

Prévalence des phytovirus associés aux agrumes dans la région de Berkane

Belabess Z.¹, Afechtal M.², Benyazid J.³, Sagouti T.^{4,5} et Rhallabi N.⁵

zineb.belabess@inra.ma

1 : INRA, Centre Régional de la Recherche Agronomique d'Oujda (CRRAO),
Laboratoire de Protection des Plantes (Qualipôle de Berkane).

2 : INRA, Centre Régional de la Recherche Agronomique de Kénitra, Laboratoire de
Virologie.

3 : Faculté des Sciences d'Oujda, Laboratoire de Biochimie et Biotechnologies.

4 : Faculté des Sciences et Techniques de Mohammadia, Laboratoire de Virologie,
Microbiologie et Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité.

5 : Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires, Station de
Quarantaine, Bouznika.

Résumé

Les phytovirus constituent un sujet de préoccupation majeur aussi bien au niveau mondial que national. L'efficacité des mesures de contrôle des phytovirus repose sur une bonne compréhension de leur étiologie et de leur épidémiologie. C'est dans ce contexte que la prévalence des viroses des agrumes, causées par des phytovirus et des microorganismes similaires aux virus, a été étudiée dans la région de Berkane. Un total de 277 échantillons a été prélevé dans 3 pépinières et 27 exploitations agrumicoles entre 2018 et 2019. Ces échantillons ont été testés contre des anticorps monoclonaux spécifiques pour citrus tristeza virus (CTV), citrus psorosis virus (CPsV), et *Spiroplasma citri*, moyennant Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked-Immunosorbent Assay (DAS-ELISA). Seul CPsV a été détecté avec une prévalence de 18% (51/277). Nos résultats révèlent que les profils d'infection par CPsV sont significativement différents entre tous les sites prospectés et que ce virus est présent aussi bien sur oranger (24%) que sur clémentinier (15%). Des tests préliminaires de Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ont permis de confirmer les résultats obtenus par DAS-ELISA pour CPsV et ont révélé également la présence de citrus exocortis viroid (CEVd) et hop stunt viroid (HSVd). Ces résultats contribueraient dans la formulation de pratiques viables de gestion des phytovirus et des microorganismes similaires aux virus dans la région de Berkane.

Mots clés

Phytovirus, agrumes, Berkane, DAS-ELISA, One-step RT-PCR, symptômes, écaillage, écorce (écaillage d'écorce).

Assessing the prevalence of citrus virus and virus-like diseases in Berkane area

Abstract

Plant viruses represent serious threats to crop plants, particularly in intensive farming. They are responsible for tremendous losses in crop production and quality all over the world. The efficiency of their control relies on a good understanding of both their etiology and epidemiology. In this context, a survey of citrus virus and virus-like diseases was undertaken in the northeast of Morocco (Berkane area). 277 leaf samples were collected from citrus nurseries plants and orchards trees between 2018 and 2019 and were tested with Double-Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) to detect citrus tristeza virus (CTV), citrus psorosis virus (CPsV), and *Spiroplasma citri*. Only CPsV was detected with an average prevalence of 18% (51/277). CPsV infection patterns were significantly different between all the surveyed orchards, and the virus was detected on both orange and clementine trees with an average prevalence of 24% and 15%, respectively. Preliminary Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) tests have confirmed the serological results obtained for CPsV and also allowed the detection of two viroids, citrus exocortis viroid (CEVd) and hop stunt viroid (HSVd). These results will help improve citrus virus and virus-like diseases control strategies in the Berkane area.

Keywords

Plant viruses, citrus, Berkane, DAS-ELISA, One-step RT-PCR, bark scaling symptom.

دراسة معدل انتشار فيروسات الحوامض في منطقة بركان

بلعباس زينب، افشثال محمد، بن يزيد جمال، سكوطي ثورية، غلابي نعيمة

ملخص

تشكل الفيروسات التي تصيب النباتات مصدر قلق كبير للمزارعين على المستويين العالمي والوطني. تعتمد فعالية التدابير المتخذة من أجل القضاء على هذه الكائنات الممرضة على الفهم الجيد لإيتيولوجيتهم (étiologie) ولعلم الأوبئة (épidémiologie) الخاص بهم. في هذا السياق، تمت دراسة معدل إنتشار أمراض الحوامض الناتجة عن الإصابة بالفيروسات والكائنات الدقيقة الشبيهة بالفيروسات (بعض أنواع البكتيريات و الفيروسيات)، في منطقة بركان. في هذا الإطار تم أخذ ما مجموعه 277 عينة من أوراق الحوامض من 3 مشاتل و 27 بستان بين 2018 و 2019. تم اختبار هذه العينات ضد أجسام مضادة وحيدة النسيلة محددة لفيروس تريستيزا الحوامض (citrus tristeza virus)، فيروس قوباء الحوامض (citrus psorosis virus)، والبكتيريا Spiroplasma citri وذلك عن طريق استخدام تقنية الاليزا أومقايصة الممتر المناعي المرتبط بالإنزيم-مزدوجة الأجسام المضادة (Double-Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay). أبانت النتائج عن وجود فيروس قوباء الحوامض فقط بالبساتين التي تمت زيارتها بمعدل إنتشار نسبته 18% (277/51). أظهرت النتائج كذلك أن نسبة الإصابة بفيروس قوباء الحوامض تختلف بشكل كبير بين جميع البساتين التي تم رصدها وأن هذا الفيروس يصيب كل من أشجار البرتقال (24%) والكليمنتين (15%). أكدت اختبارات التفاعل العكسي لنسخ البلمرة المتسلسل (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) النتائج التي تم الحصول عليها من قبل بواسطة تقنية الاليزا وكشفت أيضاً عن وجود بعض أشباه الفيروسات، و نخص بالذكر فيروس تشقق قلف الحوامض (citrus exocortis viroid) و فيروس تشقق الخشب (hop stunt viroid) مستساهم نتائج هذه الدراسة في صياغة ممارسات زراعية جديدة من أجل الحد من إنتشار الفيروسات والكائنات الدقيقة الشبيهة بالفيروسات في بساتين الحوامض في منطقة بركان.

