

Mise en evidence du virus 2 associé a  
l'enroulement foliaire de la vigne dans le  
vignoble tunisien (Grapevine Leaf Roll  
associated Virus 2 : GLRaV2)

*N. CHABBOUH , N. MAHFOUDHI & R. BESSAI*

*Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray, 2049.  
Ariana-Tunisie*



## ملخص

إثر الملاحظات والختبارات التي وقع إجراؤها على مرض التفاف أوراق الكروم في المزارع وقع تحديد أهم أعراض المرض وأثارها في الإنتاج. إلا أن المعلومات المتعلقة بالعوامل المسببة للمرض لم تكتمل بعد. فسبعة من الفيروسات هي مرتبطة بمرض التفاف أوراق الكروم (Turturo et al, 2000). بعض هذه الفيروسات قد وقعت البرهنة على أنها العوامل الحقيقية للمرض ولكن أثر البقية لم يقع تحديده بعد. وقد وقع إنجاز البحث المتعلق بدور GLRaV2 في مجموعة أعراض التفاف أوراق الكروم في عنب التحويل أو عنب الطاولة في تونس باستعمال التقنيات المتكاملة التالية :

- وصف الأعراض في الحقول مكن من تعيين الأشجار لإلتفاف أوراق الكروم في الحقول.
- التحليل المنظم بواسطة ELISA مكن من الكشف عن وجود GLRaV2 في عينات مأخوذة من الحقول أو مزرعة في البيوت المكيفة، سواء ظهرت فيها الأعراض أو استتورت.
- التقبيس البيولوجي عن طريق تطعيم عينات على أصناف حساسة يمكن من تمييز الالتفاف العادي وإظهار العلامات الموحية بحضور GLRaV2.
- التضخيم الجيني بواسطة تقنية البيولوجيا الجزيئية أثبت حضور GLRaV2 في العينات التي لا يبدو عليها أعراض الإصابة في الحقل على الأنواع المعروفة بأنها حساسة.
- ملاحظة الجزيئات الفيروسية في العينات التي أثبتت مختلف الطرق إصابتها قد وقع التأكد منها عن طريق تقنية الأمطال والمجهر الإلكتروني.

**الكلمات المفتاحية:** كروم، ستروفيروس، التفاف أوراق الكروم، فيروس 2 لتفاف أوراق الكروم، تونس

## Résumé

*Après les observations et les expérimentations réalisées sur la maladie de l'enroulement foliaire dans le vignoble, les principaux symptômes de la maladie ainsi que leurs effets sur les produits de la vigne ont été définis. Cependant, les connaissances sur son étiologie ne sont pas encore complètes. En effet, sept Closterovirus sont associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne (Turturo et al., 2000), certains de ces virus sont démontrés comme étant les véritables agents, le rôle des autres n'a pas encore été démontré. La recherche du rôle du GLRaV2 dans le syndrome de l'enroulement viral, chez les cépages de cuve et de table, en Tunisie, a été réalisée en utilisant les techniques complémentaires suivantes :*

- \* *la symptomatologie en plein champ a permis de repérer des souches extériorisant les symptômes caractéristiques de l'enroulement foliaire de la vigne en plein champ;*
- \* *L'analyse systématique au moyen de l'ELISA a permis de déceler la présence du GLRaV2 dans les échantillons provenant du champ ou cultivés en serre, avec ou sans symptômes;*
- \* *L'indexage biologique par greffage des échantillons sur des indicateurs ligneux sensibles permet de caractériser l'enroulement commun et d'extérioriser des symptômes suggérant la présence du GLRaV2 sur des indicateurs spécifiques ;*
- \* *L'amplification génique au moyen de la technique moléculaire RT-PCR a confirmé la présence du GLRaV2 dans des échantillons non enroulés au champ sur des variétés normalement sensibles;*
- \* *L'observation des particules virales, dans des échantillons confirmés infectés par les différentes méthodes utilisés, est vérifiée au moyen de l'immuno-électromicroscopie.*

**Mots- clés:** closterovirus, GLRaV2

## Abstract

*After observations and experimentation on Grapevine Leaf Roll, in the vineyard, the main symptoms of the disease as well as their effects on products of the grapevine have been defined. However, knowledge on its aetiology is not complete. Seven Closteroviruses viruses are associated to Grapevine Leaf Roll disease (Turturo and al., 2000), some of these viruses are demonstrated to be the real agents, the role of the other has not been demonstrated. The research of GLRVa2 role in Grapevine Leaf Roll disease, in wine and table vines, in Tunisia, has been achieved using the following complementary techniques:*

