

Diagnostic immuno-enzymatique des maladies du bois strié du pommier et du jaunissement des nervures du poirier à l'aide d'anticorps monoclonaux

M.-E. RAMEL, P. GUGERLI, L. BOURQUIN et J. DE MEYER¹, Agroscope RAC Changins, case postale 254, CH-1260 Nyon 1

E-mail: maria-elena.ramel@rac.admin.ch
Tél. (+41) 22 36 34 444.

Résumé

Des maladies importantes du pommier et du poirier sont causées par l'*apple stem pitting virus* (ASPV) et le virus apparenté *pear vein yellows virus* (PVYV). Le diagnostic rapide de ces maladies par le test immuno-enzymatique ELISA est devenu possible grâce au développement des premiers anticorps monoclonaux (AMC). La validation de la procédure s'est faite avec des échantillons de diverses espèces, variétés et organes prélevés à différents états végétatifs. Les résultats ont été comparés à l'indexage biologique et à la détection moléculaire par le test RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*). Une très bonne concordance a été obtenue entre les résultats du test ELISA et l'indexage biologique. Par contre, le test RT-PCR n'a pas détecté toutes les origines de virus. La détection par le test ELISA est particulièrement fiable à partir d'échantillons de bois dormant. Ce type de matériel est couramment utilisé dans la commercialisation de variétés. Le contrôle virologique dans le cadre de programmes de sélection sanitaire et de production de plants est ainsi facilité. La mono-spécificité des AMC a également permis de confirmer la forte similitude sérologique entre l'ASPV et le PVYV.

Introduction

L'*apple stem pitting ideoavirus* (ASPV) et le *pear vein yellows virus* (PVYV) ont été associés aux maladies du **bois strié du pommier** ou au **jaunissement du poirier** par divers auteurs (KOGANEZAWA et YANASE, 1990; GIUNCHEDI et POLLINI, 1992; JELKMANN *et al.*, 1992; PILOTTI *et al.*, 1995; RAMEL *et al.*, 1998). Les ideoavirus sont caractérisés par des particules filamenteuses d'une longueur d'environ 800 nm. Ils sont principalement disséminés par le plant issu de multiplication végétative.

L'ASPV et le PVYV sont fréquemment mis en évidence par l'indexage biologique sur les variétés commerciales de pommier, poirier et cognassier. L'analyse de 35 ans de sélection sanitaire française (LEMOINE et GEOFFRION, 2000) a démontré qu'environ **60%** de clones de pommier et plus de **90%** de poirier sont infectés par ces virus. Ils peuvent



Fig. 1. Striures provoquées par l'ASP sur le bois écorcé de l'indicateur *Malus sylvestris* Virginia crab (en bas: contrôle sain).

¹Avec la collaboration technique de P.-H. Crausaz et N. Dubuis.

se manifester par des symptômes caractéristiques sur le feuillage ou les fruits, mais aussi par des effets moins définis, mais fortement dommageables, notamment par rapport à la reprise au greffage, à la croissance des porte-greffe, au rendement et au calibre des fruits. Ces symptômes sont souvent renforcés par la présence d'autres viroses courantes comme la maladie des taches chlorotiques ou le bois souple du pommier (SCHMIDT, 1972; WESTWOOD et CAMERON, 1974; FRIDLUND et DRAKE, 1981; LEMOINE et MICHELESI, 1976 et 1997). Divers syndromes sont à présent associés aux virus ASPV et PVYV. Le **bois strié du pommier**, en anglais «*apple stem pitting*» (ASP), est une maladie appelée ainsi à cause des striures visibles sur le xylème de porte-greffe sensibles au virus (fig.1). Certains porte-greffe réagissent plus fortement par le dépérissement très rapide de tout le scion. Actuellement, ces porte-greffe très sensibles, comme *Malus sylvestris* Virginia crab ou *M. sylvestris* Spy 227, sont utilisés seulement comme indicateurs à des fins diagnostiques pour l'indexage biologique de la maladie. Greffées sur les porte-greffe actuellement utilisés en Europe, peu de variétés commerciales de pommier expriment ces symptômes, à l'exception de Reinette Clochard, Charden ou de variétés à cidre (DESIGNES, 1999). Le virus est donc présent sous forme latente et les dommages se manifesteront par des effets indirects sur la production. Le jaunissement des nervures du poirier, en anglais «*pear vein yellows*» (PVY), s'exprime souvent sur des variétés commerciales comme Beurré Hardy, B. Durondeau, Conférence, Curé, Doyenné du Comice, Abbé Fettel, Passe Crassane ou Pierre Corneille. Des stries chlorotiques sont visibles sur les nervures tertiaires des feuilles. Sur certaines variétés, ces symptômes évoluent d'une couleur jaune à rougeâtre vers la fin de la saison. Cette expression de la maladie est appelée la **marbrure rouge du poirier** («*pear red mottle*» en anglais). Sur les poires, des zones avec un développement irrégulier donnent un aspect bosselé au fruit. Les tissus liégeux de ces zones ont donné le nom de **gravelle** («*stony pit*» en anglais) à cette affection, d'expression variable d'année en année. Sur cognassier, la **maladie des taches annulaires fuligineuses** («*quince sooty ring spot*» en anglais) s'exprime sur quelques porte-greffe et variétés sensibles. Cette manifestation a été associée au jaunissement de nervures du poirier et au dépérissement du Spy par DESIGNES en 1970 déjà. La maladie se manifeste par des épinasties

