

Le virus du cherry leaf roll (CLRV) : Relation avec le dépérissement du noyer et comportement de différentes espèces ou hybrides interspécifiques de *Juglans*.

Françoise DOSBA, Micheline LANSAC, E. GERMAIN,
K. MAZY et Mercé ROVIRA*

RELATIONSHIP BETWEEN CHERRY LEAF ROLL VIRUS
(CLRV) AND WALNUT BLACK LINE DISEASE : BEHAVIOUR
OF DIFFERENT SPECIES OR INTERSPECIFIC HYBRIDS OF
JUGLANS.

Françoise DOSBA, Micheline LANSAC, E. GERMAIN,
K. MAZY et Mercé ROVIRA.

Fruits, Mar.-Apr. 1990, vol. 45, n°2, p. 171-175.

ABSTRACT - Walnut black line disease is well described in the USA on *J. regia/J. hindsii* or Paradox combinations. It is caused by Cherry leaf roll virus (CLRV) which induces necrosis and then incompatibility at the graft union. *J. regia* is tolerant to this virus whereas *J. hindsii* and Paradox are hypersensitive. The same phenomenon has been studied in France on the combinations *J. regia/J. nigra* or *J. regia/(J. nigra x J. regia)*. The black line was also caused by CLRV. The virus spreads in *J. regia* without inducing any symptoms whereas other species of *Juglans* could not multiply CLRV and showed an hypersensitive reaction.

The main results obtained in the study of black line disease of *J. regia/J. nigra* combinations were as following :

- CLRV was found in many cultivars of *J. regia*. It was always detected in *J. regia/J. nigra* showing black line but the distribution of the virus was irregular,
- virus progression inside the tree was slow,
- seed and pollen transmission were demonstrated.

The study of different scion/rootstock combinations after inoculation has shown that :

- all heterospecific combinations with infected *J. regia* presented a black line at the graft union,
- the rootstocks belonging to *J. nigra*, *J. major*, *J. sieboldiana* species and to different interspecific hybrids did not multiply the virus,
- injection of purified CLRV under the bark induced a quicker response than graft inoculation with infected bark.

D'abord multiplié par semis, le noyer commun, *Juglans regia* L., est maintenant couramment greffé. Lorsque le greffage est réalisé sur d'autres espèces que *J. regia*, un manque d'affinité entre le greffon et le porte-greffe peut apparaître plusieurs années après la plantation.

* - DOSBA, LANSAC, GERMAIN et MAZY - Institut National de la Recherche agronomique INRA - Station de Recherches fruitières La Grande Ferrade - B.P. 81 - 33883 VILLENAVE D'ORNON Cedex - France.
ROVIRA - Centre Agropecuari Mas BOVE - Apartat 415 - 43280 REUS - Espagne.

LE VIRUS DU CHERRY LEAF ROLL (CLRV) :
RELATION AVEC LE DEPERISSEMENT DU NOYER
ET COMPORTEMENT DE DIFFERENTES ESPECES
OU HYBRIDES INTERSPECIFIQUES DE *JUGLANS*.

Françoise DOSBA, Micheline LANSAC, E. GERMAIN
K. MAZY et Mercé ROVIRA.

Fruits, Mar.-Apr. 1990, vol. 45, n° 2, p. 171-175.

RESUME - Le dépérissement du noyer lié à la présence d'une ligne noire au niveau du point de greffe chez le noyer commun (*J. regia*) greffé sur des porte-greffe appartenant à d'autres espèces, est causé par un Nepovirus, le Cherry leaf roll virus (CLRV). Le virus se multiplie facilement dans l'espèce *J. regia* sans provoquer de symptômes alors que d'autres espèces de *Juglans* ne multiplient pas le virus et manifestent une résistance de type hypersensible.

En France, le dépérissement des combinaisons *J. regia/J. nigra* est étudié depuis 1980. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- le CLRV est communément répandu chez divers cultivars de *J. regia*. Il est toujours trouvé chez les combinaisons *J. regia/J. nigra* présentant une ligne noire mais il est mal réparti dans *J. regia* et trouvé seulement au point de greffe chez *J. nigra*.
- la multiplication du virus à l'intérieur de l'arbre est lente,
- la transmission du virus par pollen et par semences est possible.