الكلمات المفتاحية: فيروسات النباتات، الحوامض، بركان، DAS-ELISA، One-step RT-PCR، عوارض، البثرات القلفية.

Introduction

Les arbres d'agrumes sont sujets aux attaques de nombreux pathogènes d'origine virale ou bactérienne (Meena and Baranwal, 2016). Les agents pathogènes les plus importants sont *Candidatus liberibacter* Jagoueix et al. [*Phyllobacteriaceae*] et citrus tristeza virus [*Closteroviridae* ; *Closterovirus* ; CTV] qui sont associés respectivement aux épidémies du huanglongbing (aussi connu sous le nom de greening) et de la tristeza. Ces pathogènes nuisent incontestablement au développement des arbres d'agrumes (Bové, 2006). Le huanglongbing est classé comme une maladie de quarantaine dans tous les pays du bassin méditerranéen, nécessitant ainsi la mise en place de mesures préventives pour éviter les revers de son invasion (Zemzami, 2016). Quant à la tristeza, maladie présente dans les pays du bassin méditerranéen, elle a été déjà rapportée dans certaines régions agrumicoles marocaines du Loukkos, Souss et Gharb (Afechtal, 2012). Ces deux maladies sont transmises par des pucerons (tristeza) et des psylles (huanglongbing) compliquant ainsi leur contrôle. *Toxoptera citricida* Kirkaldy est le puceron le plus efficace dans la transmission du CTV (Moreno et al., 2008). Quant à la bactérie *C. liberibacter*, ses trois espèces inféodées aux agrumes sont transmises par deux espèces de psylle, *Diaphorina citri* Kuwayama [*Hemiptera* : *Liviidae*] (Alves et al., 2014) ou *Trysoza erytreae* Del Guercio [*Hemiptera* : *Trioziidae*] (Gottwald et al., 2007).

Outre CTV et *C. Liberibacter*, d'autres agents nuisibles, transmis essentiellement par l'opération de greffage et/ou les outils de taille, ont été déclarés présents au Maroc. Il s'agit notamment : (i) du virus associé à la maladie de la psorose, citrus psorosis virus [*Aspiviridae* ; *Ophiovirus* ; CPsV] (Achachi et al., 2015; Achachi and Ibriz, 2015; Afechtal, 2018; Bekki, 2007; Belabess et al., 2019; Bibi et al., 2019; D'Onghia et al., 2002; Mrani et al., 2002), (ii) des deux viroïdes associés à l'exocortis et à la cachexie, respectivement citrus exocortis viroid [*Pospiviroidae* ; *Pospiviroid*; CEVd] et hop stunt viroid [*Pospiviroidae* ; *Hostuviroïde* ; HSVd] (Afechtal et al., 2016; Chapot and Cassin, 1961; Ouantar et al., 2018), et (iii) du phytoplasme associé au stubborn, *Spiroplasma citri* Saglio et al. [*Spiroplasmataceae* ; *Spiroplasma* ; *S. citri*] (Chapot and Cassin, 1961). Ces agents pathogènes ont été rapportés comme responsables de maladies graves sur agrumes (Mannaa et al., 2013; Vernière et al., 2006, 2004).

En dépit des dangers considérables que représentent les phytovirus et les microorganismes similaires aux virus pour l'agrumiculture au Maroc, le nombre de travaux qui leur sont consacrés demeure limité et spécifique à la seule zone du Gharb. De tels bioagresseurs devraient faire l'objet d'une surveillance toute particulière car ils manifestent un fort potentiel destructif pour le patrimoine agrumicole marocain. L'objectif de cette étude est de savoir quelle est la situation actuelle des vergers agrumicoles de la région de Berkane en matière d'infection par les phytovirus et les microorganismes similaires aux virus.

Matériel et méthodes

Sites de collecte des échantillons

Des échantillons de feuilles d'agrumes ont été collectés durant les années 2018 et 2019, dans des pépinières et vergers situés dans la région de Berkane. Au total, 277 échantillons ont été collectés à partir de 30 sites : 3 pépinières (25 échantillons) et 27 exploitations agrumicoles d'âge moyen (entre 5 et 10 ans) et avancé (entre 27 et 65 ans) (252 échantillons). Pour les pépinières, les échantillons ont été collectés sur quatre plants et rassemblés en un seul échantillon composite. Les plants ayant fait l'objet d'échantillonnage ont été choisis aléatoirement. Certains de ces plants avaient des feuilles avec une chlorose internervaire et d'autres étaient asymptotiques. Pour les vergers, le prélèvement a été fait sur des arbres asymptotiques et d'autres manifestants des symptômes qui rappellent ceux causés par les phytovirus et les microorganismes similaires aux virus (**Figure 1**). Les échantillons collectés ont été placés dans une glacière et amenés au laboratoire de protection des plantes de l'INRA du Qualipôle de Berkane pour analyse.