ou enroulements du jeune feuillage et par des colorations noires en forme d'anneaux ou de bandes qui donnent l'aspect d'une attaque de fumagine. Des plantes atteintes peuvent produire des fruits déformés comme la gravelle du poirier. Certaines variétés de poirier japonais ou nashi sont atteintes par la **tacheture nécrotique du poirier** («*pear necrotic spot*» en anglais). YANASE *et al.* (1988) ont attribué cette maladie à une souche d'ASPV. Les symptômes débutent par des taches nécrotiques d'environ 2-3 mm de diamètre sur les feuilles, provoquant vers la fin de la saison leur chute prématurée. Les maladies du **fruit bosselé**, de la **craquelure étoilée** et des **taches liégeuses** (respectivement «*apple green crinkle*», «*star crack*» et «*rough skin*» en anglais) sont des maladies des fruits du pommier considérées comme étant d'origine virale et transmises par greffage. Leur étiologie est encore inconnue, mais leur association avec l'ASPV a été suggérée, sans être prouvée. Le diagnostic de ces maladies se fait couramment par l'**indexage biologique**. Un indicateur (*Malus sylvestris* Virginia Crab et Spy 227 ou *Pyronia veitchii*) est inoculé par double greffage avec la plante à vérifier. Réalisée au champ, l'observation des symptômes se fait pendant une à trois saisons. Plusieurs chercheurs (FRIDLUND, 1980; GILLES et BORMANS, 1986 et 1988; DESIGNES *et al.*, 1992; RAMEL *et al.*, 1998) ont adapté cette technique aux conditions de serre, diminuant ainsi la période d'observation à quelques mois. L'indexage sur la plante herbacée *Nicotiana occidentalis* (VAN DER MEER, 1986) est aussi utilisé en serre. Néanmoins, la réussite de la transmission du virus d'un hôte ligneux à un hôte herbacé est plus irrégulière que la transmission entre espèces ligneuses et cette technique est plutôt un complément qu'un

test définitif. Actuellement, le diagnostic en laboratoire se fait essentiellement par un test moléculaire basé sur l'amplification de gènes, test **RT-PCR** voire **IC-RT-PCR** (JELKMANN, 1994; JELKMANN et KEIM-KONRAD, 1997; SCHWARZ et JELKMANN, 1998). Cette approche est cependant coûteuse et peu adaptable à l'analyse en grande série. Le diagnostic à l'aide d'anticorps polyclonaux a été étudié par GIUNCHEDI et POLLINI (1992), JELKMANN et KEIM-KONRAD (1997) et RAMEL *et al.* (1998). Par manque de spécificité, les applications ont été limitées à l'immuno-microscopie électronique, le western-blot ou l'IC-RT-PCR. L'utilisation du dosage immuno-enzymatique par le test **ELISA** est seulement devenue possible après l'obtention des premiers **anticorps monoclonaux** (AMC) (GUGERLI et RAMEL, 2003 et 2004). Dans cet article, nous démontrons la fiabilité du test ELISA à l'aide de ces anticorps monoclonaux hautement spécifiques et son utilisation à grande échelle pour le dépistage de l'ASPV et du PVYV, permettant donc le diagnostic rapide de leurs maladies associées en laboratoire. Par la monospécificité de ces AMC, nous confirmons également la forte similitude sérologique entre les deux virus.

Matériel et méthode

Matériel végétal

Les isolats de virus sur plantes herbacées font partie de la collection de références du service de virologie d'Agroscope RAC Changins et ont été maintenus sur *Nicotiana occidentalis* (tabl. 1). Les références sur plantes ligneuses, de statut viral connu ou en cours d'évaluation, ont été maintenues en serre ou en parcelle à Changins (tabl. 2).

Tableau 1. Isolats maintenus sur plante herbacée *Nicotiana occidentalis*.

N° d'identification	Origine	N° d'identification de l'origine	Etat sanitaire de l'origine*
N 953 N 974 N 1063 N 1136 N 1125 N 1137	Pommier	2118 (inoculé sur <i>Malus sylvestris</i> Spy 227) 6805 49 (inoculé sur <i>M. Platycarpa</i>) 97 2097 2094	ASP ACLS RW ApM ASP ACLS ASG ApP ASP ACLS ASP ACLS ASP ASP
N 922 N 952 N 980 N 1090 N 1141	Poirier	2225 2224 (inoculé sur <i>Pyronia veitchii</i>) 191 (inoculé sur <i>P. veitchii</i>) 1544 (inoculé sur Passe Crassane) 23145	PVY RW PVY RW PVY PVY PVY ACLS

*ASP = *Apple stem pitting* (bois strié du pommier), ACLS = *Apple chlorotic leafspot* (maladie des taches chlorotiques du pommier), RW = *Rubbery wood* (bois souple du pommier), ApMV = *Apple mosaic* (mosaïque du pommier), ASG = *Apple stem grooving* (bois rayé du pommier), ApP = *Apple proliferation* (prolifération du pommier), PVY = *pear vein yellows* (jaunissement des nervures du poirier).

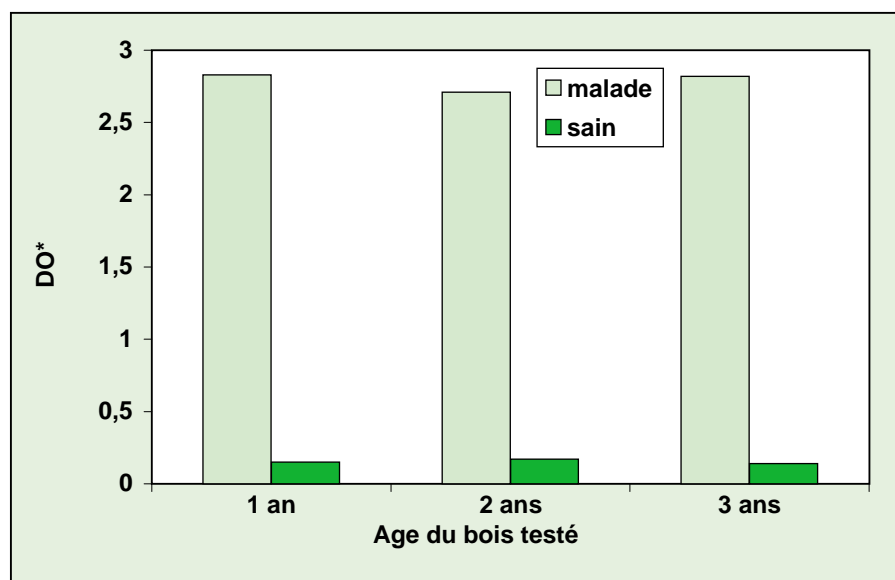
Tableau 2. Références sur hôtes ligneux pommier, poirier et cognassier.