L'étude de la réponse de différentes combinaisons variété/porte-greffe après inoculation du virus à la variété a donné les premiers résultats suivants :

- toutes les combinaisons hétérosécifiques faisant intervenir *J. regia* infecté comme variété greffon présentent une ligne noire au point de greffe,
- les porte-greffe appartenant aux espèces *J. nigra*, *J. major*, *J. sieboldiana* et aux hybrides intersécifiques *J. major x J. regia*, *J. sieboldiana x J. regia*, *J. hindsii x J. regia* ne multiplient pas le CLRV,
- les inoculations sous écorce avec du virus purifié permettent une multiplication plus rapide du virus que l'inoculation par placage.

L'arbre dépérit progressivement tandis qu'une zone de tissus nécrosés apparaît à l'union se traduisant par une ligne noire appelée «black line» dans la littérature américaine. Ce symptôme a été longtemps considéré comme une manifestation d'incompatibilité retardée liée à l'hétérogreffe.

En 1984, MIRCETICH et ROWHANI ont montré que le cherry leaf roll virus (CLRV) était responsable de ce syndrome dans le cas de combinaisons *J. regia/J. hindsii* ou *J. regia/(J. hindsii x J. regia)* appelé Paradox. Le CLRV se multi-

plie dans *J. regia* sans provoquer de symptômes nets tandis qu'il ne migre pas dans ces deux types de porte-greffe qui réagissent à la contamination par une réaction d'hypersensibilité donc par la formation d'une zone nécrotique au point de greffe. Les symptômes de mosaïque foliaire observés dans différents pays dont l'Italie (SAVINO *et al.*, 1977) n'ont pas été signalés aux USA dans les noyeraies en production.

En France, seuls les symptômes de ligne noire ont été notés en verger sur les combinaisons hétérospécifiques *J. regia/J. nigra* plantées principalement ces trente dernières années et sur quelques combinaisons *J. regia/(J. nigra x J. regia)*.

Depuis 1980 nous avons recherché l'agent causal de ce dépérissement, étudié son mode de transmission et précisé le comportement de diverses espèces ou hybrides interspécifiques (DELBOS *et al.*, 1982 ; DELBOS *et al.*, 1984). Nous relatons ici les résultats obtenus en matière d'étiologie, de transmission et de comportement de différents matériels génétiques vis-à-vis du CLRV.

ETIOLOGIE

En fonction des premiers résultats obtenus dès 1980 aux USA, nous avons d'abord cherché si un agent de type viral était responsable de la maladie.

Les indexages réalisés sur plantes herbacées à partir de *J. regia/J. nigra* manifestant des symptômes de ligne noire ont fait apparaître des taches chlorotiques avec nécrose apicale sur *Chenopodium quinoa* L., des anneaux chlorotiques concentriques systémiques ou des lignes en arabesques sur *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi, sur *Phaseolus vulgaris* L. et *Vigna sinensis* L.. Ces symptômes semblaient traduire la présence d'un Nepovirus.

Nous avons confirmé par test ELISA la présence de CLRV chez ces noyers dépérissants. La répartition du virus dans l'arbre est très hétérogène (DELBOS *et al.*, 1982).

Lorsqu'il y a des symptômes de ligne noire, le virus peut être détecté aisément à partir de l'écorce au-dessus du point de greffe alors que des rameaux entiers peuvent être indemnes de CLRV sur le même arbre. Ceci a été confirmé pour de nombreuses combinaisons hétérospécifiques, alors que pour les combinaisons *J. regia/J. regia* le virus est très bien réparti (tableau 1).

Le virus a seulement été détecté chez *J. regia* que ce soit à partir de semis, d'homogreffes ou d'hétérogreffes (tableau 1). Il n'a jamais été mis en évidence chez les six autres espèces de *Juglans* étudiées ; celles-ci réagissent à la contamination par une réaction d'hypersensibilité comme c'est le cas pour *J. hindsii* ou Paradox.

