



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عبد الحميد ابن باديس مستغانم  
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Agronomiques

Thèse en vue de l'obtention de diplôme de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle  
(DOCTORAT/LMD)

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences agronomiques

Spécialité : Productions agricoles et développement agricole durable

Option : Protection des végétaux

Présentée par

**M. ALI AROUS Samir**

## Thème

Rôle des pucerons dans la propagation du virus de la Tristeza (CTV) responsable du dépérissement rapide des agrumes dans le moyen Chlef et identification des biotypes vecteurs des souches virulentes

**Soutenue le :** Jeudi 05 Mars 2020

**devant le jury composé de :**

Président :	DJIBAOUI Rachid	Pr. Université de Mostaganem
Directrice de thèse:	GUENAOUI Yamina	Pr. Université de Mostaganem
Co-Directeur de thèse:	DJELOUAH Khaled	Dr. CIHEAM de Bari. Italie
Examineur :	SETTI Benali	Pr. Université de Chlef
Examineur :	YOUCEF BENKADA Mokhtar	Pr. Université de Mostaganem

**Année universitaire: 2019/2020**

Dédicaces.....	v
Remerciements.....	vi
المأنص.....	vii
Abstract .....	viii
Résumé.....	ix
Liste des Tableaux.....	x
Liste des Figures .....	xi
Liste des annexes.....	xiv
Liste des abréviations .....	xv
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
<b>2 DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Historique des agrumes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Taxonomie .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Importance économique .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 À l'échelle mondiale .....	22
2.3.2 À l'échelle du Bassin méditerranéen .....	23
2.3.3 Importance de l'agrumiculture en Algérie.....	24
2.3.4 Situation dans la plaine de Chlef .....	25
<b>2.4 Les contraintes de l'agrumiculture au niveau de la plaine de Chlef.....</b>	<b>26</b>
2.4.1 Les contraintes abiotiques.....	26
2.4.1.1 Problème du manque d'eau .....	26
2.4.1.2 Sols calcaires.....	27
2.4.1.3 . Contraintes structurelles et économiques .....	27
2.4.1.4 Réchauffement climatique et ses conséquences .....	28
2.4.2 Les contraintes biotiques.....	28
<b>2.5 Intérêt du porte-greffe .....</b>	<b>29</b>
2.5.1 Apport du porte-greffe .....	29
2.5.2 Critères de choix d'un porte-greffe .....	29
2.5.3 Les principaux porte-greffes des agrumes .....	31
2.5.3.1 Le bigaradier .....	31
<b>2.6 Origine de la maladie virale Tristeza .....</b>	<b>32</b>
2.6.1 Histoire de la Tristeza en Algérie .....	34
2.6.2 Caractéristiques de l'agent causal .....	35
2.6.3 Gamme de plantes hôtes.....	36
<b>2.7 Symptômes .....</b>	<b>36</b>
2.7.1 Le dépérissement .....	37
2.7.2 Le bois strié (stem pitting SP) .....	38
2.7.3 La jaunisse des jeunes plants (Seedling Yellowing SY).....	39
2.7.4 Conséquences indirectes du CTV.....	39
<b>2.8 Relation entre les génotypes du CTV et les symptômes.....</b>	<b>39</b>

<b>2.9</b>	<b>Agents de transmission et épidémiologie du CTV .....</b>	<b>40</b>
2.9.1	Transmission du CTV.....	40
2.9.2	Épidémiologie de la Tristeza .....	41
<b>2.10</b>	<b>Les pucerons.....</b>	<b>43</b>
2.10.1	Systématique .....	43
2.10.2	Cycles de développement .....	43
2.10.3	Les principales espèces de pucerons des agrumes.....	45
2.10.3.1	<i>Aphis gossypii</i> (Glover 1877) .....	45
2.10.3.2	<i>Aphis spiraecola</i> (Patch 1934).....	47
2.10.3.3	<i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe 1841) .....	48
2.10.3.4	<i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy 1907) .....	49
<b>2.11</b>	<b>Interaction virus-puceron vecteur .....</b>	<b>51</b>
2.11.1	Transmission non-persistante des virus par les pucerons .....	51
2.11.2	Transmission persistante des virus par les pucerons .....	51
2.11.3	Transmission semi-persistante des virus par les pucerons .....	51
<b>2.12</b>	<b>Problématique taxonomique du genre <i>Aphis</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>2.13</b>	<b>Le génome du CTV .....</b>	<b>55</b>
<b>2.14</b>	<b>Détection et caractérisation des souches de CTV.....</b>	<b>57</b>
2.14.1	Indexation biologique .....	57
2.14.2	Techniques sérologiques .....	58
2.14.3	Analyses moléculaires .....	59
<b>2.15</b>	<b>Diversité génétique du CTV .....</b>	<b>59</b>
<b>2.16</b>	<b>Identification des souches de CTV .....</b>	<b>61</b>
2.16.1	Indexation biologique .....	61
2.16.2	Sérologie .....	61
2.16.3	Techniques moléculaires .....	62
<b>2.17</b>	<b>Altération génomique de la population virale de CTV par la transmission par pucerons .....</b>	<b>62</b>
<b>2.18</b>	<b>Gestion de la maladie de la Tristeza .....</b>	<b>63</b>
2.18.1	Exclusion et quarantaine .....	64
2.18.2	Programmes de certification .....	64
2.18.3	Éradication et suppression .....	64
2.18.4	Tolérance des hôtes.....	65
2.18.5	Protection croisée.....	65
2.18.6	L'amélioration génétique pour la résistance .....	66
2.18.7	Résistance dérivée des agents pathogènes.....	66
2.18.8	Contrôle des pucerons vecteurs .....	67
2.18.9	La vulgarisation et la formation.....	68
2.18.10	Gestion intégrée de la maladie.....	68
<b>3</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1</b>	<b>Description de la zone d'étude .....</b>	<b>69</b>

<b>3.2</b>	<b>Enquête sur la présence et distribution des espèces de pucerons vecteurs de CTV .....</b>	<b>69</b>
3.2.1	Identification des pucerons recensés .....	70
<b>3.3</b>	<b>Identification moléculaire et variations génétiques des différentes populations de pucerons des agrumes recensés.....</b>	<b>73</b>
3.3.1	Extraction d'ADN et PCR .....	75
3.3.2	Clonage .....	76
3.3.2.1	Transformation d' <i>E coli</i> .....	76
3.3.2.2	Isolation du plasmide.....	77
3.3.2.3	Analyse des séquences .....	78
<b>3.4</b>	<b>Enquête sur le CTV dans la zone d'étude .....</b>	<b>78</b>
3.4.1	Détection sérologique .....	81
3.4.1.1	DTBIA (DirectTissueBlotimmuno-assay) .....	81
3.4.1.2	DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay) .....	82
<b>3.5</b>	<b>Détermination des périodes propices à la détection de CTV .....</b>	<b>84</b>
<b>3.6</b>	<b>Caractérisation moléculaire des sources de CTV sélectionnées .....</b>	<b>85</b>
3.6.1	Extraction de l'ARN total (ARNt).....	85
3.6.2	La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) .....	86
3.6.3	PCR.....	86
<b>3.7</b>	<b>Caractérisation moléculaire des sources de CTV par les marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s.....</b>	<b>87</b>
3.7.1	Caractérisation moléculaires des sources de CTV par clonage et séquençage du gène de la capsid P25, et deux marqueurs spécifiques T30POL et VTPOLE .....	88
3.7.1.1	Analyse des séquences .....	89
<b>3.8</b>	<b>Essai d'efficacité de transmission des sources de CTV identifiées pendant l'étude à travers des populations locales d'<i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> des agrumes. ....</b>	<b>90</b>
3.8.1	Obtention de colonies de pucerons indemnes de virus .....	91
3.8.2	Acquisition et transmission de CTV .....	92
<b>3.9</b>	<b>Détection de CTV et caractérisation de sous-isolats inoculés par puceron.....</b>	<b>92</b>
3.9.1	Détection sérologique des isolats de CTV après le passage par puceron.....	92
3.9.2	Caractérisation moléculaires des sous-isolats de CTV après le passage des pucerons .....	93
3.9.2.1	Clonage et séquençage du gène de la protéine de capsid CP25 des sous-isolats inoculés par les pucerons	93
3.9.2.2	Analyse par les marqueurs moléculaires multiples des sous-isolats inoculés par les vecteurs de CTV	93
<b>4</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>94</b>
<b>4.1</b>	<b>Surveillance des espèces de pucerons vecteurs du CTV .....</b>	<b>94</b>
4.1.1	Conclusion .....	99
<b>4.2</b>	<b>Identification moléculaire et variations génétiques des différentes populations autochtones d'<i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> .....</b>	<b>100</b>
4.2.1	Conclusion .....	104
<b>4.3</b>	<b>Enquête du CTV dans la zone d'étude.....</b>	<b>105</b>

<b>4.4</b>	<b>Étude de quelques paramètres épidémiologiques de la maladie de la Tristeza .....</b>	<b>105</b>
4.4.1	Résultats des analyses sérologiques.....	105
4.4.1.1	Les analyses sérologiques par la technique DTBIA (Direct Tissue Blot Immunoassay) .....	105
4.4.1.2	Distribution géographique de la maladie dans la zone d'étude .....	106
4.4.2	Distribution selon les espèces .....	107
4.4.3	Âge des vergers .....	108
4.4.4	Origine du matériel végétal .....	110
4.4.5	Corrélation des plants infectés par rapport aux porte-greffes.....	111
4.4.6	Corrélation des plants infectés par rapport à la période d'échantillonnage .....	113
4.4.7	Conclusion .....	114
<b>4.5</b>	<b>Caractérisation moléculaire des sources de CTV sélectionnés. ....</b>	<b>115</b>
4.5.1	Utilisation de marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s. ....	115
4.5.2	Clonage et séquençage du gène de la capsid CP25 .....	119
4.5.3	Clonage et séquençage du marqueur spécifique aux souches VT (VTPOL) .....	123
4.5.4	Clonage et séquençage du marqueur (T30POL) .....	125
4.5.5	Réactivité de l'isolat SY-1-ALG à l'anticorps monoclonal MCA13.....	128
4.5.6	Conclusions .....	129
<b>4.6</b>	<b>Efficacité de transmission au laboratoire des sources de CTV identifiées durant l'étude par les populations autochtones d'<i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> .....</b>	<b>130</b>
4.6.1	Les variations de la structure génétique du CTV après des essais de transmission du puceron. ....	132
4.6.1.1	Variation de séquences nucléotidiques et polypeptidiques du gène P25 de sous-isolats générés de pucerons vecteurs. ....	132
4.6.1.2	Évaluation de la diversité génétique de sous-isolats de CTV inoculés par pucerons avec les marqueurs moléculaires multiples (M.M.M.s).....	133
4.6.2	Conclusion .....	134
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....</b>	<b>136</b>
	Références bibliographiques .....	139
	Annexes .....	179
	Valorisations scientifiques des résultats obtenus .....	207

# Dédicaces

Je dédie ce travail de thèse

À la mémoire de mon grand père Martyr Bachir

À mon père Foudhil que dieu nous le garde

À ma Mère Fatma

À Ma femme Feyrouz

À mes Garçons

À ma Grande mère Lalia

À mes Frères et Sœurs

## Remerciements

Après plusieurs années d'activités difficiles à la fois sur le terrain et en laboratoire, j'éprouve un réel plaisir à finaliser ce projet de thèse qui m'a permis de découvrir des choses fascinantes et de rencontrer des personnes de grande valeur morale, humaine et intellectuelle. J'ai découvert de nouvelles expériences professionnelles et j'ai appris que les efforts sont toujours récompensés. L'aboutissement de ce travail n'aurait pas eu lieu sans la contribution de plusieurs personnes et institutions que je tiens ici à remercier sincèrement.

Mes premières pensées vont d'abord à Madame la Professeure Yamina Guenaoui, directrice de ma thèse, que je remercie du fond de mon cœur pour la confiance qu'elle m'a accordée et sa disponibilité à diriger cette thèse malgré ses nombreuses charges. Elle a suivi de près la réalisation de mes travaux et sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Merci pour vos précieux conseils et vos critiques constructives. Au-delà de vos enseignements, votre générosité et vos qualités humaines m'ont beaucoup motivé à aller vers l'avant et à évoluer.

Docteur Khaled DJELOUAH, mon co-directeur de thèse, à qui je témoigne toute ma reconnaissance pour son soutien, ses recommandations et encadrement scientifique pour cette recherche. Son soutien moral et ses encouragements m'ont beaucoup motivé pour arriver au terme de cette expérience.

Je remercie Dr Olufemi ALABI, Chercheur à l'université de Texas (Agrilife research and extension, center of Weslaco), pour avoir participé à mon encadrement. Ses compétences et ses conseils m'ont beaucoup aidé lors de mon passage aux USA. Je n'oublie pas Dr Mustapha Zemzami (Domaines agricoles UCP, Maroc) pour son soutien et aide tant morale que matérielle.

Je remercie vivement Professeur Mamoudou SETAMOU, chercheur au centre des agrumes de l'université A&M Kingsville de Texas, pour m'avoir accordé l'occasion de travailler dans ce prestigieux centre dans le cadre du programme d'échanges Borlaug.

J'adresse mes remerciements également à Dr Jong-Won PARK, chercheur bio-informaticien au centre des agrumes de l'université A&M Kingsville de Texas, pour ses conseils et participation aux travaux impliquant les analyses moléculaires.

Je remercie Pr DJIBAOUI Rachid de l'université de Mostaganem qui a bien voulu présider le jury. Je remercie également les professeurs SETTI Benali et YOUCEF BENKADA Mokhtar, respectivement de l'université Hassiba Benbouali de Chlef et l'université Abdelhamid Ibnbadis de Mostaganem pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'être les examinateurs de cette thèse.

Enfin, Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à tous mes ami(e)s et collègues et à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Je leur suis redevable du soutien, assistance et sympathie qu'ils m'ont témoignés.

## المُلخَص

أجريت دراسة واسعة النطاق لفيروس التريستيزا (CTV) المسبب لمرض التدهور السريع على الحمضيات خلال عامي 2016 و2018 على مستوى سهل الشلف، أهم ثاني منطقة لإنتاج الحمضيات في الجزائر من أجل تقييم الوضع الصحي الحالي لمحصول الحمضيات وتحديد أنواع المن المحتمل نقلها للفيروس. تم تجميع العينات من إجمالي 1680 شجرة حمضيات من 93 بستان، وحللت بواسطة اختبار اليزا بالإحتواء المزدوج للفيروس بالأجسام المضادة (DAS- ELISA) واختبار بصمة النسيج النباتي المناعي . (DTBIA) أكدت النتائج وجود الفيروس في 54 عينة بمعدل إصابة يعادل 3.21٪. خضعت بعض العينات المصابة لاختبارات جزيئية إضافية من أجل التوصيف الجزيئي لفيروس التريستيزا باستخدام تسلسل النيكلوتيدات للمؤثر CP25 و تقنية العلامات الجزيئية المتعددة (M.M.M.s) والتي أبرزت وجود عزلة لسلالة فيروسية شرسة (VT) في المنطقة بالإضافة إلى تواجد سلالات معتدلة (T30) على نطاق أوسع، وهذه الأخيرة هي السائدة في حوض الشلف كما هو الحال في سهل المتيجة والتي تُظهر 99٪ من التشابه مع سلالات فيروس التريستيزا الإسبانية المعتدلة. في حين أن حصر أنواع حشرة المَن خلال نفس الفترة أظهرت وجود اثنين من ناقلات فيروس التريستيزا الهامة وهي *Aphis gossypii* (Glover) و *Aphis spiraecola* (Patch)، كما أنه لا يوجد دليل على وجود ناقلات الأمراض الرئيسية *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy). وفي نفس السياق فقد أظهر التعرف الجزيئي لأنواع المن باستخدام العلامة الجين الميتوكوندري السيتوكروم أوكسيداز mtCOI موثوقته العالية على التحديد الدقيق لأنواع المن.

أظهرت التجارب المخبرية لاختبار قدرة حشرات المن المحلية على نقل سلالات فيروس التريستيزا المكتشفة أثناء الدراسة أن العزلة المعتدلة فقط هي التي يمكن نقلها بواسطة *A. spiraecola* و *A. gossypii* بمعدل 8٪ و 11٪ على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، لم تظهر تحاليل النيوكليوتيدات ل CP25 ونتائج تحليلات M.M.M.s للعزلات الفرعية المشتقة من حشرات المن تغيرات جينية مقارنة بتلك المعزولة من الأبوين. إن وضعية مرض التريستيزا في منطقة الدراسة والذي يبدو أنه أخذ الشكل الوبائي، والاكتشاف الجديد لسلالة خبيثة ينتمي إلى تنتمي إلى مجموعة ال VT في سهل الشلف هو مصدر قلق لمزارعي الحمضيات في الجزائر ويتطلب التنفيذ السريع لخطة عمل من قبل مصالح الصحة النباتية تركز على المراقبة المستمرة للسلالات الفيروسية الخبيثة، ومكافحة ناقلات الأمراض والقضاء على البؤر الأولية من أجل تجنب انتشار الوباء نحو المناطق الغير المصابة.

الكلمات الدالة: الحمضيات، حشرة المن، سهل الشلف، السلالات الخبيثة، IOCTm ، التريستيزا

## Abstract

Following the observation of quick decline symptoms associated to CTV infection in several citrus trees located in the Chlef Valley, the second most important area of citrus cultivation in Algeria, a first survey to assess the status of this epidemic disease and to identify the potential aphid's vectors was carried out. The survey of CTV was performed every year during the blossom period from March to May in 2016, 2017 and 2018, on a total of 1680 citrus trees belonging to 93 commercial orchards. The collected samples were tested by Direct Tissue Blot ImmunoAssay (DTBIA) analysis and by the Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay DAS-ELISA technique. The obtained results showed that 54 trees were identified as being infected with CTV, corresponding to an infection rate of 3.21% throughout the studied area. Further molecular investigation was performed on some local CTV sources to determine the genotype associated with the CTV isolates detected in the study area, using multiple molecular markers technique M.M.M.s and CP25 sequencing. The results showed the presence of the T30 and VT genotypes. This outcome allowed confirmation of the presence of a virulent strain belonging to the VT genotype. The other CTV isolates were similar to those from the Mitidja region, which showed 99% nucleotide identity with the Spanish mild CTV isolate. Aphid's monitoring carried out during the same period had highlighted the occurrence of two important CTV vectors, which are; *Aphis gossypii* (Glover) and *Aphis spiraecola* (Patch), however no evidence of the presence of the major vector *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy). Molecular identification using mtCOI marker showed a high reliability to resolve taxonomic ambiguity among aphid species at juvenile stages. Natural CTV dissemination has been evaluated by aphid transmission trials in the laboratory, the experiment had shown the ability of *A. gossypii* and *A. spiraecola* to transmit moderate isolates belonged to the T30 group, with a transmission rate of 11 and 8% respectively. In contrast, the virulent isolate affiliated to the VT group was not transmissible by both aphid species. Furthermore, post molecular analysis through M.M.M.s and CP25 sequencing of CTV sub-isolates after aphids' passage did not shown any significant genetic alteration in comparison to the parental isolates. The epidemic status of Tristeza disease and the new detection of a virulent strain belonging to the VT genotype in the Chlef Valley is a matter of concern for Algerian citrus growers. This situation requires a rapid implementation of a plan of action by phytosanitary services, based on the continuous surveillance of virulent strains of the virus, its aphid vectors and the eradication of primary foci in order to avoid spread to the virus-free areas.

Keywords. Citrus, CTV, Aphids, Chlef Valley, virulent isolates, mtCOI

## Résumé

L'observation de symptômes de dépérissement rapide sur arbres d'agrumes, associés au virus de la Tristeza (CTV) dans la Vallée de Chlef, l'une des principales zones de production d'agrumes en Algérie, a permis de conduire une étude à grande échelle sur la réalité de cette maladie pendant 3 années consécutives (2016 à 2018). Des prélèvements d'échantillons ont été réalisés sur un total de 1680 arbres d'agrumes répartis dans 93 vergers commerciaux. Ces échantillons ont été analysés par test d'immunofluorescence directe ou méthode DTBIA (Direct Tissue Blot Immuno Assay) et par DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Les résultats ont confirmé la présence du virus dans 54 arbres ce qui représente un taux d'infection de 3,21% dans la zone étudiée. Certains échantillons de ces sources locales de CTV ont fait l'objet de tests moléculaires complémentaires pour déterminer l'identité des génotypes associés aux isolats de CTV qui se propagent désormais dans la région. La caractérisation réalisée à l'aide de différents marqueurs moléculaires a permis d'identifier les génotypes T30 et VT, le génotype VT étant considéré comme une souche virulente du CTV. Les autres isolats de CTV ont été apparentés à ceux précédemment détectés dans la plaine de la Mitidja, montrant 99% de similarité nucléotidique avec un isolat modéré du CTV présent en Espagne. La surveillance des pucerons vecteurs a permis de confirmer la présence constante des deux espèces, *Aphis gossypii* (Glover) et *Aphis spiraecola* (Patch). L'espèce *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) dont le rôle est important dans la transmission des souches virulentes, n'a pas été détectée dans notre étude.

Nous avons aussi montré l'utilité du gène mtCOI comme marqueur moléculaire distinguant différentes espèces de pucerons au stade juvénile. Un essai de transmission d'isolats de CTV identifiés dans la zone d'étude, par le biais des espèces de pucerons locales réalisé dans des conditions contrôlées a montré que seul l'isolat modéré est transmissible par les deux espèces *A. spiraecola* et *A. gossypii* avec un taux de 8 et 11% respectivement. Dans les conditions expérimentales de notre étude, les souches virulentes n'ont pas été véhiculées par ces 2 espèces. L'alignement multiple des séquences nucléotidiques du gène CP25 et les résultats des analyses M.M.Ms des sous-isolats dérivés des pucerons vecteurs n'a pas montré d'altérations génomiques comparativement à ceux des isolats parentaux. La situation liée à la maladie de la Tristeza qui pourrait encore s'aggraver avec la découverte, dans la Vallée de Chlef, d'une souche virulente appartenant au génotype VT constitue un sujet d'inquiétude pour tous les agrumiculteurs d'Algérie. Elle nécessite la mise en œuvre d'un plan d'actions par les services phytosanitaires basé sur une surveillance continue des souches virulentes du CTV, de ses pucerons vecteurs et l'éradication des foyers primaires afin d'éviter la propagation vers les zones indemnes.

Mots clés : CTV, agrumes, pucerons, plaine de Chlef, virulent, mtCOI

## Liste des Tableaux

Tab1. Caractéristiques des porte-greffes importants d'agrumes (Castle <i>et al.</i> , 2015) .....	31
Tab2. Les phytovirus et modes de transmission par pucerons (Astier <i>et al.</i> , 2001) .....	53
Tab 3. Indexage du CTV par Garnsey <i>et al</i> (1991). .....	57
Tab4. Liste des vergers ayant servi à l'observation et au prélèvement d'échantillons. ....	70
Tab 5. La clé d'identification des pucerons d'agrumes (Blackman et Eastop, 2006). ....	72
Tab 6. Détails des séquences COI obtenus de la base de données NCBI .....	74
Tab 7. Vergers prospectés durant l'enquête de dépistage du CTV .....	80
Tab8. Les sources de CTV détectées dans la zone d'études et sélectionnées pour caractérisation moléculaire.....	85
Tab 9. Les amorces oligonucléotidiques et leurs positions génomiques utilisées dans la technique des marqueurs moléculaires multiples (M.M.M.s) (Hilf <i>et al.</i> , 2005). ....	87
Tab 10. Les séquences nucléotidiques de références récupérées du (NCBI GenBank) correspondant aux marqueurs T36CP, T30POL et VTPOLE .....	90
Tab 11. Sources de CTV sélectionnées pour les essais de transmission.....	91
Tab 12. Taux d'infestation des pucerons par espèce dans les différents vergers prospectés.....	97
Tab 13. Numéros d'accession NCBI GenBank des séquences de nucléotides (mtCOI) des populations de pucerons étudiées.....	100
Tab14. Comparaison de séquences mtCOI des populations d' <i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> .....	102
<b>Tab 15.</b> Résultats de l'enquête du CTV dans la plaine de Chlef : Taux d'infection .....	105
<b>Tab 16.</b> Situation du CTV/origine des plants.....	110
Tab 17. Situation de CTV par rapport au porte-greffe utilisé.....	111
Tab 18. Attribution de génotypes aux isolats de CTV de la Vallée de Chlef basée sur les analyses M.M.M.s.....	115
Tab19. Numéros d'accession (NCBI GeneBank) attribués aux isolats de CTV sélectionnés.....	119
Tab 20. Matrice des identités de séquences nucléotidiques CP25 par paires .....	120
Tab 21. Matrice des identités de séquences nucléotidiques du marqueur VTPOLE par paires .....	123
Tab 22. Matrice des identités de séquences nucléotidiques du marqueur T30POL par paires .....	126
<b>Tab 23.</b> Alignement partiel de séquences multiples d'acides aminés du CP25 .....	128
Tab 24. Caractérisation des sous isolats de CTV par M.M.M.s après passage par les pucerons vecteurs.....	134

## Liste des Figures

Fig1. Production mondiale en agrumes (2006-2016). (FAOSTAT, 2019).....	22
Fig2. Répartition de la production mondiale des agrumes (tonnes) (FAOSTAT, 2019).....	23
Fig 3. Zones agrumicoles d'Algérie (Sahraoui, 2016).....	25
Fig 4. Production d'agrumes par wilaya (MADRP, 2018).....	25
<b>Fig 5.</b> Distribution de la Tristeza dans le monde (OEPP, 2019).....	33
Fig 6. Shémas du genre <i>Closterovirus</i> . Les noms des genres sont montrés à la droite. BYV, Beet yellows virus (Agranovsky <i>et al.</i> , 1994), CTV, <i>Citrus Tristeza virus</i> (Karasev <i>et al.</i> , 1995); LIYV, Lettuce infectious yellows virus (Klaassen <i>et al.</i> , 1995); SPCSV, Sweet potato chlorotic stunt virus (Kreuze <i>et al.</i> , 2002); GLRaV-3, Grapevine leafroll-associated virus-3 (Ling <i>et al.</i> , 2004). .....	35
<b>Fig 7.</b> Différents symptômes causés par le CTV ; a) déclin d'oranger greffé sur bigaradier ; b : bois strié SP ; c : striure inversée et exsudats gommeuses sous le point de greffe de bigaradier ; d) éclaircissement des nervures chez limettier mexicain sous serre (18-25°C) ; e : feuille en cuillère chez limettier mexicain ; f : rabougrissement chez un jeune plant d'oranger greffé sur bigaradier (spécimen sain droite et spécimen infecté à gauche) ; g : dégâts de bois strié sur rameaux de pamplemoussier ; h : jaunisse de jeunes plants de bigaradier (Afechtal, 2012). .....	38
<b>Fig8.</b> Cycle de développement d'espèce hétérogonique alternant la phase sexuée et la phase asexuée (Blackman, 1975) .....	44
Fig9. <i>A. gossypii</i> (Glover): (A) adulte aptère; (B,C) caractéristiques morphologiques de l'abdomen, des antennes et de fémur postérieur. <i>A. spiraecola</i> (Patch): (D) adulte aptère; (E) colonie etenroulement de feuilles de citrus; (F) caractéristiques morphologiques de l'abdomen, des antennes et de fémur postérieur. <i>T. aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe): (G) colonie; (H, I) caractéristiques morphologiques <i>i</i> : appareil stridulatoire (H); (I) antennes (Afechtal, 2012). .....	49
<b>Fig 10.</b> Caractéristiques de l'aile antérieure et antenne de <i>T. citricidus</i> et <i>T. aurantii</i> (Afechtal, 2012). .....	50
<b>Fig11.</b> Le mode transmission non circulatoire (non-persistante et semi-persistante) et le mode de transmission circulatoire (persistant) (Astier <i>et al.</i> , 2001).....	53
Fig12. Schéma de l'organisation génétique du <i>Citrus Tristeza virus</i> (CTV) montrant les cadres de lecture (ORFs) de chaque gène (Dawson <i>et al.</i> , 2013). .....	56
<b>Fig13.</b> Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) calculé avec la séquence de nucléotides complète d'ARN génomique de 9 isolats de CTV par l'utilisation de 1000 bootstrap. La longueur de ramifications indique les distances génétiques. Les trois grappes obtenues incluent des souches sévères induisant la jaunisse des jeunes plants (SY) et le bois strié sur oranger et pamplemoussier (SP) (T318A, SY568R, NuagA et VT), souches modérées (T30 et T385) et un groupe d'isolats à caractéristiques intermédiaires (T36, Qaha et Mexican) (Moreno <i>et al.</i> , 2008). .....	60
Fig14. Position géographique de la zone d'étude (photo Google Earth®). .....	69
<b>Fig15.</b> Différences morphologiques entre les différents pucerons vecteurs de CTV sous microscope. ....	71
Fig 16. Clé des caractéristiques morphologiques utilisée pour l'identification. A: puceron adulte ailé, B: puceron adulte aptère, C: tubercules frontaux (ft) à la base des antennes, D, E: cauda, F: cornicule; ant=antennes, ca=cauda, co=cornicule, fl=flange, ft=tubercule fontal, M=veine médiane (Liu et Sparks, 2001). .....	71

<b>Fig17.</b> Illustrations de quelques manipulations moléculaires (amplification et clonage) réalisées au laboratoire Agrilife research and extension, Weslaco (Université A&M kingsville, Texas, USA).....	75
<b>Fig 18.</b> Identification des communes de la zone d'étude (Vallée de Chlef).....	79
Fig 19. (A) Schéma d'échantillonnage hiérarchique selon Gottwald et Hughes (2000) ; (B) méthode d'échantillonnage en diagonale. ....	79
<b>Fig 20.</b> Différentes étapes de l'analyse sérologique DTBIA, (a) empreintes ; (b) blocage par BSA ; (c) lecture (Photographie S ALI AROUS).....	81
<b>Fig 21.</b> (a, b et c) : Quelques étapes de l'analyse sérologique par DAS-ELISA ; (d) évaluation des DO par le spectrophotomètre Sunrise™ Tecan et le logiciel Magellan v.7.0™. (Photographie S ALI AROUS) .....	83
<b>Fig 22.</b> Schéma de l'organisation du génome de <i>CitrusTristeza</i> virus. Les flèches indiquent les différents cadres ouverts de lecture (ORFs) et les positions des marqueurs spécifiques selon Hilfetal.,2000. ....	88
Fig 23. Différentes étapes du test de transmissibilité de CTV par les pucerons ; (a et b) : dépôt de pucerons infectieux sur plantes réceptrices ; (c) : élimination de pucerons par insecticide ; (d) : le maintien sous serre.....	91
<b>Fig 24.</b> Photographies associées à <i>Aphis spiraecola</i> en correspondance avec la clé de Blackman et Eastop (2006), (A) : cornicules et cauda de couleur sombre, (B) : cauda avec 6 à 12 soies. ....	94
Fig 25. Photographies associées à <i>Aphis gossypii</i> en correspondance avec la clé de Blackman et Eastop (2006),.....	94
<b>Fig 26.</b> (A) : Feuilles enroulées infestées par <i>Aphis spiraecola</i> , (B) : colonie d' <i>Aphis gossypii</i> .....	95
<b>Fig 27.</b> Localisation géographique d' <i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> dans la zone d'étude. ....	95
Fig 28. Fréquence d'occurrence de <i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> en fonction de dates d'observation. ....	98
<b>Fig 29.</b> Amplifias de PCR (Polymerase chain reaction) (709pb) à travers l'utilisation des amorces universelles : LCO1490F- HCO2198. Le produit PCR visualisé dans un gel agarose 1,5%. Ligne 1 : marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb.....	100
<b>Fig 30.</b> Le Neighbor-Joining (NJ) arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre diverses populations d' <i>A. gossypii</i> , <i>A. spiraecola</i> et de <i>P. persicae</i> collectés dans la Vallée de Chlef sur la base de l'analyse d'un fragment d'ADN de la sous-unité mitochondriale cytochrome oxydase (mtCOI) de 709 pb.....	103
<b>Fig 31.</b> Photos prises lors des prospections .....	105
Fig 32. Répartition des cas positifs du CTV décelés dans la zone d'étude.....	106
Fig 33. Nombre d'arbres d'agrumes infectés par espèce.....	107
<b>Fig 34.</b> Taux d'infection de CTV en fonction de l'âge des vergers.....	108
<b>Fig 35.</b> Évaluation de la concentration du CTV par DAS-ELISA en fonction des dates d'échantillonnage.....	113
Fig 36. Amplifias spécifiques générés par les marqueurs moléculaires multiples M.M.M (T30POL, VTPOL, T36POL et T3K17) à partir les cinq sources locales étudiées, ligne 1 : SY-1-ALG, ligne 2 : NN-2-ALG, ligne 3 : PC-3-ALG, ligne 4 : WN-5-ALG, ligne 5 : PL-6-ALG. Ligne 1 : marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb .....	116
<b>Fig 37.</b> Symptômes de CTV au champ :(A1, A2, A3) évolution chronologique du déclin ; (B) rabougrissement d'un arbre infecté par l'isolat (NN-2-ALG) ; (C) subérification des nervures d'un jeune plant infecté par l'isolat (SY-1-ALG) ; (D) rabougrissement et chlorose d'un arbre infecté par l'isolat (PC-3-ALG).....	118

<b>Fig 38.</b> Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining (NJ) » montrant les relations génétiques du gène de la capsid CP25 des isolats locaux de CTV en comparaison avec certaines souches et isolats de référence. ....	122
<b>Fig 39.</b> Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining (NJ) » montrant les relations évolutives entre les isolats locaux de CTV et les diverses souches et isolats de référence sur la base de l'analyse du marqueur moléculaire spécifique aux souches VT (VTPOL).....	124
<b>Fig 40.</b> (A) Jaunissement de jeune plant infecté par l'isolat SY-1-ALG ; (B) Vieil arbre de clémentinier asymptomatique greffé sur bigaradier infecté par l'isolat PL-6-ALG (C) déclin d'un oranger Navel greffé sur bigaradier. ....	126
Fig 41. Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining (NJ) » montrant les relations évolutives entre les isolats locaux de CTV et les diverses souches et isolats de référence sur la base de l'analyse du marqueur moléculaire spécifique aux souches T30 (T30POL). ....	127
<b>Fig 42.</b> Efficacité de transmission de trois isolats de CTV par les deux biotypes autochtones de citrus <i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> .....	131
Fig 43. Alignement de séquences du gène de la capsid (P25) de l'isolat (PC-3-ALG) en pré-inoculation et les sous-isolats dérivés issus de la transmission par <i>A. gossypii</i> (PC-3-ALG_Ag), et par <i>A. spiraecola</i> (PC-3-ALG_As). La couleur rouge met en évidence le polymorphisme mononucléotidique SNP en position 87 (à gauche) et la séquence d'acides aminés correspondante (à droite). Alignement réalisé par le programme Clustal Omega® .....	132

## Liste des annexes

<b>Annexe 1.</b> Milieu de montage pour pucerons .....	179
<b>Annexe 2.</b> Tampon d'extraction des acides nucléiques totaux (Dellaporta, 1983) .....	180
<b>Annexe 3.</b> Composition des Tampons TE, TAE et gel d'agarose .....	181
<b>Annexe 4.</b> Séquences FASTA du Fragment mtCOI (709pb) des populations d' <i>Aphis gossypii</i> , <i>A. spiraecola</i> et <i>Pterochloroides persicae</i> .....	183
<b>Annexe 5.</b> Séquences FASTA de nucléotides du gène CP (671pb) des isolats locaux de CTV .....	191
<b>Annexe 6.</b> Séquences FASTA de nucléotides du marqueur VTPOL (695pb) des isolats locaux de CTV .....	193
<b>Annexe 7.</b> Séquences FASTA de nucléotides du marqueur T30POL (696pb) des isolats locaux de CTV .....	195
<b>Annexe 8.</b> Comparaison de séquences CP des trois isolats de CTV locaux et les séquences d'isolats de référence	197
<b>Annexe 9.</b> Efficacité de transmission des sources de CTV identifiées durant l'étude par les populations locales d' <i>A. gossypii</i> et <i>A. spiraecola</i> des agrumes .....	204
<b>Annexe 10.</b> Organisation du génome mitochondrial d' <i>A. gossypii</i> .....	205
<b>Annexe 11.</b> Rendement moyen des vergers agrumicoles en Algérie par région .....	206

## Liste des abréviations

µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromètre
A	Adénine
AAP	Période d'accès à l'acquisition
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ag	<i>Aphis gossypii</i>
Ag <sub>CITR</sub>	<i>A gossypii</i> collecté sur <i>Citrus spp</i>
Ag <sub>COUR</sub>	<i>A gossypii</i> collecté sur <i>Cucurbita pepo</i>
Ag <sub>HIBI</sub>	<i>A gossypii</i> collecté sur <i>Hibiscus syriacus</i>
Ag <sub>POIV</sub>	<i>A gossypii</i> collecté sur <i>Capsicum annum</i>
Ag <sub>POMM</sub>	<i>A gossypii</i> collecté sur <i>Solanum tuberosum</i>
APET	AsymmetricPCR ELISA typing assay
APS	AmmoniumPersulphate
ATP	AdenineTriphosphate
B.C.	avant Jésus chris
ARN	Acide ribonucléique
ARNg	Acide ribonucléique génomique
ARNse	Ribonucléase
As	<i>Aphis spiraecola</i>
As <sub>CITR</sub>	<i>A spiraecola</i> collecté sur <i>Citrus spp</i>
As <sub>COUR</sub>	<i>A spiraecola</i> collecté sur <i>Cucurbita pepo</i>
As <sub>HIBI</sub>	<i>A spiraecola</i> collecté sur <i>Hibiscus syriacus</i>
As <sub>POIV</sub>	<i>A spiraecola</i> collecté sur <i>Capsicum annum</i>
As <sub>POMM</sub>	<i>A spiraecola</i> collecté sur <i>Solanum tuberosum</i>
BCIP-NBT	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/Nitrobluetetrazol
BSA	Bovineserumalbumin
BYV	Beetyellowvirus
C	Cytosine
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchloride
CIPV	Convention internationale de protection des plantes
CITR	Agrumes
CLAM	Comité de Liaison de l'Agrumiculture Méditerranéenne
cm	Centimètre
CONC	Concombre
COUR	Cucurbitacées
CP	Protéine de la capsid
CpD	DivergentCPanalogue
CPm	Protéine de la capsid mineure
cRNA	Acide Ribonucléique complémentaire
CTP	CytosineTriphosphate
DAS-ELISA	DoubleAntibodySandwichEnzymeLinkedImmunosorbent
dATP	DésoxyadenineTriphosphate
dCTP	DésoxycytosineTriphosphate

dGTP	DésoxyguanineTriphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
dNTP	DésoxynucleotideTriphosphate
dsRNA	DoublestrandedRNA
DTBIA	Directtissueblotimmunoassay
DTT	Dithiothreitol
dTTP	DésoxythymineTriphosphate
dUTP	DésoxyuracileTriphosphate
EDTA	EthyleneDiaminoTetraAceticAcid
ELISA	EnzymeLinkedImmunsorbentAssay
FAO	Organisation pour l'agriculture et l'alimentation
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical
g	Gramme
G	Guanine
GFP	Greenfluorescentprotein
gRNA	ARN génomique
GLRaV-3	Grapevineleafroll-associatedvirus-3
GTP	GuanineTriphosphate
h	Heure
H <sub>2</sub> O	Eau
HCl	Acidechlorhydrique
HEL	Hélicase
HIBI	Hibiscus
HS	Echantillonnage hiérarchique
HSP70	HeatShockProtein70
IAP	période d'accès à l'inoculation
INPV	Institut National de protection des végétaux
Kb	KiloBase
kDa	Kilodalton
KoAc	Acétate de Potassium
LB	LuriaBertani
LIYV	Lettuceinfectiousyellowsvirus
LMTs	Low-molecular-weightTristezasub-genomic
M	Molaire
MADRP	Ministère de l'agriculture, développement rural et de la pêche
MEGA	MolecularEvolutionaryGeneticsAnalysissoftware
mg	Milligramme
mg/ml	MilligrameperMillilitre
MGB	Minorgroovebinding
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de Magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
M-MLVRT	Moloney-MurineLeukemiavirusReversetranscriptase
MMM	MultipleMolecularMarker
MT	Methyltransferase
N°	Nombre
NaCl	Chlorure de sodium

NaI	Iodide de sodium
nm	Nanomètre
nt(s)	Nucleotide(s)
NTP	NucleotideTriphosphate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OEPP	Organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes
ONTA	Office national des terres agricoles
ORF	OpenReadingFrame
PAbs	Anticorps polyclonaux
PBS	Phosphatebufferedsaline
PCR	PolymeraseChainReaction
pmol	Picomole
PNDA	Plan National de Développement agricole
POIV	Poivron
POMM	Pomme de terre
pb	Paire de base
Pp	<i>Pterochloroides persicae</i>
RdRp	RNAdependentRNAPolemerase
RFLP	RestrictionFragmentLengthAnalysis
RPM	Tour par minute
RT	Température ambiante
RT-PCR	ReverseTranscriptasePolymeraseChainReaction
SDS	Sodium Dodesyl Sulfate
sec	Seconde
sgRNA	Sub-genomique RNA
SQNPI	Sistema di Qualita Nazionale Produzione Integrata
SLS	SodiumLaurylSarcosyl
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression (milieu de culture)
SP	Stempitting (bois strié)
<i>spp</i>	Species
SSCP	SingleStrainConformationPolymorphosim
SSPE	Sodiumchloride/sodiumphosphate/EDTAbuffer
ssRNA	SingleStrandedRibonucleicAcid
STET	SodiumchlorideethylenediaminetetraaceticacidTris
SY	Seedlingyellows (Jaunisse de jeunes plants)
T	Thymine
Tab	Tableau
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-TetramethylEthylenediamine
TNA	Acides Nucléiques Totaux
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane
UTP	UracileTriphosphate
UTR	Région non codante
UV	Ultraviolet
V	Volt
V/V	VolumeparVolume

## 1 Introduction

Les agrumes qui sont originaires des pays du sud-est asiatique, sont connus depuis plus de 4000 ans (Mukhopadhyay, 2004). Ils représentent la première culture au monde (Olivares-Fuster *et al.*, 2003 ; Ayazpour *et al.*, 2011) couvrant une superficie de huit millions d'hectares avec une production de 146.4 millions de tonnes en 2016 (FAOSTAT, 2019). Le genre *Citrus* est le plus important avec 60 espèces dont dix seulement sont cultivées pour la consommation (Webber, 1967). L'agrumiculture se pratique dans 140 pays (CLAM, 2007) dont la Chine, le Brésil et les USA sont les plus importants producteurs. Le Bassin méditerranéen est considéré comme la seconde zone de diversification des agrumes. L'industrie des agrumes représente 60% de la totalité du commerce international (CLAM, 2007). Actuellement l'agrumiculture est confrontée à de multiples contraintes d'ordre biotique d'une part, comme la gombose due aux espèces du genre *Phytophthora* et le virus de la Tristeza (CTV) qui sont actuellement parmi les principales maladies (Roistacher et Da Graça, 2006) et des contraintes d'ordre abiotique d'autre part (manque d'eau, salinité et l'alcalinité des sols...), caractéristiques des régions du Bassin méditerranéen (Snoussi, 2013) qui limitent la production.

L'introduction de la culture des agrumes en Algérie est antécédente à 1830 date du début de la colonisation française ; elle a porté sur environ 2000 plants implantés dans la région de la Mitidja (Larbi *et al.*, 2009). La création de vergers commerciaux est apparue dès le début du vingtième siècle et s'est poursuivie après la deuxième guerre mondiale ; les superficies ont augmenté rapidement si bien que la citriculture est devenue la plus importante culture arboricole du pays (Rebours, 1950, 1966), mais durant la guerre de libération il y a eu un ralentissement qui s'est poursuivi quelques années après l'indépendance- ce qui a réduit le rythme des exportations (FAO, 1996). En 1974, les agrumes représentaient une superficie de 43000 has et une production annuelle de 480 000 tonnes ce qui correspond à 20% de la production agricole, durant laquelle 4000 tonnes ont été exportés (FAO, 1996). Actuellement a superficie représente 65.974 has, soit 6% de la superficie arboricole occupant 0.7% de la SAU (MADRP, 2018). L'agrumiculture est plus particulièrement adaptée aux régions côtières et semi-continentales du pays. Elle est répartie sur treize wilayas (FAO, 1996 ; Bellabas, 2010) ; la Vallée de Chlef représente à elle seule environ 20% de la superficie agrumicole globale, et couvre trois wilayas (Ain Defla, Chlefet Relizane).

La plaine de Chlef, connue pour sa vocation agrumicole, occupe la deuxième place en termes de superficie avec 12.258 has après la Mitidja qui couvre 29.508 has (MADRP, 2018). Cette filière est confrontée à plusieurs problèmes dont l'un des plus importants concerne le virus de la Tristeza (CTV). Ce problème est lié au type de porte-greffes dominant en Algérie qui est le bigradier

(*Citrus aurantium* L.). En Algérie ce porte-greffe doit son succès à sa tolérance au calcaire, à l'alcalinité et la salinité mais surtout à sa résistance à la gommose due au genre *Phytophthora*. C'est la raison pour laquelle les agrumiculteurs algériens continuent de l'utiliser alors qu'il est très sensible au CTV, une maladie encore plus préjudiciable que la gommose. En effet, la combinaison bigaradier/varétés commerciales rendent les arbres sensibles au CTV ce qui entraîne le déclin rapide et la mort des arbres (Yokomi *et al.*, 2018 ; Lacirignola et D'Onghia, 2009 ; Moreno *et al.*, 2008).

Au niveau de la plaine de Mitidja, qui est une zone limitrophe avec la Vallée Chlef ; et à travers une enquête réalisée entre 2009 et 2012, il ressort que l'incidence du CTV dans les vergers commerciaux dans cette région avait atteint 17.6% (Larbi *et al.*, 2015). La maladie a pris un aspect épidémique au niveau de la plaine de la Mitidja ; selon Larbi *et al* (2015) à la suite d'une enquête réalisée entre 2009 et 2012, on a estimé que l'incidence de la maladie dans les vergers commerciaux était de 17.6% ; plus récemment de nombreux cas de déclin ont été observés dans la même région (Laala *et al.*, 2019). Dans la zone de Blida, à la suite d'une prospection réalisée entre 2010 et 2011, la présence de CTV a été confirmée dans 25.8% des échantillons (Belkahla *et al.*, 2013). Le premier signalement du virus de la Tristeza dans la plaine de Chlef date de 2010 (Ali Arous *et al.*, 2016), avec de nombreux cas de dépérissement et autres symptômes caractéristiques observés chez plusieurs variétés d'orangers greffés sur bigaradier. Dans la région d'étude les orangers sont dominants en raison de leur meilleure adaptation aux conditions édaphiques et climatiques de la région (Bellabas, 2010). La propagation de cette maladie qui menace sérieusement l'agrumiculture de cette zone nécessite la recherche de porte-greffes de substitution. Les pieds francs tels que le groupe des citranges, utilisés en Algérie en raison de leur tolérance à la Tristeza sont malheureusement incompatibles avec les conditions édaphiques de la région. C'est pourquoi, on s'attend à une aggravation de la situation, du fait que le virus existe et que ses vecteurs potentiels (pucerons) sont régulièrement observés en vergers d'agrumes pendant les différentes poussées de sève de l'année (Ali Arous *et al.* , 2017).

Dans les conditions naturelles, le CTV est véhiculé par les pucerons selon le mode semi-persistant. Parmi les pucerons vecteurs c'est *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) qui est considéré comme le plus efficace surtout dans la transmission des souches sévères (Lee et Bar-Joseph, 2000 ; Lin *et al.*, 2002 ; Dawson *et al.*, 2015). Cette espèce n'a pas été signalée à ce jour dans le Maghreb, malgré son signalement au Portugal (Ilharco *et al.*, 2005) et dans le nord de l'Espagne (Cambra, 2007). Malheureusement le signalement récent de la présence de la souche sévère du virus, *Poncirus trifoliata* resistance-breaking au Maroc (Afechtal *et al.*, 2018 ) constitue un risque majeur quand

on sait que certains agrumiculteurs algériens se procurent des plants en provenance d'Espagne et du Maroc pour la création de nouveaux vergers.

En Algérie les trois principales espèces de pucerons des agrumes sont : *Aphis gossypii* (Glover), *Aphis spiraecola* (Patch) et *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonsicolombe) (Belkahla *et al.*, 2013 ; Ali Arous *et al.*, 2017 et Labdaoui *et al.*, 2018). Elles ont la capacité de véhiculer les particules virales du CTV (Hilf *et al.*, 2005 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Yokomi *et al.*, 2018 ). Les deux espèces dominantes en vergers algériens sont généralement *A. spiraecola* et *A. gossypii*. Cette dernière semble être la plus efficace (Bar-joseph *et al.*, 1973 ; Roistacher, 1981 ; Yokomi et Garnsey, 1987, Campolo *et al.*, 2014; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Afechtal *et al.*, 2015).

L'identification des espèces d'aphides qui était basée sur les caractéristiques morphologiques a montré ses limites particulièrement pour les individus immatures en raison de leur petite taille et du fait que certaines races ou biotypes n'ont pas ou très peu de différences morphologiques. L'identification précise des pucerons est très utile en agriculture en raison des différences entre les espèces, les biotypes et les souches en termes de sensibilité aux insecticides et de transmission du virus (Eastop, 1977 ; Ebert et Cartwright, 1997 ; Wang *et al.*, 2002 ; Nauen et Elbert, 2003 ; Shigehara et Takada, 2003 ; Lowery *et al.*, 2006). Le génome mitochondrial est particulièrement utilisé en agronomie, comme marqueur génétique direct et non ambigu de la généalogie maternelle et de la structuration géographique au sein d'une espèce (Boursot et Bonhomme, 1986 ; Moritz *et al.*, 1987 ; Simon *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 2015).

Considérant l'impact socio-économique et environnemental qui pourrait découler d'une épidémie de CTV, il nous a paru important de réaliser cette étude dans la plaine de Chlef surtout que la majorité des études, investigations, expertises nationales et internationales réalisées sur la Tristeza en Algérie n'a concerné que la zone agrumicole de la plaine de Mitidja. L'étude est nécessaire pour une meilleure compréhension du statut actuel de cette maladie épidémique dans la plaine de Chlef et son épidémiologie.

L'objectif de l'enquête vise à déterminer essentiellement l'incidence de la maladie et la nature des souches prédominantes, l'identification morphologique et moléculaire des espèces de pucerons locales et l'évaluation de leur degré d'efficacité à transmettre les différentes souches de virus existantes dans la région et les altérations génomiques de post-inoculation possibles chez les souches expérimentées. Le travail peut apporter une aide aux autorités phytosanitaires dans la mise en œuvre d'une stratégie de gestion pratique, efficace et durable contre la Tristeza.

## 2 Données bibliographiques

### 2.1 Historique des agrumes

Le terme agrumes en Latin « *acrimera* » qui signifie aigre, sert à désigner certains fruits appartenant au genre *Citrus* tel que les oranges, les mandarines, les citrons et les pamplemousses (Loussert, 1989). Ils ont originaires des pays asiatiques en particulier la Chine, l'Inde, la Malaisie et la Thaïlande où ils étaient cultivés depuis au moins 3000 ans (Calabrese, 2002 ; Malcolm, 2006). C'est Alexandre le grand qui les a implantés en Afrique du Nord et au Moyen-Orient vers la fin du 4ème siècle avant JC (Malcolm, 2006). Ils ont été également progressivement diffusés dans d'autres zones, comme les États-Unis, le Mexique, le Pérou, le Brésil, le Mozambique et l'Afrique du sud qui répondent aux conditions de la culture (CLAM, 2007). Actuellement plus de huit millions d'hectares d'agrumes sont cultivés dans le monde (FAOSTAT, 2019).

### 2.2 Taxonomie

Les agrumes regroupent les espèces des trois principaux genres botaniques : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella*. Selon le système d'Engler, ils appartiennent tous à la famille des Rutacées qui comporte plusieurs sous-familles dont celle des Aurantioideae qui englobe tous les agrumes (Ortiz, 2002). Celle-ci est composée de deux tribus : Clauseneae avec cinq genres et Citreae avec 28 genres y compris le genre *Citrus* et les cinq genres apparentés : *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* (lime du désert), *Microcitrus* (lime sauvage d'Australie) et *Clymenia* (Blondel *et al.*, 1986). La taxonomie du genre *Citrus* est sujette à controverse puisque deux grandes classifications existent. D'une part, Tanaka (1961) a identifié 156 espèces du fait qu'il considère comme espèce de nombreux hybrides intra- ou interspécifiques qui se multiplient de façon conforme par semis du fait de la polyembryonie. D'autre part Swingle et Reece (1967) n'en a distingué que 16 espèces.

Du point de vue agronomique, les agrumes sont groupés comme suit :

- Les limettiers : *C. aurantifolia* Christm.
- Les bigaradiers : *C. aurantium* L.
- Les citronniers : *C. limon* Burm.f.
- Les pamplemoussiers : *C. grandis* Osbeck
- Les cédratiers : *C. medica* L.

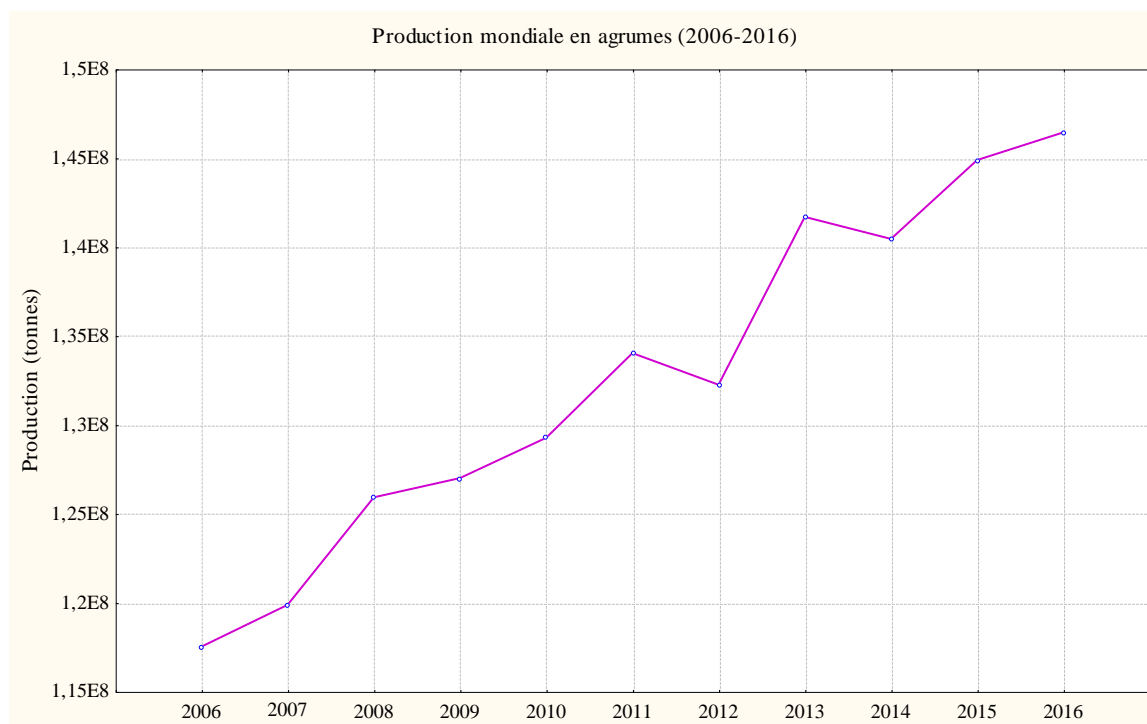
- Les pomelos : *C. paradisi* Macf.
- Les mandariniers : *C. reticulata* Blanco
- Les orangers : *C. sinensis* Osbeck.

L'oranger est l'espèce la plus répandue et la plus cultivée dans le monde pour ses fruits (FAOSTAT, 2019).

## 2.3 Importance économique

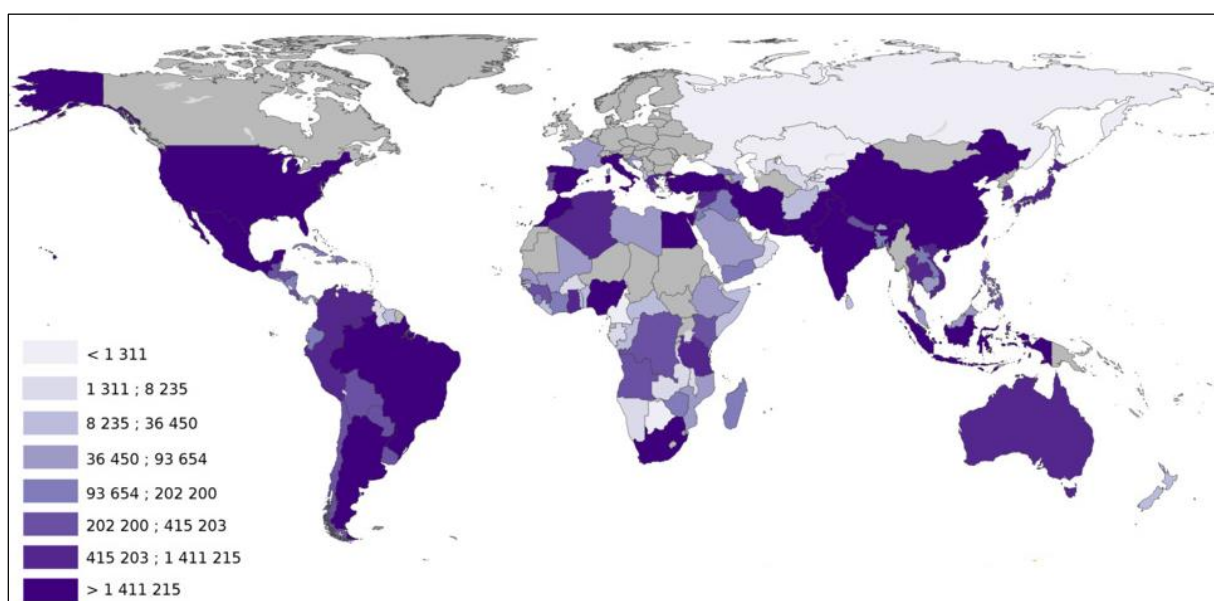
### 2.3.1 À l'échelle mondiale

La culture des agrumes a pris naissance dans les régions subtropicales du continent asiatique (CNCC, 2015). La superficie totale occupée par les agrumes est évaluée à plus de 8 millions d'hectares (FAOSTAT, 2019) répartie sur une zone comprise entre le 40° parallèle de latitude nord et sud qui comprend 140 pays selon la Comité de Liaison de l'Agrumiculture Méditerranéenne (CLAM) en 2007 ; elle constitue la principale culture fruitière dans le monde avec une production annuelle estimée à 146.4 millions de tonnes soit 25% de la production fruitière mondiale (FAOSTAT, 2019) (Fig. 1).



**Fig 1.** Production mondiale en agrumes (2006-2016). (FAOSTAT, 2019)

Les 2/3 de la production sont fournis par le Brésil, la Chine, États-Unis et le Bassin méditerranéen (Griffon et Loeillet, 2000) (Fig. 2). Actuellement, les productions d'agrumes (fruits frais et produits traités d'agrumes) sont réparties selon la FAO en quatre groupes dans le marché mondial. Il s'agit du groupe des oranges, les mandarines puis de celui des pamplemousses et pomelos, et enfin le groupe des citrons et limes. Les oranges constituent la moitié de la production des agrumes suivies du groupe des petits fruits (mandarines, clémentines et tangerines) avec plus de 22%, puis les citrons qui représentent 12%. Le reste de la production est partagé entre pamplemousses et pomélos (FAOSTAT, 2019).



**Fig2.**Répartition de la production mondiale des agrumes (tonnes) (FAOSTAT, 2019).

### 2.3.2 À l'échelle du Bassin méditerranéen

La spécificité de l'espace méditerranéen est caractérisée par trois grands indicateurs : l'originalité de son climat et de sa végétation, la valeur de sa biodiversité et de ses paysages mais aussi la fragilité de ses territoires face aux contraintes du milieu tel que la sécheresse, l'érosion hydrique, la salinisation et le relief escarpé (Souissi, 2013). L'agrumiculture méditerranéenne est à l'image de l'agriculture méditerranéenne qui n'est pas structurée en spécialités. Elle produit 60% de fruits d'agrumes destinés surtout au marché du frais (CLAM, 2007) et apporte sa contribution à raison de 55% au marché international en petits fruits (clémentines et mandarines) (FAOSTAT, 2019).

A titre indicatif, le Bassin méditerranéen a exporté 2,24 millions de tonnes de tangerines, mandarines et satsumas sur un total des exportations de 3,13 millions de tonnes dans le monde

durant la période 2004-2005 (FAOSTAT, 2019). En 2010 la production d'oranges a été estimée à 64 millions de tonnes dont 35,7 millions de tonnes destinés au marché du frais (Gifruits, 2012). Les échanges internationaux d'agrumes sont essentiellement Euro-méditerranéens, c'est dire l'importance de cette zone et du rôle central des échanges dans les enjeux de l'agrumiculture méditerranéenne (Ladaniya, 2008).

### 2.3.3 Importance de l'agrumiculture en Algérie

Les agrumes ont toujours été les fruits les plus populaires en Algérie (FAO, 1996). Ils sont très appréciés pour leur valeur nutritionnelle et organoleptique (FAO, 1996). L'introduction de l'oranger en Algérie est ancienne (Larbi *et al.*, 2009). D'après Mutin (1969) la région de Blida était déjà célèbre pour ses orangers au moment de l'arrivée des Français où le recensement algérien a dénombré dès 1852, 170 ha d'orangers. La variété de clémentine sans pépin originaire d'Oran a été la principale variété cultivée durant plusieurs années, mais des vagues sévères de froid en 1925 ont causé des dégâts considérables au niveau des vergers d'agrumes. À partir de 1940, les orangers ont émergé comme la principale espèce d'agrumes (Alloum et Bencheik El Hocine, 1983). La superficie plantée en agrumes a augmenté rapidement, et depuis l'agrumiculture ne cesse de prendre une place croissante dans la production agricole algérienne (Fig.3). En 1960, la superficie des agrumes était de 37000 ha et participait à 20% dans la valeur de la production agricole (Mutin, 1969). Actuellement les agrumes couvrent une superficie de 65974 ha représentant environ 6% de la superficie totale occupée par l'arboriculture fruitière (MADRP, 2018). En 2016, la production d'agrumes en Algérie a atteint 1.27 millions de tonnes (FAOSTAT, 2019) constituée essentiellement de 72% d'oranges, 16% de clémentines, 4% de mandarines, 7% de citrons et seulement 1% pour les autres variétés (pomelos, pamplemousse ...) (FAOSTAT, 2019). La production d'agrumes alimente le marché national par les variétés précoces sur la période allant de novembre à la fin janvier pour céder la place aux variétés tardives qui alimenteront progressivement le marché jusqu'à mai-juin (Bellabas, 2010). Le total de la production est consommé à l'état frais (97%), le reste est destiné à la transformation principalement en jus d'orange et en produits de confiserie (MADRP, 2018). En Algérie les rendements varient d'une région à une autre, allant de 10 tonnes à plus de 25 tonnes par hectare (annexe 11), ces derniers étant nettement inférieurs à la moyenne internationale, qui est estimée à 30 tonnes par hectare (Bellabas, 2010 ; Navarro, 2015 ; FAOSTAT, 2019). Cette situation est liée à plusieurs facteurs de nature différente qui ont entravé l'évolution de la filière agrumes (climat, vieillissement des vergers, arrachage des vieux arbres, mauvaise gestion de la fertilisation et des problèmes phytosanitaires (Bové, 1995).

