



Étude de la prévalence des virus et des virus like associées aux agrumes dans la région de l'oriental

Marrakech 13-15 Mai 2025



Présenté par : M. KHALLOU ABDELHAK

Institut National de la Recherche Agronomique

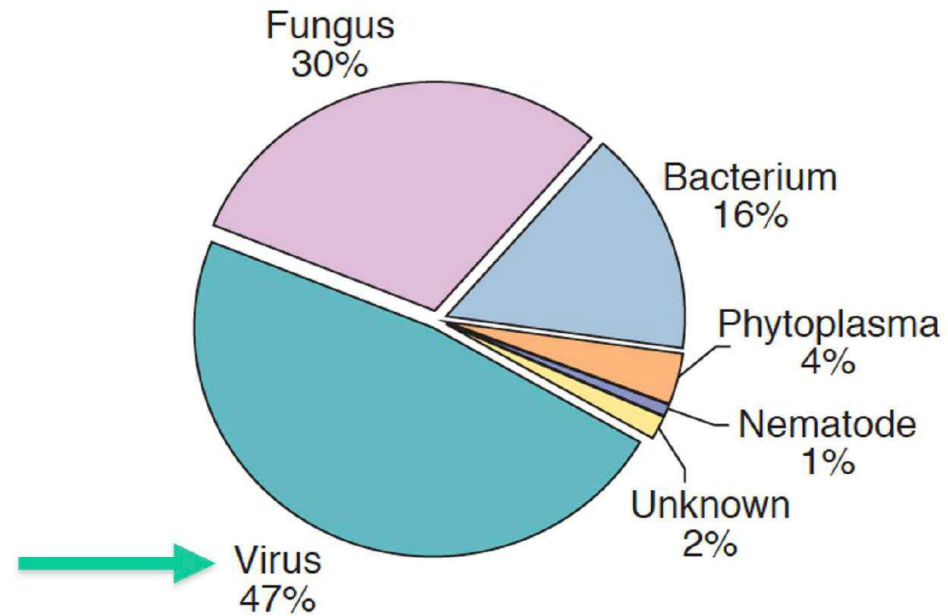
Centre Régional de la Recherche Agronomique d'Oujda

Qualipôle de Berkane



المعهد الوطني للبحث الزراعي
المعهد الوطني للبحث الزراعي
Institut National de la Recherche Agronomique

EMERGING PLANT DISEASES



TRENDS in Ecology and Evolution Vol.19 No.10 October 2004

PREVENTION / ERADICATION / SANITARY SELECTION



Detection and identification is the key

Citrus Greening

Candidatus Liberibacter

Taxonomie :

Bactéries : Protéobactéries : Alphaprotéobactéries :

Rhizobiales : Phyllobacteriaceae

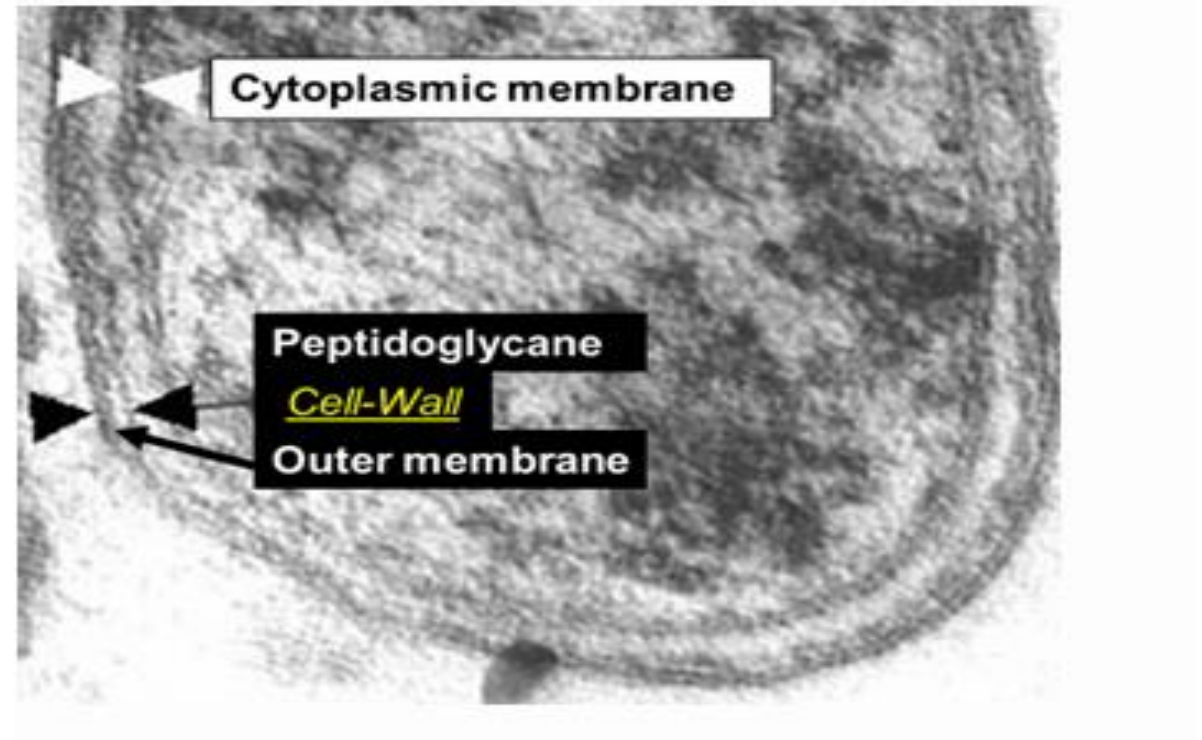
Morphology



Les Liberibacters ont une paroi cellulaire semblable à celle des gram-négatifs.

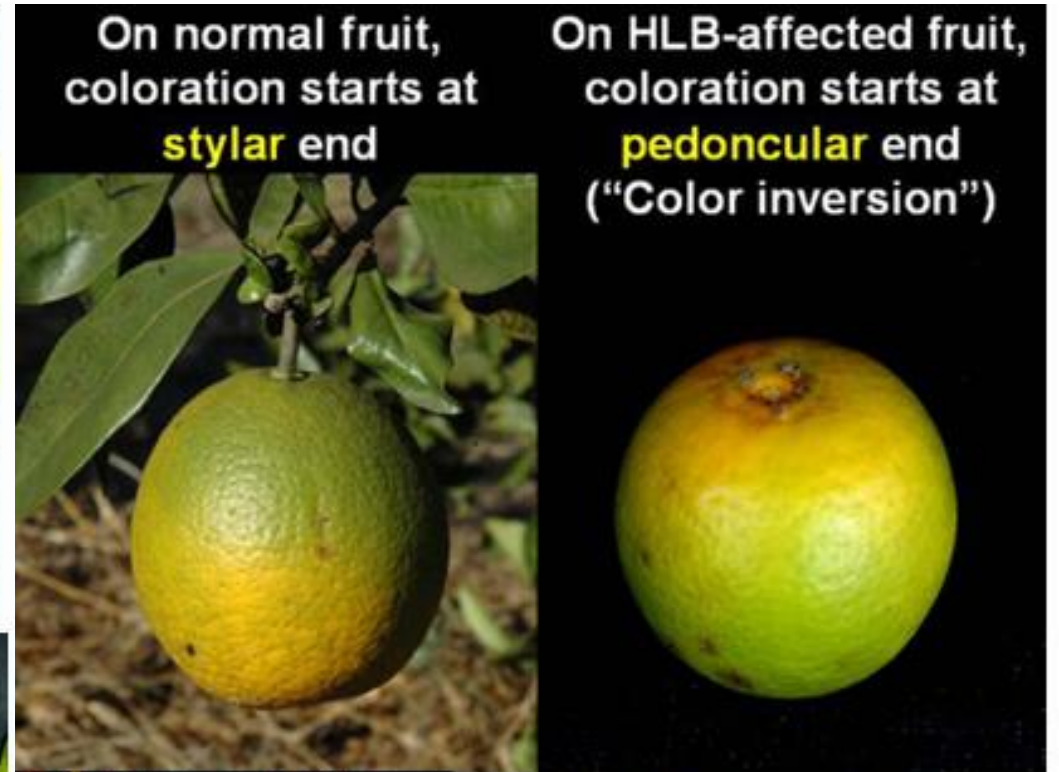
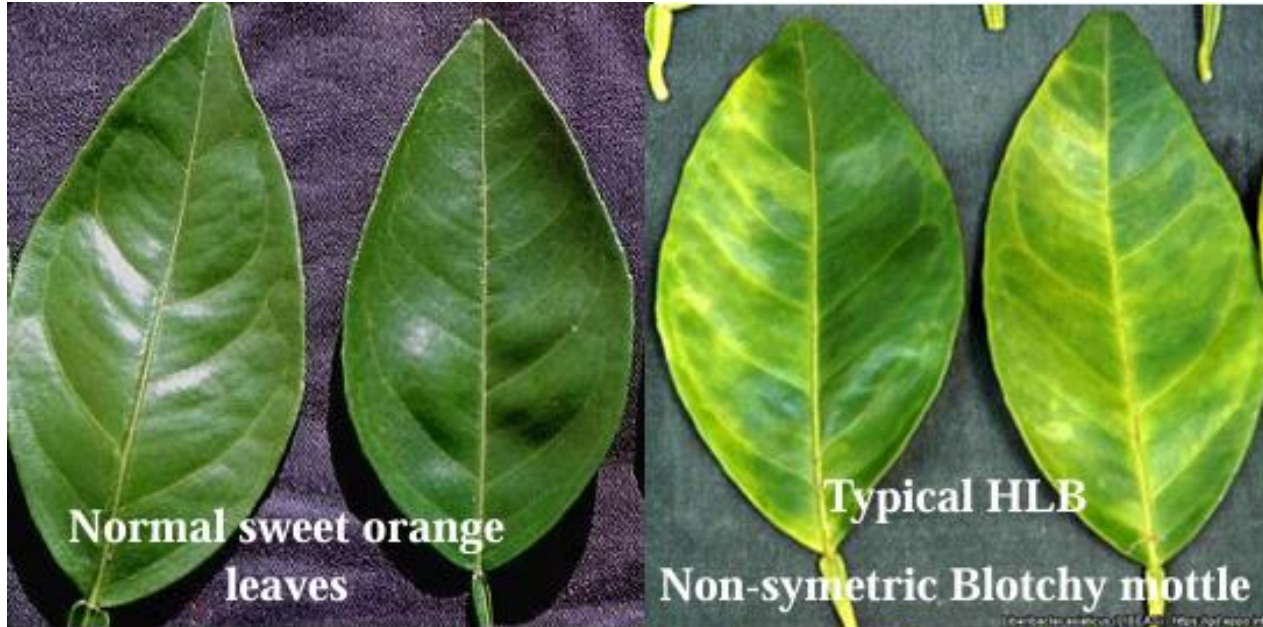
Candidatus Liberibacter asiaticus résiste à 32-35 °C