Le virus du CLRV a été purifié (DELBOS *et al.*, 1984) puis réinoculé en 1985 à des combinaisons saines de *J. regia/J. nigra*. Les symptômes typiques de la maladie ont été reproduits et le virus du CLRV détecté à nouveau.

Le postulat de Koch est donc vérifié pour la maladie de la ligne noire observée chez les combinaisons *J. regia/J. nigra*.

TRANSMISSION DE LA MALADIE

La transmission par greffage du CLRV a été un moyen important de dispersion de la maladie. Dans le cas des homogreffes, il ne semble pas que la reprise au greffage soit très affectée par la présence du CLRV. Par contre, si on réalise des hétérogreffes avec du matériel *J. regia* contaminé, la reprise au greffage est faible à nulle. Il semblerait que, dans ce cas, la réaction d'hypersensibilité soit très rapide et permette un certain assainissement au niveau de la pépinière : seules les combinaisons saines reprendraient bien au greffage.

A des fins expérimentales l'inoculation de diverses hétérogreffes est réalisée par placage à partir d'écorce provenant d'arbres malades. MIRCETICH *et al.* (1980) reproduisent ainsi les symptômes de ligne noire en 2 ans et

TABLEAU 1 - Comportement de différentes espèces de *Juglans* vis-à-vis du CLRV.

Hôtes	absence (-) ou présence (+) de ligne noire	absence (-) ou présence (+) de CLRV		Répartition du CLRV
		greffon	porte-greffe	
Arbres greffés				
<i>J. regia/J. nigra</i>	+	+	-	mauvaise
<i>J. regia/J. nigra x J. regia</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. hindsii</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. hindsii x J. regia</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. major</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. major x J. regia</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. cordiformis x J. regia</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. sieboldiana x J. regia</i>	+	+	-	"
<i>J. regia/J. regia</i>	-	+	+	bonne
<i>J. nigra/J. nigra</i>	-	-	-	
<i>J. major/J. nigra</i>	-	-	-	
<i>J. rupestris/J. nigra</i>	-	-	-	
<i>J. cinerea/J. regia</i>	-	-	-	
<i>J. sieboldiana/J. sieboldiana</i>	-	-	-	

demi. En France, le temps nécessaire à la ceinturation de l'arbre par le virus en conditions expérimentales est du même ordre (N'GUYEN, 1988).

La transmission expérimentale par nématodes du CLRV de *Chenopodium quinoa* malade à *C. quinoa* sains a été réalisée expérimentalement par JONES *et al.* (1981) ; ils montrent que diverses espèces de *Longidorus* et *Xiphinema* sont aptes à transmettre le virus. Dans les conditions naturelles, aucune infection par nématode n'a été signalée sur plantes herbacées ou jeunes semis de noyers que ce soit en France ou dans d'autres pays. Cependant, des analyses nématologiques réalisées dans 4 sites français de production nucicoles ont permis de découvrir des *Xiphinema* et des *Longidorus* vecteurs potentiels du CLRV (CARDIN et SCOTTO LA MASSESE, 1983). Des essais de vection expérimentale à partir de *Xiphinema diversicaudatum* et *longidorus* sp. ont abouti à la transmission sur *Petunia hybrida* d'un virus non encore identifié.

La transmission par pollen du CLRV a été mise en évidence après pollinisation contrôlée d'arbres sains (*J. regia/J. regia*) par du pollen provenant d'arbres malades et donnant une réponse positive en test ELISA (LAN-SAC, 1985). A partir de fruits issus d'une telle fécondation, le CLRV a été détecté aussi bien dans l'embryon que dans les tissus strictement maternels du fruit. Le taux de contamination varie entre 2 et 10 p. 100. Il est un peu plus faible mais du même ordre que celui (6 à 20 p. 100) trouvé chez des semis issus d'arbres malades sans doute depuis plusieurs années (tableau 2). Aucune contamination n'a été trouvée dans les semis de *J. nigra*. Ces résultats sont en accord avec ceux de MIRCETICH *et al.* (1984).