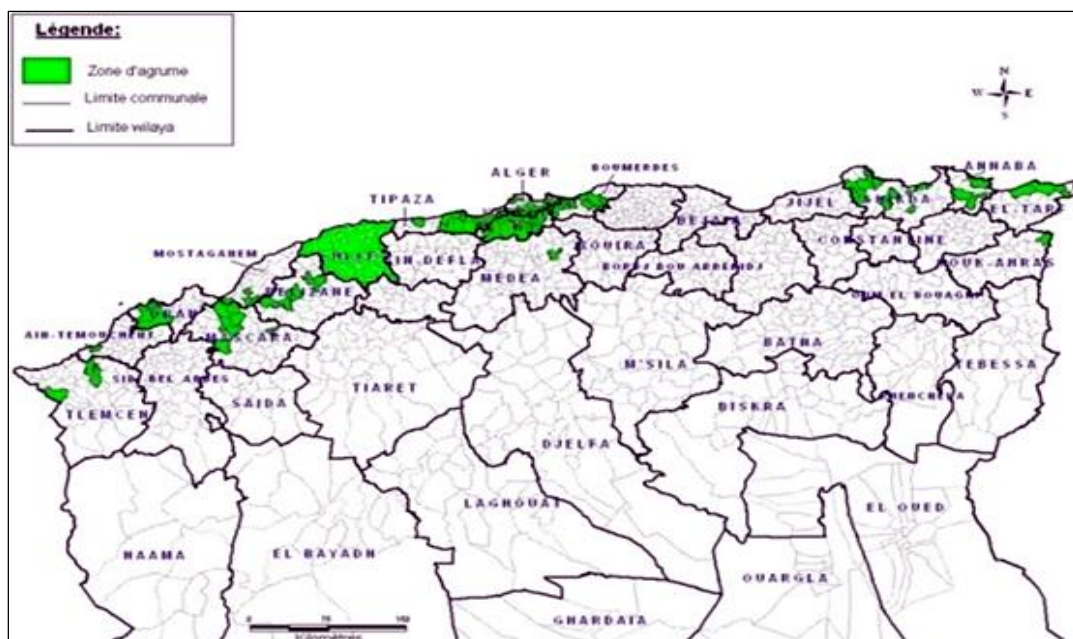


Fig 3. Zones agrumicoles d’Algérie (Sahraoui, 2016).

### 2.3.4 Situation dans la plaine de Chlef

L’agrumiculture dans la Vallée de Chlef occupe une superficie totale de 12.258 ha (MADRP, 2018) et s’étend sur trois wilayas (Ain Defla, Chlef, et Relizane). Elle figure parmi les zones potentielles en agrumes. On trouve les oranges en abondance, spécialement les variétés précoces comme les Navels à côté des clémentines (Kerrouche, 2016 ; DSA, 2018).

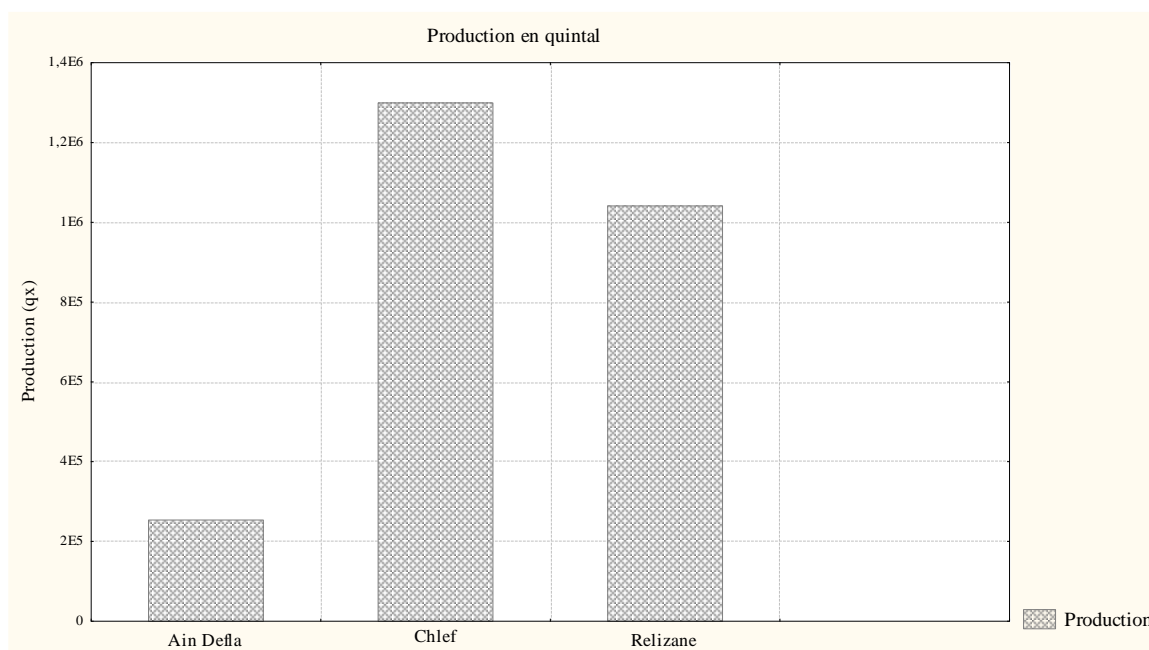


Fig 4. Production d’agrumes par wilaya (MADRP, 2018).

En 2018, la production au niveau de la plaine de Chlef a été estimée à 2.276.755 quintaux (Fig. 4), avec un modeste rendement estimé à 205qx/ha (MADRP, 2018), alors que le rendement moyen par hectare en Espagne, le plus important producteur d'agrumes en méditerranée est estimé à 300 qx/ha (Navarro, 2015). Derrière cette situation, on trouve le déficit hydrique enregistré dans la région depuis plusieurs décennies, le vieillissement des plantations, les opérations d'arrachage et surtout la pression des problèmes phytosanitaires.

## **2.4 Les contraintes de l'agrumiculture au niveau de la plaine de Chlef**

L'agrumiculture est une filière qui est confrontée à des pressions biotiques et abiotiques croissantes et le risque d'extension dans la Vallée de maladies émergentes s'est encore accru par la croissance des échanges commerciaux et les mouvements des personnes. Les principales limites se résument dans les contraintes suivantes.

### **2.4.1 Les contraintes abiotiques**

#### **2.4.1.1 Problème du manque d'eau**

Pour permettre leur croissance végétative et leur développement, les agrumes ont besoin d'eau en qualité et en quantité appropriées, à portée de leurs racines et au bon moment. Durant la saison sèche, un arbre d'agrumes a besoin d'au moins 50 litres d'eau par jour (Haifa, 2014). L'évolution climatique prévoit la réduction de 20 à 30% de la capacité de production dans les pays du Maghreb à cause de la baisse prévue de la pluviométrie et une augmentation de l'évapotranspiration potentielle (ETP) annuelle (FAO, 2008). Les prévisions réalisées sur 30 à 40 ans sont encore imprécises mais pourraient être de l'ordre de -10% pour la pluviométrie et +10% pour l'ETP (Ben Mechlia, 2009). Les besoins totaux d'un verger d'agrumes se situent entre 900 et 1200 mm/an (Haifa, 2014). La pluviométrie moyenne annuelle au niveau de la plaine de Chlef ne dépasse pas 450 mm, alors que les besoins des agrumes en irrigation sont situés entre 450 à 700 mm/an. Selon Boutiba (2019), le déficit en ressources hydriques sera l'enjeu majeur de l'agrumiculture dans les prochaines décades (Boutiba, 2019). La distribution de l'eau du réseau public (ONID) est réalisée à la demande, mais sa disponibilité est limitée par un débit de fourniture insuffisant en période de pointe (Boutiba, 2019).

### 2.4.1.2 Sols calcaires

La plaine de Chlef se distingue surtout par des sols calcaires profonds. Les porte-greffes tolérants à la déficience en fer dans les sols calcaires sont généralement utilisés dans ce cas. Les porte-greffes d'agrumes varient dans leur tolérance à la chlorose ferrique, cela concerne aussi bien les orangers trifoliées sensibles que les espèces d'agrumes les plus tolérantes comme les orangers amers ((bigaradiers) (Ollitraut *et al.*, 1998). Or, pour le cas de la Vallée de Chlef, la quasi-totalité des anciens vergers d'agrumes sont greffés sur bigaradier. C'est seulement depuis une décennie que les agrumiculteurs utilisent de nouveaux portes-greffes tolérants à l'alcalinité et aux sels tels que le *C. Volkameriana* et *C. Macrophylla* (Ali Arous *et al.*, 2017).

### 2.4.1.3. Contraintes structurelles et économiques

Dans la plaine de Chlef, le morcellement des terres présente des inconvénients qui ont des conséquences de plus en plus visibles. Il s'agit de menace réelle dûe à une pression foncière croissante sous l'effet de l'accroissement démographique et à la diversification des usages de la terre (Ali Arous *et al.*, 2013). Le nombre des exploitations et/ou de la superficie cultivée augmente et restent de petites tailles ; ce sont les plus petites qui occupent une part importante de la surface agricole utile. Sur un total de 1.023.799 exploitations, 70% ont une superficie comprise entre 0.1-10ha couvrant 25.4% de la SAU, ce qui représente un réel frein pour l'intensification (Bellabas, 2010). Les litiges et conflits au sein des jeunes exploitations agricoles collectives (EAC) sont apparus très vite au lendemain de la mise en œuvre de la loi n° 87-19 du 8 décembre 1987 représentant une réelle contrainte au développement de la filière agrumes dans la plaine. Ils se sont amplifiés huit ans après la mise en œuvre de la loi 10-03 du 15 Aout 2010 fixant les conditions et modalités d'exploitation des terres agricoles du domaine privé de l'État qui prévoit la conversion du droit de jouissance en droit de concession (ONTA, 2010). Cette nouvelle loi devait en principe répondre aux problématiques créés par la précédente loi et apporter des solutions pour le bien-être des agriculteurs. Elle avait comme objectif de relancer la production et l'investissement et améliorer la sécurité alimentaire du pays. Dans ce contexte, il est important de donner la liberté à chaque concessionnaire de disposer comme il le souhaite de son droit, pour libérer les initiatives et ouvrir les possibilités d'investissement et d'accès au crédit bancaire, sous réserve de respecter des prescriptions réglementaires en matière de lutte contre le morcellement des terres. Par ailleurs à l'insuffisance flagrante de la main-d'œuvre qualifiée suite au vieillissement des agriculteurs s'ajoute le rejet des jeunes pour le métier de la terre (activités professionnelles agricoles). De plus, la part des investissements affectés à l'agriculture en général

et à la filière agrumicole en particulier agrumicole a diminué et reste toujours insuffisant par rapport aux besoins des agriculteurs. S'ajoutent à cela, les rigidités administratives pour l'octroi des crédits bancaires notamment au profit des exploitations du domaine privé de l'État. De plus, les coûts élevés du capital et du travail engendrent une lenteur dans les investissements et un désengagement de la part des agriculteurs.

#### 2.4.1.4 Réchauffement climatique et ses conséquences

Le réchauffement climatique, phénomène d'élévation durable des températures des océans et de l'atmosphère à l'échelle mondiale, constitue la principale forme de changement climatique (PachaurietResinger, 2007). L'une des conséquences du réchauffement climatique en matière de précipitations dans le monde est l'apparition de régions touchées par ce phénomène soit une aridité soit par des inondations. La Méditerranée est susceptible de connaître une baisse des pluies comprise entre -20% et -50% (Mostefa-Kara, 2008 ; Taabni et El Jihad, 2012). L'Afrique du Nord sera particulièrement touchée, ce qui entraînera une baisse des productions agricoles et une augmentation des importations alimentaires qui passeront de 40% à 60% de la consommation (Brunel *et al.*, 2013). L'agrumiculture, culture très exigeante en eau sera parmi les cultures les plus affectées par cette baisse de précipitations. Dans certains pays, des technologies moins utilisatrices d'eau comme le goutte à goutte sont mises en place. En Algérie, dès l'an 2000, la majorité des vergers agrumicoles créée dans le cadre du plan national de développement agricole (PNDA) ont commencé à être irrigués par ce procédé (goutte à goutte), mais les anciennes plantations d'agrumes continuent à être irriguées par submersion, ce qui cause une déperdition d'eau.

#### 2.4.2 Les contraintes biotiques

Les agrumes de la plaine de Chlef sont encore épargnés par plusieurs pathogènes importants tels que *Candidatus liberibacter spp*, l'agent causal du HLB des agrumes, *Phoma tracheiphila* qui cause la maladie du mal secco (dessèchement des agrumes), *Phyllosticta citricarpa*, l'ascomycète exotique, causant la maladie des tâches noires des agrumes, ou encore *Xyllela fastidiosa* subsp : pauca, une bactérie qui cause une maladie sérieuse qui risque d'apparaître et causer de sérieux problèmes endémiques. Le virus de la Tristeza est parmi les pathogènes les plus importants dans le monde causant des dommages économiques considérables et susceptible de répandre l'infestation à de nouvelles zones (Brlansky *et al.*, 1988 ; Roistacher et Da Graça, 2006 ; Yokomi *et al.*, 2018). Des symptômes très caractéristiques associés aux infections par le CTV ont été observés dans la Vallée de Chlef (Ali Arous *et al.*, 2017).

## 2.5 Intérêt du porte-greffe

### 2.5.1 Apport du porte-greffe

Depuis la moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation de porte-greffe résistant est devenue systématique en agrumiculture suite aux dégâts provoqués par la gommose due aux espèces du genre *Phytophthora* sur les agrumes cultivés franc de pied. Les porte-greffes offrent plusieurs avantages parmi lesquels on peut citer :

- 1/ La propagation par greffage sur un porte-greffe qui garantit la production de fruits identiques à la source du bourgeon permettant ainsi des plantations de type uniforme.
- 2/ L'association greffon/porte-greffe qui permet de combiner les meilleures caractéristiques génétiques du fruit (qualité et quantité), avec les traits génétiques les plus forts des racines (adaptation au type de sol, tolérance à la salinité, résistance aux maladies et nématodes...) (Khan et Kender, 2007).

Les porte-greffes doivent :

- 1/ Assurer l'adaptation des agrumes aux différents contextes pédoclimatiques permettant ainsi d'élargir l'aire de culture d'une espèce fruitière hors de sa zone de prédilection (Snoussi, 2013) ;
- 2/ Apporter des résistances à de nombreux agents pathogènes (*Phytophthora sp*, Tristeza, nématodes, mal secco...). Leurs interactions avec les cultivars déterminent également la qualité des fruits qui constituent un facteur de sélection très important, particulièrement pour les productions destinées au marché frais (Snoussi, 2013).

### 2.5.2 Critères de choix d'un porte-greffe

Les qualités essentielles d'un bon porte-greffe peuvent être résumées comme suit :

- ❖ Favoriser une association greffon/porte-greffe tolérante à la maladie à virus de la Tristeza, une bonne résistance à la gommose due à des espèces du genre *Phytophthora* et une adaptation aux sols alcalins et à teneur souvent élevée en sels.
- ❖ Assurer une multiplication et un élevage en pépinière facile et une bonne affinité au greffage avec les principales espèces et variétés commerciales.

Il est évident que le porte-greffe idéal rassemblant toutes ces qualités n'existe pas, mais les critères de sélection des porte-greffes doivent tenir compte d'un certain nombre de contraintes et d'effets sur les variétés en permettant une multiplication à l'identique, ayant un système racinaire adapté et offrant une bonne affinité porte-greffe/variété (Louzada *et al.*, 2008). Le choix d'un porte-greffe doit être basé sur les facteurs limitant les plus importants à la production dans une région donnée, comme le climat local, les conditions du sol, le cultivar et le but de la production de la culture (Castle *et al.*, 2013). Parmi plusieurs autres facteurs majeurs, la combinaison particulière porte-greffe/scion détermine ou modifie la taille du fruit ainsi que ses qualités externes et internes et son aptitude à la conservation (Ladaniya, 2008). Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer plusieurs combinaisons porte-greffes/greffons ainsi que leurs effets sur le rendement et la qualité des fruits (Georgiou, 2002; Forner-Giner *et al.*, 2003; Zekri et Al-Jaleel, 2004; Al-Jaleel *et al.*, 2005; Perez-Perez *et al.*, 2005; Ramin et Alirezanezhad, 2005; Louzada *et al.*, 2008). Sur plusieurs dizaines d'années, plusieurs groupes de recherche ont testé des porte-greffes, des hybrides et des scions de variétés sous une large gamme de conditions expérimentales impliquant des traitements de tolérance aux sols salés, aux sols calcaires et aux sols à pH élevé (Zekri et Parsons, 1989; Lloyd *et al.*, 1990; Chen, 1992; Zekri, 1993; Garcia-Lidon *et al.*, 1998; Ait Haddou Mouloud *et al.*, 2002; Rochdi *et al.*, 2005; Louzada *et al.*, 2008). Hélas, les porte-greffes disponibles comme l'orange trifoliée et ses hybrides, les citranges Carrizo et Troyer résistants à plusieurs stress biotiques tels que le CTV, les nématodes et l'agent causal de la gombose *Phytophthora spp*, sont très sensibles au calcium et aux sels (Davies et Albrigo, 1994). Les porte-greffes appartenant au groupe des citronniers sont tolérants à la salinité mais sensibles au CTV, aux nématodes et à *Phytophthora spp*. De plus, le mandarinier Cléopâtre, qui est très tolérant au sel et à la Tristeza est sensible à *Phytophthora spp*. Pour cela, il est incontestable que l'objectif principal des améliorateurs serait de chercher et de créer de nouveaux porte-greffes cumulant les deux types de tolérance aux stress biotiques liés à la Tristeza, *Phytophthora spp*, Nématodes et aux stress abiotiques telles que la salinité et l'alcalinité.

### 2.5.3 Les principaux porte-greffes des agrumes

Les caractéristiques horticoles importantes des principaux porte-greffes à travers le monde sont présentées dans le tableau 1.

**Tab1.** Caractéristiques des porte-greffes importants d'agrumes (Castle *et al.*, 2015)

PorteGrefre/ Tolérance	Phytophthora	Tristeza	Greening	Exocortis	Cachexie	Nématodes	Salinité	Sécheresse	Gelées	Calcaire	Calibre	Vigueur
Citrange Carrizo	T	T	I	S	T	T	B	I	F	I	E	E
Citrange Troyer	R	T	I	S	T	S	I	B	I	I	I	E
Citrange C35	I	T	I	T	T	R	I	I	S	I	I	E
Orange trifoliée	R	R	?	S	T	S	F	B	F/S	P	F	F/I
Cléopâtre	S	T	S	T	T	S	I	B	I	P	E	F/I
Volkamer	S	T	?	R	T	S	B	F	E	G	E	E
Rough lemon	S	T	?	T	T	S	B	F	E	G	E	E
Macrophylla	R	S	S	T	S	S	B	F	E	G	E	E
Citrumelo swingle	T	T	?	S	T	S	B	I	F	I	E	E
Lime Rangpur	S	T	?	S	S	S	B	F	E	G	E	E
Orange douce	S	T	?	T	T	S	F	I	F	I	I	I
Lime de Palestine	S	T	?	S	S	S	B	F	I	G	E	E
C22 Bitters	R	S	T	T	T	S	I	B	E	I	I	I

Abréviations : B = bonne ; E = élevé ; I = intermédiaire ; F = faible ; G = grand ; TR = très résistant ; R= résistant; S = sensible ; T = tolérant ; P = petit.

#### 2.5.3.1 Le bigaradier

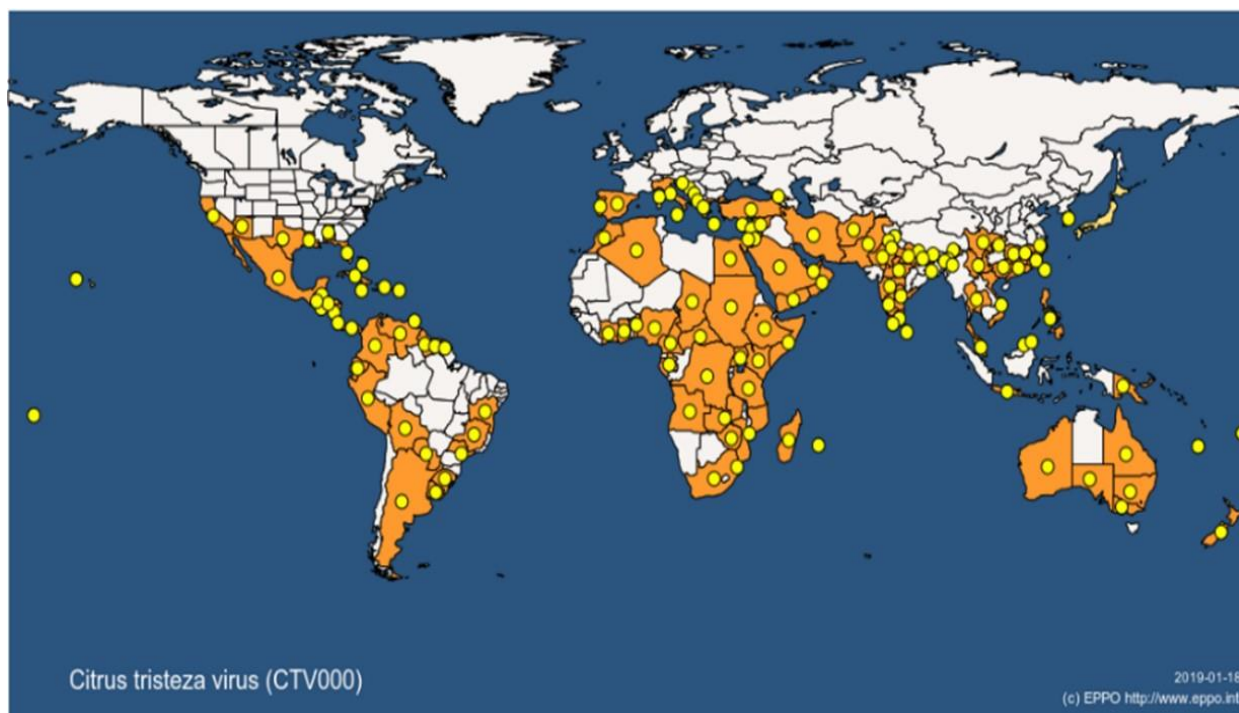
Le bigaradier (*Citrus aurantium* L.) est originaire du Sud-Est d'Asie (Grosser *et al.*, 2004). Il a été introduit dans le Bassin Méditerranéen après les conquêtes des arabes (Webber *et al.*, 1967) ; durant le 10<sup>ème</sup> siècle en Perse, Iraq, Syrie, Palestine et Egypte et plus tard dans le Nord de l'Afrique, Sicile, Sardaigne et Espagne (Nicolosi, 2007). Dans la littérature arabe ancienne (Tolkowski, 1938; Calabrese, 1998), le terme 'naranji' désignait le bigaradier ; aussi, plusieurs autres nominations lui ont été données: *Citrus vulgaris* (Risso, 1813), *Citrus bigaradia* (Risso et Poiteau, 1818). *Citrus aurantium* L. est le binomial scientifique adopté après la description fournie par Linneus en 1753. Ce dernier a placé l'orange comme une variété de bigaradier, en la nommant *C. aurantium* var. *sinensis*. L'espèce *C. aurantium* L est le porte-grefre le plus anciennement utilisé dans le monde et qui reste prédominant en Méditerranée (Grosser *et al.*, 2004). Le bigaradier présente plusieurs avantages, qui sont un bon comportement en pépinière ; une tolérance aux chlorures et au calcaire ; il s'adapte à tous les types de sols et possède une bonne

affinité avec la majorité de variétés. De plus il est résistant à la gommose et à l'exocortis et très productif, mais il craint l'excès d'eau et les sols lourds. Il montre également une sensibilité aux nématodes (Snoussi, 2013). Malheureusement, le principal inconvénient de ce porte-greffe est sa sensibilité au virus de la Tristeza quand il est utilisé comme porte-greffe pour les variétés d'orange ou de pamplemousse (Rao *et al.*, 2008). C'est pourquoi, l'emploi du bigaradier est limité et réglementé pour un petit nombre de régions dans le monde, c'est la raison pour laquelle il a été nécessaire de remplacer ce porte-greffe par d'autres, afin d'intégrer plus de tolérance au CTV et à la salinité, qui est fréquemment omniprésente dans la plupart des régions agrumicoles. Le bigaradier a fait l'objet de plusieurs travaux visant l'amélioration des porte-greffes. À partir de cultures d'ovules, 17 lignées de cals ont été générées ; le bigaradier étant l'un des géniteurs potentiels. Ces cals ont présenté un intérêt potentiel pour la sélection de porte-greffes (Ollitrault *et al.*, 1998).

## 2.6 Origine de la maladie virale Tristeza

La Tristeza est probablement originaire de Malaisie et d'autres pays d'Asie du Sud-Est, zone d'origine présumée des agrumes, où elle existait depuis longtemps sur des cultivars tolérants (Roistacher, 2000 ; Atta *et al.*, 2012). Entre 1836 et 1916, une épidémie de pourriture du collet causée par un oomycète du genre *Phytophthora* est apparue dans plusieurs régions du monde, décimant les agrumes obtenus par semis ou greffés sur orangers doux ou sur citronniers (Roistacher, 2000). Ce désastre a conduit à transformer le mode de plantation par semis direct au greffage de scions sur bigaradier (*Citrus aurantium* L), un porte greffe résistant à la gommose, et très adapté à tous les types de sols (Fawcett, 1936 ; Rocha-Pena *et al.*, 1995 ; Roistacher, 2000). Le bigaradier est rapidement devenu le porte greffe le plus utilisé en Méditerranée, puis en Amérique. Ce porte greffe a malheureusement créé les conditions d'une vaste épidémie de déclin induit par la Tristeza, d'abord en Afrique du sud en 1910, puis à Java à partir de 1928, au Brésil dès 1937 et en Argentine en 1938 (Herron, 2003). Webber (1943) a rapporté qu'en Afrique de sud entre 1924 et 1925, il était difficile de trouver un oranger doux greffé sur bigaradier âgé de moins de 20 ans, car la maladie entraînait la mort des sujets âgés.

Toxopeus (1937) à Java a décrit les symptômes de la maladie sur bigaradier similairement à ceux de l'Afrique de Sud en excluant les facteurs environnementaux comme l'unique cause du problème. Bitancourt (1940) a fait une description indiquant une « pourriture des radicules des agrumes » ; il a testé de nombreuses combinaisons cultivar/porte greffe au Brésil, suggérant une origine virale du syndrome ; Il s'agissait d'un virus latent sur bigaradier transmis via le point de greffe à l'oranger doux.



**Fig 5.** Distribution de la Tristeza dans le monde (OEPP, 2019).

Webber (1943) a publié le premier rapport sur les maladies des agrumes sans aucune mention aux symptômes de la Tristeza. Moreira (1942) a utilisé le terme portugais « Tristeza » ou tristesse pour décrire les symptômes de déclin des frondaisons de scions greffés sur bigaradier au Brésil. Meneghini (1946) avait déjà démontré la transmission de l'agent de la Tristeza par les pucerons, alors que Fawcett et Wallace (1946) ont démontré la nature virale de la maladie. Apparemment, tous les premiers cas de Tristeza découverts dans les zones d'agrumes du Bassin Méditerranéen remontent à l'introduction du matériel végétal infecté provenant de l'étranger (Russo, 1956). Tous les pays ayant introduit le citronnier Meyer ont également introduit la Tristeza (Bové, 1967). D'autres variétés importées d'Australie, d'Afrique du Sud, des États-Unis d'Amérique et du Japon auraient également introduit la Tristeza dans des pays Méditerranéens. Les premières épidémies ont eu lieu en Espagne, au Moyen Orient et en Italie (Soroker *et al.*, 2009 ; Navarro, 1993 et Russo, 1956), alors que plusieurs foyers ont été signalés en Albanie, en Algérie, en Egypte, France, Grèce, Jordanie, Liban, Libye, Maroc, Palestine, Portugal, Syrie, Tunisie et Turquie (Djelouah et D'Onghia, 2001a ; OEPP, 2019). La propagation et le mouvement de la Tristeza dépend de la distribution du matériel infecté, de l'espèce de pucerons vecteurs, de la souche du virus et d'autres facteurs abiotiques (Roistacher, 2004).

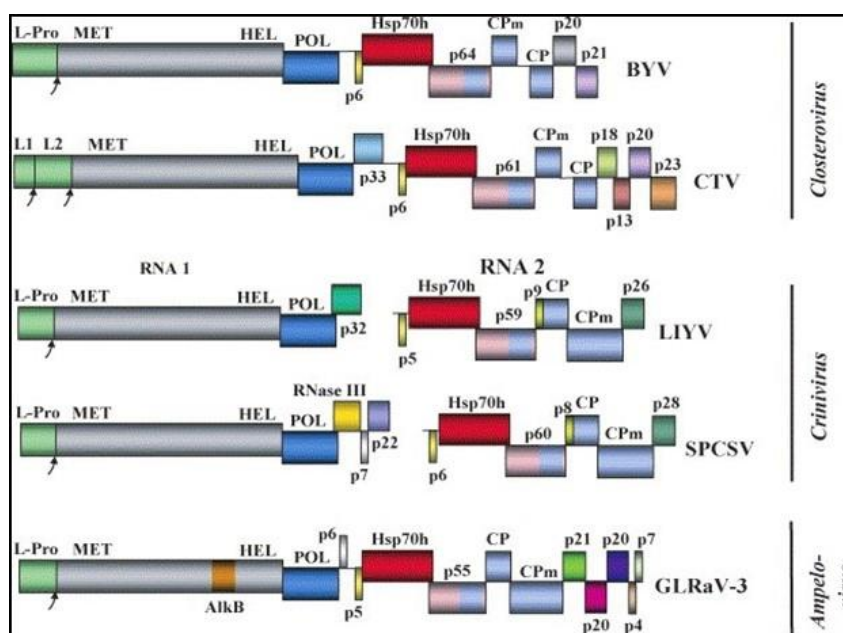
### 2.6.1 Histoire de la Tristeza en Algérie

Depuis 1948, les premiers cas de Tristeza ont été décelés sur agrumes dans les pays du Bassin Méditerranéen suite à l'introduction des greffons infectés du citronnier Meyer (Frezal, 1957 ; Bové, 1967 ; Djelouah et D'Onghia, 2001a) ; l'introduction du virus devenait inévitable vu que la maladie était quasi inconnue à cette époque (Herron, 2003). En Algérie, la maladie a été détectée en 1955 et 1957, où des plants de citronnier Meyer porteurs du CTV ont été introduits dans le pays (Frezal, 1957). Aucune propagation naturelle de la maladie n'a été observée à l'époque, sauf par propagation de greffons. Au cours de sa visite en Algérie, Salibe (1961) a découvert des symptômes de présence de la Tristeza dans quelques vergers d'agrumes de la région de Mitidja. Il s'agissait de deux pamplemoussiers sans pépins (Variété: Marsh) et de deux orangers (Variété: Salustiana) greffés sur des bigaradiers, âgées de 22 à 23 ans environ. Le pamplemoussier sans pépins présentait un feuillage de couleur vert, mais avec une surcroissance, striure inversée et exsudats gommeux sous le point de greffe. Les orangers de Salustiana étaient rabougris, avec dépérissement des rameaux, excroissance du tronc au-dessus de point de greffe et exsudats gommeux au niveau du tronc de bigaradier. Lors d'une visite dans un grand verger d'agrumes étatique à Haouch Massouma dans la commune de Chebli (Blida), environ 40 orangers, probablement de la variété Verna Peret (Pereta) ont montré des symptômes de dépérissement, des feuilles jaunâtres et fanées ainsi que du bois strié. Dans le même verger, à environ 500 m du foyer, un autre groupe d'une dizaine d'arbres de Mandarinier (Variété: Clémentine) et d'Oranger (Variété: Pereta) greffés sur bigaradier et plantés en intercalaire étaient en souffrance, certains étaient déjà morts (FAO, 1996 et Salibe, 1961). La cause de cette anomalie n'a pas été déterminée, mais il a été suggéré d'utiliser la technique sérologique ELISA pour déterminer l'origine de ces cas de déclin. Au niveau de l'ITAF de Boufarik, des plantes indicatrices (Lime mexicaine) inoculées avec des greffons d'un oranger (Variété: CapNartje) importé d'Afrique du Sud ont montré des symptômes de bois strié SP ce qui indiquait la forme grave du virus (FAO, 1996). Plus tard, Farrag et Omar (1969) ont soupçonné la présence de la Tristeza sur 30 arbres, ce qui a été confirmé par la mission COFROR en 1971 (Anonyme, 1971). Par ailleurs, au cours d'une visite technique en Algérie, des chercheurs Français ont observés des symptômes du virus sur certains arbres d'agrumes dans la région de la Mitidja (Bové, 1995). Entre 1967 et 1982, durant des missions techniques en Algérie, Bové a rapporté la présence du CTV sur certains arbres (Mandarinier et Clémentinier) de la collection variétale de la station expérimentale de l'ITAF à Boufarik (Bové, 1995). Jusqu'en 2000, aucun symptôme de la maladie n'a été observé dans les vergers d'agrumes de cette localité ou ailleurs (ITAFV, 2003). A partir de 2001 l'ITAFV a détecté

à nouveau du CTV sur deux variétés d'agrumes (Mandarinier et Oranger doux) appartenant au parc à bois de Beni Tamou. Ces arbres ont été arrachés et détruits (ITAFV, 2003 ; Larbi *et al.*, 2009 ; Laala *et al.*, 2019). En 2009 l'INPV a réalisé une enquête au niveau de plusieurs zones agrumicoles d'Algérie dont le résultat a prouvé la présence de foyers isolés de la maladie dans certaines zones comme Chlef et Ain Defla déjà connues indemnes de la maladie. Suite à l'enquête réalisée entre 2009 et 2012, l'incidence de la maladie dans la plaine de Mitidja a été estimée à 17.6% (Larbi *et al.*, 2015). À Blida l'incidence du CTV a été évaluée à 25.8% (Belkahla *et al.*, 2013). L'OEPP rapporte que la Tristeza est présente en Algérie, mais son occurrence est faible (OEPP, 2019).

### 2.6.2 Caractéristiques de l'agent causal

*Citrus Tristeza virus* (CTV) provoque une des maladies les plus préjudiciables à la culture des agrumes, cause d'épidémies ravageuses qui ont pesé sur l'évolution de ce secteur (Moreno *et al.*, 2008). Le virus de la Tristeza est le plus fréquent et le plus complexe du genre Closterovirus de la famille de phytovirus Closteroviridae (Karasev *et al.*, 1995 ; Martelli *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Dawson *et al.*, 2015).



**Fig 6.** Schémas du genre *Closterovirus*. Les noms des genres sont montrés à la droite. BYV, Beet yellows virus (Agranovsky *et al.*, 1994), CTV, *Citrus Tristeza virus* (Karasev *et al.*, 1995); LIYV, Lettuce infectious yellows virus (Klaassen *et al.*, 1995); SPCSV, Sweet potato chlorotic stunt virus (Kreuze *et al.*, 2002); GLRaV-3, Grapevine leafroll-associated virus-3 (Ling *et al.*, 2004).

La famille est composée de trois genres : Citrivirus dont le CTV qui possède un génome monopartite de 19.3 kb et 12 ORFs (open reading frame) est transmis par pucerons (Fig. 6) ;

Closterovirus, le BYV (Beet Yellow virus), dont le génome est composé de 14.5 kb et 9 ORFs et également transmis par pucerons. Biclovirus dont le LYV (lettuce infectious yellow virus) est composé d'un génome bi-caténaire de 8.1 et 7.1 kb et 9 ORFs celui-ci est transmis par les cochenilles (Hemiptera : Pseudococcidae). Leurs virions sont flexueux et filamenteux et mesurent 2000 nm de longueur et 11 nm de diamètre (Bar-Joseph *et al.*, 1979). Ils sont transmis d'une manière semi-persistante par les insectes, causant des structures cytopathologiques caractéristiques au niveau du phloème. Actuellement cette famille est composée de plus de 30 virus, de 2 à 3 virus sont ajoutés chaque année à cette liste (Karasev et Bar-Joseph, 2010). L'évolution des Closterovirus a été suggérée sur la base de l'analyse de leurs gènes de répliquons et le HSP70 homologue (HSP70h) (Dolja *et al.*, 1994 ; Karasev, 2000).

### 2.6.3 Gamme de plantes hôtes

En conditions naturelles, le virus de la Tristeza infecte facilement les cellules du phloème de la plupart des espèces des genres *Citrus* et *Fortunella* ainsi que certaines espèces de genres voisins des agrumes appartenant à la famille des Rutaceae qui sont également sensibles au CTV. Il s'agit de *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hespertusa*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* et *Swinglea* (Duran-Vila et Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000 ; Roistacher, 2004). La majorité des clones de *Poncirus trifoliata* (oranger trifolié) et bonnombredeleurshybrides, ainsi que *Fortunella crassifolia* (kumquat Meiwa) et certains *Citrus grandis* (pomélo), résistent à la plupart des souches de CTV (Moreno *et al.*, 2008). Par conséquent le CTV est absent ou très peu concentré dans les espèces suivantes ; *C. reticulata* (mandariner), *C. sinensis* (orangerdoux) et *C. latifolia* (limettier). Parmi les espèces utilisées comme porte-greffe, *C. macrophylla* (alemow), *C. volkameriana* (citronnier Volkamer), *C. reshni* (mandariner Cleopatra) et *C. limonia* (limettier Rangpur) sont sensibles aux infections naturelles par CTV, tandis que les citranges (hybrides des orangers doux et trifoliés Carrizo et Troyer) sont très rarement infectés. Les porte-greffes *P. trifoliata* et *C. paradisi* × *P. trifoliata* (citrumelo) résistent à la plupart des souches de CTV. Les non-agrumes *Passiflora gracilis* et *Passiflora coerulea* sont étudiés comme hôtes à titre expérimental (Roistacher, 2010).

## 2.7 Symptômes

Le CTV est le phytovirus qui a le plus large nombre de phénotypes distincts (Garnsey *et al.*, 2005 ; Hilf *et al.*, 2005 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Dawson *et al.*, 2013). Les symptômes qui se manifestent chez les hôtes infectés par le CTV sont très variables et dépendent des conditions environnementales, de l'espèce touchée et de l'agressivité de la souche infectieuse. Le virus peut

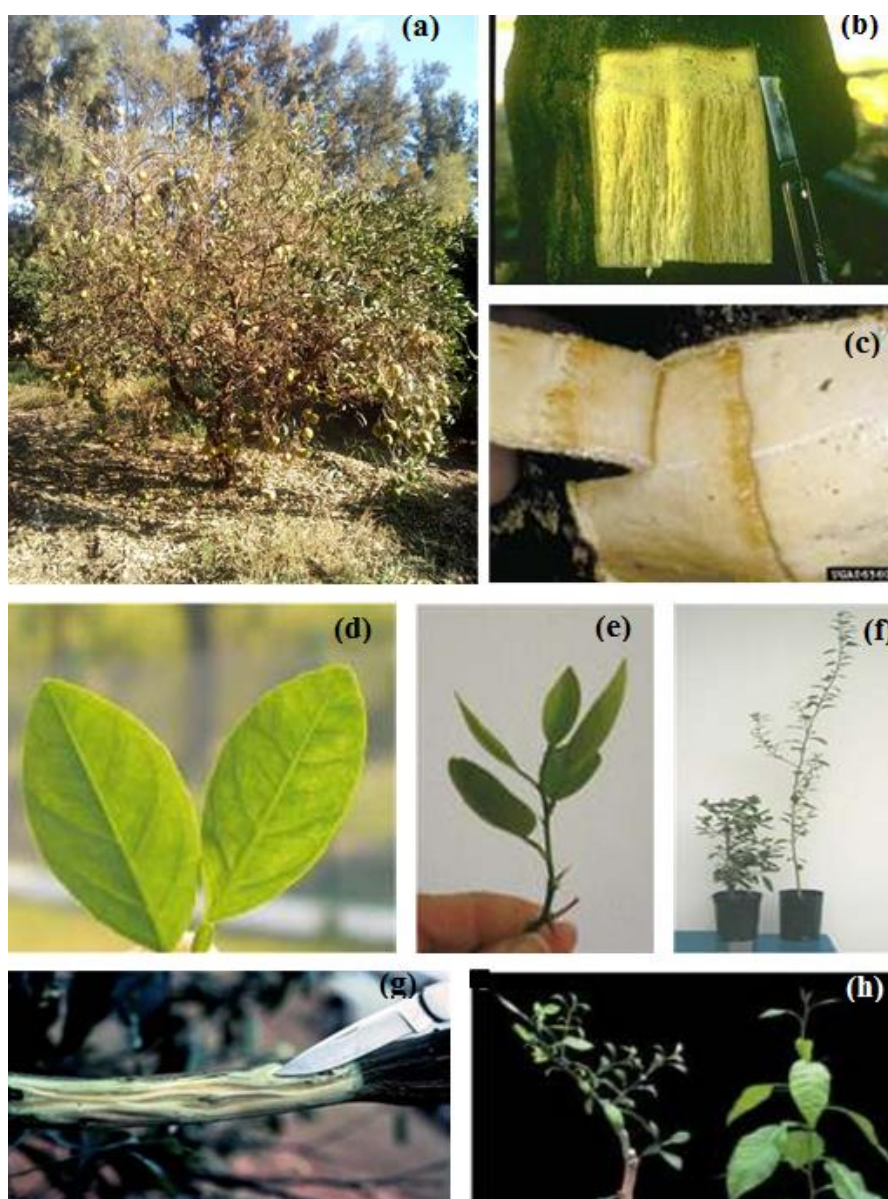
rester latent pendant plusieurs années (Moreno *et al.*, 2008). Certaines souches de CTV sont bénignes et ne produisent pas d'effets visibles chez la majorité des espèces d'agrumes commerciales, notamment les agrumes greffés sur *C. aurantium* (Roistacher, 1991). De manière générale, les mandariniers sont particulièrement tolérants aux infections par le CTV. Alors que *C. sinensis*, *C. aurantium* (utilisé comme jeune plants non comme porte-greffe), *C. jambhiri* (citronnier rugueux) et *C. limonia* demeurent habituellement asymptomatiques après l'infection, mais peuvent toutefois manifester une réaction à certaines souches agressives. Des symptômes d'infection apparaîtront probablement chez le limettier, le pamplemoussier, certains cultivars du pomélo, *C. macrophylla* (alemow), l'oranger doux, quelques hybrides d'agrumes et les espèces proches des agrumes de la famille des Rutaceae. En fonction de la souche de CTV, des espèces d'agrumes ou de l'association greffon/porte-greffe, le virus cause l'un des trois symptômes suivants : dépérissement d'agrumes, bois strié, ou jaunisse des jeunes plants. Ces trois syndromes sont décrits dans les paragraphes qui suivent. La figure (7) récapitule les principaux symptômes induits par le virus de la Tristeza.

### 2.7.1 Le dépérissement

L'une des conséquences du CTV les plus importantes sur le plan économique et le déclin à Tristeza (maladie du point de greffe), caractérisée par un dépérissement des arbres greffés sur bigaradiers. Les orangers doux mandariniers et pamplemoussiers greffés sur ce porte-greffe dépérissent lentement. Les symptômes sont montrés Fig. 7a. En revanche, d'autres greffons dépérissent rapidement ou se rétrécissent quelques jours seulement après l'apparition des premiers symptômes. Le dépérissement est dû aux effets physiologiques du virus sur le phloème du porte-greffe sensible, juste en dessous du point de greffe. Les arbres qui dépérissent lentement présentent typiquement un gonflement au-dessus du point de greffe formant une ligne brune à la jonction et des striures inversées et quelque fois un motif de nid d'abeilles sur la face intérieure de l'écorce (Fig. 7c). Les symptômes couramment observés chez les hôtes sensibles sont un rabougrissement, un repliement des feuilles, un éclaircissement des nervures, une chlorose foliaire (Fig. 7d, e, f). Cependant, certains isolats du virus, en particulier dans les zones productrices d'agrumes du Bassin méditerranéen, n'entraînent des symptômes de dépérissement que plusieurs années après l'infection (déclin lent/slow decline), même chez les arbres greffés sur bigaradiers tandis que les souches exotiques sévères peuvent provoquer la mort soudaine de l'arbre atteint (déclin rapide/quick decline).

### 2.7.2 Le bois strié (stem pitting SP)

Le bois strié est la forme la plus sérieuse de tous les types de CTV, parce qu'il attaque directement les scions et/ou les porte-greffes d'agrumes (Roistacher *et al.*, 2010 ; Dawson *et al.*, 2015). Les souches agressives de CTV peuvent toucher sévèrement les arbres et provoquer des striures du bois au niveau du tronc et des branches de nombreuses espèces d'agrumes (Fig. 7b ; 7g). Le bois strié peut parfois donner l'aspect d'une corde bosselée du tronc et les branches charpentières des arbres adultes, creuser des cavités profondes dans le bois sous les parties touchées de l'écorce et réduire la qualité et le rendement des fruits (Roistacher *et al.*, 2010).



**Fig 7.** Différents symptômes causés par le CTV ; a) déclin d'oranger greffé sur bigaradier ; b) bois strié SP ; c) striure inversée et exsudats gommeux sous le point de greffe de bigaradier ; d) éclaircissement des nervures chez limettier mexicain sous serre (18-25°C) ; e) feuille en cuillère chez limettier mexicain ; f) rabougrissement chez un jeune plant d'oranger greffé sur bigaradier (spécimen sain droite et spécimen infecté à gauche) ; g) dégâts de bois strié sur rameaux de pamplemoussier ; h) jaunisse de jeunes plants de bigaradier (Afechtal, 2012).

### 2.7.3 La jaunisse des jeunes plants (Seedling Yellowing SY)

La jaunisse des jeunes plants est caractérisée par un dépérissement, une production de feuilles pâles ou chlorosées, un développement réduit du système racinaire et l'arrêt de la croissance des jeunes plants de bigaradier, pamplemoussier et citronnier (Dawson *et al.*, 2015). Le syndrome se poursuit au champ et provoque le déclin de la plantule quelques mois après plantation (Fig. 7f). Occasionnellement les plants affectés, peuvent guérir (Dawson *et al.*, 2015).

### 2.7.4 Conséquences indirectes du CTV

Les épidémies de CTV ont des conséquences négatives car ils entraînent des décisions tels que l'abandon du porte-greffe bigaradier qui possède des qualités agronomiques et horticoles inégalées, qui est remplacé par des porte-greffes tolérants à la Tristeza ce qui engendre de nouveaux problèmes, en particulier le maladie du Greening (HLB) ainsi que d'autres maladies transmissibles par greffe associées à l'utilisation de ces porte-greffes, tels que les viroïdes (Roman *et al.*, 2004 ; Hanani *et al.*, 2018).

## 2.8 Relation entre les génotypes du CTV et les symptômes

Des méthodes basées sur la technique PCR (amplification en chaîne par polymérase) et des amorces spécifiques de séquence conçues à partir de séquences de CTV connues ont été utilisées pour détecter des isolats génétiquement similaires par amplification de séquences d'ADN de taille similaire (marqueurs) à proximité de l'extrémité 5' de l'ARN génomique ou de sites multiples dans ORF 1 (Hilf et Garnsey, 2000 ; Ayllon *et al.*, 2001 ; Gambino et Gribaudo, 2006). Actuellement deux grands groupes représentés par les isolats VT et T36 sont mis en évidence, au sein du groupe VT ; il existe trois génotypes spécifiques représentés par les isolats VT, T30 et T3 (Hilf *et al.*, 2005). Une étude qui a appliqué des amorces spécifiques du génotype à un petit échantillon d'isolats de CTV provenant de sources nationales et internationales a identifié des isolats avec des marqueurs similaires aux isolats de référence, mais a également trouvé des isolats sans marqueurs spécifiques (Hilf et Garnsey, 2000 ; Hilf *et al.*, 2005). Un isolat de CTV est généralement classé dans une ou plusieurs des catégories de symptômes biologiques générales telles que définies par Garnsey *et al.* (2005) et Rocha-Pena *et al.* (1995). Ces symptômes biologiques correspondent à la réaction foliaire (LR) sur limette mexicaine, au déclin de l'oranger doux sur bigaradier (DEC) et au jaunissement des plantules greffées sur bigaradier (SO-SY) ainsi qu'au bois strié sur pamplemoussier (GFSP) ou sur oranger (OSP)

(Garnsey *et al.*, 2005). Tous les symptômes peuvent être classés de 0 à 3 (Yokomi *et al.*, 2018), 0 avec aucun symptôme, 1 indiquant des symptômes bénins, 2 avec des symptômes modérés et 3 indiquant une réaction très grave. Mais un isolat ayant une note sur chaque indicateur peut être placé dans un graduel (0 à 10). (1) LR (réaction foliaire) chez le limettier mexicain est évaluée en fonction du nombre de veines claires, de la taille des feuilles, du retard de croissance et des striures des tiges chez l'hôte. (2) Le syndrome de DEC (déclin d'oranger doux sur bigaradier) est évalué sur la base de la sévérité du rabougrissement et de chlorose foliaire de l'oranger doux greffée sur bigaradier, indiquant une lésion du phloème au point de greffe induite par le CTV. (3) La réaction SO-SY est caractérisée par des feuilles chlorotiques, une réduction de la taille des feuilles et un rabougrissement des plantules de bigaradier. (4) GFSP et OSP sont les symptômes de bois strié des plants de pamplemoussier de Duncan et d'orangers doux (Madame Vinous), respectivement. Le nom (bois strié) indique la présence de fosses longitudinales ou de canaux dans le bois des tiges (Garnsey *et al.*, 2005).

## 2.9 Agents de transmission et épidémiologie du CTV

### 2.9.1 Transmission du CTV

La propagation du matériel végétal infecté par le CTV et la transmission naturelle de ce dernier par les pucerons sont à la base de sa dispersion. Le premier est le responsable de la plupart des introductions dans des régions nouvelles, alors que le second joue un rôle important dans la dissémination locale (Moreno *et al.*, 2008). Le virus a été expérimentalement transmis par la cuscute (*Cuscuta subinclusa*) (Weathers et Hartung, 1964) et par l'inoculation d'extraction semi-purifiée (Garnsey *et al.*, 1977), mais ces procédures ne sont pas importantes d'un point de vue épidémiologique.

En plus du rôle joué par l'homme dans la propagation du CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1989), ce dernier est véhiculé par de nombreuses espèces de pucerons qui varient en termes d'efficacité de transmission (Garnsey et Lee, 1988). Des espèces de la famille des Aphididae, telles que, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Aphis gossypii* (Glover) et *A. spiraecola* (Patch), sont les vecteurs les plus importants (Roistacher et Bar-Joseph, 1984 ; Yokomi et DeBorde, 2005 ; Campolo *et al.*, 2014). Ces espèces peuvent acquérir et transmettre le virus durant une courte durée de succion sans une période de latence (Norman *et al.*, 1972). Plus la période d'acquisition est longue (>24h), plus l'efficacité de transmission est importante (Roberts *et al.*, 2001 ; Campolo *et al.*, 2014). Le CTV n'a pas de période de latence, les phases d'acquisition et inoculation peuvent durer 30 minutes et 24 heures (Costa et Grant, 1951; Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Campolo *et al.*, 2014) ;

mais l'acquisition et inoculation de CTV est plus rapide chez *T. citricidus* car elle est estimée en secondes (Retuerma et Price, 1972). Les Closterovirus n'étant pas transmises verticalement, le puceron peut rester virulent 24-48 heures après s'être alimenté sur une plante infectée et il ne perd son pouvoir infectieux qu'après s'être alimenté sur une autre plante indemne ou alors après une mue (Roistacher, 2006). Plusieurs recherches avec des méthodes de diagnostic telles que ELISA, RT-PCR classique et RT-PCR en temps réel, ont noté que le CTV peut être acquis par différents pucerons vecteurs et non-vecteurs qui atterrissent sur agrumes, indépendamment de leur capacité de le transmettre (Bertoloni *et al.*, 2008).

### 2.9.2 Épidémiologie de la Tristeza

Le système de pathologie du CTV est très complexe. Les isolats de CTV varient dans l'expression des symptômes et une multitude d'interactions peuvent se produire en raison de diverses combinaisons du virus, de l'arbre hôte, des espèces de vecteurs de pucerons, l'environnement et la température (Roistacher, 2004). L'une des caractéristiques les plus importantes des épidémies de CTV est liée à la nature des espèces de pucerons vecteurs présentes dans la région (Yokomi, 2009c). Plusieurs facteurs influent sur le taux de propagation du CTV dans une zone donnée, comme la composition de la faune aphidienne (Gottwald *et al.*, 1996 ; Cambra *et al.*, 2000c); la densité de population de pucerons (Dickson *et al.*, 1956) qui va dépendre des conditions environnementales qui vont agir sur l'accroissement démographique des pucerons et la formation des ailés (températures modérées, irrigation et fertilisation) (Bar-Joseph et Loebenstein, 1973 ; Roistacher, 2004); la prédisposition des variétés d'agrumes prédominantes (Roistacher et Bar-Joseph, 1984; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988b ; Marroquín *et al.*, 2004); et la transmissibilité des isolats de CTV prédominants (Bar-Joseph et Loebenstein, 1973, Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984, 1988a ; Yokomi ; Garnsey, 1987).

La dissémination spatiale et temporelle du CTV dans les champs d'agrumes a fait l'objet d'études dans diverses régions du monde (Gottwald *et al.*, 2002). Ces études démontrent qu'il peut s'écouler un long moment entre l'introduction d'une source primaire d'inoculum de CTV et le déclenchement d'une épidémie de Tristeza (Garnsey et Lee, 1988). En effet dans de nombreux pays, une période de latence parfois supérieure à trente ans a été observée entre l'introduction présumée du CTV et sa dissémination notable sur le terrain, à cause de la nécessité d'une adaptation entre l'isolat de CTV nouveau et les populations locales de pucerons (Racah *et al.*, 1980 ; Bar-Joseph *et al.*, 1989). L'échec de l'éradication précoce des arbres infectés par le CTV est dû, surtout à la présence de *Toxoptera citricidus* (Kirkclady) (Lee et Bar-Joseph, 2000). Dans

une étude réalisée par Sharma (1989) il ressort que sur 20 isolats de CTV, 12 ont été efficacement transmis par *T. citricidus*, 5 par *A. gossypii* et seulement 3 par *Myzus persicae*. D'autre part Yokomi et Damsteegt (1991) ont constaté que *T. citricidus* est 25 fois plus efficace qu'*A. gossypii*. Ce dernier a transmis également de façon efficace des souches de déclin et de stem-pitting en Californie et en Floride (Bar-joseph et Loebenstein, 1973 ; Roistacher, 1981 ; Yokomi et Garnsey, 1987 ; D'Onghia et Lacirignola, 1998). Plus récemment ce constat a été fait en Italie et au Maroc (Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Afechtal *et al.*, 2015). L'espèce *A. spiraecola* bien que souvent dominante est connue comme un vecteur du CTV moins efficace qu'*A. gossypii* (Norman et Grant, 1956 ; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984). Yokomi et Garnsey, (1987) rapportent qu'il est 3 fois moins efficace. Il existe d'autres espèces de pucerons qui transmettent aussi le CTV (Moreno *et al.*, 2008), parmi lesquelles, *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonsicolombe), *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis craccivora* Koch et *Uroleucon jaceae* (Linnaeus). mais ces espèces sont des vecteurs moins efficaces que *T. citricidus*, *A. gossypii* et *A. spiraecola* (Gottwald *et al.*, 1996 ; Hughes et Gottwald, 1998, 1999). Elles sont toutefois prédominantes dans certaines zones et par conséquent susceptibles d'influencer la dissémination du virus, dans la mesure où leur abondance compense leur faible capacité vectrice (Marroquín *et al.*, 2004). Les populations du redoutable puceron *T. citricidus* ont tendance à déplacer le virus d'un arbre à l'autre avec peu de distance entre les centres d'infection et ainsi répandre la maladie plus ou moins concentriquement des points d'entrée et d'infection dans un verger ou une région (Gottwald *et al.*, 1998). En dehors de son rôle de vecteur, cette espèce est un organisme nuisible parcequ'elle peut atteindre des populations élevées pendant la période de poussées de sève. Le déplacement de *T. citricidus* est assez réduit. On estime que son action se limite à une superficie, dont le rayon ne dépasse pas la largeur de 4 à 8 arbres (Gottwald *et al.*, 1998). La taille d'hiver favorise les poussées de sève au printemps lorsque les pucerons sont actifs et tendent à augmenter les épidémies comme cela s'est produit en Moyen orient (Bar- Joseph et Nitzan, 1991). À l'inverse, *A. gossypii* qui arrive plus tard se disperse plus, lentement et de façon aléatoire par rapport à *T. citricidus* (Gottwald *et al.*, 1998). Cependant, quand des deux populations coexistent dans la même zone, la propagation rapide du CTV sur de longues distances peut être due à *A. gossypii*, alors une diffusion efficace agrégée par *T. citricidus* entraîne une augmentation rapide des infections locales par le CTV (Gottwald *et al.*, 1998).

## 2.10 Les pucerons

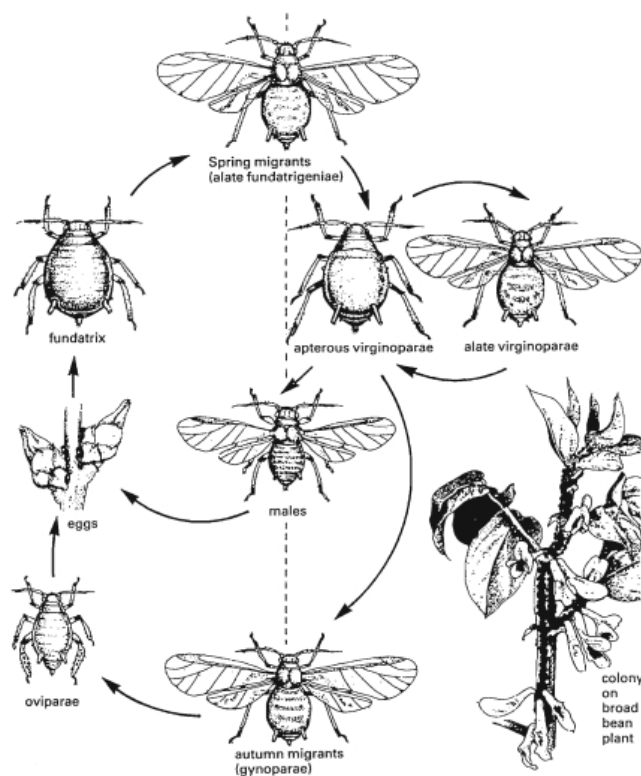
Les pucerons est le nom commun donné aux insectes appartenant à la superfamille Aphidoidea, au sein de l'ordre Hemiptera (Remaudière et Remaudère, 1997). Près de 4700 espèces sont recensés dans le monde (Carletto *et al.*, 2009), ils constituent l'un des groupes les plus importants de ravageurs des cultures (Blackman et Eastop 1984). Il n'y a pas de plantes terrestres qui ne soit attaquée par un puceron, que ce soit en surface ou dans le sol; ils peuvent même se nourrir d'écorce (Guerrieri et Digilio, 2008). Dans les climats tempérés, ce sont des ravageurs d'importance majeure (Minks et Harrewijn, 1989), en particulier dans les cas où leur attaque est associée à la transmission de virus phytopathogènes (Blackman and Eastop, 2000 ; Chouibani *et al.*, 2001 ).

### 2.10.1 Systématique

La taxonomie des pucerons a connu plusieurs changements au fil des années. Remaudière et Remaudière (1997), ont modifié la taxonomie, en réduisant les familles en groupe inférieur ; par exemple le genre *Aphis* appartient à la super famille Aphidoidea et à la famille Aphididae, et à la sous famille Aphidinae. Au niveau inférieur il y'a la tribu des Aphidini et la sous-tribu des Aphidina. La famille des Aphididae est la plus importante en agriculture, comprenant 25 sous-familles dont plusieurs espèces transmettent plus de 370 virus phyto-pathogènes (Turpeau *et al.*, 2010 ; Boukhris-Bouhachem et Souissi, 2016). Dès le XIX siècle, plusieurs travaux sur l'identification morphologique des pucerons sont apparus (Passerini, 1863 ; Ferrari, 1872). Vers la deuxième moitié du XX siècle, des travaux plus spécifiques sur les pucerons ont été publiés (Addante *et al.*, 2009), parmi les plus importants on cite ceux de Barbagallo (1965, 1966a,b) dans lesquels l'auteur a présenté des données essentielles sur *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe), *A. spiraeicola* Patch et *A. gossypii* Glover. Stoezel (1994) a publié un travail détaillé sur l'identification des pucerons des agrumes à l'aide d'une clé dichotomique, dans la même année Blackman et Eastop (1994) ont publié également une clé d'identification dichotomique de 14 espèces communément rencontrés sur agrumes.

### 2.10.2 Cycles de développement

Il existe plusieurs modes de reproduction et de développement, car certains espèces de pucerons appelés dioïques peuvent changer de type de plante hôte au cours des saisons alors que d'autres espèces, dites monoeciques, accomplissent tout leur cycle de développement sur un seul type de plante (Barbagallo *et al.*, 2007 ; Turpeau *et al.*, 2010) (Fig. 8).



**Fig 8.** Cycle de développement d'espèce hétérogonique alternant la phase sexuée et la phase asexuée (Blackman, 1975)

Les espèces dioïques, alternent entre deux types de plantes en général très différentes l'une de l'autre (Blackman et Eastop, 2007). Cette alternance est liée à la sexualité, car beaucoup d'espèces ne peuvent se reproduire sexuellement que sur une plante hôte particulière, en général pérenne (arbre ou arbuste), qualifiée d'hôte primaire (Moran, 1988). Les plantes herbacées sur lesquelles l'espèce migre ensuite au printemps sont alors qualifiées d'hôtes secondaires. Ainsi les populations holocycliques du puceron noir de la fève, *Aphis fabae*, se reproduisent sexuellement sur fusain d'Europe, *Euonymus europaeus* L, puis migrent au printemps sur de nombreuses plantes herbacées dont les fabacées et les chénopodiacées (Hullé *et al.*, 1999).

Le cycle évolutif de la plupart des espèces est hétérogonique, c'est-à-dire caractérisé par l'alternance entre une génération amphisexuelle (comportant des mâles et des femelles fécondables) et une ou plusieurs générations ne comportant que des femelles parthénogénétiques (se reproduisent sans fécondation). Les femelles fécondes sont toujours ovipares, alors que les femelles parthénogénétiques sont en général ovipares, excepté pour le phylloxera de la vigne, c'est-à-dire qu'elles donnent directement naissance à de jeunes larves capables de s'alimenter et de se déplacer aussitôt produites (Delmotte *et al.*, 2001). Dans les régions tempérées, les pucerons ont presque toujours gardé la possibilité d'effectuer un cycle annuel complet, ou

holocycle, c'est-à-dire, comportent la génération amphi sexuelle. L'œuf fécondé est pondu à l'automne, diapause et constitue pour l'espèce une forme de survie durant les conditions climatiques défavorables de l'hiver (Turpeau *et al.*, 2010). L'éclosion de l'œuf se produit généralement en même temps que les débourrements des bourgeons de la plante-hôte ; la femelle parthénogénétique qui en est issue et appelée fondatrice, elle est presque toujours aptère. Au cours du printemps, la fondatrice engendre une ou plusieurs générations de femelles parthénogénétiques appelées fondatrigènes, qui se développent sur la même plante qu'elle. Lorsqu'il y a plusieurs générations de fondatrigènes, les premières sont essentiellement composées d'aptères, la proportion d'ailés croissant au fil des générations (Hullé *et al.*, 1999).

Les fondatrigènes ailées quittent la plante sur laquelle elles se sont développées et vont s'alimenter sur les végétaux de la même espèce ou d'espèces différentes, sur lesquelles elles engendrent un certain nombre de générations d'individus femelles parthénogénétiques, alternativement aptères ou ailés, appelés virginogènes (Dreistadt *et al.*, 2004). En automne apparaissent des femelles parthénogénétiques appelées sexupares, qui donneront naissance à des mâles (sexupares andropares), à des femelles ovipares (sexupares gynopares) ou aux deux (sexupares amphotères) (Turpeau *et al.*, 2010). Les mâles sont souvent ailés et les femelles ovipares presque toujours aptères. La rencontre des sexes a lieu presque toujours sur la plante portant la femelle ovipare. Une fois fécondée, celle-ci pond ses œufs sur les parties lignifiées de sa plante-hôte (Fig. 8).

### 2.10.3 Les principales espèces de pucerons des agrumes

La composition de la faune aphidienne dans les vergers d'agrumes est très similaire dans l'ensemble des régions agrumicoles de la Méditerranée et à un degré moins qu'ailleurs dans le monde (Barbagallo et Inserra, 1974 ; Addante *et al.*, 2009). On trouve généralement 4 à 5 espèces principales dont la description est plus ou moins détaillée. Ce sont des insectes de l'ordre des Hémiptères et tous de la famille des Aphididae.

#### 2.10.3.1 *Aphis gossypi* (Glover 1877)

Description : C'est une espèce de petite taille (entre 1 et 2 mm), plus petite que la plupart des autres pucerons d'agrumes qui a une forme globuleuse (Ilharco et Fonseca, 1985). Sa couleur varie du verdâtre au brunâtre en passant par des couleurs intermédiaires (Fig. 9, A). Les cornicules sont noires et la queue (cauda) est pâle généralement de la couleur du corps (Blackman et Eastop, 2006). Elle est ornée de 5 à 7 soies (Fig. 9, B et C). Deux morphes peuvent être

observés dans la même population : des individus ailés et des aptères (Blackman et Eastop, 1984 ; Slosser *et al.*, 1989 ; Blackman et Eastop, 2000 ; Blackman et Eastop, 2006). Les aptères en général sont dépourvus de pigmentation dorsale, excepté parfois, dans la région pleurale (sclérites inter- segmentaires) ou dans la zone marginale (sclérites circulaires). Chez les ailés, parfois on observe de petits sclérites pigmentés éparses sur l'abdomen, notamment entre les cornicules, en plus des sclérites marginaux et des sclérites post-corniculaires fortement assombris. L'espèce supporte facilement les grandes chaleurs de l'été. Elle a été décrite à partir d'individus récoltés sur le cotonnier et sur du melon d'où le nom de puceron du coton et de melon qui lui est donné (Leonide celeni, 2001).

