



Identification et caractérisation biologique de l'isolat d'une chlorose virale type calico sur amandier

Boulila M.

*Institut de l'Olivier. B.P. 14; 4061 Sousse Ibn Khaldoun-
Tunisie. E-mail: boulilamoncef@yahoo.fr*

*N.B. Cet article comporte des figures que pour des raisons techniques nous n'avons
pu reproduire. Nous nous en excusons auprès de l'auteur et des lecteurs.*

La Rédaction en Chef.

ملخص

حسب البحث الذي أُجري في الجنوب التونسي، تمت ملاحظة شحوب فيروسية يشبه مرض كاليكول الذي يصيب أشجار الموز، الواردة في الأدبيات كما تم إخضاعه لتجارب بيولوجية. وقد سمحت مجموعة الطرق المستعملة بتحديد فيروس البقع الحلقية القاتمة المرتبطة بهذا المرض. بالإضافة الى ذلك تم التحديد البيولوجي للعزلة. وتجدر الإشارة الى أن هناك دراسات لاحقة للتفاضل بين مختلف العزلات ستحمل معلومات عن التنوع البيولوجي لمختلف طبقات الشحوب الفيروسي.

Résumé

Durant une enquête effectuée dans le sud tunisien, un cas de chlorose virale similaire à la maladie du calico de l'amandier, décrite dans la littérature, a été observé et a fait l'objet de tests biologique (plante indicatrice herbacée), microscopique (DIP, ISEM et décoration) et moléculaire (RT-PCR). L'ensemble des méthodes utilisées a permis d'identifier le virus des taches annulaires nécrotiques des Prunus (PNRSV) comme étant associé à cette maladie. En outre, une caractérisation biologique de l'isolat a été faite. Des études ultérieures de caractérisations comparées de différents isolats apporteront de plus amples informations quant à la diversité biologique dont différentes souches de ce virus seraient à l'origine.

Abstract

During a survey conducted in southern Tunisia, a viral chlorosis very similar to almond calico disease reported in the literature, has been observed and dealt with in biological (herbaceous indicators), microscopical (DIP, ISEM and decoration) and molecular assays (RT-PCR). Prunus necrotic ringspot virus was identified in infected samples. A biological characterization of the isolate was also done. Further typing studies would highlight the biological diversity having a probable origin of different PNRSV strains.

Introduction

Jusqu'à ce jour en Tunisie, les affections virales touchant l'espèce amandier (*Prunus amygdalus* Batsch) sont, en substance, le complexe viral de la mosaïque qui a fait l'objet de nombreuses études (Dunez, 1986 ; Boulila, 1992 ; 1997, 2002 ; Zeramdini, 1996. Boulila et Marrakchi, 1999 ; 2001) et le " Bud Failure " qui est considéré comme une altération d'origine génétique (Di Terlizzi et al., 1990) et qui a été signalée, pour la première fois, dans le sud de la Tunisie par Siriez (1981). Durant des enquêtes de terrain effectuées dans cette même région, en particulier dans la région d'Ettaous et de Boughrara (Sfax), nous avons pu observer un cas singulier (variété Achak) d'une chlorose qui rappelle la maladie du Calico de l'amandier signalée pour la première fois aux USA par Thomas et Rawlins (1939 ; cités par Németh, 1986). Ces auteurs ont mis en évidence la nature infectieuse du " Calico " causée par le virus des taches annulaires nécrotiques des *Prunus* (PNRSV). A l'époque, ils ont mentionné que ce virus serait étroitement lié au " Bud Failure " ou à l'oreille du mulet du pêcher ; il serait, en outre, l'agent responsable de la maladie des taches foliaires " pinto " du cerisier doux. Afin de démontrer la nature virale de cette affection, nous avons procédé à un diagnostic biologique, microscopique et moléculaire. De plus, une caractérisation de l'isolat, utilisant diverses plantes herbacées, a été réalisée. Le présent article fait état de l'ensemble des éléments ainsi mentionnés.