N° d'identification	Hôte (variété)	N° d'identification	Hôte (variété)
Pommier		Pommier	
3 4 636 637 2094 2097 2901 6905 5 6 639 7 13 15 21 1559 11 27 1555 17 33 34 35 36 37 39 695 700 2111 2113 2197 2900 3999-4001 5140 5141 5143 5144 5146 5147 5148 5149 5152 5153 5155 5156 5158 5159 5161 5162 5164 5165 5167 5168 5170 5171 5173 5176 5177 5181 5182 5187 5190 5191 5194 5197 5200 5201 5203 5204 7036 41 43 45 633 2118 49 50 52 2108 2109 2110 684 51 682 683 55 671 17403 57 59 61 65 67 1551 71 2068 2127 4357 4365 4372 4409 79 710 2482 1557 89 95 Lo185-189 97 73 1339 101 2044 105 107 109	Arlét Boskoop Boskoop ordinaire Boskoop rouge Cloche Close Cox's Orange Delbard Estivale Elstar Florina Franc Roseau Gloster Golden Delicious Golden Smoothee Goro Granny Smith Gravenstein Gravenstein ordinaire Gravenstein rouge Idared Inconnue James Grieve rouge Jonagold Jonared Jonathan Watson Jonnee Karmijn Kid's Orange Red Lord Lambourne Maigold Meran Ontario (Reinette) Pomme Raisin Rouge Priam Primerouge Red Delicious Reine des Reinettes Reinette du Canada Reinette grise du Canada Rose de Berne Spartan	567 2102 2103 129 113 117 1553 119 571 123 2884 1544 155 1509 St1er 2224 2225 168 171 1506 8791 Z6 873 157 161 624 159 1455 198 167 170 1606 173 175 1547 177 179 181 1542 Lo579-572 23143 23145 165 187 185 189 1453 2203 2238 5936 5937 1451 1448 1549 1450 191 643 Lo592-596 196 1545 848 626 1459 1510	Spy Stark Earliest Starkrimson Summerred Tenroy Transparente blanche Virginia Crab Vista Bella Abbé Fettel Beurré Bosc Beurré d'Anjou Beurré Diel Beurré Giffard Beurré Hardy Champirac Clapp's Favourite Conférence Doyenné du Comice Dr Jules Guyot Général Leclerc Grand Champion Hybride Poirier Louise Bonne Pachkam's Triumph Passe Crassane Pierre Corneille Poire à Botzi Poire Curé Précoce de Trévoux Précoce Morettini Président Héron Pyrionia veitchii Pyrus betulaefolia P. serotina P. serotina Ping Ding P. ussuriensis Super Comice Swiss William's Triumph de Vienne Valérac William's
		Poirier	
		Cognassier	
		346 611 348 606 617 2233 1446	Champion Géant de Vranja Ronda Cognassier A Cognassier C- 7/1

Tableau 3. Amorces utilisées en analyse RT-PCR.

Amorce	Séquence	Taille (pb)*	Référence
C8849	5'-TGCCTCAAAGTACACCCCTCAGT-3'	316	McKENZIE (1997)
H8534	5'-CGCCAAGAAATGCCACAGC-3'	264	JELKMANN et KEIM-CONRAD (1997)
A (pos 9237-9256)	5'-ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT-3'		
C (pos 8993-9012)	5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3'	291	MALINOWSKI <i>et al.</i> (1998)
ASPF1	5'-AGCGGTTGCCTATTTTGTCC-3'		
ASPR5	5'-GTGAGGTCAAAGATGCTGAAACC-3'		

*Nombre de paires de bases amplifiées.



Test ELISA

Le test immuno-enzymatique ELISA a été réalisé selon la méthode de CLARK et ADAMS (1977) à l'aide des AMC 4-0 ou 4-1, 4-7, voire occasionnellement l'AMC 5-4 (GUGERLI et RAMEL, 2003 et 2004). Les échantillons de divers organes (feuilles, fleurs, bourgeons ou bois) ont été broyés avec un homogénéisateur Homex de Bioreba AG (Reinach, CH). Le broyage a été réalisé dans un rapport de 1/20 dans du tampon d'extraction. 200 µl de cet extrait ont été déposés dans deux alvéoles de plaques ELISA. Au moins deux répétitions par sujet à tester ont été évaluées. L'absorbance à 405 nm a été mesurée avec un photomètre Dynex MRX (Dynex Technologies GmbH, Denkerdorf, D). Ces mesures ont été effectuées principalement après deux ou quatre heures et exceptionnellement après 18 heures d'incubation du substrat. Le blanc correspond à la lecture du tampon substrat à 0 minute. La valeur «limite sain/malade» a été calculée en additionnant la valeur moyenne des échantillons sains et trois fois leur écart-type.