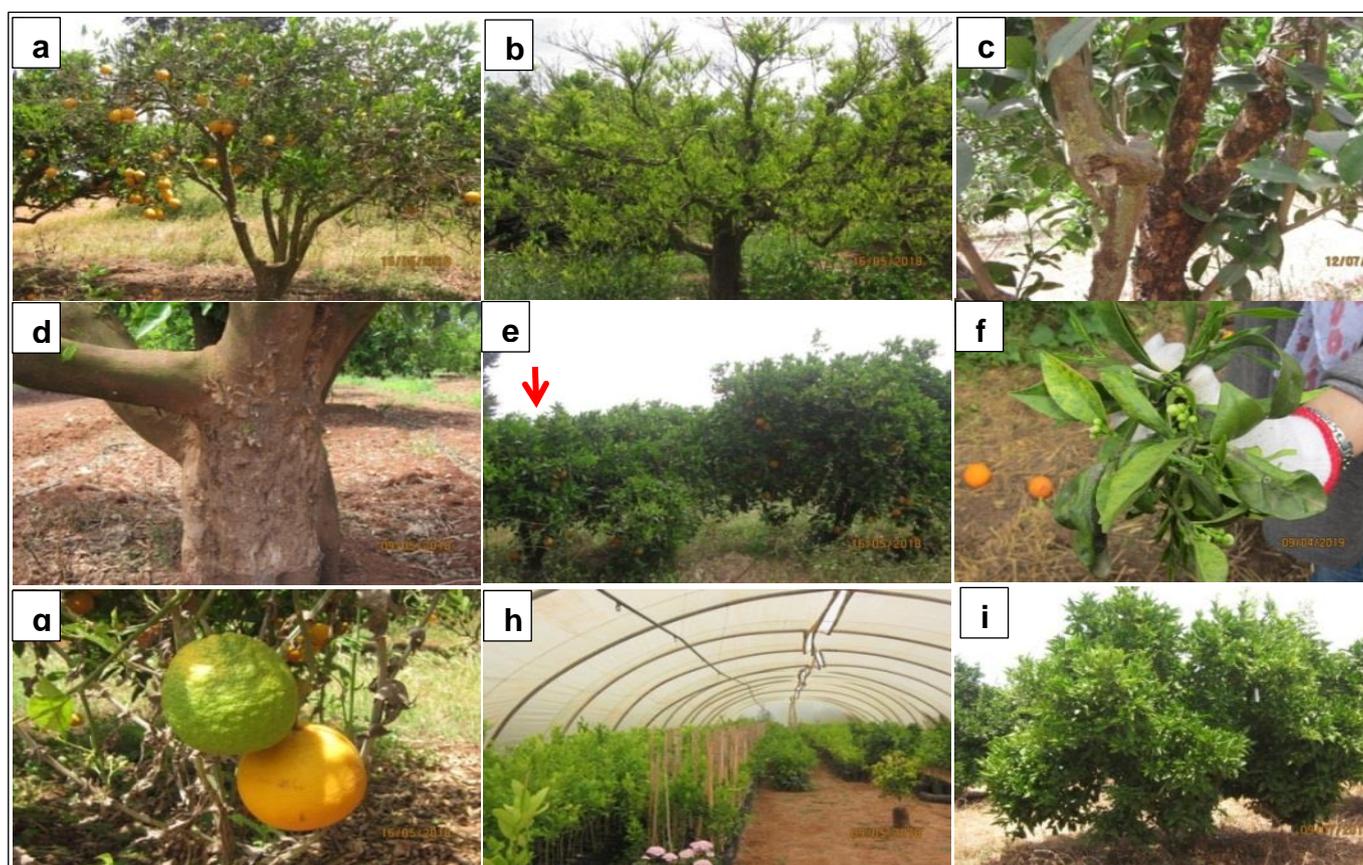


Figure 1 : Types de symptômes observés lors des prospections de terrain réalisées en mai et juillet 2018 dans certains vergers agrumicoles et pépinières situés dans la région de Berkane. **(a)** défoliation de l'arbre ; **(b)** défoliation de l'arbre et épinastie des feuilles ; **(c)** écaillage de l'écorce des branches ; **(d)** écaillage de l'écorce du tronc ; **(e)** nanisme (flèche rouge); **(f)** taches chlorotiques irrégulières sur toute la surface du limbe ; **(g)** fruit avec une écorce rugueuse ; **(h)** plants de pépinière ; **(i)** arbre asymptotique.

Détection du CTV, CPsV et *S. citri* par DAS-ELISA

Les échantillons collectés ont été testés contre des anticorps monoclonaux spécifiques pour CTV (Sediag, France), *S. citri* (Sediag, France) et CPsV (Agritest, Italie) en utilisant la technique Double Antibody Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA). Les tests DAS-ELISA ont été effectués selon les instructions des fournisseurs (Sediag, France et Agritest, Italie). Chaque échantillon a été testé en deux réplicats et chaque plaque ELISA comprenait une colonne entière pour le blanc du lecteur ELISA (eau distillée stérile ou tampon d'extraction) et deux puits pour chaque contrôle (témoin sain, contrôle positif et tampon d'extraction). Après addition du substrat p-nitrophénol phosphate, la lecture des plaques a été faite après 1h et 2h d'incubation à 37°C, à 405 nm avec le lecteur Elx808 (Biotek, USA). Une absorbance corrigée¹ a été calculée pour chaque puits en se référant aux valeurs du blanc. Les échantillons dont la moyenne de densité optique (DO) des deux réplicats est inférieure à S1², supérieure à S2³, et comprise dans l'intervalle [S1 ; S2] ont été considérés avoir un profil d'infection respectivement négatif, positif et indéterminé.

Extraction des acides nucléiques totaux (TNA)

Pour chaque échantillon de feuilles, les TNA ont été extraits à partir de 100 mg de matériel végétal (pétiole, nervure principale et/ou écorce). Les tissus végétaux ont été broyés dans 1 ml du tampon d'extraction contenant 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8) et 2% de β -mercaptoéthanol. Les broyats de plante ont été incubés au bain-marie à 65°C pendant 30 min et centrifugés pendant 5 min à 14.000 rpm. Le surnageant a été transféré à un nouveau tube de 1,5 ml et un volume équivalent de chlorophorme-alcool isoamylique (24 :1) a été ajouté. Le mélange a été vortexé pendant 5 secondes et centrifugé pendant 1 min à 14.000 rpm. Les TNA ont été précipités de la phase aqueuse avec 0,7 volume d'isopropanol froid, incubés pendant 15 min à -20°C et centrifugés pendant 10 min à 14.000 rpm. Le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70% froid et centrifugé pendant 5 min à 14.000 rpm. Après séchage, le culot a été remis en suspension avec 100 μ l d'eau distillée stérile.