Matériel et méthodes

Description des symptômes au champ

L'arbre malade montre une chlorose unilatérale (fig. 1a). L'examen rapproché de la frondaison montre que les feuilles sont réduites en taille, caractérisées par des taches chlorotiques confluent et donnant l'aspect d'une chlorose marginale dont l'extension peut intéresser le limbe dans sa totalité épargnant, de place en place, la nervure médiane (fig. 1b). Avec l'arrivée des fortes chaleurs estivales, l'aspect jaune doré des feuilles vire au jaune blanchâtre (fig. 1b). En outre, les fruits, contrairement aux plantes saines, sont de petite taille et présentent un épicarpe lavé de jaune (fig. 1c). Ceux-ci, au fur et à mesure que la saison végétative avance, peuvent se momifier et tomber par terre.

Transmission mécanique

Afin de s'assurer de la nature virale de l'infection, une transmission mécanique par frottis a été faite sur de jeunes plants de *Cucumis sativus* cv Marketer au stade de feuilles cotylédonnaires bien déployées. Celles-ci ont été saupoudrées par un abrasif (célite ou du carborundum) afin de créer des microlésions favorisant l'entrée instantanée du virus dans les cellules du végétal. Le broyage du tissu végétal infecté a été effectué dans un mortier contenant une solution d'extraction [tampon phosphate disodique-monopotassique (v:v = 8:2) 0,02 M, pH 7,8 ; de la nicotine

2,5% (anti-oxydant) et du DIECA 0,02 M (Diethyldithiocarbamate de sodium, inhibiteur des oxydases des polyphénols) en respectant le rapport : volume de tampon : poids de feuilles égal à 3:1. Il est utile (non indispensable) d'ajouter du charbon activé (adsorbant des inhibiteurs au moment de l'inoculation) à raison de 90 mg/ml d'inoculum. L'étape finale consiste à rincer les feuilles après inoculation.

Les plantes sont placées dans une serre vitrée dont la température est réglée comme suit : 18°C de nuit et 24°C de jour.

Microscopie électronique

Dans le présent travail, nous avons utilisé les mêmes techniques, c'est-à-dire celles ayant servi pour la détection du virus du nanisme du prunier chez l'amandier (Boulila, 2002). De fait, il s'agit de l'ISEM (Immunosorbent electron microscopy) ou piégeage et de la décoration.

Les observations (à une différence de potentielle de 60 kilovolts) ont été faites à l'aide d'un microscope électronique à transmission (marque ZEISS EM 10/C) du Centre des services interdépartementaux de Microscopie de l'Université de Potenza (Italie). Les anticorps ont été fournis par l'Institut Expérimental pour la Pathologie Végétale de Rome. Deux sérums anti-PDV (ISPAVE n° 35a) ayant un titre de 1 :128 et anti-PNRSV (ISPAVE n° 73a) ayant un titre de 1 :512, ont été utilisés.

La technique ISEM

Cette méthode est basée sur le même principe d'immobilisation et de concentration de l'antigène que l'ELISA. Elle a été développée par Derrick (1973). La grille porte-échantillon est sensibilisée avec les anticorps. Seules les particules du virus correspondant sont retenues et concentrées sur la grille. La technique du "trapping" ou piégeage (Van Regenmortel, 1981, Milne, 1986) a été appliquée. Elle consiste à sensibiliser une grille avec des anticorps qui immobilisent le virus contenu dans le jus de plante. Dans ce cas précis, les particules virales sont plus concentrées qu'avec la technique DIP (adsorption sur goutte). Elle est particulièrement adaptée pour la détection de virus faiblement concentrés dans l'extrait de plante.

La technique ISEM utilisée est la suivante :