Le pollen est donc un moyen efficace de contamination des semences de *J. regia* ; il peut aussi entraîner la contamination de l'arbre pollinisé mais, dans ce cas, la progression du virus à l'intérieur de l'arbre est lente et ne dépasse pas 30 cm/an dans nos conditions expérimentales. En verger la progression du virus peut atteindre 1 m/an (DES-VIGNES et CORNAGGIA, 1988).

En définitive, différents modes de contamination de *J. regia* sont possibles :

- le greffage,
- les nématodes,
- le pollen,
- le semis.

Mais leur efficacité est variable selon le matériel génétique étudié. Ainsi chez les combinaisons *J. regia/J. nigra*,

la principale voie de contamination sera le pollen puisque *J. nigra* ne multiplie pas le CLRV et que la reprise au greffage de *J. regia* contaminé est faible à nulle chez ce genre de combinaisons.

Pour les combinaisons *J. regia/J. regia* tous les types de contamination sont possibles.

ETUDE DU COMPORTEMENT DE DIFFÉRENTS PORTE-GREFFE ET DE DIVERSES COMBINAISONS GREFFES VIS-A-VIS DU CLRV APRES INOCULATION

Compte tenu du comportement des combinaisons *J. regia/J. nigra* qui est similaire à celui des combinaisons *J. regia/J. hindsii* ou *J. regia/Paradox*, nous avons cherché à préciser le comportement de différents porte-greffe et de plusieurs combinaisons hétérospécifiques, après inoculation en pépinière.

Le comportement des porte-greffe issus de semis ou de marcottages est récapitulé dans le tableau 3. Aucun des porte-greffe testés après inoculation par placage ne semble multiplier le virus hormis les semis de *J. regia*. La détection du virus est d'autant plus efficace qu'elle est réalisée au moins 2 ans après l'inoculation. Ainsi le taux d'arbres contaminés peut passer de 14 p. 100 un an après l'inoculation par greffage, à 90 p.100 deux ans après. Le site de prélèvement est également important : si au niveau du point d'inoculation on peut obtenir 90 p. 100 de réponses positives vis-à-vis du CLRV, ce taux avoisine seulement 20 p. 100 au sommet du jeune scion. Même en conditions de germination expérimentale, et sur de jeunes arbres en pleine croissance, la migration du virus est lente.

Le comportement de différentes combinaisons vis-à-vis de 3 isolats de CLRV (BL purifié, RA 248, RA 96) a été étudié (tableau 4).

Les inoculations ont été effectuées sur *J. regia* ; un ou deux ans après la dernière inoculation, la multiplication du virus est détectée seulement sur une partie des arbres. L'injection sous écorce de CLRV purifié (BL) semble plus efficace que les inoculations par placage d'écorce contaminée. Il apparaît également que l'isolat RA 248 induit moins rapidement des réactions que l'isolat RA 96. Ces résultats sont en accord avec ceux de DE PREVILLY (1989).

CONCLUSION

Les différentes études réalisées à Bordeaux ont permis

TABEAU 2 - Etude de la transmission du CLRV dans les semences.
(Tests sur plantes herbacées : *C. quinoa* et tests ELISA).

Espèce	Variété	Clone	Nombre de semis analysés	Pourcentage de semis CLRV+
<i>J. regia</i>	Marbot	RA 99	280	20
<i>J. regia</i>	Marbot	RA 96	260	6
<i>J. regia</i>	Lozeronne	RA 248	270	8
<i>J. regia</i>	Lozeronne	RA 1006	70	7
<i>J. regia</i>		RA 550	270	9
<i>J. nigra</i>		NG 201	80	0

TABLEAU 3 - Comportement de différents porte-greffe (semis ou marcottes) vis-à-vis de 2 isolats de CLRV après inoculation.