Détection du CPsV, CEVd et HSVd par One-Step RT-PCR

Les échantillons analysés ayant un profil d'infection CPsV, par DAS-ELISA, de type « indéterminé » et « positif » et quelques échantillons négatifs (8) ont été testés par RT-PCR. Le test a été réalisé en utilisant le Kit One-step RT-PCR (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fournisseur, avec 1 μ l d'extrait de TNA dans un volume final de 10 μ l. Le test a été mis en œuvre avec le couple d'amorces Ps66/Ps65 spécifique à un fragment de 430 pb du gène de la protéine de capsid (CP) du CPsV (Martin et al., 2004). La RT-PCR consiste d'abord à une étape de transcription inverse à 50°C pendant 30 min, pour la synthèse de l'ADN complémentaire suivie par une amplification comportant une étape d'activation initiale de la PCR à 95°C pendant 15 min, et une série de 35 cycles. Chaque cycle comporte une étape de dénaturation à 94°C pendant 45 s, une hybridation des amorces à 59°C durant 1 min et une élongation à 72°C pendant 1 min. La réaction PCR a été achevée avec une extension finale à 72°C pendant 10 min. Des tests préliminaires de détection de CEVd et HSVd ont été

¹ Absorbance corrigée : absorbance brute – absorbance du substrat ou d'eau distillée stérile (zéro optique).

² S1 : Moyenne des absorbances corrigées du témoin sain \times 2.

³ S2 : Moyenne des absorbances corrigées du témoin sain \times 3.

réalisés sur 5 échantillons moyennant les couples d'amorces HSVd-F/HSVd-R et CEV-F/CEV-R spécifiques respectivement des fragments 302 pb et 371 pb (Wang et al., 2009). Les conditions de retro-transcription et de PCR sont similaires à celles décrites pour CPsV. La température d'hybridation (T_m) des amorces était de 53°C pour les deux viroïdes.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées selon le logiciel *R Studio version 3.0.3*. (The R Core Team, 2010). Les p-value inférieures à 0,05 ont été considérées statistiquement significatives.

Résultats

Virus et microorganismes similaires aux virus présents dans les vergers agrumicoles de la région de Berkane

Sur l'ensemble des échantillons collectés (277), 275 ont été testés pour CTV et *S. citri* et 277 ont été testés pour CPsV. Pour les trois pathogènes recherchés par DAS-ELISA, seul CPsV a été détecté. Trois catégories d'échantillons ont été identifiées pour ce virus : (i) échantillons négatifs (216/277), (ii) échantillons ayant un profil d'infection indéterminé (36/277), et (iii) échantillons positifs (25/277) (**Figure 2**). Des tests préliminaires par RT-PCR ont révélé la présence de CEVd (3/5) et HSVd (3/5) dans certains vergers agrumicoles dans la région de Berkane (données non communiquées).

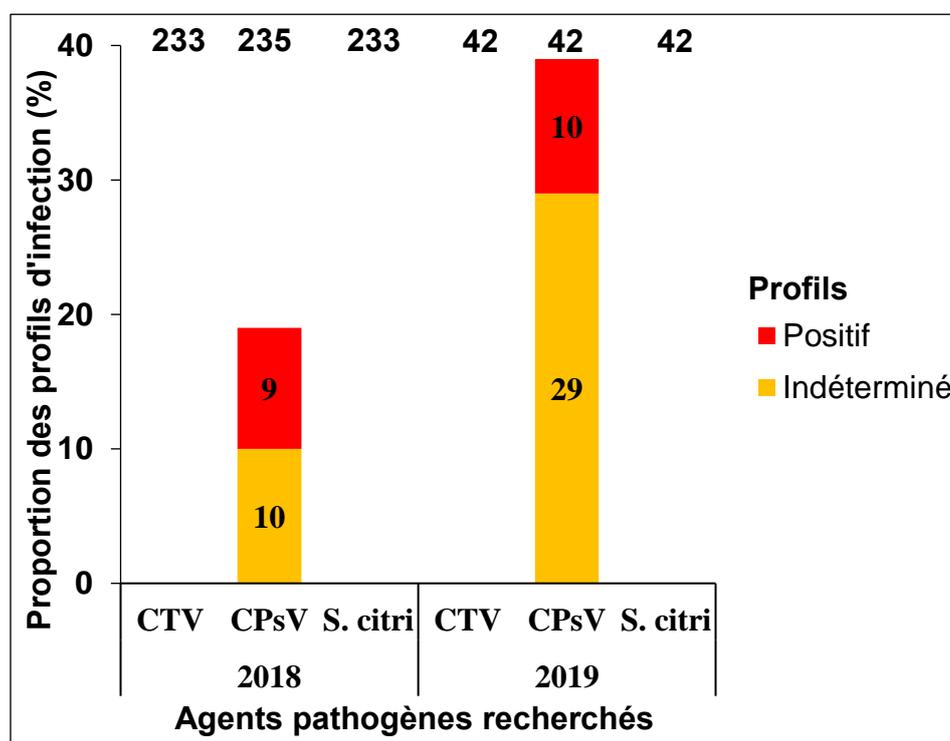


Figure 2 : Résultats des tests de screening par DAS-ELISA réalisés pour les échantillons de feuilles d'agrumes collectés en 2018 et 2019 dans la région de Berkane. Les pourcentages d'infection sont relatifs au nombre total des échantillons testés indiqués en haut de chaque histogramme.

Comparaison de la détection du CPsV par DAS-ELISA et One-Step RT-PCR

Sur les 49 échantillons testés par RT-PCR, un total de 21 s'est révélé positif (**Figure 3**). Il s'agit en fait de 38% (8/21) et 65% (13/20), respectivement des échantillons des catégories « indéterminé » et « positif ». L'analyse par RT-PCR a confirmé le profil d'infection des 8 échantillons testés de la catégorie « négatif » par DAS-ELISA. Sur la base de ces résultats, tous les échantillons ayant un profil d'infection DAS-ELISA « indéterminé » devraient subir un second test par RT-PCR pour confirmer leurs profils d'infection. Ainsi, nous pourrions en déduire que CPsV est présent dans les vergers agrumicoles dans la région de Berkane avec une prévalence de 18% (51/277).