Candidatus Liberibacter africanus est sensible aux températures élevées optimale 24-28°C



Citrus Greening

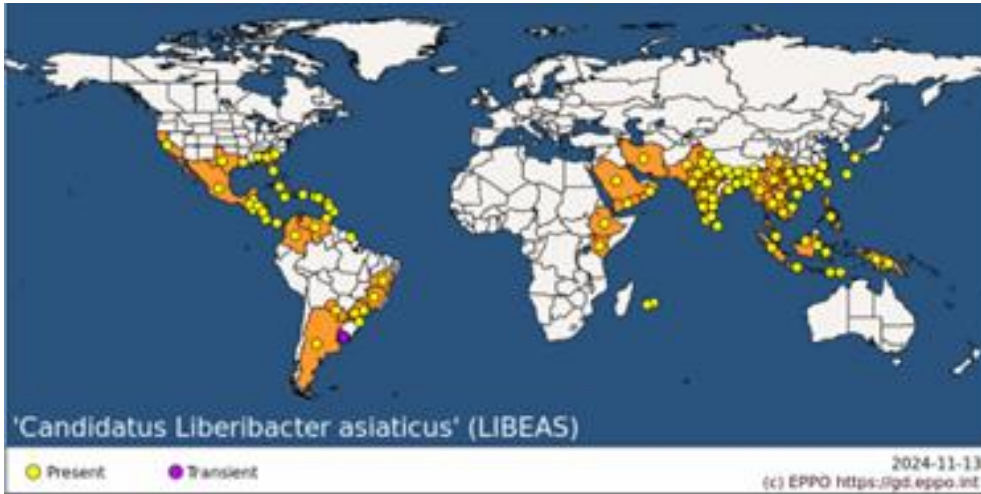
Symptômes



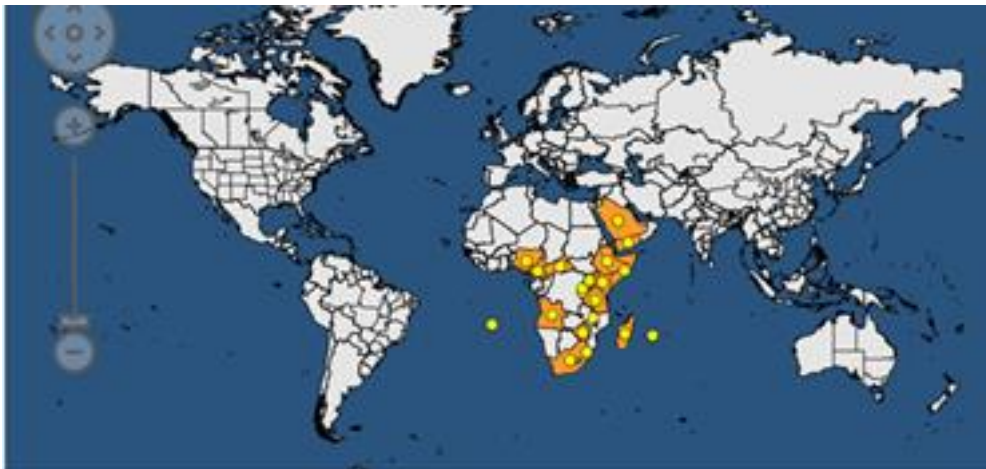
Citrus Greening

Distribution géographique

Candidatus Liberibacter asiaticus



Candidatus Liberibacter africanus



Mode de transmission

- Transmission par multiplication végétative en pépinière
- Transmission persistante par les psylles des agrumes

Diaphorina citri;
Asian citrus psyllid



Vector of LIBEAS

Trioza erytreae ;
African citrus psyllid

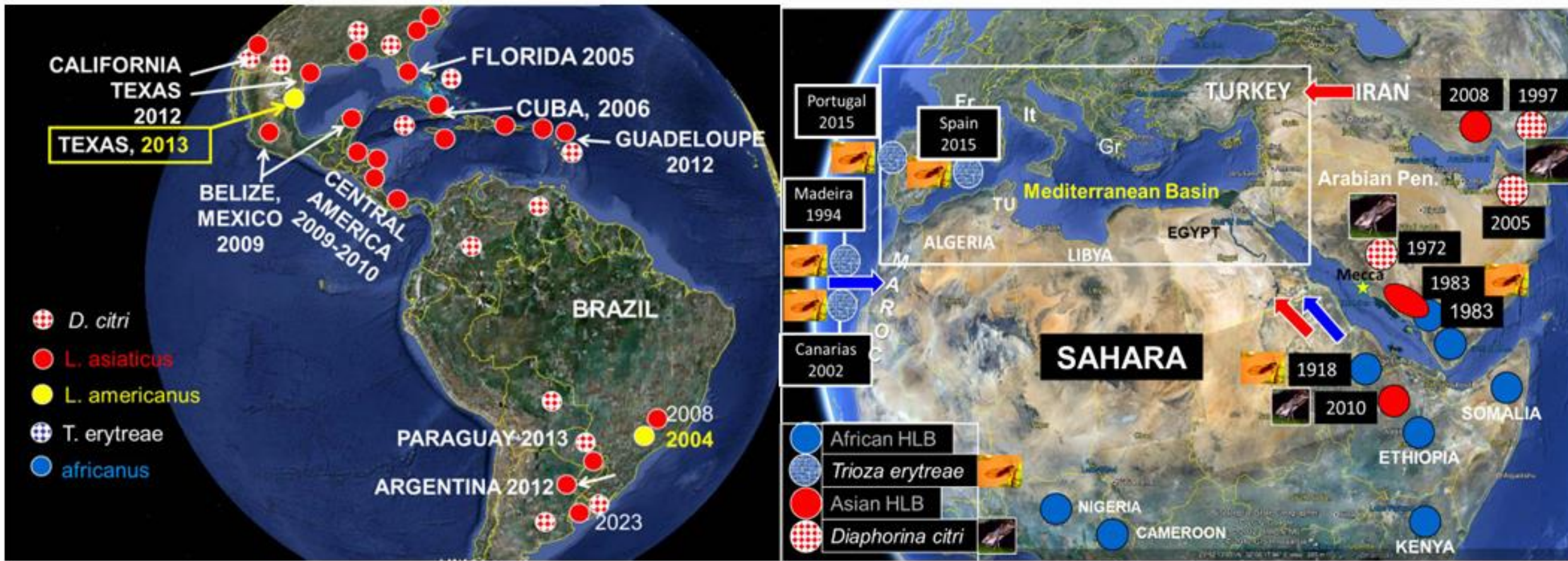


Vector of LIBEAF

Citrus Greening

Situation dans le bassin méditerranéennes

Le bassin méditerranéen **n'est pas touché par la maladie**, mais les vecteurs progressent !



Citrus Greening

Plantes Hôtes

Symptômes graves :

- Orange douce (*Citrus sinensis*)
- Mandarine (*Citrus reticulata*)
- Tangelo (*C. reticulata* × *C. paradisi*)

Symptômes modérés :

- Citron (*Citrus limon*)
- Pamplemousse (*Citrus paradisi*)
- Lime Rangpur (*Citrus limonia*)
- Lime douce palestinienne (*Citrus limettioides*)
- Citron rugueux (*Citrus jambhiri*)
- Kumquat (*Fortunella* spp.)
- Cédrat (*Citrus medica*)

Symptômes faibles à très faibles :

- Limettier (*Citrus aurantiifolia*)
- Pomelo (*Citrus grandis*)

Citrus Greening

Risque d'introduction par le e-Commerce

Exemples au Royaume-Uni : risque de vente directe (internet) de plantes envoyées par les services postaux
risque de pénétration de la plante bettle

- Mars 2020, 1200 envois contenant des plants à racines nues de Malus, Prunus, Citrus destinés à des particuliers
- Expédiés depuis la France mais peut-être d'origine bulgare
- Pas de certificats phytosanitaires
- Tous ont été réexportés



Citrus Greening

Risque d'introduction des vecteurs par le déplacement de machines et de véhicules usagés

- Capture de la punaise diabolique brune (*Halyomorpha halys*) à la frontière du Royaume-Uni

Introduction de la punaise diabolique brune (*Halyomorpha halys*)

En Amérique du Nord :

La punaise diabolique brune a été introduite accidentellement aux États-Unis entre 1997 et 1998 depuis la Chine ou le Japon.