Isolats	Matériel testé					Nombre d'années après inoculation
	RA	MJ	MJ x RA	HD x RA	SB x RA	
MARBOT (RA 96)	30*	0	0		0	1
	90	0	0	0	0	2
	90	0	0	0	0	3
LOZERONNE (RA 248)	14	0	0	0		1
	61	0	0	0		2
	75	0	0	0		3

RA : *J. regia* (semis)

MJ : *J. major* (semis)

MJ x RA : *J. major* x *J. regia* (semis)

HD x RA : *J. hindsii* x *J. regia* = Paradox (semis et marcottes)

SB x RA : *J. sieboldiana* x *J. regia* (marcottes)

* - pourcentage de réponses positives en test ELISA (25 ou 50 plantes analysées)

TABLEAU 4 - Comportement de différentes combinaisons vis-à-vis du CLRV selon le type d'inoculum et le nombre d'années écoulées entre la date d'inoculation et le test ELISA.

Combinaison	Inoculum	Fréquence de greffons ELISA +	Nombre d'années après inoculation
RA/RA	BL purifié	3/18	1
	RA 248	0/5	1
RA/NG	BL purifié	4/16	1
	RA 248	0/6	1
	RA 96	2/10	2 et 3
RA/MJ x RA	BL purifié	4/16	1
	RA 248	0/6	1
RA/HD x RA = PX	BL purifié	1/10	1
	RA 248	0/6	1
RA/SB x RA	RA 96	11/30	1 et 2

RA : *J. regia*

NG : *J. nigra*

MJ : *J. major*

HD : *J. hindsii*

PX : Paradox

SB : *J. sieboldiana*

de faire apparaître le mauvais état sanitaire de la noyeraie française.

Cette situation est également préoccupante dans d'autres pays comme la Grèce, l'Espagne, l'Italie ou la Hongrie. Certains clones de *J. regia* multipliés dans des conditions isolées ont cependant échappé à cette contamination. Le retour à une bonne situation sanitaire exigera beaucoup de temps et de moyens. En zone contaminée, il faut préconiser de ne plus réaliser de greffes hétérospécifiques qui induisent à plus ou moins long terme des symptômes de ligne noire ; en effet, la variété greffée, si elle n'est pas contaminée au départ, sera infectée plus tard par le pollen des arbres environnants.

Même dans ces conditions de contamination par le

pollen l'utilisation de greffons sains et de semis sains pour les greffages *J. regia*/*J. regia* est bénéfique car elle permet une bonne croissance des arbres dans les premières années.

Une approche génétique est également entreprise pour résoudre ces problèmes. Elle consiste à partir de croisements interspécifiques, à sélectionner des porte-greffe qui soient tolérants au CLRV, et induisent une bonne vigueur.

Les premiers résultats obtenus à partir d'hybrides (*J. nigra* x *J. regia*) x *J. regia* ou (*J. major* x *J. regia*) x *J. regia* semblent indiquer qu'on puisse sélectionner des porte-greffe tolérants et de bonne valeur agronomique.

Associée à une sélection sanitaire efficace, cette voie de recherche permet d'espérer pour les années à venir des solutions pour lutter contre le dépérissement du noyer.