Gamme d'hôtes : *A. gossypii* est une espèce cosmopolite et très polyphage (Ebert et Cartwright, 1997 ; Hullé *et al.*, 1999). On la retrouve principalement sur les plantes des familles Malvacées, Rutacées, Cucurbitacées, ou encore sur les Solanacées (Lopes, 2007 ; Leonide celini, 2001).

Biologie : Vu le statut taxonomique ambigu de *A. gossypii*, il est difficile de conclure sur ses données bio-étiologiques (Blackman et Estop, 1994). Le cycle évolutif de ce puceron est complexe et diffère selon les régions et les plantes hôtes (Inaizumi, 1981). C'est une espèce plurivoltine (plusieurs générations par an) ; grâce à son mode de reproduction parthénogénétique durant le printemps et l'automne, les générations sont non seulement chevauchantes mais aussi emboîtées (les embryons contiennent des embryons) (Dixon, 1990 ; Carter et Godfrey, 1999). Au Japon, certaines races sont holocycliques et d'autres anholocycliques. En Europe et au sud des États-Unis l'espèce semble être uniquement anholocyclique. Les conditions climatiques qui règnent en Afrique du nord font que la majorité des espèces de pucerons connues ont un cycle de type anholocyclique, ce qui pourrait être le cas d'*A. gossypii* sur agrumes (Patti et Barbagallo, 1998 ; Blackman et Eastop, 2006) ; *A. gossypii* est à l'origine de nombreux dégâts importants sur plusieurs cultures. Ces dégâts sont soit directement liés à l'action des pucerons, soit indirectement par transmission de virus (Pitrat et Lecoq, 1980 ; Gray *et al.*, 1986 ; D'Onghia et Lacirignola, 1998 ; Lopes, 2007).

*A. gossypii* est le deuxième vecteur de CTV le plus efficace, mais il est le principal vecteur de CTV dans le Bassin méditerranéen et dans certaines régions d'Amérique du Nord (Dickson *et al.*, 1956 ; Racciah *et al.*, 1976a ; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984 ; Yokomi et Garnsey, 1987, Cambra *et al.*, 2000b ; Marroquín *et al.*, 2004). Ce puceron est le vecteur le plus efficace de CTV en l'absence de *T. citricidus* (Gottwald *et al.*, 1996b ; Marroquín *et al.*, 2004). Des expériences de transmission comparative de plusieurs isolats de CTV avec ces deux espèces vecteurs ont montré

que *T. citricidus* peut transmettre le CTV 6 à 25 fois plus efficacement qu'*A. gossypii* (Yokomi *et al.*, 1994). Dickson *et al.* (1956) ont signalé que les souches de Tristeza de déclin rapide étaient véhiculées par *A. gossypii* d'une manière extrêmement inefficace. Cependant, Martinez et Wallace (1964) ont rapporté plus tard qu'il a transmis trois isolats de CTV de la jaunisse des jeunes plants à des taux de 25 à 78%. La gestion intégrée de cette espèce est basée sur l'évaluation de l'activité des auxiliaires dans le verger infesté et le respect du seuil économique de nuisibilité (Chouibani *et al.*, 2010). Une intervention n'est justifiée que si 25% de pousses infestées en absence de toute activité des auxiliaires (SQNPI, 2019).

### 2.10.3.2 *Aphis spiraecola* (Patch 1934)

Description : Cette espèce est de petite taille, mesurant environ 2 mm de long ; elle est de couleur vert clair à jaunâtre. Les formes ailées ont en général une couleur brun foncé, sauf l'abdomen qui est verdâtre (Fig. 9, E). Les pattes sont toujours noires (Benoufella-Kitous, 2005). Les femelles aptères vivipares, ont 1,5 mm de long sont, entièrement vertes, sauf la tête et les cornicules qui sont bruns (Patti et Barbagallo, 1998).

Gamme d'hôtes : L'espèce est très répandue dans le monde, en région méditerranéenne, et elle est plus fréquente sur agrumes (D'Onghia et Lacirignola, 1998). En Amérique, ce puceron est considéré comme l'un des plus dangereux qui attaquent les Citrus. Ils s'attaquent aux agrumes particulièrement au cours du printemps (Hullé *et al.*, 1999). C'est le puceron le plus abondant aussi bien aux Etats-Unis que dans le Bassin Méditerranéen (Barbagallo *et al.*, 1996). *A. spiraecola* est parmi les pucerons d'agrumes les plus redoutables en région méditerranéenne (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006 ; Labdaoui et Guenaoui, 2018).

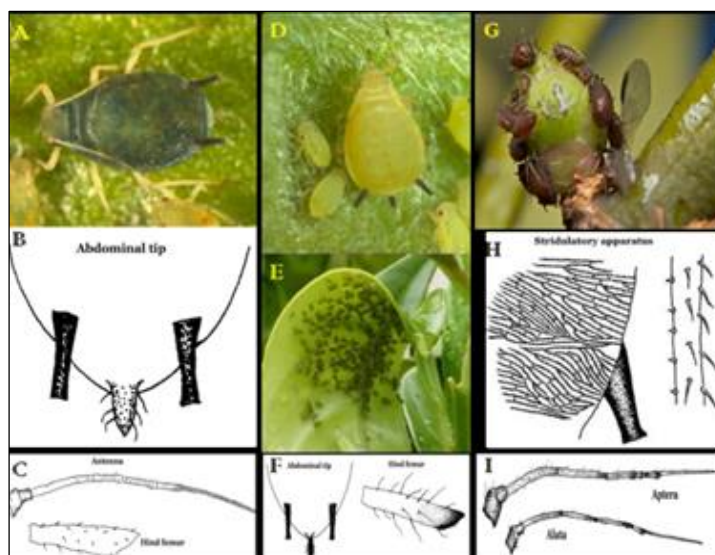
Biologie : La biologie du puceron des agrumes peut être différente d'un pays à l'autre (Hullé *et al.*, 1999). Plusieurs générations se développent au cours de l'année sur les Citrus où l'on dénombre plus de 40 générations par an (Patti et Barbagallo, 1998). Dans le Bassin méditerranéen, l'espèce se reproduit par parthénogenèse. Les femelles aptères sont présentes surtout au début de la saison et durant la période froide ; Elles sont les fondatrices de nombreuses colonies larvaires au printemps (Fig. 9, D, F). Les femelles ailées sont observées particulièrement pendant les périodes les plus chaudes de l'année et leurs pullulations sont moins importantes (Gómez-Marco, 2016). *A. spiraecola* peut transmettre le virus de la mosaïque du concombre (CMV) ou le virus Y de la pomme de terre (PVY) ainsi que le virus de la Tristeza des agrumes (D'Onghia et Lacirignola, 1998 ; Hullé *et al.*, 1999). *A. spiraecola* a été signalé comme étant un vecteur de CTV moins efficace que *A. gossypii* dans des conditions expérimentales (Hermoso de

Mendoza *et al.*, 1984 ; Yokomi et Garnsey, 1987); cependant, dans certaines zones agrumicoles, *A. spiraecola* accumule des populations plus importantes qu'*A. gossypii* et son rôle dans la dispersion du CTV pourrait être très important (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984). Yokomi et Garnsey (1987) ont observé un taux de transmission de CTV de 29% avec *A. spiraecola* comparativement à 76% avec *A. gossypii* en utilisant différents isolats CTV de Floride. Dans cas où cette espèce est identifiée dans un verger, l'évaluation de l'activité des auxiliaires et le calcul du seuil économique de nuisibilité est nécessaire. Le seuil est atteint si on observe 5% de pousses infestées pour les mandariniers et 10% pour les autres espèces d'agrumes et en absence totale de l'activité des ennemis naturels (SQNPI, 2019 ; Hermosode Mendoza *et al.*, 2006).

### 2.10.3.3 *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe 1841)

Description : L'adulte ailé mesure environ 3 mm .Il est de couleur brun-noir à noir, avec les cornicules et la cauda noires. Les ailes sont caractérisées par leurs nervures médianes qui ne sont ramifiées généralement qu'une seule fois. Les femelles aptères virginipares sont de même taille et couleur que les ailés, (Patti et Barbagallo, 1998 ; Blackman et Eastop, 2006).

Biologie : Ce puceron est présent partout sur les espèces du genre *Citrus*. Dans les régions tropicales, l'espèce est polyphage, attaquant le thé (*Camellia*), le café (*Coffea*), la mangue (*Mangifera*) et l'Anone (*Annona*). Dans les pays au climat méditerranéen, il est pratiquement monophage, attaquant surtout le genre *Citrus* (plus rarement sur *Pittosporum*) (Patti et Barbagallo, 1998) (Fig. 9 G, H, I). Les formes sexuelles sont inconnues dans la nature. L'anholocyclie semble être obligatoire. Lorsque les colonies sont importantes on peut entendre le bruit produit par le frottement d'épines tibiales sur les stries de l'abdomen. Chaque femelle produit de 50 à 70 nymphes. Les colonies se développent de préférence sur la face inférieure des feuilles. Ils peuvent être également trouvés sur les jeunes pousses et les bourgeons floraux. Les températures optimales pour ce puceron se situent entre 20 et 25°C. Les températures hivernales basses et la chaleur de l'été en particulier (au-dessus de 30 ° C) ralentissent le développement. En Afrique du nord, *T. aurantii* passe l'hiver en tant qu'individus regroupés en petites colonies sur les bourgeons ou sur d'autres plantes dans les vergers d'agrumes (Bodenheimer, 1951 ; Barbagallo *et al.*, 1996). Une trentaine de générations se succèdent et se chevauchent toute l'année. Il a été rapporté que *T. aurantii* est un vecteur mineur de certains isolats de CTV, mais qu'il n'est pas susceptible d'être significativement efficace (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984). La lutte chimique contre cette espèce est recommandée lorsqu'un seuil de 25% de pousses infestées est observé (SQNPI, 2019).

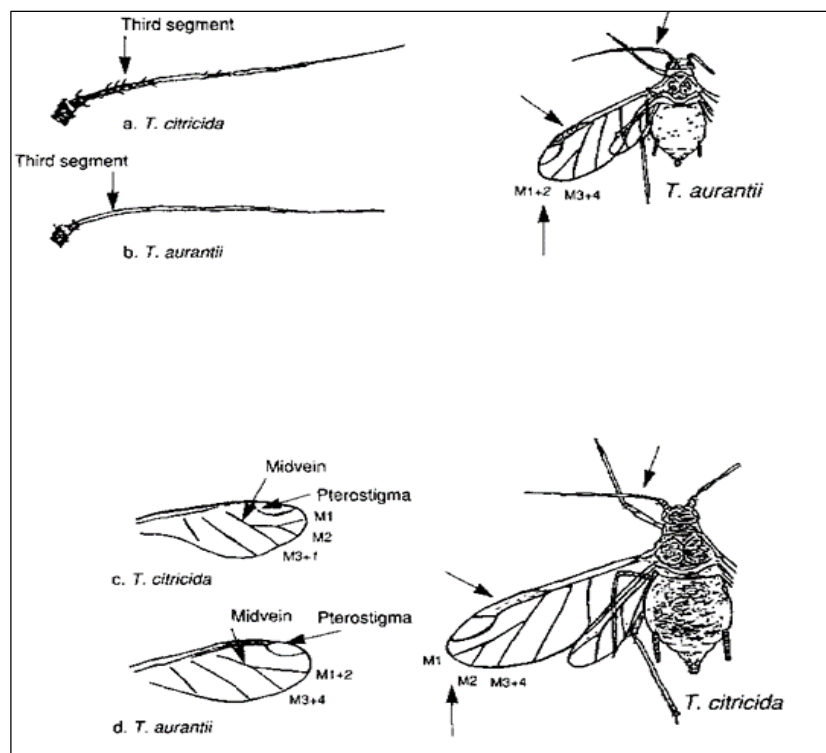


**Fig 9.** *A. gossypii* (Glover): (A) adulte aptère; (B, C) caractéristiques morphologiques de l'abdomen, des antennes et de fémur postérieur. *A. spiraecola* (Patch): (D) adulte aptère; (E) colonie etenroulement de feuilles de citrus; (F) caractéristiques morphologiques de l'abdomen, des antennes et de fémur postérieur. *T. aurantii* (Boyer de Fonscolombe): (G) colonie; (H, I) caractéristiques morphologiques *i*: appareil stridulatoire (H); (I) antennes (Afechtal, 2012).

#### 2.10.3.4 *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy 1907)

Ce puceron est vraisemblablement originaire d'Asie, d'où provenaient les agrumes (Kirkaldy, 1907). Le nom de l'espèce, *T. citricidus* est dérivé du latin (tueur des Citrus). Depuis la première moitié du XXe siècle, ce puceron était largement répandu sur les agrumes en Asie, Inde, Nouvelle-Zélande, Australie, îles du Pacifique, Afrique subsaharienne, Madagascar, îles de l'océan Indien et Amérique du Sud (Yokomi, 2009b). Récemment, il a été détecté dans des citronniers isolés dans le nord de l'Espagne (Cambra, 2007) et au Portugal (Ilharco *et al.*, 2005). Des populations élevées de ce puceron pendant les périodes de floraison ont causé par le passé des dommages directs aux agrumes (Hall et Ford, 1933). Cependant, les principaux dommages associés à cette espèce sont surtout la transmission et la propagation de souches sévères du CTV car il est démontré qu'elle est la plus efficace de toutes les espèces signalées sur agrumes (Roistacher, 2000 ; Lin *et al.*, 2002 ; Yokomi, 2009b,c). La dissémination du CTV par *T. citricidus* se fait par le mode semi-persistant, avec une courte période d'acquisition ne dépassant pas 10 minutes, mais cette durée peut atteindre jusqu'à 24 heures (Chalfant et Chapman, 1962 ; Lim et Hagedorn, 1977 ; Yokomi, 2009b). *Toxoptera citricidus* était responsable de la propagation rapide du déclin causé par le CTV qui a entraîné la mort de millions d'arbres d'agrumes greffés sur bigaradier au Brésil et en Argentine entre 1930 et 1940 (Knorr et DuCharme, 1951) et dans les années 1970 en Colombie (Geraud, 1976 ; Lee *et al.*, 1992). Actuellement, en Afrique du Sud, *T. citricidus* répand des souches très virulentes de CTV ce qui a provoqué une baisse de 6 à 8 ans de la longévité des pamplemoussiers,

malgré la protection croisée (Marais *et al.*, 1996). En plus de son efficacité élevée de transmission du CTV, *T. citricidus* transmet également des souches de ce virus qui ne sont pas transmissibles par d'autres espèces de pucerons (Yokomi *et al.*, 1994). Actuellement, il y a environ 200 millions de cultivars greffés sur bigaradier dans le monde et tous sont sous le risque imminent du déclin (Garnsey *et al.*, 1996). *T. citricidus* est très polyphage, (Yokomi, 1992 ; Yokomi *et al.*, 1994 ; Roistacher, 2006), anholocyclique dans la majeure partie de son aire de répartition, préférant les climats chauds. Il peut toutefois tolérer des zones plus froides comme le sud du Japon en développant une forme holocyclique pour hiverner sous forme d'œufs (Komazaki, 1993). Parfois *T. citricidus* peut être confondu avec *T. aurantii*, en raison de sa présence sur agrumes, sa coloration brun-noir foncé, sa taille et la présence d'un appareil stridulatoire. Cependant, les ailés de ces pucerons sont facilement différenciables par observation sous loupe. On peut constater que le troisième segment antennaire chez *T. citricidus* est de couleur entièrement noire, le ptérostigma de l'aile antérieure de couleur brun-clair et des nervures médianes bifurquées ; par contre les segments antennaires III, IV, V et VI de *T. aurantii* sont dotés de gaines au niveau des articulations, et le ptérostigma des ailes antérieures sont de couleur brun-noirâtre avec la veine médiane qui porte une seule ramification. La cauda de *T. citricidus* est touffue avec 25-40 soies, tandis que celle de *T. aurantii* est moins dense avec 8-19 soies (Yokomi, 2009b) (Fig. 10).



**Fig 10.** Caractéristiques de l'aile antérieure et antenne de *T. citricidus* et *T. aurantii* (Afechtal, 2012).

## 2.11 Interaction virus-puceron vecteur

Le caractère cosmopolite des aphides ainsi que leur comportement alimentaire, les placent comme bons vecteurs de phytovirus (Tab. 2) car plusieurs centaines de virus de plantes sont signalés transmissibles par les pucerons (Harris, 1977 ; Blackman et Eastop, 1984).

### 2.11.1 Transmission non-persistante des virus par les pucerons

Le mode de transmission non persistant est dû à de brefs prélèvements de nourriture des cellules de l'épiderme des plantes infectées ; le virus qui est prélevé grâce aux styllets maxillaires au niveau de la partie basale de l'appareil buccal persiste dans le puceron quelques minutes, (Harris *et al.*, 1995). La transmission non persistante des potyvirus filamenteux chez les pucerons est facilitée par la capsid de protéine (CP) et une aide-protéinase (*HC-Pro*) qui se trouve à l'intérieur des cellules infectées (Fig. 11a). Il s'agit de l'interaction directe entre la CP et *HC-Pro* qui crée des liaisons réversibles du virion à l'appareil buccal de l'aphide (Pirone et Blanc, 1996).

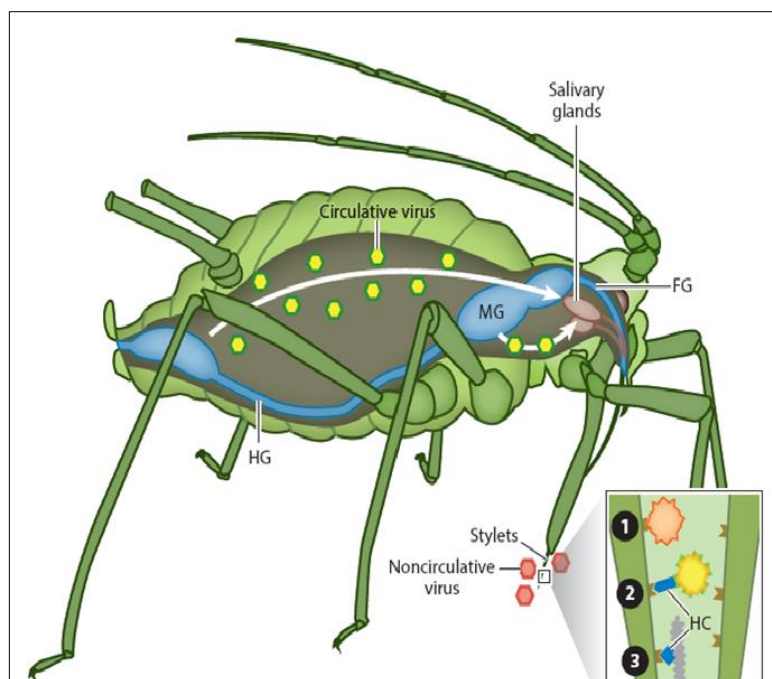
### 2.11.2 Transmission persistante des virus par les pucerons

En mode de transmission circulatoire, les particules virales sont acquies par les pucerons à partir des tubes de sève, qui se diffusent à travers l'hémocèle, puis transportés aux glandes salivaires, ensuite injectés avec la salive lors de l'alimentation sur une plante hôte (Pirone et Blanc, 1996) (Fig. 11b). La transmission persistante des luteovirus implique généralement une relation symbiotique (bactérie-puceron), les symbiontes se localisent au niveau de cellules spécialisées chez le puceron, connues sous le nom de « Bactériocytes » (Dixon, 1998). La symbionine, une protéine bactérienne sécrétée dans l'hémocèle par la bactérie *Buchneraaphidicola* (Sub-Division: Proacteria), dans la majorité des aphides elle forme un complexe avec la capsid de protéine mineure du virus, ce qui est déterminant dans la transmission du virus (Van den Heuvel *et al.*, 1997). La transmission persistante du virus de l'excroissance de veine CVEV (vein enation virus) via *A. gossypii* et *M. persicae* a été démontré par (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1993).

### 2.11.3 Transmission semi-persistante des virus par les pucerons

Durant le processus de transmission semi-persistant, des régurgitations répétées du puceron afin de tester la qualité de la sève pendant lesquelles le virus entre en contact avec une surface large de l'appareil buccal de l'aphide dont la valve et la pompe du stylet permettent la dissémination de l'infection virale de l'insecte à la plante et vice-versa (Harris *et al.*, 1995) (Fig. 11a). La différence entre le mode non-persistant et le mode semi-persistant réside dans la durée de

rétenion au niveau du stylet du puceron (Harris, 1989). Il semble que ce soit lié à l'anatomie particulière de l'espèce de puceron combinée à la dimension physique du virion, en plus des interactions spécifiques virus-vecteur, comme celles qui existent entre les protéines de surface du virion et les protéines présentes dans le stylet (Katis *et al.*, 2007). Chez les potyvirus l'aide-protéinase (*HC-Pro*) est importante dans la transmission du virus (Pirone et Blanc, 1996). Pour Cauliflower mosaic virus (CaMV), l'aide protéine P2 et P3 est indispensable pour la réaction entre les virions et la cuticule de l'aphide (Woolston *et al.*, 1987 ; Leh *et al.*, 2001). Néanmoins, les informations précises sur le mécanisme de transmission (Closterovirus-vecteur) sont rares, mais les protéases de CTV sont de probables acteurs dans la transmission. Par conséquent, CTV-CP, CPm, *HSP70h*, p61 et p20 sont vraisemblablement impliquées dans le processus de transmission par puceron, puisque ces protéines sont présentes à la surface des virions. Il a été démontré déjà que *HSP70h* est impliquée dans la transmission en inhibant les défenses de cellules contre la pénétration du stylet (Peng *et al.*, 2001). Récemment, des expérimentations *in-vitro* sur l'alimentation de *T. citricidus* à travers des membranes artificielles sur des préparations de tissus crus, faite à partir d'écorces infectées par le CTV a permis la transmission du virus à des plants récepteurs à de faibles concentrations ; l'analyse par la technique Western blots a montré la présence du p20, p27 et p25 au niveau de toutes les préparations de tissus crus (Yahiaoui, 2010). En outre, le blocage de la fonction du p20 pour alimenter les pucerons avec leurs anticorps correspondants diminue considérablement l'efficacité de transmission du CTV chez *T. citricidus*, suggérant que le p20 aide à la transmission du virion par *T. citricidus*. On pense que l'association des composantes virales pour l'agrégation des particules du complexe de protéines virales est indispensable au CTV pour être transmissible (Herron *et al.*, 2006). A ce jour, et malgré le peu de connaissances sur le mécanisme d'interactions virus-vecteur chez le CTV, on a pu démontrer que les souches du virus de la Tristeza diffèrent en termes de transmissibilité par les pucerons (Bar-Joseph et Loebenstein, 1973 ; Raccah *et al.*, 1978, 1980). Mais on sait à travers des expérimentations que les souches sévères de CTV sont transmises par *T. citricidus* avec une efficacité plus élevée que les souches modérées, avec une période d'acquisition (AAP) plus courte, et une période de rétention plus longue (Sharma, 1989).



**Fig 11.** Le mode transmission non circulatoire (non-persistante et semi-persistante) et le mode de transmission circulatoire (persistant) (Astier *et al.*, 2001).

Des essais de transmission similaires par *A. gossypii* de trois sous-isolats dérivées de la souche californienne virulente SY568, obtenues de plants de *Mineola Tangelo*, ont confirmé le haut potentiel d’*Aphis gossypii* dans la transmission du sous-isolat responsable du syndrome sévère nommé striure gommeuse (honey combing) (1B) avec un taux d’efficacité de 50%, comparativement aux isolats bénins, dont le taux de transmission était de 30 à 43% (Velazquez-Monreal *et al.*,2009).

**Tab2.** Les phytovirus et modes de transmission par pucerons (Astier *et al.*, 2001)

Vecteur	Non-circulatoire		Circulatoire persistant	
	Non-persistant	Semi-persistant	Non-propagateur	Propagateur
<b>Pucerons</b>	<i>Alfamovirus</i>	<i>Caulimovirus</i>	<i>Enamovirus</i>	<i>Cytorbabbdovirus</i>
	<i>Carlavirus</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Luteovirus</i>	<i>Nucleobabbdovirus</i>
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Sequivirus</i>	<i>Nanovirus</i>	
	<i>Fabavirus</i>	<i>Trichovirus</i>	<i>Polerovirus</i>	
	<i>Macluravirus</i>	<i>Waikavirus</i>		
	<i>Potyvirus</i>			

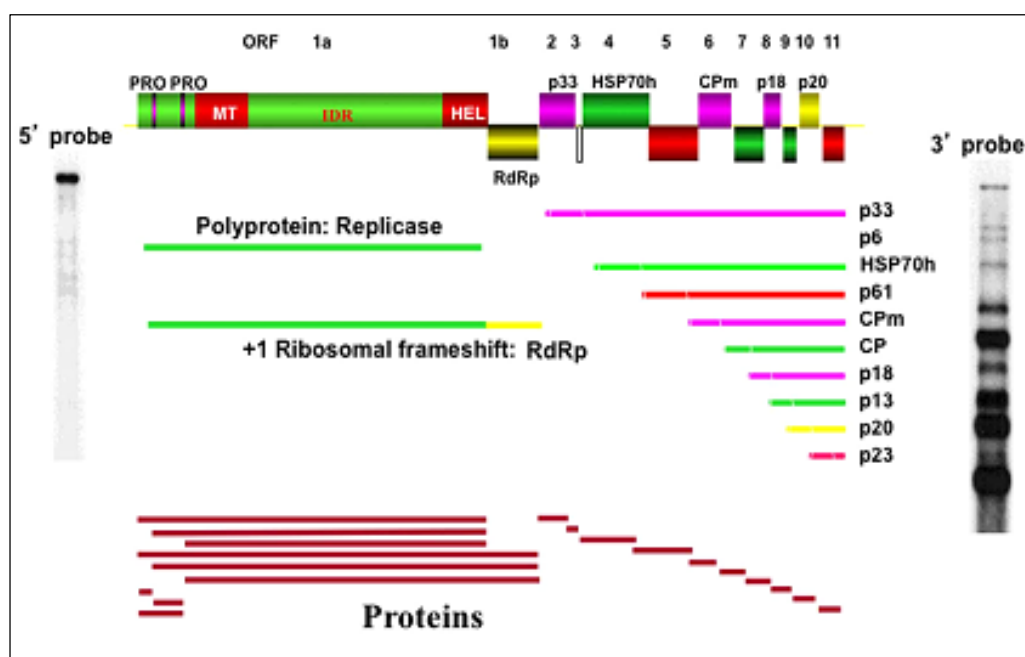
## 2.12 Problématique taxonomique du genre *Aphis*

Les pucerons constituent l'un des groupes les plus importants de ravageurs agricoles dans le monde. Le genre *Aphis* est le plus large, avec 400 espèces, dont 40 sont d'importance agronomique majeure (Blackman et Eastop, 2006). Les espèces du genre *Aphis* utilisent divers hôtes primaires et secondaires de différentes familles botaniques, ce qui rend difficile leur identification sur le terrain. Il se pose un problème d'identification des espèces nuisibles importantes comme *Aphis gossypii* Glover, *Aphis spiraecola* Patch, *Aphis craccivora* Koch et *Aphis fabae* Scopoli (Blackman et Eastop, 2006). L'identification des espèces est particulièrement difficile pour les pucerons immatures en raison de leur petite taille et du fait que certaines races ou biotypes n'ont pas ou ont très peu de différences morphologiques. L'identification précise des pucerons est nécessaire en agriculture en raison des différences entre les espèces, les biotypes et les génotypes en termes de sensibilité aux insecticides et de transmission du virus (Eastop, 1977 ; Ebert et Cartwright, 1997 ; Nauen et Elbert, 2003 ; Shigehara et Takada, 2003 ; Lowery *et al.*, 2006). Par conséquent, différentes méthodes de contrôle devraient être appliquées à différentes espèces, souches ou biotypes. Avant le développement de techniques moléculaires pour étudier les relations évolutives, il y avait peu de rapports sur la phylogénie des espèces *Aphis* en raison de leurs morphologies similaires. La phylogénie chez les pucerons de la tribu d'Aphidini était partiellement basée sur les changements d'utilisation de l'hôte au cours de l'évolution des pucerons (Shaposhnikov *et al.*, 1998). Depuis le développement des techniques moléculaires, les séquences d'ADN mitochondriales ont été utilisées pour étudier l'évolution de nombreux animaux et montrent un potentiel de discrimination des espèces et d'analyses de la biologie des populations (Moritz *et al.*, 1987 ; Simon *et al.*, 1994 ; Zhang et Hewitt, 1997a ; Ballard et Rand, 2005). Il existe de nombreux rapports sur l'utilisation de l'ADN mitochondrial pour étudier la phylogénie des pucerons (Stern, 1995 ; Turcinaviciene *et al.*, 2006 ; Von Dohlen *et al.*, 2006 ; Coccuza *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2011) à des fins de discrimination d'espèces (Raboudi *et al.*, 2005 ; Valenzuela *et al.*, 2007) et même pour la différenciation intra-spécifique entre les pucerons (Boulding, 1998 ; Shufran *et al.*, 2000 ; Delmotte *et al.*, 2001 ; Raymond *et al.*, 2001 ; Anstead *et al.*, 2002). Plusieurs rapports ont été publiés sur la phylogénie des espèces du genre *Aphis* à l'aide de séquences d'ADN mitochondrial et d'ADN nucléaire (Turcinaviciene *et al.*, 2006 ; Coeur d'acier *et al.*, 2007 ; Footitt *et al.*, 2008).

### 2.13 Le génome du CTV

Le CTV est un membre de la famille des closteroviridae, qui contient les plus larges virus à RNA de polarité positive des plantes supérieures (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Dolja *et al.*, 1994 ; Karasev, 2000 ; Dawson *et al.*, 2013). Il est le membre le plus fréquent et le plus complexe des Closteroviridae (Moreno *et al.*, 2008 ; ). Ses virions sont flexueux et filamenteux et mesurent 2 000 nm de longueur et 11 nm de diamètre ; son génome est composé d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive. Le génome de CTV contient 12 cadres ouverts de lecture (ORF) qui encodent au moins 19 protéines (Karasev, 2000), ainsi que deux régions non traduites (UTR) d'environ 107 et 273 nt à l'extrémité 5' et 3' (Hilf *et al.*, 1995). ORFs 1a et 1b code la protéine du complexe de la réplicase, alors que les ORFs 2-11 qui sont répartis sur la moitié terminale 3' du l'ARNg (Fig. 12), codent les protéines p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20 et p23 (Moreno *et al.*, 2008). Les séquences du 5'UTR ont été classées en trois types (I, II et III), mais leurs structures secondaires prédites sont en forme de deux tiges-boucles (stem-loops) séparées par une courte région d'espacement (spacer region) (Lopez *et al.*, 1998). Bien que quelques séquences du 5'UTR sont nécessaires à la réplication et l'assemblage du virion (Godwa *et al.*, 2003 ; Sattanarayana *et al.*, 2004). L'extrémité 3' UTR, qui est une région très conservée (Lopez *et al.*, 1998), est critique pour l'identification par le complexe de la réplicase. La région codante (coding region) de l'ARNg, comprend le module de réplication (ORFs 1a et 1b), un module de cinq gènes (p6, p65, p61, p27 et p25) qui codent les protéines impliquées dans l'assemblage du virion et le transport. Ce module est conservé chez tous les membres de la famille Closteroviridae. Le gène p20 qui est l'homologue du gène p21 du beet yellow virus (BYV), et quatre gènes qui codent des protéines sans qu'ils aient des homologues chez les autres closterovirus (p33, p18 ; p13 et p23) (Dolja *et al.*, 2006). Le cadre ouvert de lecture ORF 1a code une poly-protéine de 349-kDa avec deux domaines de protéase (papaïne-similaire), un domaine type I de méthyltransferase-similaire, et un domaine d'hélicase-similaire portant les motifs de la superfamille I du domaine hélicase. Le cadre ouvert de lecture ORF1b, étend les protéines 1a de 54 kDa, qui contient le domaine d'ARN-dépendant ARN polymérase (RdRp) (Karasev *et al.*, 1995) (Fig. 12). Les protéines codées par le module des cinq gènes comprend une protéine transmembranaire (p6), un homologue de la HSP70 (p65), deux copies divergentes de la capsid de la protéine (p25 et p27) (Pappu *et al.*, 1994 ; Febres *et al.*, 1996), et une protéine additionnelle (p61) considérée aussi comme une copie divergente de la capsid (Dolja *et al.*, 2006). L'homologue du p6 chez le BYV a été démontré qu'il code pour une protéine de mouvement (Peremyslov *et al.*, 2004). L'action coordonnée du p65 et p61, en addition à la protéine de la capsid CP et CPM, est cruciale pour un parfait assemblage du virion (Satyanarayana *et al.*, 2000).

Chez les virions intacts de CTV, la capsid (CP) couvre la majorité d'ARNg et la CPm couvre seulement ~630nt à l'extrémité 5', mais en absence du p65 et p61, la CPm (protéine de la capsid mineure) peut couvrir un segment plus large ou même l'ARNg complet. Ces deux protéines se lient probablement à la zone de transition entre la CP et la CPm (Satyanarayana *et al.*, 2004). Chez d'autres closterovirus l'homologue du p65 et le p61 sont assemblés à la CPm qui est intégrée à la structure du virion et reste attachée au virion (Tian *et al.*, 1999 ; Alzhanova *et al.*, 2007). La protéine p20 est la composante majeure de la production des corps d'inclusion amorphes dans les tissus du phloème infecté (Godwa *et al.*, 2000), et la p23, comme un ARN liant des protéines (Lopez *et al.*, 2000) ; elle régule l'accumulation asymétrique des brins positifs et négatifs pendant le processus de réplication (Satyanarayana *et al.*, 2002). Les deux gènes p20 et p23 ainsi que le gène de la protéine de capsid p25, agissent comme des suppresseurs des extincteurs de gènes chez *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum*, et le p23 inhibant l'extinction intercellulaire, CP extinction intracellulaire, et p20 l'inter et intracellulaire extinction (Lu *et al.*, 2004). Les virions mutants par suppression des gènes p33, p18 et p13 étaient capables à la réplication et l'assemblage (Satyanarayana *et al.*, 1999 ; Dawson *et al.*, 2013), ce qui indique que ces gènes ne sont pas indispensables à cette fonction. Leur rôle dans la biologie du CTV était inconnu, néanmoins un examen supplémentaire du rôle des gènes p33, p18 et p13 dans une large gamme d'espèces d'agrumes a montré leur importance dans les infections systémiques (Tatineni *et al.*, 2011).



**Fig 12.** Schéma de l'organisation génétique du *Citrus Tristeza virus* (CTV) montrant les cadres de lecture (ORFs) de chaque gène (Dawson *et al.*, 2013).

D'autres molécules d'ARN ont été mises en évidence ; Il s agit des ARNs défectifs (dARNs), qui sont des unités d'ARN du virion contenant les extrémités du 5' et le 3' d'un ARNg normal avec absence des différentes portions internes (Mawassi *et al.*, 1995). Ils sont variables entre isolats, et on suppose qu'ils ont un rôle dans l'expression des symptômes de la jaunisse des jeunes plants SY (Yang *et al.*, 1999). Les isolats du CTV sont fréquemment présents comme un complexe de différentes populations d'ARN génomique associées à de nombreuses propriétés, accompagnées de diverses dARNs de taille, abondance et séquences variables (Lutting *et al.*, 2002). Dans ce contexte, une courte séquence ssRNA de 0.8 kb dépourvue de capsid et qui comporte la partie terminale 5' du génome de CTV avait été isolée à partir d'un plant infecté (Mawassi *et al.*, 1995).

## 2.14 Détection et caractérisation des souches de CTV

### 2.14.1 Indexation biologique

L'indexation biologique vise à détecter la présence de CTV dans des obtentions et estimer l'agressivité de l'isolat sur de jeunes plants de *Citrus aurantifolia* (limette mexicaine, Keyou Omani), L'oranger doux *Citrus sinensis* (Variété: Madame Vinous), *Citrus macrophylla* ou *Citrus paradisi* Mac fadyen (Variété : Duncan). La plante indicatrice est un greffon inoculé selon les méthodes classiques et entretenu dans des conditions usuelles (Roistacher, 1991), l'essai se fait sur quatre à six réplicas. Les symptômes illustrés dans le Tableau 3 constituent chacun une replication de l'infection par le CTV du greffon inoculé aux plantes indicatrices sensibles.

**Tab 3.** Indexage du CTV par Garnsey *et al* (1991).

Plante indicatrice	Symptômes	Période d'évaluation (mois après-inoculation)			
		2	4	6	12
Limette mexicaine	VC, LC	×	×	×	
Limette mexicaine	SP			×	×
Oranger/Bigaradier	CH, FL, ST		×	×	×
Bigaradier	CH, ST	×	×	×	
Pamplemoussier Dunkan	CH, ST	×	×	×	
Pamplemoussier Dunkan	SP				×
Madame Vinous	ST, SP				×

VC: éclaircissement de nervures; LC: feuilles en cuillère; CH: chlorose; FL: floraison; ST: rabougrissement; SP: striure du bois

On compare les symptômes qui apparaissent sur les échantillons à ceux des témoins positifs et négatifs. Des illustrations des symptômes causés par CTV sur les plantes indicatrices sont fournies par Roistacher (1991) et Moreno *et al* (2008). L'indexation biologique est largement employée dans les systèmes de certification, car cette méthode est jugée sensible et fiable pour la détection des souches de CTV nouvelles ou inhabituelles (Tab. 3). Vidal *et al* (2012) a comparé l'indexation du limettier mexicain à l'essai de culture directe sur empreinte de tissus (DTBIA) et la technique DAS-ELISA (avec les anticorps monoclonaux (3DF1+ 3CA5) et l'analyse (RT-PCR) et a conclu que, pour détecter le CTV, ces deux méthodes en laboratoire pouvaient se substituer à la méthode classique d'indexation du limettier mexicain en conservant la même exactitude (CIPV, 2016).

### 2.14.2 Techniques sérologiques

Les techniques sérologiques ont été utilisées depuis les années 70. ELISA (Enzyme- Linked Imunosorbent Assay) et la culture directe sur empreinte de tissus combinée à un essai ELISA, également appelée immuno-empreinte ELISA ou DTBIA (*direct tissue blot immunoassay*) sont des techniques de routine pour la détection du CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000a et Lin *et al.*, 2000). La technique DTBIA est plus rapide. Dans la région des Pouilles (Sud de l'Italie) cette technique a été utilisée à la place de la DAS-ELISA dans une enquête de CTV à grande échelle, plusieurs foyers ont été décelés (Djelouah et D'Onghia, 2001b). Plusieurs antisérums monoclonaux ont été produits pour de nombreux isolats, détectant efficacement la majeure partie des isolats. Des anticorps monoclonaux (Mabs) ont été aussi développés (Vela *et al.*, 1986 ; Permar *et al.*, 1990); certains réagissent à des épitopes qui sont bien conservés chez diverses isolats. Il existe des mélanges d'anticorps monoclonaux qui détectent toutes les souches de CTV avec une spécificité, une sensibilité et une fiabilité satisfaisantes, mais certains anticorps polyclonaux ne sont pas spécifiques et offrent une sensibilité limitée (Cambra *et al.*, 2000a, 1990, 1982). C'est la raison pour laquelle il est recommandé d'appliquer des méthodes supplémentaires lorsque l'analyse repose sur des anticorps polyclonaux (CIPV, 2016). Alors que quelques anticorps monoclonaux (Mabs) sont spécifiques, le MCA13 est utilisé pour distinguer les isolats modérés, des isolats causant le déclin et le bois strié en Floride (Permar *et al.*, 1990).

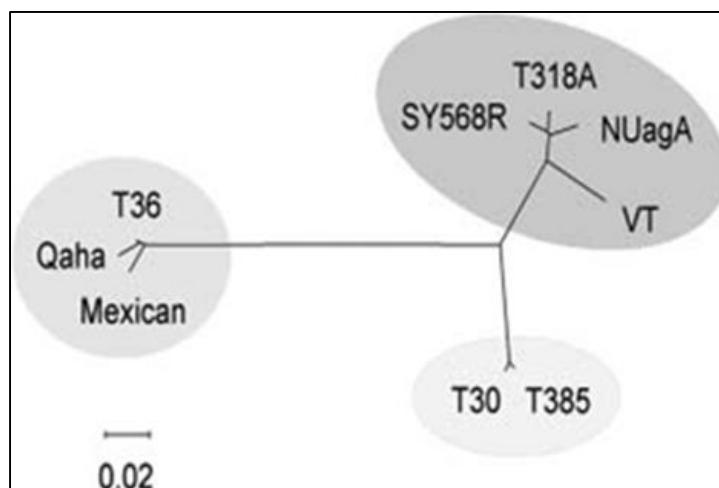
### 2.14.3 Analyses moléculaires

L'élucidation de la séquence nucléotidique complète de l'ARN génomique de CTV a permis de mettre au point diverses procédures de diagnostics fondées sur la détection spécifique de l'ARN viral, notamment des méthodes d'hybridation moléculaire faisant appel à des sondes à l'acide nucléique complémentaire (ADNcou ARNc) ainsi que plusieurs essais de type RT-PCR (Moreno *et al.*, 2008). Les méthodes RT-PCR ont considérablement amélioré la sensibilité de la détection, permettant de quantifier les copies d'ARN viral dans les tissus infectés des agrumes ou chez les espèces de pucerons virulifères de CTV (Bertolini *et al.*, 2008), telle que la technique RT-PCR à point final avec traitement de post-amplification (électrophorèse sur gel) et la RT-PCR en temps réel qui permet d'éviter les traitements post-amplification. On devrait extraire l'ARN en suivant les protocoles validés appropriés, sauf dans le cas du protocole combinant immuno-capture et RT-PCR (IC-RT-PCR), qui ne requiert pas d'isolement de l'acide nucléique. Les échantillons devraient être placés dans des sachets en plastique individuels en vue d'éviter la contamination croisée pendant l'extraction. Une autre solution consistait à analyser des gouttes d'extraits de plantes, des empreintes de sections de tissu ou du matériel végétal écrasé par immobilisation sur du papier buvard ou des membranes en nylon puis RT-PCR en temps réel (Bertolini *et al.*, 2008). Si une PCR classique est employée, il est déconseillé d'analyser l'échantillon sous forme de gouttes d'extrait ou d'empreintes de tissus, car cette méthode PCR est moins sensible que la RT-PCR en temps réel et peut donner de faux négatifs. Des études menées par Niblett *et al.* (2000) ont suggéré que le polymorphisme nucléotidique (SNP) au niveau du gène très conservé de la capsidie protéique CP25 était suffisant pour prévoir simultanément les symptômes et différencier les souches.

### 2.15 Diversité génétique du CTV

L'analyse des séquences de l'ARN génomique de CTV a montré que le degré et le schéma de la diversité de séquences varie d'un isolat à un autre (Hilf *et al.*, 2005). Les génomes d'isolats de CTV sont conservés à l'extrémité 3'UTR (8kb), avec une identité de  $\geq 90\%$  entre isolats (Hilf *et al.*, 2005), alors que la plus variable région est la 5'UTR (11kb), avec un taux de similarité de 40% seulement entre les séquences de certains isolats (Lopez *et al.*, 1998 ; Vives *et al.*, 1999 ; Albiach-Marti *et al.*, 2000a ; Suastika *et al.*, 2001). Inusuelles variations sont observées aussi au niveau des régions codantes et même au niveau des gènes, cela est probablement le reflet de la pression sélective sur l'ARNg (Moreno *et al.*, 2008). Les facteurs qui modifient les populations de CTV sur terrain sont les mutations, les recombinaisons entre diverses séquences divergentes, la sélection, l'expression génétique et mouvement de gènes dus aux inoculations répétées chez

les arbres des vergers et le mouvement du matériel végétal infecté entre régions. Les mutations dues aux erreurs lors du processus de réplication qui caractérise l'ARN dépendant ARN polymérase (RdRp) est le principal mécanisme générant la diversité (Moreno *et al.*, 2008). Les populations de CTV sont aussi affectées par la dispersion naturelle du virus.



**Fig13.**Arbre phylogénétique (Neighbour-joining) calculé avec la séquence de nucléotides complète d'ARN génomique de 9 isolats de CTV par l'utilisation de 1000 bootstrap. La longueur de ramifications indique les distances génétiques. Les trois grappes obtenues incluent des souches sévères induisant la jaunisse des jeunes plants (SY) et le bois strié sur oranger et pamplemoussier (SP) (T318A, SY568R, NuagA et VT), souches modérées (T30 et T385) et un groupe d'isolats à caractéristiques intermédiaires (T36, Qaha et Mexican) (Moreno *et al.*, 2008).

La culture des agrumes étant pérenne, les arbres peuvent être inoculés par les pucerons à répétition avec des souches divergentes de CTV, ce qui augmente la diversité génétique (Kong *et al.*, 2000 ; Rubio *et al.*, 2001 ; Ayllon *et al.*, 2006). La distribution hétérogène de différentes séquences dans un arbre infecté et/ou la sélection au hasard de certain d'eux lors de l'acquisition par les pucerons est une contribution additionnelle aux changements des populations de CTV dans les vergers (d'Urso *et al.*, 2000, 2003 ; Sambade *et al.*, 2007). La présence de séquences divergentes dans un isolat de CTV augmente aussi la variation génétique via les recombinaisons (Vives *et al.*, 2005). Par contre, le mouvement du matériel végétal infecté tend à réduire la diversité génétique entre régions créant une population unique de CTV. Par exemple les isolats de Californie et d'Espagne sont génétiquement identiques (Rubio *et al.*, 2001). Bien que le CTV semble génétiquement stable dans certain hôtes, l'intervention de l'humain par les différentes combinaisons greffon/porte-greffe sous différentes conditions environnementales a peut-être généré des variabilités génétiques (Moreno *et al.*, 2008). L'analyse phylogénétique de la séquence complète de neuf isolats a révélé trois principaux groupes : (1) les souches sévères (SP) T318A d'Espagne (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007), SY568R de Californie (Yang *et al.*, 1999 ; Vives *et al.*, 2005),

NuagA du Japon (Suastika *et al.*, 2001) et le VT du Moyen Orient (Mawassi *et al.*, 1996) ; (2) les souches modérées T30 de Floride (Albiach-Marti *et al.*, 2000b) et T385 d'Espagne (Vives *et al.*, 1999), et (3) les isolats T36 de Floride qui est un isolat sévère induisant le déclin (Pappu *et al.*, 1994 ; Karasev *et al.*, 1995), Qaha d'Egypte (AY340974) et l'isolat Mexicain (DQ272579) (Fig. 13). La similarité dans le groupe est estimée à 97,5%. Alors que les plus bas taux de similitudes sont enregistrés entre la souche VT et Qaha (75,6%) et une variation de 44.45% entre l'isolat T385 et T36 (Lopez *et al.*, 1998). Plus récemment et sur la base de l'analyse du génome complet, les souches de CTV ont été classées en sept groupes de séquence : T36, VT, T3, RB, T68, T30 et HA16-5. Cependant, des variations de virulence se produisent dans ces groupes dans la mesure où la virulence seule ne devrait pas être un caractère déterminant d'un phénotype (Dawson *et al.*, 2015 ; Yokomi *et al.*, 2018).

## 2.16 Identification des souches de CTV

On peut identifier les souches de CTV au moyen d'analyses biologiques, sérologiques ou par amplification moléculaire.

### 2.16.1 Indexation biologique

Au moyen d'une gamme de plantes indicatrices comme *C. aurantifolia*, *C. macrophylla*, *C. sinensis* (variété Madame vinous) ou *C. paradisi* (cultivar Duncan), pour évaluer le bois strié, ou de jeunes plants de *C. aurantium* ou *C. limon*, pour évaluer la jaunisse (Roistacher, 1991 ; Ballester-Olmos *et al.*, 1993).

### 2.16.2 Sérologie

Réactivité à l'égard de l'anticorps monoclonal MCA13 (Permar *et al.*, 1990), qui reconnaît un épitope bien conservé chez les souches sévères (agressives) de CTV mais absent des souches bénignes (moins agressives) cette réactivité des isolats au MCA13 est conférée à la présence de l'acide aminé phénylalanine (F) à la position 124 de la séquence d'acides aminés de la protéine d'enveloppe (Pappu *et al.*, 1993). Cet anticorps monoclonal est réactif aux souches les plus sévères de CTV (Permar *et al.*, 1990). Les souches virulentes induisent le déclin rapide, le bois strié, l'arrêt de croissance et la jaunisse des jeunes plants.

### 2.16.3 Techniques moléculaires

Bien que certaines souches de CTV ont été classées selon leur phénotype, leur virulence et leur gamme de plantes hôtes, la composition des épitopes et plus récemment, la séquence propre à un ou plusieurs gènes (Moreno *et al.*, 2008), la corrélation nette avec le comportement biologique reste peu définie (Hilf *et al.*, 2005 ; Yokomi *et al.*, 2018). Néanmoins, une stratégie PCR avait été mise en place pour la discrimination entre isolats génétiquement similaires et géographiquement distinctes à travers l'amplification de séquences d'ADN de tailles similaires (Marqueurs moléculaires), désignés au niveau du cadre ouvert de lecture (ORF1) du l'ARNg relatif aux souches de référence VT, T3, T30 et le T36 (Hilf *et al.*, 1999 ; Hilf et Garnsey, 2000 ; Ayllon *et al.*, 2001 ; Hilf *et al.*, 2005). La technique des marqueurs moléculaires multiples (M.M.M) a été utilisée avec succès dans la caractérisation et l'évaluation des appartenances génétiques de trois cent soixante-douze (372) isolats de CTV qui constituent la collection internationale des pathogènes exotiques des agrumes (Garnsey *et al.*, 1991 ; Hilf *et al.*, 2005).

### 2.17 Altération génomique de la population virale de CTV par la transmission par pucerons

Les isolats de CTV peuvent contenir différentes variétés de séquences et certaines pourraient s'altérer après transmission par pucerons vecteurs ou par greffage à un nouvel hôte (Moreno *et al.*, 2008). Des sous-isolats générés par ces deux voies quelques fois connaissent quelques divergences chez la population virale d'isolat source. La séparation des variétés de CTV des isolats collectés depuis les vergers après passage par pucerons vecteurs a été rapporté dans plusieurs études (Gillings *et al.*, 1993; Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Brlansky *et al.*, 2003 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Yahiaoui *et al.*, 2015). Le puceron brun des agrumes *Toxoptera citricidus* est souvent associé à la transmission efficace des souches sévères de bois strié SP et les variations dans les séquences après passage par pucerons (Yokomi *et al.*, 1994). De même, des sous isolats modérés ont été quelques fois générés après la transmission de souches plus sévères par *A. gossypii* (Yokomi *et al.*, 1989). Inversement, ce dernier vecteur a induit l'émergence de sous isolats sévères de bois strié SP sur pamplemoussier et orangers doux à partir d'une souche modérée (B192) (Brlansky *et al.*, 2003).

Dans certains cas la transmission de CTV par pucerons altère l'expression des symptômes et les caractéristiques pathogénique d'un isolat (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a; Moreno *et al.*, 1993a et Broadbent *et al.*, 1996), ainsi que sa réactivité sérologique vis-à-vis des anticorps monoclonaux (Kano et Koizumi, 1991 ; Cambra *et al.*, 1993). Des analyses par la technique RFLP

d'un ADNc du gène de la protéine de la capsid P25 afin de différencier des isolats de CTV ont révélé la disparition d'un marqueur après passage via pucerons (Gillings *et al.*, 1993).

Une analyse SSCP, qui est efficacement utilisée pour la détection des SNP (single nucleotide polymorphism) au niveau du p25 des isolats de CTV, a montré son utilité dans l'analyse génomique du CTV et sa variabilité après passage d'un hôte à un autre (Rubio *et al.*, 1996, 2000). A travers des investigations récentes, une caractérisation des isolats inoculés par *A. gossypii* et qui proviennent de la souche californienne (SY568) a été réalisée sur le gène p65 (HSP) par la technique RPAs (RNase protection assay) ; cette dernière a révélé que la plupart des variétés obtenues étaient prédites être sévères dans la nature, et elle a causé quelques cas de bois strié, rabougrissement et subérification de veines, sauf pour un isolat (1B-a4) qui a été révélé modéré (Velazquez-Monreal *et al.*, 2009). Un puceron vecteur peut sortir d'une seule feuille quelques variétés du complexe existant sans qu'elles ne soient dominantes, et transmettre une sous-population différente de l'isolat source, par conséquent, quelques variétés minoritaires de l'ancienne source vont devenir majoritaires et donner naissance à une nouvelle souche avec des caractéristiques nouvelles (d'Urso *et al.*, 2000).

## 2.18 Gestion de la maladie de la Tristeza

La stratégie de gestion de la Tristeza diffère selon la prévalence et la sévérité des souches de CTV présentes (Garnsey *et al.*, 1998 ; Lee et Bar-Joseph, 2000), la combinaison greffon/porte greffe prédominante et la population de vecteur dominante au niveau de chaque zone (Garnsey *et al.*, 1998). Le contrôle de CTV devient extrêmement difficile une fois installé dans une région surtout si leurs vecteurs naturels sont aussi présents. La meilleure mesure pour éviter l'infection ou la dissémination dans des régions indemnes de CTV, doit inclure des mesures strictes de quarantaine, couplées à un programme de certification rigoureux de matériel de propagation, surtout dans les zones où le bigaradier est le porte greffe dominant (Navarro *et al.*, 2002), ce qui est le cas au niveau de la plaine de Chlef.

Il n'y a pas de stratégie de contrôle standard contre le CTV applicable à toutes les situations (Garnsey *et al.*, 1996), par conséquent plusieurs approches ont été utilisées pour contrôler les pertes causées par la maladie (Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Rocha-Peña *et al.*, 1995). L'éradication d'arbres infectés est la juste mesure afin d'éviter ou retarder une épidémie, si le CTV est en faible incidence et les arbres contaminés sont groupés en nombre limité (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Kyriakou *et al.*, 1996; Gottwald *et al.*, 2002 ; Yokomi *et al.*, 2018).

Si l'incidence est au-dessous de 3%, les mesures d'éradication peuvent offrir divers degrés de réussite (Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Dodds *et al.*, 1994). Si les arbres infectés dans les vergers peuvent être éliminés en nombre plus grand que l'initiation de nouvelles infections, le maintien de l'incidence à un seuil gérable est possible (Dodds *et al.*, 1994). Une fois que le seuil dépasse les 5%, la stratégie de d'éradication devient difficile à appliquer, en conséquence d'autres mesures s'imposent (Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Dodds *et al.*, 1994).

### **2.18.1 Exclusion et quarantaine**

Quand le CTV est absent ou rare, des efforts préventifs devraient être faits afin d'éviter l'introduction de l'épidémie dans la zone de la culture par une mesure de quarantaine sur le matériel végétal vivant. La méthode la plus pratique est de limiter les importations aux zones connues indemnes du virus, pour éviter aux agriculteurs de recourir à des voies illégales d'introduction de nouvelles variétés et germoplasmes (Frison et Taher, 1991).

### **2.18.2 Programmes de certification**

La certification est devenue un outil très important pour l'amélioration de la qualité des plants utilisés, aussi bien du point de vue variétal que sanitaire. Le contrôle méticuleux du matériel de propagation reste l'unique meilleur moyen pour éviter l'extension rapide de l'épidémie de la Tristeza (D'Onghia, 2009). La plupart du matériel végétal agrumicole est multiplié par l'utilisation de greffons à partir de variétés sélectionnées greffés sur plantules nucellaires. Le bois de multiplication est obtenu généralement depuis un arbre vigoureux est directement utilisé dans les pépinières pour produire le maximum de plants à partir d'une seule source. Donc la propagation du matériel végétal infecté par le CTV peut être évitée par l'usage de plantes mères indemnes de maladie de CTV protégées des infections naturelles par les serres d'isolation ou l'utilisation des cultures *in vitro* et micro greffage (Navarro, 1993).

### **2.18.3 Éradication et suppression**

Si quelques arbres seulement sont détectés contaminés par le CTV dans une région indemne de la maladie, et que les espèces de pucerons locales ne sont pas considérées d'efficaces vecteurs, la dissémination naturelle peut être freinée par un programme d'éradication et de suppression. Néanmoins, une campagne de dépistage est cruciale, car les arbres malades doivent être immédiatement éradiqués et la surveillance maintenue (Garnsey *et al.*, 1996). L'éradication est rarement efficace quand la maladie est installée, spécialement en présence de pucerons vecteurs efficaces (D'Onghia, 2009).

#### 2.18.4 Tolérance des hôtes

Quand la stratégie d'éradication atteint ses limites, due à la dispersion rapide du CTV à travers les vecteurs, la propagation des agrumes sur des porte greffes tolérants/résistants est la seule option viable pour gérer le CTV (Garnsey *et al.*, 1987a ; Moreno *et al.*, 2008). Bien qu'un nombre de facteurs limitants rend compliqué le choix de combinaisons greffons/porte greffes résistantes ou tolérantes dans une zone contaminée par la Tristeza telles leurs réponses aux sols alcalins, salés, lourd ou encore vis-à-vis des maladies telluriques (*Phytophthora*) et d'autres maladies de dégénérescence à l'instar du greening (HLB) (Román *et al.*, 2004 ; Sétamou *et al.*, 2012). *Poncirus trifoliata* et ses hybrides (Carrizo, troyer et C35), Swingle citrumelo et Rangpur lime sont parmi les porte greffes les plus utilisés contre le CTV (Albiach-Marti *et al.*, 2004). L'utilisation de Rough limon et le mandarinier comme porte-greffe à la place du bigaradier a permis une meilleure production des oranges en Afrique du Sud malgré la coexistence de souches sévères et le puceron brun des agrumes (*Toxoptera citricidus*) (Bar-Joseph *et al.*, 2002).

#### 2.18.5 Protection croisée

En cas de dissémination de souches sévères de bois strié (SP), l'utilisation de la résistance spécifique au virus ou de variété protégée par croisement avec des souches atténuées appropriées est nécessaire. Cette approche a résolu le problème de baisse de production et la réduction de calibre des fruits de variété économiquement importante en Brésil tel que l'oranger Pera (Costaet Müller, 1980), et le pamplemoussier Marsh en Afrique de sud (VanVuuren *et al.*, 1993). Des isolats protecteurs ont été sélectionnés depuis les arbres de vergers de quelques cultivars qui ont vécu plusieurs années sans manifester de significatifs symptômes de la maladie. Il a été démontré que ces arbres sont restés protégés d'infections des souches agressives de bois strié (SP), et ils ont même été utilisés comme pieds mères sources de greffons pour la production de plants de pépinières. Mais, la même stratégie de protection a eu un succès limité dans d'autres zones ou avec différentes variétés (Ieki et Yamaguchi, 1988; Müller *et al.*, 1988 ; Broadbent *et al.*, 1991), indiquant que la protection croisée dépend probablement des variétés, souches de CTV et les conditions environnementales qui caractérisent chaque région (Roistacher *et al.*, 2010). Le mécanisme réel qui régit la protection croisée entre les races de virus reste peu clair. La responsabilité de la capsid de protéine ou l'ARN médiateur alimente le débat depuis des années (Fraser, 1998). Bien qu'on ne peut pas exclure le rôle de la capsid de protéine, extinction de gène en post-transcription (PTGS), un processus induit par l'ARN bi-caténaire dsARN, est récemment devenu l'hypothèse la plus cohérente qui explique le mécanisme d'auto-défense de la plante contre les infections virales et la protection croisée entre les convergentes souches de

virus (Covey *et al.*, 1997 ; Ratcliff *et al.*, 1997, 1999). Alors que Fagoaga *et al.* (2006) a observé une accumulation importante de petites particules virales interférentes (si)-ARNs chez des plants de lime mexicaine inoculés par le CTV ; ceci suggère que dans les cellules protégées par la protection croisée. Les (si)-ARNs générés par les souches virales atténuées peuvent prévenir des tentatives d'infection par les variantes agressives.

### 2.18.6 L'amélioration génétique pour la résistance

Les croisements réalisés pour but d'incorporer des gènes de résistance chez les cultivars commerciaux est considéré comme la meilleure approche afin d'éviter des pertes causés par les pathogènes, mais différentes fonctions liées à la biologie des agrumes, particulièrement leurs complexes biologiques, génétiques et de reproduction, ainsi que la grande taille des arbres ont considérablement freiné l'amélioration génétique à travers les croisements conventionnels (Moreno *et al.*, 2008).

Même si les traits de résistance au CTV ont été observés chez quelques espèces d'agrumes (Garnsey *et al.*, 1987a; Fang et Roose, 1999 et Asíns *et al.*, 2004), la résistance est largement présente chez d'autres agrumes appartenant à d'autres genres de la sous-famille des Aurantioideae, dont quelques espèces de *Fortunella*, *P. trifoliata*, *Severinia buxifolia* et *Swingle aglutinosa* (Garnsey *et al.*, 1987a; Yoshida, 1996 ; Mestre *et al.*, 1997 a,b). Une attention particulière avait été dédiée au *Poncirus trifoliata* qui a montré une résistance à la majorité des souches de CTV, en plus de sa comptabilité entant que porte greffe avec les *Citrus spp.* Cette résistance est associée à un seul locus de gènes dominants (*CTv*), qui a été en fur et à mesure très bien caractérisé (Yoshida, 1985, 1993; Gmitter *et al.*, 1996; Mestre *et al.*, 1997a; Fang *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2003). La taille du fragment *CTv* a été estimée à 121 kb et comprend dix gènes (Rai, 2006).

### 2.18.7 Résistance dérivée des agents pathogènes

La première démonstration de la résistance dérivée des agents pathogènes ont été illustré par l'incorporation du gène de la capsid CP issu d'une souche sévère ou d'une souche modérée à des limettes mexicaines (Domínguez *et al.*, 2002). L'inoculation transgénique a provoqué deux réponses : (1) la plupart des plants ont développé les mêmes symptômes que les plants témoins ; et (2) quelques plants ont exhibé un comportement de résistance, environ 10-33% de plants sont devenus immunes, et d'autres ont montré un retard significatif dans l'expression de symptômes. Ghorbel *et al.* (2001) ont exploré l'expression de gène p23 dans un plant transgénique comme

méthode potentielle pour interférer dans des infections normales de CTV. De façon inattendue, les symptômes typiques induits par le p23, ressemblent à ceux incités par le CTV chez des plants non transgéniques. Ces résultats indiquent que le p23 est un important déterminant de pathogénicité chez le CTV qui interfère avec le développement, spécialement chez la famille des rutacées (Fagoaga *et al.*, 2005). La résistance dérivée des agents pathogènes est efficace contre le CTV dans ses hôtes naturels, mais d'autres facteurs en plus du contexte génétique des plantes transgéniques peuvent affecter la résistance phénotypique manifestée par la propagation des plantes transgéniques. Que ce soit les plantes d'agrumes transgéniques exprimant des séquences dérivées de CTV qui puissent être une alternative efficace à la protection croisée pour contrôler les dommages du syndrome du bois strié (SP), ou la résistance au déclin dus à la Tristeza qui pourrait être incorporée chez le bigaradier, les deux techniques nécessitent des profondes expérimentations (Moreno *et al.*, 2008).

### 2.18.8 Contrôle des pucerons vecteurs

Le contrôle des vecteurs devrait être l'une des composantes d'une stratégie de gestion intégrée et durable de la maladie, puisque le CTV n'est transmis que par les pucerons vecteurs qui colonisent les agrumes. Les populations de pucerons sur les agrumes sont souvent trop variables pour fournir suffisamment d'ennemis naturels pour un contrôle efficace du vecteur (Tremblay *et al.*, 1978a). Parmi les ennemis naturels connus pour leur efficacité contre les pucerons, citons les coccinelles (Coleoptera: Coccinellidae), les syrphes (Diptera: Syrphidae), les chrysopes (Neuroptera: Chrysopidae) et les guêpes (Hymenoptera: Braconidae) (Labdaoui *et al.*, 2018). Comme les nouvelles pousses de végétation ne sont disponibles que durant les périodes limitées de l'année, les pucerons des agrumes se rencontrent souvent dans le temps et dans l'espace et tendent à être attaqués par la même gamme d'antagonistes (Michaud et Alvarez, 2000). Mais les agents biologiques colonisent de nouvelles zones plus lentement que leur hôte, la réalisation de lâchers de parasitoïdes élevés en masse au niveau de divers sites devraient être périodiquement effectués en addition à la lutte biologique par conservation des ennemis naturels locales (Wellings, 1994). Bien que les insecticides puissent ne pas agir assez rapidement pour prévenir l'infection primaire par les pucerons virulifères, la réduction des populations de pucerons diminuerait la propagation secondaire. L'efficacité du contrôle insecticide dépend de la longévité de la rémanence et l'efficacité de la molécule utilisée et de l'étendue de la zone traitée par rapport au réservoir d'inoculum et à l'activité migratoire du puceron (Ando *et al.*, 1992 ; Knapp *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2002). Le contrôle insecticide des populations de vecteurs peut être utile dans la réduction des infections secondaire (Gourmet *et al.*, 1994) et dans des situations spécifiques, telles que dans les

pépinières d'agrumes, et aux parcs à bois. Les insecticides systémiques résiduels avec un impact minime sur les auxiliaires sont recommandés. La concentration de CTV est plus élevée au moment de la poussée de sève printanière et automnale. Les populations de pucerons atteignent aussi leur optimum en même moment, et par conséquent, ces périodes devraient être ciblées pour entamer des actions de lutte (Yokomi, 2009b).

