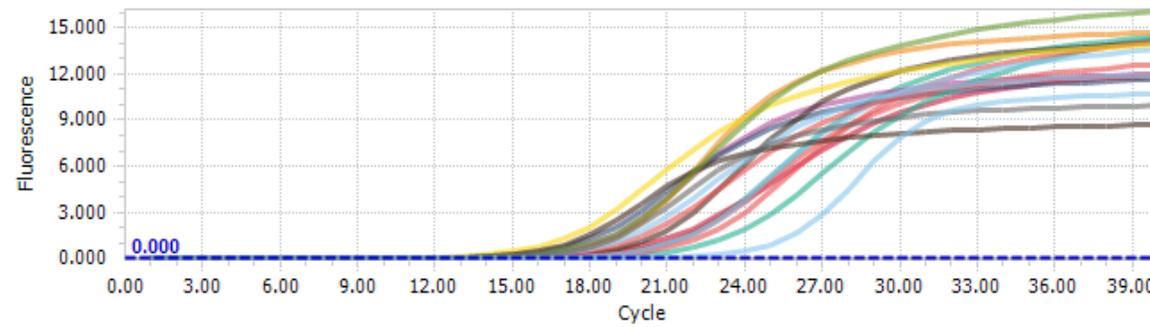
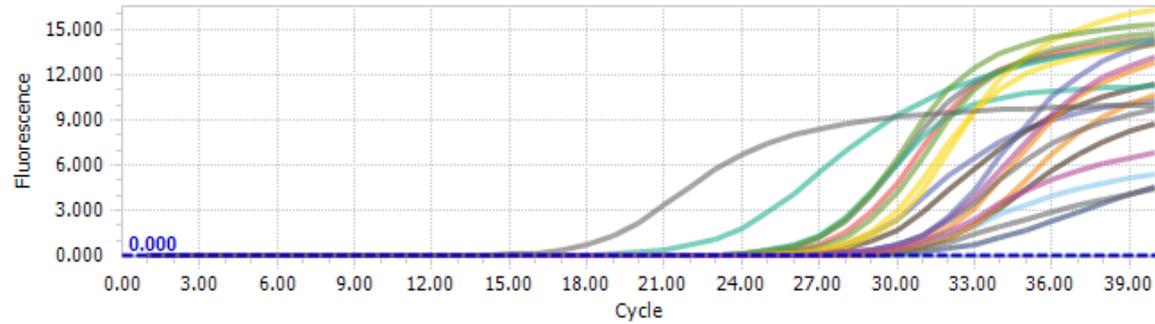
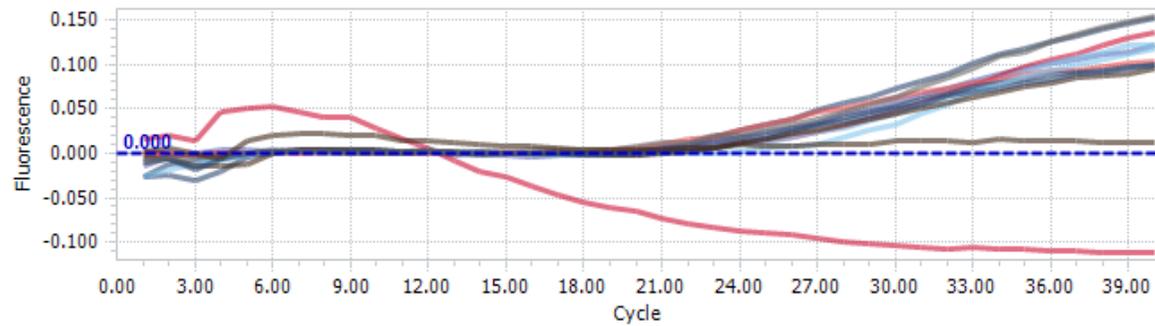


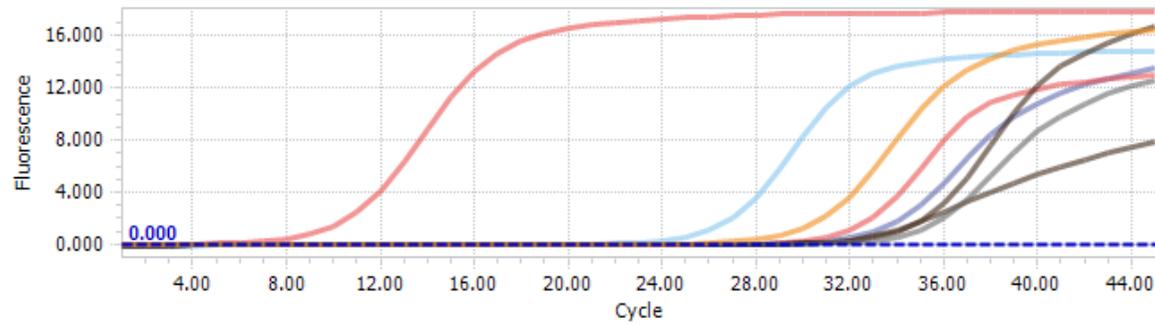
Figure supplémentaire 1. Représentation de la courbe positive pour le virus GFkV par la méthode de qPCR. Appareil LightCycler96.