BIBLIOGRAPHIE

- CARDIN (M.C.) et SCOTTO LA MASSESE (C.). 1983.
Programme d'étude du Blackline vu sous l'angle nématologique.
IIIe Colloque sur les Recherches fruitières, Bordeaux, 16-17 mars
1983, 177-185.
- DELBOS (R.), KERLAN (C.), DUNEZ (J.), LANSAC (Micheline),
DOSBA (Françoise) et GERMAIN (E.). 1982.
Virus infection of walnuts in France.
Acta Hort., 130. *Fruits Tree Virus Diseases*, 123-131.
- DELBOS (R.), BONNET (A.) et DUNEZ (J.). 1984.
Le virus de l'enroulement des feuilles du cerisier, largement
répandu en France sur noyer, est-il à l'origine de l'incompatibilité
de greffage du noyer *J. regia* sur *J. nigra* ?
Agronomie, 1984, 4 (4), 333-339.
- DESIGNES (J.C.) et CORNAGGIA (D.). 1988.
Study of black line or brown line, expressions of the resistance to
viral infection in the fruit trees.
Acta Horticulture, 235, 215-221.
- JONES (A.T.), McELROY (F.D.) et BROWN (D.J.F.). 1981.
Tests for transmission of CLRV using *Longidorus*, *Paralongidorus*
and *Xiphinema* nematodes.
Ann. Appl. Biol., 99, 143-150.
- LANSAC (Micheline). 1985.
Relation entre le dépérissement du noyer *Juglans regia* (L.) et le
virus de l'enroulement foliaire du cerisier (CLR.V).
D.E.S. Université de Bordeaux I, 54 p.
- MIRCETICH (S.M.), DE ZOETEN (G.A.) et LAURITIS (J.A.). 1980.
Etiology and natural spread of black line disease of English walnut
trees.
Acta Phytopath. Acad. Scient. Hungaricae, vol. 15, 147-151.
- MIRCETICH (S.M.) et ROWHANI (A.). 1984.
The relationship of CLR.V and Black line disease of English walnut
trees.
Phytopath. 74 (4), 423-428.
- N'GUYEN (B.). 1988.
Étude de l'incompatibilité liée au CLR.V chez le noyer ; recherche
de porte-greffe tolérants.
D.E.A. Université de Bordeaux II, 18 p.
- DE PREVILLE (D.). 1989.
Comportement du noyer vis-à-vis du virus de l'enroulement foliaire
du cerisier.
Mémoire de fin d'étude ENITA de Bordeaux, 33 p.
- SAVINO (V.), QUACQUARELLI (A.), GALLITELLI (D.),
PIAZZOLIA (P.C.) et MARTELLI (G.P.). 1977.
II.- Virus dell'accartocciamento fogliare del ciliege nel Noce.
I.- Identificazione e caratterizzazione.
Phytopath. medit., 16, 96-102.

EL VIRUS DEL CHERRY LEAF ROLL (C L R V) : RELACION CON
EL DESMEJORAMIENTO DEL NOGAL Y COMPORTAMIENTO
DE DIFERENTES ESPECIES O HIBRIDOS INTERSPECIFICOS DE
JUGLANS.

Françoise DOSBA, Micheline LANSAC, E. GERMAIN, K. MAZY
y Mercé ROVIRA.

Fruits, Mar.-Apr. 1990, vol. 45, n° 2, p. 171-175.

RESUMEN - El desmejoramiento del nogal ligado a la presencia de una línea negra al nivel del punto de injerto en el nogal común (*J. regia*), injertado sobre portainjertos pertenecientes a otras especies, está causado por un Nepovirus, el Cherry leaf roll virus (CLR.V). El virus se multiplica fácilmente en la especie *J. regia* sin provocar síntomas mientras que otras especies de *Juglans* no multiplican el virus y manifiestan una especie de resistencia de tipo hipersensible.

En Francia, el desmejoramiento de las combinaciones *J. regia*/*J. nigra* se estudia desde 1980. Los principales resultados obtenidos son los siguientes :

- el CLR.V se extiende comunmente entre diversos cultivares de *J. regia*. Se encuentra siempre en las combinaciones *J. regia*/*J. nigra* que presentan una línea negra, pero está mal repartido en *J. regia* y se encuentra solo en el punto de injerto en *J. nigra*.

- la multiplicación del virus en el interior del árbol es lenta.

- la transmisión del virus por polen y semillas es posible.

El estudio de la respuesta de diferentes combinaciones variedad/portainjertos después de inoculación del virus en la variedad ha dado los primeros resultados siguientes :

- todas las combinaciones heteroespecíficas que hacen intervenir *J. regia* infectado como variedad injerto presentan una línea negra en el punto de injerto.

- los portainjertos pertenecientes a las especies *J. nigra*, *J. major*, *J. sieboldiana* y a los híbridos interspecíficos *J. major* x *J. regia*, *J. sieboldiana* x *J. regia*, *J. hindsii* x *J. regia* no multiplican el CLR.V.

- las inoculaciones bajo corteza con virus purificado permiten una multiplicación más rápida del virus que la inoculación por chapeado.