Elle aurait voyagé comme passager clandestin dans des **caisses d'emballage ou sur divers types de machines.**

En Europe :

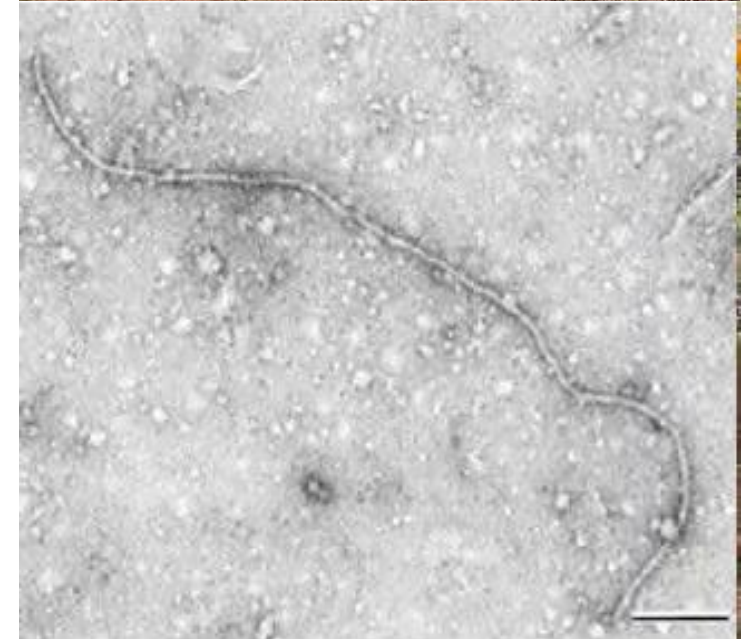
Halyomorpha halys aurait été introduite en Europe lors des travaux de rénovation du Jardin chinois à Zurich (Suisse) durant l'hiver 1998.

Elle aurait voyagé avec **des tuiles de toit** importées de Pékin (Chine).



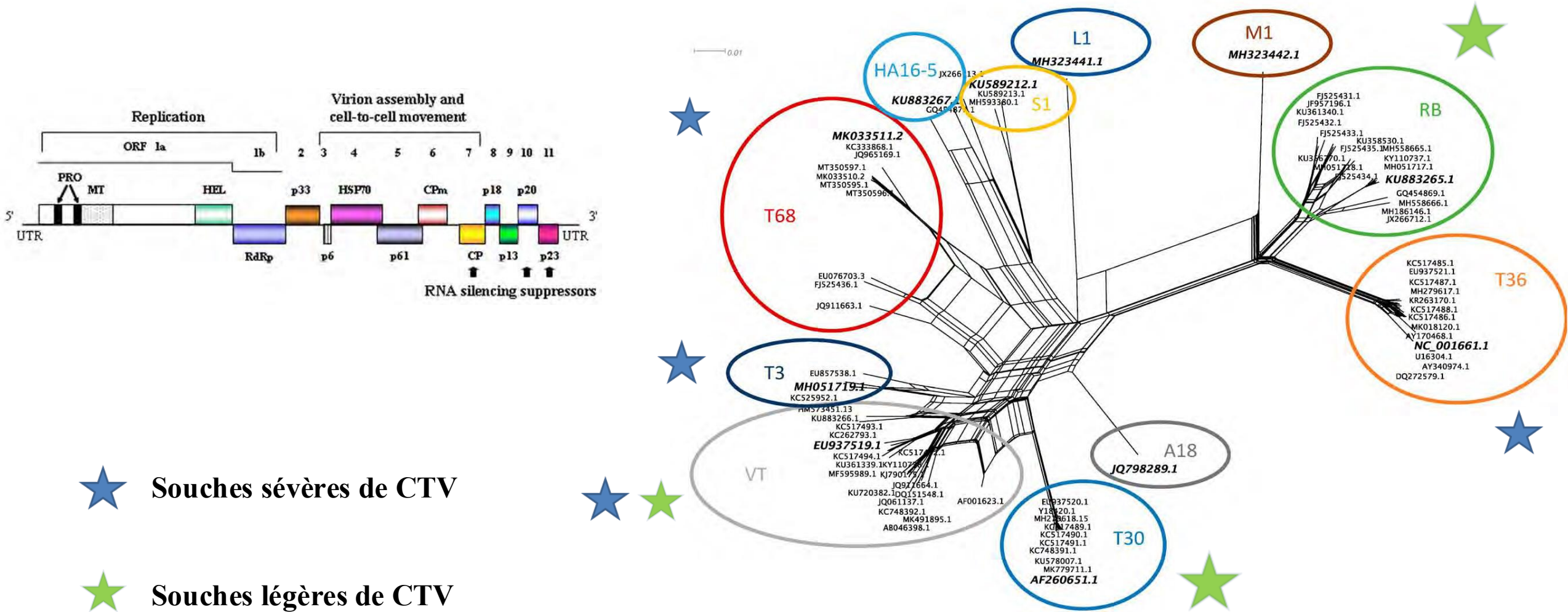
Citrus Tristeza virus (CTV)

- Le virus de la tristeza des agrumes (CTV) est à l'origine de l'une des maladies les plus dommageables pour les agrumes.
- *Toxoptera citricida* le vecteur le plus efficace du CTV.



Citrus Tristeza virus (CTV)

Diversité génétique du CTV



Citrus Tristeza virus (CTV)

Plantes hôtes

Plantes hôtes majeures

- *Citrus x aurantium*
- *Citrus x aurantium var. sinensis*

Plantes hôtes

- *Citroncirus webberi*
- *Citropsis articulata*
- *Citrus*
- *Citrus hybrids*
- *Citrus hystrix*
- *Citrus maxima*
- *Citrus medica*
- *Citrus myrtifolia*
- *Citrus reticulata*
- *Citrus trifoliata*
- *Citrus x aurantiifolia*

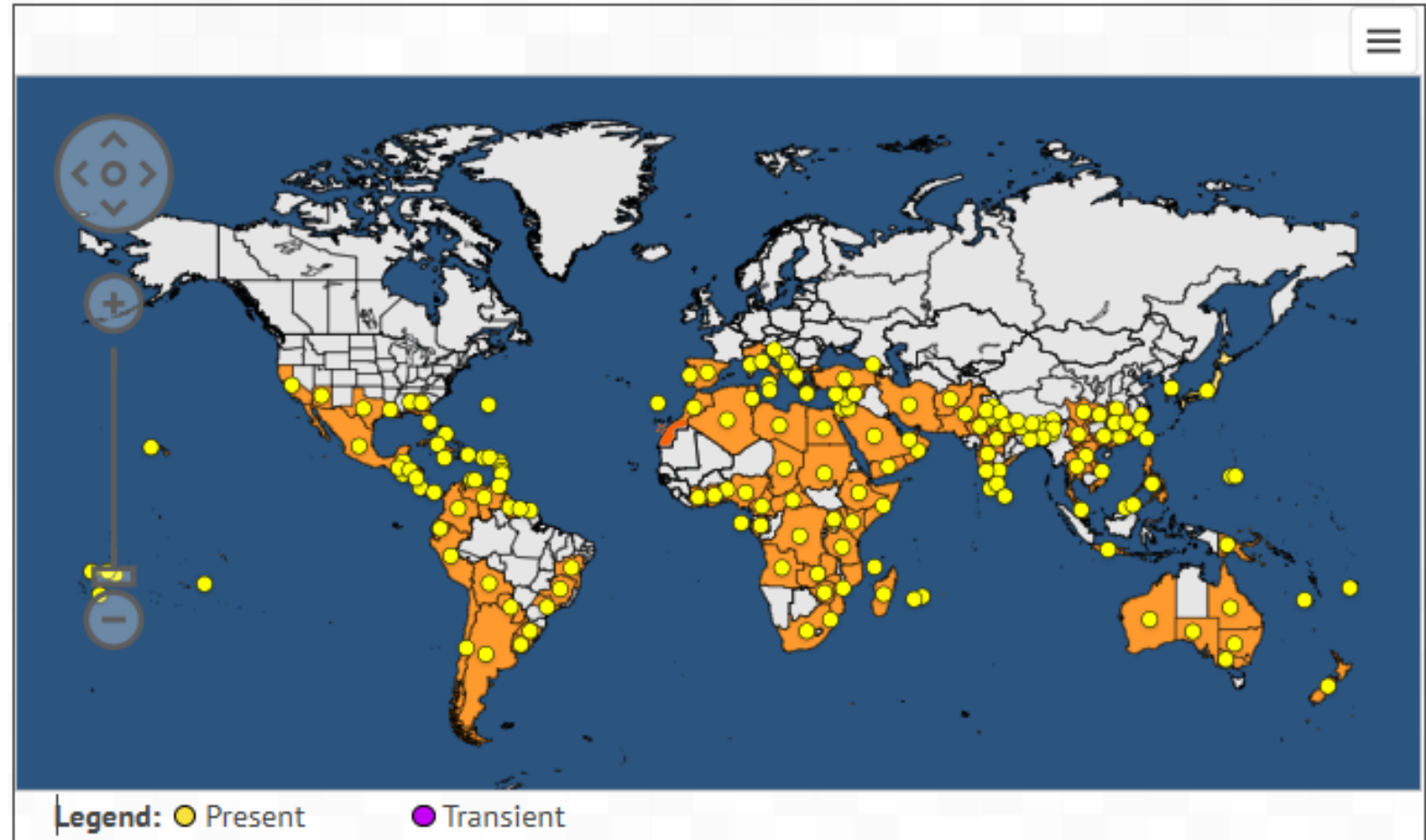
- *Citrus x aurantiifolia var. macrophylla*
- *Citrus x aurantium var. clementina*
- *Citrus x aurantium var. deliciosa*
- *Citrus x aurantium var. paradisi*
- *Citrus x aurantium var. unshiu*
- *Citrus x junos*
- *Citrus x latifolia*
- *Citrus x limon*
- *Citrus x limon var. limetta*
- *Citrus x limon var. limettioides*
- *Citrus x limon var. meyerii*
- *Citrus x limonia*
- *Clausena*
- *Fortunella*
- *Fortunella japonica*
- *Fortunella margarita*

Plantes expérimentales

- *Aegle marmelos*
- *Aeglopsis chevalieri*
- *Afraegle paniculata*
- *Atalantia buxifolia*
- *Atalantia citroides*
- *Atalantia monophylla*
- *Citropsis gilletiana*
- *Citrus australis*
- *Citrus glauca*
- *Citrus micrantha*
- *Citrus wintersii*
- *Citrus x limonia var. jambhiri*
- *Merrillia caloxylon*
- *Naringi crenulata*
- *Pamburus missionis*
- *Passiflora*
- *Pleiospermium sp.*
- *Swinglea glutinosa*
- *x Citrofortunella microcarpa*

Citrus Tristeza virus (CTV)

Distribution géographique



Continent ^	Country	State	Status	
- select v	Morocco v	- select - v	- select - v	
Africa	Morocco		Present, restricted distribution	view...