Test moléculaire RT-PCR

La préparation des échantillons à partir de feuilles ou de bois a été obtenue selon la méthode d'extraction de MCKENZIE *et al.* (1997) (kit Rneasy de Quiagen, Quiagen AG Bâle, CH) en suivant les instructions du fabricant. Les protocoles de MCKENZIE *et al.* (1997) et JELKMANN et KEIM-CONRAD (1997) ont été modifiés et adaptés pour la phase de RT-PCR, en utilisant AMV RT et Tth polymerases de Promega. Les paires d'amorces choisies sont indiquées dans le tableau 3. Les cycles d'amplification ont été effectués dans un thermocycleur UNO-Thermoblock (Biometra) en utilisant les paramètres suivants: quatre cycles (90 sec/94 °C, 30 sec/56 °C, 90 sec/72 °C) suivis par 30 cycles (40 sec/94 °C, 30 sec/43 °C, 40 sec/72 °C), suivis d'une polymérisation finale de cinq minutes à 72 °C. Les produits amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5% et coloriés au bromure d'éthidium.

Résultats

Analyse de bois et de fleurs

La production et l'évaluation des anticorps monoclonaux contre l'ASPV ont été décrites antérieurement. La détection du virus à partir d'échantillons foliaires a bien été démontrée (GUGERLI et RAMEL, 2003 et 2004). Afin de valider plus amplement le test ELISA sur d'autres organes, des échantillons de bois de pommier de la variété Golden Delicious de 1, 2 et 3 ans ont été analysés. Des résultats typiques sont présentés dans la figure 2. Les réactions des

◁ Fig. 2. Détection du virus ASPV par le test ELISA sur des échantillons de bois de 1, 2 et 3 ans de la variété Golden Delicious. *DO = densité optique à 405 nm (moyennes de six répétitions).

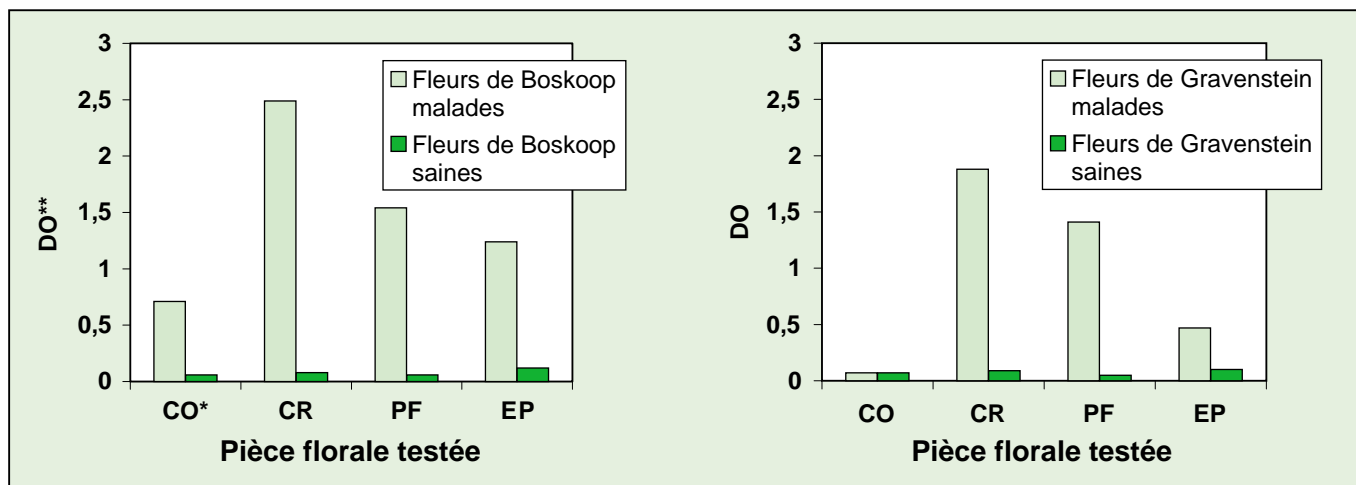


Fig. 3. Détection du virus ASPV par le test ELISA dans diverses pièces florales de deux variétés de pommier. *CO = corolle, CR = calice et réceptacle, PF = pédoncule floral, EP = étamines et pistils. **DO = Densité optique à 405 nm (moyennes de quatre répétitions).

échantillons provenant de l'arbre malade ont été comparables pour les trois âges et clairement distinctes des réactions de l'arbre sain. De même, la présence d'ASPV a été évaluée dans diverses pièces florales de deux variétés de pommier: Boskoop et Gravenstein. Comme le montre la figure 3, la répartition n'est pas la même pour les deux variétés. Le virus n'a pas été détecté dans la corolle des fleurs de Gravenstein à la différence des fleurs de Boskoop. Au contraire, les tissus du calice et du réceptacle et du pédoncule floral des deux variétés réagissent bien au test ELISA. Le virus est aussi reconnu dans les tissus de pistils et d'étamines.

Comparaison de différentes méthodes

Dans une première approche, le test ELISA a été comparé au test moléculaire RT-PCR. La comparaison s'est faite avec des échantillons de bois de pommier, de poirier et de feuilles de plantes herbacées *N. occidentalis* infectées par la même origine de virus. Le tableau 4 présente les réactions aux trois paires d'amorces. La concordance entre les résultats ELISA et RT-PCR a été partielle, particulièrement pour les échantillons provenant des plantes herbacées. Deux origines sur pommier n'ont été reconnues par aucune des trois paires d'amorces du test RT-PCR, contrairement au test ELISA qui a reconnu toutes les origines sur bois et feuille de plante herbacée. Par ailleurs, les trois paires d'amorces ont donné des résultats variables au test RT-PCR.

Deuxièmement, le test ELISA a été comparé à l'indexage biologique. Les

résultats sont présentés dans le tableau 5. La comparaison comprend d'un côté les observations faites sur le bois écorcé de l'indicateur *Malus sylvestris* V. crab et

d'autre part les réactions au test ELISA obtenues avec les échantillons homologues de la variété Golden Delicious, indicateur des maladies des fruits.