*Prospecting field permitted to mark plants expressing characteristic symptoms of grapevine leaf roll disease*

- Systematic analysis by ELISA permitted to disclose presence of GLRVa2 in samples coming from field or cultivated in greenhouse, with or without symptoms.*
- Biological indexing on sensitive woody indicators permits to characterise the common leaf roll and to express symptoms suggesting GLRVa2 presence on specific indicators.*
- molecular biology using RT-PCR confirmed presence of the GLRVa2 in samples of sensitive varieties non rolled in field.*
- Viral particle observation in infected samples is confirmed by immuno-electromicroscopy.*

*Key word: closterovirus, GLRVa2*

## Introduction

L'enroulement foliaire de la vigne est une maladie connue dans toutes les régions viticoles du monde. Les souches malades montrent un enroulement du limbe accompagné d'un rougissement des feuilles chez les cépages rouges ou d'un jaunissement si le cépage est blanc. Ces altérations entravent qualitativement et quantitativement la production des grappes.

Toutefois, certaines souches de vigne choisies pour l'absence des symptômes au champ et testées indemnes des virus de l'enroulement 1 et 3 (Grapevine Leaf Roll associated Virus 1 et 3) montrent après indexage un enroulement foliaire sur les indicateurs sensibles. Ces symptômes manifestés sur la variété *Vitis Riparia Gloire* évoquent la présence du GLRaV2. Le GLRaV2 a été impliqué tantôt dans la maladie de l'enroulement foliaire tantôt dans la maladie de l'écorce liégeuse de la vigne et plus récemment il est décrit comme étant responsable d'une incompatibilité au greffage sur 5BBKober. Notre objectif est la recherche du GLRaV2 dans le vignoble tunisien. Différentes techniques biologiques, sérologiques, moléculaires et ultramicroscopiques sont combinées pour caractériser le virus en question et trouver une éventuelle relation entre la présence de ce virus et les symptômes d'enroulement dans les échantillons candidats pour les différentes analyses.

## Matériel et méthodes

Les échantillons ayant servi aux analyses virologiques sont formés de 3 types de matériel végétal :

\* Des boutures ligneuses prélevées au hasard sur les différents cépages de *Vitis vinifera* installés dans 42 vignobles commerciaux, de collection et des parcs à bois situés dans les principales zones viticoles de la Tunisie.;

\* Un deuxième type de matériel présélectionné est formé par les plants marqués pour l'absence de symptômes de nature virale au champ et révélés, au moyen de la sérologie, indemnes des virus suivants : GFLV, GVA et GLRV1 et 3;

\* Le matériel biologique utilisé contient également des échantillons de vigne infectée par le GLRV2 (provenant de l'IAM-Bari) ainsi que des échantillons de vigne saine, utilisés comme témoins;

L'ensemble de ce matériel, prélevé sous forme de boutures en hiver, est analysé en utilisant les méthodes suivantes :

\* Les tests immuno-enzymatique (ELISA): La présence des virus GLRaV2 est effectuée en utilisant la technique DAS-ELISA (Boscia et al., 1997) ; les sérums utilisés proviennent d'un kit commercial (Sanofi);

\* Méthodes biologiques : La méthode adoptée correspond à l'indexage, sur les variétés indicatrices : *Vitis rupestris*, 5BBKober, LN33, Mission et *Vitis Riparia Gloire*, par greffage en oméga des échantillons révélés infectés par le GLRV2 mais ne présentant pas de symptômes au champ.;

\* Les méthodes moléculaires : les échantillons positifs en ELISA pour le GLRV2 sont analysés par la RT-PCR selon la procédure décrite par Wetzel et al.(1991). Les amorces spécifiques du GLRaV2 utilisées présentent les séquences suivantes :

\*up 140-2 (5' AGGCGGATCGACGAATAC 3' sens ) homologue à la séquence comprise entre la position 4280 et 4298 nt du gène codant pour la protéine HSP70 (65K) représentant l'ORF 3,

\*up 111 (5' ATCCTGTCCGGCGCTGTG 3' antisens) complémentaire à la séquence comprise entre la position 5082 et 5100 nt du gène codant pour la protéine HSP90 (63K) représentant l'ORF4 de la séquence déterminée de la partie 3' terminale du génome.