### **2.18.9 La vulgarisation et la formation**

La sensibilisation est au cœur d'un programme de surveillance réussi (Djelouah *et al.*, 2009), c'est pourquoi les activités de vulgarisation doivent être menées de manière intensive à tout moment de la surveillance, que la maladie soit présente ou non (Djelouah *et al.*, 2009). Seule la vulgarisation peut progressivement sensibiliser les parties prenantes (agriculteurs, associations professionnelles, organismes publics, etc.) aux risques liés à la propagation de cette maladie dans une région. En effet, il s'agit d'une véritable catastrophe naturelle qui peut balayer l'industrie des agrumes dans un pays (Roistacher et Da Graça, 2006) et entraîner de graves répercussions socio-économiques, mettant également en danger les ressources paysagères d'un territoire. Cette campagne d'information doit être menée en mobilisant les experts techniques impliqués dans l'étude et le contrôle du virus, et par le biais de la communication utilisant différents supports (brochures, affiches, vidéos, publicités télévisées, cours, ateliers, sites Web, etc.). La formation des responsables de la surveillance et le diagnostic du CTV est fondamentale pour le succès de toutes les opérations qui doivent être effectuées dans le respect des lois en vigueur, en temps utile et avec professionnalisme (Djelouah *et al.*, 2009).

### **2.18.10 Gestion intégrée de la maladie**

L'incidence et la propagation du CTV est un processus complexe qui est influencé par les interactions entre la plante, le pathogène et le vecteur. Les approches conventionnelles sont en général orientées vers un ou plusieurs paramètres de contrôle du CTV. Une stratégie de protection intégrée de la maladie devrait incorporer le maximum d'éléments on se basant sur les connaissances fondamentales de la maladie (Garnsey *et al.*, 1996)

### 3 Matériels et méthodes

#### 3.1 Description de la zone d'étude

L'étude a été menée essentiellement au niveau des principales zones agrumicoles de la plaine de Chlef. La zone d'étude se situe dans le Bassin de oued Chlef (le Haut, le Moyen et le Bas Chlef), elle est limitée au nord-est par le plateau de Djendel, et circonscrite au nord par les massifs de Dahra et de Zakkar et bordée au sud par les contreforts de l'Ouarsenis ; à son extrémité sud-ouest elle est reliée à la plaine de la Mina. La partie ouest de la plaine fait partie du Bassin versant de la Mina. La zone d'étude couvre 12 communes des wilayas de Chlef et d'Ain Defla (Fig. 14 et Fig. 18).



**Fig14.** Position géographique de la zone d'étude (photo Google Earth®).

#### 3.2 Enquête sur la présence et distribution des espèces de pucerons vecteurs de CTV

Le point de départ de notre travail a consisté, dans un premier temps, en un suivi de treize (13) vergers d'agrumes situés au niveau de huit (8) régions différentes de la Vallée de Chlef (Tab. 4) pendant la poussée de sève printanière allant de Mars à Mai 2016. Cette surveillance avait comme objectif l'acquisition de connaissances sur l'identité des espèces existantes, leur fréquence, leur abondance et leur répartition. Selon Dawson *et al* (2015) l'abondance des populations de pucerons et la prédominance des espèces dans chaque région sont des facteurs épidémiologiques cruciaux de la maladie de la Tristeza. Par conséquent, cette étude était nécessaire pour approfondir la

compréhension du rôle des espèces identifiées dans l'épidémiologie de la maladie. Cette étape a précédé les essais de transmission du virus de la Tristeza par les pucerons. Au niveau de chaque verger, sur dix (10) arbres on a procédé à un prélèvement hebdomadaire de dix 10 jeunes pousses. Les échantillons ont été collectés de façon aléatoire et placés dans des sachets en polyéthylène étiquetés portant les informations nécessaires. L'identification des espèces de pucerons a été réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques (Fig. 16), grâce à la clé dichotomique universelle de Blackman RL et Eastop VF (2006). Les notations des taux d'infestation, fréquence et abondance des pucerons rencontrés ont été calculés selon la formule de Dajoz (2016).

**Tab4.** Liste des vergers ayant servi à l'observation et au prélèvement d'échantillons.

Wilaya	Commune	Exploitation	Sup (ha)	Espèce/Var	Age
Chlef	Medjadja	KTM	28.5	Navel Powel	15
	Medjadja	FP SIYABI	10	Navel	15
	Oum drou	feddal	8	clémentine	15
	Chlef	FP Aichouba	10	Navel	50
	Chlef	bensouna	2	Clémentine	60
	Boukader	Medjadji	4	Navel	15
	Sobha	Fellague	4	Navel	6
	Oued sly	EAC 13	15	hameline	60
	Ouled fares	FP si tayeb	5	Navel	15
	Ouled abbas	Abbane	3	Clémentine	5
	Chettia	Moulfi	6	Navel	55
	Oued fodda	FP birsafsaf	12	Double fine	28
	Ain Defla	Ain defla	bounedjma	5	Navel

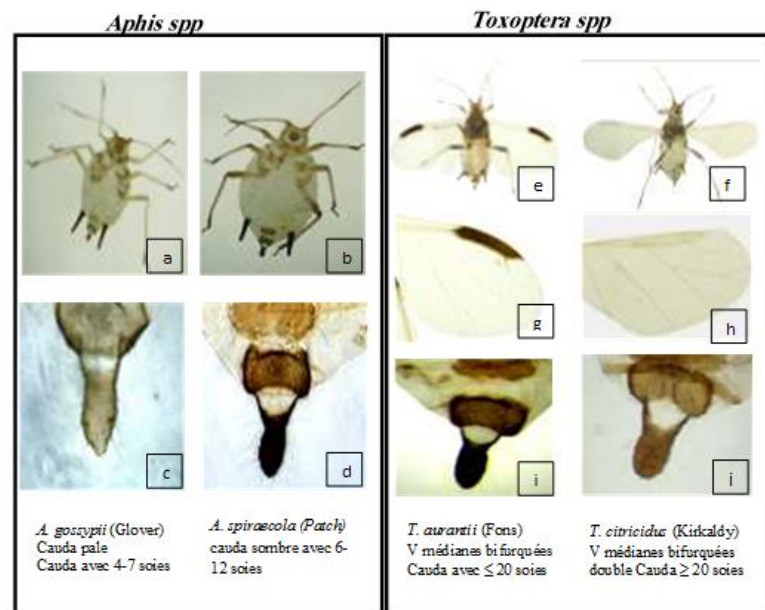
### 3.2.1 Identification des pucerons recensés

L'objectif principal du montage des aphides est d'obtenir des pucerons totalement transparents, dont le tégument peut être parfaitement visible sur les deux faces (dorsale et ventrale) quand l'échantillon est observé sous microscope (Fig. 15). La technique de préparation des pucerons est inspirée de celle qui est utilisée par Heikinheimo (1988) et par Blackman et Eastop (2006). Elle comprend les phases suivantes :

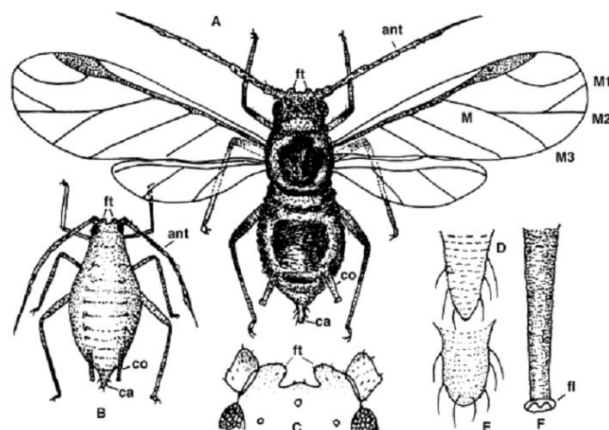
- 1) L'incision du puceron à l'aide d'une épingle entomologique au niveau de la face ventrale du puceron entre le quatrième et sixième sternite abdominal.
- 2) Le dégraissage du puceron pour en extraire toutes les réserves lipidiques. Le puceron est chauffé dans une solution d'hydroxyde de potassium à 10% (KOH) pendant 5 à 10 minutes.

3) Le nettoyage (après dégraissage), de la pièce dans trois bains d'eau distillée afin d'enlever les traces de potasse.

4) Le montage du puceron est réalisé entre lame et lamelle dans une goutte du milieu de montage pour puceron (voir annexe1) (Heikinheimo, 1988). Les spécimens préparés ont été identifiés sous microscope à l'aide de la clé de Blackman et Eastop (2006) (Tab. 5).



**Fig 15.** Différences morphologiques entre les différents pucerons vecteurs de CTV sous microscope.



**Fig 16.** Clé des caractéristiques morphologiques utilisée pour l'identification. A: puceron adulte ailé, B: puceron adulte aptère, C: tubercules frontaux (ft) à la base des antennes, D, E: cauda, F: cornicule; ant=antennes, ca=cauda, co=cornicule, fl=flange, ft=tubercule fontal, M=veine médiane (Liu et Sparks, 2001).

**Tab 5.** La clé d'identification des pucerons d'agrumes (Blackman et Eastop, 2006).

1	Tubercules antennaires peu développés	2
	Tubercules antennaires bien développés.	10
2	Le segment terminal un peu plus court que sa base. Cornicules beaucoup plus courtes que la queue.	A
	Le segment terminal beaucoup plus long que sa base. Cornicules courtes ou plus longues que la queue.	3
3	Cauda en forme de casque a vue dorsale, moins longue que sa largeur à la base.	B
	Cauda en forme de langue ou triangulaire en vue dorsale, plus longue que sa largeur à la base.	4
4	Abdomen dorsal avec une large tache noire.	C
	Abdomen dorsal sans tache noire	5
5	Cornicules beaucoup plus courtes que la queue.	D
	Cornicules plus ou moins long que la queue.	6
6	Le segment terminal 3,5 fois plus long que sa base .Cauda avec pas moins de 10 soies.	7
	Le segment terminal est moins 3,5 fois la longueur de sa base. Cauda généralement porte moins de 10 soies.	9
7	Cauda avec généralement plus de 20 soies. Les soies du segment antenne III sont plus longues que le diamètre de ce segment à la base. Tergites thoraciques souvent partiellement sclérifiées	E
	Cauda avec généralement moins de 20 poils. Les soies sur le segment antenne III souvent plus courtes que le diamètre de ce segment à la base. tergites thoraciques généralement non sclerotisés.	8
8	Cornicules est 1.5 fois moins longues que la queue. appareil stridulatoire présent.	F
	Cornicules est 1.5 fois plus longues que la queue. appareil stridulatoire absent.	G
9	Cauda plus pâle que les cornicules avec 4 à 7 soies. Soies fémorales tous assez courtes, moins larges que le fémur à sa base.	H
	Cauda sombre, avec 6 à 12 soies. Quelques soies fémorales sont longues et fines, plus longues que la largeur de fémur à sa base.	I
10	Face interne de tubercules antennaires convergentes.	J
	Face interne de tubercules antennaires parallèles ou divergentes.	11
11	Cornicules un peu plus courtes que la longue et sombre queue.	K
	Cornicules beaucoup plus longues que la queue.	12
12	La tête, les pattes et les antennes sont de couleur foncée ; fémurs pâles à la base, mais avec la moitié à trois-quarts est noir. Cornicules légèrement enfilés. Cauda avec une constriction.	L
	Pattes, tête, et les antennes de couleur pâle. Cornicules de forme de ruban parallèle tout au long. Cauda sans constriction.	13
	Face interne des tubercules antennaires parallèles. Cornicules sans réticulation polygonale. La longueur du cauda mesure un dixième à un huitième la longueur du corps.	M
	Faces internes des tubercules antennaires divergentes. la zone subapicale des cornicules avec réticulation polygonale. Cauda mesurant un septième à un cinquième la longueur du corps.	N

A- <i>Brachyunguis harmalae</i>	J- <i>Myzus persicae</i>
B- <i>Brachycaudus helichrysi</i>	K- <i>Sinomegoura citricola</i>
C- <i>Aphis craccivora</i>	L- <i>Aulacorthum magnoliae</i>
D- <i>Toxoptera odinae</i>	M- <i>Aulacorthum solani</i>
E- <i>Toxoptera citricidus</i>	N- <i>Macrosiphum euphorbiae</i> {autres espèces peuvent être rencontrés sur citrus : <i>Aphis arbuti</i> ; <i>Aphis fabae</i> ; <i>Brachycaudus cardui</i> ; <i>Pterochloroides persicae</i> ; <i>Rhopalosiphum maidis</i> }
F- <i>Toxoptera aurantii</i>	
G- <i>Aphis nerii</i>	
H- <i>Aphis gossypii</i>	
I- <i>Aphis spiraeicola</i>	

### 3.3 Identification moléculaire et variations génétiques des différentes populations de pucerons des agrumes recensés

Avant le développement des techniques moléculaires pour étudier les relations évolutives, il y avait peu de rapports sur la phylogénie des espèces du genre *Aphis* en raison de leurs morphologies similaires. La phylogénie au sein de la tribu des Aphidini a été partiellement basée sur les traits morphologiques et les changements dans l'utilisation des plantes-hôtes au cours de l'évolution des pucerons (Shapochnikov *et al.*, 1998). Néanmoins cette approche devient insuffisante quand il s'agit d'individus immatures des stades larvaires.

Depuis le développement de techniques moléculaires, les séquences de l'ADN mitochondrial (annexe 11) ont été utilisées pour étudier l'évolution chez beaucoup d'animaux, démontrant ainsi un potentiel de discrimination des espèces (Moritz *et al.*, 1987 ; Folmer *et al.*, 1994 ; Simon *et al.*, 1994 ; Zhang et Hewitt, 1997a ; Rebijith *et al.*, 2002 ; Ballard et Rand, 2005). Il existe beaucoup d'études sur l'utilisation de l'ADN mitochondrial pour étudier la phylogénie des pucerons (Stern, 1995 ; Turcinavicien *et al.*, 2006 ; Von Dohlen *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2011) et la discrimination d'espèces (Raboudi *et al.*, 2005 ; Valenzuela *et al.*, 2007) ; On a également cherché à établir une différenciation intra-spécifique des pucerons (Boulding, 1998 ; Shufran *et al.*, 2000 ; Delmotte *et al.*, 2001 ; Raymond *et al.*, 2001 ; Anstead *et al.*, 2002). Contrairement à d'autres marqueurs, les marqueurs mitochondriaux ont des caractéristiques maternellement hérités (Savolainen et coll, 2005). En effet, des petites portions du gène Cytochrome C Oxydase sont utilisées efficacement pour résoudre les ambiguïtés taxonomiques des animaux (Kress et Erickson, 2008). De ce fait nous avons jugé qu'il serait très utile de réaliser un travail d'identification moléculaire sur des populations immatures de pucerons inventoriées pendant la surveillance notamment les espèces *A. gossypii* et *A. spiraecola* collectées sur différentes plantes hôtes au niveau de la plaine de Chlef. Cette étude avait pour objectif de vérifier l'efficacité du marqueur mitochondrial Cytochrome C oxydase I (mtCOI) dans l'identification des espèces d'aphides locales et voir s'il est capable de détecter les possibles variations intra-spécifiques existant chez les différentes populations de la même espèce. L'intégralité du travail moléculaire a été effectué au niveau du centre de recherche Agrilife Research and Extension Services à l'Université de Texas, USA (Fig. 17). Cinq populations d'*A. gossypii* collectées sur cinq espèces appartenant à 4 familles botaniques différentes considérées comme plantes hôtes potentielles (Blackman et Eastop, 2006) communes dans la Vallée de Chlef ; il s'agit de *Citrus sinensis* (Osbeck, 1765) (Rutaceae), de *Hibiscus syriacus* (L, 1661) (Malvaceae), de *Cucurbita pepo* (L, 1753) (Cucurbitaceae), et de 2 espèces de la famille des Solanacées (*Solanum tuberosum* (L, 1753) et *Capsicum annuum* (L, 1753)) . Ces populations ont été désignées par un nom comportant 6 lettres chacune de sorte que l'on y retrouve

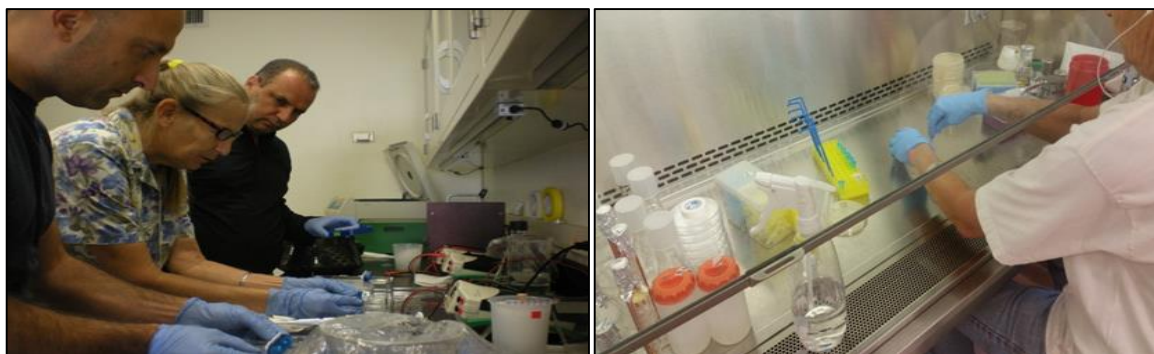
l'épèce de puceron et sa plante hôte ; ainsi Ag<sub>CITR</sub>, Ag<sub>HIBI</sub>, Ag<sub>COUR</sub>, Ag<sub>POMM</sub> et Ag<sub>POIV</sub> sont les populations de *Aphis gossypii* récoltées sur les 5 espèces végétales. S'agissant de populations d'*Aphis spiraecola* récolté sur les mêmes plantes hôtes, leur dénomination est la suivante : AS<sub>CITR</sub>, AS<sub>HIBI</sub>, AS<sub>COUR</sub>, AS<sub>POMM</sub> et AS<sub>POIV</sub>). Nous avons intégré dans cette analyse une population du puceron brun du pêcher *Pterochloroides persicae* (Pp) (Hemiptera: Lachninae) récoltée sur pêcher dans notre région pour montrer la différence,. Notons que cette espèce est d'introduction récente ; elle a signalée pour la première fois en Algérie par Laamari *et al* (2015). L'identification des espèces a été effectuée sur des individus adultes, à la station régionale de protection des végétaux de Chlef et à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem sur des caractères morphologiques se basant sur la clé de Blackman et Eastop (2006).

**Tab 6.** Détails des séquences COI obtenus de la base de données NCBI

<i>Aphis gossypii</i>		
Plantes hôtes	Pays de collection	NCBI accessions
<i>Capsicum annuum</i>	USA	EU930156
<i>Citrus sp</i>	Japon	AB506730
<i>Gossypium sp</i>	Sénégal	EU930151
<i>Gossypium sp</i>	Cameroun	EU930150
<i>Triticum sativum</i>	Chine	MF322542
<i>Citrus sp</i>	Chine	KY679436
<i>Lycopersicum tuberosum</i>	Inde	KT899439
<i>Aphis spiraecola</i>		
Plantes hôtes	Pays de collection	NCBI accessions
<i>Citrus sp</i>	Canada	EU701492
-	Pakistan	KY841003
-	Chine	MG954458
-	Japon	AB506736
-	Japon	AB506735
<i>Pterochloroides persicae</i>		
Plantes hôtes	Pays de collection	NCBI accessions
<i>Prunus sp</i>	Espagne	LT600391
<i>Prunus sp</i>	Tunisie	JN644629

### 3.3.1 Extraction d'ADN et PCR

Cinq pucerons de différents stades larvaires de chaque population conservés dans de l'éthanol à 70%, ont été rincés deux fois avec de l'eau traitée de nucléases et de protéases, puis avec 100 µl de tampon d'extraction (Dellaporta *et al.*, 1983) (Annexe 2). Les acides nucléiques totaux ont été extraits en utilisant le protocole décrit par Dellaporta *et al.* (1983). Les pucerons ont été broyés dans 100 µl de tampon d'extraction contenant 100 mM de Tris, 8,5 mM d'EDTA, 500 mM de NaCl et 0,1% de B-mercaptoéthanol ajouté juste avant l'utilisation dans un microtube de 1,5 ml à l'aide d'un micro-pilon en plastique, par la suite, 7 µl de SDS ont été ajoutés, suivi d'une incubation dans un bain marie à une température de + 65 ° C pendant 10 mn. Sous température ambiante 32 µl de KOAc ont été ajoutés, et après agitation, une centrifugation à 13000 tr/mn pendant 10 mn a été effectuée. Ensuite 50 µl de surnageant ont été prélevés par micropipette et mélangés à 25 µl d'isopropanol glacial ; le microtube a été mis dans de la glace pendant 20 mn, puis centrifugé ; pour décanter l'isopropanol, cette étape a été suivie par une addition de 50 µl d'éthanol suivie d'une centrifugation ; le surnageant a été décanté délicatement sans toucher le culot (TNA). À la fin, le culot a été séché à température ambiante (évaporation complète de l'éthanol). Le TNA a été dissous dans 20 µl de TE (Annexe 3) et conservé à -20°C. La concentration moyenne de l'ADN génomique extrait de 150-200ng/µl, a été évaluée avec Nanodrop 1000. (ThermoScientific®. USA).



**Fig17.** Illustrations de quelques manipulations moléculaires (amplification et clonage) réalisées au laboratoire Agrilife research and extension, Weslaco (Université A&M kingsville, Texas, USA).

Le marqueur moléculaire universel du gène mitochondrial de la cytochrome Oxidase I (mtCOI) (709pb) a été amplifié en utilisant les amorces (LCO1490F), 5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG3' et (HCO2198R) 5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA3', selon (Folmer *et al.*, 1994 ; Zhang et Hewitt, 1997b ; Cocuzza *et al.*, 2008 ; Komazaki *et al.*, 2010 ; Sharma et Koabayashi, 2013 ; Zhang *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2015 ; Lokeshwari *et al.*, 2015), synthétisé chez Integrated DNA

technologies IDT, Coraville, Iowa, États-Unis. La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (BIORAD C1000<sup>®</sup>) suivant le profil thermique à travers 05 cycles de 94°C pendant 40s, 45° C pendant 40s, 72°C pendant 60s, suivis de 35 cycles de 94°C pendant 40 s, 51°C pendant 40 s, 72 °C pendant 60 s et 72°C pendant 10 mn comme extension finale. La PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 0,5 µl de chaque amorce, 2,5 µl de tampon PCR, 0,5 µl de dNTPs, 0,25 µl de taq DNA polymérase 5U/ µl (Roche diagnostics international LTD). Les amplifias ont été visualisés dans un gel d'agarose à 1% (annexe 3), mélangé avec du bromure d'éthidium (0,6 µl / ml). La taille moléculaire attendu du produit PCR a été déterminée par comparaison au marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb. New England BioLabs<sup>®</sup>.Inc. USA.

### 3.3.2 Clonage

L'ensemble des populations d'aphides immatures caractérisées par PCR, a été soumis au clonage du marqueur mitochondrial mtCOI. Le fragment moléculaire a été amplifié avec les amorces universelles (LCO1490F) et (HCO2198R) produisant un amplifia de 709 pb et visualisé dans un gel à agarose de 1%. Il a été ensuite dilué en utilisant le kit zymoclean<sup>®</sup>Gel DNA Recovery Kit (Epigenetics company. USA) selon les instructions du fabricant ; les amplifias purifiés (produit PCR) ont été ligaturés au vecteur TOPO-TA (Invitrogen. USA) dans un mélange composé de 2.5 µl d'eau, 1 µl (salt solution), 0.5 µl (TOPO-ta vector) et 2 µl de produit PCR élué. Après mélange utilisant le vortex, le tout a été incubé pendant 15 minutes sous température ambiante.

Le matériel ligaturé a été conservé à -80°C. Par la suite dans un tube de 1.5 ml nous avons ajouté 2 µl du matériel ligaturé à 23 µl d'*Echerichia coli*, après une légère agitation. Le mélange a été maintenu dans la glace pendant 30 minutes. L'incorporation du plasmide dans les cellules hôtes d'*E coli* a nécessité un traitement de choc thermique par lequel les colonies bactériennes ont été incubées dans un bain d'eau à 42 ° C (bain marie) pendant 45 secondes.Elles ont été immédiatement transférées dans de la glace pendant 5 minutes, avec 250 µl du milieu (SOC) suivi d'une incubation à 37°C avec une rotation de 225 tours/min pendant 1 heure en maintenant les tubes inclinés.

#### 3.3.2.1 Transformation d'*E coli*

80 µl de suspension bactérienne a été étalée dans le milieu Luria-Bertani (LB-Carbenicilline)-Agar (100mg/L) fourni avec 15 µl de X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-p-D-galactopiranoside) (Invitrogen, USA) auquel nous avons ajouté 50 mg / L d'ampiciline 30 minutes avant l'étalage. Les plaques ont été ensuite incubées pendant une nuit à 37°C. Afin de confirmer la présence de

l'insert cible, des réactions de PCR ont été réalisées. Dans une solution de PCR qui contient 16.5 µl d'eau, 5 µl de tampon prime 5×, 2 µl (dNTPs 2.5mM), 20 µM d'amorces universelles M13 (M13F-GTAAAACGACGGCCAG et M13R-CAGGAAACAGCTATGAC) et 0.5µl Taq polymérase 5U/µl (Invitrogen), la réaction PCR a été réalisée dans un thermocycleur de type BIORAD C1000©. Les résultats de la PCR ont été visualisés dans un gel d'agarose à 1%. Successivement, dans un tube, nous avons mis 2 µl du milieu de culture (LB broth), puis à partir des colonies bactériennes positives (transformées), la surface est frottée à l'aide de cônes de micropipette puis le frottis est déposé dans le tube. Les préparations ont été ensuite placées dans un incubateur à 37°C avec une rotation de 225 tours/min pendant 8 à 14 heures.

### 3.3.2.2 Isolation du plasmide

Cette opération a comporté 06 étapes utilisant le kit Sigma GenElute©Plasmid Miniprep (Sigma.aldrich. USA).

*1) Centrifugation des cellules bactériennes :* Les colonies sélectionnées d'*E coli* ont été prélevées avec une lance stérile, inoculées dans 2 ml de liquide LB contenant de l'ampicilline (50 mg / l). Les suspensions bactériennes ont été versées dans un tube de micro-centrifugeuse de 1,5 ml, puis centrifugées à 13 000 tr/min pendant 60 secondes et le surnageant a été éliminé.

*2) Suspension et lyse des cellules bactériennes transformées :* Le culot a été remis dans 200 µl de solution de ré-suspension. On ajoutant 200 µl de solution de lyse, les cellules bactériennes lysées ont été obtenues après une période d'incubation de 3.5 à 4,5 minutes suivi d'un refroidissement rapide dans de la glace pendant une durée maximale ne dépassant pas 5 minutes, car un temps supplémentaire peut endommager les plasmides.

*3) Neutralisation :* chaque colonne (fournie dans le kit) a été placée en correspondance à un échantillon de cellules bactériennes lysées dans un microtube stérilisé de 1.5ml. 500 µl de solution de colonne ont été ajoutés (fournie dans le kit), après une centrifugation à 12 000 tr/mn pendant 1 minute. Les colonnes ont été placées dans des microtubes de 1.5 ml, auxquels nous avons ajouté 350µl de solution neutralisation/liaison (fourni dans le kit). Les tubes ont été inversés 5-7 fois pour ensuite être centrifugés à 13000 tr/mn pendant 10 mn.

*4) Transfert des lysats :* à l'aide d'une micropipette les cellules bactériennes lysées ont été transférées à chacune des colonnes placées dans des microtubes de 1.5ml, puis centrifugées à 13000 tr/ mn.

5) Lavage : les colonnes ont été placées dans de nouveaux microtubes de 1.5 ml étiquetés, puis 750 µl de solution de lavage (fourni dans le kit) ont été ajoutés, après centrifugation à 13000 tr/mn ; l'effluent a été éliminé. L'opération de lavage a été répétée une deuxième fois. Les colonnes ont été ensuite transférées dans de nouveaux microtubes de 1.5 ml étiquetés.

6) Elution de l'ADN : à l'aide d'une micropipette un volume de 100 µl d'H<sub>2</sub>O traitée de nucléases a été versé au centre de chaque colonne sans toucher au filtre des colonnes, et centrifugé à 13000 tr/mn. A la fin la concentration de l'ADN plasmique a été évaluée avec un Nanodrop 1000. (ThermoScientific®. USA), puis conservé à -80°C.

### 3.3.2.3 Analyse des séquences

Les tests d'homologie ont été réalisés par le programme BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), avec les séquences publiées au niveau du NCBI (National Center of Biotechnology Information), par comparaison aux séquences homologues du gène mtCOI. Pour définir les variations intra-spécifiques chez *A. gossypii* et *A. spiraecola*, les séquences de la mtCOI des deux espèces disponibles obtenues sur la banque de données NCBI GeneBank (Tab. 6). Toutes les séquences générées de la présente étude et les séquences récupérées correspondant au fragment du gène COI, ont été alignées en utilisant le logiciel bio-informatique (multiple sequence alignment software CLUSTALW), au niveau des nucléotides et les acides aminés. L'arbre phylogénétique a été développé par la méthode neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987). Les distances évolutives ont été calculées par la méthode Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004). L'ensemble des analyses de l'évolution moléculaire ont été exécutées par le logiciel MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

## 3.4 Enquête sur le CTV dans la zone d'étude

Afin de faire la lumière sur la présence, l'incidence et la nature des souches de CTV présentes au niveau des zones agrumicoles de la plaine de Chlef (Fig. 18), une prospection a été réalisée durant la période printanière allant de mi-Mars à mi-Juin des années 2016, 2017 et 2018.

La prospection a porté sur un total de 93 vergers, représentatifs des principales zones de production agrumicole de la Vallée de Chlef (Tab. 7). Dans ce cadre, deux méthodes ont été choisies, soit 25% des arbres de chaque verger sélectionné suivant la méthode d'échantillonnage hiérarchique de Gottwald et Hughes (2000), ou en aléatoire en double diagonale (Fig. 19 A, B) respectivement, tout en respectant les procédures techniques de monitoring de CTV établi par Djelouah *et al.* (2009). La majeure partie des vergers visités étaient homogènes en termes d'âge, porte greffe,

densité et variété. L'âge des vergers échantillonnés était étendu (entre 3 et 40 ans). Chaque échantillon est composé de cinq jeunes pousses ou pédoncules de fruits, dix feuilles complètement développées, ou cinq fleurs prélevés autour de la cime de chaque arbre sur chacune des charpentières. Les échantillons ont été mis individuellement dans des sacs en plastique, étiquetés et placés dans des glacières. Une fois au laboratoire, ils ont été stockés à 4 °C pendant quelques jours (<7J) avant leur traitement. Un total de 1680 échantillons a été collecté. Tous les échantillons ont été analysés par DTBIA (Bar Joseph *et al.*, 1979 ; Cambra *et al.*, 2000b), les échantillons positifs ont été re-testés par la technique DAS-ELISA (Clark et Adams., 1977 ; Garnsey *et al.*, 1993 ; Cambra *et al.*, 2000b).

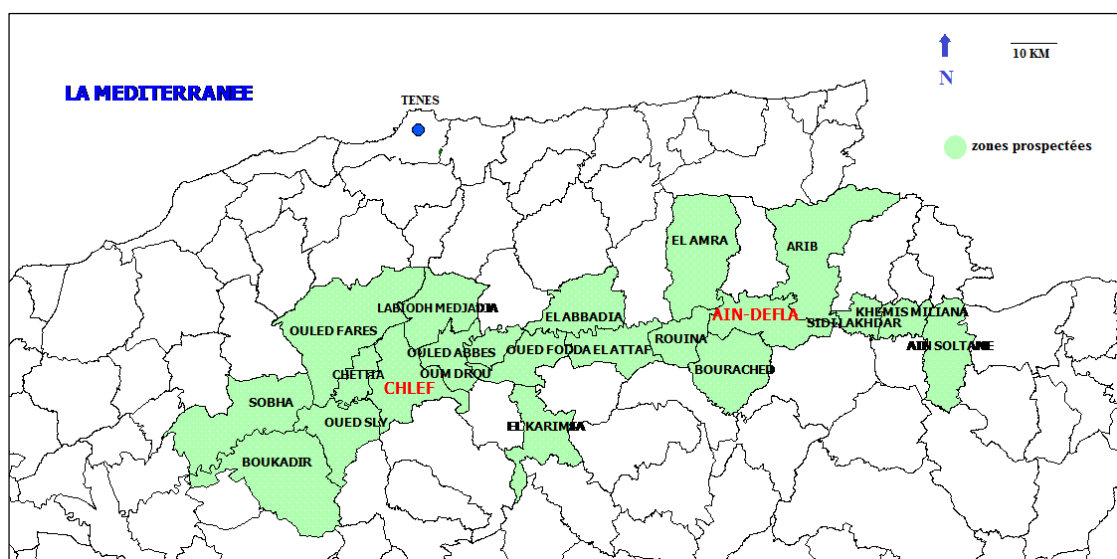


Fig 18. Identification des communes de la zone d'étude (Vallée de Chlef).

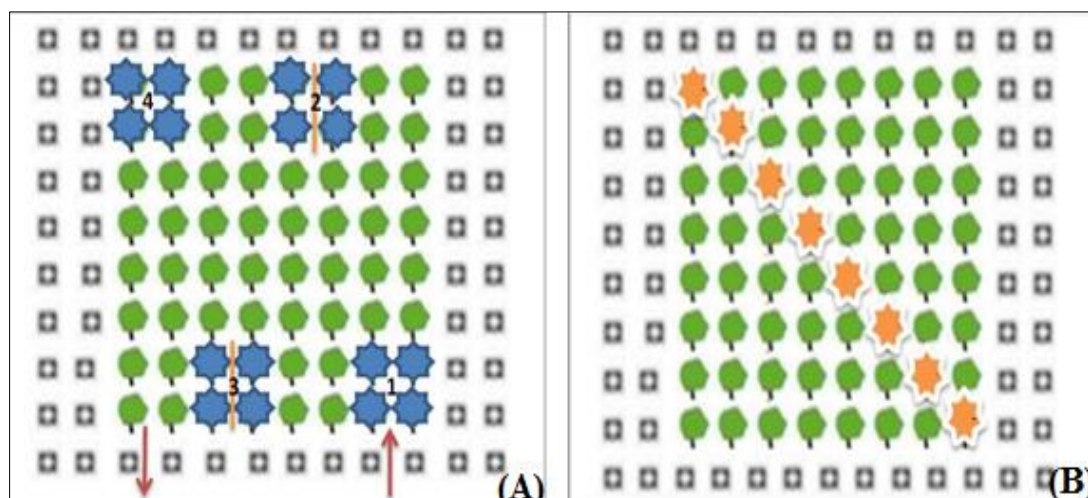


Fig 19. (A) Schéma d'échantillonnage hiérarchique selon Gottwald et Hughes (2000) ; (B) méthode d'échantillonnage en diagonale.

Tab 7. Vergers prospectés durant l'enquête de dépistage du CTV

WILAYA	Commune	Exploitation	Esp	Var/PG	Age	Sup (ha)	Origine	N Ech	WILAYA	Commune	Exploitation	Esp	Var/PG	Age	Sup (ha)	Origine	N Ech		
CHLEF	O/FODDA	Kerkoud(privé)	Cs	tn/b	pc	13	inc	16	CHLEF	Houcine(privé)	Cr	c/b	27	01.5		mitidja	16		
	O/FODDA	Fp bir safsaf	Cs	tn/b	pc	20	inc	16	CHETTIA	Bouhella(privé)	Cr	cm/b	11	8		mitidja	16		
	O/FODDA	Fp bir safsaf	Cs	tn/b	30	12	bir safsaf	16	CHETTIA	Madaoui(privé)	Cs	wn/b	15	3		mitidja	16		
	O/FODDA	Fp bir safsaf	Cs	df/b	28	12	bir safsaf	16	A.MEDJADIA	Tazgait(privé)	Cs	wn/b	14	3		mitidja	16		
	O/FODDA	EAC n°02 dellali	Cs	wn/b	10	20		mitidja	16	A.MEDJADIA	KTM(privé)	Cs	pn/mc	12	4		espagne	16	
	O/FODDA	EAC n°02 toualbia	Cr	e/b	pc	15	inc	16	A. MEDJADIA	KTM(privé)	Cr	c.og/mc	3	2		espagne	16		
	KARIMIA	Oulkbir(privé)	Cs	wn/b	14	5		mitidja	16	O/SLY	EAC lotfi	Cs	wn/b	15	4		mitidja	16	
	O/ABBES	djilali sayah (privé)	Cr	cm/b	13	20		mitidja	16	O/SLY	EAC adjal	Cs	wn/b	15	02.5		mitidja	64	
	OUM DROU	EAC n°02 babas	Cs	tn/b	pc	20	inc	16	O/SLY	EAC habbar	Cp	p/b	pc	3		inc	16		
	OUM DROU	EAC n°02 toumi	Cr	e/b	pc	20	inc	16	O/ABBES	Kassouli(privé)	Cs	wn/b	14	02.5		mitidja	16		
	CHLEF	Boutiba(privé)	Cs	wn/b	14	10		mitidja	16	O/ABBES	Zidane(privé)	Cs	wn/b	14	2		mitidja	16	
	CHLEF	Boutiba(privé)	Cr	cm/b	14	10		mitidja	16	BOUKADIR	EAC n°7 baroudi	Cs	wn/b	13	5		mitidja	16	
	CHETTIA	chenouf(privé)	Cs	wn/b	12	10		mitidja	16	BOUKADIR	EAC n°7 baroudi	Cs	tn/b	26	6		mitidja	16	
	CHLEF	EAC n°1 ben mhidi	Cs	vl/b	pc	10	inc	16	BOUKADIR	Medjadji(privé)	Cs	wn/b	11	4		mitidja	16		
	OUED SLY	EAC n°13 maameri	Cs	hm/b	pc	15	inc	16	OUM DROU	EAC n°5 toumi	Cs	df/b	26	5		inc	16		
	CHETTIA	Habar(privé)	Cs	wn/b	30	10	inc	16	OUM DROU	EAC n°4 toumi	Cs	tn/cg	15	3		mitidja	16		
	A. MEDJAJA	FP si yahi	Cs	wn/b	14	28		mitidja	16	SOBHA	Fellague(privé)	Cs	wn/b	6	4		mitidja	16	
	O/FARES	FP si tayeb	Cs	wn/b	13	5		mitidja	16	A-DEFLA	EL.ATTAF	EAC 16 berchouche	Cs	wn/b	35	10	inc	16	
	BOUKADER	EAC arbouche	Cs	tn/b	25	10		mitidja	16		EL. ABADIA	FP BENSAAHA	Cs	df/b	pc	20	inc	16	
	CHETTIA	Bouthiba(privé)	Cs	wn/vk	14	5		mitidja	16		EL. ABADIA	FP BENSAAHA	Cr	cm/b	pc	20	inc	16	
	CHETTIA	Bouthiba(privé)	Cr	cm/vk	14	10		mitidja	16		ROUINA	EAC n°14 berekaa	Cs	wn/b	9	5		mitidja	16
	A. MEDJADIA	FP si yahi	Cs	wn/b	15	10		mitidja	16		ROUINA	EAC n°4 berekaa	Cs	tn/b	pc	6	inc	16	
	CHLEF	EAC chegga	Cs	tn/b	pc	5	inc	16	ROUINA		EAC n°4 berekaa	Cr	e/b	pc	5	inc	16		
	CHLEF	EAC cheboua	Cs	Wn/b	9	2		mitidja	16		ROUINA	EAC n°6 berekaa	Cr	e/b	pc	9	inc	16	
	CHLEF	EAC firem	Cr	e/b	pc	1	inc	16	ROUINA		EAC n°2 Berekaa	Cs	tn/b	pc	6	inc	16		
	CHETTIA	FP aichouba	Cs	wn/b/cg	12	2.5		mitidja	64		AIN DEFLA	Boundedjma	Cs	wn/b	14	5		mitidja	64
	CHETTIA	FP aichouba	Cr	e/b	pc	2	inc	16	AIN DEFLA		EAC n°5 bouzagar	Cs	wn/b/cg	14	17		A.defla	16	
	CHETTIA	FP aichouba	Cr	cm/b	pc	2.5	inc	16	EL. AMRA		EAC n°11 khadraoui	Cs	Wn/b	10	11		mitidja	16	
	CHETTIA	Moulfi(privé)	Cs	tn/b	pc	4	inc	16	S.LAKHDAR		EAC n°6 souaed	Cs	Wn/b	15	7		mitidja	16	
	CHLEF	EAC (firem)	Cs	tn/b	pc	2	inc	16	S.LAKHDAR		EAC n°2 bougara	Cr	cm/b	pc	8	inc	16		
	SOBHA	FP si tayeb	Cs	wn/b	15	5		16	S.LAKHDAR		EAC n°2 bougara	Cs	tn/b	pc	10	inc	16		
	BOUKADIR	Medjadji(privé)	Cs	Tm/b	30	4	inc	16	S.LAKHDAR		Khelif(privé)	Cs	tn/b	pc	6	inc	16		
	BOUKADIR	Sobhi(privé)	Cs	Wn/b	16	4		mitidja	16		KHEMIS	Khellas (Privé)	Cs	wn/b	35	10		mitidja	16
	OUM DROU	EAC n°0 toumi	Cr	e/b	pc	2	inc	16	AIN DEFLA		B.youcef(privé)	Cs	wn/b	25	10		mitidja	16	
	OUM DROU	EAC N°2 babas	Cs	n/b	pc	5	inc	16	AIN DEFLA		Lakhdari (privé)	Cs	wn/b	15	10		mitidja	16	
	OUM DROU	EAC N°2 toumi	Cs	df/b	pc	3	inc	16	AIN DEFLA		Daoudi(PRIVE)	Cs	wn/b	15	10		mitidja	16	
	O/ABBES	Abbanet(privé)	Cr	dm/b	16	3		mitidja	16		AIN DEFLA	Daoudi(PRIVE)	Cr	cm/b	15	5		mitidja	16
	CHLEF	Bouzidi(privé)	Cs	tn/b	pc	2	inc	16	AIN DEFLA		Bellal (privé)	Cs	wn/b	11	2		mitidja	16	
	CHLEF	Beriah(privé)	Cr	e/b	pc	01.5	inc	16	ARIB		Ziane (privé)	Cs	tn/b	35	10	inc	16		
	A.MEDJADIA	Abdelli(privé)	Cm	cit/b	15	2		mitidja	16	MEKHATRIA	Bouegar(privé)	Cs	cit/b	13	2	inc	16		
	CHETTIA	Benson(privé)	Cs	tn/b	pc	4	inc	16	MEKHATRIA	Bouegar(privé)	Cs	wn/b	13	5		mitidja	16		
	CHETTIA	Saiah(privé)	Cr	cm/b	16	2		mitidja	16	AIN SULTANE	Cherchali(privé)	Cs	wn/b	15	8		mitidja	16	
CHETTIA	Abassi(privé)	Cs	wn/b	30	02.5		mitidja	16	AIN SULTANE	Cherchali(privé)	Cs	wn/b	13	10		mitidja	16		
CHETTIA	Arab(privé)	Cs	tn/b/cg	pc	1.5	inc	64	AIN SULTANE	Cherchali(privé)	Cs	wn/b	13	10		mitidja	16			
CHETTIA	Saiah(privé)	Cs	Tr/cg	pc	7	Inc	16	TOTAL											
CHETTIA	Saiah(privé)	Cs	vl/b	12	6	inc	16												
CHLEF	Mazraa (privé)	Cs	tn/b	8	5		mitidja	16											
CHLEF	Bensoua	Cr	e/b	pc	2	inc	16												
CHLEF	Haidour(privé)	Cr	e/b	35	03.5		mitidja	16											

Cs: C. sinensis; Cp :C. paradisi ; Cr : C. reticulata ; Cm : C. medica ; b: bigaradier; pc: période coloniale;  
wn: w. navel; tn: T.navel; og: el.oro grande; cg: citrange; e: cl. montréal ; p :pamplemoussier ;  
Tr : tarocco ; inc : inconnu ; cit : citronnier ; mc : Citrus macrophylla ; pn : Powell navel

### 3.4.1 Détection sérologique

#### 3.4.1.1 DTBIA (Direct Tissue Blot Immuno-assay)

L'analyse sérologique des 1680 échantillons collectés a été réalisée par DTBIA, conformément à la description de plusieurs auteurs ; Cambra *et al* (1991), Garnsey *et al* (1993), Cambra *et al* (2000b) ; Djelouah et D'Onghia (2001b) et le protocole de diagnostic recommandé par l'EPPO (2005). Un kit complet de marque PlantPrint Diagnostics SL<sup>®</sup> (IVIA, Valencia, Spain) a été utilisé (annexe 4) ; il contient, un mélange d'anticorps monoclonaux spécifiques à CTV ; 3DF1 et 3CA5 (Vela *et al.*, 1986), des membranes de nitrocellulose portant déjà les empreintes des témoins positif et négatif ainsi que l'ensemble des réactifs, tampons et substrats.



**Fig 20.** Différentes étapes de l'analyse sérologique DTBIA, (a) empreintes ; (b) blocage par BSA ; (c) lecture (Photographie S ALI AROUS)

#### a) Empreintes sur membranes

Les surfaces lisses finement taillées des pétioles foliaires, des rameaux issus des pousses et pédoncules des fleurs ont été pressés soigneusement sur une membrane de nitrocellulose (Fig. 20). Chaque carré sur la membrane contenant les empreintes d'un échantillon représente un arbre dans le verger. Ensuite les membranes sont séchées pendant 30 à 40 min puis conservées à sec jusqu'à la fin de l'enquête selon le dispositif décrit par Djelouah et D'Onghia (2001b).

#### b) Fixation de la membrane

Les membranes et leurs empreintes de tissus sont placées dans un récipient approprié (conteneur hermétique), puis recouvert avec une solution d'albumine sérique bovine à 1 % (BSA) diluée dans de l'eau distillée et incubée. Il existe deux méthodes, l'incubation pendant 2 heures à température ambiante ou jusqu'au lendemain (environ 16 heures) à 4 °C. C'est la dernière méthode qui a été adoptée. Nous avons procédé à une légère agitation pour favoriser cette étape, à l'issue de laquelle, la solution de BSA a été éliminée avec la conservation des membranes dans le même récipient (Fig. 20).

**c) L'ajout des anticorps spécifiques au CTV conjugués à la phosphatase alcaline**

Une solution de conjugué contenant les anticorps monoclonaux spécifiques au CTV (3DF1 + 3CA5) associés à la phosphatase alcaline (en concentrations égales, soit 0,1 µg/ml de chaque anticorps monoclonal dans du tampon physiologique AFT) a été ajoutée sur les membranes et le tout a été incubé pendant 2 à 3 heures à température ambiante sous agitation, avant d'être éliminé.

**d) Lavage des membranes**

Le rinçage des membranes a été réalisé avec le tampon de lavage (PBS à pH 7,2-7,4 contenant 0,05% de Tween 20), en agitant manuellement durant 5 min, avant d'être éliminée (l'opération de lavage a été répétée deux fois).

**e) Développement de la membrane**

Une solution de développement contenant le substrat (comprimés *FastBCIP/NBT* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro bleue tétrazolium), a été versée sur les membranes, lesquelles ont été incubées jusqu'à l'apparition d'une coloration pourpre-violet dans les témoins positifs (soit environ 10-15 min). La réaction a été stoppée en lavant les membranes avec de l'eau du robinet. Ces membranes ont été étalées sur du papier absorbant pour séchage.

**f) Lecture des membranes**

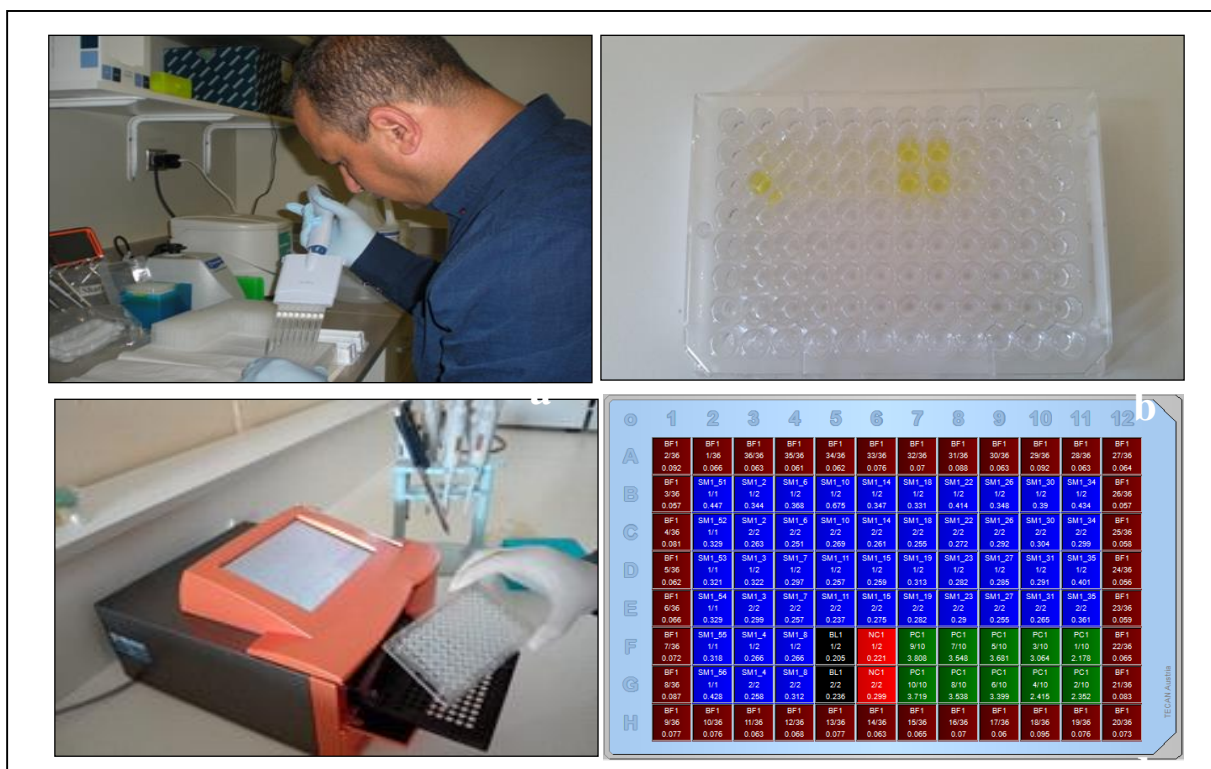
Les différentes empreintes sur la membrane ont été observées à l'aide d'un binoculaire de marque Bresser® à faible grossissement de X10 à X20. La présence d'un précipité pourpre-violet dans la zone vasculaire du matériel végétal indique la présence du CTV (Fig. 20).

**3.4.1.2 DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

Les échantillons révélés positifs par le test DTBIA ont été ré-analysés par la technique ELISA à deux anticorps en sandwich (DAS-ELISA) conçu par Cambra *et al* (2000b), en suivant la méthode décrite ci-dessous. Un kit commercial contenant les anticorps monoclonaux spécifiques au CTV (3DF1 + 3CA5) (Domaines agricoles UCP, Maroc) a été utilisé (Annexe 4).

La DAS-ELISA est une méthode immunochimique qui met en œuvre successivement deux anticorps pour détecter des antigènes. Dans un premier temps, des anticorps sont déposés et se lient à la surface d'une plaque de microtitration ; ils permettent la capture des antigènes recherchés. La présence des antigènes dans l'échantillon analysé est alors détectée grâce à ces anticorps secondaires spécifiques couplés à la phosphatase alcaline (EPPO, 2015). Au final, l'addition du substrat de l'enzyme (pNPP) provoque l'apparition d'un produit jaune qui absorbe à 450 nm,

révélaient la présence éventuelle des antigènes (Bar Joseph *et al.*, 1979). Les analyses par la technique sérologique DAS-ELISA ont été réalisées suivant le protocole recommandé par l'organisation européenne et méditerranéenne de la protection des plantes (EPPO, 2015).



**Fig 21.** (a, b et c) : Quelques étapes de l'analyse sérologique par DAS-ELISA ; (d) évaluation des DO par le spectrophotomètre Sunrise™ Tecan et le logiciel Magellan v.7.0™. (Photographie S ALI AROUS)

**a) Étape de sensibilisation**

Après dilution des anticorps de sensibilisation dans un volume de tampon carbonate 1× à pH 9,6 (Na2CO3, 1,59 g ; NaHCO3, 2,93g dans 1 litre d'eau distillée), nous avons versé 100 µl de dilution dans chaque puits. La plaque a été incubée pendant 2 h à 37 °C. Ensuite les puits sont lavés trois fois avec le tampon de lavage (PBS à pH 7,2-7,4 contenant 0,05 % de Tween 20).

**b) Dépôt des échantillons (fixation des antigènes)**

Une quantité de 0.5g de l'échantillon a été broyée dans 5ml de tampon de broyage (10g de PVP, 0.5ml tween20 et 1L PBS.PH=7.3) dans un mortier, en écrasant bien à l'aide d'un pilon. On a ajouté 100 µl d'extrait végétal dans chaque puits, puis nous avons incubé pendant 16 h à 4 °C. Les plaques ont été lavées cinq fois comme précédemment.

### c) Dépôt des anticorps conjugués à l'enzyme

Dans chaque puits, nous avons ajouté 100 µl de tampon contenant l'anticorps conjugué, correspondant à environ 0,1 µg/ml dans du PBS contenant 0,5 % de BSA, mélangé aux anticorps monoclonaux (3DF1 + 3CA5) spécifiques conjugués à la phosphatase alcaline, successivement. La plaque a été incubée pendant de 2 à 3 heures à 37 °C.

### d) Dépôt du substrat

Une solution de 1 mg/ml de phosphatase alcaline (p-nitrophénylphosphate) a été préparée dans un tampon substrat correspondant à 97 ml de diéthanolamine dans 800 ml d'eau distillée ; le pH a été ajusté à 9,8 en ajoutant de l'acide chlorohydrique HCl; 100µl de cette solution ont été déposée dans chaque puits. Les plaques ont été ensuite incubées à température ambiante en mesurant la densité optique (DO) des puits à 405 nm à intervalle régulier pendant 120 mn. Le test ELISA est jugé négatif si la DO moyenne de chaque puits de l'échantillon en duplicata est  $< 0,1$  ou bien  $< 2 \times$  la DO moyenne obtenue avec les témoins négatifs composés d'extraits de plantes saines. Le test ELISA est jugé positif si la DO moyenne de chaque puits de l'échantillon en duplicata est  $\geq 2 \times$  la DO moyenne obtenue avec les témoins négatifs composés d'extraits de plantes saines (Cambra *et al.*, 2000b ; EPPO, 2015). La lecture a été réalisée avec le spectrophotomètre Sunrise™ Tecan, Autriche, le traitement des résultats a été effectué par le logiciel Magellan v.7.0™ (Fig. 21).

## 3.5 Détermination des périodes propices à la détection de CTV

Pour la détection du CTV, les échantillons peuvent être prélevés à tout moment de l'année dans des vergers d'agrumes situés dans des régions Méditerranéennes tempérées sur des orangers doux, mandariniers, citronniers et pamplemoussiers (CIPV, 2016). Considérant que la Vallée de Chlef est située à 45 km de la Méditerranée, caractérisée par un climat semi-continentale, très froid en hiver et extrêmement chaud en été, nous avons jugé utile de vérifier les fluctuations de concentrations de CTV dans les arbres infectés de la zone d'étude en fonction des saisons ; ce travail permet de définir les périodes propices au dépistage du CTV, évitant ainsi les cas de faux-négatifs. A cet effet, nous avons procédé à sept (07) prélèvements d'échantillons et analyses par DAS-ELISA depuis cinq arbres détectés préalablement infectés par le CTV de février 2017 à juillet 2018. Des feuilles, des pétioles et des pousses ont été collectés. Les arbres testés et les arbres de contrôle négatifs étaient situés dans trois zones de la Vallée de Chlef : deux (02) à Abiodh Medjadja (arbre 1 et 2), deux (02) à Oum Drou (arbre3 et 4) et un (1) (arbre5) à Chettia (Fig 18). Les échantillons ont été testés par DAS-ELISA en utilisant des anticorps monoclonaux de CTV (3DF1 + 3CA5) (SEDIAG®, France). Les densités optiques (DO) ont été lues à 405 nm en utilisant

le lecteur universel de microplaques Sunrise®. Tecan Reader® et le logiciel de contrôle et de réduction des données Tecan (Magellan©). Une réaction positive a été mesurée dans l'heure qui a suivi l'ajout du substrat. Le seuil de valeurs positives a été évalué à deux fois la valeur du témoin négatif (EPPO, 2015).

### 3.6 Caractérisation moléculaire des sources de CTV sélectionnées

A l'issue de l'enquête de dépistage du CTV par les techniques sérologiques (DTBIA et DAS-ELISA), cinq sources de CTV ont été sélectionnées sur la base de quelques facteurs épidémiologiques tels que l'espèce, la variété, le porte-greffe, la provenance, la localisation, l'âge ainsi que les symptômes manifestés (Tab. 8) pour une caractérisation moléculaire du virus de la Tristeza. Celle-ci a été réalisée par des techniques moléculaires à l'aide des marqueurs moléculaires multiples spécifiques M.M.M.s et le séquençage du gène de la capsid P25 et deux fragments spécifiques T30POL et VTPOL.

**Tab8.** Les sources de CTV détectées dans la zone d'études et sélectionnées pour caractérisation moléculaire

	Commune	Wilaya	Lon-Lat	Variété	Porte greffe	Age	Origine	Symptômes	Code
1	Medjadja	Chlef	36.15 N 1.24 E	Cl. Orogrande	Macrophylla	36 mois	Mitidja	dépérissement	SY-1-ALG
2	Medjadja	Chlef	36.15 N 1.24 E	Powell Navel	Macrophylla	15 ans	Spain	rabougrissement	NN-2-ALG
3	Oued Sly	Chlef	36.10 N 1.12 E	Powell Navel	Macrophylla	15 ans	Spain	asymptomatique	PC-3-ALG
4	Ain Defla	Ain Defla	36.22 N 1.84 E	W. Navel	Bigaradier	15 ans	Mitidja	rabougrissement	WN-5-ALG
5	O. Drou	Chlef	36.11 N 1.22 E	Cl. Montréal	Bigaradier	60 ans	Inconnu	asymptomatique	PL-6-ALG

#### 3.6.1 Extraction de l'ARN total (ARNt)

Cette étape a été réalisée au laboratoire de bio-ressources naturelles locales de l'université Hassiba Benbouali de Chlef. L'extraction a été effectuée par l'utilisation d'un kit d'extraction (Viral RNA isolation, Nucleospin®RNA Plant&Fungi. Macherey-Nagel. Germany). L'ARN total a été récupéré à partir des 05 échantillons sources infectés par le CTV selon les résultats des analyses sérologiques DTBIA et DAS-ELISA. A cet effet, une suspension de 10% (p/v) de tissu du phloème broyés dans le tampon d'extraction contenant 100 mM de Tris, 8,5 mM d'EDTA, 500 mM de NaCl et 0,1% de B-mercaptoéthanol ajouté juste avant l'utilisation, a été préparé (Dellaporta *et al.*, 1983). Ensuite le processus d'isolation de l'ARN a été réalisé en 05 étapes :

*1) Lyse des virus :* Dans un microtube de 1.5ml, 600 µl du tampon RAV1 sont ajoutés à 150 µl d'échantillon homogénéisé, après agitation ; celui-ci a été incubé à 70°C pendant 5 minutes.

2) Optimisation des conditions de liaison : 600 µl d'éthanol (96-100%) sont ajoutés à la solution puis mélangés à l'aide d'un agitateur (10-15 minutes).

3) Liaison de l'ARN: Nous avons placé le Nucleospin<sup>®</sup>RNA Virus (colonne) dans un microtube de 2 ml avec 700 µl de la solution lysée, ont été versés, puis centrifugé à 8000\*g/mn. Cette étape a été répétée avec le volume restant de la solution lysée.

4) Lavage et séchage de la membrane silica : 500 µl de tampon de lavage RAW ont été ajoutés à la colonne Nucleospin<sup>®</sup>RNA Virus, placée dans un nouveau microtube, puis centrifugée (8000\*g/mn). L'effluent a été éliminé, ce qui a permis d'éliminer les contaminants et les inhibiteurs de la PCR. Après nous avons procédé à un deuxième lavage avec 600 µl du tampon RAV3 ajouté au Nucleospin<sup>®</sup>RNA Virus puis centrifugé à 8000\*g/mn, cette étape a été répétée une fois avec ajout de 200 µl du tampon RAV3 suivi d'une centrifugation de 11000\*g/mn pendant 5mn pour éliminer l'éthanol rémanent.

5) Elution du L'ARN: La colonne Nucleospin<sup>®</sup>RNA Virus a été placée dans un tube de collection stérile de 1.5ml à laquelle nous avons ajouté 50 µl d'H<sub>2</sub>O traitée de nucléases préchauffée à 70°C. Le tout a été centrifugé à 11000\*g/mn pendant 5minutes. L'ARN a été conservé à -80°C.

### 3.6.2 La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)

L'intégralité des analyses moléculaires a été réalisée au niveau du laboratoire du département IPM de l'Institut Agronomique Méditerranéen de Bari, Italie. La synthèse de L'ADN complémentaire (ADNc) a été achevée par l'utilisation du M-MLV Reverse Transcriptase, Promega<sup>®</sup> USA. A partir de 1 µg d'ARN total dans un volume final de 20 µl de solution composée de 4 µl M-MLV 5× de tampon de réaction, 2 µl de random primers, 3 µl d'ARN et 1 µl de l'enzyme M-MLV reverse transcriptase, après homogénéisation par agitation dans un thermocycleur (BIORAD C1000<sup>®</sup>), la solution a été incubée à 2°C pendant 5 minutes, puis à 42°C pendant 30 minutes, et enfin à 85°C pendant 5 minutes pour désactiver la reverse transcriptase. L'ADNc a été conservé à -20°C.

### 3.6.3 PCR

Le marqueur moléculaire universel du gène de la protéine de la capsid CPg25 (672pb) a été amplifié en utilisant des amorces universelles, P25F : 5'ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG3' et P25R:5'TCAACGTGTGTTGAAT3' (Hilf *et al.*, 2000, 2005) synthétisés chez Integrated DNA technologies IDT<sup>®</sup>, Coraville, Iowa, États-Unis dans un volume total de 25 µl contenant 0,5 µl de chaque amorce sens F et anti-sens R, 2,5 µl de tampon PCR, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTPs,

0,20 µl de Taq DNA polymérase 5U/ µl (GoTaq® Hot Start Polymerase kit, Promega, USA). La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (BIORAD C1000®) selon le profil thermique d'amplification suivant : une dénaturation initiale de 94°C pendant 120 minutes, suivi de 35 cycles de dénaturation d'ADN bi-caténaire à 92°C pendant 30s, puis l'attachement des amorces à 54°C pendant 60s et l'étape d'élongation à 72 °C pendant 60s et enfin 72°C pendant 10mn comme extension finale. Les amplifias ont été visualisés dans un gel d'agarose à 1%, mélangé avec du bromure d'éthidium (0,6 µl/ml). La taille moléculaire attendue du produit PCR a été déterminée par comparaison au marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb, New England BioLabs®.Inc. USA.

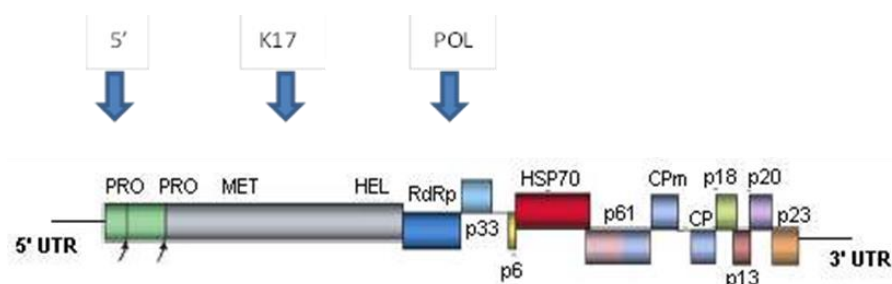
### 3.7 Caractérisation moléculaire des sources de CTV par les marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s.