Nos résultats de recherches sur CTV

Détection du CTV

- Test **DAS-ELISA** (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- Vérification des résultats obtenues par le test ELISA
 - Amorces Pex1/Pex2 avec des conditions suivantes



Concentration des amorces = 0,6 μ M



T_m = 56°C



Durée d'hybridation = 60 s



Nos résultats de recherches

Détection du CTV

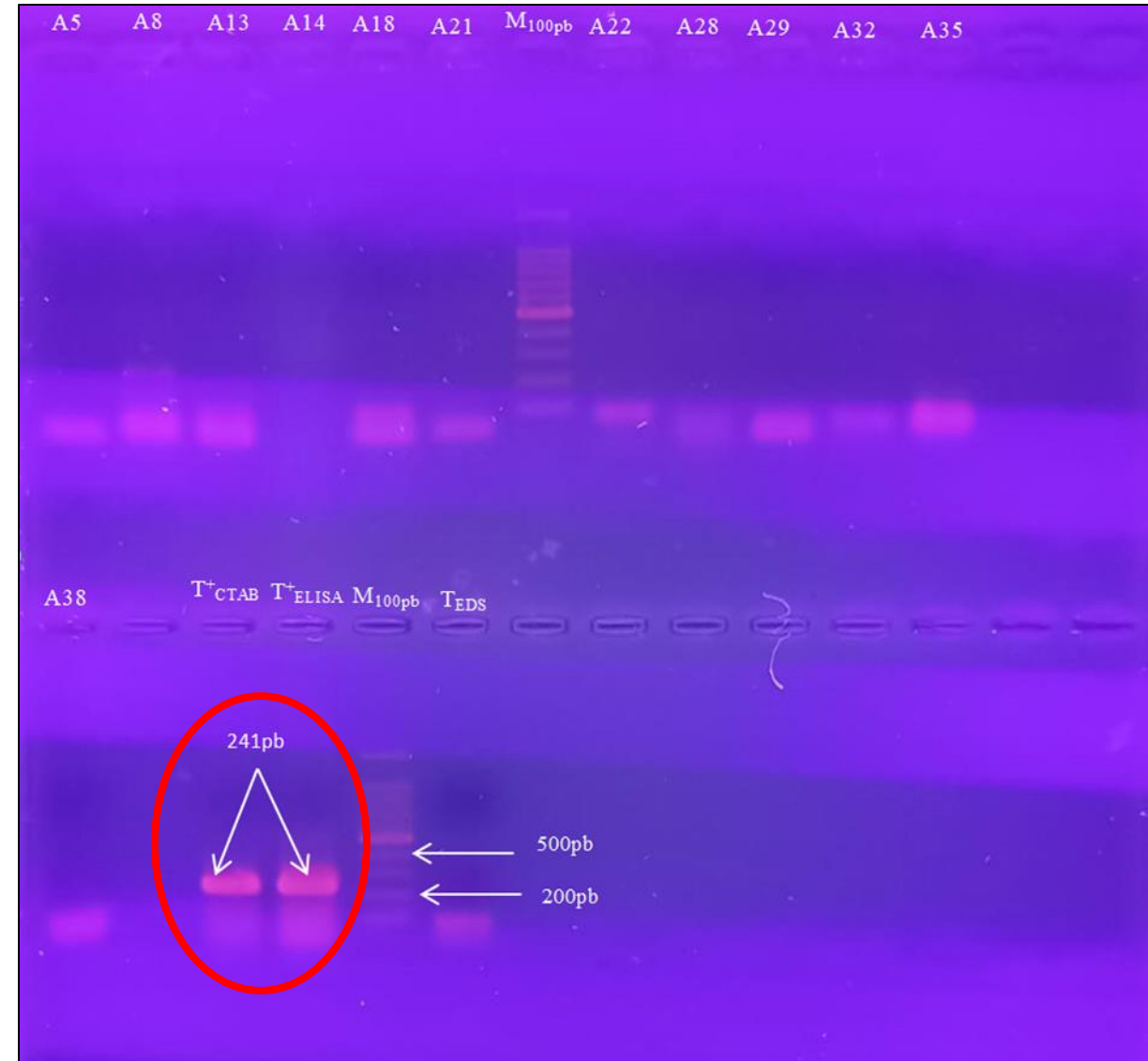


Nos résultats de recherches sur CTV

Résultats de détection du CTV par PCR

L'ensemble des échantillons testés sont négatifs

Amplification des bandes pour les témoins positifs



Nos résultats de recherches sur l'occurrences des pucerons vecteurs

Occurrence des pucerons vecteurs du CTV

12 vergers d'agrumes situés dans la région de Berkane ont été prospectés

10 arbres par verger ont été sélectionnés au hasard sur les diagonales du champ

4 pousses infestées par pucerons par verger ont été prélevées dans différentes directions et à différents niveaux de hauteur.

Les pucerons de chaque pousse ont été conservés dans de l'éthanol 70 %.

Les pucerons sont observés sous microscope et loupe binoculaire



- Les clés d'identification des pucerons

Clé de Hullé et *al.*, 1998;

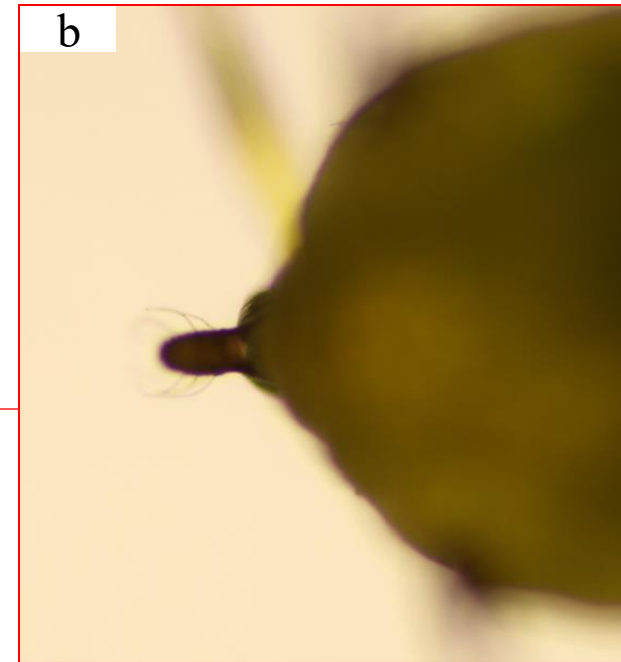
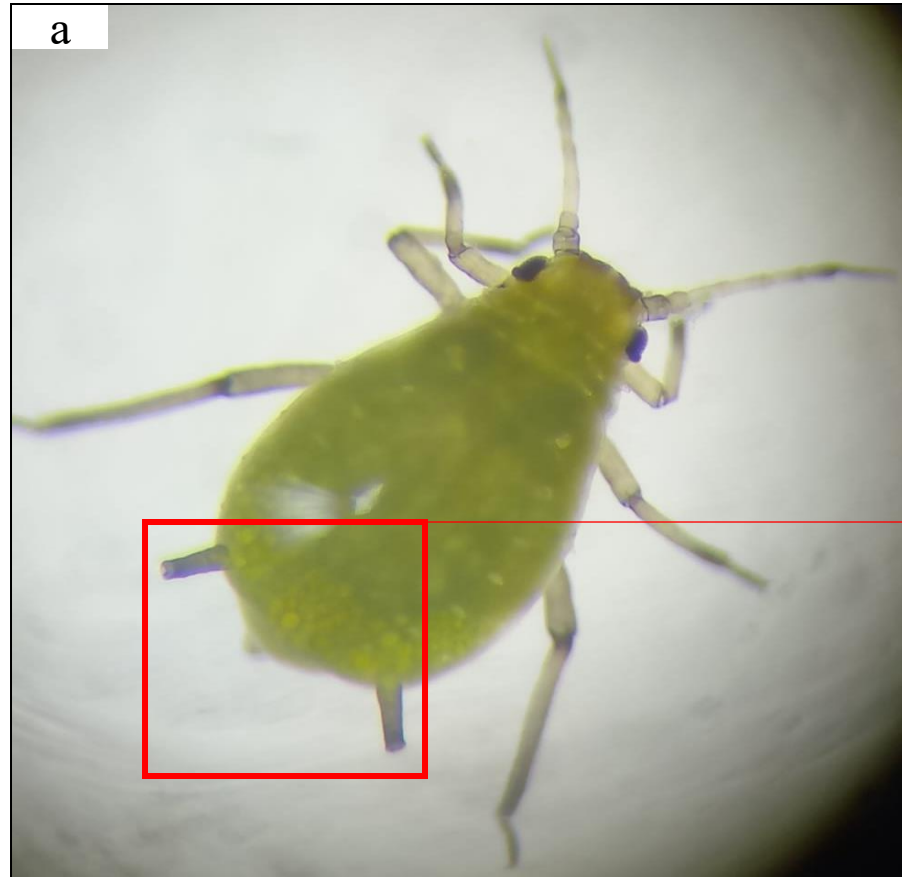
Clé de Blackman et Eastop 2006;

Clé de Trapeau et *al.*, 2014.