A l'aide d'une pipette Pasteur, un aliquote de l'antisérum dilué au 1/1000^{ème} (de préférence dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7) est prélevé. Une goutte de celui-ci est déposée sur une surface plane hydrophobe en chambre humide (une boîte de pétri contenant un morceau de papier imbibé d'eau au dessus duquel est placé un morceau de papier siliconé, le tout est recouvert d'un couvercle). Une grille de 400 mesh est mise en contact des anticorps, toujours la face carbonée orientée vers la goutte (l'incubation dure 15 mn). Un aliquote de l'échantillon est prélevé et une goutte est déposée sur la surface hydrophobe se trouvant dans la chambre humide. Après rinçage de la grille avec 20 gouttes de tampon phosphate 0,05 M, pH 7, celle-ci est déposée sur l'échantillon pendant 15 mn. Au terme de l'incubation, la grille est rincée avec 20 gouttes de tampon phosphate 0,05 M, pH 7 et 40 gouttes d'eau distillée. La coloration négative se fait en percolant 10 gouttes d'acétate d'uranyle au 2% ; éliminer l'excès du liquide en faisant passer un papier filtre entre les bras de la pince et sur la grille. L'étape finale est l'observation.

La décoration

La technique de décoration consiste à mettre en contact une grille où le virus est déjà absorbé sur cette dernière avec les mêmes anticorps. Elle permet d'identifier, avec précision, le virus ; mais également, de mettre en évidence le degré de parenté (ou de corrélation) entre les virus (Walkey et Webb, 1984).

Elle consiste à mettre en contact une goutte d'antisérum (dilué au 10^{ème}) et la rétine (provenant de l'ISEM après l'étape de piégeage du virus) et laisser incuber durant 15 mn. Les étapes de rinçage de coloration sont identiques aux méthodes précédemment décrites.

L'amplification de séquences

A l'instar du travail réalisé sur le PNRSV présent dans les parcs à bois de la profession en Tunisie (Boulila et Marrakchi, 2001) et à la lumière des résultats obtenus par microscopie électronique, l'amplification génique a été effectuée. Celle-ci comporte les principales étapes suivantes : extraction des acides nucléiques totaux (TNA), synthèse de l'ADNc, PCR et vérification de l'amplification par un gel de polyacrylamide.

Extraction des acides nucléiques totaux (TNA)

La méthode des TNA est fréquemment utilisée en PCR (Hadidi et al., 1995). Elle se base sur l'extraction des acides nucléiques totaux par le moyen du phénol et du chloroforme qui éliminent les protéines et les substances contaminantes et leur précipitation par l'éthanol. Crescenzi et al. (1995) ont adapté cette technique pour le virus de la Sharka. Nous l'avons également appliquée pour le PNRSV et dont voici la méthodologie : L'échantillon (100 mg) de feuille de *Cucumis sativus* cv Marketer est broyé dans 1 ml de solution d'extraction 1X EB (Extraction Buffer) dans un mortier, préalablement refroidi 30 mn avant son usage dans de la glace pilée. Dix millilitres de solution 1X EB sont composés de : 1 ml de tampon 10X EB (une solution mère de 500 ml contient 38,5 g de Glycine, 29 g de NaCl et 100 ml de 0,5M EDTA, pH 8), 2 ml de 10% SDS, 1 ml de 10% N-Lauroyl Sarcosine et 6 ml d'eau ultrapure. Il faut prélever 400 μ l de broyat et les verser dans un microtube de 2 ml contenant 800 μ l d'une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1). Une agitation monotube (vortex) durant 1 mn et un repos, pendant 5 mn dans de la glace, sont effectués. De nouveau, il faut faire une agitation monotube pendant 1 mn et une centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse de table (Microcentrifuge E Beckman) à la vitesse maximale de 15.000 t/mn durant 10 mn. Le surnageant est récupéré auquel, il faut ajouter 2 volumes de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1). Il faut appliquer une agitation monotube pendant 1 mn et une centrifugation à la vitesse de 15.000 t/mn durant 5 mn (centrifugeuse Sigma 3k30). Le surnageant est récupéré, auquel il faut ajouter un volume d'une solution de chloroforme-alcool isoamylique (24-1). Une agitation monotube durant 1 mn et une centrifugation à la vitesse de 15.000 t/mn pendant 5 mn, sont effectuées. Le surnageant est récupéré dans un autre tube, on y ajoute le 1/5 du volume d'acétate d'ammonium 10 M et 3 fois le volume d'éthanol absolu. Il faut agiter, de nouveau, le contenu du tube, pendant 1 mn qu'il faut placer, par la suite, à une température de -70°C pour une durée minimale de 20 mn. L'étape suivante consiste à faire une centrifugation à 15.000 t/mn (à 4°C et durant 10 mn). Les microtubes sont

vidés lentement et le culot est récupéré. De l'éthanol à 70% (pour éliminer les sels) y est ajouté. Une autre centrifugation à 4°C (15.000 t/mn durant 10 mn) est faite. Les microtubes sont, de nouveau, vidés et le culot est récupéré. Celui-ci est asséché sous vide (concentrator drying rate SAVANT) durant 5 mn et remis en suspension avec 50 μ l d'eau ultrapure. Les microtubes sont conservés à -70°C.