L'amplification de la séquence spécifique par marqueurs moléculaires a été réalisée pour la caractérisation et l'évaluation des appartenances génétiques par l'utilisation d'une paire d'amorce universelle (CTV-CP25) et 04 paires d'amorces oligonucléotides hautement spécifiques et définitives relatives aux souches de référence VT, T3, T30 et le T36 (Hilf *et al.*, 1999 ; Hilf et Garnsey, 2000 ; Ayllon *et al.*, 2001 ; Hilf *et al.*, 2005) (Tab. 9) (Fig. 22).

**Tab 9.** Les amorces oligonucléotidiques et leurs positions génomiques utilisées dans la technique des marqueurs moléculaires multiples (M.M.M.s) (Hilf *et al.*, 2005).

Marqueur	Taille	oligo-nucleotides (séquences 5' à 3')	Position du marqueur
<b>T36CP</b>	672	(+) ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG (-) TCAACGTGTGTTGAATTTCCCA	16.152-16.823
<b>T36POL</b>	714	(+) TGACGCTAACGACGATAACG (-) ACCCTCGGCTTGTTTTCTTATG	10.791-11.508
<b>T30POL</b>	696	(+) GATGCTAGCGATGGTCAAAT (-) CTCAGCTCGCTTTCTCACAT	10.772-11.467
<b>VTPOL</b>	695	(+) GACGCTAGCGATGGTCAAGC (-) CTCGGCTCGCTTTCTTACGT	10.745-11.440
<b>T3K17</b>	409	(+) GTTATCACGCCTAAAGTTTGGT (-) CATGACATCGAAGATAGCCGAA	4.871-5.279

Les positions des séquences d'amorces T36, T30 et VT sont récupérés du NCBI GenBank. Numéro d'accès sont: AY170468, AF260651 et 56902, respectivement. La position du marqueur T3 est dérivée de la séquence du génotype T36.



**Fig 22.** Schéma de l'organisation du génome de *Citrus Tristeza virus*. Les flèches indiquent les différents cadres ouverts de lecture (ORFs) et les positions des marqueurs spécifiques selon Hilfet al., 2000.

Cinq réactions PCR ont été réalisées pour chaque échantillon. Une quantité de 2 µl d'ADNc de chaque source de CTV a été soumise à une série de réactions PCR, dans un volume final de 25 µl contenant 0,5 µl de chaque amorce spécifique (sense F et anti sense R), 2,5 µl de tampon PCR, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTPs, 0,20 µl de taq DNA polymérase 5U/ µl (Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase. USA). La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (BIORAD C1000®) selon le profil thermique d'amplification suivant : une dénaturation initiale de 94°C pendant 120 minutes, suivi de 35 cycles de dénaturation d'ADN bi-caténaire à 92°C pendant 30s, puis l'attachement des amorces à 54°C pendant 60s et l'étape d'élongation à 72 °C pendant 60s et enfin 72°C pendant 10mn comme extension finale. Les amplifias ont été visualisés dans un gel d'agarose à 1% additionné au bromure d'éthidium (0,6 µl / ml). La taille moléculaire attendu du produit PCR a été déterminée par comparaison au marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb. (New England BioLabs®.Inc. USA).

### 3.7.1 Caractérisation moléculaires des sources de CTV par clonage et séquençage du gène de la capside P25, et deux marqueurs spécifiques T30POL et VTPOL

Après la caractérisation moléculaire à l'aide des marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s, des isolats représentatifs de chaque groupe de profils génotypiques ont été retenus pour une caractérisation plus poussée en se concentrant sur le fragment CPg25 et les deux fragments spécifiques générés des analyses M.M.M.s (T30POL, VTPOL). À cette fin, trois isolats de CTV chacun selon son profil, ont été soumis au clonage et séquençage des marqueurs CPg25, T30POL, VTPOL. Les fragments moléculaires ont été amplifiés avec les amorces universelles (P25f/r) et les deux marqueurs spécifiques (T30POLf/r, VTPOLf/r), produisant des amplifias de 672pb, 696pb et 695pb respectivement et visualisés dans un gel à agarose de 1%. Ils sont ensuite élués en utilisant le kit zymoclean© Gel DNA Recovery Kit (Epigenetics company. USA) selon les instructions du fabricant. Les amplifias des trois échantillons sources ont été purifiés (produit

PCR) ensuite ligaturés au vecteur TOPO-TA (Invitrogen. USA) comme il a été décrit dans le paragraphe 4.3.2. Les ADNs recombinés ont fait l'objet de réactions PCR additionnelles avec les mêmes amorces utilisées initialement. Les plasmides sélectionnés ont été d'abord purifiés puis l'ADN plasmique séquencé.

### 3.7.1.1 Analyse des séquences

Les homologues de séquences ont été effectuées grâce au programme BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)); les séquences du gène P25 et les fragments des marqueurs spécifiques T30POL, VTPOL ont été publiées et déposées au niveau du NCBI (National Center of biotechnology Information), avec comparaison avec des séquences homologues. Pour définir les variations nucléotidiques et acides aminés des trois sources étudiées, les séquences ont été alignées avec le logiciel bio-informatique (*multiple sequence alignment software* CLUSTALW). En outre les séquences de références des trois marqueurs récupérées de la NCBI GeneBank (Tab. 10) et toutes les séquences générées de la présente étude ont été analysées par le logiciel phylogénétique et d'évolution moléculaire MEGA7 selon Kumar *et al* (2016). L'arbre phylogénétique a été développé en utilisant le programme *Neighbor-joining method*, ensuite les distances évolutives ont été calculées par la méthode *Maximum Composite Likelihood* en utilisant le logiciel MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

**Tab 10.** Les séquences nucléotidiques de références récupérées du (NCBI GenBank) correspondant aux marqueurs T36CP, T30POL et VTPOL.

Génotype	Marqueur	Isolat	Origine	N° accession
	<b>T36CP</b>	T36	USA	AY170468
		VT	M.Orient	U56902
		CA-VT-AT39	Californie	KU361339
		CA-T30-AT4	Californie	KU578007
		T30	Floride	EU937520
		L-Val1-Maroc	Maroc	HF947337
		L-Clem5-Maroc	Maroc	HF947334
		CTV	Mexique	DQ272579
		SP	New Zélande	EU857538
		T3	USA	KC525952
		QAHA	Egypte	AY340974
		T30like	Californie	GQ424348
		CTV-2000	Chine	AJ518841
		K51	Italie	FN661494
		4B	Pouilles	FN661497
		QS2(VT)	Syrie	FN552118
		T385	Espagne	Y18420
	Bau282	Sicile	KC748391	
<b>T30</b>	<b>T30POL</b>	T30	Floride	AF260651
		T385	Espagne	Y18420
		T30like	Calabre	JX106451
<b>VT</b>	<b>VTPOL</b>	M423GR	Grèce	MF595989
		FS703-VT	Floride	KC517492
		VT	M.Orient	U56902
		CA-VT-AT39	Californie	KU361339
		CT-ZA3	Afrique de sud	KC333868
		CT14A	Chine	JQ911663
	SG29	Italie	KC748392	

### 3.8 Essai d'efficacité de transmission des sources de CTV identifiées pendant l'étude à travers des populations locales d'*A. gossypii* et *A. spiraecola* des agrumes.

Partant du fait que quelques isolats de CTV ne sont transmissibles que par certaines espèces de pucerons et que certaines espèces de pucerons transmettent plus efficacement certains isolats que d'autres (Dawson *et al.*, 2015), nous avons considéré trois isolats de CTV détectés dans la Vallée de Chlef, PC-3-ALG, SY-1-ALG et NN-2-ALG (Tab. 11). Ils correspondent à trois génotypes différents T30+VT, VT+T36 et VT qui respectivement ont été utilisés dans les essais de transmission de CTV. Les greffons prélevés des arbres potentiellement infectés de CTV au niveau

des vergers sélectionnés (arbres donneurs) ont été greffés sur des plantules d'oranger *Citrus sinensis* (Osbeck), Variété : Madame Vinous, puis maintenues dans une serre en insect-proof. L'infection a été confirmée deux mois après inoculation par analyse sérologique utilisant DAS-ELISA (SEDIAG, S.A.S. France). Des plantules saines d'oranger (Variété : Madame Vinous) ont été utilisées comme plantes réceptrices.

**Tab 11.** Sources de CTV sélectionnées pour les essais de transmission

	commune	Wilaya	Variété	Porte greffe	Age	Symptômes	Code	génotype
1	Medjadja	Chlef	Clémentine orogrande	Macrophylla	36	Dépérissement	SY-1-ALG	T36+VT
2	Medjadja	Chlef	Oranger powell navel	Macrophylla	15	Rabougrissement	NN-2-ALG	VT
3	Oued sly	Chlef	Oranger powell navel	Macrophylla	15	Asymptomatique	PC-3-ALG	T30+VT

### 3.8.1 Obtention de colonies de pucerons indemnes de virus

Les 2 espèces *A. gossypii* et *A. spiraecola* ont été évaluées dans ces essais de transmission. Des colonies de chacune des espèces ont été collectées sur arbres d'agrumes infestés et indemnes de CTV situés au niveau de la zone d'étude. Pour générer des colonies de pucerons non virulifères et éviter un mélange de populations de pucerons au sein de la même colonie nous avons transféré une seule femelle adulte aptère virginipare de chacune des deux espèces sur des plantules de bigaradier (*Citrus aurantium* L). Les nouvelles colonies ont été introduites dans des cages entomologiques au niveau de la salle d'élevage du laboratoire régional d'entomologie de la station régionale de la protection des végétaux de Chlef (Fig. 23). L'élevage a été effectué sous les conditions suivantes :  $25 \pm 2$  °C,  $65 \pm 5\%$  HR avec une photopériode de 16:8 (L:D).



**Fig 23.** Différentes étapes du test de transmissibilité de CTV par les pucerons ; (a et b) : dépôt de pucerons infectieux sur plantes réceptrices ; (c) : élimination de pucerons par insecticide ; (d) : le maintien sous serre.

### 3.8.2 Acquisition et transmission de CTV

Les plantules de la variété « Madame Vinous » précédemment inoculées avec les trois isolats de CTV ont été utilisées dans les essais d'efficacité de transmission des deux espèces d'aphides. *A. gossypii* et *A. spiraecola*. La méthodologie de l'acquisition a été basée sur le protocole décrit par Yokomi et DeBorde (2005) et Campolo *et al* (2014). Selon plusieurs auteurs ( Norman *et al* (1968) ; Racciah *et al* (1976b) ; Roistacher *et al* (1984) ; Yokomi and DeBorde (2005) ; Dawson *et al* (2013) et Campolo *et al* (2014), il semble qu'il n'existe pas de différence dans l'acquisition et la transmission des souches de CTV entre les pucerons adultes et leurs larves. Cette information nous a permis de transférer des ébauches de feuilles infestées par des stades différents vers de nouvelles pousses de la variété d'agrumes Madame Vinous (plants donneurs) laissant les pucerons se nourrir sur leurs nouveaux hôtes infectés (période d'acquisition AAP) pour 24 heures (Campolo *et al.*, 2014). A la fin de la période d'acquisition et pour chaque expérience de transmission, pour contraindre les pucerons de retirer leurs stylets du tissu foliaire nous les avons touchés avec un pinceau souple. Les pucerons sont immédiatement transférés sur les tissus tendres des plantules saines de la même variété (plantes réceptrices) pour permettre la transmission, en prenant en compte que la période d'inoculation IAP est d'une durée de 24 heures selon Campolo *et al* (2014). Après la phase d'inoculation, pour éliminer les pucerons les plantes réceptrices ont été traitées avec imidaclopride à 0.05% qui est un insecticide de la famille chimique des chloronicotinyles présenté sous la forme de dispersion huileuse (OD), et qui est connu sous le nom commercial de Confidor™ 200 OD 200g/L de la société Bayer Cropscience® (DVCT, 2017) (Fig. 23). Les plantes inoculées ont été maintenues sous serre prétraitée contre les insectes et dotée d'insect-proof durant deux mois (Fig. ). La transmission a été vérifiée 60 jours après inoculation, selon les recommandations de Yokomi et DeBorde (2005) et Velasquez-Montreal *et al* (2009). Dix répétitions ont été effectuées pour chaque essai.

## 3.9 Détection de CTV et caractérisation de sous-isolats inoculés par puceron

### 3.9.1 Détection sérologique des isolats de CTV après le passage par puceron

La transmission a été vérifiée par analyse sérologique DAS-ELISA (SEDIAG, S.A.S. France) 60 jours après inoculation (dès l'apparition de nouvelles pousses) d'après les recommandations de Yokomi et De Borde (2005), et de Velasquez-Montreal *et al* (2009). Le protocole utilisé est le même décrit dans le paragraphe 4.4.1.2.

### 3.9.2 Caractérisation moléculaires des sous-isolats de CTV après le passage des pucerons

La transmission par pucerons altère quelques fois la population virale par l'apparition de nouvelles variantes (Gillings *et al.*, 1993; Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Brlansky *et al.*, 2003 ; Moreno *et al.*, 2008 ; Dawson *et al.*, 2015 ; Yahiaoui *et al.*, 2015). Dans certains cas la transmission de CTV par pucerons altère l'expression des symptômes et les caractéristiques pathogéniques d'un isolat (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a; Moreno *et al.*, 1993a ; Broadbent *et al.*, 1996), ainsi que sa réactivité sérologique vis-à-vis des anticorps monoclonaux (Kano et Koizumi, 1991 ; Cambra *et al.*, 1993). Afin d'évaluer les probables altérations génomiques des isolats de CTV par la transmission par pucerons, les sous-isolats de CTV transmis avec succès ont été soumis à une analyse moléculaire supplémentaire.

#### 3.9.2.1 Clonage et séquençage du gène de la protéine de capsid CP25 des sous-isolats inoculés par les pucerons

Les acides nucléiques totaux ont été récupérés à partir des tissus végétaux inoculés par les pucerons vecteurs. La synthèse du premier brin d'ADNc ainsi que la transcription inverse ont été mises en œuvre suivant les instructions de Foissac *et al* (2001). Les réactions PCR ont été réalisées avec le marqueur (CP25). Ces gènes ont été amplifiés avec les amorces (P25f/r) produisant ainsi des amplifias de 672pb. Les séquences qui en résultent ont été soumises au clonage et au séquençage comme il a été déjà décrit en paragraphe (4.3.2) ; ensuite elles ont été comparées à leurs isolats sources correspondantes, ainsi qu'à d'autres références CTV : SY568, T30, T36, VT, T385 (Tab 10) en utilisant des analyses BLAST (disponibles en ligne auprès du Centre National d'Information Biotechnologique, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

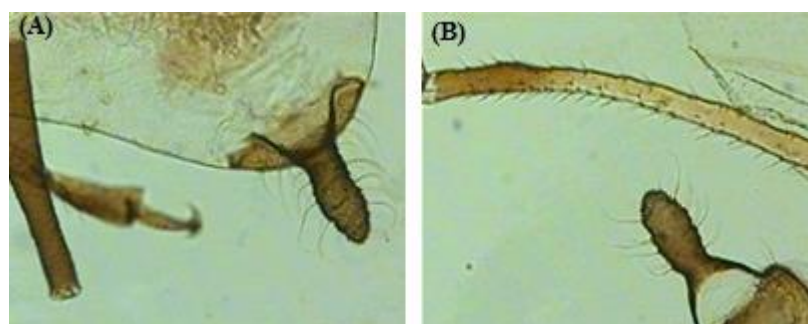
#### 3.9.2.2 Analyse par les marqueurs moléculaires multiples des sous-isolats inoculés par les vecteurs de CTV

Les mêmes préparations d'ADNc ont été soumises à l'analyse par la technique des marqueurs moléculaires multiples (M.M.M.s) comme décrit précédemment, en utilisant les marqueurs les plus spécifiques de chaque groupe de génotype comprenant T36POL, T30POL, VTPOL et T3K17, comme documenté par Hilf *et al.*, (2005).

## 4 Résultats et discussions

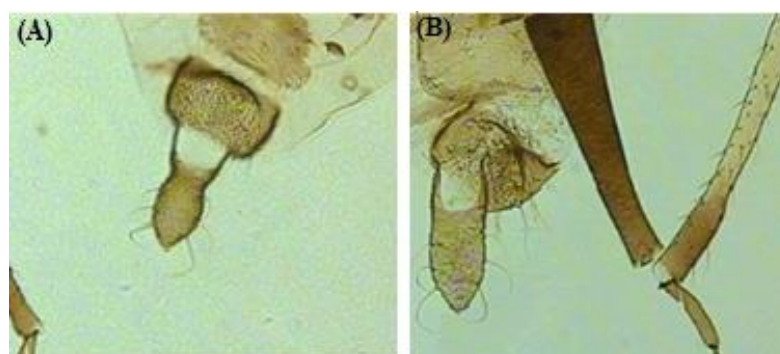
### 4.1 Surveillance des espèces de pucerons vecteurs du CTV

Une enquête sur la fréquence et le taux d'infestation de la population de pucerons vecteurs a été effectuée de Mars à Mai 2016 dans 13 vergers situés dans 8 zones distinctes (Fig.15 et Tab. 4). L'identification des espèces de pucerons rencontrées au cours de la surveillance correspond à deux espèces seulement, alors que certains auteurs ont signalé près de 14 espèces (Blackman et Eastop, 2006). Il s'agit d'*Aphis gossypii* (Glover 1877) et *Aphis spiraecola* (Patch 1934) (Hemiptera: Aphididae) qui sont illustrées dans les Figures 24, 25 et 26.



**Fig 24.** Photographies associées à *Aphis spiraecola* en correspondance avec la clé de Blackman et Eastop (2006),

(A) : cornicules et cauda de couleur sombre, (B) : cauda avec 6 à 12 soies.



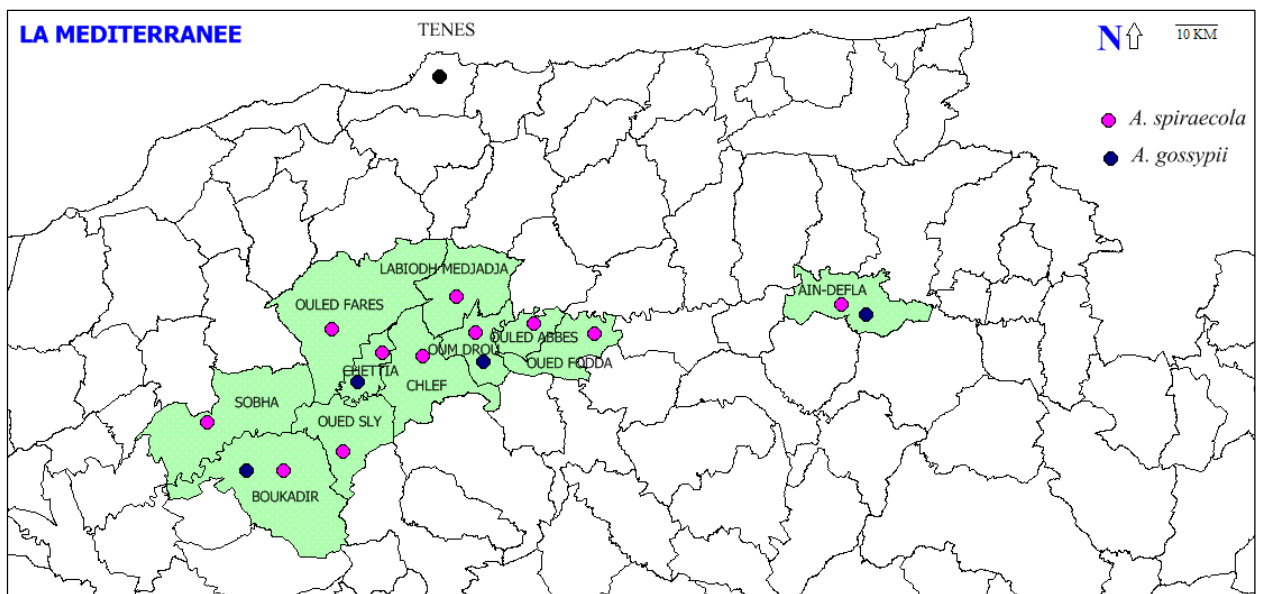
**Fig 25.** Photographies associées à *Aphis gossypii* en correspondance avec la clé de Blackman et Eastop (2006),

(A) : cauda avec 4 à 7 soies, (B) : cauda de couleur pale et cornicules sombres.

D'après Blackman et Eastop (2006) la majorité des espèces du genre *Aphis* sont décrites sur des plantes herbacées ou des arbustes ; les espèces qui vivent sur arbres sont rarement décrites. Les deux espèces que nous avons identifiées font partie de cette minorité. Elles sont très polyphages, et vectrices de plus de 50 virus notamment le CTV, la Sharka, le virus Y de la pomme de terre, etc.... (Blackman et Eastop, 1984 ; Barbagallo *et al.*, 1996).



**Fig 26.** (A) : Feuilles enroulées infestées par *Aphis spiraecola*, (B) : colonie d'*Aphis gossypii*



**Fig 27.** Localisation géographique d'*A. gossypii* et *A. spiraecola* dans la zone d'étude.

Cette étude, a montré une dominance d'*Aphis spiraecola* (Fig. 27), avec un indice d'abondance relative de 61,2 par rapport à celui d'*A. gossypii* qui est de 13.3 (Tab. 12). Cette situation de dominance d'*Aphis spiraecola* au niveau de la zone d'étude est similaire à la situation observée en Syrie (Abou Kubaa *et al.*, 2009), en Iran (Delkhosh et Tousi, 2009), en Turquie (Baloglu et Birisik, 2009) et également en Algérie (Belkahla *et al.*, 2013 et Lebbal et Laamari, 2015, 2016 ; Labdaoui *et al.*, 2018 ). Le taux d'infestation d'*A. gossypii* enregistré lors d'une prospection réalisée en 2010 dans la Vallée de Chlef a été estimé à 43% (Ali Arous *et al.*, 2017), ceci est probablement en relation avec la période de prospection qui s'est étalée jusqu'au la deuxième poussée de sève (Juin) du fait de la tolérance de *A. gossypii* aux hausses de températures. *A. spiraecola*, est plus dominant sur la première poussée de sève (Mars) pendant laquelle les températures étaient moins élevées. Dès que les températures augmentent c'est *A.gossypii* qui prédomine. L'enquête a montré aussi l'absence de l'espèce *Toxoptera aurantii* pendant cette étude. Cette espèce qui est oligophage sur Citrus et sur quelques genres d'arbres et de plantes herbacées (Barbagallo, 1966 ; Patti, 1983, 1985 ; Addante *et al.*, 2009), a été signalée dans d'autres zones agrumicoles en Algérie (Belkahla *et al.*, 2013 ; Labdaoui, 2019). Par contre, à ce jour, il est important de signaler qu'il n'y a aucune évidence de la présence du vecteur majeur du CTV, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), bien que cette espèce a déjà été signalée dans le pourtour Méditerranéen, au Portugal et en Espagne (Ilharco *et al.*, 2005 ; Cambra, 2007).

*A. spiraecola* qui est une espèce holocyclique dans le continent américain et au Japon, mais apparemment anholocyclique dans le reste du monde, hiverne sous forme de petites colonies de femelles adultes aptères dans les bourgeons et dans les crevasses du tronc des agrumes (Stoetzel, 1994). Elles apparaissent très tôt au printemps, dès les premières hausses de température. *A. spiraecola* cause de sérieux dégâts sur jeunes pousses (Fig.26a) et bourgeons floraux au printemps (Hullé *et al.*, 1999), en provoquant le recoquillement des jeunes feuilles et la chute des bourgeons floraux (Patti et Barbagallo, 1998), avec un impact sur le rendement qui peut être considérable sur jeunes plants de Citrus notamment en pépinières. Cet aphide possède une certaine capacité de transmission des virus, comme le virus Y de la pomme de terre (PVY), le virus de la mosaïque du concombre (CMV), le virus de la sharka (PPV), et bien entendu le virus du dépérissement des agrumes (CTV) (Blackman et Eastop, 2006) ; mais il semble être moins efficace que *A.gossypii* (Lee et Bar-joseph, 2000). Selon Yokomi et Garnsey (1987), il serait trois fois moins efficace. Le nombre limité d'ennemis naturels attaquant *A. spiraecola* (Labdaoui *et al.*, 2018), explique en partie la fréquence d'occurrence et la densité élevée de cette espèce dans la zone d'étude (Fig. 28).

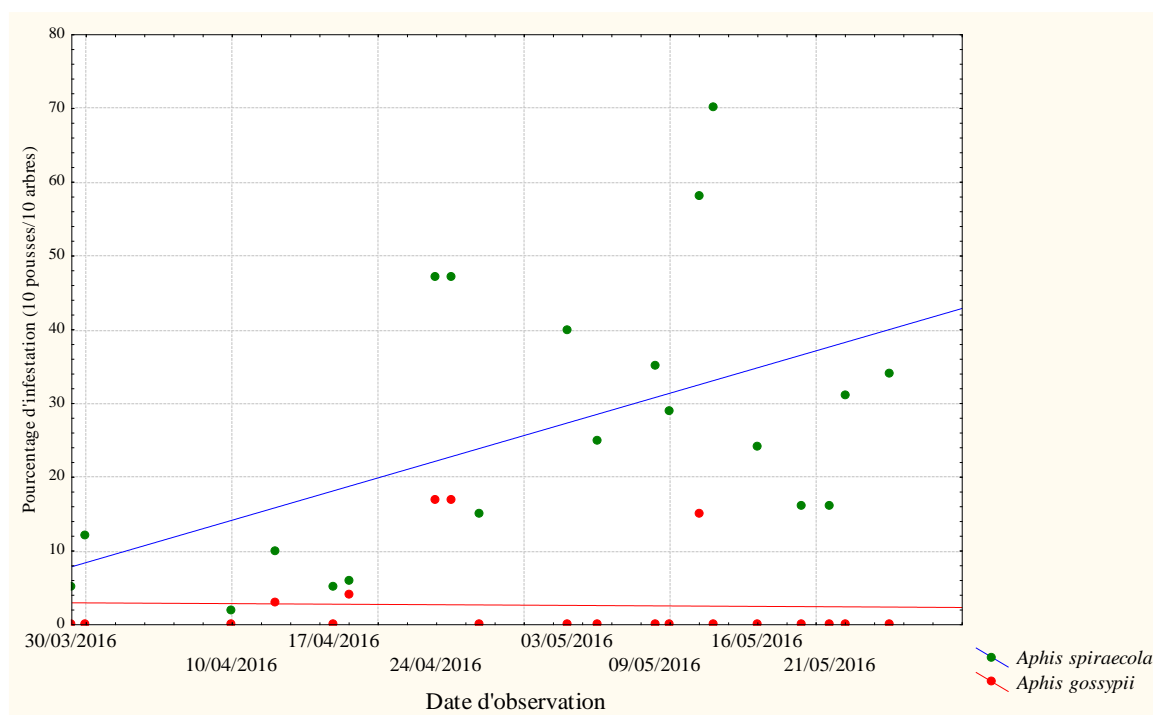
Tab 12. Taux d'infestation des pucerons par espèce dans les différents vergers prospectés

Date d'observation	Taux d'infestation (%) <i>A spiraecola</i>	Taux d'infestation (%) <i>A gossypii</i>	Lieu
29/03/16	4	0	AIN DEFLA
30/03/16	5	0	OUM DROU
31/03/16	12	0	CHETTIA
10/04/16	2	0	CHETTIA
13/04/16	10	3	OUM DROU
17/04/16	5	0	MEDJADJA
18/04/16	6	4	BOUKADER
24/04/16	47	17	CHETTIA
25/04/16	47	17	AIN DEFLA
27/04/16	15	0	CHETTIA
03/05/16	40	0	MEDJADJA
05/05/16	25	0	OUED FODDA
09/05/16	35	0	BOUKADER
10/05/16	29	0	OULED FARES
12/05/16	58	15	AIN DEFLA
13/05/16	21	0	OUED FODDA
16/05/16	24	0	CHLEF
19/05/16	16	0	CHLEF
21/05/16	16	0	CHETTIA
22/05/16	31	0	MEDJADJA
<b>F<sub>rel</sub></b>	<b>100%</b>	<b>23.8%</b>	
<b>D<sub>rel</sub></b>	<b>22.4%</b>	<b>2.8%</b>	
<b>RAI*</b>	<b>61,2</b>	<b>13,3</b>	

RAI (Indice d'Abondance Relative) =  $(D_{rel} + F_{rel}) / 2$ .  $D_{rel}$  = densité relative.  $F_{rel}$  = fréquence relative  $F_{rel}$  (Fréquence d'occurrence relative) =  $P_i / P * 100$ ,  $P_i$ : nombre total de prélèvements contenant l'espèce prise en considération;  $P$ : nombre total de prélèvements effectués (Dajoz, 2006).

De nombreuses études réalisées au niveau des vergers d'agrumes du sud de l'Italie durant plus de vingt ans ont montré que *A. spiraecola* est l'espèce la moins visitée par les parasitoïdes comparativement aux autres espèces vivant sur agrumes (Tremblay *et al.*, 1978b). Malgré sa capacité de transmission du virus moins élevée qu'*A. gossypii*, ses caractéristiques ainsi que son statut d'espèce dominante dans les vergers agrumicoles du Moyen Chlef montrent son importance économique dans la zone d'étude (Fig. 27, 28). La prospection a montré que *Aphis gossypii* (Glover) était beaucoup moins fréquent que *A. spiraecola* durant la période de prospection (Fig. 28). Le taux d'infestation de cette espèce n'a pas excédé 2.8%. Sur les treize (13) vergers surveillés

*A. gossypii* n'a été présent que dans 05 vergers avec de faible pourcentages variant entre 3 et 17%. Sa fréquence d'occurrence est également faible (23.8%). La situation actuelle diffère de celle de 2010 où l'enquête a révélé un taux d'infestation moyen par *A. gossypii* de 43% (Ali Arous *et al.*, 2017). Cette baisse importante de ses populations peut être expliquée par différents facteurs. Le caractère très polyphage de l'espèce lui permet de vivre sur une large gamme d'hôtes de réserve, notamment sur les cultures maraichères (Kring, 1959). Ces dernières sont largement présentes dans la région d'étude. D'autre part nous pensons que la compétition pour l'espace avec *A. spiraecola* est une autre raison de cette situation, car cette dernière s'installe en premier sur jeunes pousses, etne peut être concurrencée par *Aphis gossypii* que si les températures agmentent. Au niveau des vergers conduits en intensif où les programmes de fertilisation sont excessives, il a été constaté lors de nos sorties pour le dépistage de CTV pendant la deuxième poussée de sève située entre Juin et Juillet, que l'espèce *A. gossypii* sur jeunes pousses d'été est dominante avec absence presque totale de l'espèce *A. spiraecola*.



**Fig 28.** Fréquence d'occurrence de *A. gossypii* et *A. spiraecola* en fonction de dates d'observation.

Une absence quasi-totale de *Toxoptera aurantii* a été observée durant la prospection. Les nombreuses applications d'insecticides (pyréthrinoides de synthèse, organophosphorés, carbamates ...) utilisées au cours de l'année pour combattre d'autres ravageurs dans les vergers d'agrumes, peuvent agir sur les pucerons monophages qui n'ont pas beaucoup d'autres plantes hôtes pour s'y réfugier. Nous pensons que l'espèce *Toxoptera aurantii* pourra être réduite à cause de l'action combinée des traitements chimiques et la compétition spatiale exercée par *A. spiraecola*

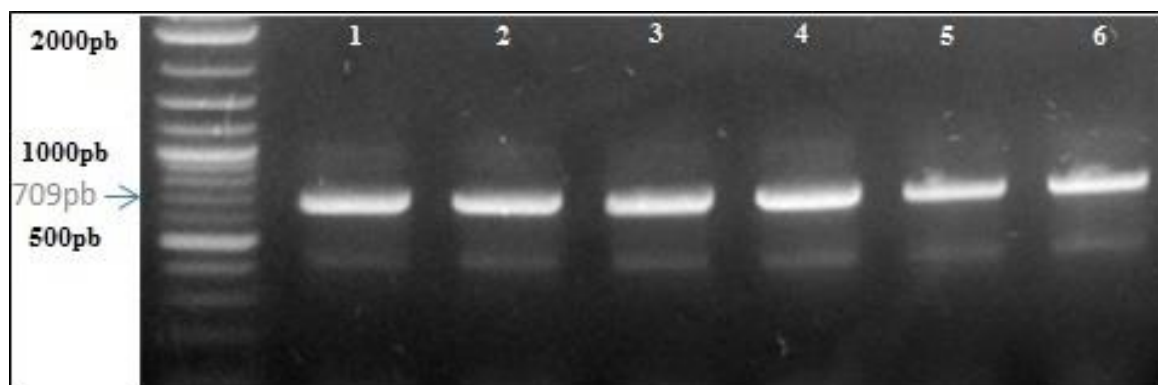
et *A. gossypii* vu qu'elles sont plus prolifiques (Yokomi et Damsteegt, 1991). *Aphis gossypii* peut produire des dégâts très importants sur certaines cultures (Lopes, 2007). Sur agrumes l'espèce excrète du miellat causant la chute des fleurs, le flétrissement des feuilles et l'installation de la fumagine. Cet aphide peut produire soixante générations par an. Il est myrmécophile car il entretient un mutualisme étroit avec les fourmis qui le protègent contre ses ennemis naturels (Patti et Barbagallo, 1998). Peu fréquent sur agrumes au cours de cette étude, le statut d'*A. gossypii* change d'une année à une autre. Une étude qui a été menée sur la dynamique de population des pucerons d'agrumes dans l'est algérien à Skikda a montré aussi que *A. gossypii* est moins fréquent qu'*A. spiraecola* (Lebbal et Laamari, 2016). Sur agrumes c'est un vecteur potentiel de nombreux isolats du CTV (Ilharco, 1992 ; Gariido-Vivas et Ventura, 1993). *A. gossypii* a transmis efficacement des souches sévères de CTV en Californie et en Floride (Bar-joseph et Loebenstein, 1973 ; Roistacher, 1981 ; Yokomi et Garnsey, 1987). A l'exception de la voie végétative notamment par le greffage, le CTV ne peut être transmis d'un arbre infecté à un arbre sain que par un vecteur (Roistacher, 1988 ; Yokomi *et al.*, 1989) et l'*Aphis gossypii* est l'un des vecteurs les plus efficaces derrière l'espèce *Toxoptera citricidus* (D'Onghia et Lacirigniola, 1998 ; Yokomi *et al.*, 2018). Cette espèce est à l'origine de la propagation du CTV en Espagne (Cambra *et al.*, 2000b) et également dans la Mitidja (Larbi *et al.*, 2015).

#### 4.1.1 Conclusion

À travers cette prospection, deux espèces potentiellement vectrices de CTV ont été identifiées, il s'agit d'*A. spiraecola* et de *A. gossypii*. La surveillance a montré une prédominance d'*A. spiraecola* avec une densité relative de 22.4% par rapport à celle d'*A. gossypii* qui est seulement de 2.8% et une fréquence relative de 100% pour *A. spiraecola* mais seulement de 23.8% pour *A. gossypii*. Cependant nous avons noté l'absence de *Toxoptera aurantii* dans nos échantillons, alors que cette dernière est inventoriée dans la plaine de Mitidja et nord-ouest algérien (Belkahla *et al.*, 2013 ; Labdaoui et Guenaoui, 2018). *A. spiraecola* par sa tolérance aux basses températures, son apparition précoce, sa capacité de dispersion et de reproduction colonisent massivement les jeunes pousses de la première poussée de sève, alors qu'*A. gossypii* est plus fréquent sur les jeunes feuilles de la deuxième poussée de sève. Parallèlement durant les prospections effectuées à ce jour, aucune présence du puceron *Toxoptera citricidus* n'a été signalée en Algérie. Cette prospection nous a permis de déduire que la dissémination naturelle du CTV dans les vergers d'agrumes étudiés, pourrait être assurée par la présence des deux espèces citées. Cette situation oblige les services phytosanitaires à mettre en pratique une stratégie de lutte efficace contre ces deux vecteurs afin de ralentir la propagation de la maladie de la Tristeza.

## 4.2 Identification moléculaire et variations génétiques des différentes populations autochtones d'*A. gossypii* et *A. spiraecola*

Le séquençage partiel du marqueur moléculaire mtCOI a généré des séquences nucléotidiques de 709 pb (Fig. 29) (Annexe 5).



**Fig 29.** Amplifias de PCR (Polymerase chain reaction) (709pb) à travers l'utilisation des amorces universelles : LCO1490F- HCO2198. Le produit PCR visualisé dans un gel agarose 1,5%. Ligne 1 : marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb

L'analyse des séquences et leur étude sur la banque de données BLAST a montré une grande homologie pour les trois espèces étudiées. Enfin les séquences ont été envoyées pour enregistrement à la base de données NCBI GenBank et un numéro d'accèsion a été attribué à chaque séquence (Tab. 13).

**Tab 13.** Numéros d'accèsion NCBI GenBank des séquences de nucléotides (mtCOI) des populations de pucerons étudiées.

SequenceID	Date de Collection	Pays	Plante-hôte	Espèce	Lat_Lon	NCBI accessions
AgCITR	20-mar-17	Algeria	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Aphis gossypii</i>	36.09 N 1.23 E	MH632726
AgCOUR	20-mar-17	Algeria	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Aphis gossypii</i>	36.15 N 1.24 E	MH632727
AgPOIV	10-apr-17	Algeria	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	36.14 N 1.26 E	MH632728
AgHIBI	15-apr-17	Algeria	<i>Hibiscus syriacus</i>	<i>Aphis gossypii</i>	36.10 N 1. 23E	MH632729
AsCITR	14-mar-17	Algeria	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	36.12 N 1.24 E	MH632730
AsHIBI	20-mar-17	Algeria	<i>Hibiscus syriacus</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	36.20 N 1.28 E	MH632731
AsPOMM	10-apr-17	Algeria	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	36.06 N 1.09 E	MH632732
AsCOUR	15-apr-17	Algeria	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	36.18 N 1.29 E	MH632733
AsPOIV	15-apr-17	Algeria	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	36.11 N 1.32 E	MH632734
PpALG	30-apr-17	Algeria	<i>Prunus persicae</i>	<i>Ptero persicae</i>	30.26 N 1.17 E	MH636013

Les divergences de séquences génétiques ont été analysées au niveau espèce, genre et famille. La divergence moyenne interspécifique des séquences dans la sous-famille des Aphidinae d'*A.*

*gossypii* et de *A. spiraecola* était de 6,4% avec un intervalle de 5,8% à 7%. La variation interspécifique moyenne entre les sous-familles (Aphidinae et Lachnidae) était significativement élevée allant de 9,4% à 10,6%. Cependant, les variations intra-spécifiques entre populations de la même espèce, a révélé un très faible niveau de diversité clonale allant de 0% à 0,3% pour l'espèce *A. gossypii* et de 0% à 0,9% pour *A. spiraecola*. Ces résultats confirment que le marqueur mtCOI s'avère être un outil d'identification efficace et crédible pour les espèces de pucerons. Dans ce contexte plusieurs auteurs ont confirmé l'utilité du marqueur mtCOI dans l'identification interspécifique des espèces de la sous-famille Aphidinae (Wang *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2016)

L'arbre phylogénétique conçu pour comparer les séquences COI des populations étudiées de pucerons (Fig. 30) avec leurs homologues déposés à la NCBI GenBank database, a montré que les pucerons étudiés se sont retrouvés dans trois groupes distincts. En effet les séquences du marqueur mtCOI des différentes populations d'*A. gossypii* collectés sur agrumes, courgette, poivron, pomme de terre, concombre et hibiscus ont été classifiées dans le groupe 1 avec l'ensemble des séquences homologues de populations d'*Aphis gossypii* récupérées de la GenBank database. De la même manière, les séquences du marqueur mtCOI d'*A. spiraecola* prélevés sur agrumes, courgette, poivron et pomme de terre ont été groupés en un seul groupe (groupe 2) avec le marqueur homologue de toutes les populations de la même espèce déposées à la NCBI database. Un troisième groupe s'est distingué par les séquences mtCOI de *Pterochloroides persicae*. L'échantillon d'*A. spiraecola* trouvé sur hibiscus (AS\_HIBI-1) est par contre inclus dans un sous-groupe à l'intérieur du groupe 2. En effet la légère variation génétique du Marqueur COI observé chez différentes populations d'*A. spiraecola* concorde avec les résultats obtenus sur la même espèce collectée dans l'Est algérien sur différentes espèces de citrus en utilisant la technique Random-Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction technique (RAPD-PCR) (Lebbal *et al.*, 2019). Les séquences mtCOI de 17 populations d'*A. gossypii* collectées à partir de cinq plantes hôtes différentes ont montré une très faible variation entre les séquences nucléotidiques du marqueur COI, ce qui suppose que la divergence est relativement récente comme l'ont rapportée divers chercheurs (Carletto *et al.*, 2009 ; Komazaki *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2015 ; Lokeshwari *et al.*, 2015 ) (Tab. 14).

**Tab14.** Comparaison de séquences mtCOI des populations d'*A. gossypii* et *A. spiraecola*

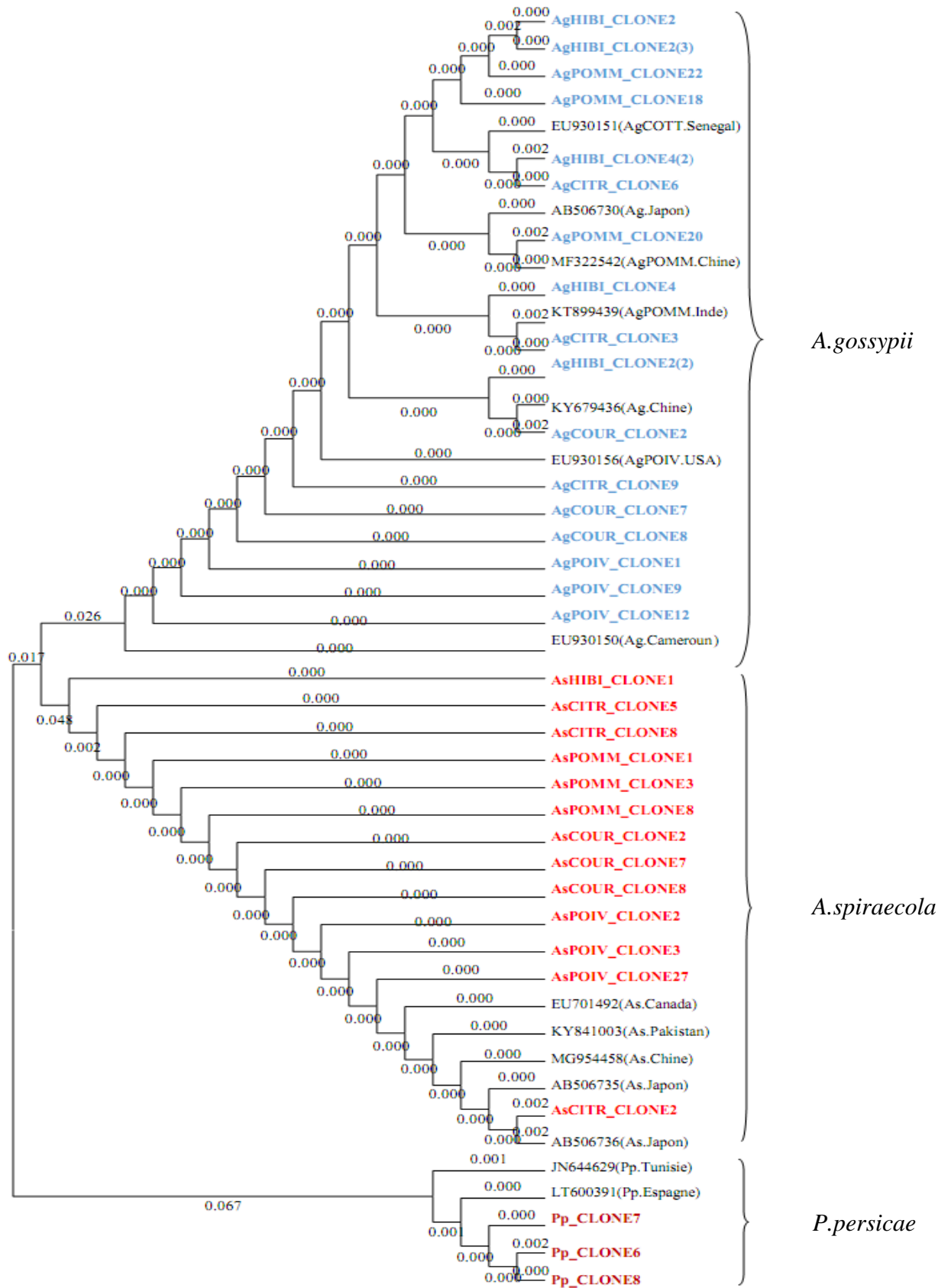
<i>A. gossypii</i>					
	Ag <sub>CIT</sub>	Ag <sub>POIV</sub>	Ag <sub>HIBI</sub>	Ag <sub>POMM</sub>	Ag <sub>COUR</sub>
<b>Ag<sub>CIT</sub>3-18</b>	ID	99.7%	99.7%	99.7%	99.8%
		0.001	0.0005	0.0005	0.000
<b>Ag<sub>POIV</sub>3-22</b>		ID	99.6%	99.6%	99.6%
			ID	0.001	0.001
<b>Ag<sub>HIBI</sub>8-18</b>			ID	99.7%	99.7%
				ID	0.0005
<b>Ag<sub>POMM</sub>3-60</b>				ID	99.7%
				ID	0.0005
<b>Ag<sub>COUR</sub>3-17</b>					ID
					ID
<i>A. spiraecola</i>					
	As <sub>CIT</sub>	As <sub>POIV</sub>	As <sub>HIBI</sub>	As <sub>POMM</sub>	As <sub>COUR</sub>
<b>As<sub>CIT</sub>3-15</b>	ID	100%	99.1%	100%	99.8%
		0.000	0.0005	0.000	0.000
<b>As<sub>POIV</sub>3-32</b>		ID	99.2%	100%	99.8%
			ID	0.000	0.000
<b>As<sub>HIBI</sub>1-1</b>			ID	99.2%	99.1%
				ID	0.0005
<b>As<sub>POMM</sub>3-12</b>				ID	99.8%
				ID	0.000
<b>As<sub>COUR</sub>3-17</b>					ID
					ID

Nombre de la dernière ligne indique l'écartype

Nombre après le code de l'hôte indique le nombre de produit PCR cloné

Nombre après trait d'union (-) indique le nombre d'ADN plasmique recombiné du même produit PCR cloné.

Pour *A. gossypii*, la matrice d'identité de séquence présentée dans le Tableau 14, laisse penser que le niveau de variation intra-spécifique est extrêmement faible. Le nombre de substitutions de bases par site à partir d'une moyenne obtenue sur toutes les paires de séquences était de 0,3%. Ce niveau de divergence génétique est nettement inférieur en comparaison avec la divergence moyenne de 0.5% entre les sous espèces appartenant au groupe d'*A. gossypii* telles que *A. taraxacicola*, *A. clerodendri* et *A. sedi* (Lee *et al.*, 2015 ). Bien que la séquence nucléotidique ait été bien conservée dans tout le fragment séquencé COI des populations d'*A. spiraecola*, le nombre total de substitutions de bases de toutes les paires de séquences était légèrement supérieur à 0,5%.



**Fig 30.** Le Neighbor-Joining (NJ) arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre diverses populations d'*A. gossypii*, *A. spiraecola* et de *P. persicae* collectés dans la Vallée de Chlef sur la base de l'analyse d'un fragment d'ADN de la sous-unité mitochondriale cytochrome oxydase (mtCOI) de 709 pb.

Bien que les plantes hôtes jouent un rôle important dans la structure génétique des populations d'*A. gossypii* (Fuller *et al.*, 1999 ; Brévault *et al.*, 2008), la diversité clonale au sein des échantillons de populations d'*A. gossypii* de la Vallée de Chlef testée par le marqueur mitochondrial (mtCOI) a été extrêmement faible, car tous les individus avaient une séquence nucléotidique similaire. Bien que cette espèce présente des phénotypes différents en fonction des plantes-hôtes la ressemblance génétique entre populations suppose que cette espèce se reproduit exclusivement par parthénogenèse. Dans la majeure partie de l'aire de distribution d'*A. gossypii*, (Afrique et Europe inclus), cet aphide est considéré être anholocyclique, se reproduisant continuellement par parthénogénèse (Ebert et Kartwright, 1997 ; Blackman et Eastop, 2007). Enfin les résultats de notre étude n'ont montré aucun indice de différenciation associée à l'hôte dans les populations d'*A. gossypii* et *A. spiraecola* de la Vallée de Chlef en comparaison avec les séquences mitochondriales de mtCOI rapportées par divers chercheurs (Komazaki et Osakabe, 1998; Komazaki et Toda, 2008 ; Wang *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2016).

#### 4.2.1 Conclusion

Dans la présente étude, nous avons montré l'utilité du gène mtCOI en tant que marqueur moléculaire distinguant différentes espèces de pucerons au stade juvénile. À l'inverse, ce marqueur moléculaire n'a pas pu identifier une présence probable de sous-espèces ou biotypes, car l'analyse moléculaire basée sur la séquence mtCOI n'a pas montré de variations génétiques significatives entre les différentes populations d'*A. gossypii* et d'*A. spiraecola*. La diversité clonale au sein d'échantillons de deux populations était très faible, ce qui semble indiquer que ces populations se reproduisent par anholocyclie. Nous avons considéré ce travail comme une première étape pour l'identification des espèces de pucerons à des stades très précoces de leur développement. En ce qui concerne la distinction entre différents biotypes, d'autres marqueurs moléculaires, tels que les ITS et l'ADN nucléaire (SNP ou microsatellites), devraient être utilisés, pour distinguer les différents biotypes car cela permettrait de mener des analyses épidémiologiques précises de la maladie ce qui aidera à la mise en place de stratégies de gestion durable de la Tristeza et de ses vecteurs.

### 4.3 Enquête du CTV dans la zone d'étude

### 4.4 Étude de quelques paramètres épidémiologiques de la maladie de la Tristeza

#### 4.4.1 Résultats des analyses sérologiques

##### 4.4.1.1 Les analyses sérologiques par la technique DTBIA (Direct Tissue Blot Immunoassay)

Le dépistage effectué au niveau de 93 vergers d'agrumes de différents âges et espèces situés dans la plaine de Chlef en utilisant selon les situations, les empreintes des ovaires des fleurs, jeunes pousses et pétioles de feuilles a révélé un total de 54 arbres infectés par le test DTBIA et DAS-ELISA. L'incidence de la maladie représentait environ 3,21%, alors que 16% de vergers d'agrumes contrôlés étaient infectés par le CTV (Tab. 15).



**Fig 31.** Photos prises lors des prospections

Il est à noter que sur des enquêtes menées entre 2009 et 2012 dans la Vallée de Mitidja, il a été rapporté des taux d'infection avoisinant les 25% (Belkahla *et al.*, 2013 et Larbi *et al.*, 2015). Le taux d'infection relativement faible enregistré dans la zone d'étude (3,21%), indique que la maladie est encore sporadique dans la Vallée et que son introduction semble être récente.

**Tab 15.** Résultats de l'enquête du CTV dans la plaine de Chlef : Taux d'infection

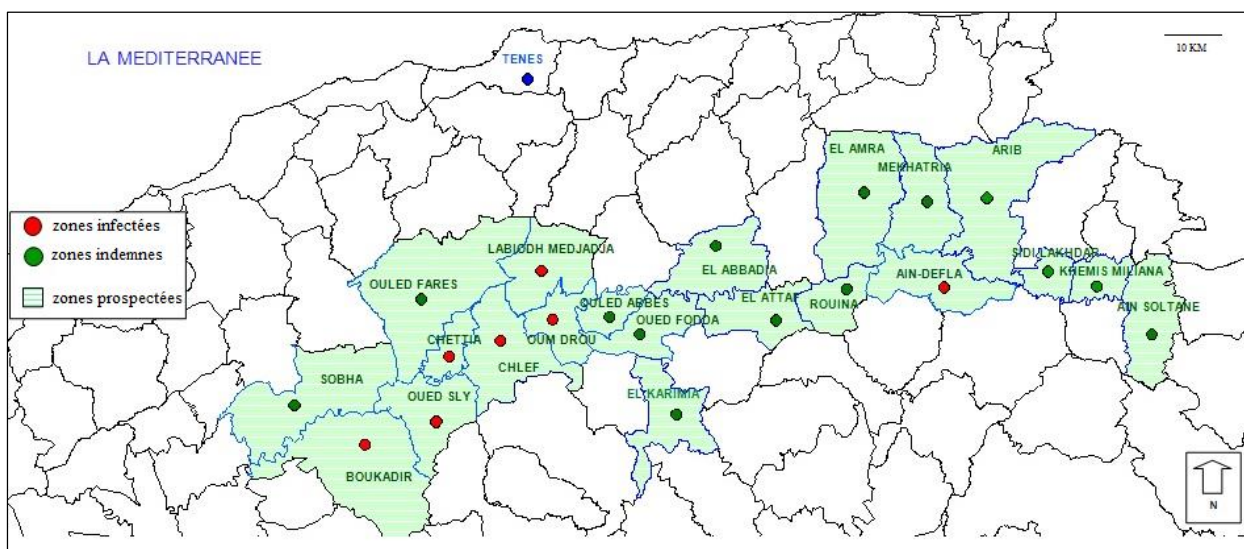
	Total (N)	infectés	% d'infection
<b>Vergers</b>	93	15	16%
<b>Arbres</b>	1680	54	3.21 %

On sait qu'une fois installé dans une région, surtout en cas de présence de ses vecteurs naturels (Yokomi, 2009a), le CTV peut être cerné car une incidence d'environ 3% permet de mettre en place des mesures d'éradication qui peuvent offrir une solution d'assainissement de foyers

contaminés (Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Dodds *et al.*, 1994). Le lancement rapide d'un plan d'éradication des arbres infectés pourrait arrêter ou ralentir la propagation du virus et maintenir le seuil d'infection inférieur à 5%, considérant qu'en présence d'un taux d'infection supérieur la stratégie d'éradication devient difficile à appliquer, et par conséquent d'autres mesures s'imposent (Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Dodds *et al.*, 1994). Dans ce contexte, des mesures de quarantaine, ainsi que la mise en œuvre du programme de certification, l'utilisation de porte greffes résistants est indispensable (Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Kyriakou *et al.*, 1996 ; Gottwald *et al.*, 2002).

#### 4.4.1.2 Distribution géographique de la maladie dans la zone d'étude

L'étude de l'incidence du CTV au niveau de la plaine du moyen Chlef a dévoilé une large distribution de la maladie au niveau de la zone d'étude (Fig. 32). D'après les résultats de la prospection, le virus est présent au niveau de deux parties de la plaine de Chlef, le moyen Chlef (Ain Defla) et le bas Chlef (Oum Drou, Chlef, Labiodh Medjadja, Chettia, Oued Sly et Boukadir), alors qu'aucun cas de CTV n'a été décelé au niveau du haut Chlef.



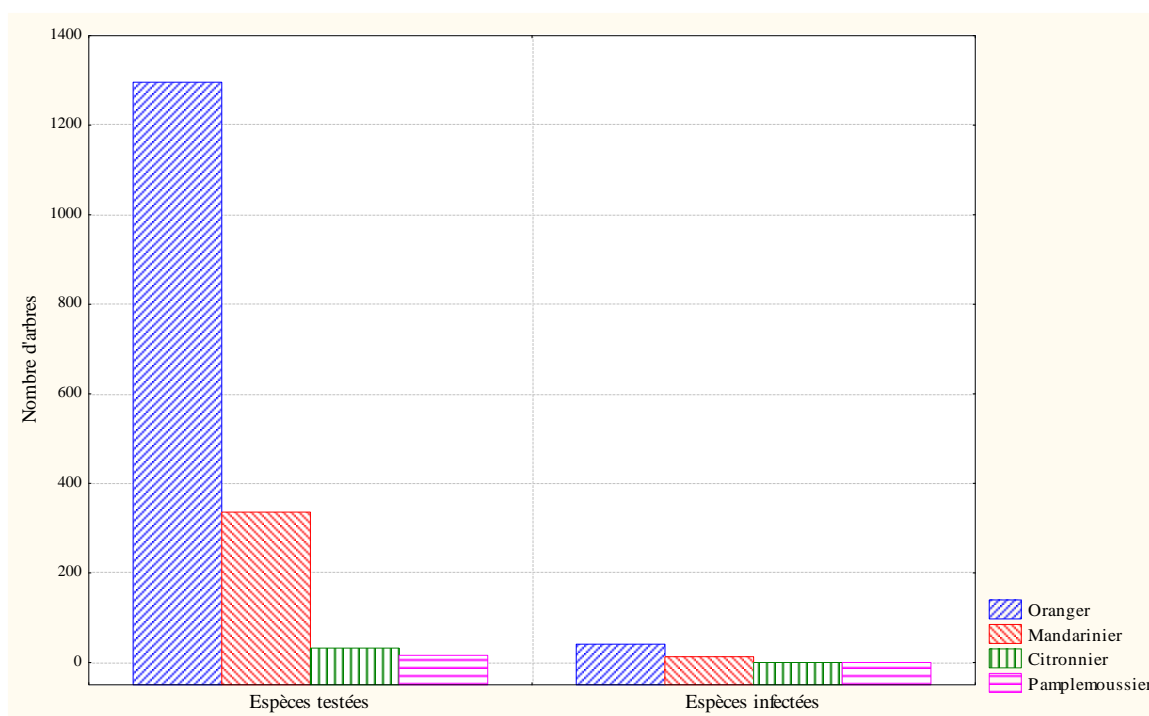
**Fig 32.** Répartition des cas positifs du CTV décelés dans la zone d'étude.

Parmi les 21 communes prospectées, 07 communes sont contaminées par le CTV. On suppose que la maladie s'est probablement établie par voie végétative (plants de pépinières et greffons infectés). Le schéma de distribution de plants infectés dans les vergers contaminés détectés durant l'enquête est généralement aléatoire, souvent sous forme d'arbres éloignés l'un de l'autre, ce qui est très proche du schéma de distribution de la maladie quand la dissémination est naturelle. Selon Gottwald *et al* (1998) *A. gossypii* produit une diffusion dispersée et aléatoire. Durant la prospection en plein champ, ce type de schéma a été observé dans de nombreux vergers. On sait que la distribution de la maladie de la Tristeza en présence de *T. citricidus* se présente sous forme

d'amas d'arbres infectés due au mouvement des individus ailés d'un arbre infecté vers un arbre sain très proche ; ces mouvements peuvent être orientés ou aléatoires (Gottwald *et al.*, 1993) ; ce genre de schéma de distribution n'a pas été observé durant la prospection.

#### 4.4.2 Distribution selon les espèces

La majorité des arbres infectés par le CTV sont des orangers doux *Citrus sinensis* L (41 arbres sur 1296 arbres testés); L'oranger doux s'est avérée l'espèce la plus atteinte durant cette étude, car qu'il s'agit du groupe d'agrumes le plus important de la Vallée de Chlef représentant plus de la moitié des superficies (59%) (DSA, 2018). Le deuxième groupe a concerné les mandariniers *Citrus reticulata* (Blanco) avec 13 arbres infectés sur 336 arbres testés, alors qu'aucun cas positif n'a été enregistré sur pamplemoussier ou sur citronnier (Fig. 33).

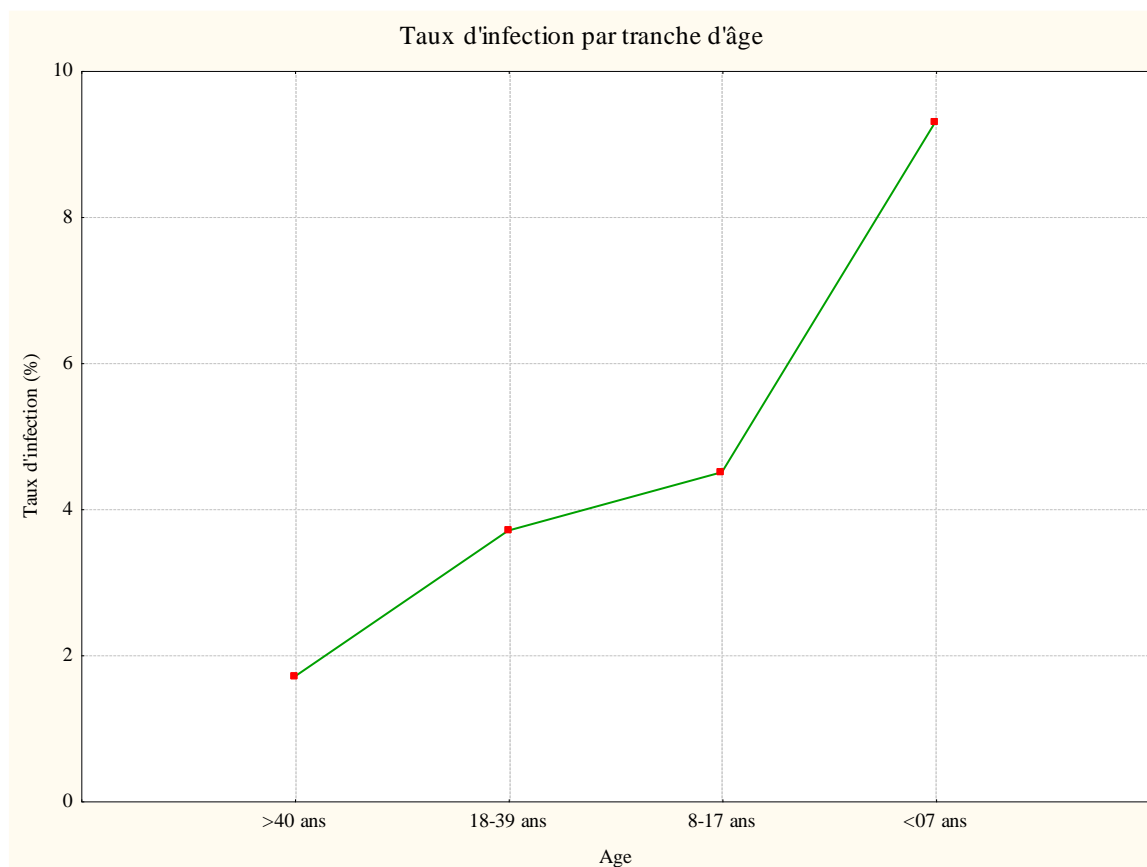


**Fig 33.** Nombre d'arbres d'agrumes infectés par espèce.

Sur la base des résultats de l'enquête, treize (13) mandariniers étaient contaminés par le virus de la Tristeza, avec un taux d'infection de 3,86% qui est plus élevé que celui enregistré sur orangers doux (3,16%). Selon Kitajima et al (1974) et Müller et al (1974), *Citrus sinensis* (L), *Citrus reticulata* (Blanco) et *Citrus paradisi* (Macf) sont les hôtes principaux de CTV. L'enquête a mis en évidence la présence du virus de la Tristeza de façon significative sur mandarinier avec environ 24% de vergers contaminés par le CTV contre 14,5% de vergers d'orangers doux (Fig 39).

### 4.4.3 Âge des vergers

L'enquête a montré que des vergers de tous âges ont été contaminés par le CTV, y compris les jeunes vergers récemment créés. Le nombre de vergers contaminés et les taux d'infection par tranche d'âge est illustré figure 34.



**Fig 34.** Taux d'infection de CTV en fonction de l'âge des vergers

L'enquête a permis d'évaluer la situation de la maladie de la Tristeza en fonction de l'âge des vergers. Le taux d'infection le moins élevé (1.7%) a été enregistré chez les sujets âgés de plus de 40 ans dont la plupart remontent à la période coloniale. La catégorie d'arbres âgés entre 18 et 39 ans représente 3.7%, par contre, un taux de 4.5% a été enregistré chez les sujets âgés entre 08 et 17 ans. Le pourcentage le plus élevé estimé à 9.3%, a été enregistré dans les jeunes vergers ayant moins de 07ans.