Nos résultats de recherches sur l'occurrences des pucerons vecteurs

Occurrence des pucerons vecteurs du CTV

- *Aphis gossypii* Glover (1854)



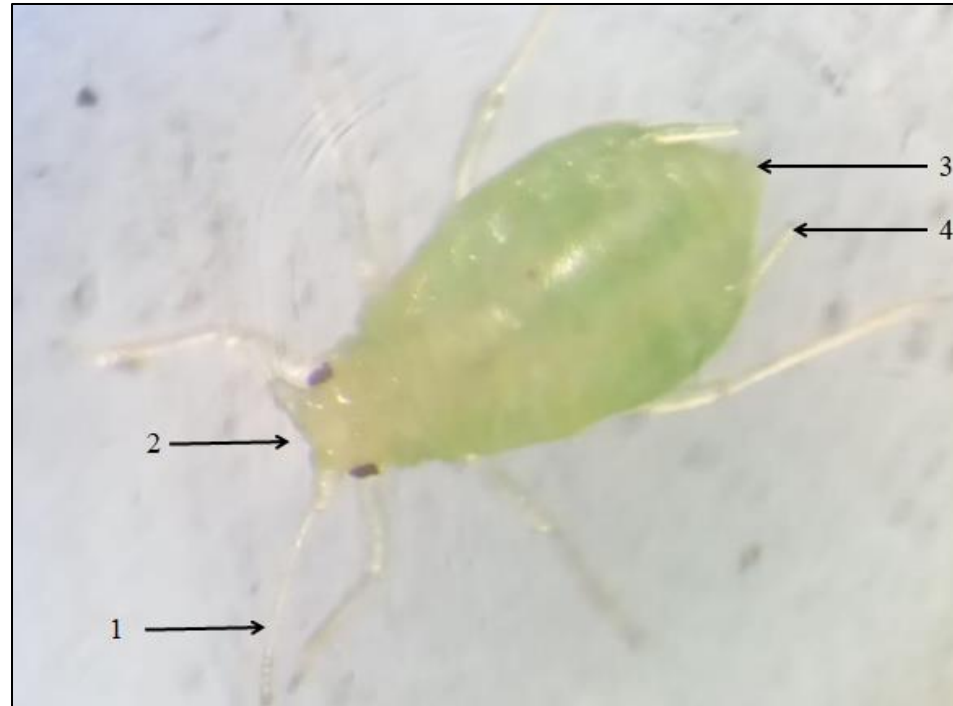
Nos résultats de recherches sur l'occurrences des pucerons vecteurs

Occurrence des pucerons vecteurs du CTV

- *Myzus persicae* Sulzer (1776)

Tubercules frontaux convergentes

Antenne longue pigmentée

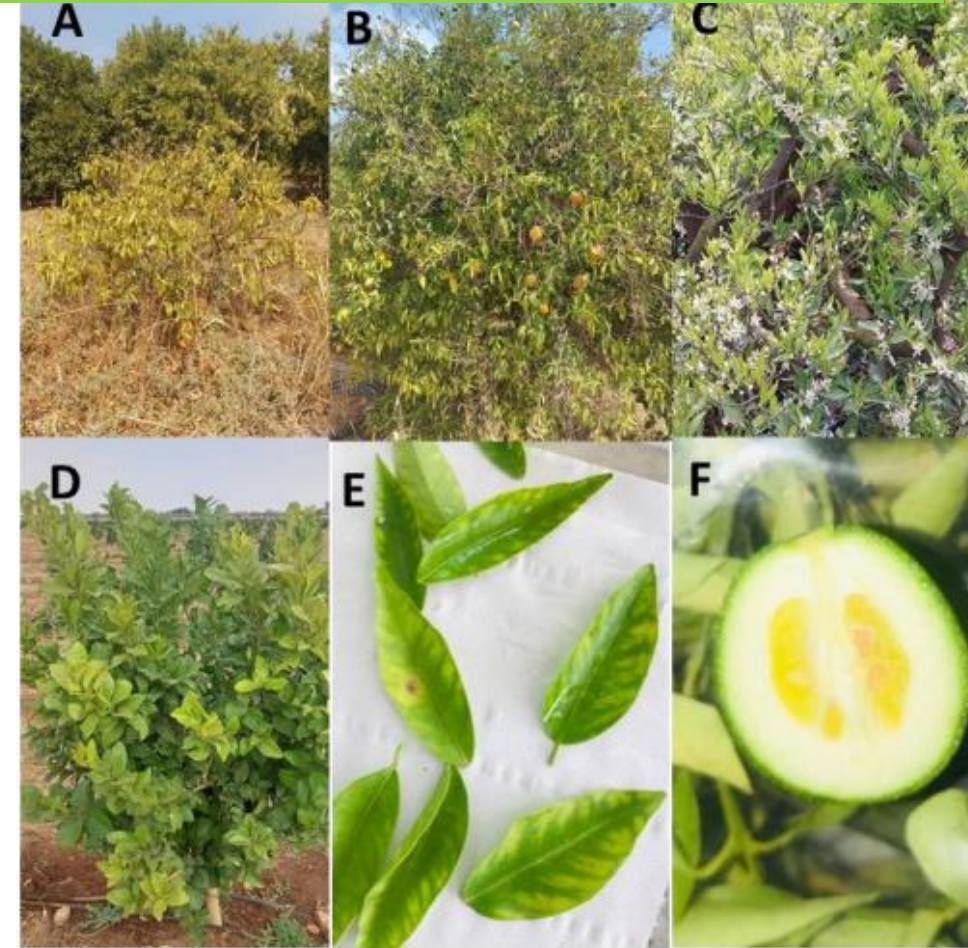


3 Cauda claire digiforme
4 Cornicule claire longue

Stubborn (*Spiroplasma citri*)

Symptômes

- **Rabougrissement des arbres** : réduction de la croissance, port anormal (A, B)
- **Floraison hors saison** : apparition de fleurs en dehors de la période normale (C)
- **Développement anormal des jeunes plants** : symptômes visibles dès le jeune âge sur porte-greffe bigaradier (D)
- **Chlorose foliaire** : jaunissement des feuilles lié à un dysfonctionnement physiologique (E)

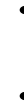
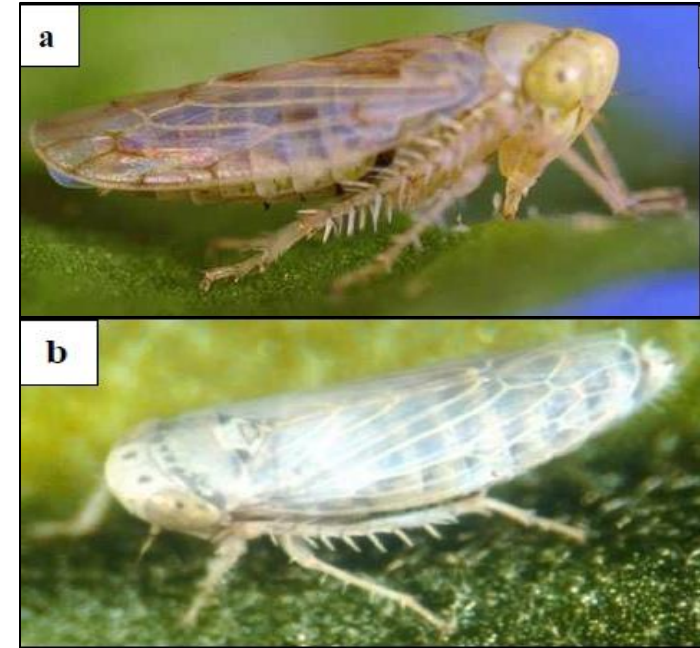
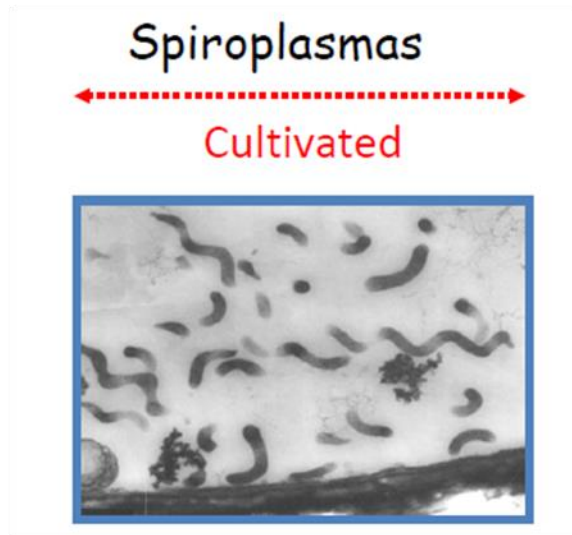


Symptômes observés sur terrain de la maladie du stubborn des agrumes observés sur des orangers doux (*Citrus sinensis*) dans la région du Tadla en 2021 (sagouti et *al.*, 2023).