\* La microscopie électronique (réalisée intégralement à l'IAM-Bari) : l'observation de la morphologie des particules est réalisée en microscopie électronique selon le protocole établi par Milne (1993).

## Resultats et discussion

### Observation des symptômes

Les notations directes, réalisées dans le cadre de la sélection sanitaire du matériel viticole, montrent une gamme assez large de symptômes d'enroulement foliaire d'intensités variables allant d'une intensité faible à une intensité forte en passant par l'intensité moyenne. Les feuilles enroulées chez les variétés prospectées Carignan, Grenache et Alicante Bouschet montrent un rougissement du limbe d'intensités également variables allant du rouge au rouge-violacé caractéristiques de la maladie. Les notations montrent également une répartition assez large de la maladie de l'enroulement sur la variété Muscat qui extériorise un enroulement plus ou moins sévère et un jaunissement du limbe, aussi bien dans les vignobles commerciaux, de collection que dans les parcs à bois. Ces prospections au champ ont permis de retenir, dans les 42 vignobles choisis, l'échantillonnage suivant :

\* 1010 échantillons sont collectés au hasard, avec et sans symptômes, sur un effectif représentant 10% de l'effectif total des plants prospectés, appartenant aux variétés : Carignan , Grenache, Alicante Bouschet , Syrah, Muscat d'Italie et Muscat d'Alexandrie.

\* 133 plants sont choisis sur la base de l'absence de symptômes dus aux virus. Ils appartiennent aux cépages suivants : Carignan , Grenache, et Alicante Bouschet, ils sont caractérisés par l'absence des virus GFLV, GFkV, GVA, GLRV1 et 3 (Chabbouh et Marrakchi, 1998).

\* 10 plants de Carignan sont choisis pour les symptômes typiques d'enroulement observés sur les feuilles.

La multitude de symptômes d'enroulement foliaire, observés au champ, évoque les différentes combinaisons de facteurs agissant dans la manifestation des symptômes du complexe de l'enroulement viral de la vigne. L'éventuelle association de ces symptômes avec le GLRV2 a été expérimenté au moyen de la sérologie.

## Résultats sérologiques

Les analyses immuno-enzymatiques pour la présence du GLRaV2, effectuée en utilisant la technique DAS-ELISA, ont permis d'obtenir les résultats suivants :

\* Sur les 1010 échantillons collectés au hasard, 19 échantillons se sont révélés infectés par le virus, soit un taux d'infection de 18,8 % toutes variétés confondues à l'exception de l'Alicante Bouschet où aucun échantillon infecté par le GLRV2 n'a été détecté.

\* Sur les 133 échantillons ne montrant pas de symptôme au champ, 9 échantillons ont montré une réaction positive traduisant la présence du GLRV2 sur les deux variétés Carignan et Grenache, soit un taux d'infection de 6,7% des échantillons sans symptômes apparents.

\* Sur les 10 échantillons extériorisant des symptômes classiques d'enroulement, chez le Carignan, aucun plant n'a montré la présence du GLRV2.

Les résultats des tests immunoenzymatiques suggèrent une faible implication du GLRV2 dans les symptômes d'enroulement observés au champ. En effet, dans les échantillons montrant des symptômes, le virus n'a été détecté aucune fois alors qu'il est présent dans les échantillons ne montrant pas de symptômes. Toutefois nous notons la faible concentration du GLRV2 dans les tests effectués. En effet, les densités optiques (DO) des produits colorés, obtenues au moyen du spectrophotomètre (Multiskan Ascent) sont faibles. Ceci nous a orienté vers l'utilisation des méthodes plus sensibles pour confirmer la présence du GLRV2.