Synthèse de l'ADNc

Cette étape comporte essentiellement une phase de dénaturation et de linéarisation du modèle (ARN viral), notamment, par le chauffage (eau bouillante), une phase de refroidissement (glace pilée) pour éviter sa renaturation, une phase d'hybridation de l'amorce complémentaire avec celui-ci (température ambiante) et, enfin, la phase de synthèse de l'ADNc (nucléotides, rétro-transcriptase, inhibiteur de ribonucléase, divers sels eau,...) à 45°C.

A 5 μ l (1(g) d'échantillon TNA sont ajoutés : 6 μ l d'une solution tampon 5X RT [(STRATAGENE), composée de 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 à 25°C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ et de 50 mM DTT], 3 μ l de 0,1 M DTT, 183 pmoles (GENENCO) de l'amorce complémentaire et 15 μ l d'eau stérile. Une agitation monotube (vortex) et une très brève centrifugation (spin down) sont effectuées. Une première incubation des tubes dans de l'eau bouillante (100°C) durant 5 mn ainsi qu'une seconde (des mêmes tubes) dans de la glace pilée pendant 5 mn et, enfin, une dernière, à température ambiante pendant 15 mn, sont faites. L'étape suivante consiste à ajouter dans chaque tube (20 μ l) le milieu réactionnel suivant :

- 4 μ l de la solution tampon 5X RT, 2 μ l de 0,1 M DTT, 5 μ l de 0,3 M 2-Mercaptoéthanol ; 2,5 μ l de 10 mM dNTPs (2,5 mM dATP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP et 2,5 mM dCTP),

- 4,5 μ l de H₂O, 1 μ l de RNasin [inhibiteur de ribonucléase (AMBION) à la concentration de 40 U/ μ l], 1 μ l de transcriptase inverse de MoMuLV à la concentration de 50 U/ μ l (STRATAGENE). L'étape ultime consiste à faire une agitation monotube, une très brève centrifugation et une incubation à 45°C pendant 30 mn.

Réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

Elle consiste à préparer le milieu réactionnel suivant : dans chaque tube PCR (0,2 ml), il faut verser : 5 μ l (2 ng) d'ADNc, 14 pmoles de l'amorce sens [(GENENCO), sa séquence est :5'-AGA CGT CGT GAC AGA CGT CGA AG-3'], 18,3 pmoles de l'amorce antisens [(GENENCO), sa séquence est :5'-CTT CGG ACC ATA GAC ATC-3'] d'après Hammond et Crosslin (1995), 5 μ l de la solution tampon 10X PCR [(SIGMA, P-2192), 100 mM de Tris HCl (pH 8,3), 500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂ et 0,01% de gélatine], 1 μ l de 10 mM dNTPs, 1 μ l de Taq DNA polymérase à la concentration de 5 U/ μ l (SIGMA, D-6677), 36 μ l d'eau stérile. Il faut appliquer une agitation monotube et une très brève centrifugation.

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (HYBAID Omn-E, U.K.) utilisant le programme suivant : 1 cycle : 85°C pendant 5 minutes (dénaturation) ; 30 cycles : 94°C pendant 30 secondes (dénaturation), 50°C pendant 30 secondes (hybridation ou annealing), 72°C pendant 45 secondes (synthèse), 1 cycle : 72°C pendant 5 minutes (synthèse finale).

Vérification des amplifiats

La vérification des produits de PCR est faite par le biais de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide 6% (révélation des bandes par le nitrate d'argent).