Stubborn (*Spiroplasma citri*)

Vecteurs

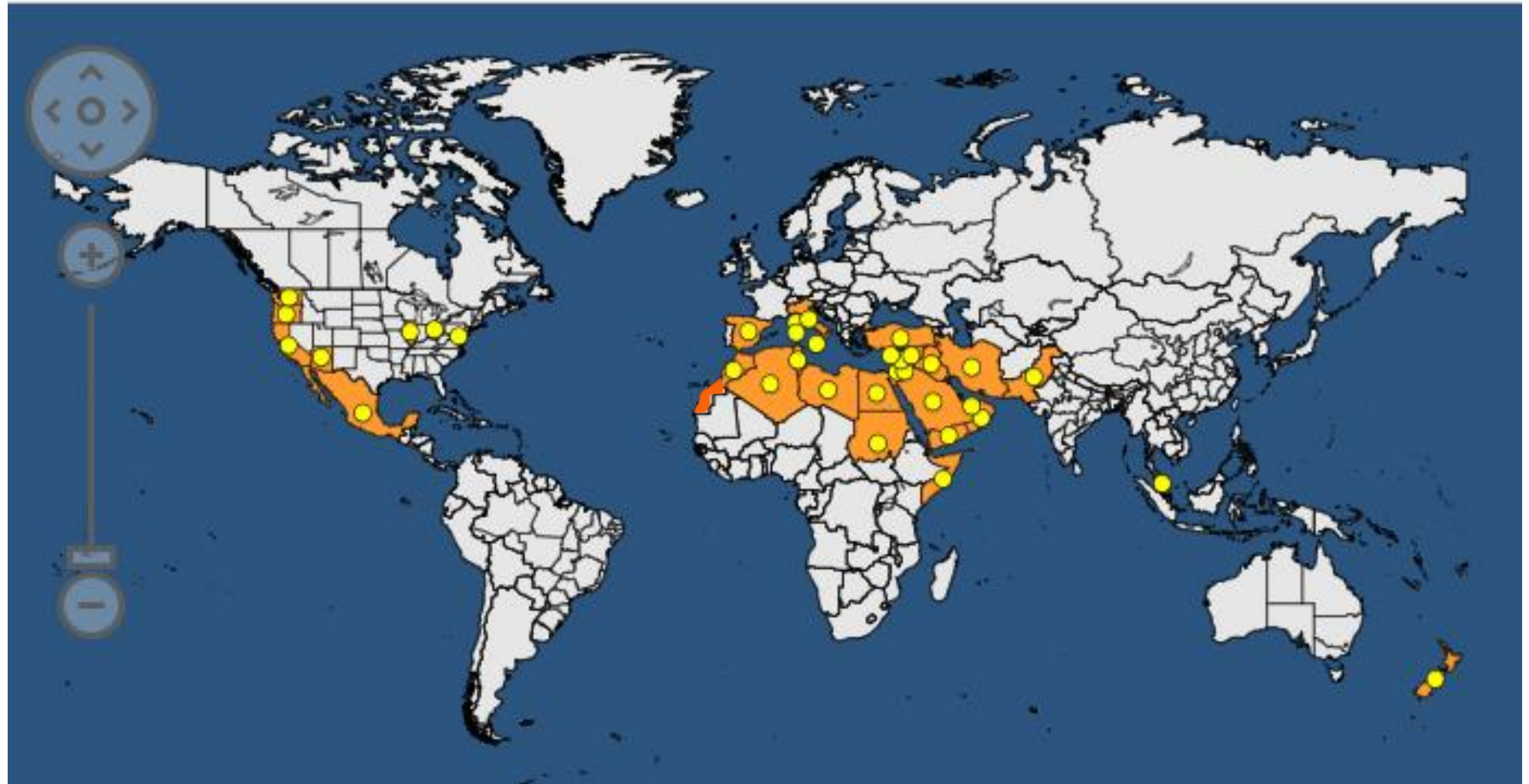
Mollicutes(cell-wallless)



Vecteur : cicadelles (*Circulifer tenellus*
& *Circulifer haematoceps*)

Stubborn

Répartition géographique



Nos résultats de recherches

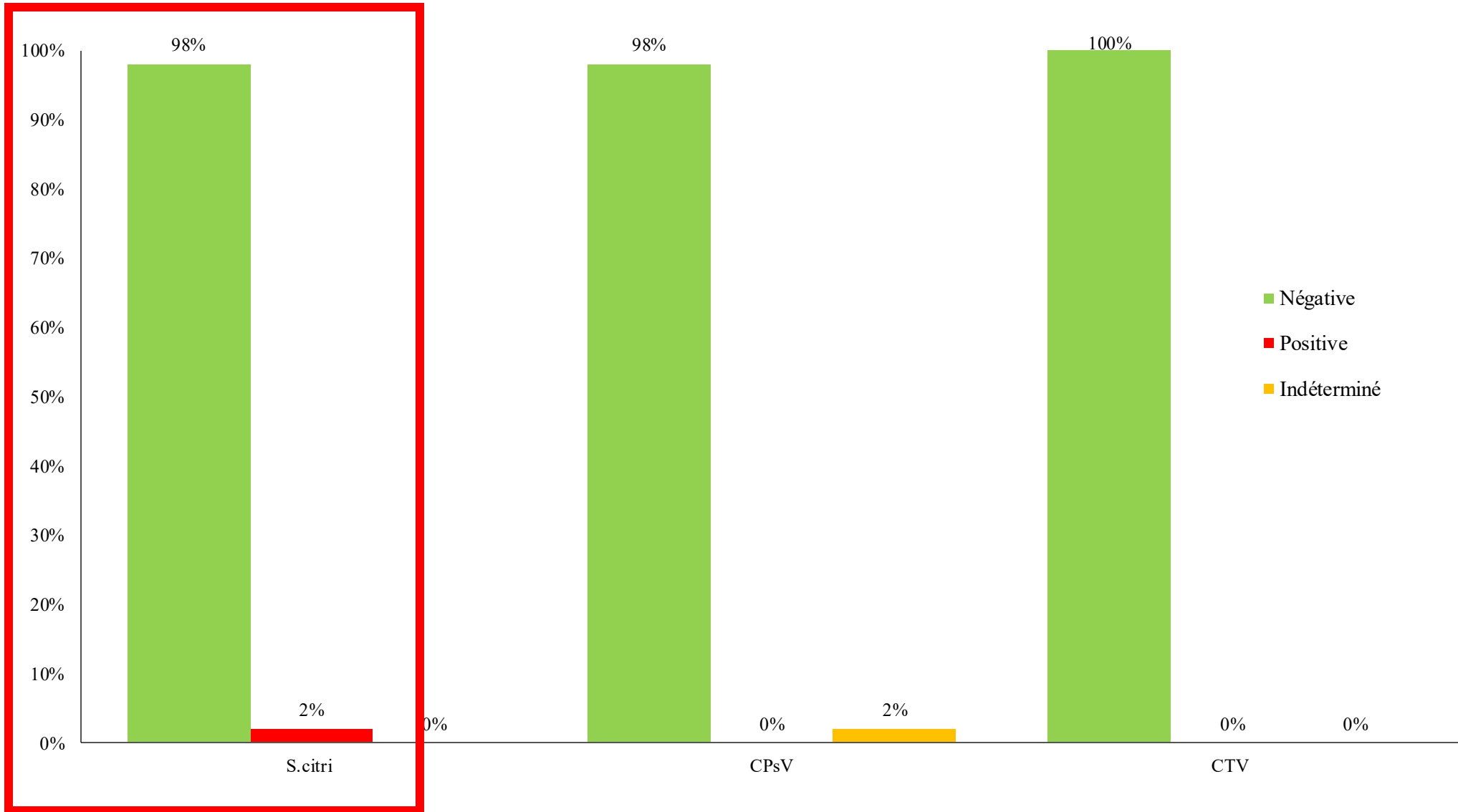
Détection du *spiroplasma Citri* par la méthode sérologique

- Test **DAS-ELISA** (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

- **PROTOCOLE**
(Selon la
recommandation du
fournisseur du kits)

- Etape de coating
- Etape de dépôt de l'anticorps conjugué
- Etape de fixation des antigènes
- Etape de dépôt du substrat

Nos résultats de recherches



Autre résultat

Résultats des tests DAS-ELISA et PCR sur des échantillons de feuilles collectés dans plusieurs zones de culture d'agrumes au Maroc de juillet 2020 à octobre 2021 (T. sagouti et *al.*, 2023) .

Region	Serological				Adhesine P58 Gene			Spiralin Gene	
	Analyzed Samples	Negative	Suspect	Positive	Analyzed Samples *	PCR	qPCR	PCR	qPCR
TADLA	207	168 (81.16%)	14 (6.76%)	25 (12.08%)	61	36 (59.02)	43 (70.49%)	2 (4.65%)	13 (21.31%)
GHARB	126	111(88.10%)	5 (3.97%)	10 (7.94%)	19	14 (73.68)	15 (78.95%)	2 (13.33%)	3 (15.79%)
HAOUZ	133	115 (86.47%)	12 (9.02%)	6 (4.51%)	33	14 (42.42)	20 (60.61%)	1 (5%)	6 (18.18%)
SOUSS	77	73 (94.81%)	2 (2.60)	2 (2.60%)	7	3 (42.86)	5 (71.42%)	0 (0%)	1 (14.29%)
LOUKKOS	14	7 (5%)	3(21.43%)	4 (28.57%)	10	7 (70%)	8 (80%)	0 (0%)	6 (60%)
MOULOUYA	18	4 (22.22%)	7 (38.88%)	7 (38.88%)	18	13 (72.22%)	15 (83.33)	1 (6.67%)	3 (6.67%)
Total	575	478 (83.13%)	43 (7.48%)	54 (9.39%)	148	87 (58.78%)	106 (71.62%)	6 (4.05%)	32 (21.62%)

* Positive, doubtful, and a portion of negative samples with high OD from the DAS-ELISA test.