Tableau 4. Détection par tests ELISA et RT-PCR de diverses références de virus ASPV et PVYV sur hôte herbacé et ligneux.

Virus	N° d'identification	Variété	Organe	ELISA	RT-PCR		
					Paire d'amorces		
					H8534/C8849	C/A	ASPF1/ASPR5
ASPV+	49 N 1063	Gravenstein <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ -	+ +	+ -
	2118 N 953	Granny Smith <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ +	+ -	+ -
	97 N 1136	Priam <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ -	+ +	+ +
	7036 N 974	Golden Delicious <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	- -	+ +	- -
	2097 N 1125	Boskoop <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	- -	- -	- -
	2094 N 1137	Boskoop <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	- -	- -	- -
PVYV+	2224 N 952	Beurré Diel <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ -	+ -	+ -
	1544 N 1090	Abbé Fettel <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ +	+ +	+ +
	191 N 980	Super Comice <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ -	+ +	+ -
	23145 N 1141	Poire à Botzi <i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	+ +	+ +	+ +	- -
Sain	45	Granny Smith	Bois	-	-	-	-
	36	Golden Delicious	Bois	-	-	-	-
	52	Gravenstein	Bois	-	-	-	-
	159	Doyenne du Comice	Bois	-	-	-	-
		<i>N. occidentalis</i>	Bois Feuille	- -	- -	- -	- -
	tampon			-	-	-	-

Zone verte = concordance entre tests ELISA et RT-PCR.

Tableau 5. Comparaison des résultats obtenus par test ELISA sur bois et sur fleurs et par indexage sur indicateur ligneux.

N° d'identification	Variété	ELISA						INDEXAGE			
		Etat sanitaire selon indexage*						ASP		Autres viroses	
		Indicateur V. crab						Sévérité des striures sur l'indicateur**		Sévérité des striures à l'union (JNP)***	
		Bois		Fleurs		Feuilles		Interprétation du test	Interprétation du test	Interprétation du test	Interprétation du test
		DO°	Interprétation du test	DO°°°	Interprétation du test	DO	Interprétation du test				
5140-5141	Golden Delicious	1,32	+ °°	1,72	+			3	0,83	ASP+	ACLS+
5143-5144		0,06	-	0,09	-			0	0		ASG+
5146-5147		0,04	-	0,07	-			0	0		sain
5148-5149		0,03	-	0,09	-			0	0		ASG+
5152-5153		0,07	-	0,07	-			0	0		ASG+
5155-5156		0,08	-	0,08	-			0	0		ASG+
5158-5159		0,06	-	0,10	-			0	0		ASG+
5161-5162		0,92	+	0,97	+			3	0	ASP+	ASG+ ACLS+
5164-5165		0,99	+	1,14	+			2,3	0	ASP+	ASG+ ACLS+
5167-5168		1,68	+	0,41	+			2,67	0,16	ASP+	ASG+ ACLS+
5170-5171		1,03	+	0,90	+			2,5	0	ASP+	ASG+ ACLS+ FL+
5173		1,18	+					3	0	ASP+	ACLS+ RW+
5176-5177		1,34	+	1,59	+			3	1,5	ASP+	ACLS+ ApM+
5181		0,05	-	0,08	-			0	0		ACLSV+
5182		0,32	-	0,08	-			0	0		ASG+
5187		0,09	-					0	0		sain
5190		0,71	+	0,43	+			0,67	3	ASP+	ACLS+
5191		1,02	+					3	0	ASP+	ASG+ ACLS+ RW+
5194		1,36	+					2	0,8	ASP+	ACLS+ RW+
5197		0,14	-	0,06	-			0	0		ACLS+
5200-5201		0,08	-	0,06	-			0	0		sain
5203-5204		0,06	-	0,05	-			0	0		sain
TÉMOINS											
2901	Boskoop	1,96	+	1,51	+					ASP+	ACLS+ ASG+
636-637	Boskoop			0,08	-						sain
2108-10	Gravenstein	2,28	+	0,96	+					ASP+	ACLS+ ASG+ FL+
682-683	Gravenstein			0,08	-						ASG-
79	Maigold	0,05	-								sain
34	Golden Delicious	0,27	-								sain
3999-4001	Golden Delicious			0,07	-						sain
N 1090	<i>N. occidentalis</i>					1,15	+				
N 953						1,62	+				
N 922						2,22	+				
N 1063						2,44	+				
sain						0,14	-				

° Test sur bois: moyenne de deux; trois ou quatre répétitions, limite sain/malade = 0,39.

°° Résultats des tests: + test positif, - = test négatif, rien = non testé.

°°° Test sur fleurs: moyenne de deux; quatre ou huit répétitions, limite sain/malade = 0,10.

*ASP = *Apple stem pitting* (bois strié du pommier); ACLS = *Apple chlorotic leafspot* (maladie des taches chlorotiques du pommier), ASG = *Apple stem grooving* (bois rayé du pommier), RW = *Rubbery wood* (bois souple du pommier), ApM = *Apple mosaic* (mosaïque du pommier), FL = *flat limb* (plastomanie).

** = moyenne de notes d'évaluation (échelle 0 à 3).

***JNP = *jonction necrotic pitting* = stries concentrées sur la zone de l'union entre le porte-greffe et l'indicateur.

L'évaluation sérologique a été effectuée en hiver sur le bois et au printemps sur des fleurs. L'observation sur le bois écorcé comprenait à la fois la sévérité des striures sur l'indicateur et la focalisation des striures à l'union. L'AMC a reconnu toutes les origines qui ont provoqué des striures sur le bois, indépendamment de leur sévérité ou de leur localisation. Les autres viroses démontrées sur différents indicateurs n'ont pas interféré avec la détection de l'ASPV. Par rapport aux symptômes sur le bois, certaines origines ont produit des striures très marquées et bien réparties le

long de l'indicateur. Avec d'autres origines, les irrégularités du xylème ont été plutôt localisées sur la zone de l'union entre le porte-greffe et l'indicateur (en anglais «*jonction necrotic pitting*»). Ces expressions sont supposées être provoquées par différentes souches du virus (WELSH et UYEMOTO, 1980). La différence entre les réactions des échantillons positifs et négatifs a été très significative et comparable à celles mesurées pour les témoins ligneux et herbacés figurant au bas du tableau. La concordance entre l'indexage biologique et le test ELISA a été parfaite.