La première étape consiste à préparer les composants du gel adapté au système Protean (II xi Cell (BIO-RAD) : Acrylamide/N,N'-Méthylène-bis-Acrylamide (29:1) à 40% : 6,750 ml, une solution 5X TBE [54 g de Tris base, 27,5 g d'acide borique et 20 ml de 0,5 M EDTA, pH 8] ayant un volume de 5,4 ml, un volume d'eau ultrapure stérile égal à 41,820 ml, 54 (l de TEMED et 734,4 (l d'APS. Le tampon de migration est constitué d'une solution de 0,5X TBE.

La seconde étape consiste à charger un volume de 10 (l d'amplifiat ajoutés à 3 (l de colorant d'ADN [30% de glycérol, 1 mg de xylène cyanol, 1 mg de bleu de bromophénol, 1 mg d'orange G et une solution finale de 1X TBE (on utilise une solution mère 10X TBE)]. Le marqueur de taille [(100 pb), à la concentration de 50 ng/(l), est chargé avec un volume de 3 (l. La durée de l'électrophorèse (Générateur LKB Bromma) est de 1h 30 mn avec une différence de potentielle de 150 volts.

La troisième étape consiste à récupérer le gel et de le rincer avec une solution composée de : 178 ml d'eau distillée, 2 ml d'acide acétique glacial et 20 ml d'éthanol. Une agitation pendant 40 minutes (agitateur à balancement) est effectuée, ensuite le gel est rincé avec de l'eau distillée, 3 fois espacées de 30 secondes. Par la suite, il faut procéder à la coloration du gel avec du nitrate d'argent (0,39 g de AgNO₃ dans 200 ml d'eau pure) pendant 40 minutes (sur un agitateur à balancement). De nouveau, le gel est rincé avec de l'eau pure, 3 fois espacées d'une minute. Ensuite, il faut verser 200 ml d'eau contenant 4,2 g de NaOH, 20 mg de borate de sodium et 800 (l de formaldéhyde à la concentration de 37% (préparer la solution juste avant son utilisation). Le récipient est mis au repos, durant 5 à 15 minutes, pour permettre le développement des bandes. La solution de développement est éliminée et un nouveau rinçage, avec de l'eau pure, est fait. Le gel est conservé dans une solution contenant 40% d'éthanol et 5% d'acide acétique glacial (de 10 mn à une nuit). Après quoi, il peut-être séché.

Il est à signaler que la révélation de la réaction positive a également été faite par le bromure d'éthidium [(10 mg/ml), Sambrook et al., 1989] en versant 5 (l dans 200 ml d'eau ultrapure. La coloration se fait par une agitation (agitateur à balancement) durant 5mn suivie d'une décoloration avec la même eau. L'observation est faite sur un transilluminateur (2011 Macrovue-LKB Bromma) à une longueur d'onde de 305 nm et la photographie avec un appareil polaroid CU-5.

La caractérisation biologique

Dans le but d'étudier le pouvoir pathogène du PNRSV et le comportement d'une gamme de plantes hôtes à l'infection artificielle, nous avons procédé à un travail de caractérisation biologique.

Espèces botaniques

Les plantes herbacées, qui ont été utilisées dans cette étude, sont les suivantes : des Cucurbitacées (Cucumis sativus cv Marketer, Cucumis sativus cv Poinsett, Cucumis sativus cv Sombre d'Arménie, Cucumis sativus cv Grandiose de Reuter, Cucurbita pepo cv Jedida, Cucurbita

maxima cv Béjaoui), une Légumineuse (*Vigna sinensis*), des Chénopodiacées (*Chenopodium foetidum*, *Chenopodium murale*) et des Solanacées (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana occidentalis*).

Résultats et discussion

Plante-test

La transmission mécanique sur concombre (cv Marketer) a permis d'observer des symptômes consistant en des lésions chlorotiques et nécrotiques (fig.1e) sur les feuilles cotylédonnaires et une mosaïque sur les feuilles vraies (fig.1d). En outre, une panachure réticulée (fig.1g) au niveau des tissus avoisinant la nervure principale et celles d'ordre inférieur est, également, obtenue. Ce type de symptôme est assez différent de ceux observés avec d'autres isolats (Boullila et Marrakchi, 2000b). Une nécrose apicale caractérisant l'infection par le PNRSV (fig1.f) est obtenue.