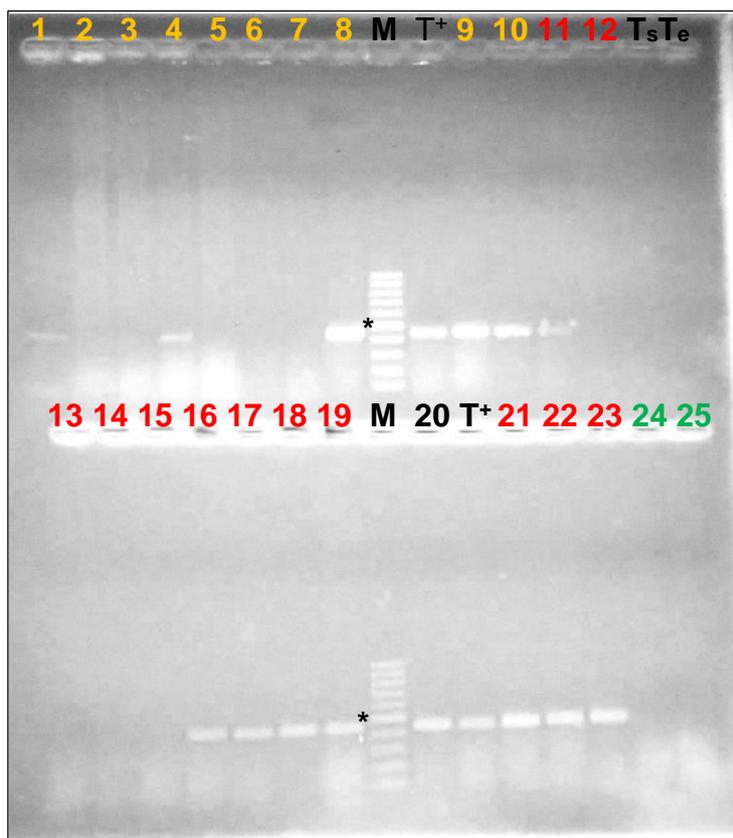


Figure 3 : Produits d’amplification RT-PCR générés avec le couple d’amorces Ps66/Ps65 spécifiques à la détection du CPsV. Profils d’infection DAS-ELISA : 1-10 « indéterminé », 11-23 « positif », 24-25 « négatif ». M : marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 100 bp DNA Ladder (thermo scientific, Lituanie) et l’étoile noire indique un fragment de 500 pb). Les contrôles sont : échantillon infecté par CPsV (T⁺) ; échantillon non infecté (T_s) ; mélange réactionnel sans TNA (T_e).

Profil d’infection par CPsV et espèces d’agrumes étudiées

Le suivi du CPsV dans les vergers agrumicoles dans la région de Berkane a révélé que les échantillons de clémentinier et d’oranger présentaient les deux profils d’infection décrits précédemment pour CPsV. Quant aux échantillons de citronnier, ils ont réagi négativement au test ELISA (**Figure 4**). Nos résultats révèlent que les profils d’infection par CPsV ne sont pas significativement différents entre l’oranger et le clémentinier (test de χ^2 , p-value = 0.075). Autrement dit, CPsV pourrait être détecté aussi bien dans des vergers de clémentinier que d’oranger.

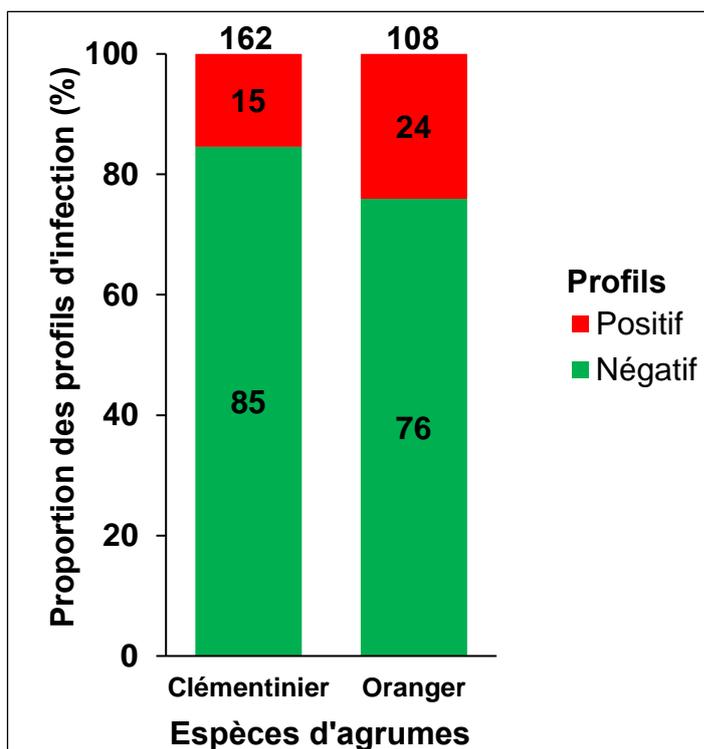


Figure 4 : Répartition des profils d'infection par CPsV selon l'espèce d'agrumes étudiée (Test de χ^2 , p-value (clémentinier-oranger) = 0.075). Les pourcentages d'infection sont relatifs au nombre total des échantillons testés indiqués en haut de chaque histogramme.