## Résultats de l'indexage biologique

Ces résultats concernent uniquement 9 plants confirmés infectés par le GLRV2 en ELISA et présélectionnés visuellement pour l'absence de symptôme et sérologiquement pour l'absence de ces virus : GFLV, GVA et GLRV1 et 3. Ces plants greffés sur *Vitis rupestris*, 5BBKober, le LN33, Mission et *Vitis Riparia* Gloire, font l'objet d'un contrôle régulier, pour l'apparition des symptômes. Ce contrôle a permis de réaliser les notations suivantes :

\* Les variétés indicatrices LN33 et Mission montrent l'absence d'enroulement foliaire, confirmant ainsi l'absence, obtenue au moyen de l'ELISA du GLRaV1 et du GLRaV3 identifiés comme responsables de la maladie (Savino, 1996 et Walter, 2000)

\* Cependant, ces notations ont permis de repérer sur les plants inoculés de la variété indicatrice *Vitis Riparia* Gloire des symptômes d'enroulement précoce des feuilles vers le bas ainsi qu'une pigmentation rouge anormale affectant aussi bien les nervures.

\* que le reste du limbe (Fig.1). Les mêmes observations sont décrites par Boscia et al., (1993) qui associent ces symptômes à la présence du GLRV2 ; Gugerli et al. (1997) notent aussi que le GLRV2 est associé à un rougissement total des feuilles.

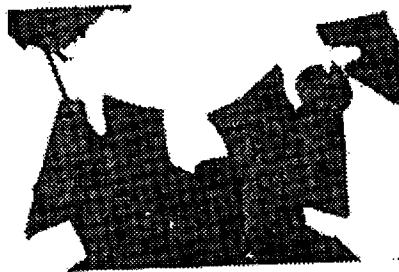


Figure 1. Enroulement des feuilles sur RGloire et pigmentation anormale des nervures



Figure 2. Incompatibilité au greffage sur 5BBKober

\* Les notations ont également permis d'observer, sur les plants inoculés de la variété indicatrice 5 BBKober, une incompatibilité au greffage (fig.2). Les mêmes symptômes sont décrits par (Greif et al.,1995) comme étant dus au GLRVa2 .

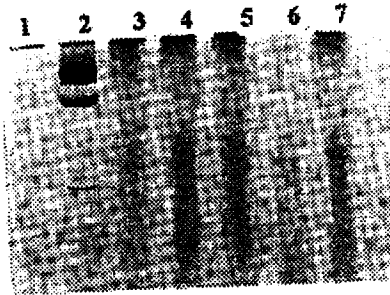


Figure 3 Profil électrophorétique des produits de la RT-PCR sur gel polyacrylamide

Ces résultats sont en accord avec les résultats sérologiques qui montrent la présence du GLRV2 confirmant ainsi les résultats obtenus par les auteurs cités plus haut.

## Résultats moléculaires

L'analyse électrophorétique des produits amplifiés en RT-PCR, sur gel de polyacrylamide, montre

\* la présence de bandes dans les pistes 5, 6 et 7 (Fig.3 ) correspondants aux échantillons de vigne analysés, choisis sur la base des résultats de l'indexage. La taille de ces bandes est d'environ 821pb, ce qui correspond à la taille du fragment à amplifier appartenant au gène codant pour la protéine HSP70 de l'ORF3 et du gène codant pour la protéine HSP90 de l'ORF4.



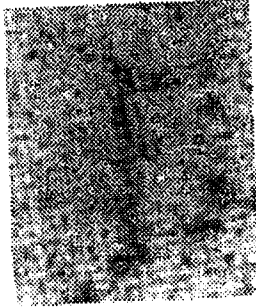


Figure 4. Observation ultramicroscopique d'une particule virale du GLRaV2

\* la présence d'une bande correspondant également à 821pb, dans la piste 3 (Fig.3 ) de l'échantillon de vigne infectée utilisée comme témoin.

\* Aucune bande n'a été obtenue dans les échantillons correspondant respectivement au témoin sans ADN et au témoin de vigne révélé sain en sérologie (Fig.3 : pistes 1 et 4).

\* La piste 2 (Fig.3 ) est réservée au marqueur de poids moléculaires 1 Kb ladder.

Ces résultats confirment donc la présence du GLRV2 dans les échantillons révélés déjà infectés au moyen de la sérologie et qui ont montré des symptômes spécifiques sur les indicateurs utilisés dans les opérations de l'indexage biologique.

## Résultats de la microscopie électronique

Après la sensibilisation par les anticorps monoclonaux du GLRaV2 d'une grille de 3mm de diamètre 150 meshes et le transfert sur une solution virale du GLRaV2 purifié la grille est colorée à l'acétate d'uranyle 2%. L'observation en microscopie électronique a révélé la présence de particules virales allongées décorées par les anticorps monoclonaux du GLRaV2 (Fig. 4). Ce qui confirme la présence d'un virus filamenteux. En effet, le GLRaV2 appartient aux Closterovirus qui regroupent les virus filamenteux (Martelli et al.,1997).