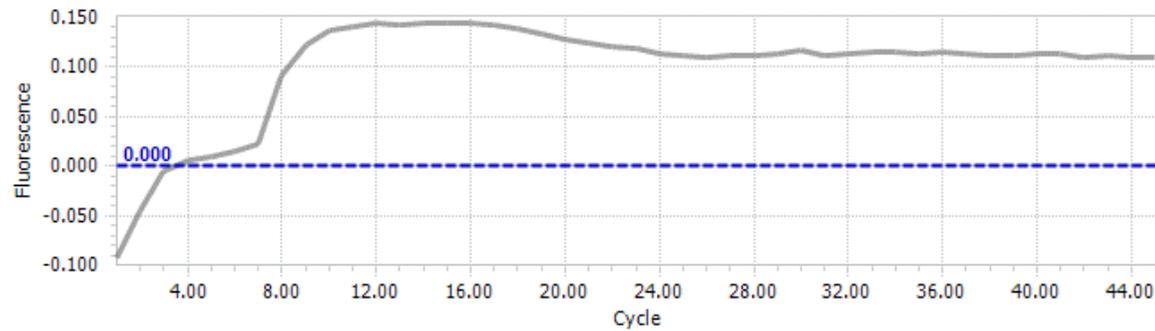
**Figure supplémentaire 2.** Représentation graphique des cycles de qPCR pour les échantillons indéterminés pour le virus GFkV. La première courbe représente le cycle le plus précoce d'un échantillon positif (cycle 11,47), et la deuxième courbe représente la limite d'un cycle d'un échantillon positif (cycle 21,32). À partir de la troisième courbe (à partir du cycle 22,69), les échantillons sont considérés comme indéterminés.



**Figure supplémentaire 3.** Représentation graphique des résultats négatifs de la qPCR pour le virus GFkV. Application LightCycler96.



**Figure supplémentaire 4.** Représentation graphique des cycles de qPCR pour les échantillons indéterminés du virus GFKV. La première courbe représente le cycle le plus précoce d'un échantillon positif (cycle 11,47) et la deuxième courbe représente le seuil d'un cycle d'un échantillon positif (cycle 21,32). À partir de la troisième courbe (à partir du cycle 22,69), les échantillons sont considérés comme indéterminés.



**Figure supplémentaire 5.** Représentation graphique du résultat négatif de la qPCR de l'échantillon ZR1.3 pour le virus RSP. Application LightCycler96.

#### Annexe 4 : Amorces de virus utilisés pour la rt-qPCR

##### Programme GfKV

10 min 55°C  
1 min 95°C

10 s 95°C  
1 min 50°C  
45 s 72°C\* | 40 cycles

\* MELTING  
CURVE

##### Programme RSP

10 min 55°C  
1 min 95°C

10 s 95°C  
30 s 54 °C  
30 s 72°C\* | 45 cycles

<b>Amorces GfKV</b>	206pb
GfK-F1	TTC ACC TCT TGG AAA GCC TG
GfK-R1	TAG TCA TTG GCG AGG TGG AC
<b>Amorces RSP</b>	423pb
RSP-F1	GTCATGGATGAAGGTGCAATA
RSP-R2	GGCGATATTAGCAACCATCTC

**Annexe 5. Les testes statistiques utilisés et les p-values pour chaque traitement**

Traitement	Test	P-value
Plantes survivantes - chimiothérapie	Pearson's Chi-squared test	0.7167
	Paired t-test (AS+ZR et ZR)	0.08147
	Test de proportion AS+ZR – Correction de Bonferroni	0.003145
	Test de proportion ZR	0.1983
Plantes assainis – chimiothérapie	Two Sample t-test	0.6283
	Test de proportion AS+ZR et ZR	0.08841
	Test de proportion ZR – Correction de Bonferroni	0.01857
Plantes survivantes – cryothérapie	One sample t-test	0.3671
	T – test pour chaque cultivar :Isabelle	0.7834
	Israella	0.6094
	0MTP945	0.1835
	68MTP2	0.391
	2023MTPX	0.391
Novo-mexicana	0.8238	

## **Annexe 6 : Les solutions et milieux de culture utilisés**

### **1. Milieu de culture**

#### **1.1. Milieu de culture - cryothérapie**

1.1.1. ½ MS (Murashige et Skoog 1962) : composé d'éléments minéraux à de MS dilué à moitié (sauf le Fe EDTA 100%) avec les vitamines de Morel (1mL par litre), 3% de saccharose, 0,5 µMolAIB et 0,7% d'agar (Sigma) à pH 5,8.

1.1.2. Milieu pour micro-tigelles Vigne (1L): composé d'éléments minéraux à de MS dilué à moitié (sauf le Fe EDTA 100%) avec les vitamines de Morel (1mL par litre), sucrose 0,3M, 6,5g de microagar et pH 5,8. Après l'autoclavage, il est ajouté 1 µM de zeatine riboside et 0,1mM de acide salicylique stériles.