Selon Rebours (1950), jusqu'au la fin de la deuxième guerre mondiale l'agrumiculture algérienne était considérée comme une des plus importantes dans le Bassin méditerranéen. En ce temps-là les parcs à bois existaient et déjà étaient soumis à des évaluations variétales et sanitaires rigoureuses. L'origine de plusieurs foyers de CTV détectés au niveau des vieux vergers de la période coloniale est difficile à déterminer. On sait que depuis 1948 des cas de déclin lent et rapide associés au CTV

ont été signalés dans certains vergers, et reliés au matériel végétal importé de l'étranger introduit dans le Bassin méditerranéen y compris l'Algérie qui a importé le citronnier Meyer infecté (Russo, 1956 ; Bové, 1967). Ces résultats montrent clairement que l'infection des arbres a eu lieu à travers l'introduction de matériel de propagation par greffage et la dissémination du virus a eu lieu probablement à travers les pucerons vecteurs. Il est possible aussi que les pépinières de la Mitidja soient à l'origine des infections décelées sur jeunes arbres plantés durant la période du programme PNDA, qui était une période caractérisée par des défaillances du contrôle phytosanitaire. Les vergers créés dans le cadre du Plan National du Développement Agricole ( PNDA) sont ceux qui ont le taux le plus élevé (4.5 %) chez les sujets âgés entre 8 et 17 ans, ce qui correspond à la période de mise en application du plan . On sait aussi que la plus grande partie des plants sont issus des pépinières de la Mitidja, qui est considérée comme le fournisseur principal du matériel végétal arboricole à l'échelle nationale. A ce propos, en 2001 l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV) a signalé la présence du CTV chez 11 mandariniers et orangers appartenant à des parcs à bois de la région de Béni Tamou (ITAF, 2003; Laala *et al.*, 2019 ; OEPP, 2019). Par ailleurs, un travail sur l'incidence du CTV entre 2009 et 2012 au niveau de la plaine de la Mitidja a révélé un taux d'infection de 17,6% dans les vergers commerciaux et 22,7% au niveau des collections variétales de l'ITAF (Larbi *et al.*, 2015), alors qu'une autre enquête sur la Tristeza au niveau de la wilaya de Blida entre 2011 et 2012 a déterminé un taux d'infection à 25,18% (Belkahla *et al.*, 2013) . Ces travaux démontrent clairement que cette région est fortement contaminée par la maladie de la Tristeza.

L'incidence du CTV au niveau des vergers dont la tranche d'âge est comprise entre 18 et 39 ans a été de 3.7%. Cette catégorie de vergers a été généralement créée dans les années 70/80, une période pendant laquelle plusieurs foyers de CTV étaient signalés. Dans ce contexte Farrag et Omar (1969) ont soupçonné la présence du CTV chez une trentaine d'arbres d'agrumes, et ce doute a été confirmé plus tard par la mission du COFROR en 1971 (Anonyme, 1971). Cependant durant cette période, peu d'investissements ont été dédiés à l'extension des surfaces des vergers d'agrumes et la majorité des plants d'agrumes provenait d'un système d'autoproduction de plants au niveau local sans aucun contrôle.

Enfin notre étude a montré que sur les deux jeunes vergers prospectés âgés de moins de 7 ans, un seul arbre s'est avéré contaminé par le CTV. Les plants du verger indemne âgé de 3 ans ont été fournis par des pépinières exerçant sous les nouvelles dispositions de 2010, concernant la gestion des parcs à bois et pépinières et les pépiniéristes travaillent en étroite collaboration avec les

instituts techniques et leurs parcs à bois et pépinières ; de plus que les vergers environnants sont périodiquement contrôlés par les laboratoires spécialisés du ministère de l'agriculture.

#### 4.4.4 Origine du matériel végétal

L'origine du matériel végétal a été mise en évidence dans cette enquête, puisque toutes les analyses ont montré que l'incidence de la maladie au niveau des vergers créés à partir de plants achetés depuis les pépinières de la Mitidja est le plus élevé. On a enregistré 10 vergers contaminés sur un total de 48 vergers analysés. Enfin il est à noter aussi, que les deux vergers mis en place à partir de plants importés d'Espagne, ont montré une infection de certains plants par le virus de la Tristeza (Tab. 16).

**Tab 16.** Situation du CTV/origine des plants

Origine	Vergers	Vergers infectés	% Infestation
Mitidja	48	10	22.9
Inconnu	39	3	7.6
Espagne	2	2	100
Ain Defla	1	0	0
Chlef	2	0	0

Dans les vieux vergers dont l'origine de plants est inconnue, l'enquête a fait sortir 03 vergers contaminés sur les 39 vergers analysés. Il est intéressant de signaler que les vergers dont les plants de départ sont produits au niveau local pour Chlef et Ain Defla, aucun sujet infecté n'a été décelé. Les résultats du travail de prospections montrent que 36 plants provenant des différentes pépinières de la Mitidja ont été infectés auxquels s'ajoutent 07 plants importés. Ces plants âgés entre 36 mois et 17 ans, fait exclure que l'origine des contaminations est liée aux pucerons vecteurs. Vraisemblablement l'infection a pu avoir lieu au niveau des pépinières notamment celles situées dans la Mitidja, car la dissémination naturelle prend plusieurs années. Selon (Gottwald *et al.*, 1996b, 1998) en présence du puceron *Aphis gossypii* comme espèce dominante dans un verger infecté par le CTV, l'incidence peut atteindre 50% au bout de 15 ans. Mais dans notre cas cette espèce n'est pas dominante. Le suivi de la dynamique de population des aphides de 2010 à 2016 au niveau de la plaine de moyen Chlef a montré une nette dominante du puceron vert des agrumes *Aphis spiraecola* (Ali Arous *et al.*, 2016). La détection du CTV dans des plants d'importation

provenant d'Espagne au niveau des vergers situés dans une zone très éloignée (Abiodh Medjadja) de la zone agrumicole principale, permet d'émettre l'hypothèse que la maladie a été importée avec le matériel végétal entre l'année 2000 et 2006.

#### 4.4.5 Corrélation des plants infectés par rapport aux porte-greffes

Durant notre prospection il a été confirmé une dominance du porte greffe bigaradier *Citrus aurantium* (L) au niveau de toute la Vallée de Chlef ; en effet, 85.7 % des arbres d'agrumes analysés étaient greffés sur bigaradier, alors que seulement 12.3% étaient greffés sur les citranges *Poncirus trifoliata* (L) × *Citrus sinensis* (Osbeck) (Tab. 17). Rappelons que le bigaradier est un porte greffe bien adapté aux sols calcaires et salés qui sont des caractéristiques de la zone d'étude. Il est aussi tolérant à la gommose et à la sécheresse, néanmoins le bigaradier est très sensible à la maladie de la Tristeza (Roistacher, 1991 ; Malcolm, 2006; D'Onghia, 2009; Lacirignola et D'Onghia, 2009; Dawson *et al.*, 2015 ; Yokomi *et al.*, 2018). Un taux de 14.2% de vergers dont la combinaison greffon/porte greffe *C. sinensis* ou *C. reticulata/C.aurantium* ont été infectés par le CTV. Ce virus est probablement responsable de plusieurs cas de déclin rapide ou lent qui ont été observés durant nos sorties au niveau de la zone d'étude, considérant que la souche de CTV la plus diffuse dans le Bassin méditerranéen induit le déclin rapide des arbres, particulièrement quant il s'agit d'orangers doux, mandariniers ou pamplemoussier greffés sur bigaradier (D'Onghia, 2009 ; Atta *et al.*, 2012). Ce déclin est associé aux nécroses causées par le virus au niveau du phloème du point du greffage, ce qui bloque le transport des carbohydrates (sève élaborée) vers les racines ; lorsque le système racinaire se détériore, l'arbre commence son déclin. Les scions greffés sur des portes greffes résistants tels que les trifoliées guérissent immédiatement après le greffage (Fraser, 1952).

**Tab 17.** Situation de CTV par rapport au porte-greffe utilisé.

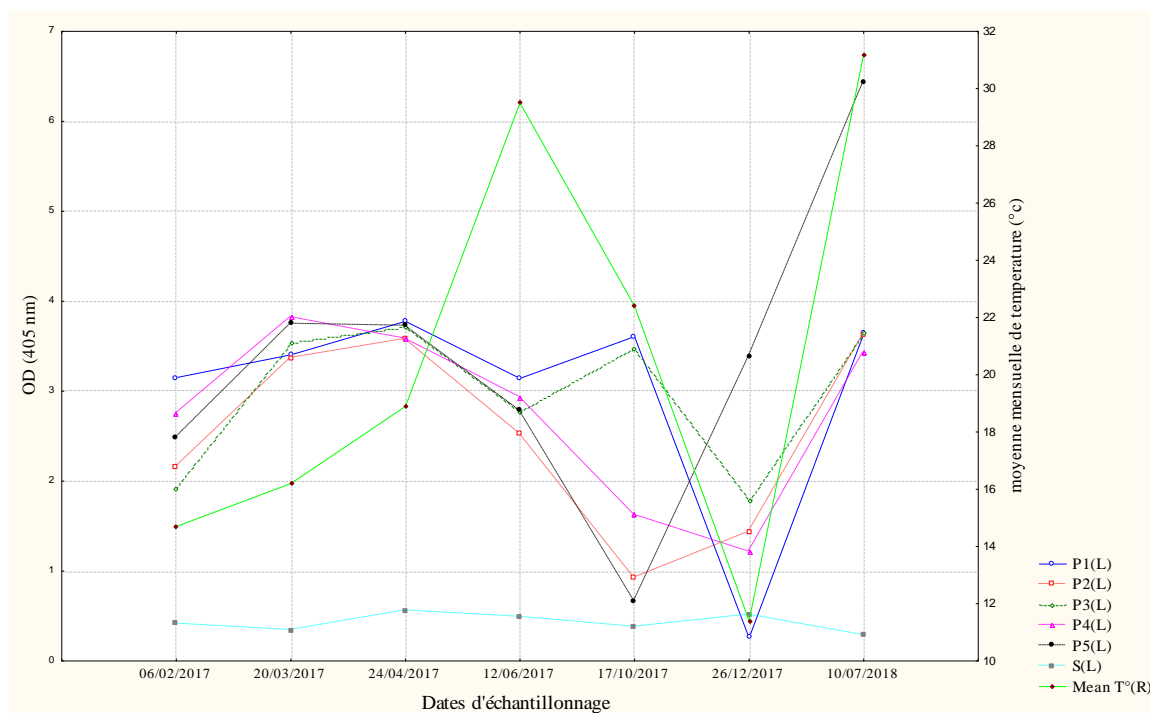
Porte greffe	Vergers (N)	Vergers infestés	Arbres testés	Arbres infectés	% Infection
<b>Bigaradier</b>	81	10	1392	36	3
<b>Citrange</b>	7	3	208	10	4.8
<b>Volkameriana</b>	2	0	32	0	0
<b>Macrophylla</b>	3	3	48	4	8.3

Malgré l'usage très limité des porte greffes trifoliés tels que les citranges, sur les 07 vergers prospectés, trois (03) vergers ont été trouvés contaminés par le CTV. Comme présenté, les sujets

atteints ne manifestaient aucun symptôme qui pourrait être attribué au CTV. L'enquête a aussi plusieurs cas d'infection par le CTV chez l'oranger Powell navel et le clémentinier Orogrande greffés sur *C. macrophylla* (Wester) ; certains arbres manifestaient des symptômes plus au moins visibles allant de quelques cas de déclin au rabougrissement très prononcé (Fig. 37b). Le porte greffe *C. macrophylla*, comme le bigaradier est très sensible au CTV et à la gommosse ; il a été introduit depuis une quinzaine d'années par des investisseurs privés pour faire face aux sols salés et alcalins de la Vallée de Chlef, tout en adoptant la culture sur ados pour surmonter sa sensibilité à la gommosse à *Phytophthora spp*, mais sa haute susceptibilité à la Tristeza n'a pas été prise en considération à cette époque. Dans ce contexte, les portes greffes tels que les trifoliés et *C. volkameriana* qui sont résistants/tolérants au déclin dûs au CTV, posent des problèmes liés autres facteurs biotiques et abiotiques essentiels, comme la salinité du sol et l'eau d'irrigation, le taux de calcaire active, le froid, la gommosse et surtout les viroïdes. A ce propos, Hanani *et al* (2018) dans une récente étude ont révélé la présence du *Citrus Bark Cracking Viroid* (CBCVd) et *Citrus Dwarfing Viroid* (CDVd) en Egypte, associés au syndrome du bois strié et craquelure de l'écorce sur porte greffe *C. volkameriana*. C'est une maladie considérée comme émergente (Hanani *et al.*, 2018). Par ailleurs, le dépérissement rapide (8.3%) enregistrée au niveau de deux vergers situés à Labiodh Medjadja sur des espèces et variétés greffées sur le porte greffe *C. macrophylla* est inquiétant, car il s'agit d'un porte greffe sensible à la Tristeza ; en effet la présence des cas de déclin, de chlorose sévères et de rabougrissement chez des sujets infectés par le CTV peuvent indiquer la présence probable de souches sévères.

#### 4.4.6 Corrélation des plants infectés par rapport à la période d'échantillonnage

Selon la CIPV (2016), les échantillons de pousses ou feuilles et pédoncules complètement développés peuvent être prélevés à n'importe quel moment de l'année à partir d'oranger doux, de mandarinier, de citronnier et de pamplemoussier dans les régions tempérées méditerranéennes, Cependant, l'analyse DAS-ELISA dans cette étude a montré que la capacité à détecter le CTV sur arbres d'agrumes fluctue au fil des saisons dans la Vallée de Chlef (Fig. 35).



**Fig 35.** Évaluation de la concentration du CTV par DAS-ELISA en fonction des dates d'échantillonnage.

Les données indiquent que les valeurs d'absorbance ELISA des échantillons positifs au CTV étaient plus élevées au printemps et en été mais plus faibles en automne et hiver. Les valeurs d'absorption enregistrées pendant l'hiver étaient parfois inférieures au seuil ELISA (Arbre1, Abiodh Medjadja en Décembre), donnant ainsi un faux résultat (faux négatif). Les valeurs d'absorbance les plus élevées ont été enregistrées durant les échantillonnages de Mars, Avril et juillet, car ces mois coïncident respectivement avec la première et la deuxième poussée de sève dans les vergers d'agrumes de la Vallée de Chlef. On note que les valeurs d'absorbance obtenues en Février (fin d'hiver) et en Octobre (automne) étaient inférieures à celles des mois de printemps mais significativement supérieures aux valeurs des seuils, ce qui signifie que ces tests ne comportent pas de faux résultats, comme cela a été le cas en Décembre.

#### 4.4.7 Conclusion

Les prospections à large échelle du virus de la Tristeza (CTV) réalisées dans les principales régions agrumicoles de la Vallée de Chlef (haut, moyen et bas Chlef) en utilisant pour la détection, les techniques sérologiques (DTBIA et DAS-ELISA) a révélé un taux d'infection de 3.21%, particulièrement dans le moyen et bas Chlef qui a montré 53 cas positifs sur les 54 cas détectés. Par contre, aucun arbre infecté n'a été décelé dans le haut Chlef. L'analyse de quelques paramètres épidémiologiques a révélé que toutes les variétés analysées comportaient des sujets infectés à l'exception du pamplemoussier; toutes les catégories d'âges ont fait l'objet de contamination par le virus. L'enquête a permis aussi de déterminer les périodes idéales pour mener des analyses sérologiques de CTV dans la Vallée de Chlef. En général, les valeurs OD les plus élevées ont été enregistrées entre Mars et Avril, alors que les valeurs d'absorption enregistrées pendant l'hiver étaient parfois inférieures au seuil ELISA, ce qui peut conduire à des résultats erronés. Certains arbres infectés manifestent des symptômes sévères indiquant la présence probable de souches virulentes. L'enquête nous a aussi confirmé la responsabilité des pépinières dans la diffusion actuelle de la maladie à travers le mouvement informel du matériel végétal. En outre, l'enquête a montré que l'importation de plants de propagation de l'étranger représente aussi un risque imminent à travers l'introduction de plants infectés. A ce propos, sept arbres infectés par le CTV semblent avoir été introduits d'Espagne, ce qui oblige la révision des modalités du contrôle phytosanitaire aux frontières et le renforcement des laboratoires de contrôle en moyens matériels et en la formation continue pour tout le personnel techniques. Pour éviter de tels risques, il faudrait contrôler les importations de façon très stricte en attendant de mettre en place un système fiable de production de plants certifiés au niveau local et régional. Ces informations doivent être prises en considération pour assurer la pérennité de cette filière dans la zone d'étude et pour limiter la dissémination de la maladie surtout vers les zones encore épargnées (haut Chlef). Vu le taux d'infection relativement faible, l'assainissement des vergers contaminés est possible à travers une éradication rapide des plants infectés et la mise en place d'un monitoring plus conséquent. Cette stratégie est confirmée par certains auteurs (Gottwald *et al.*, 2002), où la maladie peut être éradiquée par la suppression de sujets malades, et des mesures de quarantaine végétale qui pourraient contribuer à la protection des agrumes de la Vallée de Chlef contre la maladie de la Tristeza. Le facteur humain, (sensibilisation de la profession et vulgarisation), ainsi que des mesures de répression à l'égard des personnes et établissements qui ne respectent pas les règles régissant la production de matériels de multiplication sains sont autant importantes à mettre en œuvre dans une politique globale assurant la sécurité alimentaire du pays.

## 4.5 Caractérisation moléculaire des sources de CTV sélectionnés.

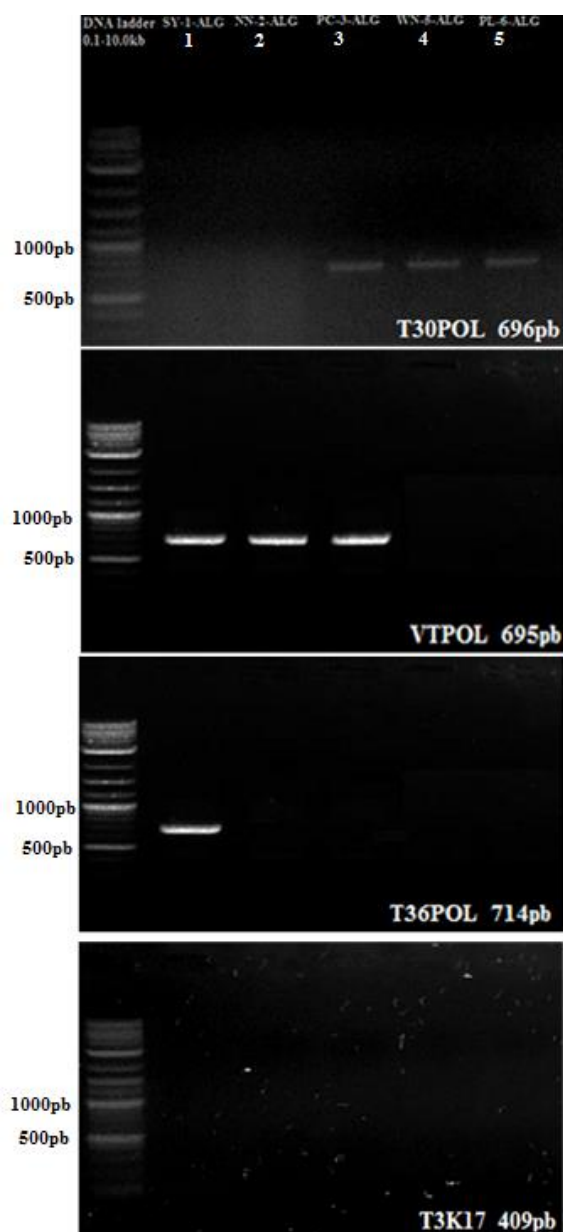
### 4.5.1 Utilisation de marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s.

La caractérisation et l'évaluation des appartenances génétiques par l'utilisation d'une paire d'amorce universelle (CTV-P25), utilisée pour le contrôle interne, et 04 paires d'amorces d'oligonucléotides hautement spécifiques et définitives relatives aux souches de référence VT, T3, T30 et T36 (Hilf *et al.*, 1999 ; Hilf et Garnsey, 2000 ; Ayllon *et al.*, 2001 ; Hilf *et al.*, 2005), ont montré la présence de divers génotypes, parmi lesquels on note T30, VT et T36, avec absence de la souche T3 (Tab. 18) (Fig. 36).

**Tab 18.** Attribution de génotypes aux isolats de CTV de la Vallée de Chlef basée sur les analyses M.M.M.s

Origine	Code	T36CP	T36POL	T30POL	VTPOL	T3K17	Génotype
	SY-1-ALG	1	1	0	1	0	VT+T36
<b>Vallée</b>	NN-2-ALG	1	0	0	1	0	VT
<b>de</b>	PC-3-ALG	1	0	1	1	0	T30+VT
<b>Chlef</b>	WN-5-ALG	1	0	1	0	0	T30
	PL-6-ALG	1	0	1	0	0	T30

Deux isolats (WN-5-ALG et PL-6-ALG) ont réagi uniquement avec le marqueur T30POL, ce dernier est unique au génotype T30 (Hilf *et al.*, 2005), donc son amplification sur ces isolats indique la présence du génotype modéré T30. Ce dernier est dominant dans la Mitidja, car Larbi *et al* (2015) ont auparavant établi à travers le séquençage du gène de la protéine de la capsid CP25, que 39 isolats sélectionnés provenant de vergers d'agrumes de la région de la plaine de Mitidja (Algérie) présentaient une similitude de 99% avec la souche Espagnole modérée T385. L'isolat PL-6-ALG a été décelé chez des arbres de clémentinier asymptomatiques d'un vieux verger âgé d'environ 70 ans (Fig. 40b), ce qui rend difficile de connaître l'origine des infections primaires. Pour le cas de l'isolat WN-5-ALG il provient des arbres d'oranger âgés d'environ 15 ans importés d'Espagne.



**Fig 36.** Amplifias spécifiques générés par les marqueurs moléculaires multiples M.M.M (T30POL, VTPOL, T36POL et T3K17) à partir les cinq sources locales étudiées, ligne 1 : SY-1-ALG, ligne 2 : NN-2-ALG, ligne 3 : PC-3-ALG, ligne 4 : WN-5-ALG, ligne 5 : PL-6-ALG. Ligne 1 : marqueur 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0kb

D'autre part on note que l'isolat NN-2-ALG qui a été détecté sur un arbre importé d'Espagne en 2003, n'a réagi qu'avec les amorces VTPOL qui génèrent un marqueur spécifique à la souche sévère induisant le déclin et le bois strié (VT) ; ce marqueur est amplifié à partir des deux génotypes standard T3 et VT, mais puisque le T3K17 n'a pas été amplifié (marqueur différentiel entre ces deux génotypes), la présence d'un génotype VT a été attribuée à cet isolat.

En ce qui concerne l'isolat SY-1-ALG, celui-ci a été détecté sur un jeune arbre provenant de pépinière localisée au niveau de la région de Mitidja. L'isolat a réagi aux amorces des marqueurs T36POL et TVPOL. L'association du marqueur T36POL uniquement au génotype T36 supportait

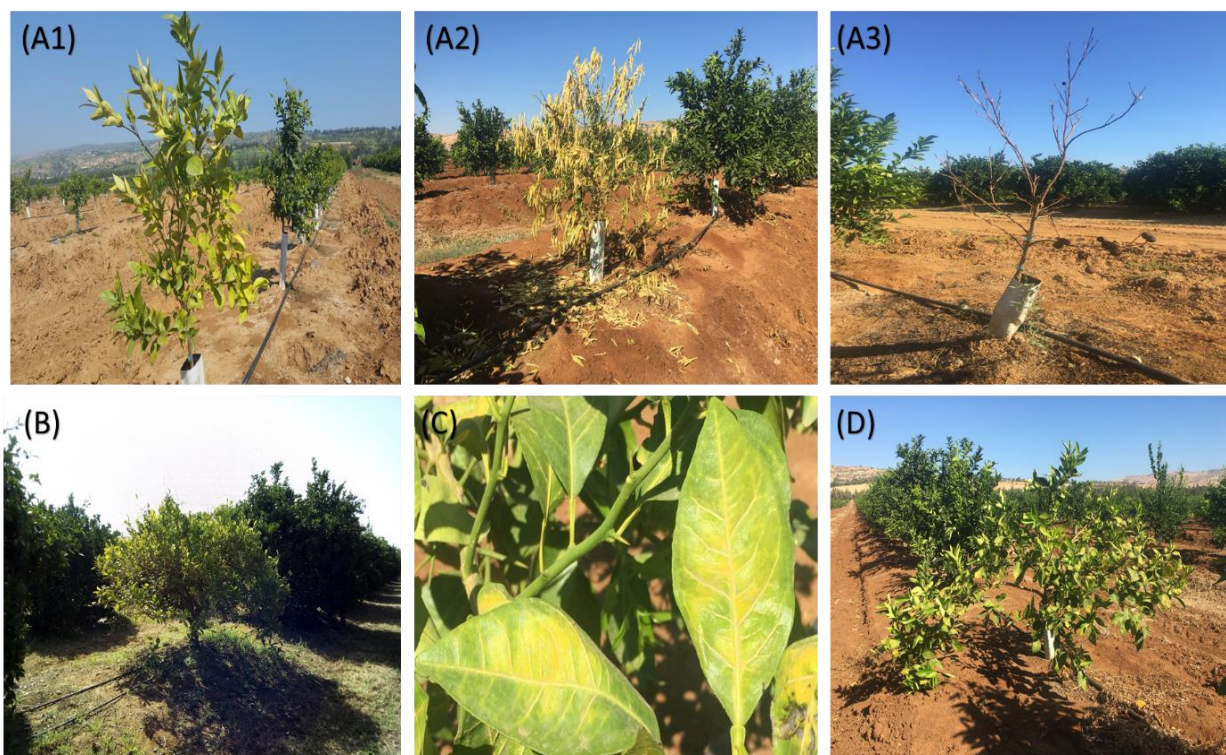
l'attribution du génotype T36 induisant le déclin à cet isolat, cependant sa réaction positive aux amorces du marqueur VTPOLE indiquait la présence d'un mélange des deux génotypes (T36 + VT). Enfin l'isolat PC-3-ALG a réagi positivement aux marqueurs VTPOLE et T30POL (Tab. 18), qui sont amplifiés à partir de la même position génomique (Fig.36). Le marqueur T30POL étant unique au génotype T30, l'amplification à partir de PC-3-ALG a été interprétée comme indiquant la présence du génotype T30, alors que le marqueur VTPOLE est amplifié à partir des deux génotypes standards T3 et VT. Du fait que le marqueur T3K17 n'était pas amplifié, que la présence du génotype VT était indiquée, PC-3-ALG a été reconnu comme correspondant à une infection mixte entre le génotype T30 et le génotype VT. D'ailleurs une étude moléculaire portant sur 75 sources CTV provenant de plusieurs pays méditerranéens a montré que le mélange de génotypes les plus répandus étaient (VT + T30) (Yahiaoui *et al.*, 2015).

Les résultats de cette caractérisation moléculaire a révélé l'existence de deux isolats à infection mixte sur les cinq isolats analysés ; tous les deux sont à mixture double (PC-3-ALG) et (SY-1-ALG). L'idée que le CTV est composé de variantes génétiques comme tous les virus à ARN décrits précédemment par Domingo et Holland (1994) est mise en évidence dans cette étude.

Sachant que l'identification des souches de CTV causant les différents syndromes de la maladie de la Tristeza est utile pour une gestion et un contrôle efficace de cette épidémie (Abou Kubaa *et al.*, 2012), l'un des principaux objectifs de cette étude était de déterminer les génotypes associés aux isolats de CTV présents dans la Vallée de Chlef. Des études antérieures sur la caractérisation de certains isolats de CTV prélevés au niveau de la plaine de la Mitidja ont montré qu'ils sont tous apparentés à la souche espagnole modérée T385 (Larbi *et al.*, 2015). Cette souche peut être contrôlée par l'utilisation de porte-greffes tolérants, alors que les souches sévères, telles que celles causant le bois strié sur oranger doux ou de pamplemoussier (SP) ou le déclin rapide (QD), peuvent affecter les arbres quel que soit le porte-greffe (Roistacher *et al.*, 2010). La présente étude révèle la présence de souches virulentes dans certaines zones de la Vallée de Chlef. Probablement ces isolats ont été introduits à travers des plants de multiplication importés de l'étranger, considérant qu'ils ont été identifiés en partie sur des arbres importés d'Espagne entre 2000 et 2006.

Les arbres infectés par le CTV présentaient divers symptômes allant du dépérissement rapide au rabougrissement et des chloroses chroniques (Fig. 37, 40). Dans le cadre de notre enquête nous avons observé diverses symptômes sur les sujets malades, par exemple les jeunes arbres infectés par l'isolat de SY-1-ALG et indiqué comme une infection mixte des souches virulentes (T36 et VT) ont montré une forme grave de jaunissement chronique sur jeune plants provenant de

pépinières sise dans la Mitidja (Fig. 40a), causant leurs morts quelques mois plutard (Fig 37. a1, a2, a3) .



**Fig 37.** Symptômes de CTV au champ :(A1, A2, A3) évolution chronologique du déclin ; (B) rabougrissement d'un arbre infecté par l'isolat (NN-2-ALG) ; (C) subérification des nervures d'un jeune plant infecté par l'isolat (SY-1-ALG) ; (D) rabougrissement et chlorose d'un arbre infecté par l'isolat (PC-3-ALG).

Les jeunes arbres malades ont manifesté également une sévère subérification des nervures avant leur déclin (Fig. 37c). Cependant les arbres infectés par la souche sévère VT représentée par l'isolat (NN-2-ALG) ont manifesté un retard de croissance très important (Fig.37b), confirmant les observations d'autres auteurs sur arbres infectés, en effet, selon Yokomi *et al* (2018), les souches virulentes causent le déclin rapide (QD), le bois strié sévère (SP), l'arrêt de croissance et/ou la jaunisse des jeunes plants. Pendant cette enquête les sujets infectés par l'isolat modéré (PL-6-ALG) qui appartient au groupe T30 largement répandu en Méditerranée n'ont manifesté aucun symptôme apparent, malgré que la concentration du virus de cet isolat fût très élevée dans les clémentiniers greffés sur bigaradier (Fig.40b) ; il en est de même pour les arbres atteints par l'isolat PC-3-ALG qui est aussi une infection mixte (VT+T30). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'isolat PC-3-ALG pour identifier un possible rôle de la souche locale modérée similaire à la souche T30 et T385 dans la protection croisée. La coexistence de multiples génotypes de CTV dans un seul hôte est probablement le résultat de la combinaison de la transmission verticale continue et la transmission horizontale assurée par les pucerons.

#### 4.5.2 Clonage et séquençage du gène de la capsid CP25

La caractérisation moléculaire du CTV s'est basée sur le séquençage de la région du gène de la protéine de capsid (Gillings *et al.*, 1993 et Nolasco *et al.*, 2009); par conséquent, de nombreuses séquences nucléotidiques du gène CTV-P25CTV ont été soumises à la base de données NCBI (Tab. 10). La base de la classification a été réalisée principalement sur la caractérisation M.M.M et du séquençage de la protéine CP25, à cet effet de nombreux auteurs soutiennent l'existence d'une relation cohérente entre le phénotype viral et les séquences génétiques du gène de la protéine de la capsid (Pappu *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 2001; Zemzami *et al.*, 2002; Hilf *et al.*, 2005; Nolasco *et al.*, 2009 ; Zemzami *et al.*, 2009b ; Yokomi *et al.*, 2018). Par ailleurs, Niblett *et al* (2000) suggèrent que le polymorphisme nucléotidique au niveau du gène de la capsid protéique CP25 est suffisant pour l'identification des souches.

**Tab19.** Numéros d'accèsion (NCBI GeneBank) attribués aux isolats de CTV sélectionnés

ID Sequence	Date de prélèvement	Pays	Plante-Hôte	Lat-Lon	NCBI accession n°
PC-3-ALG	1er May, 2018	Algérie	C. sinensis	36.15 N 1.24 E	MK049162
SY-1-ALG	1er May, 2018	Algérie	C. reticulata	36.15 N 1.24 E	MK049163
PL-6-ALG	1er May, 2018	Algérie	C. reticulata	36.11 N 1.22 E	MK049164

De ce fait, les amplifias des fragments CP25 de 672 pb des isolats SY-1-ALG, PC-3-ALG et PL-6-ALG, correspondant respectivement aux groupes de références VT+T36, VT+T30 et T30 ont été clonés et séquencés. Les séquences nucléotidiques du CP25 obtenues ont été donc déposés au niveau de la base de données (NCBI) sous les numéros d'accèsion illustré dans le Tableau 19. Les analyses de séquence nucléotidique du CP25 des trois isolats de CTV sélectionnés ont mis en évidence une grande diversité génotypique parmi ces isolats. L'homologie nucléotidique parmi les isolats de CTV sélectionnés variait de 91,8% à 99,1% (Tab. 20).

Tab 20. Matrice des identités de séquences nucléotidiques CP25 par paires

	PC-3-ALG	SY-1-ALG	PL-6-ALG	GQ424348(T30,USA)	FN661497(4B,Pouilles)	EU937520(T30)	U56902(VT)	AY170468(T36)	Y18420(T385)	AY340974(Qaha)	FN661494(K51,Italie)	FN552118(VT,Syrie)	DQ272579(Mexique)	HF947337(Maroc)	HF947334(Maroc)	KU578007(CA-T30-AT4)	KU361339(CA-VT-AT39)	EU857538(SP)	KC525952(T3)	KC841814(SY568)
PC-3-ALG	ID	92,5	99,1	100	100	99,5	92,3	93,2	99,7	93	99,9	92,6	93	99,7	99,9	99,7	92,8	93,2	92,3	92,2
SY-1-ALG	ID	ID	91,8	92,5	92,4	91,9	98,9	92,6	92,1	92,5	92,3	99,6	92,5	92,5	92,5	92,1	98,2	97,9	93	96,4
PL-6-ALG	ID	ID	ID	99,1	99,1	98,6	91,9	92,3	98,8	92,1	98,9	92	92,1	99,9	98,9	98,8	92,5	92,5	91,6	92,9
GQ424348(T30, USA)	ID	ID	ID	ID	100	99,5	92,2	93,1	99,7	92,3	99,9	92,6	93	99,9	99,9	99,7	92,8	93,1	92,5	92,7
FN661497(4B,Pouilles)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,2	93,1	99,7	92,3	99,9	92,6	93	99,9	99,9	99,7	92,8	93,1	92,2	92,9
EU937520(T30)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	91,7	92,6	99,5	92,5	99,4	92,1	92,5	99,2	99,4	99,5	92,6	93	92	92,8
U5 U56902(VT)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,5	91,9	92,3	92,1	99,1	92,3	92,1	92,3	91,9	98	98	93,3	92,9
AY170468(T36)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,8	99,9	93	92,8	99,9	92,8	99,9	93	92,8	92,7	91	92,9
Y18420(T385)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,7	99,6	92,3	92,7	99,4	99,6	100	92,8	93,5	92,3	92,9
AY340974(Qaha)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,8	92,6	100	92,7	92,8	92,7	92,6	92,5	90,9	92,9
FN661494(K51,Italie)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,5	92,8	99,6	99,7	99,6	92,6	93	92,1	96,6
FN552118(VT,Syrie)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,6	99,6	99,7	92,3	98,3	98	93,2	92,9
DQ272579(Mexique)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	92,5	92,6	92,7	92,6	92,5	90,9	92,8
HF947337(L-V AL1-Maroc)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	99,4	92,6	93	92,1	92,8
HF947334(L-CLE5-Maroc)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	99,6	92,8	93,2	92,3	96,6
KU578007(CA-T30-AT4)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	93,5	90,9	92,8
KU361339(CA-VT-AT39)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	93,7	96,7
EU857538(SP)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
KC525952(T3)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
KC481814(SY568)	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID

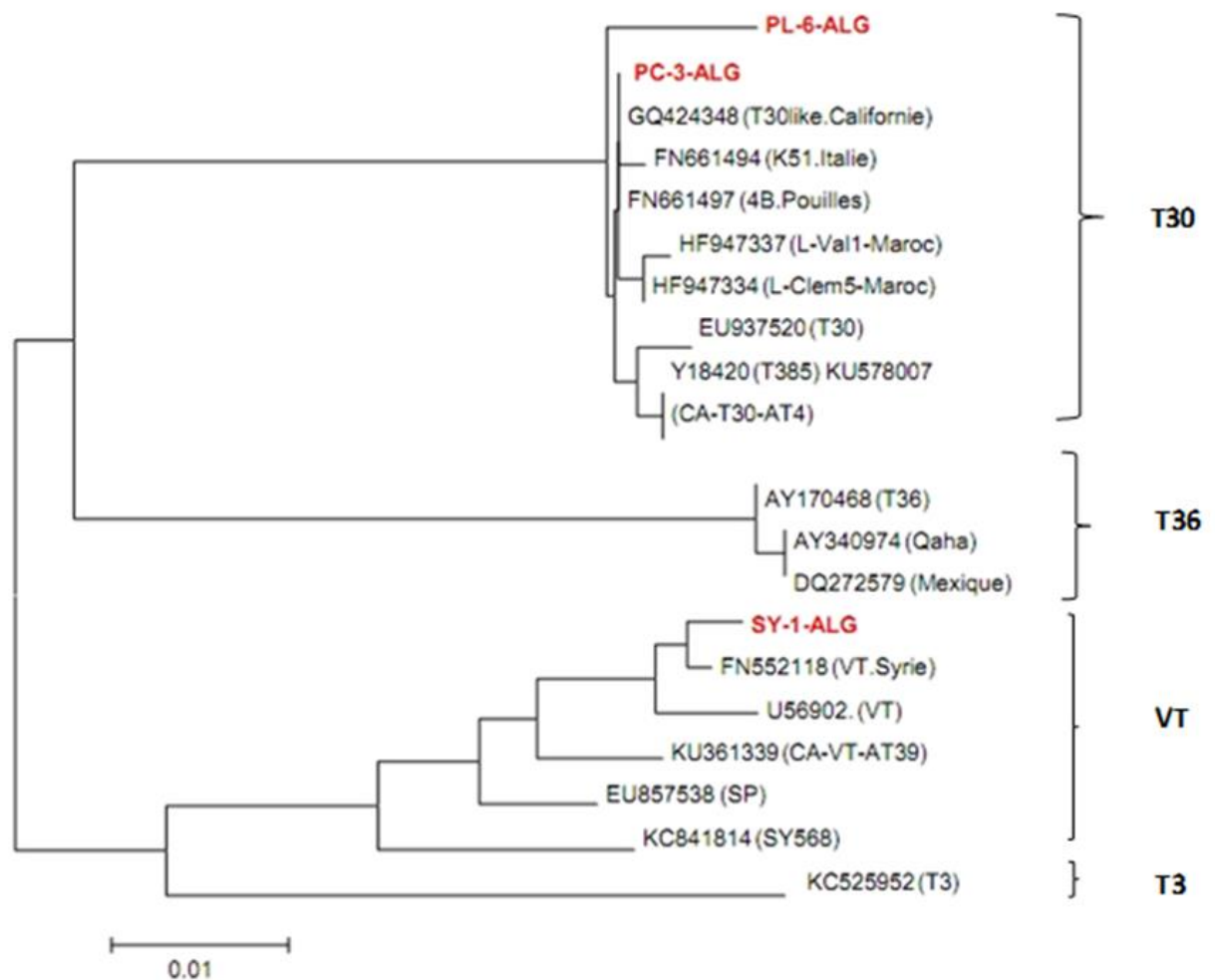
Les valeurs en caractères gras rouge sont les similarités de séquence nucléotidique les plus élevées du gène CP des isolats locaux du CTV par rapport aux autres génotypes mondiaux existants

L'isolat de CTV (PC-3-ALG) associé à une infection mixte (T30+VT) à travers les analyses moléculaires multiples (M.M.M.s) a été regroupé avec deux isolats modérés, GQ424348 (T30like, Californie) et FN661497 4B (Région des Pouilles en Italie) présentant une homologie de séquence identique (100%) (Fig. 44 et Tab. 21), l'homologie de séquence était très élevée avec les souches de référence modérées T30 (EU937520, Floride) et T385 (Y18420, Espagne), révélant ainsi une similitude allant de 99.5% à 99,7% respectivement. On note que chez d'autres souches qui font également partie du groupe de T30 (HF947337 et HF947334) du Maroc, l'homologie de séquence a été de 99.7% à 99.9% respectivement. L'analyse de la séquence du gène de la protéine de la capsid CP25 n'a confirmé que partiellement cette caractérisation par M.M.M.s, car l'appartenance au groupe VT n'a pas été confirmée pour cet isolat malgré sa réaction au marqueur VTPOLE spécifique au groupe VT, présentant une homologie de 93.2% seulement avec la souche VT de référence (U56902).

La séquence CP25 de l'isolat SY-1-ALG a été associée au génotype virulent VT qui est bien connu par les symptômes de déclin et de bois strié qu'il cause en Asie et en Méditerranée (Harper *et al.*, 2015). L'isolat SY-1-ALG est situé à proximité de la souche de référence VT (U56902, Moyen Orient) et (FN552118, Syrie) montrant respectivement 98,9% et 99.6% de similitude nucléotidique, alors que l'appartenance au groupe T36 n'a pas été confirmée. Cet isolat a été proche de l'isolat induisant le syndrome de bois strié qui a montré une homologie élevée de 97.9% avec l'isolat virulent originaire de New Zélande (EU857538). Le test d'homologie a également montré une similitude élevée (96,4%) entre l'isolat SY-1-ALG et l'isolat virulent SY568 (KC841814) originaire de Texas qui provoque le rabougrissement et le bois strié (Wang *et al.*, 2013). La majorité des variétés d'agrumes sont sensibles à la maladie du bois strié, même s'ils sont greffés sur des portes greffes résistants à la Tristeza (Atta *et al.*, 2012 ; Dawson *et al.*, 2015). Selon Dawson *et al.* (2015), le syndrome de bois strié résulte de différenciations vasculaires anormales ; quand la maladie est sévère, les arbres développent un grand nombre de stries au niveau de leurs troncs et rameaux, ce qui provoque le rabougrissement des arbres atteints et un retard notable de croissance, Nous avons constaté ces symptômes dans la zone d'étude, chez les sujets atteints par cet isolat (Fig. 37, 40).

En ce qui concerne le troisième isolat PL-6-ALG dont l'origine est inconnue, il a été prélevé sur des arbres d'un vieux verger âgé d'environ 70 ans. L'analyse M.M.M.s le place dans le groupe T30. Cependant l'analyse de la séquence nucléotidique du gène CP25 a révélé un degré d'identité inférieur à celui enregistré chez l'isolat modérée PC-3-ALG. Il existe une similitude nucléotidique de 98.6% et 98.8% avec la souche modérée de référence T30 (EU937520, Floride) et la souche

T385 (Y18420, Espagne) respectivement mais elle est plus élevée (99,5% et 99,7%) par rapport à l'isolat PC-3-ALG. En conclusion, les relations génétiques du gène de la capsid CP25 des isolats locaux de CTV par rapport aux isolats de référence ont révélé que l'isolat PC-3-ALG et l'isolat SY-1-ALG se sont retrouvés dans deux groupes majeurs qui sont celui des souches modérées (T30) et celui des souches virulentes (VT) respectivement. Quant à l'isolat PL-6-ALG il s'est distingué dans un sous-groupe particulier (Fig. 38). Ce résultat pourrait signifier que ce dernier isolat (PL-6-ALG) serait différent dans son étiologie et sa distribution au niveau de la région.



**Fig 38.** Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining (NJ) » montrant les relations génétiques du gène de la capsid CP25 des isolats locaux de CTV en comparaison avec certaines souches et isolats de référence.

### 4.5.3 Clonage et séquençage du marqueur spécifique aux souches VT (VTPOL)

Les études complémentaires avec les séquences du marqueur VTPOL (995pb) des isolats (SY-1-ALG et PC-3-ALG) ont montré une homologie nucléotidique très élevée de 98.8% (Annexe 7). Elles ont montré aussi une similarité maximale avec l'isolat grec M423GR (MF595989) et l'isolat de Floride FS703-VT (KC517492) par des taux élevés de 99.3% et de 99.3% respectivement (Tab. 21).

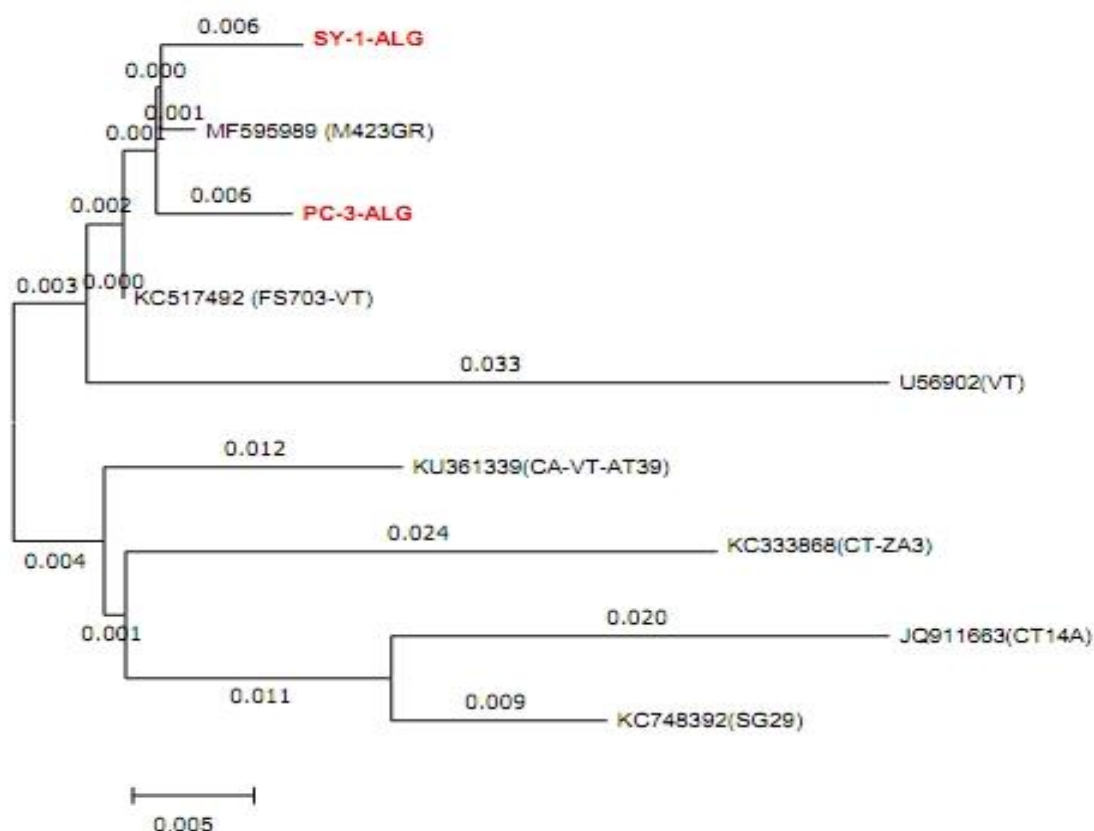
**Tab 21.** Matrice des identités de séquences nucléotidiques du marqueur VTPOL par paires

	PC-3-ALG	SY-1-ALG	MF595989(M423GR)	KC517492(FS703-VT)	U56902(VT)	KU361339(CA-VT-AT39)	KC333868(CT-ZA3)	JQ911663(CT14A)	KC748392(SG29)
<b>PC-3-ALG</b>	ID	<b>98.8</b>	<b>99.3</b>	<b>99.3</b>	<b>95.8</b>	<b>97.8</b>	96.1	95.5	96.6
<b>SY-1-ALG</b>		ID	<b>99.3</b>	<b>99.3</b>	<b>95.8</b>	<b>97.2</b>	93.8	95.1	96.4
MF595989(M423GR)			ID	99.7	96.3	97.6	96.3	95.5	96.8
KC517492(FS703-VT)				ID	96.6	97.9	96.6	95.8	97.1
U56902(VT)					ID	94.8	93.4	92.8	93.9
KU361339(CA-VT-AT39)						ID	96.3	95.5	96.6
KC333868(CT-ZA3)							ID	94.5	95.5
JQ911663(CT14A)								ID	97.1
KC748392(SG29)									ID

L'analyse a révélé aussi une homologie avec l'isolat californien sévère induisant le bois strié (SP) CA-VT-AT39 dont le taux de similitude était de 97.8% avec la source PC-3-ALG et 97.2% avec le SY-1-ALG. Néanmoins l'analyse a montré que la séquence étudiée (VTPOL) des deux sources avait une homologie moins élevée (95,8%) avec la souche VT de référence originaire du Moyen Orient (U56902) (Tab. 21).

L'analyse phylogénétique de séquences du marqueur moléculaire spécifique VTPOL a montré que les deux isolats se trouvaient dans un sous-groupe distinct et forme un seul groupe avec l'isolat sévère grec M423GR (MF595989) et l'isolat de FS703-VT (KC517492, Floride) (Fig. 39). La souche VT de référence (U56902) se retrouve à part, mais dans le même groupe des isolats SY-1-ALG et PC-3-ALG. L'homologie nucléotidique intra spécifique des isolats PC-3-ALG et SY-1-ALG a été de 98.8%. Cependant, la similitude de séquence de nucléotides du gène de la protéine de capsid de l'isolat PC-3-ALG variait énormément par rapport à celle de l'isolat SY-1-ALG

(92.5% d'homologie). A la lumière de l'analyse de la séquence nucléotidique du marqueur spécifique à la souche VT et celle de l'analyse du gène de la protéine de la capsid CP, ainsi que les symptômes du bois strié, de rabougrissement et de jaunisse sur les sujets atteints, on peut confirmer la présence de souche virulente appartenant au génotype du groupe VT représenté ici par l'isolat local SY-1-ALG (Fig. 39).



**Fig 39.** Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining (NJ) » montrant les relations évolutives entre les isolats locaux de CTV et les diverses souches et isolats de référence sur la base de l'analyse du marqueur moléculaire spécifique aux souches VT (VTPOL).

Ce dernier peut contenir des isolats induisant les formes plus sévères de bois strié (Hilf *et al.*, 2007) ce qui peut représenter une menace sérieuse pour les agrumes de la plaine de Chlef, surtout si *T. citricidus* s'introduit dans le pays car il est déjà signalé au Portugal et en Espagne (Ilharco *et al.*, 2005 ; Cambra, 2007). Selon Roistacher *et al* (2010), cette espèce connue sous le nom de puceron tropical des agrumes pénétrera inévitablement en Afrique du Nord. Cette espèce qui est originaire des régions tropicales et subtropicales, (Komazaki, 1982) peut s'adapter à différents climats dont le climat méditerranéen. Yokomi *et al* (2009) estiment que *T. citricidus* devient très prolifique par temps chaud et humide, qui sont des conditions qui entraînent une

stimulation fréquente de nouveaux cycles de croissance végétale. Même, dans les régions arides ou semi-arides et fraîches on peut observer des pullulations saisonnières importantes. C'est pourquoi le climat continental de la zone d'étude semble être un environnement très propice à l'installation de ce redoutable vecteur de CTV.

Cette étude a démontré que la surveillance est l'élément essentiel pour une protection durable de nos zones agrumicoles contre les maladies de dégénérescence. Le dépistage à grand échelle effectué durant ce travail de recherche a permis de déceler un foyer de CTV dont la souche est exotique et sévère dans un verger jeune. Cette détection précoce rend l'action d'éradication possible et efficace.

Les plus récentes études sur la protection phytosanitaire des agrumes en Californie (USA), précisent que le contrôle du CTV devrait être au centre des préoccupations des autorités phytosanitaires, et plus particulièrement pour les souches VT ainsi que d'autres souches exotiques associées aux formes sévères de bois strié (SP) (Yokomi *et al.*, 2018). A cet effet les autorités phytosanitaires territorialement compétentes préconisent de prendre les mesures adéquates dans l'immédiat.

#### 4.5.4 Clonage et séquençage du marqueur (T30POL)

Les séquences nucléotidiques du marqueur T30POL (696pb) des isolats attribués à la souche (T30) suivant les analyses M.M.M.s (PL-6-ALG et PC-3-ALG) ont montré que la séquence du PC-3-ALG avait une homologie très élevée allant de 99% à 99.4% avec l'ensemble des séquences homologues des souches et isolats de référence (Tab 22). Cependant l'analyse de comparaison de la séquence de l'isolat PL-6-ALG a révélé une homologie significativement inférieure avec ses homologues de la souche espagnole T385 (Y18420) et l'isolat italien modéré (JX106451) montrant respectivement 98,9% et 98.8% de similitude nucléotidique (Tab. 22).

L'analyse de la séquence nucléotidique du gène de la capsid CP25 de l'isolat PL-6-ALG a révélé aussi une divergence par rapport aux génotypes T30 de référence, avec 98.6% vis-à-vis de la souche modérée de référence T30 (EU937520) de Floride et 98.8% avec l'autre souche de référence T385 (Y18420) d'Espagne. Ces corrélations renforcent l'hypothèse citée précédemment où les variations génétiques sont constatées au niveau de deux fragments du génome (CP25 et T30POL). Ceci nous incite à approfondir notre étude à travers un séquençage plus complet du génome.

**Tab 22.** Matrice des identités de séquences nucléotidiques du marqueur T30POL par paires

	PL-6-ALG	PC-3-ALG	KC748391 (Sicile)	AF260651 (T30.Floride)	Y18420 (T385.Espagne)	JX106451 (Calabre)
<b>PL-6-ALG</b>	ID	<b>99,3</b>	<b>99,3</b>	<b>99</b>	98,9	98,8
<b>PC-3-ALG</b>		ID	<b>99,4</b>	<b>99,4</b>	<b>99,3</b>	<b>99</b>
KC748391. (Sicile)			ID	99,4	99,3	99,3
AF260651. (T30.Floride)				ID	99,3	99
Y18420.(T385. Espagne)					ID	99,1
JX106451. (Calabre)						ID

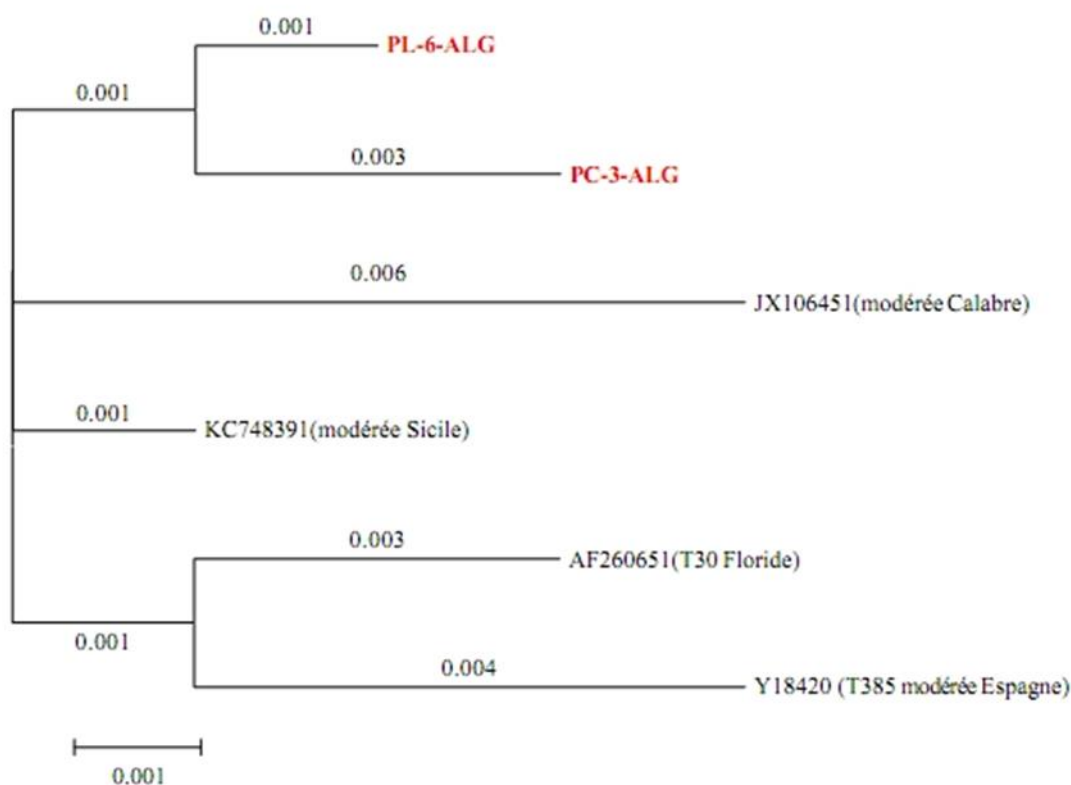
L'analyse phylogénétique a traduit les degrés d'homologie de séquences de nucléotides par la formation de deux sous-groupes distincts (Fig. 41), le premier est composé des deux sources locales (PL-6-ALG et PC-3-ALG) et le deuxième regroupe les deux principales souches modérées de référence, la souche espagnole T385 (Y18420) et la souche T30 de Floride (AF260651).

Ces affiliations génotypiques consolident les résultats de l'analyse de la séquence du gène de la protéine de capsid majeure (CP25) qui a indiqué les variations génotypiques des isolats locaux assignés aux groupe T30 comparativement aux souches de référence, en particulier la source PL-6-ALG qui pourrait être un isolat présentant une petite différence génétique avec ceux déjà décrits dans le même groupe dans le Bassin méditerranéen.



**Fig 40.** (A) Jaunissement de jeune plant infecté par l'isolat SY-1-ALG ; (B) Vieil arbre de clémentinier asymptomatique greffé sur bigaradier infecté par l'isolat PL-6-ALG (C) déclin d'un oranger Navel greffé sur bigaradier.

Dawson *et al* (2015) ont groupé les souches de CTV en sept génotypes sur la base des séquences de l'intégralité du génome possédant une différence de nucléotides supérieure à 7.5% (T36, VT, T3, RB, T68, T30 et HA16-5). Selon ces mêmes auteurs, il est possible qu'il existe d'autres souches qui ne soient pas encore identifiées. Dans ce contexte, l'isolat PL-6-ALG devrait faire l'objet du séquençage complet de son génome et d'une étude phénotypique pour une caractérisation définitive. Ceci permettra d'avoir d'autres informations pour le classer par rapport aux isolats existants dans la banque de données. L'isolat PL-6-ALG pourrait éventuellement jouer un rôle dans un programme de protection croisée, surtout dans le cas où le CTV deviendra endémique dans la région de Chlef. On sait que ce sont les isolats modérés collectés à partir de vieux arbres du même cultivar ne manifestant aucun de symptômes de Tristeza (Fig. 40b) qui sont utilisés dans les programmes de protection croisée (Dawson *et al.*, 2015).



**Fig 41.** Arbre phylogénétique « Neighbor-Joining (NJ) » montrant les relations évolutives entre les isolats locaux de CTV et les diverses souches et isolats de référence sur la base de l'analyse du marqueur moléculaire spécifique aux souches T30 (T30POL).

4.5.5 Réactivité de l'isolat SY-1-ALG à l'anticorps monoclonal MCA13

L'anticorps monoclonal MCA13 réagit avec la majorité des souches virulentes de CTV (Permar *et al.*, 1990). Des enquêtes régionales, nationales et de dépistages règlementaires sur l'incidence et la sévérité de CTV ont été réalisés aux USA, l'Amérique centrale et les Caraïbes à l'aide de l'anticorps MCA13 (Lastra *et al.*, 1991 ; Yokomi *et al.*, 2018). Considérant que la réactivité des isolats à l'anticorps monoclonal MCA13 est lié à la présence de l'acide aminé phénylalanine (F) en position 124 de la séquence d'acides aminés de la protéine de capsid P25 et cet épitope est conservé parmi les isolats sévères de CTV qui provoquent le dépérissement, le bois strié et la jaunisse des jeunes plants (Pappu *et al.*, 1993). Un alignement de séquences d'acides aminés des 3 isolats de la zone d'étude et des souches de référence a été réalisé pour vérifier la présence ou l'absence en position 124 de l'épitope MCA 13 (F) déterminé par le codons TTT en position 371 de la protéine de capsid chez les isolats locaux.

Tab 23. Alignement partiel de séquences multiples d'acides aminés du CP25

Isolats de CTV	Séquence d'acides aminés du P25		Séquence de nucléotides du P25	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	125	135	365	375
PC-3-ALG	DIVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACATCGTGT	ATAATTCTAA
<b>SY-1-ALG</b>	DVVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACGTCGTGT	TAATTCTAA
PL-6-ALG	DIVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACATCGTGT	ATAATTCTAA
T385 (Y18420)	DIVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACATCGTGT	ATAATTCTAA
T30 (EU937520)	DIVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACATCGTGT	ATAATTCTAA
SY568 (AB046398)	DVVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACGTCGTGT	TAATTCTAA
T36 (AY170468)	DVVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACGTCGTGT	TAACTCTAA
VT (U56902)	DVVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACGTCGTGT	TAATTCTAA
19-21 (AF184114)	DVVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACGTCGTGT	TAACTCCAA
SP (EU857538)	DIVVNSKGIG	NRANALRVWG	GACATCGTGT	TAATTCTAA
B301 (JF957196)	DVVVNSKGIG	NRTNALRVWG	GACGTCGTGT	TAACTCCAA
CA-S1-L (KU589212)	DVVVNSKGIG	NRANALRVWG	GACGTCGTGT	TAACTCCAA
CA-S1-L65 (KU589213)	DVVVNSKGIG	NRANALRVWG	GACGTCGTGT	TAACTCCAA

L'étude réalisée sur la présence de cet épitope dans les isolats séquencés a révélé que l'acide aminé (phénylalanine) est présent à la position 124 de la séquence d'acides aminés chez l'isolat SY-1-ALG, et absent chez les deux autres séquences de CP25 des isolats (PC-3-ALG et PL-6-ALG). L'épitope Y(Tyrosine) a été remplacé par la Phénylalanine (F), en raison du changement de la base (A en T) à la position 371 de la séquence nucléotidique de l'isolat virulent SY-1-ALG (Tab 23). Une précédente étude sur la réactivité du MCA 13 aux isolats californiens menés par Yokomi *et al* (2005) a montré qu'aucun isolat bénin appartenant au groupe de T30 ne réagit au MCA13, contrairement à l'ensemble des isolats assignés aux groupes T36, VT et T3. A ce jour, le laboratoire central de diagnostic et ses laboratoires régionaux appartenant à l'autorité phytosanitaire du pays continuent à diagnostiquer le CTV à travers les techniques sérologiques avec des kits d'anticorps polyclonaux uniquement, et ceci dans le cadre d'enquêtes de dépistage et les analyses

réglementaires telles que le contrôle des parcs à bois, pépinières et le matériel végétal importé, du coup cette stratégie ne permet pas de distinguer les souches virulentes. Les travaux récents sur le CTV ont montré que les souches bénignes du virus sont largement répandues (Larbi *et al*, 2015 ; Ali Arous *et al*, 2017). Du coup on peut dire que le statut de la maladie est passé de foyers isolés, à une présence endémique, ce qui implique une reconsidération de l'approche à adopter et l'utilité des opérations de dépistage classiques qui ne correspondent plus à la situation actuelle. La découverte des isolats sévères dans la zone d'études au cours de la présente enquête, nous emmène à recommander vivement l'utilisation de l'anticorps monoclonal MCA13 spécifique aux souches virulentes dont le SY-1-ALG permettant sa détection et sa possible éradication. Toutefois il est utile de rappeler que des récentes caractérisations moléculaires et biologiques de quelques isolats modérés de Californie (RB et S1) (Yokomi *et al.*, 2017, 2018) ont réagi avec le MCA13 (Tab. 23)(annexe 6). Par conséquent, dans le moyen terme il est crucial de revoir les critères d'utilisation de la réactivité MCA13 qui devraient être renforcés par des tests qPCR avec des amorces et des sondes spécifiques aux différentes souches.

#### 4.5.6 Conclusions

La caractérisation de certains isolats de CTV détectés dans la Vallée de Chlef par les marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s et le séquençage du CP25 et deux marqueurs spécifiques de la région POL (VTPOL et T30POL) ont montré la présence de trois types d'isolats de CTV dans la Vallée de Chlef (SY-1-ALG, NN-2-ALG et PC-3-ALG) contenant le génotype VT seul ou mélangé avec le génotype T30, alors que deux isolats (WN-5-ALG ET PL-6-ALG) portent uniquement le génotype modéré T30. Ce dernier s'est avéré prédominant dans la zone d'étude. Les résultats obtenus sont remarquablement consolidés par les symptômes causés par chacun des isolats sur les sujets atteints. Par rapport à la réactivité des isolats sévères à l'anticorps monoclonal MCA13, l'étude de la séquence d'acides aminés de la protéine de capsid CP25 a révélé la présence de cet épitope chez l'isolat SY-1-ALG alors qu'il est absent chez les deux autres isolats séquencés ; en conséquence il est vivement recommandé d'utiliser cet anticorps dans la détection de souches virulentes.

En conclusion, la situation du CTV semble être épidémique à diffusion lente ; elle reste malheureusement liée à une dominance du porte-greffe bigradier. La découverte dans cette étude, de la souche sévère VT induisant le déclin (lent ou rapide) et le bois strié (SP) dans la Vallée de Chlef représente une menace sérieuse à la survie de l'agrumiculture dans la région et également pour l'ensemble des zones agrumicoles du pays. L'intérêt de cette enquête est qu'elle permettra

l'éradication des sujets contaminés par ces isolats virulents avant que la transmission naturelle par pucerons ne puisse se faire.