Application à large échelle

A la suite de ces résultats prometteurs, le test ELISA a ensuite été appliqué à l'analyse d'un plus grand nombre d'arbres comprenant des évaluations en cours par des indexages biologiques. 131 sujets représentant 113 variétés de pommiers, poiriers et cognassiers ont été ainsi testés à partir d'échantillons de bois récoltés en hiver. Le tableau 6 montre les résultats obtenus. La réponse du test ELISA a été comparée à l'état sanitaire connu par indexage biologique dans la majorité des cas. Pour

Tableau 6. Analyse de bois d'hiver de 131 arbres de pommier, poirier et cognassier par test ELISA.

Espèce	Etat sanitaire selon indexage*		N° d'identification	Nbre de variétés différencées	Nbre d'individus testés	Résultats du test ELISA**					
	ASP/PVY	Autres				Positifs		Négatifs		Douteux	
						Nbre	DO***	Nbre	DO	Nbre	DO
Pommier	nt	nt	3 6 633 639 1339 17043	6	6			6	0,05 à 0,20		
	ASP -	ASG -	4 5 7 11 13 17 21 27 33 35 37 39 41 51 57 59 61 65 67 71 7379 89 101 105 107 109 113 117 119 123 129 567 571 671 682 695 700 710	33	39			38	0,03 à 0,16	1	0,23
	en cours	en cours	15 43 45 1551 1553 1555 1557 1559	8	8	2	0,88 à 3,00	6	0,06 à 0,10		
	ASP -	RW +	2044 2068 2127 2884	3	4			4	0,04 à 0,08		
	ASP -	ASG +	Lo185-189 55 95 2111 2113 2197 2900	3	7			7	0,03 à 0,13		
	ASP -	ACLS +	2102 2103	1	2			2	0,03 à 0,05		
	ASP +	RW +	4409	1	1	1	1,63				
	ASP +	ACLS+ ASG+ RW	4357 4365	1	2	2	1,67 à 2,17				
	ASP +	ACLS+	47 97 684 2482 4372	4	5	5	0,31 à 2,25				
	ASP +	ACLS+ ASG+	2110 2901	2	2	2	1,08 à 1,48				
	ASP +	ACLS+ RW+ ApM+	2118	1	1	1	0,82				
Poirier	nt	nt	624	1	1			1	0,06		
	PVY -		155 157 159 161 165 167 168 170 171 173 175 179 181 185187 196 198 626	18	18			18	0,02 à 0,06		
	en cours	en cours	848 873 1448 1450 1451 1453 1455 1459 1506 1509 1510 1542 1544 1545 1547 1549 1606	17	17	2	0,64 à 3,00	14	0,03 à 0,07	1	0,08
	PVY +		177 191 643 2203 Lo579-572 Lo592-596	4	6	5	0,19 à 1,63			1	0,07
	PVY +	Gravelle +	St1er	1	1	1	2,34				
	PVY +	ACLS+	5936 5937	1	2	2	1,11 à 1,47				
	PVY +	RW +	2224 2225	1	2	2	0,98 à 1,54				
	Cognassier	nt	nt	606 611	2	2			2	0,04	
PVY -			346 348 617	3	3			3	0,03 à 0,04		
en cours		en cours	1446	1	1			1	0,06		
PVY +		RW +	2233	1	1					1	0,08
TOTAL				113	131	25		102		4	
T É M O I N S											
<i>N. occidentalis</i>	ASP+ ou PVY +		N 922 N953 N1063	1	3	3	0,99 à 3,00				
		sain	N sain		1			1	0,09		

*ASP = Apple stem pitting (bois strié du pommier), ASG = Apple stem grooving (bois rayé du pommier), RW = Rubbery wood (bois souple du pommier), ACLS = Apple chlorotic leafspot (maladie des taches chlorotiques du pommier), ApM = Apple mosaic (mosaïque du pommier), PVY= Pear vein yellows (jaunissement des nervures du poirier), nt = non testé.

**Moyenne de deux à cinq répétitions par plante.

***DO = densité optique; limite sain-malade pommier = 0,21; limite poirier et cognassier = 0,07.

26 arbres en cours d'indexage, quatre se sont révélés positifs au test ELISA. Ce résultat a ainsi précédé celui du test biologique. Des 23 arbres connus infectés par ASPV ou PVYV, 21 ont été aisément reconnus par le test ELISA. Seuls quatre, sur le total de 131 sujets testés, ont montré des réactions douteuses, nécessitant de plus amples vérifications, notamment la répétition avec un nombre accru d'échantillons.