Microscopie électronique

La technique ISEM a montré la présence de particules virales parasphériques (fig.2) mettant, clairement, en évidence l'infection virale de l'échantillon de concombre. L'usage d'anticorps à la phase de décoration a permis d'identifier le PNRSV (fig.3).

RT-PCR

La figure n° 4 apporte la confirmation que le PNRSV est associé à la chlorose des feuilles d'amandier. En effet, la fraction génomique du virus, ayant la taille de 282 paires de bases (voir la flèche sur la figure n° 4), a été amplifiée.

Réactions d'hôtes différentiels

Les plantes indicatrices, ayant réagi à l'inoculation artificielle par le PNRSV, se sont limitées à deux espèces de Cucurbitacées : *Cucumis sativus* cv Marketer, *Cucurbita maxima* cv Béjaoui et à *Vigna sinensis* (Tableau n° 1). Les symptômes obtenus, sur la première espèce, ont été déjà décrits ; par contre, sur la deuxième espèce, les symptômes ont consisté, sur la feuille vraie, en une moucheture jaune (des taches jaunes minuscules réparties sur la surface du limbe), des lésions chlorotiques (fig.1h) et une mosaïque unilatérale limitée à une partie de la feuille. *Vigna sinensis* a, en revanche, réagi en donnant des lésions chlorotiques linéaires sur le limbe des folioles.

Aucune espèce de la famille des Chénopodiacées et des Solanacées utilisées dans ce travail n'a réagi à l'infection. Il convient de noter que d'autres espèces appartenant à la première famille botanique en l'occurrence *Chenopodium quinoa* et *Chenopodium amaranticolor* sont sensibles à ce virus (Fulton, 1970 ; 1981). En revanche, les espèces de tabac ne semblent pas être des hôtes expérimentaux pour le PNRSV. Nos résultats le montrent et confirment ceux de Fulton (1981). Toutefois, il semble, d'après Digiario et al. (1992), que *Nicotiana tabacum* cv Samsun y est sensible. L'infection peut, également, y être latente.

Tableau 1. Description des réactions des plantes indicatrices à l'infection par l'isolat de PNRSV (Chlorose de Sfax)

Famille, Genre, Espèce, Cultivar	Feuille inoculée	Feuille non inoculée
Cucurbitacées		
<i>Cucumis sativus</i> cv Marketer	Lésions chlorotiques	Mosaïque, Panachure réticulée
<i>Cucumis sativus</i> cv Poinsett	0	0
<i>Cucumis sativus</i> cv Sombre d'Arménie	0	0
<i>Cucumis sativus</i> Grandiose de Reuter0		0
<i>Cucurbita pepo</i> cv Jedida	0	0
<i>Cucurbita maxima</i> cv Béjaoui	0	Moucheture jaune, Lésions chlorotiques, Mosaïque unilatérale
Légumineuses		
<i>Vigna sinensis</i>	0	Lésions chlorotiques linéaires.
Chénopodiacées		
<i>Chenopodium foetidum</i>	0	0
<i>Chenopodium murale</i>	0	0
Solanacées		
<i>Nicotiana tabacum</i> cv Xanthi	0	0
<i>Nicotiana clevelandii</i>	0	0
<i>Nicotiana rustica</i>	0	0
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0	0
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0	0
<i>Nicotiana occidentalis</i>	0	0

Conclusions

Ce travail met en évidence que la maladie connue sous le nom de "calico de l'amandier" est effectivement d'origine virale et le PNRSV y est associé. Il apporte un élément supplémentaire de la diversité biologique quant aux infections dues au PNRSV sur amandier. C'est une preuve que ce virus possède des souches différentes qui agissent différemment sur les plantes hôtes. Une étude ultérieure comparée de différents isolats pourraient, par la caractérisation, contribuer à l'identification de certaines souches. L'apport de l'Immunologie (confrontation avec des anticorps monoclonaux spécifiques) et de la Biologie Moléculaire (analyse RFLP, variabilité moléculaire et phylogénie) y est, sans doute, non seulement important mais déterminant aussi.