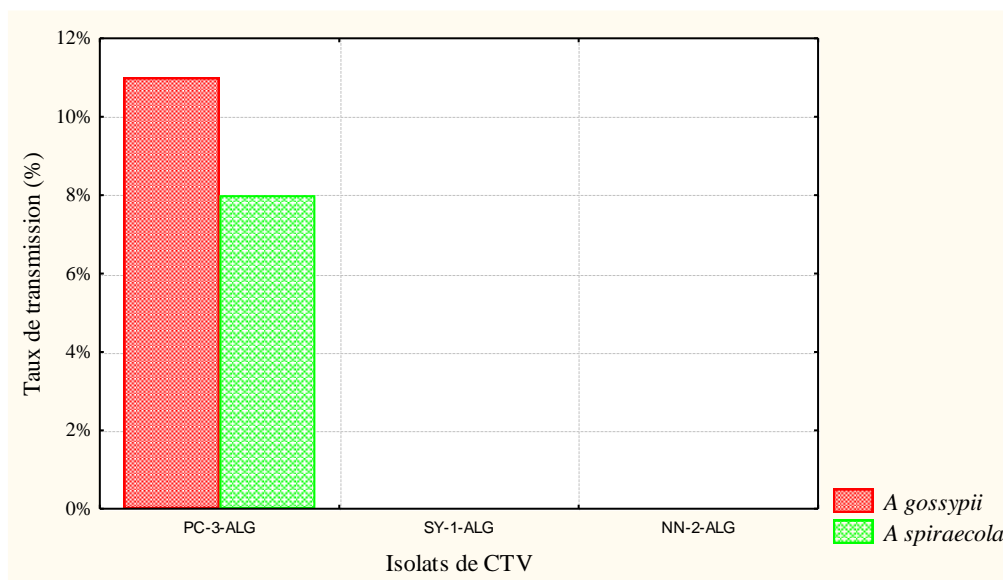
À cet effet, comme mesure d'urgence, il est vivement recommandé de réaliser des traitements insecticides dès l'apparition des premières colonies printanières pour réduire notablement les populations de pucerons et ainsi retarder la dissémination du virus. Toutefois, pour une gestion durable du virus de la Tristeza et particulièrement pour le génotype VT, l'autorité phytosanitaire du pays est invitée à lancer un plan d'action basé sur la surveillance continue du virus, des pucerons vecteurs et l'éradication des foyers de contamination afin d'éviter sa propagation vers les zones indemnes. L'état doit aussi encourager les agriculteurs et les pépiniéristes à procéder au remplacement progressif du porte greffe bigaradier par d'autres porte-greffes tolérants ou résistants au CTV pour mieux gérer la diffusion des souches modérées. La révision de la législation actuelle relative à l'importation du matériel de multiplication, la subvention du prix des plants d'agrumes certifiés et le financement des travaux de recherche sur la protection croisée sont des actions à mettre en œuvre pour mieux gérer la situation phytosanitaire de cette filière

#### **4.6 Efficacité de transmission au laboratoire des sources de CTV identifiées durant l'étude par les populations autochtones d'*A. gossypii* et *A. spiraecola***

Le résultat du test sur l'efficacité de transmission a montré des différences significatives entre les trois sources de CTV ( $F = 2$ ,  $df = 4.000$ ,  $P = 0,017023 < 0.05$ ). L'analyse statistique n'a montré aucun effet significatif des vecteurs de pucerons *A. spiraecola* et *A. gossypii*) ni la combinaison des deux paramètres sur la transmission du virus ( $F = 0.000$ ,  $df = 1.000$ ,  $1.0000 > 0.05$ ) et ( $F = 0.000$ ,  $df = 2,000$ ,  $1.0000 > 0,05$ ) respectivement (Annexe 9). Les plantes infectées par les pucerons ont été soumises à la détection de CTV par analyse DAS-ELISA et les résultats ont montré qu'*A. gossypii* et *A. spiraecola* étaient capables de transmettre efficacement l'isolat PC-3-ALG, considéré comme une infection mixte (T30+VT) à travers les analyses moléculaires multiples M.M.M.s. Lorsque celui-ci est associé uniquement au groupe T30 après séquençage du CP25, on observe des taux de transmission de 11% et 8% respectivement. Concernant, les isolats virulents appartenant au groupe VT (SY-1-ALG) et (NN-2-ALG). Les deux espèces de pucerons testées n'ont pas pu les véhiculer.

Les résultats obtenus sont en concordance avec des essais de transmission conduits sur plusieurs isolats de CTV dans le Bassin méditerranéen et aux USA dans des conditions expérimentales dans lesquels on a pu montrer que *A. gossypii* et *A. spiraecola* étaient fortement impliqués dans la dissémination rapide du CTV (Yokomi et Garnsey, 1987 ; Campolo *et al.*, 2014 ; Afechtal *et al.*,

2015 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Yokomi *et al.*, 2018). Plusieurs études ont démontré qu'*A. gossypii* est très efficace dans la transmission de CTV comme principal vecteur de la maladie de la Tristeza dans le Bassin méditerranéen et dans certaines zones d'Amérique du Nord (Dickson *et al.*, 1956 ; Racciah *et al.*, 1976, Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984 ; Yokomi et Garnsey, 1987 ; Cambra *et al.*, 2000a ; Marroquin *et al.*, 2004).



**Fig 42.** Efficacité de transmission de trois isolats de CTV par les deux biotypes autochtones de citrus *A. gossypii* et *A. spiraecola*

Dans plusieurs régions du monde, on a rapporté que *A. gossypii* a efficacement transmis des souches sévères de CTV, causant d'importantes épidémies qui ont conduit à la destruction de millions d'arbres (Bar-joseph et Loebenstein 1973 ; Roistacher, 1981 ; Yokomi et Garnsey, 1987 ; Atta *et al.*, 2012 ; Afechtal *et al.*, 2015 ; Yahiaoui *et al.*, 2015). *A. gossypii* est aussi associé à une dissémination consistante d'une souche de CTV induisant le bois strié (SP) au niveau de l'université de Riverside, Californie (Calavan *et al.*, 1980 ; Roistacher *et al.*, 1980, 1984). Dans le cas de notre étude, la population locale d'*A. gossypii* pu transmettre la souche PC-3-ALG indiqué comme modérée du T30 à travers l'analyse de la séquence CP, mais aussi comme isolat à deux variantes (T30 et VT) selon les analyses M.M.M. Dans de nombreux pays, une période de latence (parfois supérieure à 30 ans) a été observée entre l'introduction du CTV et la dissémination notable sur le terrain. Ceci suppose qu'il y a une nécessité d'adapter les isolats de CTV aux populations locales de pucerons (Racciah *et al.*, 1980 ; Bar-Joseph *et al.*, 1989 ; Moreno *et al.*, 2008). Dans la situation actuelle et compte tenu de l'introduction récente des deux souches sévères (SY-1-ALG et NN-2-ALG) dans la zone d'étude (3 et 15 ans) respectivement, un changement dans la capacité des populations locales à les transmettre est possible. *Aphis spiraecola* est un vecteur moins

efficace du CTV qu'*A. gossypii* (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984), ceci a été confirmé par le taux de transmission inférieur réalisé à celui de *A. gossypii*, cependant, dans de nombreuses zones d'agrumes des pays méditerranéens, les populations d'*A. spiraeicola* sont plus importantes que celles d'*A. gossypii*, donc leur rôle dans la dissémination de CTV pourrait être plus important dans le futur (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984).

#### 4.6.1 Les variations de la structure génétique du CTV après des essais de transmission du puceron.

##### 4.6.1.1 Variation de séquences nucléotidiques et polypeptidiques du gène P25 de sous-isolats générés de pucerons vecteurs.

L'isolat PC-3-ALG a été transmis avec succès par *A. gossypii* et par *A. spiraeicola*. A partir de cet isolat, le gène CP25 a été récupéré sur les plantes donneuses (PC-3-ALG), puis le sous-isolat issu de la transmission par *A. gossypii* (PC-3-ALG\_Ag), et le sous-isolat dérivé de la transmission d'*A. spiraeicola* (PC-3-ALG\_As) ont été clonés et séquencés. Les séquences obtenues de la plante donneuse ont été comparées à leurs sous-isolats correspondants dérivés de pucerons (Fig. 43).



**Fig 43.** Alignement de séquences du gène de la capsid (P25) de l'isolat (PC-3-ALG) en pré-inoculation et les sous-isolats dérivés issus de la transmission par *A. gossypii* (PC-3-ALG\_Ag), et par *A. spiraeicola* (PC-3-ALG\_As). La couleur rouge met en évidence le polymorphisme mononucléotidique SNP en position 87 (à gauche) et la séquence d'acides aminés correspondante (à droite). Alignement réalisé par le programme Clustal Omega®

L'alignement multiple des séquences nucléotidiques du gène CP25 des sous-isolats dérivés de *A. gossypii* (PC-3-ALG\_Ag) et *A. spiraeicola* (PC-3-ALG\_As), a montré une similarité élevée de séquence avec la séquence du gène P25 obtenue à partir de l'isolat de CTV parental (PC-3-ALG).

Cependant, un seul polymorphisme nucléotidique unique (SNP) a été détecté : C87=>T dans les deux sous-isolats dérivés de pucerons. Cette SNP unique n'a pas affecté la séquence prédite d'acides aminés de la protéine de la capsid P25 de ces sous-isolats qui sont restées identiques à la séquence de CP obtenue à partir de PC-3-ALG (Fig. 43).

Ainsi, l'analyse des isolats transmis par les pucerons a montré que leur transmission induisait des modifications mineures dans les séquences nucléotidiques du gène CP25, mais sans impact sur les séquences d'acides aminés prédites du gène étudié. Néanmoins, ces variations minimales induites par le passage par pucerons vecteurs pourraient augmenter avec le temps et après une succession de passages et par conséquent influencer l'activité biologique du complexe CTV prédominant (Moreno *et al.*, 1993b ; Perry *et al.*, 1998). Une distribution inégale des variantes d'ARN génomique dans la plante infectée, situation observée lors de cette étude et représentée par les nombreuses infections mixtes enregistrées et le tri de certaines de ces variantes par des pucerons contribuent probablement à des changements génétiques dans les populations de CTV dans le futur.

Les isolats de CTV peuvent contenir des variantes de séquences différentes et il a été indiqué précédemment que certains d'entre eux peuvent être altérés par la transmission de pucerons ou après greffage sur de nouvelles espèces hôtes (Grant et Higgins, 1957 ; Raccach *et al.*, 1980 ; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a ; Moreno *et al.*, 1993b). Les sous-isolats générés par ces processus ont parfois montré une certaine divergence au sein de la population virale des isolats parentaux. De plus, la séparation des variantes du CTV des isolats sur le terrain a été rapportée dans plusieurs études sur la transmission du puceron (Gillings *et al.*, 1993; Albiach-Martí *et al.*, 2000a ; Brlansky *et al.*, 2003).

#### **4.6.1.2 Évaluation de la diversité génétique de sous-isolats de CTV inoculés par pucerons avec les marqueurs moléculaires multiples (M.M.M.s).**

Du fait que la comparaison des séquences de gène P25 est insuffisante pour être représentative du génome entier, une évaluation de la diversité génétique des sous-isolats de CTV inoculés par pucerons avec les marqueurs moléculaires multiples (M.M.M.s) a été réalisée sur l'isolat prélevé de la plante donneuse (PC-3-ALG) et les sous-isolats issus de la transmission par *A. gossypii* et *A. spiraecola* (PC-3-ALG\_Ag et PC-3-ALG\_As) respectivement. Nous avons utilisé 04 paires d'amorces d'oligonucléotides hautement spécifiques et définitives de la région divergente 5' relatives aux souches de référence VT, T30, T36 et T3 (Hilf *et al.*, 1999 ; Hilf et Garnsey, 2000 ; Ayllon *et al.*, 2001 ; Hilf *et al.*, 2005) . Les résultats des amplifications par les marqueurs

spécifiques de l'isolat de la plante donneuse ont été comparés à leurs sous-isolats dérivés de l'inoculation par pucerons (Tab. 24)

**Tab 24.** Caractérisation des sous isolats de CTV par M.M.M.s après passage par les pucerons vecteurs

	T36 CP	T36POL	T30POL	VTPOL	Génotype
PC-3-ALG	1	0	1	1	T30+VT
PC-3-ALG_Ag	1	0	1	1	T30+VT
PC-3-ALG_As	1	0	1	1	T30+VT

Le tableau 24 montre que les marqueurs de l'isolat PC-3-ALG sont restés réactifs aux marqueurs T30POL et VTPOL. Le marqueur VTPOL de 695 pb et le marqueur T30POL de 696 pb ont été amplifiés avec un excellent signal avant et après la transmission par les deux espèces de pucerons *A. gossypii* et *A. spiraecola*, tandis que le marqueur T3K17 n'a donné aucun signal. A la lumière de ce résultat, il est clair que le passage de l'isolat par les deux espèces de pucerons vecteurs n'a pas affecté les séquences très spécifiques de la région POL.

#### 4.6.2 Conclusion

L'essai de transmission d'isolats de CTV identifiés dans la zone d'étude par les pucerons locaux a montré que seule l'isolat (PC-3-ALG) a été transmis par les deux espèces vectrices *A. spiraecola* et *A. gossypii* avec un taux de 8 et 11% respectivement. L'analyse de la variance n'a révélé aucun effet espèce de pucerons vecteurs ni de la combinaison des deux paramètres sur la transmission du virus. Cependant, le test ANOVA a montré des différences significatives entre les trois sources de CTV testées. Les deux espèces de pucerons n'ont pas pu véhiculer les souches virulentes SY-1-ALG et NN-2-ALG.

En outre, l'alignement multiple des séquences nucléotidiques du gène CP25 des sous-isolats dérivés des pucerons vecteurs a montré un seul polymorphisme nucléotidique unique (SNP) comparativement à la souche parentale, sans que la séquence d'acides aminés prédite ne soit affectée, tandis que les résultats des analyses M.M.M.s ont été les mêmes que ceux des isolats parentaux.

Bien que les souches virulentes détectées durant l'enquête se sont avérées non transmissibles par les pucerons vecteurs locaux, et compte tenu de la période de latence observée entre l'introduction du CTV et la dissémination notable sur le terrain, rapportée par plusieurs auteurs, il est nécessaire

de maintenir la vigilance, en éradiquant l'inoculum primaire à travers le monitoring périodique et de renforcer la lutte intégrée. La caractérisation moléculaire montrant que certains isolats contiennent différentes variétés de séquences et l'essai de transmission indiquant l'efficacité de transmission du virus chez les pucerons locaux, sont autant d'éléments qui augmentent le risque d'altérations génomiques de la population virale de CTV dans la zone d'étude ; on peut par conséquent assister à des changements de la pathogénicité chez ces populations.

## 5 Conclusions générales

La présente étude à grande échelle sur le virus de la Tristeza des agrumes (CTV) et ses pucerons vecteurs réalisée entre 2016 et 2018 dans les principales zones agrumicoles de la Vallée de Chlef (le haut, moyen et bas Chlef) a permis d'obtenir des informations importantes et utiles pour la gestion de cette maladie épidémique dans le pays. Dans cette étude, deux espèces vectrices de CTV ont été identifiées, il s'agit d'*A. spiraecola* et *A. gossypii* avec une prédominance de la première. Par contre nous n'avons pas observé d'individus correspondant à l'espèce *Toxoptera aurantii* qui est signalée dans d'autres régions du pays. Quant à l'espèce *Toxoptera citricidus* à laquelle nous avons accordé plus d'attention, elle ne semble pas être introduite en Algérie. La contribution à l'identification interspécifique des espèces de pucerons locales par le marqueur moléculaire mitochondrial du gène cytochrome oxydase mtCOI, a démontré son efficacité comme marqueur moléculaire distinguant les différentes espèces de pucerons. C'est la première fois en Algérie que ce marqueur moléculaire est utilisé comme outil d'identification des espèces de puceron. Cet outil génétique devrait permettre de résoudre les ambiguïtés taxonomiques que l'on pourrait rencontrer lorsque l'identification sera basée sur les caractères morphologiques des espèces surtout au stade juvénile ; dans le cas de la détection d'autres espèces exotiques comme *T. citricidus* cette technique serait d'un grand intérêt.

Les prospections sur le virus de la Tristeza (CTV) réalisées par l'utilisation de techniques sérologiques (DTBIA et DAS-ELISA) ont révélé un taux d'infection de 3.21%, particulièrement dans le moyen et bas Chlef qui représentent 53 cas positif sur 54 cas détectés. L'enquête a permis aussi de déterminer les périodes idéales pour mener des analyses sérologiques de CTV dans la région de Chlef, car les concentrations les plus élevées du virus dans les plantes ont été enregistrées au printemps entre Mars et Avril. Par ailleurs l'analyse de quelques paramètres épidémiologiques a confirmé le rôle de la production et le mouvement informel du matériel végétal dans l'introduction du virus dans la région. Il est à noter que certains arbres infectés manifestaient des symptômes sévères indiquant la présence probable de souches virulentes. Ceci a été confirmé par la caractérisation génétique d'une sélection de trois sources de CTV de la Vallée de Chlef. Les marqueurs moléculaires multiples M.M.M.s et le séquençage de la région CP25 et deux marqueurs spécifiques de la région POL (VTPOL et T30POL) ont montré que certains isolats de CTV de la Vallée de Chlef contiennent le génotype VT seul ou mélangé avec le génotype T30, alors que d'autres portent uniquement le génotype modéré T30, ce dernier est étant prédominant dans la zone d'étude. Les résultats obtenus sont remarquablement consolidés par les symptômes causés

par chacun des isolats sur les sujets atteints. La découverte de la souche très sévère VT induisant le bois strié et le déclin (lent ou rapide) dans la Vallée de Chlef représente une menace sérieuse à la culture des agrumes de la région et éventuellement à l'ensemble des zones agrumicoles d'Algérie. Il faut espérer que cette enquête permettra l'éradication de sujets atteints par cet isolat virulent avant que la transmission naturelle par pucerons vecteurs ne commence. Etant donné que la réactivité des isolats sévères à l'anticorps monoclonal MCA13 est liée à la présence de l'acide aminé phénylalanine, l'étude de la séquence d'acides aminés de la protéine de capsid CP25 a révélé la présence de cet épitope chez l'isolat SY-1-ALG mais son absence chez les deux autres isolats séquencés. Par conséquent, il est vivement recommandé d'utiliser cet anticorps spécifique dans les futures campagnes de dépistage.

L'essai de transmission d'isolats de CTV identifiés dans la zone d'étude par les pucerons locaux dans des conditions contrôlées a montré que seul l'isolat modéré (PC-3-ALG) est transmissible par les deux espèces vectrices *A. spiraecola* et *A. gossypii* avec un taux de 8 et 11% respectivement. Par contre les deux espèces de pucerons n'ont pas pu véhiculer les souches virulentes SY-1-ALG et NN-2-ALG. En outre l'alignement multiple des séquences nucléotidiques du gène CP25 et les résultats des analyses M.M.M.s des sous-isolats dérivés des pucerons vecteurs n'a pas montré d'altérations génomiques comparativement à ceux des isolats parentaux. Compte tenu de la période de latence observée entre l'introduction du CTV et la dissémination naturelle notable sur le terrain, rapportée par plusieurs auteurs, il est nécessaire de maintenir la vigilance, en éradiquant l'inoculum primaire à travers le monitoring périodique et la lutte intégrée contre les pucerons.

En conclusion, la situation du CTV semble être épidémique et à diffusion lente avec une présence de souches sévères dans la Vallée de Chlef. Vu la dominance du porte greffe bigaradier dans la majeure partie des vergers d'agrumes, une menace sérieuse est à craindre aussi bien pour la région que pour l'ensemble des zones agrumicoles d'Algérie ; cette enquête a aussi montré le danger que représente l'importation de plants. Les Sept arbres infectés ont été probablement introduits d'Espagne, ce qui oblige le renforcement des techniques du contrôle phytosanitaire aux frontières ainsi qu'un meilleur équipement des laboratoires de contrôle en moyens matériels. La formation continue des agents techniques est indispensable, à côté de la création de parcs à bois nationaux avec une diversité des variétés existantes sur le marché international avec le respect strict des lois en matière de contrôle phytosanitaire. Ces informations doivent être prises en considération pour pérenniser cette filière dans la zone d'étude et limiter la dissémination de la maladie vers les zones encore épargnées (Haut Chlef). Le taux d'infection qui est relativement faible, permet l'épuration des vergers contaminés, par la suppression de sujets malades et la mise en œuvre d'un

programme de certification avec des mesures de quarantaine végétale. La vulgarisation peut progressivement sensibiliser les parties prenantes (agriculteurs, associations professionnelles, organismes publics, etc.) aux risques liés à la propagation de cette maladie dans la Vallée de Chlef. Pour faire face à la diffusion de la souche virulente VT, il est recommandé en d'urgence, d'appliquer des traitements aphicides dès l'apparition des premières colonies printanières. Ainsi l'autorité phytosanitaire du pays est invitée à lancer un plan d'action basé sur la surveillance continue des souches virulentes du virus, ses pucerons vecteurs et l'éradication des foyers primaires afin d'éviter la propagation vers les zones indemnes. L'état devrait aussi inciter les agriculteurs et les pépiniéristes à remplacer le porte- greffe bigaradier par d'autres tolérants au CTV afin de mieux gérer la diffusion des souches modérées. Des mesures de sanction à l'égard des personnes et établissements qui ne respectent pas les règles régissant la production de matériels de multiplication pourraient être appliquées dans une politique globale pour assurer la sécurité alimentaire du pays.

## Références bibliographiques

- Abou Kubaa R, Addante R, Jamal M et D'Onghia AM (2009) Occurrence and distribution of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) and its vectors in Syria. In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° B65, IAM-Bari. pp. 115-117.*
- Abou Kubaa R, D'Onghia AM, Djelouah K, Savino V et Saponari M (2012) Characterization of Citrus Tristeza virus isolates recovered in Syria and Apulia (Southern Italy) using different molecular tools. *Phytopathologia Mediterranea* **51(3)**, 496-504.
- Addante R, Djelouah K et D'Onghia AM (2009) Citrus aphids in Italy: historical review. In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° B65, IAM-Bari. pp. 63-68.*
- Afechtal M, D'Onghia AM, Cocuzza G et Djelouah K (2018) First report of the *Citrus Tristeza Virus* resistance-breaking strain in Morocco. *Journal of Plant Pathology* **100**, 351.
- Afechtal M, Djelouah K, Cocuzza G et D'Onghia AM (2015) Large-scale survey of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) and its Aphid vectors in Morocco. *Acta horticultrae* **1065**, 753-757.
- Afechtal M (2012) Characterization of Moroccan Citrus Tristeza Virus (CTV) isolates and study of their genomic variability after aphid transmission. PhD thesis, university of Catania, department of Agri-Food and environmental systems management, section of plant protection, pp.122.
- Agranovsky AA, Koonin EV, Boyko VP, Maiss E, Frotschl R, Lunina NA et Atabekov JG (1994) Beet yellows Closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology* **198**, 311–324.
- Ait Haddou Mouloud M, Benyahia H, Benazouz A et Bousrhal A (2004) Tolérance a la salinité de trois porte-greffes d'agrumes (Citrange Carrizo et deux hybrides). *Cahiers Agricultures* **13**, 277-281.

- Albiach-Martí MR, Grosser JW, Gowda S, Mawassi M, Satyanarayana T, Garnsey SM et Dawson WO (2004) *Citrus Tristeza Virus* replicates and forms infectious virions in protoplast of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding* **14**, 117-128.
- Albiach-Martí MR, Mawassi M, Gowda S, Satyanayanana T, Hilf ME, Shanker S, Almira EC, Vives MC, López C, Guerri J, Flores R, Moreno P, Garnsey SM et Dawson WO (2000a) Sequences of *Citrus Tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology* **74**, 6856-6865.
- Albiach-Martí, MR, Guerri J, Hermoso de Mendoza A, Laigret F, Ballester-Olmos JF et Moreno P (2000b) Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology* **90**, 134-138.
- Ali Arous S, Araar H, Driouech N, EL Bilali H, Belsanti V et Sisto L (2013) Agricultural extension and advisory services in Algeria at crossroads: pressing problems and innovative solutions. Book of proceeding of the *Fourth International Scientific Symposium "Agrosym 2013"*, 3-6 October 2013; Jahorina Mountain, Bosnia and Herzegovina. ISBN 978-99976-632-1-4.p. 1343.
- Ali Arous S, El Bilali H, Guezlane L, Driouech N, Berjan S et Ould Youcef H (2015) Agricultural extension and advisory services in Algeria. Book of Abstracts of the *VI International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2015"*; 15-18 October, 2015; Jahorina, Bosnia and Herzegovina. ISBN978-99976-632-1-4. p. 704.
- Ali Arous S, Guenaoui Y et Djelouah K (2017) Current status of *citrus Tristeza virus* (CTV) and its vectors in Chlef valley (Algeria). Book of proceeding of the *VIII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2017"*; 5-8 October, 2017; Jahorina, Bosnia and Herzegovina. ISBN. 978-99976-718-1-3, 1064-1070.
- Ali Arous S, Houari A, Meziane M, Djelloul Berkane B, Madani BK, Boudjeltia F et Radjah F (2016) contribution à l'étude de la maladie de la Tristeza et ses pucerons vecteurs potentiels au niveau de la wilaya de Chlef. *International seminar, Santé des plantes au service du développement*. Chlef, Algeria.
- Al-Jaleel A, Zekri M et Hammam Y (2005) Yield, fruit quality, and tree health of 'Allen Eureka' lemon on sevenrootstocks in Saudi Arabia. *Scientia Horticulturae* **105**,457-465.
- Alloum D et Bencheik El Hocine N (1983) Situation générale de l'agrumiculture algérienne. Communication au Colloque de l'Agumiculture Méditerranéenne (21-26 février), pp.12.
- Alzhanova DV, Prokhnevsky AI, Peremyslov VV et Dolja VV (2007) Virion tails of Beet yellows virus: coordinated assembly by three structural proteins. *Virology* **359**, 220-226.

- Ando Y, Hama H, Hosoda A, Suzuki K (1992) Studies on the insecticide resistance in cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae) Biological characteristics of populations on eggplant and cucumber. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* **36**, (61-3).
- Anonyme (1971) Plan de rénovation du verger agrumicole algérien COFROR. Ministère de l'Agriculture et de la réforme agraire. Mission COFROR, IRFA, Paris (France).
- Anonyme (2017). Atelier national, pôle national agrumicole à Chlef, le, 10 et 11 Mai 2017, Auditorium du pôle universitaire Hassiba Benbouali de Chlef, Ouled Fares.
- Anstead, JA, Burd JD, Shufran KA (2002) Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: Haplotype and host associations. *Bull. Entomol. Res* **92**, 17-24.
- Asíns MJ, Bernet GP, Ruiz C, Cambra M, Guerri J et Carbonell E (2004) QTL analysis of Citrus Tristeza virus–citradia interaction. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 1145-1154.
- Astier S, Albouy J, Maury Y et Lecoq H (2001) Principes de la virologie végétale, génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. *INRA Editions*. p488.
- Atta S, Zhou CY, Zhou Y, Cao MJ et Wang XF (2012) Distribution and Research Advances of *Citrus Tristeza virus*. *Journal of integrative Agriculture* **11(3)**, 346-358.
- Ayazpour K, Sijam K, Vadamalai G, Jaafar H (2011) Molecular characterization of *Citrus Tristeza Virus* strains in Peninsular Malaysia. *Afr. J. Microbiol. Res* **5**, 2838-2846.
- Ayllón AM, Rubio L, Sentandreu V, Moya A, Guerri J et Moreno P (2006) Variations in two gene sequences of Citrus Tristeza virus after host passage. *Virus Genes* **32**, 119-128.
- Ayllón MA, Lopez C, Navas-Castillo J, Garnsey SM, Guerri J, Flores R et Moreno P (2001) Polymorphism of the 5' terminal region of Citrus Tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology* **146(1)**, 27-40.
- Ballard JWO et Rand DM (2005) The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Syst* **36**, 621-642.

- Ballester-Olmos JF, Pina JA, Carbonell E, Moreno P, Hermoso de Mendoza A, Cambra M et Navarro L (1993) Biological diversity of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* **42**, 219-229.
- Baloglu S et Birisik N (2009) Historical review of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) and its vectors in turkey, In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N°B65, IAM-Bari*. pp. 134-140.
- Barbagallo S (1965) Brevi notizie intorno agli Afidi degli agrumi in Sicilia. *Tecnica agricola* **17(2)**, 122-128.
- Barbagallo S (1966a) Contributo alla conoscenza degli afidi degli agrumi. I. *Aphis spiraecola* Patch. *Boll.Lab. Entomol. agr. "Filippo Silvestri", Portici* **24**, 49-83.
- Barbagallo S (1966b) L'afidofauna degli agrumi in Sicilia. Bari. *Entomologica* **2**, 201-260.
- Barbagallo S et Inserra R (1974) L'afidofauna degli agrumi in Italia. *L'Italia Agricola* **111(3)**, 121-127.
- Barbagallo S, Cocuzza G, Cravedi P et Komazaki S (2007) IPM case studies: tropical and subtropical fruit trees. In H. F., van Emden, R. Harrington (Eds.). *Aphids as crop pests*. CAB International, UK. pp. 663-67.
- Barbagallo S, Cravedi P, Pasqualini E et Patti I (1996) Afidi delle principali colture fruttifere. Bayer, Milano.
- Bar-Joseph M et Loebenstein G (1973) Effect of strain, source plant, and temperature on transmissibility of *Citrus Tristeza Virus* by the melon aphid. *Phytopathology* **63**, 716-720.
- Bar-Joseph M et Nitzan Y (1991) The spread and distribution of *Citrus Tristeza virus* isolates in sour orange seedlings. Proceedings of the Eleventh Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Florida, pp. 162-165.
- Bar-Joseph M, Che X, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Garnsey SM et Dawson WO (2002) The Continuous Challenge of *Citrus Tristeza virus*. *Proceeding of the 15th International Organization of Citrus Virologists IOCV*, Riverside, CA: 1-7.

- Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moskovitz M, Pursifull DE, Clark MF et Loebenstein G (1979) The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology* **69**, 190-194.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G et Cohen J (1973) Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus Tristeza disease. *Virology* **50**, 821-828.
- Bar-Joseph M, Marcus R et Lee RF (1989) The continuous challenge of Citrus Tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 292-316.
- Belkahla H, Larbi D, Bouafia L, Moudoud R, Guettouche F et Bouzidi S (2013) Serodetection of *Citrus Tristeza Closterovirus* (CTV) in Algeria. *American-Eurasian Journal of sustainable agriculture* **7(1)**, 10-13.
- Bellabas A (2010). *Etude de base sur les agrumes en Algérie* (Baseline study on citrus in Algeria). Rapport de mission. Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient, FAO, Rome.
- Ben Mechlia N (2009) Détermination des priorités d'intervention dans le secteur des agrumes: Résumés des communications. CTA, 2009, pp. 2.
- Benoufella-Kitous K (2005) Les pucerons (Homoptera : Aphididae) des agrumes et leurs ennemis naturels à Oued-Aissi (Tizi-Ouzou). Thèse de magister, Institut National Agronomique, El-Harrach, 207 p.
- Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, De Luis A, Vidal E, Pérez-Panadés J et Cambra, M (2008) Quantitative detection of Citrus Tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* **120**, 177-188.
- Bitancourt AA (1940) A podridão das radículas dos citrinos na provincial de Corrientes, Argentina. *O Biológico* **6**, 285-288, 356-364.
- Blackman RL (1975) *Aphids* Ginn & Co, Aylesbury, 175p.
- Blackman RL et Eastop VF (1984) *Aphids on the world's crops. An identification and information guide*. 2<sup>st</sup> edition. John Wiley and Sons (eds). Chichester. 466p.
- Blackman RL et Eastop VF (2000) *Aphids on the world's crops. An identification and information guide*. 2<sup>nd</sup> edition. Vol 1, John Wiley and Sons, Chichester, 466p.

- Blackman RL et Eastop VF (2006) Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs. An identification and information guide. 2<sup>nd</sup> edition. Vol2, John Wiley and Sons, Chichester, 1415p.
- Blackman RL et Eastop VF (2007) Taxonomic Issues. Aphids as Crop Pest (ed. HFvan Emden, R Harrington). CAB International Wallingford, UK.
- Blondel L, Jacquemond C, Vittori F et Vittori D (1986) Etat des travaux sur les porte-greffes des agrumes à la Station de Recherches agronomiques de Corse. *Fruits* **41** (2), 99-111.
- Bodenheimer FS (1951) Citrus entomology in the Middle East. Hoitsema Brothers, Groningen.
- Boukhris-Bouhachem S et Souissi R (2016) Comprendre et prévenir les pucerons vecteurs de virus phytopathogènes, *Séminaire international : Santé des plantes au service du développement*. Université Hassiba BENBOUALI, Chlef, 12-13 et 14 avril 2016.
- Boulding EG (1998) Molecular evidence against phylogenetically distinct host races of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Genome* **41**, 769-775.
- Boursot P et Bonhomme F (1986) Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires [archive] *Genet. Sel. Evol* **18** (1), 73-98
- Boutiba A (2019) Utilisation de l'eau en agriculture dans le contexte du changement climatique. 3èmes journées méditerranéennes sur l'agrumiculture, « Identification des créneaux prometteurs dans la filière agrumicole algérienne », Université Hassiba Benbouali de Chlef, 21-23 Janvier 2019.
- Bové JM (1967) Maladies à virus des citrus dans le Bassin Méditerranéen. *Fruits* **22**, 125-140.
- Bové JM (1995) Virus and virus-like diseases of citrus in Near-East region. FAO Rome eds, 518 pp.
- Brévault T, Carletto J, Linderme D et Vanlerberghe-Masutti F (2008) Genetic diversity of the cotton aphid, *Aphis gossypii*, in the unstable environment of a cotton growing area. *Agricultural and Forest Entomology* **10**, 215-223.
- Brlansky RH, Damsteegt VD, Howd DS et Roy A (2003) Molecular analyses of citrus Tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease* **87**, 397-401.
- Brlansky RH, Lee RF et Garnsey SM (1988) In situ immunofluorescence for the detection of citrus Tristeza virus inclusion bodies. *Plant disease* **72**, 1039-1041.

- Broadbent P, Bevington KB et Coote BG (1991) Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. In: Brlansky R.H., Lee R.F. and Timmer L.W. (eds). *Proc. 11th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 64-70.
- Broadbent P, Brlansky RH et Indsto J (1996) Biological characterization of Australian isolates of Citrus Tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* **80**, 329-333.
- Brunel A, Ahmadi A et Lebel M (2013) Résumé des effets des changements climatiques par région. AQLPA. Québec. Canada, pp 4.
- Calabrese F (1998) *La Favolosa Storia degli Agrumi*, l'EPOS, Palermo, Italy.
- Calabrese F (2002) Origin and history. In: Dugo G. et Di Giacomo A. (eds.). *Citrus. The Genus Citrus. Taylor and Francis Group*, London, pp. 1-15.
- Calavan EC, Harjung MK, Blue RL, Roistacher CN, Gumpf DJ et Moore PW (1980) Natural spread of seedling yellows and sweet orange and grapefruit stem pitting Tristeza viruses at the University of California, Riverside, pp. 69-75 in: *Proc. 8th Conf. Internl. Org. Citrus Virol, IOCV*, Riverside.
- Cambra M (2007) An unexpected visit: *Toxoptera citricidus* in northern part Iberian peninsula. The current situation. *IOCV Newsletter*, May 2007, 7-8.
- Cambra M, Camarasa E, Gorrís MT, Garnsey SM et Carbonell E (1991) Comparison of different immunosorbent assays for Citrus Tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. In: Brlansky RH, Lee RF et Timmer LW (eds). *Proc. 11th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 38-45.
- Cambra M, Camarasa E, Gorrís MT, Garnsey SM, Gumpf DJ et Tsai MC (1993). Epitope diversity of citrus Tristeza virus (CTV) isolates in Spain. In: Moreno P, da Gracía JV, Timmer LW, eds. *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists, 33-8.
- Cambra M, Garnsey SM, Permar TA, Henderson CT, Gumph D et Vela C (1990) Detection of citrus Tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies (Abstract). *Phytopathology* **80**, 103.
- Cambra M, Gorrís MT, Roman MP, Terrada E, Garnsey SM, Camarasa E, Olmos A et Colomer M (2000a) Routine detection of citrus Tristeza virus by direct immunoprinting ELISA method using

- specific monoclonal and recombinant antibodies. *Proceeding of the 14th Conference of IOCV*, Brazil, 34-41.
- Cambra M, Hermoso de Mendoza A, Moreno P et Navarro L (1982) Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Citrus Tristeza virus (CTV) in different aphid species. *Proceedings of the International Society of Citriculture* **1**, 444-448.
- Cambra M, Olmos A, Gorris MT, Marroquín C, Esteban O, Garnsey SM, Llauger R, Batista L, Penà I et Hermoso de Mendoza A (2000c) Detection of citrus Tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissues and single aphids. In: Da Graça, J.K., Lee, R.F. and Yokomi, R. (Eds). *Proceeding of the 14th Conference of the international Organization of Citrus Virologists, IOCV*, Riverside, 42-49.
- Cambra M., Gorris MT, Marroquín C, Román MP, Olmos A, Martínez MC, Hermoso de Mendoza A, López A et Navarro L (2000b) Incidence and epidemiology of citrus Tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Res* **71**, 75-85.
- Campolo O, Chiera E, Malacrinò A, Laudani F, Fontana A, Albanese GA, Palmeri V (2014) Acquisition and transmission of selected CTV isolates by *Aphis gossypii*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**, 493-498.
- Carletto J, Lombaert E, Chavigny P, Brévault T, Lapchin L, Vanlerberghe-Masutti F (2009) Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Mol. Ecol* **18**, 2198-2212.
- Carter LM et Godfrey K (1999) Evaluation of habitats for introduced parasites of the cotton aphid in the San Joaquin Valley. Agricultural Research Projects-Summary Reports 1999. Cotton Incorporated. Cary, NC, pp. 46-47.
- Castle WS, Bowman KD, Grosser JW, Futch SH et Graham JH (2015) Florida Citrus Rootstock Selection Guide, 3rd Edition. IFAS extension, University of Florida. HS1260. 3p.
- Chalfant AS et Chapman RK (1962) Transmission of cabbage viruses A and B by the cabbage aphid and the green peach aphid. *Journal of Economic Entomology* **55**, 584-590.
- Chen YF, Vanlerberghe-Masutti L, Wilson J, Barchia I, McLoon MO, Smith T, Herron GA (2013) Evidence of superclones in Australian cotton aphid *Aphis gossypii* Glover (Aphididae: Hemiptera). *Pest. Manag. Sci* **69**, 938-948.
- Chen ZS (1992) Identification of salt-tolerance of citrus germplasm. *Acta HortSinica* **19**, 289-295.

- Chouibani M, Ouizbouben A, Kaack H (2001) Protection intégrée en agrumiculture. Coopération Maroco-allemande, Projet contrôle phytosanitaire, DPVCTRF-GTZ. Maroc. 81p.
- CIPV (2016) DP15 *Citrus Tristeza Virus* (diagnosis protocols, International standard for phytosanitary measure 27). Rome. p21.
- CLAM (2007) Comité de Liaison de l'Agumiculture Méditerranéenne. Les exportations d'agrumes du bassin Méditerranéen. Statistiques, évaluations, répartitions, situation 2006-2007, 121p.
- Clark MF et Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virology* **34**, 475-483.
- ClarkMFetBar-JosephM (1984) Enzyme immunosorbent assay in plant virology.In: Maramorosh, K.andKoprowski,H.(eds). *Methods invirology*.NewYork, Academic Press: 51-85.
- CNCC (2015) Bulletin des Variétés d'agrumes. Centre National de Contrôle et Certification des Semences et Plants (CNCC). El Harrach, Alger, 306p.
- Coccuza G, Cavalieri V, Barbagallo S (2008) Preliminary results in the taxonomy of the cryptic group *Aphis frangulae/gossypii* obtained from mitochondrial DNA. *Bulletin of Insectology* **61** (1), 125-126.
- Coeur d'acier A, Jousselin E, Martin JF et Rasplus JY (2007) Phylogeny of the genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol* **42**, 598-611.
- Costa AS et Grant TJ (1951) Studies on transmission of the Tristeza virus by the vector, *Aphis citricidus*. *Phytopathology* **41**, 105-113.
- Costa AS et Müller GW (1980) Tristeza control by cross-protection: a US-Brazil cooperation success. *Plant Disease* **73**, 692-597.
- Covey SN, Alkaff NS, Langara A, et Turner DS (1997) Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.
- D'Onghia AM et Lacirignola C (1998) Major virus and virus-like diseases of citrus in the Mediterranean Proceedings of the Mediterranean Network on Certification of Citrus (1995-1997). *Serie B: studies and research, 21, options méditerranéennes*. CIHEAM/D.G.I., 152pp.

- D'Onghia AM (2009) Citrus certification in the Mediterranean region. In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry Options Méditerranéennes*, Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes N° **B65**, IAM-Bari, pp. 189-210.
- D'Urso F, Ayllón MA, Rubio L, Sambade A, Hermoso de Mendoza A, Guerri J. et Moreno P (2000) Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of Citrus Tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* **49**, 288-294.
- D'Urso F, Sambade A, Moya A, Guerri J. et Moreno P (2003) Variation of haplotype distributions of two genomic regions of Citrus Tristeza virus populations from eastern Spain. *Molecular Ecology* **12**, 517-526.
- Dajoz R (2006). Précis d'écologie. 8ème édition, Dunod, Paris, 640 p
- Davies FS et Albrigo LG (1994) Citrus. Wallingford, UK: CAB International, 254p.
- Dawson WO , Garnsey SM , Tatineni S, Folimonova SY , Harper SJ et Gowda S (2013) . Citrus Tristeza virus-host interactions. *Frontiers in microbiology* **4**, 88-98.
- Dawson WO, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Moreno P (2015) Citrus Tristeza Virus: making an ally from an enemy. *Annu Rev Phytopathol* **53**:137-155.
- Delkhosh HR et Tousi N (2009). Historical review of *Citrus Tristeza Virus* and its vectors in Iran, In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry, Options Méditerranéennes*. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° **B65**, IAM-Bari. pp.134-140.
- Dellaporta SL, Wood J et Hicks JB (1983) A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.
- Delmotte F, Leterme N, Bonhomme J, Rispe C et Simon JC (2001) Multiple routes to asexuality in an aphid species. *Proc. R. Soc. Lond. SerB* **268**, 2291-2299.
- Deng Z, Huang S, Ling P, Yu C, Tao Q, Chen C, Wendell MK, Zhang HB et Gmitter FGJr (2001) Fine genetic mapping and BAC contig development for the *Citrus Tristeza Virus* resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). *Molecular Genetics and Genomics* **265**, 739-747.

- Dickson RC, Johnson MM, Flock RA, Laird EF (1956) Flying aphid populations in Southern California citrus groves and their relation to the transmission of the Tristeza virus. *Phytopathology* **46**, 204-210.
- Dixon AFG (1998) *Aphid Ecology: An optimization Approach*". 2nd Edition, Chapman et Hall, New York, USA.
- Djelouah K et D'Onghia AM (2001a) Occurrence and spread of Citrus Tristeza virus (CTV) in the Mediterranean area. In: Proceedings on production and exchange of virus-free plant propagating material in the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes* **B35**, CIHEAM publications, 43-50.
- Djelouah K et D'Onghia AM (2001b). Detection of Citrus Psorosis virus (CPsV) and Citrus Tristeza virus (CTV) by direct tissue blot immunoassay. In: Proceeding for the Mediterranean Network on Certification of Citrus, *Options Méditerranéennes* **B 33**, CIHEAM publications, pp. 108-113.
- Djelouah K, Valentini F et D'Onghia AM (2009) Technical procedures for the monitoring of Citrus Tristeza Virus (CTV). In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry*, *Options Méditerranéennes*, Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° **B65**, IAM-Bari. pp. 211-217.
- Dodds JA, Morris TJ et Jordan RL (1994) Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathology* **22**, 151-168.
- Dolja VV, Karasev AV et Koonin EV (1994) Molecular biology and evolution of closteroviruses: Sophisticated build-up of large RNA genomes. *Ann. Rev. Phytopathology* **32**, 261-285.
- Dolja VV, Kreuze JF et Valkonen JPT (2006) Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* **117**, 38-51.
- Domingo E. et Holland, JJ (1994) Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: *The Evolutionary Biology of Viruses* (Morse, S.S., Eds), New York: Raven Press, 161-184.
- Domínguez A, Hermoso de Mendoza A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P et Peña L (2002) Pathogen-derived resistance to Citrus Tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) plants expressing its P25 coat protein gene. *Mol. Breeding* **10**, 1-10.

- DPVCT (2017) Index des produits phytosanitaires à usage agricole. Edition 2017. Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques. MADRP, Algérie, p. 230.
- Dreistadt SH, Clark JK et Flint ML (2004) Pests of Landscape Trees and Shrubs: An Integrated Pest Management Guide. 2nd ed. Oakland: *Univ. Calif. Agric. Nat. Res. Publ.* 3359.
- DSA Chlef (2018) Direction des services agricoles. Service statistiques. Bilan agricole 2015-2016.
- Duran-Vila N et Moreno P (2000) Enfermedades de los cítricos. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) N° 2. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa Libros and SEF ([www.sef.es](http://www.sef.es)). pp.165.
- Eastop VF (1977) Worldwide importance of aphids as virus vectors, pp. 3-62. In K. A. Harris and K. Matamoros (eds.), *Aphids as virus vectors*. Academic, New York.
- Ebert TA et Cartwright B (1997) Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Southwest. Entomol* **22**, 116-153.
- EPPO (2015) Diagnostics, PM 7/125 (1) ELISA tests for viruses. *EPPO Bulletin* **45** (3), 445-449.
- EPPO (2019) Organisation européenne et méditerranéenne de la protection des plantes. <https://www.eppo.int/>.
- Fagoaga C, López C, Hermoso de Mendoza AH, Moreno P, Navarro L, Flores R et Peña L (2006) Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus Tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* **66**, 153-165.
- Fagoaga C, López C, Moreno P, Navarro L, Flores R et Peña L (2005) Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 of Citrus Tristeza virus are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 435-445.
- Fang DQ et Roose ML (1999) A novel gene conferring Citrus Tristeza virus resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. *HortScience* **34**, 334-335.
- Fang DQ, Federici CT et Roose ML (1998) A high-resolution linkage map of the Citrus Tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* **150**, 883-890.
- FAO (1996). Citriculture in Algeria. Part II, Chapter 8. <http://www.fao.org/docrep/U5000E/U5000E0b.htm#Chapter%208:%20Algeria>.

- FAO (2008) Vingt-neuvième conférence régionale de la FAO pour le Proche-Orient. Changement climatique : conséquences pour l'agriculture au Proche-Orient. FAO 2008. 16 p.
- FAOSTAT (2019). Food and agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Farrag SN et Omar MA (1969) The present status of citrus virus diseases in Algeria. *Agricult. Research review Dokki* **47**, 5.
- Fawcett HS (1936) Citrus diseases and their control. 2<sup>nd</sup> Eds. McGraw-Hill Book. New York & London. 656pp, 440-455.
- Fawcett HS et Wallace JM (1946) Evidence of the virus nature of citrus quick decline. *Calif. Citrogr* **32**, 88-89.
- Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath KL, Lee RF & Niblett CL (1996) The p27 protein is present at one end of citrus Tristeza virus particles. *Phytopathology* **86**, 1331-1335.
- Ferrari PM (1872) Aphididae Liguriaie.Genova. *Ann. Mus. Civ. St. Nat* **2**, 49-85.
- Foissac X, Svanella-Dumas MJ, Candresse T et Gentit P (2001) Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested-PCR using degenerated and inosine containing primers. *Acta Horticulturae* **550**, 37-44.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cyto- chrome C oxidase subunit I from diverse metazoan inverte- brates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol* **3**, 294-299.
- Forner-Giner MA, Alcaide A, Primo-Millo E et Forner JB (2003) Performance of 'Navelina' orange on 14 rootstocks in northern Valencia (Spain). *Sci. Hort* **98**, 223-232.
- Fraser L (1952) Seedlings-yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural gazette of New South of Wales* **63**, 421-428.
- Fraser RSS (1998) Introduction to classical cross protection. In: Foster D. and Taylor S.J. (eds). *Methods in Molecular Biology* vol. 81, *Plant Virus Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 13-24.

- Frezal A (1957) La presence en Algérie de la Tristeza et de la xyloporose des citrus. *C.R. Acad. Agric. France* **43(6)**, 353-356.
- Frison EA et Taher MM (1991) FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germoplasm. FAO Rome Eds, Italy.
- Fry WE (1982) Principles of Plant Disease Management. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Fuller SJ, Chavigny P, Lapchin L, Valerberghe-Masutti F (1999) Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii*, in southern France. *Mol Ecol* **8**, 1867-1877.
- Garcia-Lidon A, Ortiz JM et Cerda A (1998) Role of rootstock and scion on root and leaf ion accumulation in lemon trees grown under saline conditions. *Fruits* **53**, 89-97.
- Gariido-Vivas A et Ventura JJ (1993) Plagas dos cítricos. Bases para el manejo integrado. Min. Agric. Pescal Alim. Dir. Gen.San. Prod. Agrária, 183 p.
- Garnsey SM et Lee RF (1988) In "Compendium of Citrus Diseases". Whiteside, J.I., Garnsey, S.S. and Timmer, L.W., Eds. APS Press, 48-50.
- Garnsey SM, Barrett HC et Hutchinson DJ (1987a) Identification of *Citrus Tristeza Virus* resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* **19**, 187-191.
- Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Paul C, Hilf ME, Lee RF, Brlansky RH, Yokomi RK et Hartung JS (2005) Biological characterization of an international collection of Citrus Tristeza virus (CTV) Isolates. In Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Hilf ME, Duran-Vila N et Rocha-Peña MA, eds). Riverside, CA: IOCV, pp. (75-93).
- Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Yokomi RY et Lee RF (1991) Development of a worldwide collection of *Citrus Tristeza Virus* isolates. In: Proc. 11th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, CA, pp. 113-120.
- Garnsey SM, Gonsalves D et Purcifull DE (1977) Mechanical transmission of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology* **67**, 965-968.
- Garnsey SM, Su HJ et Tsai M (1996) Differential susceptibility of pummelo and Swingle citrumelo to different isolates of Citrus Tristeza virus, In: da Graça J.V., Morno P. and Yokomi R.K. (eds). Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, CA, pp. 138-146.

- Garnsey SM, Gottwald TR et Yokomi RK (1998) Control strategies for citrus Tristeza virus. In: Hadidi A, Khetarpal R et Koganezawa H (eds). *Plant Virus Disease Control*. APS Press. St. Paul, MN, pp. 639-658.
- Garnsey SM, Gumpf DJ, Roistacher CN, Civerolo E, Lee RF, Yokomi RK et Bar-Joseph M (1987b) Toward a standard evaluation of the biological properties of Citrus Tristeza virus. *Phytophylactica* **19**, 151-157.
- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M et Henderson CT (1993) Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus Tristeza Virus* (CTV). In: Proc. 12<sup>th</sup> Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, CA, pp. 39-50.
- Georgiou A (2002). Evaluation of rootstocks for 'Clementine' mandarin in Cyprus. *Scientia Horticulturae* **93**, 29-38.
- Geraud F (1976) El Afido negro de los citricos, *Toxoptera citricida* Kirkaldy en Venezuela (Resumen) 1. Encuentro Venezolano de Entomología. Univ. Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Inst. Zool. Agric. Maracay.
- Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R et Peña L (2001) Transgenic citrus plants expressing the Citrus Tristeza virus P23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* **2**, 27-36.
- GIFruits (2012) Données sur le secteur des agrumes en Tunisie. <http://www.gifruit.nat.tn/>.
- Gillings MR, Broadbent P, Indsto J et Lee R (1993) Characterization of isolates and strains of citrus Tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* **44**, 305-317.
- Gmitter FGJr, Xiao SY Huang S et Hu XL (1996) A localized linkage map of the Citrus Tristeza virus resistance gene region. *Theor. Appl. Genetics* **92**, 688-695.
- Gómez-Marco F (2016) Gestión integrada de *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae) en clementino: mejora de su control biológico. *Ecosistemas* **25** (2), 114-118.
- Gottwald TR et Hughes G (2000) A new survey method for *Citrus Tristeza Virus* disease assessment. In Proc. 14th Conf. Of IOCV,(Brazil, 1998), IOCV Riverside, 77-78.

- Gottwald TR, Cambra M, Moreno P, Camarasa E et Piquer J (1996a) Spatial and temporal analyses of citrus Tristeza virus in Eastern Spain. *Phytopathology* **86**, 45-55.
- Gottwald TR, Garnsey SM et Barbón JC (1998) Increase and patterns of spread of Citrus Tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown Citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology* **88(7)**, 621-636.
- Gottwald TR, Garnsey SM et Yokomi RK (1993) Potential for spread of *Citrus Tristeza Virus* and its vector, the brown citrus aphid. *Proc. Fla. State Hort. Soc* **106**, 85-94.
- Gottwald TR, Garnsey SM, Cambra M, Moreno P, Irey M et Borbón J (1996b) Differential effects of *Toxoptera citricida* vs *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus Tristeza. In: *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Da Graça, J.V., Moreno, P. and Yokomi, R.K., eds), pp. 120-129. Riverside, CA: IOCV.
- Gottwald TR, Gibson GJ, Garnsey SM et Irey M (1999) Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus Tristeza virus spread by stochastic modeling. *Phytopathology* **89**, 603-608.
- Gottwald TR, Polek M et Riley K (2002) History, present incidence, and spatial distribution of Citrus Tristeza virus in the California Central Valley. In: Duran-Vila N, Milne RG et Da Graça JV (eds). *Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 83-94.
- Gowda S, Satyanarayana T, Ayllón MA, Moreno P, Flores R et Dawson WO (2003) The conserved structures of the 5' nontranslated region of *Citrus Tristeza Virus* are involved in replication and virion assembly. *Virology* **317**, 50-64.
- Gowda S, Satyanayanana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach- Martí MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P et Dawson WO (2000) The p20 gene product of citrus Tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* **274**, 246-254.
- Grant TJ et Higgins RP (1957) Occurrence of mixtures of Tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* **47**, 272-276.
- Gray SM, Moyer JW, Kennedy GG et Campbell CL (1986) Virus-suppression and aphid resistance effects on spatial and temporal spread of Watermelon mosaic virus 2. *Phytopathology* **76**, 1254-1259.

- Gray SM, Smith DM, Barbiéri L et Burd J (2002) Virus transmission phenotype is correlated with host adaptation among genetically diverse populations of the aphid, *Schizaphis graminum*. *Phytopathology* **92**, 970-975.
- Griffon M et Loeillet D (2000) Production et consommation d'agrumes dans le monde. Evolution et éléments de perspective. *Comptes rendus de l'académie d'agriculture de France*, 86(8).
- Grosser JW, Medina-Urrutia V, Ananthakrishnan G, Serrano P (2004) Building a replacement sour orange rootstock: Somatic hybridization of selected mandarin plus pummelo combinations. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**, 530-534.
- Guerrieri E et Digilio MC (2008) Aphid-plant interactions: a review, *Journal of Plant Interactions* **3(4)**, 223-232.
- Haifa (2014). Nutritional recommendation for citrus. *Citrus crop guide*.53p
- Halbert SE, Gene H, Cevic B, Brown LG, Rosales IM, Manjunath KL, Pomerinke M, Davison DA, Lee RF, Niblett CL (2004) Distribution and characterization of *Citrus Tristeza Virus* in South Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* **88**, 935-94.
- Hall WJ et Ford WK (1933) Notes on some citrus insects of southern Rhodesia. British South Africa Co., Mazce Citrus Expt. Station Publ.2a.
- Harris KF (1977). Aphid transmission of plant viruses. In "Aphid as Virus Vectors". (Harris, KF et Maramorosch K Eds.), pp. 177-204. Academic Press, New York.
- Hanani A, Khater M, Drais MI et Djelouah K (2018) First report and molecular characterization of citrus dwarfing viroid (CDVd) and citrus bark cracking viroid (CBCVd) on *Citrus volkameriana* in Egypt. *Journal of Plant Pathology. Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.)* 2018. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0134-7>.
- Harris KF (1989) Aphid transmission of plant viruses. In: Harris KF et Maramorosch K (Eds.), *Aphids as Virus Vectors*. Academic Press, New York, NY, pp. 177-204.
- Harris KF, Pesic-Van Esbroeck Z et Duffus J (1995) Anatomy of a virus vector. In "Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage control and Management" pp. 289-318. Hampshire, UK.
- Heikinheimo O (1988) Mounting techniques, Aphid collection. In: Minks, A.K. et Harrewijn, P. (eds). *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Amsterdam, *Elsevier*, 31-44.

- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF et Pina JA (1988a) Comparative aphid transmission of a common Citrus Tristeza virus isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. In: Timmer LW, Garnsey SM et Navarro L (eds). Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, CA, pp. 68-70.
- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF et Pina-Lorca JA (1984) Transmission of *Citrus Tristeza Virus* by aphids (Homoptera: Aphididae) in Spain. In: *Proc. 9th Conf. Int. Organ. Citrus Virologists*, Riverside, CA, pp. 68-70.
- Hermoso de Mendoza A, Pina JA, Ballester-Olmos JF et Navarro L (1993) Persistent transmission of citrus vein enation virus by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*. p. 361-363 in P. Moreno, J. V. Da Graça, and L. W. Timmer [eds.], Proc. Conf. Intl. Org. Citrus Virol., 12th. Riverside California.
- Hermoso de Mendoza, A., Arouni R, Belliure B, Carbonell EA et Pérez-Panadés J (2006) Intervention thresholds for *Aphis spiraeicola* (Hemiptera: Aphididae) on Citrus clementina. *Journal of Economic Entomology* **99**(4), 1273-1279.
- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF, Pina JA, Serra J et Fuertes C (1988b) Differences in transmission of efficiency of Citrus Tristeza virus by *Aphis gossypii* using sweet orange, mandarin and lemon trees as donor or receptor host plants. In: Timmer LW, Garnsey SM et Navarro L (eds). Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, CA, pp. 63-64.
- Herron CM (2003) *Citrus Tristeza Virus*: characterization of Texas isolates, studies on aphid transmission and pathogen-derived control strategies. PhD dissertation, Cambridge University, UK. 258 pp.
- Herron CM, Mirkov TE, Da Graça JV et Lee RF (2006) *Citrus Tristeza Virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: In vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. *Journal of Virological Methods* **134**, 205-211.
- Hilf ME, Karasev AV, Pappu HR, Gumpf DJ, Niblett CL et Garnsey SM (1995) Characterization of Citrus Tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* **208**, 576-582.
- Hilf ME et Garnsey SM (2000) Characterization and classification of Citrus Tristeza virus isolates by amplification of multiple molecular markers. In: 14th Conf. Int. Organ., Riverside, CA. Citrus Virol, 18-27.
- Hilf ME, Karasev A, Maria R, Albiach M, Dawson WO et Garnsey SM (1999) Two paths of sequence divergence in the Citrus Tristeza virus complex. *Phytopathology* **89**, 336-342.

- Hilf ME, Mavrodieva VA et Garnsey SM (2005) Genetic marker analysis of a global collection of isolates of citrus Tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* **95**, 909-917.
- Hilf ME, Garnsey SM, Robertson C, Gowda S, Satyanarayana T, Irey M, Sieburth P et Dawson W (2007) Characterization of recently introduced HLB and CTV isolates. *Proceeding of Florida State Horticulture Society* **120**, 138-141
- Hughes G et Gottwald TR (1998) Survey methods for assessment of Citrus Tristeza virus incidence. *Phytopathology* **88**, 715-723.
- Hughes G et Gottwald TR (1999) Survey methods for assessment of *Citrus Tristeza Virus* incidence when *Toxoptera citricida* is the predominant vector. *Phytopathology* **89**, 487-494.
- Hullé M, Turpeau-Ait Ighil E, Yvon R et Monnet Y (1999) Les pucerons des plantes maraîchères. In: *Bulletin de la Société entomologique de France* **104 (4)**, octobre 1999. p. 356.
- Ieki H et Yamaguchi A (1988) Protective interference of mild strains of Citrus Tristeza virus against a severe strain in Morita Navel orange. In: Timmer LW, Garnsey SM et Navarro L (eds). *Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 86-90.
- Ilharco FA (1992). Equilíbrio biológico de afídeos. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Ilharco FA et Fonseca PA (1985) Identificação de afídeos por via macroscópica. I. Afídeos dos citrinos. Instituto Nacional de Investigação Agrária e de Extensão Rural, Lisboa.
- Ilharco FA, Sousa-Silva CR et Alvarez A (2005) First report of *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), (Homoptera: Aphidoidea) in Spain and continental Portugal. *Agronomia Lusitana* **51**, 19-21.
- Inaizumi, M. (1981) Life cycle of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae) with special reference to biotype differentiation on various host plants. *Kontyû* **49**, 219-240.
- ITAFV (2003) Rapport sur le dépistage du Citrus Tristeza closterovirus (CTV) au niveau du parc à bois agrumicole. ITAFV, CNCC, INPV. Ministère de l'Agriculture, Alger 2003, Algérie.
- Kano T et Koizumi M (1991) Separation of citrus Tristeza virus (CTV) serotypes through aphid transmission. In: Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, eds. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists, 82-5.

- Karasev AV (2000) Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Phytopathology* **38**, 293-324.
- Karasev AV et Bar-Joseph M (2010) *Citrus Tristeza Virus* and the taxonomy of Closteroviridae. In “*Citrus Tristeza Virus: Complex and Tristeza disease*” (Karasev AV et Hilf ME, Eds.), pp119-132. *The American Phytopathological Society*, Minnesota, USA.
- Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblet CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF., Garnsey SM, Lewandowski DJ et Dawson WO (1995). Complete sequence of the citrus Tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**: 511–520.
- Katis NI, Tsitsipis JA, Stevens M et Powell G (2007) Transmission of plant viruses, pp. 353-390. In VanEmden HF et Harrington R (eds.), *Aphids as crop pests*. CABI, Wallingford, United Kingdom.
- Kerrouche (2016) Dépistage du virus CTV agent de la Tristeza et ses vecteurs dans la plaine du Moyen Chlef. Thèse de Master. Faculté SNV, Université hassiba Benbouali de Chlef. P. 92p.
- Khan IA et Kender WJ (2007) Citrus breeding. In: Khan IA. ed. *Citrus genetics, breeding, and biotechnology*. Wallingford, UK: CAB International. p.1-8.
- Kirkaldy GW (1907) On some peregrine Aphidae in Oahu (Hemiptera). *Proc. Hawaiian Entomol. Soc***1**, 99-102.
- Kitadjima EW, Muller GW et Costa AS (1974) Electron microscopy of Tristeza-infected *Passiflora gracilis* Jacq. In: LG Wethers M Cohen (eds). *Proc. 6th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Univ. Calif. Div Agric. Sci.* Richmond, California, pp. 79-82.
- Klaassen VA, Boeshore ML, Koonin EV, Tian T et Falk BW (1995) Genome structure and phylogenetic analysis of Lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted bipartite Closterovirus. *Virology* **208**, 99-110.
- Knapp JL, Browning HW, Lee RF et Stansly PA (1996) The brown citrus aphid, *Citrus Tristeza Virus* relationship and management guidelines for Florida citrus. *Citrus Indus***77**, 12-16.
- Knorr LC et DuCharme EP (1951) This is Tristeza-ravager of Argentina's citrus industry. *Citrus Magazine* **13**, 17-19.
- Komazaki S (1982) Effects of constant temperatures on population growth of three aphid species, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Aphis citricola* van der Goot and *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) on citrus. *Appl. Entomol. And Zool* **17**, 75-81.

- Komazaki S (1993). Biology and virus transmission of citrus aphids. Food and Fertilizer Technology Center. *Technical Bull* **136**, 9.
- Komazaki S et Toda S (2008) Difference in host preference, life cycle pattern, and insecticide susceptibility among *Aphis gossypii* clones and genetic relationships inferred from internal transcribed spacer 2 sequences of rDNA. *Ann. Entomol. Soc. Am* **101**, 565-572.
- Komazaki S, Osakabe MH (1998) Variation of Japanese *Aphis gossypii* clones in the life cycle, host suitability and insecticide susceptibility and estimation of their genetic variation by DNA analysis. *Aphids in natural and managed ecosystems*, 83-89.
- Komazaki S, Shigehara T et Toda S (2010) Diversity of Japanese *Aphis gossypii* and comparison with other *Aphis* species based on the mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. *Ann. Entomol. Soc. Am* **103**, 916-924.
- Kong P, Rubio L, Polek M, Falk BW (2000) Population structure and Genetic Diversity within California *Citrus Tristeza Virus* (CTV) isolates. *Virus Genes* **21**(3), 139-145.
- Kreuze JF, Savenkov EI et Valkonen, JPT (2002) Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of sweet potato chlorotic stunt virus reveal several new features for the genus *Crinivirus*. *Journal of Virology* **76**, 9260–9270.
- Kring JB (1959) The life cycles of the melon aphid, *Aphis gossypii* Glover, an example of facultative migration. *Ann Entomol Soc. Am* **52**, 284-286.
- Kumar S, Stecher G et Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870-1874.
- Kyriakou A, Ioannou N, Gavriel J, Bar-Joseph M, Papayiannis C, Kapar-Isaia T et Savva G (1996) Management of Citrus Tristeza virus in Cyprus. In: Da Graça JV, Moreno P. et Yokomi RK (eds). *Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 172-178.
- Laala S, Belhadj H et Ghezli C (2019). Détection du virus de la Tristeza dans la région de la Mitidja. Communication. *3èmes journées méditerranéennes sur l'agrumiculture*, « Identification des créneaux prometteurs dans la filière agrumicole algérienne », Université Hassiba Benbouali de Chlef, 21-23 Janvier 2019.
- Laamari M, Coeur d'Acier et Jouselin E. (2015) Première observation du puceron brun *Pterochloroides persicae* (Homoptera, Aphididae, Lachnidae) sur pêcher en Algérie. *Bulletin*

*OEPP* **45** (1), 106-107.