Profil d'infection par CPsV et expression des symptômes d'écaillage de l'écorce du tronc et des branches

Dans ce travail de diagnostic, nous nous sommes intéressés non seulement à détecter le CPsV mais aussi à vérifier la relation potentielle qui pourrait exister entre le statut d'infection par ce virus et l'expression des symptômes d'écaillage de l'écorce du tronc et des branches (**Figure 1**) sur les arbres. Notre étude n'a pas mis en évidence de différences statistiquement significatives entre les pourcentages des profils d'infection obtenus chez des échantillons prélevés sur des arbres symptomatiques et asymptomatiques (Test χ^2 , p-value = 0,15) (**Figure 5**). Il est donc difficile de présenter une conclusion précise concernant la présence d'une relation potentielle entre l'expression des symptômes et les profils d'infection obtenus. Autrement dit, l'observation des symptômes d'écaillage n'est pas toujours révélatrice de la présence du virus dans l'arbre et l'inverse est également vrai.

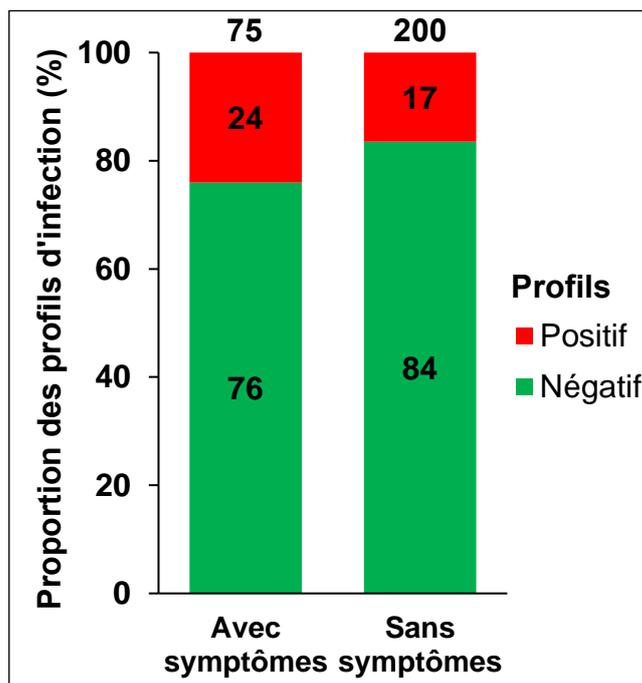


Figure 5 : Répartition des profils d'infection par CPsV selon l'expression des symptômes (Test de χ^2 , p-value = 0.15). Les pourcentages d'infection sont relatifs au nombre total des échantillons testés indiqués en haut de chaque histogramme.

Discussion

La présente étude révèle que sur les trois agents phytopathogènes recherchés, seul CPsV a été détecté par DAS-ELISA dans les échantillons d'agrumes collectés durant les années 2018 et 2019 dans la région de Berkane. Les tests de RT-PCR ont permis de confirmer les résultats obtenus par DAS-ELISA pour CPsV et ont également révélé la présence du CEVd et HSVd dans certains vergers. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par Afechtal (2018) qui indiquent que : (i) CPsV est le virus le plus prévalent dans les vergers agrumicoles de Moulouya, (ii) CTV est absent dans toutes les zones agrumicoles du Maroc à l'exception du Loukkos, (iii) les viroïdes CEVd et HSVd sont présents dans la zone de Moulouya, et (iv) l'incidence de *S. citri* est très faible dans cette zone (variation entre 2,7% et 15%) limitant ainsi la probabilité de sa détection.

La comparaison des résultats obtenus par DAS-ELISA avec ceux obtenus par RT-PCR indiquent que nous ne pourrions pas se limiter à l'un des seuils S1 ou S2 dans l'interprétation des résultats du test DAS-ELISA spécifique à la détection du CPsV. En effet, étant donné que nous cherchons à identifier les cas de maladie, nous estimons qu'il est important de ne pas les occulter (donc de réduire le nombre des échantillons faussement négatifs que nous pourrions avoir avec le seuil S2 qui est le plus utilisé dans ce genre d'études). Ainsi, nous pensons qu'il serait plus judicieux par la suite, de continuer à travailler avec les trois profils d'infection du test DAS-ELISA et d'analyser systématiquement les échantillons de la catégorie "indéterminée" par RT-PCR pour confirmer leurs profil d'infection. Cette conclusion tire sa force des résultats de la présente étude et de ceux de certains travaux antérieurs qui se basaient uniquement

sur le seuil S2 du test DAS-ELISA pour distinguer entre les échantillons négatifs et positifs (Achachi et al., 2015; Djelouah et al., 2000; Garcia et al., 1997).

Dans la présente étude, CPsV n'a été détecté que sur les échantillons de clémentinier et d'oranger (non détecté sur citronnier). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que les échantillons de citronnier ont été collectés sur de jeunes plants de pépinières qui pourraient être réellement indemnes ou avoir une faible concentration du virus non détectable par DAS-ELISA. Il est important de signaler que les résultats obtenus dans cette étude révèlent que la prévalence de CPsV (18%) dans la région de Berkane est indépendante de l'espèce d'agrumes analysée. Elle pourrait, en effet, être la même dans des vergers d'oranger ou de clémentinier (Test de χ^2 , p-value = 0.075). Ce résultat corrobore celui de Achachi et al., (2015) qui ont détecté la maladie de psorose dans la région de Moulouya aussi bien sur oranger (Washington Navel) que sur clémentinier (Nules).

Les résultats de la présente étude révèlent également que le profil d'infection par CPsV ne dépend pas de la nature de l'arbre (Test de χ^2 , p-value = 0.15). Ce résultat est en parfaite cohérence avec celui rapporté par Achachi et al., (2015) qui ont détecté le virus à des fréquences relativement comparables sur des échantillons prélevés sur des arbres symptomatiques (17/31) et asymptomatiques (14/31). Les mêmes résultats ont été obtenus par Martin et al., (2004) qui stipulent que le diagnostic de la psorose n'est toutefois pas fiable quand il est basé sur les symptômes car ces derniers pourraient être liés à des causes autres que CPsV (désordres d'origine infectieuse ou génétique). Ce constat a été fondé sur le fait que la détection du CPsV n'a pas été toujours corrélée avec l'observation de symptômes spécifiques sur le terrain (Martín et al., 2004, 2002a, 2002b; Roistacher et al., 2000; Velázquez et al., 2005; Zaneck et al., 2006). Par ailleurs, il est important de souligner que l'écaillage de l'écorce apparaît souvent quand les arbres sont âgés de 12 à 15 ans (Velázquez et al., 2012).