Bibliographie

- CLARK M. F., ADAMS A. N., 1977. Characterization of a microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- DESIGNES J.-C., 1970. Observations sur quelques viroses du poirier: ring mosaic, vein yellows, quince sooty ring spot. *Ann. Phytopathol.* N° Hors série, 295-304.
- DESIGNES J.-C., BOYÉ R., CORNAGGIA D., GRASSEAU N., 1992. Quick detection of the principal apple and pear virus diseases. *Acta Horticulturae* **309**, 377-384.
- DESIGNES J.-C., 1999. Maladies à virus des arbres fruitiers. CTIFL, Paris, 202 p.
- FRIDLUND P. R., 1980. Glasshouse indexing for fruit tree viruses. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hungaricae* **15**, 153-158.
- FRIDLUND P. R., DRAKE S. R., 1981. Effect of pear vein yellows virus and a nonviral factor on the performance of pear trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **106** (4), 412-414.
- GILLES G. L., BORMANS H., 1986. Detection of fruit tree viruses by greenhouse indexing with woody indicators. *Acta Horticulturae* **193**, 275-281.
- GILLES G. L., BORMANS H., 1988. Improvement of greenhouse and field indexing techniques for fruit tree viruses. *Acta Horticulturae* **235**, 159-168.
- GIUNCHEDI L., POGGI POLLINI C., 1992. Cytopathological, negative staining and serological electron microscopy of a closter-like virus associated with pear vein yellows disease. *J. Phytopathol.* **134**, 329-335.
- GUGERLI P., RAMEL M.-E., 2003. Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of apple stem pitting and pear yellow vein viruses in apple and pear. Abstracts. In: Proceedings 19th International symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops, 21-25 July 2003, Valence, Spain, 20.
- GUGERLI P., RAMEL M.-E., 2004. Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of apple stem pitting and pear yellow vein viruses in apple and pear. *Acta Horticulturae* (sous presse).
- JELKMANN W., KUNZE L., VETTEN H.-J., LESEMAN D.-E., 1992. cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus-like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. *Acta Horticulturae* **309**, 55-62.
- JELKMANN W., 1994. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 1535.
- JELKMANN W., KEIM-KONRAD R., 1997. Immunocapture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. *J. Phytopathology* **145**, 499-503.

Discussion et conclusions

- ❑ Pommiers et poiriers sont fréquemment atteints par les viroses associées respectivement à l'ASPV et au PVYV. Des outils de diagnostic rapides, économiques et fiables, permettant des analyses en série, directement sur du tissu ligneux, n'étaient pas disponibles.
 - ❑ Avec l'obtention d'AMC hautement spécifiques, l'utilisation du test ELISA est devenue envisageable (GUGERLI et RAMEL, 2003 et 2004). Les auteurs ont démontré que la détection des virus par ce test était possible à partir d'échantillons foliaires et de bois.
 - ❑ La présente étude a maintenant confirmé la fiabilité de détection dans divers organes, en particulier dans le bois dormant de 1, 2 et 3 ans ainsi que dans des fleurs. Le diagnostic à partir du bois facilitera le travail dans le cadre des contrôles virologiques en relation avec la certification ou les échanges de matériel végétal.
 - ❑ La détection fiable des virus dans des échantillons de fleurs permet en outre d'étendre le contrôle virologique à d'autres périodes de l'année et donc la synchronisation du dépistage de plusieurs virus (ASPV, PVYV, ACLSV, ASGV ou ApMV). Vu la répartition inégale des virus dans les différents tissus floraux, l'utilisation de la fleur entière est recommandée.
 - ❑ La comparaison du test ELISA et de l'indexage biologique a révélé une parfaite concordance. Cela prouve que l'AMC disponible reconnaît tous les isolats et souches mis en évidence par les indexages biologiques réalisés.
 - ❑ Quant au test RT-PCR, avec les trois paires d'amorces utilisées ici, la concordance a été partielle et particulièrement moins fiable avec les échantillons provenant de plantes herbacées. Deux origines sur dix n'ont pas été reconnues du tout. L'utilisation d'autres amorces et l'affinement de la technique paraissent donc nécessaires.
 - ❑ Bien que les deux procédures de laboratoires abrègent notablement la durée du diagnostic à une journée, le test ELISA a l'avantage d'être moins coûteux et plus adapté au travail en série que le test RT-PCR.
 - ❑ Vu la variabilité de symptômes observée à l'indexage biologique, le test ELISA s'avère également très utile pour l'étude des syndromes atypiques liés à l'ASPV et au PVYV. La mono-spécificité de l'AMC confirme une fois de plus la parenté entre le virus responsable de la maladie du bois strié du pommier et le jaunissement des nervures du poirier.
- KOGANEZAWA H., YANASE H., 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Dis.* **74** (8), 610-614.
- LEMOINE J., MICHELES J.-C., 1976. Incidence des maladies à virus sur la production et le calibre des fruits de la variété de poire Docteur Jules Guyot. *CTIFL-Documents* n° 51.
- LEMOINE J., MICHELES J.-C., 1997. Incidence d'une contamination en verger de poirier. *L'Arboriculture fruitière* **508**, 35-40.
- LEMOINE J., GEOFFRION R., 2000. Sélection sanitaire du pommier et du poirier. *Phytoma* **531**, 46-51.
- MALINOWSKI T., KOMOROVSKA B., GOLIS T., ZAWADZKA B., 1998. Detection of apple stem pitting and pear vein yellows virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* **472**, 87-95.
- MCKENZIE D. J., MCLEAN M. A., MUKERJI S., GREEN M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* **81** (2), 222-226.
- PILOTTI M., FAGGIOLI F., BARBA M., 1995. Characterisation of italian isolates of pear vein yellows virus. *Acta Horticulturae* **386**, 148-154.
- RAMEL M.-E., GUGERLI P., SAUGY R., CRAUSAZ P.-H., BRUGGER J.-J., 1998. Contrôle virologique du pommier et du poirier par indexage rapide en serre et isolement des agents des principales viroses. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **30** (1), 13-21.
- SCHWARZ K., JELKMANN W., 1998. Detection and characterization of european apple stem pitting virus sources from apple and pear by PCR and partial sequence analysis. *Acta horticulturae* **472**, 75-85.
- SCHMIDT H., 1972. The effect of latent virus infections on the yield of maiden trees on 20 apomictic apple seedling rootstocks. *J. hort. Sci.* **47**, 159-163.
- VAN DER MEER F. A., 1986. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. *Acta horticulturae* **193**, 73-74.
- WELSH M. F., UYEMOTO J. K., 1980. Differentiation of syndromes caused in apple by graft-transmissible, xylem-affecting agents. *Phytopathology* **70**, 349-352.
- WESTWOOD M. N., CAMERON H. R., 1974. Effect of vein yellows virus on growth, flowering and yield of Anjou pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **99** (5), 425-426.
- YANASE H., KOGANEZAWA H., FRIDLUND P. R., 1988. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting, and a flexuous filamentous virus associated with them. *Acta Horticulturae* **235**, 157.