## Discussion générale et conclusion

Les différents résultats obtenus montrent :

- Que le GLRVa2 a été identifié pour la première fois, en Tunisie, au moyen d'anticorps monoclonaux aussi bien dans les échantillons prélevés au hasard dans le vignoble que sur des indicateurs greffés par des sujets présumés sains élevés en serre.

- Les tests sérologiques suggèrent également la faible implication du GLRV2 dans les symptômes d'enroulement observés au champ. En effet, dans les échantillons montrant des symptômes, le virus n'a été détecté aucune fois alors qu'il est présent dans des échantillons ne montrant pas des symptômes.

- Qu'il a été possible de transmettre par greffage le GLRaV2 sur des indicateurs ligneux caractérisant le virus, à savoir le 5BBKober et le *Vitis Riparia* Gloire.
- Les tests moléculaires ont permis d'amplifier un fragment correspond à une partie du gène codant pour la protéine HSP70 et HSP90 du GLRV2. Ceci confirme la présence de particules de ce virus, dans les échantillons positifs de l'indexage biologique sur 5BBKober et *Vitis Riparia* Gloire.
- L'immuno électromicroscopie a montré, enfin, la présence de particules allongées caractérisant le GLRV2 qui appartient au groupe des Closterovirus qui réunit les virus à particules filamenteuses.

## Remerciements

Nous remercions l'équipe de Bari pour la partie réalisée entre l'IAM-Valenzano et l'Université de Bari. Nous remercions également les techniciens du Groupement Interprofessionnel de la Vigne qui nous ont orienté vers les vignobles les plus représentatifs.

## Références bibliographiques

- Boscia D., Savino V., Minafra A., Namba S., Elicio V., Castellano M.A., Gonsalves D. & Martelli GP 1993. proprieties of a filamentous virus isolated from grapevines infected by corky bark. Archives of Virology 130, 109-120
- Boscia D., Digiario M., Fresno J, Greif C Grenan S. Kassemeyer H.H., Prota VA & De Sequeira O.A., 1997. ELISA for the detection and identification of grapevine viruses. In sanitary Selection of the Grapevine. Les colloques INRA 86,129-155.
- Chabbouh N. et Marrakchi M., 1998. Contribution à l'étude de l'écorce liégeuse dans le vignoble tunisien. Bul. OIV. Vol .71. 813-814
- Greif C., Garau R., D. Boscia, Prota VA, Fiori M., Bass P., Walter B. & Prota U.,1995. the relationship of grapevine associated closterovirus 2 with graft incompatibility conditions of grapevines. *Phytopath. Medit.*, 34,167-173.
- Gugerli P., Brugger J.J. & Ramel M.E.,1997. Immunochemical and biological distinction of grapevine associated virus 2 and 6 in complex infection with other known and unidentified viruses. 12th meeting of International council for the study of viruses and virus -like diseases of grapevine(ICVG). 28th sept. 2nd oct.1997. Lisbon, Portugal.
- Turturo C.,Rott ME., Minafra A., Sakdarelli P., Jelkmann W. and Martelli GP. 2000. Grapevine Leafroll associated Virus1.XIIIth meeting of International council for the study of viruses and virus -like diseases of grapevine(ICVG). 12-17 mars , 2000.Adélaïde ( Australia).
- Martelli GP Sakdarelli P., Boscia 1997. Filamentous viruses of grapevine.closteroviruse.in : filamentous viruses of woody plants. MonetteP.I. Ed. Research Signpost Trivandrum, India.
- Milne RG. & Louisi E., 1993. Rapid immune electron microscopy of Virus preparations.In: Methods in Virology (K Maramorosch and H. Koprowski eds) 6, 265-281.
- Savino V., 1996. Correlazioni tra virus floematici ed il complesso dell'accartocciamento fogliare e del legno riccio della vite. Virus floematici e malattie della vite. Locorotondo,3-4 ottobre 1996.
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M. & Dunez J., 1991.A Polymerase Chain Reaction assay adopted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*.33, 355-365.
- Walter B., 2000. Les Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne. Edi. Féret pp 192.