La détection du CPsV dans les vergers agrumicoles marqués par le vieillissement est assez perceptible dans la région de Berkane, chose non surprenante car il a été jusqu'à ce jour impossible de trouver au Maroc des arbres suffisamment âgés (plus de 20 ans) et dépourvus de ce virus (Chapot and Cassin, 1961). Par ailleurs, une corrélation positive a été observée entre l'âge et le nombre des arbres symptomatiques (manifestant l'écaillage de l'écorce) dans un verger d'agrumes. Une étude réalisée en Argentine dans trois vergers agrumicoles a révélé que la proportion des arbres symptomatiques était plus élevée dans les vergers âgés de 27 et 31 ans que dans les vergers âgés de 17 ans (de Zubrzycki et al., 1984). Cependant, des cas d'arbres positifs pour CPsV, âgés de 20 ans ou plus, et sans symptômes d'écaillage de l'écorce ont été également décrits. L'apparition tardive de ce type de symptômes a été considérée comme l'un des facteurs ayant contribué dans la dispersion du CPsV dans la majorité des régions agrumicoles du monde via la propagation involontaire de matériel végétal infecté par les agrumiculteurs qui prétendent que leur matériel de multiplication est indemne du virus (Velázquez et al., 2012). C'est pourquoi, la présence ou l'absence du CPsV ne pourrait être confirmée que par l'indexage biologique (Roistacher, 2004, 1993). Dans la présente étude, CPsV a été également détecté sur des échantillons collectés dans des vergers jeunes (11 ans). Ces résultats posent un ensemble d'interrogations. Ces infections sont-elles le produit : (i) d'un manque d'une bonne hygiène lors des opérations culturales (taille des arbres, collecte des fruits, etc.), (ii) de transmission par un vecteur naturel qui circule dans les vergers

agrumicoles de Berkane, ou plutôt (iii) de la présence du virus dans les plants au moment de la plantation (achat de plants contaminés à la pépinière). La recherche d'éléments de réponse à ses interrogations contribuerait sans doute dans la compréhension de la distribution épidémiologique du CPsV à petite (verger) et à grande échelle (région) et dans la mise en place de stratégies efficaces pour limiter sa dissémination.

Conclusion

L'étude de la prévalence des virus (cas du CTV et CPsV) et des microorganismes similaires aux virus (cas de *S. citri*, CEVd et HSVd) qui circulent dans les vergers agrumicoles dans la région de Berkane a révélé l'infection des arbres de clémentinier et d'oranger par CPsV. Ce virus a été détecté, en effet, dans des arbres d'oranger et de clémentinier, avec et sans symptômes d'écaillage de l'écorce au niveau du tronc et/ou des branches. Des résultats préliminaires ont révélé également la présence des deux viroïdes, CEVd et HSVd dans trois vergers d'agrumes. De nouveaux tests devraient être réalisés pour évaluer la prévalence de ces viroïdes dans les vergers agrumicoles de Berkane.

Conflits d'intérêts : Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

Remerciements

Cette étude a été financée par l'INRA (CRRAO).

Nos remerciements vont à toutes les personnes du CRRAO. Nous citons notamment le chef du Centre, Dr. Hamid Mahyou, et le coordinateur de l'unité de recherche, M. Karim Andich. Nos remerciements vont également aux agrumiculteurs et responsables de production agricole de la région de Berkane pour l'aide inconditionnelle qu'ils nous ont apportés durant la phase de terrain. Sans eux, nous n'aurions pas pu réaliser toutes les prospections. Une pensée particulière à M. Charaf-Eddine Habja (Coopérative El Wahda), M. Nasri Mohammed (ORMVAM), M. Anwar Boussamid (Domaine Oukwiss) et les étudiantes stagiaires Mlle. Maria Rimani et Mlle. Dounia Mbarki (Faculté des Sciences d'Oujda).

Références bibliographiques

- Achachi A. and Ibriz M. (2015). Biological and Molecular Detection of Citrus Psorosis Virus in the Northwest Region of Morocco. In: XIIth International Citrus Congress-International Society of Citriculture. Valencia Spain. 18-23 November 2012. p. 6.
- Achachi A., Jijakli M.H., El Fahime E., Soulaymani A. and Ibriz M. 2015. Detection of Citrus psorosis virus Using an Improved One-Step RT-PCR. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 40. p. 7–13.
- Afechtal M. 2012. Characterization of Moroccan Citrus Tristeza Virus (CTV) isolates and study of their genomic variability after aphid transmission. Doctoral thesis (University of Catania, Italy). 143 pages.
- Afechtal M. 2018. Present status of virus and virus-like diseases of citrus in Morocco. *Integrated Control in Citrus Fruit Crops IOBC-WPRS Bulletin*. 132. p. 215–220.
- Afechtal M., Jamai H., Mokrini F., Essarioui A., Faddoul Z., Sbaghi M. and Dababat A.A. 2016. First Report of Hop stunt viroid infecting Citrus trees in Morocco. *Plant Disease*. 100. p. 1512.
- Alves G.R., Diniz A.J.F. and Parra J.R.P. 2014. Biology of the Huanglongbing Vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Different Host Plants. *Journal of Economic Entomology*. 107. p. 691–696.
- Barthe G.A., Ceccardi T.L., Manjunath K.L. and Derrick K.S. 1998. Citrus psorosis virus : nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *Journal of General Virology*. 79. p. 1531–1537.
- Bekki L. 2007. Etude préliminaire de la psorose des agrumes dans la région de Moulouya. Mémoire de troisième cycle pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Agronomie (Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, Morocco). 88 pages.
- Belabess Z., Afechtal M., Khfif K. and Benyazid J. 2019. Prévalence des phytovirus et virus-like associés aux agrumes au Nord-Est du Maroc. In *Onzième Congrès de l'Association Marocaine de Protection Des Plantes*. Rabat Morocco, 26-27 March 2019. p.135–149.
- Bibi I., Afechtal M., Chafik Z., Bamouh A., Benyazid J., Bousamid A. and Kharmach E. 2019. Occurrence and distribution of virus and virus-like Diseases of citrus in North-Est of Morocco-Moulouya perimeter. In *Onzième Congrès de l'Association Marocaine de Protection Des Plantes*. Rabat Morocco, 26-27 March 2019. p. 119–134.
- Bové J.M. 2006. Huanglongbing : a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*. 88. p. 7–37.
- Chapot H., Cassin J. 1961. Maladies et troubles divers affectant les citrus au Maroc. *Al Awamia*. 1. p. 107–142.