Citrus psorosis virus (CPsV)

Détection du CPsV

- Maladie virale répandue dans le monde
- Réduction du rendement, de la croissance et de la longévité des arbres infectés
- Les arbres peuvent survivre plusieurs années avant de dépérir Origine et propagation
- Première apparition : Floride et Californie (années 1890) Origine : Orient, propagation mondiale via les plants infectés
- Présente dans le bassin méditerranéen et potentiellement répandue en Asie

Citrus psorosis virus (CPsV)

Détection du CPsV

- **Écaillage et gommose localisés** au niveau du tronc et des branches principales des orangers doux
- **Écaillage rampant de l'écorce** affectant les **branches fines** des orangers doux



Symptômes de la psorose des agrumes observés dans les vergers d'agrumes marocains de la région de la Moulouya en 2019 (belabess et *al.*, 2020)

Citrus psorosis virus (CPsV)

Détection du CPsV

- Test **DAS-ELISA** (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- Confirmation des résultats par le test PCR

—● Amorces CPV1/CPV2

—● Conditions du test



Concentration des amorces = 0,25 μ M



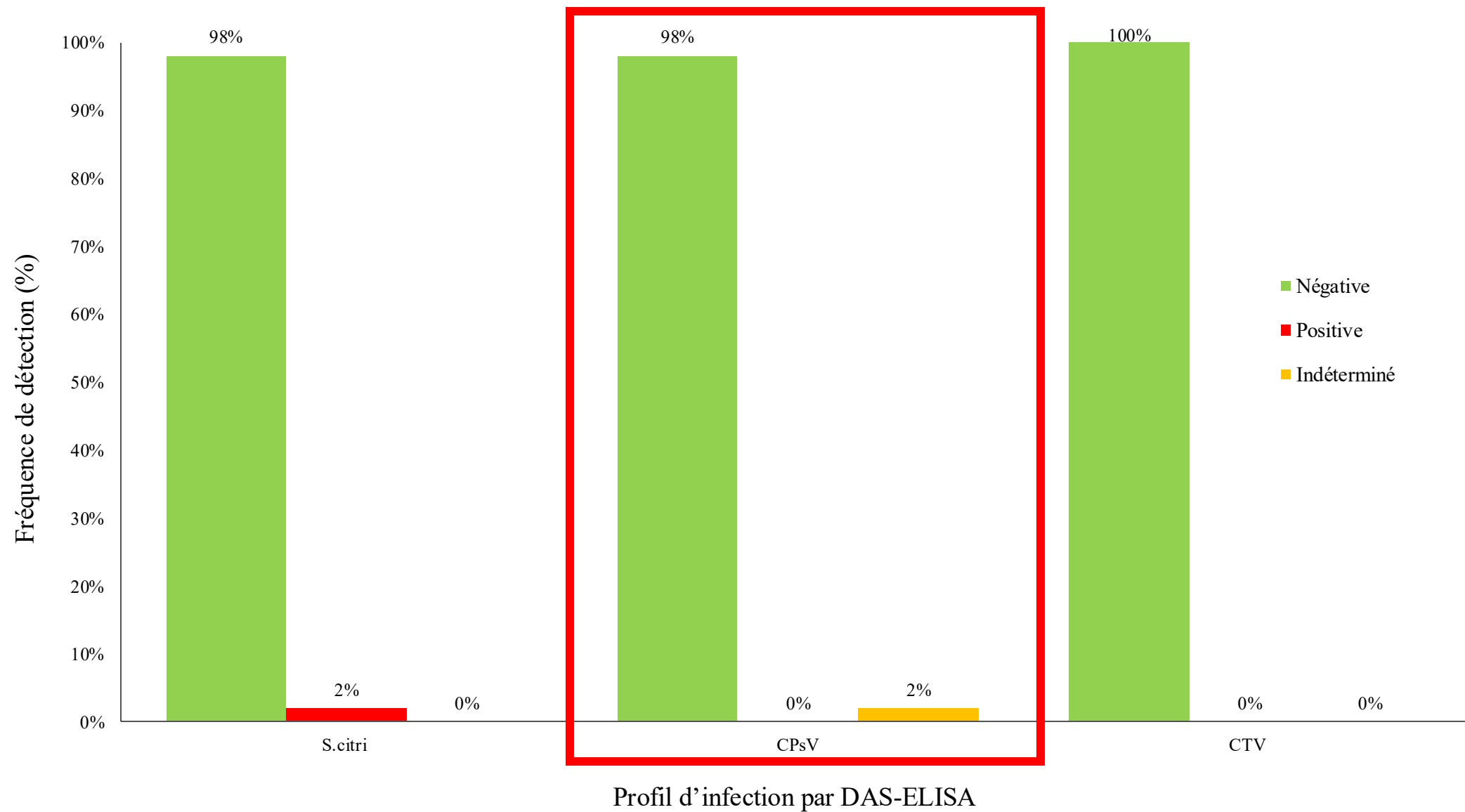
T_m = 58°C



Durée d'hybridation = 60 s

Citrus psorosis virus (CPsV)

Résultats de la détection du CPsV



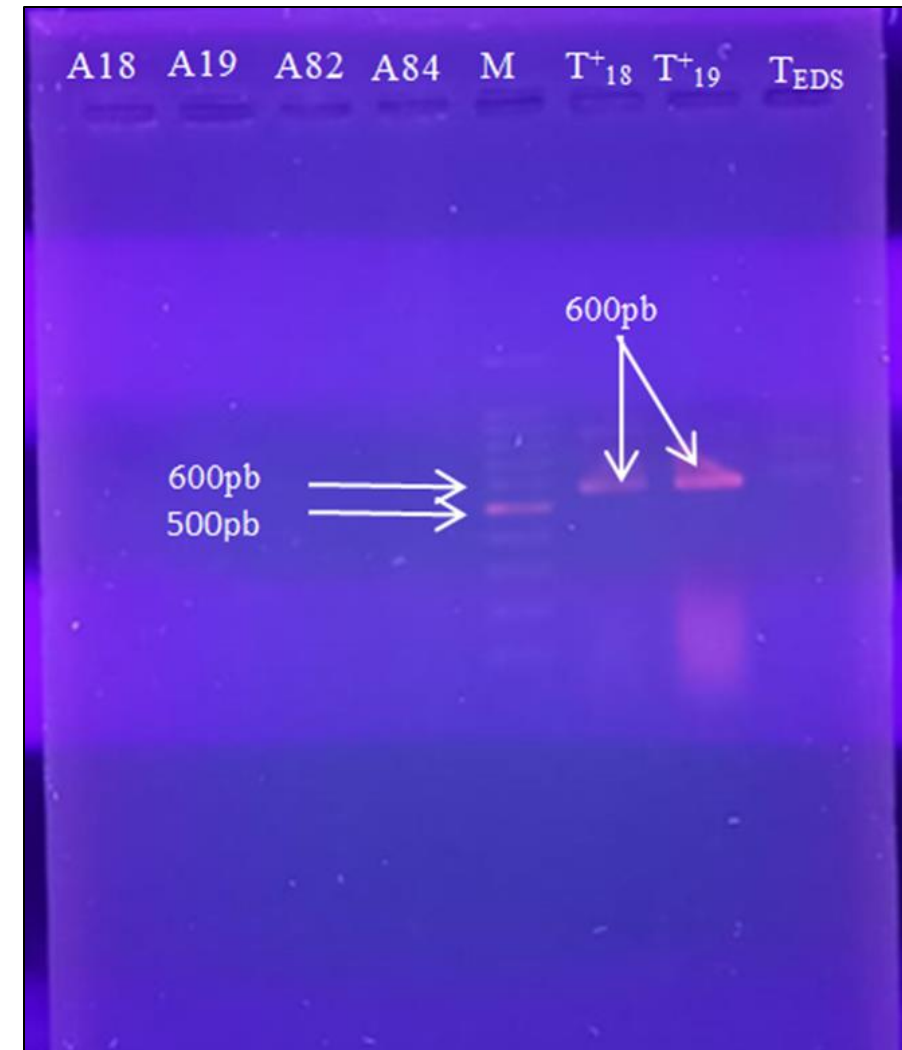
Citrus psorosis virus (CPsV)

Résultats de la détection du CPsV

L'ensemble des échantillons testés sont indemnes du virus étudié

Aucune bande n'a été amplifiée sur les échantillons testés



- Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Belabess (2019), Afechtal (2017) et Bibi et *al.*, (2019) qui ont rapporté la détection du CPsV dans la région de Berkane avec une prévalence de 19%, 33% et 39%, respectivement




Citrus viroids (CEVd & HSVd)

- 7 viroïdes infectent les agrumes, mais seuls **CEVd** (exocortis) et **HSVd** (cachexie) causent des **maladies majeures**.


● CEVd – Exocortis

-  **Perte de rendement jusqu'à 50 %**, surtout en gros calibres (essai de 12 ans sur clémentinier).
-  Pas d'impact majeur sur la **qualité du fruit**, mais baisse marquée de la production.

 Porte-greffes les plus sensibles :
• *P. trifoliata*, lime douce (*C. limettioides*), citron Rangpur.

● HSVd – Cachexie

- Jusqu'à 76 % de perte de rendement (essai sur 12 ans).
- Peu d'impact sur la qualité, mais réduction du calibre des fruits.

 Principaux hôtes sensibles : mandariniers, tangelos, *C. macrophylla*.

Nos résultats de recherches sur les viroids

Symptômes observés sur les arbres infectés :

- Gommose du tronc et de l'écorce, fissures, aspect rugueux.
- Rabougrissement** modéré à sévère, chlorose, déclin, voire **mort des arbres**.
- Taches brunes** sous les feuilles, **petites cavités** dans le bois.
- Maladie principalement sure : **mandariniers, tangelos, C. macrophylla**.