#### **1.2. Milieu de culture - chimiothérapie**

1.2.1. Le témoin (1L) : ½ de formulation MS (sauf Fe EDTA 100 %), 1mL de vitamines de Morel, 30g de saccharose, 6,5g de microagar et pH 5,8. Après l'autoclavage, il est ajouté 1 µM de zeatine riboside stérile.

1.2.2. Milieu de culture AS Le témoin (1L) : utiliser la même solution, mais additionner 0,1 mM de acide salicylique stérile par filtration de 0,45 µm après l'autoclavage.

### **2. Milieu de pré-culture - cryothérapie**

2.1. Milieu de pré-culture témoin : composé d'éléments minéraux à de MS dilué à moitié (sauf le Fe EDTA 100%) avec les vitamines de Morel (1mL par litre), 0,3 M de saccharose, gelrite 3g/L et le pH a 5,8.

2.2. Milieu de pré-culture AS: utiliser la même solution que le témoin, mais après l'autoclavage, additionner 0,05 mM d'AS stérile par filtration de 0,45 µm.

### **3. Solutions cryothérapie**

3.1. Solution de charge (loading solution) : macro nutriments ½ MS, sucrose 0,4M, glycerol 2M et pH 5,8.

- 3.2. Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) : macro nutrients  $\frac{1}{2}$  MS, glycerol (30%w/vol), etilène glycol (15% w/v), DMSO (15% w/v), sucrose 0,4M et pH 5,8.
- 3.3. Solution for PVS2 dilution: macro nutrients  $\frac{1}{2}$  MS, 0,4M sucrose et pH 5,8.
- 3.4. Solution de rançage (Unloading solution): macro nutrients  $\frac{1}{2}$  MS, saccharose 1,2M et pH 5,8.

#### **4. Milieu de régénération**

- 4.1. Milieu de régénération : composé d'éléments minéraux de MS dilué à moitié (sauf le Fe EDTA 100%). Après l'autoclavage, il est ajouté 25  $\mu$ Mol de zeatine riboside sterile par filtration de 0,45  $\mu$ m.
- 4.2. Milieu de régénération AS : utiliser la même solution que le témoin, mais après l'autoclavage, adiciner 0,05 mM d'AS sterile par filtration de 0,45  $\mu$ m.

# Résumé

La vigne représente l'un des fruits les plus importants sur le plan économique et historique. La production de plants exempts de virus revêt une importance cruciale pour contrôler les maladies virales. La collection de Vassal, située dans le domaine de Vassal, illustre la vaste biodiversité de la vigne. Cependant, en raison de l'élévation du niveau de la mer et de la salinisation des sols, un projet de transfert vers Pech Rouge est en cours. Avant le transfert, il est nécessaire de les assainir. Afin de garantir la préservation de la diversité génétique de la vigne et de faciliter son exportation, ce projet propose de comparer deux méthodes d'assainissement contre les virus : la chimiothérapie et la cryothérapie. Les méthodes de cryothérapie, selon le protocole de Vitrification, et de chimiothérapie avec l'ajout d'acide salicylique dans le milieu de culture et de la zeatine riboside (AS+ZR), et l'autre uniquement avec de la zeatine riboside (ZR), ont été mises en œuvre pour évaluer le taux d'assainissement vis-à-vis des virus Grapevine fleck virus (GFkV) et Rupestris Stem Pitting (RSP). L'identification des virus a été réalisée en utilisant de l'ARN total et la méthode rt-qPCR. En ce qui concerne le nombre de plantes survivantes contaminées par le virus GFkV, le traitement avec AS+ZR a entraîné la survie de 61 % des plantes, tandis que le traitement avec ZR a permis la survie de 83 % des plantes. Le traitement avec AS+ZR a également permis d'obtenir un taux de 55 % de plantes exemptes du virus GFkV, contre 70 % avec ZR seul. Une plante a été assainie avec la méthode de chimiothérapie utilisant ZR pour le virus RSP. Pour la cryothérapie, le taux de survie le plus élevé a été obtenu en utilisant une pré-culture avec AS+ZR et un milieu de régénération contenant uniquement ZR. Pour le protocole de cryothérapie, on a des résultats indéterminés en rt-qPCR en raison de contraintes dans la chambre de culture. Les résultats indiquent que le traitement par chimiothérapie avec ZR et AS+ZR se montre prometteur pour le virus GFkV.

## Mots clés

Vigne, Assainissement, Acide salicylique, Cryothérapie.

Pour citer ce document : [Rodrigues Pinheiro, Rafaela, 2023. Diversité de la réponse d'accessions de vigne à deux protocoles d'assainissement vis-à-vis des virus : cryothérapie et effet de l'acide salicylique. Mémoire de fin d'études, Diplôme d'ingénieur agronome, Spécialité Amélioration des plantes et Ingénierie Végétale Méditerranéennes et Tropicales (APIMET), L'Institut Agro Montpellier. 48 pages.]

Institut Agro | Montpellier SupAgro, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 02.  
<https://www.institut-agro-montpellier.fr/>