D'Onghia A.M., Djelouah K. and Zemzami M. 2002. Serological characterization of Moroccan sources of Citrus psorosis virus (CPsV). In Proceedings of the Mediterranean Research Network on Certification of Citrus (MNCC). Bari Italy, 1998-2001. p. 81–83.

de Zubrzycki A.D., Zubrzycki H.M. and Correa M. 1984. Determination of the Distribution of Psorosis in Commercial Plantings. In Ninth International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings. p. 165–170.

Djelouah K., Potere O., Boscia D., D'Onghia A.M. and Savino, V. 2000. Production of Monoclonal Antibodies to Citrus Psorosis Virus. In Fourteenth International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings. p. 152–158.

Garcia M.L., Sanchez De La Torre M.E., Dal Bo E., Djelouah K., Rouag N., Luisoni E., Milne R.G. and Grau O. 1997. Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathology*. 46. p. 830–836.

Gottwald T.R., da Graça J.V. and Bassanezi R.B. 2007. Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact. *Plant Health Progress*. 8. p. 36.

Mannaa M., D'Onghia A.M., Djelouah K., Cavallo G. and Valentini F., 2013. Improvement of Detection Methods and Further Characterization of *Spiroplasma citri*, the Causal Agent of Citrus Stubborn Disease in Egypt. *American Journal of Plant Sciences*. 4. p. 245–249.

Martín S., Alioto D., Milne R.G., Garnsey S.M., Laura Garcia M., Grau O., Guerri J. and Moreno P. 2004. Detection of Citrus Psorosis Virus by ELISA, Molecular Hybridization, RT-PCR and Immunosorbent Electron Microscopy and its association with citrus psorosis disease. *European Journal of Plant Pathology*. 110. p. 747–757.

Martín S., Alioto D., Milne R.G., Guerri J. and Moreno P. 2002a. Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathology*. 51. p. 134–141.

Martín S., Milne R.G., Alioto D., Guerri J. and Moreno P. 2002b. Psorosis-like Symptoms Induced by Causes Other Than Citrus psorosis virus. In Fifteenth International Organization of Citrus Virologists Proceedings. p. 197–204.

Meena R.P. and Baranwal V.K. 2016. Development of multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of clostero-, badna- and mandari-viruses along with huanglongbing bacterium in citrus trees. *Journal of Virological Methods*. 235. p. 58–64.

Moreno P., Ambrós S., Albiach-Martí M.R., Guerri J. and Peña L. 2008. Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*. 9. p. 251–268.

Mrani N., D'Onghia A.M., Djelouah K., Zemzami M., Frasher D. and Martelli G.P. 2002. Distribution of Citrus psorosis virus in Morocco. In Fifteenth International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings. p. 358–362.

Quantar M., Bibi I., Chebli B., Ait Friha A.T. and Afechtal M. 2018. Prospection et première caractérisation moléculaire de l'exocortis (Citrus exocortis viroid , CEVd) dans la région du Gharb. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*. 6. p. 14–18.

Roistacher C.N., 1993. Psorosis - A Review. In Twelfth International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings. p. 139–154.

Roistacher C.N., 2004. Diagnosis and Management of Virus and Virus like Diseases of Citrus. In Diseases of Fruits and Vegetables Volume I. p. 109–189.

Roistacher C.N., D'Onghia A.M. and Djelouah K. 2000. Defining Psorosis by Biological Indexing and ELISA. In Fourteenth International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings. p. 144–151.

The R Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 3364 pages.

Velázquez K., Pérez J.M., Alonso M., Batista L., Rodríguez J., Legarreta G., Grau O. and García M.L. 2005. Detection of Citrus Psorosis Virus in Cuba. In Sixteenth International Organization of Citrus Virologists Proceedings. p. 427–428.

Velázquez K., Pina J.A., Navarro L., Moreno P. and Guerri J. 2012. Association of citrus psorosis B symptoms with a sequence variant of the Citrus psorosis virus RNA 2. *Plant Pathology*. 61. p. 448–456.

Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella L., Chabrier C., Bové J.M. and Duran Vila N. 2004. Citrus viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Disease*. 88. p. 1189–1197.

Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella L., Chabrier C., Bové J.M. and Duran Vila N. 2006. Interactions Between Citrus Viroids Affect Symptom Expression and Field Performance of Clementine Trees Grafted on Trifoliolate Orange. *Virology* 96. p. 356–368.

Wang X., Zhou C., Tang K., Zhou Y., Li Z. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal of Plant Pathology*. 124. p. 175–180.

Zanek M.C., Peña E., Reyes C.A., Figueroa J., Stein B., Grau O. and Garcia M.L. 2006. Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *Journal of Virological Methods*. 137. p. 245–251.

Zemzami M. 2016. La menace des maladies émergentes sur l'agrumiculture marocaine et les mesures préventives à mettre en place : cas du greening/HLB. In 10^{ème} Congrès de l'Association Marocaine de Protection des Plantes sur la Gestion des Risques Phytosanitaires liés aux Organismes Émergents. Rabat Morocco, 22-23 November 2016. p. 11.