Références bibliographiques

- Boulila, M. 1992. Mise en évidence de trois Iarvirus associé à la mosaïque de l'amandier dans une pépinière fruitière au Cap Bon (Tunisie). *Ann. de l'INRAT*. 65 (1,2) : 61-73.
- Boulila, M. 1997. Occurrence and detection of three ilarviruses infecting plum and almond crops in Tunisia. *Proc. 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. June 1st 5th, 1997. Montpellier-Le Corum (France) 6 pp.
- Boulila, M. 2002. Le Prune dwarf ilarvirus en Tunisie : détection par plante test, sérologie et par microscopie électronique et caractérisation biologique d'un isolat d'amandier. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 32, 515-519.
- Boulila, M. et M. Marrakchi. 1999. Le virus du Prunus necrotic ringspot : réactions d'hôtes naturels et différentiels et conséquences. 10 èmes journées de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques. Monastir (Hôtel Helya), 20-22/03/99.
- Boulila, M. et M. Marrakchi. 2001. Amplification de séquences (RT-PCR) et analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de quelques isolats du Prunus necrotic ringspot ilarvirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31, 173-178.
- Crescenzi, A., L. d'Aquino, S. Comes, M. Nuzzaci, P. Piazzolla, et A. Hadidi. 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease*. 81 :711-714.
- Derrick, K.S. 1973. Quantitative assay of plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology*. 56 :652-653.
- Digiario, M., V. Savino, B. Di Terlizzi et G.P. Martelli. 1992. The relationship of ilarviruses to almond mosaic. *Advances in Horticultural sciences*. 4 :161-166.
- Di Terlizzi, B., M. Digiario et V. Savino. 1990. Le virosi del mandorlo in Puglia II. Presenza di accettazione delle gemme su due varietà pugliesi di mandorlo : Fragiulio e Franciscuda. *Atti del convegno : Virosi ed entomofauna del mandorlo. Quaderno n°1. Bari-Valenzano 06.10.1989*. pp : 141-148.
- Dunez, J. 1986. Maladies à virus des arbres fruitiers à noyau. *Rapport. Gouv. De Tunisie. FAO*. 52 pp.
- Fulton, 1970. Prunus necrotic ringspot virus. *CMI/AAB. Descriptions of plant viruses*. n°5.
- Fulton, 1981. Iarviruses. In : *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Ed. E. Kurstak. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp : 377-413.
- Hadidi, A., L. Levy et E.V. Podleckis. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In : *Molecular methods in plant pathology*. Edit. R.P. Singh et U.S. Singh. CRC Lewis publishers. pp : 167-187.
- Hammond, R.W. et J.M. Crosslin. 1995. The complete nucleotide sequence of RNA 3 of a peach isolate of prunus necrotic ringspot virus. *Virology*. 208 :349-353.
- Milne, R.G. 1986. New developments in electron microscope serology and their possible applications. *Proc. Conference at the University of Cambridge*. 10-12 April, 1985. In : *Developments in applied biology I : Developments and applications in virus testing*. Edit. R.A.C. Jones and L. Torrance. Association of applied biologists. pp : 179-191.
- Nemeth, M. 1986. *Virus, Mycoplasmas and Rickettsia diseases of fruit trees*. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands and Akademi Kiado. Hungary. 841 pp
- Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd edit. Cold spring Harbor press. NY.
- Siriez, H. 1981. L'amandier et ses ennemis. *Phytoma-Défense des cultures*. pp : 25-27.

Van Regenmortel, M.H.V. 1981. Serological methods in the identification and characterization of viruses. In : *Comprehensive virology*. 17. Edit. H. Frankael-Conrat et R..R.. Wagner. Methods used in the study of viruses. pp : 183-243.

Walkey, D.G.A. et M.J.W. Webb, 1984. The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyviruses. *Phytopathologische Zeitschrift*. 110 :319-327.

Zeramini, H., B. Di Terlizzi, et V. Savino. 1996. Phytosanitary status of almond and apricot in Tunisia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 26 : 155-160.