Zusammenfassung

Immunoenzymatische Diagnostik der Stammnarbung des Apfels und der Adernvergilbung der Birne mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern

Wichtige Apfel- und Birnenbaumkrankheiten werden durch das «apple stem pitting virus» (ASPV) und das verwandte «pear yellow vein virus» (PVYV) verursacht. Die rasche Diagnose dieser Krankheiten durch das ELISA-Verfahren wurde dank der Entwicklung der ersten monoklonalen Antikörper (MKA) möglich. Die Zuverlässigkeit dieses Tests wurde anhand von Proben von verschiedenen Arten, Sorten und Organen, von unterschiedlichen Alter und Jahreszeiten, geprüft. Das ELISA-Verfahren wurde mit der biologischen Indexierung und dem molekularen Nachweis mittels RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) verglichen. Dabei wurde eine totale Konkordanz zwischen den ELISA-Resultaten und der biologischen Indexierung gefunden. Hingegen hat das angewandte RT-PCR-Verfahren nicht alle Virusherkünfte erkannt. Der Virusnachweis mittels ELISA ist ab Mustern aus ruhendem Holz besonders zuverlässig. Da Kontrollen von Holzproben bei der Kommerzialisierung von Sorten wichtig sind, kann hiermit die Virusprüfung im Rahmen von Züchtungs- und Vermehrungsprogrammen erleichtert werden. Die Monospezifität des MKA hat weiter auch erlaubt, die grosse serologische Verwandtschaft zwischen dem ASPV und dem PVYV zu bestätigen.

Summary

Immuno-enzymatic diagnosis of the apple stem pitting and pear yellow vein diseases by means of monoclonal antibodies

Important diseases of apple and pear are caused by apple stem pitting foveavirus (ASPV) and the related pear vein yellows virus (PVYV). The fast diagnosis of these diseases by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) became possible thanks to the development of the first monoclonal antibodies (Mab's). The validation of the procedure was achieved with samples of various species, varieties and organs, at different vegetative states. The results have been compared to the biological indexing and molecular detection by RT-PCR assays (reverse transcription polymerase chain reaction). A total concordance has been observed between the results obtained by ELISA and the biological indexing. The applied RT-PCR protocol did not detect all origins of the viruses. Virus detection by ELISA revealed particularly reliable with samples of wood scrapings. Wooden material is usually used in the distribution of varieties. The virus control within selection and plant propagation programs will therefore be facilitated. The mono-specificity of these monoclonal antibodies also allowed to confirm the close serological relationship between ASPV and PVYV.

Key words: monoclonal antibodies, apple stem pitting virus, ASPV, pear vein yellows virus, PVYV, ELISA, detection, fruit viruses.

Riassunto

Diagnosi immuno-enzimatica delle malattie della butteraia del legno del melo e del giallume delle nervature del pero per mezzo di anticorpi monoclonali

Alcune malattie importanti del melo e del pero sono causate da *apple stem pitting virus* (ASPV) e dal suo prossimo parente *pear vein yellows virus* (PVYV). La rapida diagnosi di queste malattie per mezzo del test immuno-enzimatico Elisa è diventata possibile grazie allo sviluppo dei primi anticorpi monoclonali (AMC). La validazione della procedura è stata eseguita con degli esemplari di diverse specie, varietà ed organi prelevati a differenti stadi vegetativi. I risultati sono stati paragonati al saggio biologico su piante indicatrici ed all'identificazione molecolare per mezzo del test RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*). Tra i risultati del test Elisa e il saggio biologico è stata ottenuta una buona concordanza. Il test RT-PCR non ha però individuato tutte le origini del virus. L'identificazione per mezzo del test Elisa è particolarmente affidabile a partire da esemplari di legno invernale. Questo tipo di materiale è correntemente utilizzato nella commercializzazione di varietà. I controlli virologici nei programmi di selezione sanitaria e di produzione di piantine sono quindi facilitati. La mono-specificità degli AMC ha pure permesso di confermare la forte similitudine sierologica tra l'ASPV ed il PVYV.



BOUCHONS Schittler FABRIQUE DE BOUCHONS ET DE LIÈGE AGGLOMÉRÉ

E. & H. Schittler Frères SA
Autschachen 41
CH-8752 Naefels / Gl
Tél. +41 (0)55 618 40 30
Fax +41 (0)55 618 40 37
info@swisscork.ch

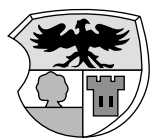
À LA RECHERCHE D'UN
BON TIRE-BOUCHON?
CONSULTEZ LE SITE
WWW.SWISSCORK.CH

Réduire vos coûts de production?

La solution...

Travaux de cave à façon - location de matériel de cave

Vinification - Préfiltration - Analyses - Mise en bouteilles
Etiquetage - Surpiquage d'étiquettes - Fournitures - Conseils œnologiques



Maison fondée en 1895

CAVE ALBERT MAYOR SA 1800 VEVEY

Prestataire de services

Tél. 021 921 13 41

Fax 021 921 19 38

Mobile 079 210 69 14

E-mail: cave.mayor@bluewin.ch