Citrus exocortis
viroid (exortis)



[Pospiviroidae ; Pospiviroid;
CEVd]



Hop stunt viroid
(cachexie)



[Pospiviroidae ; Hostuviroïde ;
HSVd]

Nos résultats de recherches sur les viroids

Détection des virus et microorganismes similaires aux virus associés aux agrumes par PCR



HSVd

—● Amorces HSVd-f/HSVd-r

—● Conditions du test



Concentration des amorces = 0,25 μ M



T_m = 52°C



Durée d'hybridation = 60 s



CEVd

—● Amorces CEVd-f/CEVd-r

—● Conditions du test



Concentration des amorces = 0,25 μ M



T_m = 51°C



Durée d'hybridation = 60 s

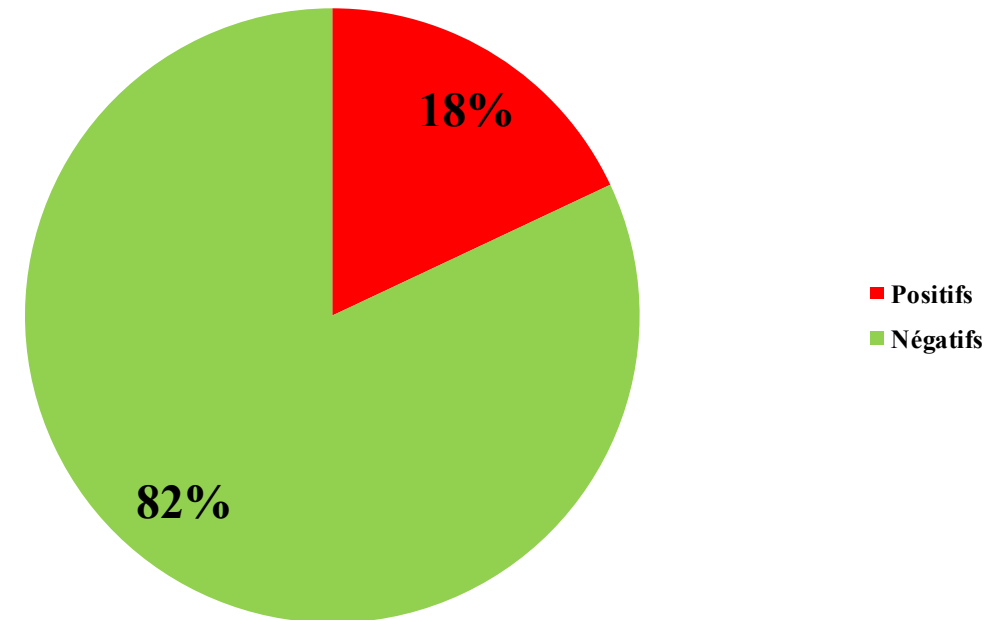
Nos résultats de recherches sur les viroids

Détection du CTV, CPsV , HSVd, CEVd par one step RT-PCR



HSVd

- 18 % des échantillons testés sont positifs

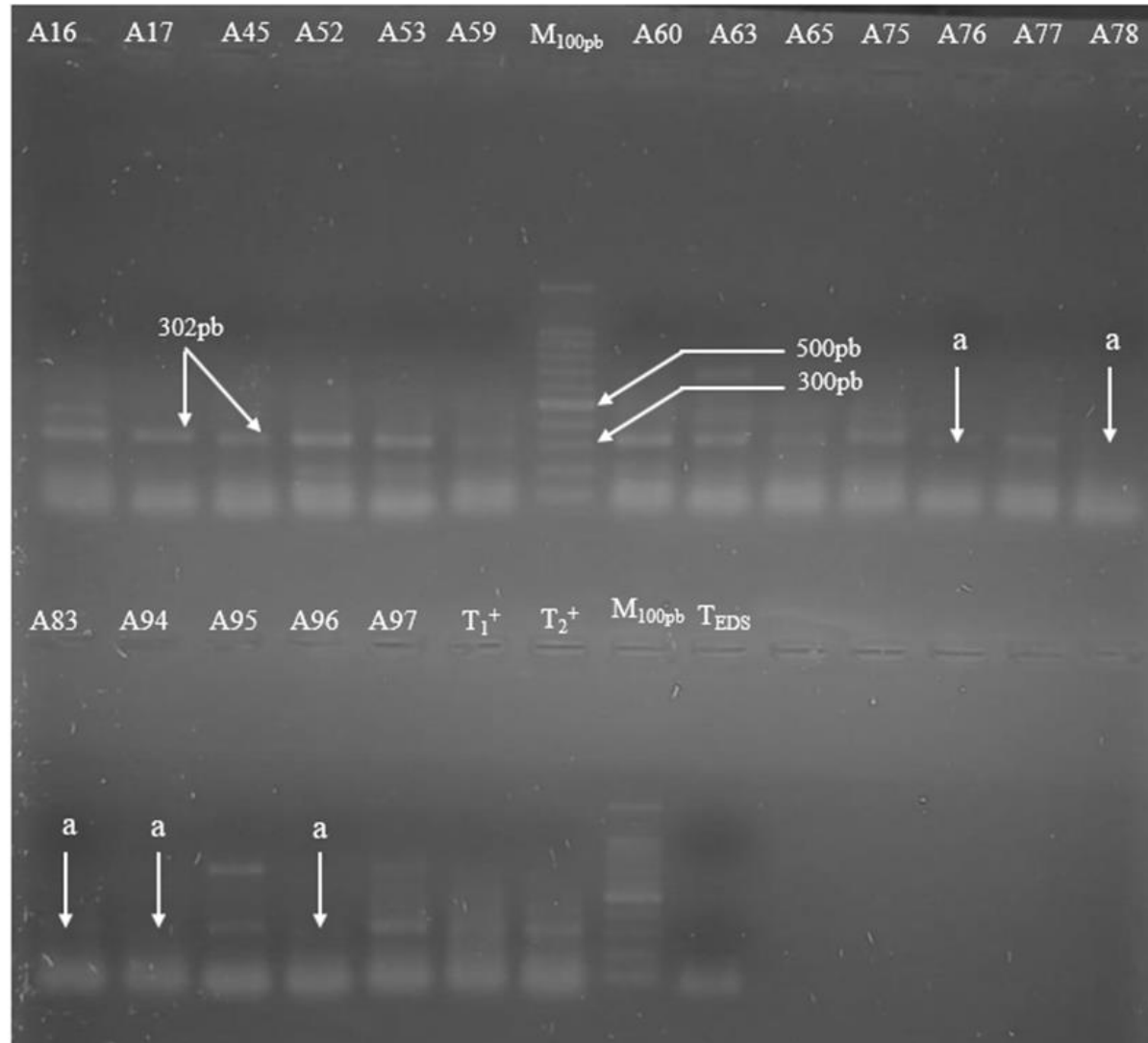


Nos résultats de recherches sur les viroids

Détection du CTV, CPsV, HSVd, CEVd par one step RT-PCR



HSVd



Detection of CTV infection on clementine in the Berkane area by one-step RT-PCR; agarose gel electrophoresis showing amplification of the band to the expected size (241 bp) on the positive control, "M100pb" corresponds to the GeneRuler 100 bp DNA Ladder molecular weight marker.

Nos résultats de recherches sur les viroids

Détection du CTV, CPsV , HSVd, CEVd par one step RT-PCR

 HSVd



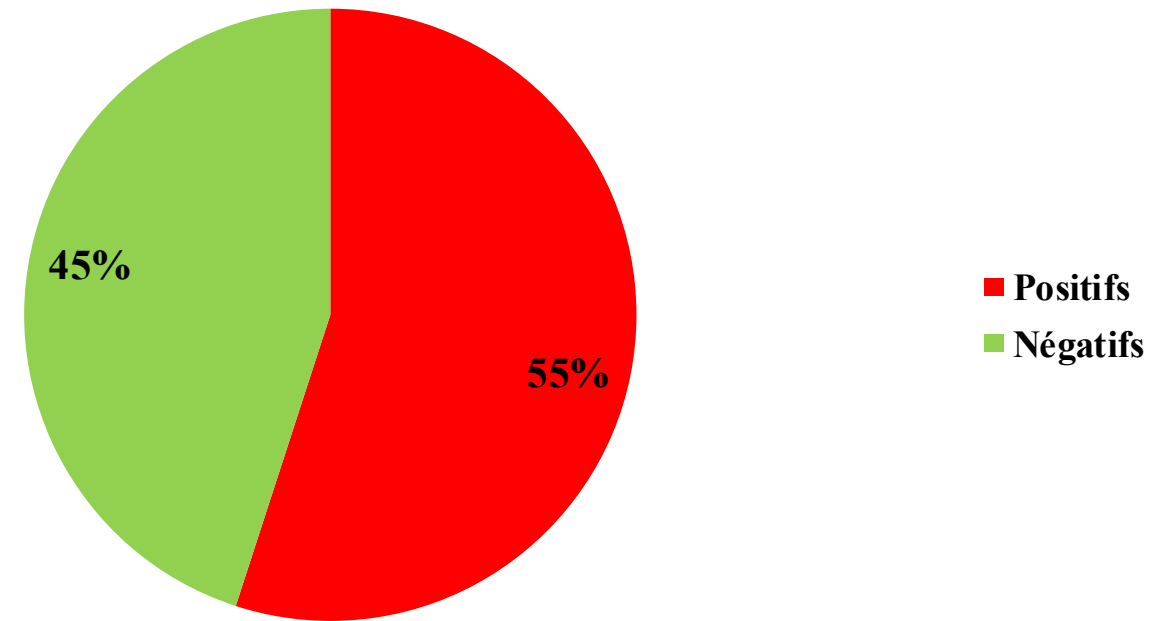
Des échantillons testés positives

Nos résultats de recherches sur les viroids

Détection du CTV, CPsV , HSVd, CEVd par one step RT-PCR

CEVd

- 55 % des échantillons testés sont positifs



Nos résultats de recherches sur les viroids

Détection du CTV, CPsV , HSVd, CEVd par one step RT-PCR

 **CEVd**



Des échantillons testés positives

HSVd et CEVd

- ✓ HSVd et CEVd sont largement répandus avec des taux d'infection de 18% et 55%, respectivement.
- ✓ Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Bibi et *al.*, (2020) qui ont rapporté que HSVd et CEVd étaient présents au Maroc, avec des taux d'infection de 10,8% et 18,2%,

Conclusion & Recommendations

Conclusion

Cette étude nous a permis d'obtenir des informations importantes sur la situation en matière d'infections en phytovirus;



La **non détection** du CPsV et CTV dans les vergers agrumicoles de Berkane;



La **faible** détection de *S. citri*;



Les viroids HSVd et CEVd sont **largement répandus** avec des taux d'infection de 18% et 55%;



L'**absence** du principal vecteur du CTV *Toxoptera citricida*.



Surveillance continue :

- Il est essentiel de mettre en place un programme de surveillance à long terme pour suivre l'évolution des maladies virales associées aux agrumes dans la région.



Sensibilisation et formation :

- Informer et former les professionnels sur les maladies virales des agrumes est essentiel pour les aider à adopter des pratiques agricoles appropriées.
- La sensibilisation permettrait également de promouvoir une approche collective pour prévenir la propagation des maladies virales.

Conclusion & Recommendations

Recommendations

Campagne de communication : passagers internationaux



À l'aéroport de Valence