Labdaoui ZE (2019) Aménagement de la protection phytosanitaire contre les pucerons des agrumes dans le Nord-Ouest algérien en faveur d'une lutte biologique durable. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département des sciences agronomiques, pp. 139.

Labdaoui ZE et Guenaoui Y (2018) Some observations on the predominance of *Aphis spiraecola* on citrus in Northwestern Algeria. *Tunisian Journal of Plant Protection* **13** (si), 147-157.

Labdaoui ZE, Guenaoui Y, Ferrer Suay M, Selfa J, Pujade Villar J (2018) First record and new hosts relationships of *Alloxysta brevis* (Thomson, 1862) (Hymenoptera: Charpinae) from Algeria. *Butlleti de la Institutio Catalana d'Historia Natural* **82**, 63-66.

Lacirignola C et D'Onghia AM (2009) The Mediterranean citriculture: production and perspectives. CIHEAM- Mediterranean Agronomic Institute, Valenzano (Ba) Italy, pp. 13-17.

Ladaniya MS (2008) Citrus Fruit. Biology, Technology and Evaluation. San Diego, USA: Academic Press, 558 p.

Larbi D, Belkahla H, Djelouah K et D'Onghia AM (2015) Monitoring of *Citrus Tristeza virus* (CTV) in Algeria and characterization of local isolates. *Acta horticulturae* **1065**, 767-771.

Larbi D, Ghezli C et Djelouah K (2009). Historical review of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) in Algeria. In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° B65, IAM-Bari. pp. 107-110.*

Lastra R, Rocha-Peña MA, Niblett CL et Lee RF (1991) Summary of workshop. In "Final Report of the Workshop on *Citrus Tristeza Virus /Toxoptera citricidus* survey in Central America and Mexico." pp. 1-2. CATIE-University of Florida-INIFAP/SARH-USDA, Turrialba, Costa Rica.

Lebbal S, Mezghani-Khemakhem M, Bouallegue M, Ben Amara W, Khalfallah Y, Makni M et Bouktila D (2019) Host-associated Genetic Differentiation of the Green Citrus Aphid, *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae) in Algeria. *Journal of the Entomological Research Society* **21**(1), 115-127.

- Lebbal S et Laamari M (2015) Seasonal dynamics of aphids on lemon (*Citrus limon* L.), orange (*C. sinensis* L.) and clementine (*C. clementina* Hort. ex Tan.) in Skikda (Algeria). *Journal of Entomology and Zoology Studies* **3**, 321-324.
- Lebbal S et Laamari M (2016) Population dynamics of aphids (Aphididae) on orange (*Citrus sinensis* 'Thomson Navel') and mandarin (*Citrus reticulata* 'Blanco'). *Acta Agriculturae Slovenica* **107(1)**, 137-145.
- Lee RF et Bar-Joseph M (2000) Tristeza. Compendium of Citrus Diseases, Second Edition Timmer LW, Garnsey SM et Graham H (Eds.) APS Press, St. Paul, Minn. pp. 61-63.
- Lee RF, Roistacher CN, Niblett CL, Lastra R, Rocha-Peña MA, Garnsey SM, Yokomi RK, Gumpf DJ et Dodds JA (1992) Presence of *Toxoptera citricidus* in Central America: A threat to citrus in Florida and the United States. *Citrus Ind* **73**, 13-24, 62, 63.
- Lee Y, Lee W, Lee S et Kim H (2015) A cryptic species of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) complex revealed by genetic divergence and different host plant association. *Bulletin of Entomological Research* **105**, 40-51.
- Leh V, Jacquot E, Geldreich A, Haas M, Blanc S, Keller M et Yot P (2001) Interaction between Cauliflower mosaic virus ORF III product and coat protein is required for transmission of the virus by aphids. *J. Virol* **75**, 100-106.
- Leonide Celeni (2001) Le puceron du cotonnier *Aphis gossypii* (Glover) et son parasitoïde *Aphelinus gossypii* Timberlake en République Centrafricaine. *Insectes* **1227**, 10.
- Lim WL et Hagedorn DJ (1977) Bimodal transmission of plant viruses. In: Harris KF et Maramorosch KK (eds). *Aphids as Virus Vectors*. Academic Press, New York, pp. 237-251.
- Lin Y, Brlansky RH, Powell CA (2002) Inefficient transmission of *Citrus Tristeza Virus* from grapefruit by single Brown citrus aphids. *HortSci.* **37(6)**, 936-939.
- Lin Y, Rundell PA, Xie L et Powell CA (2000) In situ immunoassay for detection of Citrus Tristeza virus. *Plant Disease* **84**, 937-940.
- Ling KS, Zhu HY et Gonsalves D (2004) Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine Leafroll-associated Virus 3, type member of the genus Ampelovirus. *Journal of General Virology* **85**, 2099-2102.

- Liu TX et Sparks AN (2001) Aphids on Cruciferous Crops, Identification and Management. Texas Agricultural Extension service, B-6109. <http://texaserc.tamu.edu>.
- Lloyd J, Kriedemann P et Aspinall D (1990) Contrasts between Citrus species in response to salinization: An analysis of photosynthesis and water relations for different rootstock-scion combinations. *Physiol. Plant* **78**: 236-246.
- Lokeshwari D, Krishna Kumar NK, Manjunatha H (2015) Molecular diversity of the *Aphis gossypii* (Hemiptera Aphididae): A potential vector of Potyviruses (Potyviridae). *Ann. Entomol. Soc. Am* **108(4)**, 621-633.
- Lopes C (2007) Dynamique d'un système hôte-parasitoïdes en environnement spatialement hétérogène et lutte biologique. Application au puceron *Aphis gossypii* et au parasitoïde *Lysiphebus testaceipes* en serre de melons. Thèse de Doctorat. Agro. Paris. Tch. Paris. 311pp.
- López C, Ayllon MA, Navas-Castillo J, Guerri J, Moreno P et Flores R (1998) Molecular variability of the 5'- and 3'- terminal regions of *Citrus Tristeza Virus* RNA. *Phytopathology* **88**, 685-691.
- López C, Navas-Castillo J, Gowda S, Moreno et Flores R (2000) The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of Citrus Tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* **269**, 462-470.
- Loussert R (1987) Les agrumes 2 production. Ed Scientifiques Universitaires Mkalles- Mar Roukoz. Liban. 157 P.
- Louzada ES, del Rio HS, Sétamou M, Watson JW et Swietlik DM (2008) Evaluation of citrus rootstocks for the high pH, calcareous soils of South Texas. *Euphytica* **164**, 13-18.
- Lowery DT, Smirle MJ, Footitt RG et Beers EH (2006) Susceptibilities of apple aphid and spirea aphid collected from apple in the Pacific northwest to selected insecticides. *J. Econ. Entomol* **99**, 1369-1374.
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO et Ding SW (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**, 15742-15747.
- Lutting M, van Vuuren SP, van der Vyver JB (2002) Differentiation of single aphid sub- isolates from two South African Citrus Tristeza Virus isolates from grapefruit by single strand conformation polymorphism. In "Proceeding of the 15th conference of the International Organization of Citrus Virologists." (Duran-Vila N, Milne RG et Da Graça JV Eds.), IOCV, Riverside, CA, pp. 186-196

- MADRP (2018) Statistique Agricole, superficies et productions, SERIE B, 2016. Ministry of agriculture, rural development and fishing of Algeria. 77p.
- Malcom P (2006) History of citrus. [Http://www.submityourarticle.com/articles/Patrick-Malcom-1285/lemon-7969.php](http://www.submityourarticle.com/articles/Patrick-Malcom-1285/lemon-7969.php).
- Marais LJ, Marais ML et Ra M (1996) Effect of citrus disease stem pitting on fruit size and yield of Marsh grapefruit in Southern Africa. In: Moreno P, Da Graça JV et Yokomi RK (eds). *Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*. Riverside, CA, pp. 163-167.
- Marroquín C, Olmos A, Gorris MT, Bertoloni E, Martínez MC, Carbonell EA, De Mendoza AH et Cambra M (2004) Estimation of the number of aphids carrying *Citrus Tristeza Virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research* **100**, 101-108.
- Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RAH, Dolja VV, Falk BW, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev AV, Minafra A, Namba S, Vetten HJ, Wisler GC et Yoshikawa N (2002) The family Closteroviridae revised. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), study group on closteroviruses and allied viruses. *Virology Division News. Archives of Virology* **147(10)**, 2039-2044.
- Martinez A et Wallace JM (1964) Studies on transmission of the virus components of citrus seedling yellows by *Aphis gossypii*. *Plant Dis. Rep* **48**, 131-133.
- Mawassi M, Mietkiewska E, Gofman R, Yang G et Bar-Joseph M (1996) Unusual sequence relationships between two isolates of Citrus Tristeza virus. *J. Gen. Virology* **77**, 2359-2364.
- Mawassi M, Mietkiewska E, Hilf ME, Ashoulin L, Karasev AV, Gafny R, Lee RF, Garnsey SM, Dawson WO et Bar-Joseph M (1995) Multiple species of defective RNAs in plants infected with citrus Tristeza virus. *Virology* **214**, 264-268.
- Meneghini M (1946) Sobre a natureza e transmissibilidade da doença (Tristeza) dos citrus. *Biologico* **12**, 285-287.
- Mestre PF, Asíns MJ, Pina JA, Carbonell EA et Navarro L (1997a) Molecular markers flanking citrus Tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor. Appl. Genetics* **94**, 458-464.
- Mestre PF, Asíns MJ, Pina JA. et Navarro L (1997b) Efficient search for new resistant genotypes to the Citrus Tristeza closterovirus in the orange subfamily Aurantioideae. *Theor. Appl. Genetics* **95**, 1282-1288.

- Michaud JP et Alvarez R (2000) First collection of brown citrus aphid from Quintana Roo, Mexico. *Florida Entomologist* **83**: 357-358.
- Minks AK et Harrewijn P (1989) Aphids: their biology, natural enemies and control. New York: Elsevier.
- Moran NA (1988). The Evolution of Host-Plant Alternation in Aphids: Evidence for Specialization as a Dead End. *The American Naturalist* **132** (5), 681-706.
- Moreira S (1942) Observações sobre a “Tristeza” dos Citrus: ou “Podridão das radículas”. *O. Biológico* **8**, 269-272.
- Moreno P, Ambros S, Albiach-Martí M, Guerri J et Pena L (2008) Citrus Tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* **9**(2), 251-268.
- Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Fuertes-Polo C, Albiach R et Martinez ME (1993a) Variations in pathogenicity and double stranded (dsRNA) patterns of Citrus Tristeza Virus isolates induced by host passage. In: 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol, Riverside, CA: 8-15.
- Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos JF, Fuertes-Polo C, Albiach R, Martinez ME (1993b) Variations in pathogenicity and double-stranded RNA (dsRNA) patterns of citrus Tristeza virus isolates induced by host passage. In: Moreno P, da Graca JV, Timmer LW, eds. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists, 8–15.
- Moritz C, Dweling TE et Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst* **18**, 269-292.
- Mostefa-Kara K., 2008 - La menace climatique en Algérie et en Afrique. Hydra (Algérie) : Editions Dahlab, 384 p.
- Mukhopadhyay S (2004) Citrus: Production, Postharvest, Disease and Pest Management. Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA.
- Müller GW, Costa AS, Castro JL et Guirado N (1988) Results from preimmunization tests to control the Capao Bonito strain of Tristeza. In: Timmer L.W., Garnsey S.M. and Navarro L. (eds). *Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 82-85.

- Müller GW, Costa AS, Kitadjima EW et Camargo LJB (1974) Additional evidence that Tristeza virus multiplies in *Passiflora* spp. In: Weathers LG, Cohen M (eds.). Proc. 6<sup>th</sup> Conf. Int. Citrus Virol., Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Richmond. California, pp. 75-78.
- Mutin G (1969) L'Algérie et ses agrumes. In: Revue de géographie de Lyon, Vol. 44, n° 1. pp 5-36.
- Nauen R et Elbert A (2003) European monitoring of resistance to insecticides in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special reference to imidacloprid. *Bull. Entomol. Res* **93**, 47-54.
- Navarro L, Pina JA, Juárez J, Ballester-Olmos JF, Arregui JM, Ortega C, Navarro A, Duran-Vila N, Guerri J, Moreno P, Cambra M, Medina A et Zaragoza S (2002) The Citrus Variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila, N., Milne, R.G. and Da Graça, J.V., eds), pp. 306–316. Riverside, CA: IOCV.
- Navarro L (1993) Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: Moreno P, Da Graça JV, Timmer LW (eds). Proc. 12<sup>th</sup> Conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV, Riverside, 383-391.
- Navarro L (2015) The Spanish citrus industry. *Acta Hort* **1065**, 41-48
- Nicolosi E (2007) Origin and taxonomy. In: I.A. Khan (ed.). Citrus genetics, breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford, pp.19-44.
- Nolasco G, Santos C, Silva G, Fonseca F (2009) Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *Citrus Tristeza Virus* based on the coat protein gene. *J Virol Meth* **155**, 97-108.
- Norman PA et Grant TJ (1956) Transmission of Tristeza virus by aphids. Proc. Fla. State. *Hortic. Soc* **69**, 38-42.
- Norman PA, Sutton RA et Burditt AK Jr (1968) Factors affecting transmission of Tristeza virus by melon aphids. *J. Econ. Entomol* **61**, 238-242.
- Norman PA, Sutton RA et Selhime AG (1972) Further evidence that Tristeza virus is transmitted semi-persistently by the melon aphid. *J. Econ. Entomology* **65**, 593-594.
- Olivares-Fuster O, Fleming GH, Albiach-Marti MR, Gowda S, Dawson, WO, Grosser JW (2003) *Citrus Tristeza Virus* (CTV) resistance in transgenic citrus based on virus challenge of protoplasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **39**, 567-572.

- Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Bakry F, Aubert B (1998) Rootstock breeding strategies for the Mediterranean Citrus industry ; the somatic hybridization potential. *Fruits* **53**, 335-44.
- ONTA (2010) Guide de procédures, Procédures de conversion du droit de jouissance en droit de concession. Partie I. MADRP, Alger, 11p
- Ortiz JM (2002) Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In Dugo G. et Di Giacomo A. (eds.). Citrus. The Genus Citrus. Taylor and Francis Group, London, pp. 16-35.
- Pachauri RK et Reisinger A (2007) Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC, Geneva, Switzerland. pp. 104.
- Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckloff RMG., McCaffery M, Boyko V, Gowda S, Dolja VV, Koonin EV, Gumpf DJ, Cline KC, Garnsey SM, Dawson WO, Lee RF et Niblett CL (1994) Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the *Citrus Tristeza Closterovirus* genome. *Virology* **199**, 35-46.
- Pappu HR, Pappu SS, Niblett CL, Lee RF et Civerolo E (1993) Comparative analysis of the coat proteins of biologically distinct *Citrus Tristeza Closterovirus* isolates. *Virus Genes* **73**, 255-264.
- Passerini G (1863) Aphididae Italicae hucusque observatae. *Archivio per la Zool* **2(2)**, 1-92.
- Patti I (1983) Gli afidi degli agrumi. Pubblicazione C.N.R. collana Progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente", AQ/1/231, Roma pp.63
- Patti I (1985) Afidi degli agrumi. In: Barbagallo S. Gli aphidi e le colture. Reda, Roma:137-145.
- Patti I et Barbagallo S (1998) An approach to the knowledge on the Italian aphid fauna, pp. 397-405. In: Nafria N et Dixon JM (eds). Aphids in natural and managed ecosystems. Universidad de León, León, Spain.
- Peng CW, Peremyslov VV, Mushegian AR, Dawson WO et Dolja VV (2001) Functional specialization and evolution of leader proteins in the family Closteroviridae. *J. Virol.* **75**, 12153-12160.
- Peremyslov VV, Pan YW et Dolja VV (2004) Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Virology* **78**, 3704-3709.

- Perez-Perez JG, Porras Castillo I, Castillo IP, Garcia-Lidon A, Botia P et Garcia Sanchez F (2005) Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). *Scientia Horticulturae* **106**, 530-538.
- Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ, Lee RF (1990) A mono-clonal antibody that discriminates strains of citrus Tristeza virus. *Phytopathology* **80**, 224-228.
- Perry KL, Zhang L et Palukaitis P (1998) Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* **242**, 204-210.
- Pirone TP et Blanc S (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol* **34**, 227-247.
- Pitrat M et Lecoq H (1980) Inheritance of resistance to Cucumber mosaic virus transmission by *Aphis gossypii* in *Cucumis melo*. *Phytopathology* **70**, 958-961.
- Powell CA, Pelosi RR, Rundell PA et Cohen M (2003) Breakdown of cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of *Citrus Tristeza Virus* following introduction of the brown citrus aphid. *Plant Disease* **87**, 1116-1118.
- Raboudi F, Mezghani M, Makni H, Marrakchi M, Rouault JD et Makni M (2005) Aphid species identification using cuticular hydrocarbons and cytochrome b gene sequences. *J. Appl. Entomol* **129**, 75-80.
- Racah B, Bar-Joseph M et Loebenstein G (1978) The role of aphid vectors and variation in virus isolates in the epidemiology of Tristeza disease. pp. 221-227 In: *Plant Disease Epidemiology*. Scott PR et Bainbridge A, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- Racah B, Loebenstein G et Singer S (1980) Aphid-transmissibility variants of citrus Tristeza virus in infected citrus trees. *Phytopathology* **70**, 89-93.
- Racah B, Loebenstein G, Bar-Joseph M et Oren Y (1976a) Transmission of Tristeza by aphids prevalent on citrus and operation of the Tristeza suppression program in Israel. In: Calavan E.C. (eds). *Proc. 7th Conf. Int. Ogr. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp. 47-49.
- Racah B, Loebenstein G, Bar-Joseph M (1976b) Transmission of citrus Tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* **66**, 1102-1104.

- Rai M (2006) Refinement of the Citrus Tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol. Biology* **61**, 399-414.
- Ramin AA et Alirezanezhad A (2005) Effects of citrus rootstocks on fruit yield and quality of Ruby Red and Marsh grapefruit. *Fruits* **60 (05)**, 311-317.
- Rao MN, Soneji JR, Chen CX, Huang S et Gmitter FG (2008) Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genet. Genomes* **4**, 113-124.
- Ratcliff F, Harrison BD et Baulcombe DC (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.
- Ratcliff F, MacFarlane S et Baulcombe DC (1999) Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207-1216.
- Raymond B, Searle JB et Dougl A (2001) On the processes shaping reproductive isolation in aphids of the *Aphis fabae* (Scop.) complex (Aphididae: Homoptera). *Biol. J. Linn. Soc* **74**, 205-215.
- Rebijith KB, Asokan R, Krishna V, Krishna Kumar NK., Ramamurthy VV (2012) Development of species-specific markers and molecular differences in mitochondrial and nuclear DNA sequences of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Fla. Entomol* **95**, 674-682.
- Rebours H (1950) Les agrumes. Rapport de l'union des syndicats des producteurs d'agrumes en Algérie. 3<sup>e</sup> édit., 502p.
- Rebours H (1966). Les agrumes. Manuel de culture des citrus pour le bassin Méditerranéen. Ed. J.B.-Baillièrre et Fils, 278p. Paris.
- Remaudière G et Remaudière M (1997) Catalogue Des Aphididae Du Monde (Homoptera, Aphidoidea). p. 475. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Retuerma, ML et Price WC (1972) Evidence that Tristeza virus is stylet-borne. *FAO Plant Prot.Bull* **20**, 111-114.
- Risso JA (1813) Essai sur l'Histoire Naturelle des Orangers, Bigaradies, Limettiers, Cedratiers, Limoniers ou Citronniers, Cultivés dans le Département des Alpes Maritimes. Dufour, Paris.

- Risso JA et Poiteau A (1818) Histoire Naturelle des Orangers. Herissant de Doux, Paris.
- Roberts PD, McGovern RJ, Lee RF et Niblett CL (2001) Tristeza Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, 10p. <http://plantpath.ifas.ufl.edu>.
- Rocha-Peña MA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa-Corona FM, Garnsey SM et Yokomi RK (1995) Citrus Tristeza virus and its aphid vector *Toxopera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* **79(5)**, 437-444.
- Rochdi A, Lemsellek J, Bousarhal A, Rachidai A (2005) Évaluation sous serre de la tolérance à la salinité de quelques porte-greffes d'agrumes : *Citrus aurantium* et deux hybrides de *Poncirus trifoliata* (*Poncirus* x *Citrus sinensis* et *Poncirus* x *Mandarinier sunki*). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **9(1)**, 65–73.
- Roistacher CN (1981) A blueprint for disaster. I. The history of seedling yellows disease. *Citrograph*, **67**, 4-24.
- Roistacher CN (1988) Observation on the decline of sweet orange trees in coastal Peru caused by stem pitting Tristeza. *FAO Plant Protection Bulletin* **36**, 19-26.
- Roistacher CN (1991) Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome (Eds.) 286p.
- Roistacher CN (2000) Diagnosis and Management of Virus and Virus like Diseases of Citrus Compendium of Citrus Diseases, Second Edition Timmer LW, Garnsey SM et Graham H (Eds.) APS Press, St. Paul, Minn. pp. 61-63.
- Roistacher CN (2004) Diagnosis and Management of Virus and Virus like Diseases of Citrus. S.A.M.H.Naqvi (ed), *Diseases of fruit and vegetables* **Vol I**, 109-189.
- Roistacher CN (2006) EcoPort slide shows on the internet related to citrus and citrus diseases. <http://ecoport.org/ep?SearchType=domainContents&id=9&type=group>
- Roistacher CN et Bar-Joseph M (1984) Transmission of Tristeza and seedling yellows Tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. In: *Proc. 9th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp: 9-18.
- Roistacher CN, Bar-Joseph M et Gumpf DJ (1984) Transmission of Tristeza and seedling yellows Tristeza by small populations of *Aphis gossypii*. *Plant Disease* **68**, 494-496.

- Roistacher CN, Nauer EM, Kishaba A et Calavan EC (1980) Transmission of Citrus Tristeza virus by *Aphis gossypii* reflecting changes in virus transmissibility in California. In: Calavan EC., Garnsey SM et Timmer LW (eds). *Proc. 8<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV*, Riverside, CA, pp.76-82.
- Roistacher, CN, Da Graca J (2006) Difficult times. *IOCV Newsletter* p. 1 (April 2006).
- Roistacher, CN, Da Graca J et Muller GW (2010) Cross protection against Citrus Tristeza virus- A Review. *Proceeding, 17<sup>th</sup> Conference.Int. Org., Riverside, CA. Citrus Virol*, 1-22
- Román MP, Cambra M, Juárez J, Moreno P, Duran-Vila N, Tanaka FAO, Alves E, Kitajima, EW, Yamamoto PT, Bassanezi RB, Teixeira DC, Junior WCJ, Ayres AJ, Gimenes-Fernandes N, Rabenstein F, Girotto LF et Bové JM (2004) Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. *Plant Dis* **88**, 453-467.
- Rubio L, Ayllón MA, Guerri J, Pappu HR, Niblett, CL et Moreno P (1996) Differentiation of Citrus Tristeza virus (CTV) isolates by single-stranded conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology* **129**, 479-489.
- Rubio L, Ayllón MA, Kong P, Fernandez A, Polek M, Guerri J, Moreno P et Falk BW (2001) Genetic variation of Citrus Tristeza virus isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *J. Virology* **75(17)**, 8054-8062.
- Rubio L, Guerri J et Moreno P (2000) Characterization of Citrus Tristeza virus isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of DNA complementary to their RNA population. In: *14<sup>th</sup> Proc. Conf. Int. Org., Riverside, CA.Citrus Virol*, 12-17.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J et Ambrós S (2007) The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of Citrus Tristeza virus from Spain: Comparison with isolates from different origins. *Arch. Virology* **151**, 387-398.
- Russo F (1956)La presenza del virus della Tristeza su limone “Dwarf Meyer” e mandarino “satsuma” riscontrata in Sicilia. *Riv. Agrumicoltura* **1 (7-8)**, 281-289.
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Salibe, AA (1961) Contribuição ao estudo da doença exocorte dos citros. University of São Paulo, Brazil. 71 pp. (Thesis; mimeo)

- Sambade A, Ambrós S, López C, Ruiz-Ruiz S, Hermoso de Mendoza A, Flores R, Guerri J et Moreno P (2007) Preferential accumulation of severe variants of *Citrus Tristeza Virus* in plants coinoculated with mild and severe variants. *Arch. Virology* **152**, 1115-1126.
- Saraoui N (2016) L'agrumiculture, stratégies de développement. *Journée nationale sur l'agrumiculture*. 02 Février 2016. Communication. Blida, Algérie.
- Satyanarayana T, Gowda S, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Rabindram R et Dawson WO (2002) The p23 protein of Citrus Tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation. *J. Virology* **76**, 473-483.
- Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Martí MR, Ayllón MA, Robertson C, Garnsey SM et Dawson WO (2000) Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* **278**, 253-265.
- Satyanayanana T, Gowda S, Ayllón MA et Dawson WO (2004) Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 799-804.
- Satyanayanana T, Gowda S, Boyko VP, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Navas-Castillo J, Karasev AV, Dolja V, Hilf ME, Lewandowsky DJ, Moreno P, Bar-Joseph M, Garnsey SM et Dawson WO (1999) An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7433-7438.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Towards writing the encyclopedia of life: An introduction to DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* **360**, 1805-1811.
- Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson SD, Jifon J et Louzada ES (2012) Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior of the Asian citrus psyllid. *Journal of Insect Behavior* **25**, 264-276.
- Shaposhnikov G, Kuznetsova V et Stekolshchikov A (1998) Evolutionary tendencies and systematic of Aphididae, pp. 481-487. In Nieto Nafria JM et Dixon AFG (eds.), *Aphids in natural and managed ecosystems*. University of Leon, Leon, Spain.
- Sharma P et Kobayashi T (2014). Are universal DNA primers really universal? *J appl Genetics*. DOI 10.1007/s13353-014-0218-9.

- Sharma SR (1989) Factors affecting vector transmission of citrus Tristeza virus in South Africa. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **144**, 283-294.
- Shigehara T et Takada H (2003) Changes in genotypic composition of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on tobacco during the past two decades. *Bull. Entomol. Res* **93**, 537-544.
- Shufran KA, Burd JD, Anstead JA et Lushai G (2000) Mitochondrial DNA sequence divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: evidence for host adapted races. *Insect Mol. Biol* **9**, 179-184.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H et Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am* **87**, 651-701.
- Slosser JE, Pinchak WE et Rummel DR (1989) A review of known and potential factors affecting the population dynamics of the cotton aphid. *Southwestern Entomologist* **14**, 302-313.
- Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W et Hebert PDN (2006) DNA barcodes reveal cryptic host specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3657-3662.
- Snoussi H (2013) Diversité génétique intra et interspécifique du porte-greffes d'Agrumes utilisés en Tunisie, Apport des marqueurs SSRs nucléaires, des InDel mitochondriaux et de la diversité allélique de gènes candidats pour la tolérance à la salinité. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. INAT, Tunis. 311p.
- Soroker V, Sadovsky A, Drishpon Y et Wise M (2009) Tristeza disease and its vectors in Israel: past and current status In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° B65, IAM-Bari. pp. 129-130.*
- SQNPI (2019) Norme eco-sostenibili par la difesa fitosanitaria e il controllo delle infestanti delle colture agrarie, Dipartimento agricoltura, sviluppo rurale ambientale, Sezione osservatorio fitosanitario, Regione Puglia, Bari. 293p
- Stern DL (1995) Phylogenetic evidence that aphids, rather than plants, determine gall morphology. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **260**, 85-89.

- Stoetzel Mb (1994) Aphids (Homoptera: Aphididae) of potential importance on citrus in the United States with illustrated keys to species. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **96**,74-90.
- Suastika G, Natsuaki T, Terui H, Kano T, Ieki H et Okuda S (2001) Nucleotide sequence of Citrus Tristeza virus seeding yellows isolate. *Journal of General Plant Pathology* **67**, 73-77.
- Swingle WT et Reece PC (1967) The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W *et aleds*. The citrus industry. Vol. 1. History, world distribution, botany and varieties. Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, pp. 190-430.
- Taabni M et El Jihad MI (2012) Eau et changement climatique au Maghreb : quelles stratégies d'adaptation ? *Les Cahiers d'Outre-Mer* **260**, 493-518
- Tamura K, Nei M and Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **101**, 11030-11035.
- Tanaka T (1961) Citrologia: semi centennial commemoration paperson citrus studies. Citrologia supporting fondation, Osaka, Japan 114p.
- Tatineni S, Robertson CJ, Garnsey SMet Dawson WO (2011) A plant virus evolved by acquiring Multiple non conserved genes to Extend its host range. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.* **108**, 17366-17371.
- Tian T, Rubio L, Yeh HH, Crawford B et Falk BW (1999) Lettuce infectious yellows virus: In vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly, Bemisia tabaci. *J. Gen. Virology* **80**, 1111-1117.
- Timmer LW, Garnsey SM et Graham JH (2000) Compendium of citrus diseases. St Paul, MN (États-Unis), APS Press. Pp.92.
- Tolkowsky S (1938) Hesperides: a History of the Culture and Use of Citrus Fruits. John Bale, Sons and CurnowLtd, London.
- Toxopeus HJ (1937) Stock-scion incompatibility in citrus and its cause. *Journal of Pomology and Horticultural Science* **14**, 360-364.

- Tremblay E, Barbagallo S, Micieli De Biase L, Monaco R et Ortu S (1978a). Sulla presenza in Italia del *Lysiphlebus Testaceipes* (Cr.) nemico naturale di Afidi dannosi agli Agrumi (Hym-Ichneum., Homopt.-Aphidoid). *Boll. Lab. Ent. Agr. "Fillipo silvestri"*, Portici **35**, 169-179.
- Tremblay E, Barbagallo S, Micieli De Biase L, Monaco R et Ortu S (1978b). Composizione dell'Entomofauna parassitica vivente a carico degli Aphidi degli Agrumi in Italia (Hym-Ichneum., Homopt.-Aphidoid). *Boll. Lab. Ent. Agr. "Fillipo silvestri"*, Portici **37**, 209-216.
- Turcinaviciene J, Rakauskas R et Pedersen BV (2006) Phylogenetic relationships in the "grossulariae" species group of the genus *Aphis* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae): molecular evidence. *European Journal of Entomology* **103**, 597-604.
- Valenzuela I, Hoffmann AA, Malipatil MB, Ridland PM et Weeks AR (2007) Identification of aphid species (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae) using a rapid polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method based on the cytochrome oxidase subunit I gene. *Aust. J. Entomol* **46**, 305-312.
- Van den Heuvel JFJM, Bruyere A, Hogenhout SA, Ziegler-Graff V, Brault V, Verbeek M, Van Der Wilk F et Richards K (1997) The N-terminal region of luteovirus readthrough domain determines binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol* **71**, 7258-7265.
- Van Vuuren SP, Collins RP et Da Graça JV (1993) Evaluation of Citrus Tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* **77**, 24-28.
- Vela C, Cambra M, Cortés E, Moreno P, Miguet SG, Pérez de San Román C et Sanz A (1986). Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for Citrus Tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virology* **67**, 91-96.
- Velazquez-Monreal JJ, Mathews DM et Dodds JA (2009) Segregation of distinct variants from Citrus Tristeza virus isolate SY568 using aphid transmission. *Phytopathology* **99**, 1168-1176.
- Vives MC, Rubio L, López C, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Dawson WO, Guerri J, Flores R et Moreno P (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild Citrus Tristeza virus isolate. *J. Gen. Virology* **80**, 811-816.
- Vives MC, Rubio L, Sambade A, Mirkov TE, Moreno P et Guerri J (2005) Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus Tristeza Virus*

- isolate. *Virology* **331**, 232-237.
- Von Dohlen CD, Rowe A et OE et Heie (2006). A test of morphological hypotheses for tribal and subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Hemiptera: Aphididae) using DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol* **38**, 316-329.
- Wang J, Bozan O, Kwon SJ, Dang T, Rucker T, Yokomi RK, Lee RF, Folimonova SY, Krueger RR, Bash J, Greer G, Diaz J, Serna R et Vidalakis G (2013) Past and future of a century old Citrus Tristeza virus collection. A California citrus germplasm tale. *Journal Front Microbiol* **4**, 366.
- Wang JF, Jiang LY et Qia GX (2011) Use of mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe, Aphidina. *ZooKeys* **122**, 1-17.
- Wang KY, Liu TX, Yu CH, Jiang XY et Yi MQ (2002) Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxication enzymes on cotton and cucumber. *J. Econ. Entomol* **95**, 407-413.
- Wang L, Zhang S, Luo JY, Wang CY, Lu LM et Zhu XZ (2016) Identification of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) Biotypes from Different Host Plants in North China. PLoS ONE. **11** (1), e0146345.
- Weathers LG et Hartung MK (1964) Transmission of citrus viruses by dodder, *Cuscuta subinclusa*. *Plant Disease Report* **48**, 102-103.
- Webber HJ (1943) The "Tristeza" disease of sour orange rootstock. *Proc. Amer. Soc. for Hort. Sci* **43**, 160-168.
- Webber HJ (1967) History and development of the citrus industry. In: The citrus industry.1. Reuther W et al (eds.), Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, pp. 1-39.
- Weber G (1985) On the ecological genetics of *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera: Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **100**, 100-110.
- Wellings PW (1994) How variables rates of colonization? *European Journal of Entomology* **91**, 121-125.
- Woolston CJ, Czaplewski LG, Markham PG, Goad AS, Hull R et Davies JW (1987) Location and sequence of a region of cauliflower mosaic virus gene II responsible for aphid transmissibility. *Virology* **160**, 246-251.

- Yahiaoui D (2010) Assessment of genetic diversity of Mediterranean Citrus Tristeza Virus (CTV) isolates and genomic RNA variability associated to their vector transmission. PhD thesis, university of Catania, department of science and phytosanitary technologies, section of plant protection, pp.139.
- Yahiaoui D, Djelouah K, D'Onghia AM et Catara A (2015) Effects of aphid transmission on the structure of a mild and a severe citrus Tristeza virus population from Italy. *Acta horticulturae* **1065**, 791-798.
- Yang G, Che X, Golfman R, Ben Shalom Y, Piestun D, Gafny R, Mawassi M. et Bar- Joseph, M (1999) D-RNA molecules associated with subisolates of the VT strain of citrus Tristeza virus which induce different seedling-yellowings reactions. *Virus Genes* **19**, 5-13.
- Yang ZN, Ye XR., Molina J, Roose ML et Mirkov TE (2003) Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the Citrus Tristeza virus resistance gene (ctv) locus in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Physiology* **131**, 482-492.
- Yokomi RK (1992) Potential for biological control of *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy). In "Citrus Tristeza Virus and *Toxoptera citricidus* in Central America: Development of Management Strategies and the Use of Biotechnology for Control" pp. 194-198. CATIE- University of Florida- INIFAP/SAH-Universidad de Central de Venezuela-USDA, Maracay, Venezuela.
- Yokomi RK, Selvaraj V, Maheshwari Y, Chiumenti M, Saponari M, Giampetruzzi A, Weng Z, Xiong Z et Hajeri S (2018) Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus Tristeza virus in California. *Archives of Virology* **163** (7), 1795-1804.
- Yokomi RK (2009a) *Citrus Tristeza Virus*. In: In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° B65, IAM-Bari. pp. 19-33.*
- Yokomi RK (2009b) The brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean, Options Méditerranéennes. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° B65, IAM-Bari. pp. 35-46.*
- Yokomi RK (2009c) Natural spread of severe citrus Tristeza virus isolates in citrus pre-infected with mild CTV isolates. Proc. 11th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, pp. 86-92.

- Yokomi RK et DeBorde RL (2005) Incidence, transmissibility, and genotype analysis of Citrus Tristeza virus (CTV) isolates from CTV eradicated and non-eradicated districts in central California. *Plant Dis* **89**, 859-866.
- Yokomi RK et Garnsey SM (1987) Transmission of Citrus Tristeza virus by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica* **19**, 169-172.
- Yokomi RK, et Damsteegt VC (1991) Comparison of citrus Tristeza virus transmission efficacy by *Toxoptera citricidus* and *Aphis gossypii*. In: *Proceedings, Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules*, (Peters DC, Webster JA et Choubler CS Eds.), pp. 229-241. Stillwater, UK.
- Yokomi RK, Garnsey SM, Civerolo EL. and Gumpf DJ (1989) Transmission of exotic Citrus Tristeza Virus isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease* **73**, 552-556.
- Yokomi RK, Lastra R, Stoetzel MB, Damstreet VD, Lee RF, Garnsey SM, Rocha-Pena MA et Niblett, CL (1994) Establishment of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: aphididae) in Central America and the Caribbean Basin, and its transmission of Citrus Tristeza virus. *J. Econ. Entomol* **87**, 1078-1085.
- Yokomi RK, Selvaraj V, Maheshwari Y, Saponari M, Giampetruzzi A, Chiumenti M, Hajeri S (2017). Identification and characterization of citrus Tristeza virus isolates breaking resistance-in trifoliate orange in California. *Phytopathology* **107**, 901-908.
- Yoshida T (1985) Inheritance of susceptibility to Citrus Tristeza virus in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Bulletin of Fruit Tree Research Station*, 12: 17-25.
- Yoshida T (1993) Inheritance of immunity to Citrus Tristeza virus of trifoliate orange in some citrus intergeneric hybrids. *Bull. Fruit Tree Res. Station* **25**, 33-43.
- Yoshida T (1996) Graft compatibility of Citrus with plants in the Aurantioideae and their susceptibility to Citrus Tristeza virus. *Plant Disease* **80**, 414-417.
- Zekri M (1993) Salinity and calcium effects on emergence, growth and mineral composition of seedlings of eight citrus rootstocks. *J. Hort. Sci* **68**, 53-62.
- Zekri M et Al-Jaleel A (2004) Evaluation of rootstocks for Valencia and Navel orange trees in Saudi Arabia. *Fruits* **59**, 91-100.
- Zekri M et Parsons LR (1989) Growth and root hydraulic conductivity of several citrus rootstocks under

- salt and polyethylene glycol stresses. *Physiol. Plant* **77**, 99-106.
- Zekri S et Laajimi A (2001) Etude de la compétitivité du sous-secteur agrumicole en Tunisie. In Laajimi A. (ed.), Arfa L. (ed.). *Le futur des échanges agro-alimentaires dans le bassin méditerranéen : les enjeux de la mondialisation et les défis de la compétitivité*. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, pp. 9-16.
- Zemzami M, Benali D, Moukhtari A et Soulaymani A (2009a) Historical review of Citrus Tristeza in Morocco. In : D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry*, *Options Méditerranéennes*. Série B : Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° **B65**, IAM-Bari. pp. 95-101
- Zemzami M, Daden M, Djelouah K, Frasheri D, Soulaymani A et D'Onghia AM (2009b) Serological characterization of a collection of Mediterranean citrus Tristeza virus (CTV) isolates. In: D'Onghia AM, Djelouah K et Roistacher CN (eds). *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus*, *Options Méditerranéennes*. Série B: Studies and Research, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, N° **B65**, IAM-Bari. pp.147-151.
- Zemzami M, Soares CM, Bailey AM, Niblett CL et Nolasco G (2002) Molecular characterization and classification of Moroccan isolates of Citrus Tristeza closterovirus. In JVDa Graça, N Duran & RG Milne (Eds.), *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)* (pp. 8-12). Riverside.
- Zhang DX et GM Hewitt (1997a) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol* **25**, 99-120.
- Zhang DX et Hewitt GM (1997b) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol. Biol* **6**, 143-150.
- Zhang S, Luo JY, Wang CY, Lu LM, Li CH et Jiang WL (2014) Complete mitochondrial genome of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Mitochondrial DNA*, 1-2.

## Annexes

### Annexe 1. Milieu de montage pour pucerons

(Heikinheimo, 1988)

Polyvinyl alcohol chips "Mowiol N 4-98"	<b>25g</b>
Polyvinyl alcohol chips "Mowiol N 56-98"	<b>5g</b>
Eau distillé	<b>105 ml</b>
96% ethanol	<b>30 ml</b>
Acide lactique (pure)	<b>105 ml</b>

**Annexe 2.** Tampon d'extraction des acides nucléiques totaux (Dellaporta, 1983)

	Concentration (mM)		Volume (ml)		Note
	Stock	Final	Stock	Final	
<b>TRIS</b>	1000	100	20	200	Mix et ajuste le PH=8
<b>EDTA</b>	500	8.5	3.4	200	
<b>NACL</b>	4000	500	25	200	

	concentration	note
<b>SDS</b>	20%	diluer 1/5 avec de H2O distillé
<b>KOAc</b>	5M	Ajouter 4.9g à 10ml de H2O distillé

**Annexe 3.** Composition des Tampons TE, TAE et gel d'agarose**Tampon TE**

	concentration (mM)		Volume (ml)		note
	Stock	Final	Stock	Final	
<b>TRIS</b>	1000	10	2	200	Mix et ajuste le PH=8
<b>EDTA</b>	500	1	0.4	200	

**Tampons et gels utilisés en électrophorèse****Tampon TAE**

composant	quantité	note
<b>TRIS base</b>	48.4g	dissoudre Tris, AAG et EDTA dans 800ml d'eau distillé puis diluer jusqu'à 1L bouillir
<b>Acide acétique glacial</b>	11.4ml	
<b>EDTA</b>	3.7g	
<b>H2O distillé</b>		

**Gel d'agarose**

	H2O distillé	90 ml	
<b>1% gel d'agarose</b>	TAE 10x	10 ml	Bouillir quelques secondes
	Agarose	1 g	

**Annexe 4.** Tampons utilisés dans les tests sérologiques : DAS-ELISA et DTBA

(Clark et Bar-Joseph, 1984)

Buffer	Composants	Proportions	Notes
<b>Phosphatebuffer saline(PBS)1X; pH7.4</b>	NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaN <sub>3</sub> KCl	8,0g 0,20g 1,15g 0,20g 0,20g	Dissolution dans 1 litre d'eau distillé
<b>Tampon de lavage(W.B);pH7.4</b>	PBS(1X) Tween-20	1l 0,5ml	
<b>Tampon d'extraction (E.B);pH7.4</b>	Polyvinilpirolidone Tween-20	20,0g 0,5ml	Dissolution dans 1 litre de PBS(1X).
<b>Tampon de coating(C.B);pH9.6</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> NaN <sub>3</sub> NaHCO <sub>3</sub>	1,59g 2,93g 0,20g	Dissolution dans 1 litre d'eau distillé
<b>Tampon de conjugué(C.B);pH7.4</b>	Polyvinilpirolidone Tween-20 Bovineserumalbumin (BSA)	20,0g 0,5ml 2,0g	Dissolution dans 1 litre de PBS (1X).
<b>Tampon(S.B); pH9.8</b>	Diethanolamine NaN <sub>3</sub>	97 ml 0,20g	Dissolution dans 1 litre d'eau distillé

**Annexe 4.** Séquences FASTA du Fragment mtCOI (709pb) des populations d'*Aphis gossypii*, *A spiraeicola* et *Pterochloroides persicae*

AsCITR\_CLONE2

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATCTTAATATAATAACAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAACGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGTATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

AsCITR\_CLONE7

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATCTTAATATAATAACAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAACGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGTATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

AsCITR\_Clone8

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATCTTAATATAATAACAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAACGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGTATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AsHIBI\_Clone1

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATCTTAATATAATAACAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGTATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AgHIBI\_Clone2

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT
AATTTTTTTTATAACTATAACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAGTAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AgHIBI\_Clone4

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT
AATTTTTTTTATAACTATAACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AgHIBI2\_CLONE2

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT
AATTTTTTTTATAACTATAACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AgHIBI2-CLONE2

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGATTCTTCTCTTAGAATTTTA
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT
AATTTTTTTTATAACTATAACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

## &gt;AgHIBI\_CLONE1

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATAACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATC  
AAATTCCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGTCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

## &gt;AsPOIV\_CLONE2

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT  
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACTATAACCAATTGTAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT  
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC  
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTTGATTAACCATCTTTCTCTTC  
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCCTAATAATAATACCAAACAATATAAAAATTAAT  
CAAATCCCACTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGTCTATTACTATA  
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT  
TTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

## &gt;&gt;AsPOIV\_CLONE3

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT  
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACTATAACCAATTGTAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT  
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC  
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTTGATTAACCATCTTTCTCTTC  
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCCTAATAATAATACCAAACAATATAAAAATTAAT  
CAAATCCCACTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGTCTATTACTATA  
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT  
TTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

## &gt;&gt;AsPOIV\_CLONE27

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT  
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACTATAACCAATTGTAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT  
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCAATTAATAATGGAAC  
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTTGATTAACCATCTTTCTCTTC  
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCCTAATAATAATACCAAACAATATAAAAATTAAT  
CAAATCCCACTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGTCTATTACTATA  
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT  
TTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

## &gt;SAM Ps\_clone6

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTATATTTTTATTTTTGGTATTTGAACTGGAATAAATTGGATCATCACTTAGAATCTT  
AATTCGATTAGAATTAAGACAAATTAATTCAATTATCAATAATAATCAATTATATAATGTTATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACAATACCAATTGTTATTGGAGGCTTTGGAAATTGATTAATTCCTCTTATAATAGGAACCTCTGATATAGCA

TTCCACGACTTAATAATATTAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCATTAATAATAATAATTTGTAGATTATAATTAATAACGGTAC  
AGGTACAGGATGAACTATTTACCCCTTTATCTAATAATATTGCACACAATAACATCTCAGTAGATTAACTATTTTTCTTTAC  
ATTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATCAATTTTATCTGTACAATTCTGAATATAATACCTAATAATATAAACTAAAT  
CAAATTCCTTTATTTCCCTGATCAATTTTAATTACTGCTATTTTATTAATTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATA  
TTATTAACAGATCGTAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCATCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATT  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTA

>SAM Ps\_clone7

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAECTCTATTTTTATTTTTGGTATTTGAACTGGAATAATTGGATCATCACTTAGAATCTT  
AATTCGATTAGAATTAAGACAAATTAATTCAATTATCAATAATAATCAATTATATAATGTTATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACAATACCAATTGTTATTGGAGGCTTTGGAAATTGATTAATTCCTCTTATAATAGGAACTCCTGATATAGCA  
TTCCACGACTTAATAATATTAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCATTAATAATAATAATTTGTAGATTATAATTAATAACGGTAC  
AGGTACAGGATGAACTATTTACCCCTTTATCTAATAATATTGCACACAATAACATTTTCAGTAGATTAACTATTTTTCTTTAC  
ATTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATCAATTTTATCTGTACAATTCTGAATATAATACCTAATAATATAAACTAAAT  
CAAATTCCTTTATTTCCCTGATCAATTTTAATTACTGCTATTTTATTAATTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATA  
TTATTAACAGATCGTAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCATCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATT  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTA

>SAM Ps\_clone8

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAECTCTATTTTTATTTTTGGTATTTGAACTGGAATAATTGGATCATCACTTAGAATCTT  
AATTCGATTAGAATTAAGACAAATTAATTCAATTATCAATAATAATCAATTATATAATGTTATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACAATACCAATTGTTATTGGAGGCTTTGGAAATTGATTAATTCCTCTTATAATAGGAACTCCTGATATAGCA  
TTCCACGACTTAATAATATTAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCATTAATAATAATAATTTGTAGATTATAATTAATAACGGTAC  
AGGTACAGGATGAACTATTTACCCCTTTATCTAATAATATTGCACACAATAACATTTTCAGTAGATTAACTATTTTTCTTTAC  
ATTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATCAATTTTATCTGTACAATTCTGAATATAATACCTAATAATATAAACTAAAT  
CAAATTCCTTTATTTCCCTGATCAATTTTAATTACTGCTATTTTATTAATTTTATCTTTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACAATA  
TTATTAACAGATCGTAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCATCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATT  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTA

>AsPOMM\_CLONE1

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAECTTATTTTTATTTTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT  
GATTCGATTAGAATAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT  
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAATAATTTGTAGATTATAATTAATAATGGAAC  
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTAACCATCTTTCTCTTC  
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCTTAATATAATACCAAACAATATAAAATTAAT  
CAAATCCCACTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA  
TTATTAACTGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCCTTATCAACACTTATTTTGATT  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTA

>AsPOMM\_CLONE3

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAECTTATTTTTATTTTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT  
GATTCGATTAGAATAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT  
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAATAATTTGTAGATTATAATTAATAATGGAAC  
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTAACCATCTTTCTCTTC  
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCTTAATATAATACCAAACAATATAAAATTAAT  
CAAATCCCACTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTA

TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGGAT  
TTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AsPOMM\_CLONE8

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT  
GATTCGATTAGAATAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA  
TAATTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT  
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGTAGATTCATAATTAATAATGGAAC  
AGGAACAGGATGAACTATTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTTGATTAACCATCTTTCTCTTC  
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATCTTAATAATAACCAACAATATAAAATTAAT  
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGTACTATA  
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGGAT  
TTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgPOMM\_CLONE18

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCAGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgPOMM\_CLONE20

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCAGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGGATT  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgPOMM\_CLONE22

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCAGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGGATT  
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AsCITR\_CLONE2

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCATAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCCTAATATAAGTACCAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGTCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AsCITR\_CLONE5

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCATAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCCTAATATAATACCAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGTCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AsCITR\_CLONE8

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGAATAATTGGATCTTCACTTAGAATTTT
GATTCGATTAGAACTAAGTCAAATCAATTCAATTATCAATAATAACCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTA
TAATTTTTTTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGTGGATTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCT
TTCCACGATTAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGTAGATTCATAATTAATAATGGAAC
AGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
ACTTAGCAGGTATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATTCCTAATATAATACCAAACAATATAAAATTAAT
CAAATCCCCTATTTCCATGATCAATCTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCTCTACCAGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAAGTATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGTCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGAT
TTTTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AgCITR\_CLONE3

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT
AATTTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTTGATTTAACCATCTTTCTCTTC
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC
AAATTCCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGTCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACACTTATTTTGATTTT
TTGGTCACCCTGAAGTTTA
```

>AgCITR\_clone6

```
GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT
AATTTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT
```

TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgCITR\_clone9

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgCOUR\_CLONE2

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAATA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgCOUR\_CLONE7

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgCOUR\_CLONE8

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgPOIV\_CLONE1

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGANCNGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgPOIV\_CLONE9

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

>AgPOIV\_CLONE12

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGTCTTCTCTTAGAATTTTA  
ATCCGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTAT  
AATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTT  
TTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACA  
GGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACA  
TTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATC  
AAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATAT  
TATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCCAGCAGGTGGGGGAGACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATT  
TTTGGTCACCCTGAAGTTTA

**Annexe 5.** Séquences FASTA de nucléotides du gène CP (671pb) des isolats locaux de CTV

>SY-1-ALG T36 CP \_ CLONE 2

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTT
TCGGCTCCGTAACACTTACACATCGATCAGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTT
TGAACAGGGACTTGTTCCTTGCTCTGAAAGGGAAGTATCCTAACTTGCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATAGCTATGATGT
TATACCGCTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAA
GTAGATTTGTCTGACAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGG
GGTAGAACTAACGATGCTCTTACTTAGCCTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG
GATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGACAGATTTCTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACA
AGCTAAAGAACAATTGCTGAAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACA
CGTTG
```

> SY-1-ALG T36 CP \_ CLONE 6

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCT
TTCGGTCTGTAACTTACACATCGATCCGACTCTGATAGCGATGAACGATGTGCGTCGGTTGGGTACCCAACAGAATGCCGCT
TTGAACAGAGATTTGTTCTTACTTTGAAAGAGAAGTATCCTAATTTGTCTGATAAAGATAAAGGACTTTCACCTAGCTATGATGT
TGTATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGCGATGACGACACTACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTCGAA
GTGGATTTGTCTGACAACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATTCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTAACGCCCTTCGAGTCTGG
GGTAGGACTAACGATGCCCTTTATTTAGCCTTTGTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG
GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTAGATTTCTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAGTGTGCTGTGTACATACA
AGCTAAAGAACAATTGTTGAAGAAGCGGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACA
CGTTG
```

> PL-6-ALG T36 CP \_ CLONE 7

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTT
TCGGCTCCGTAACACTTACACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTT
TGAACAGGGACTTGTTCCTTGCTCTGAAAGGGAAGTATCCTAACTTGCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATAGCTATGATGT
TATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGATGACTCCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAA
GTAGATTTGCCTGACAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGG
GGTAGAACTAACGATGCTCTTACTTAGCCTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG
GATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGACAGATTTCTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACA
AGCTAAAGAACAATTGCTGAAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACA
CGTTGAAA
```

> PL-6-ALG T36 CP \_ CLONE 21

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTT
TCGGCTCCGTAACACTTACACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTT
TGAACAGGGACTTGTTCCTTGCTCTGAAAGGGAAGTATCCTAACTTGCTGACAAAGATAAAGGACTTTCACATAGCTATGATGT
TATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAA
GTAGATTTGTCTGACAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGG
GGTAGAACTAACGATGCTCTTACTTAGCCTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG
GATTCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGACAGATTTCTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACA
AGCTAAAGAACAATTGCTGAAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACA
CGTTG
```

> PC-3-ALG T36 CP \_ CLONE 4

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTT
TCGGTCCGTAACCTTACACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTT
TGAACAGGGACTTATTTCTTGCTCTGAAAGGGAAGTATCCTAACTTGCTGACAAAGATAAGGACTTTACATAGCTATGATGT
TATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAA
GTAGATTTGTCTGACAAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGG
GGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCGCTAGATGCAGG
GATCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACA
AGCTAAAGAACAATTGTTGAAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACA
CGTTG
```

> PC-3-ALG T36 CP \_ CLONE 5

```
ATGGACGACGAAACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGAAGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTT
TCGGTCCGTAACCTTACACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACTCAACAGAATGCTGCTT
TGAACAGGGACTTGTCTTGCTCTGAAAGGGAAGTATCCTAACTTGCTGACAAAGATAAGGACTTTACATAGCTATGATGT
TATACCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCATTGCAAAGTGATGATGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAA
GTAGATTTGTCTGACAAACTTTGGACCGACATCGTGTATAATTCTAAGGGTATTGGTAACCGAACTAACGCCCTTCGAGTCTGG
GGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTTGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCGCTAGATGCAGG
GATCCGGCTGGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACA
AGCTAAAGAACAATTGCTGAAAAAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATTCAACACA
CGTTG
```

**Annexe 6.** Séquences FASTA de nucléotides du marqueur VTPOL (695pb) des isolats locaux de CTV

>NN-2-ALG VTPOL\_ CLONE4

```
GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACAGGCTGATAGTTTGTTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGATTTTTCGCCGTAGAACCTGCCATCGTAAGT
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGGCTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATT
TCTCGTTGTATTTCTTTTGTCTTAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGAC
TCATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAATCGTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTT
TGCGATTTCGATAAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTTCGGGCGTTTGTAGTGGTGACGTCGCTAGCG
AACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTCTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGG
TTTGTTTCGTTCTTCTTCTTTAGAGCTGTTTCGGAAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG
```

>NN-2-ALG VTPOL\_ CLONE5

```
GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACAGGCTGATAGTTTGTTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGATTTTTCGCCGTAGAACCTGCCATCGTAAGT
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGACTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATT
TCTCGTTGTATTTCTTTTGTCTTAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGAC
TCATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAACCCTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTT
TGCGATTTCGATAAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTTCGGGCGTTTGTAGTGGTGACGTCGCTAGCG
AACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTCTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGG
TTTGTTTCGTTCTTCTTCTTTAGAGCTGTTTCGGAAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG
```

>NN-2-ALG VTPOL\_ CLONE 6

```
GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACAGGCTGATAGTTTGTTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGATTTTTCGCCGAAGAACCTGCCATCGTAAGT
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGACTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATTT
CTCGTTGTATTTCTTTTGTCTTAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGACT
CATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAATCGTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTTT
GCGATTTCGATAAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTTCGGGCGTTTGTAGTGGTGACGTCGCTAGCGA
ACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTCTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGG
TTGTTTCGTTCTTCTTCTTTAGAGCTGTTTCGGAAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG
```

>PC-3-ALG VTPOL\_ CLONE 5

```
GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACAGGCTGATAGTTTGTTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGATTTTTCGCCGTAGAACCTGCCATCGTAAGT
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGGCTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATT
TCTCGTTGTATTTCTTTTGTCTTAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGAC
TCATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAATCGTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTT
TGCGATTTCGATAAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTTCGGGCGTTTGTAGTGGTGACGTCGCTAGCG
AACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTCTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGG
TTTGTTTCGTTCTTCTTCTTTAGAGCTGTTTCGGAAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG
```

>PC-3-ALG VTPOL\_ CLONE2

```
GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACAGGCTGATAGTTTGTTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGATTTTTCGCCGTAGAACCTGCCATCGTAAGT
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGGCTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATT
TCTCGTTGTATTTCTTTTGTCTTAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGAC
TCATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAATCGTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTT
```

TGCGATTGCGATAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTCGGGCGTTTGTTAGTGGTGACGTCGCTAGCG  
AACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTCTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGG  
TTTGTTGCTCTTCTTCTTTAGAGCTGTTTCGGAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT  
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG

>SY-1-ALG VTPOL\_CLONE 6

GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACGGGCTGATAGTTTGTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG  
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGATTTTTCGCCGTAGAACCTGCCATCGTAAGT  
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGACTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTCGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATTT  
CTCGTTGTATTTCTTTTTGCTTAAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGACT  
CATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAATCGTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTTT  
GTGATTCGATAAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTCAGGCGTTGTTAGTGGTGACGTCGCTAGCGA  
ACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTTTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGGT  
TTGTTGCTCTTCTTCTTTAGAGCTGTATCGGAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT  
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG

>SY-1-ALG VTPOL\_CLONE 1

GACGCTAGCGATGGTCAAGCCGATGACTTAGCGACAGGCTGATAGTTTGTTCAGTTCTCGCTGAGAGCTAACATAGGTAGTTG  
AGTCGAGATGTTTGCCTTCGCGAGCGAAAACCAAGACATATTAGAAGAAAAGGATTTTTCGCCGTAGAACCTGCCATCGTAAGT  
ATTTGGATGACGTGGTTAGGGACTTTACCATTGATATTGGTTATGATACTGTCGATCGTGATCCTACGGTATTGGCTGATTATTT  
CTCGTTGTATTTCTTTTTGCTTAAACAATGATAACATTGGGCCTTTAGCAGCTTCGATTATAGTAAGCCCACCAGTAAGCGGGACT  
CATAAAATTCGAGCGCACATCGATAATCAACCGAATCGTGAAGGAAACGTTACTTACGTTAAGACTGTTGATAAGAGTCGTTTT  
GTGATTCGATAAAAAGCGATGCCAGCTTCTATGAGAGGCCACTACTCCTTTCAGGCGTTGTTAGTGGTGACGTCGCTAGCGA  
ACGTAGTGAGTTTATATGCAGTTTTGTTGGTAGTAGGTTTCTTTGTTGTTGCACACAAACAATATCCGAAAATTTGAACAAGGT  
TTGTTGCTCTTCTTCTTTAGAGCTGTTTCGGAACTGCTACTAATGAGTTTTCTGTTGTGACTGATGATGTAGAAGACGTT  
AAGTACGTAAGAAAGCGAGCCGAG

**Annexe 7.** Séquences FASTA de nucléotides du marqueur T30POL (696pb) des isolats locaux de CTV

>CP-3-ALG T30POL \_CLONE1

```
GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTTC AATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT
ATTTTCGATGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAAACAACGATAACGTTGGGCCTTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCC GCCGTTAACGGGAC
TTATAAAATTCGAGCGCACGTCGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAACTATCGATAAGAGTCGTTT
TGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTC ACTAGCGA
ACGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTGCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGGT
TTGTTCTGCTTCTTTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGTT
AAGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG
```

>CP-3-ALG T30POL \_CLONE 2

```
GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTTC AATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT
ATTTTCGATGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAAACAACGATAACGTTGGGCCTTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCC GCCGTTAACGGGAC
TTATAAAATTCGAGCGCACGTCGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAACTATCGATAAGAGTCGTTT
TGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTC ACTAGCGA
ACGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTGCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGGT
TTGTTCTGCTTCTTTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGTT
AAGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG
```

>CP-3-ALG T30POL \_CLONE 3

```
GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTTC AATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT
ATTTTCGATGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAAACAACGATAACGTTGGGCCTTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCC GCCGTTAACGGGACTT
ATAAAATTCGAGCGCACGTCGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAACTACCGATAAGAGTCGTTTTT
GCGATTCTCATAAAGGCAGTCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTC ACTAGCGAA
CGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTGCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGGT
TGTTCTGCTTCTTTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGTTA
AGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG
```

>PL-6-ALG T30POL \_CLONE4

```
GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTTC AATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT
ATTTTCGATGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAAACAACGATAACGTTGGGCCTTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCC GCCGTTAACGGGAC
TCATAAAATTCGAGCGCACGTCGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAACTGTGATAAGAGTCGTT
TTGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTC ACTAGCG
AACGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTGCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGG
TTTGTTCGCTTCTTTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGT
TAAGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG
```

>PL-6-ALG T30POL \_CLONE 4

```
GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTTC AATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT
ATTTTCGATGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAAACAACGATAACGTTGGGCCTTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCC GCCGTTAACGGGAC
TCATAAAATTCGAGCGCACGTCGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAACTGTGATAAGAGTCGTT
TTGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTC ACTAGCG
```

TTGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTCAGCTAGCG  
AACGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGG  
TTTGTTTCGTTCTTTCTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGT  
TAAGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG

>PL-6-ALG T30POL \_CLONE 5

GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTCAATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG  
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT  
ATTTTCGATGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT  
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAACAACGATAACGTTGGGCCTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCCGCCGTTAACGGGAC  
TCATAAAATTCGAGCGCACGTGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAAACTGTGATAAGAGTCGTT  
TTGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTCAGCTAGCG  
AACGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGG  
TTTGTTTCGCTTTCTTTCTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGT  
TAAGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG

>PL-6-ALG T30POL \_CLONE 6

GATGCTAGCGATGGTCAAATGGACGACTTGATGACTGGTTGATCGTTTGTCAATTCTCGCTGAGAGCCAACGTTGGTAGTTG  
AGTCGAGATGTTTCTTTTCGCGAGCGAAAATCAAGACTTATTAGAAGAAAAGATATTTTCGTCGTAGAACGTACCATCGTAAGT  
ATTTTCGACGATGTGGTTAGGGATTTTACTATCGATGTTGGTTACGATATTGTTGATCGTGACCCTACGGTATTGGCTGACTATTT  
CTCGTTATATTTCTTTCTGCTTAACAACGATAACGTTGGGCCTTAGCGGCTTCAATTGTGGTGAGCCCGCCGTTAACGGGAC  
TCATAAAATTCGAGCGCACGTGATAATCAACCAAATTGCGAAGGAAACGTGACTTACATTA AAAACTGTGATAAGAGTCGTT  
TTGCGATTCTCATAAAGGCAGTCCCGGCTCCTATGAGAGGTTACTACTCTTTTCGGGCGTTTCTTGCCGCTGATGTCAGCTAGCG  
AACGCAGTGAATTCATATGCAGTTTTGTCGGTAGTAGATTCTTTGTTGTTGTACGCAAACGATATCCGAAAATTTGAGTAAGG  
TTTGTTTCGTTCTTTCTCTTTTAGAGCTGTCTCAAAAACCGCAATTAACGAGTTTTCTGTTGCGATTGATGATGTGGAAGACGT  
TAAGTATGTGAGAAAGCGAGCTGAG

Annexe 8. Comparaison de séquences CP des trois isolats de CTV locaux et les séquences d'isolats de référence

	1	50
PC-3-ALG	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
FN661497.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
GQ424348.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
FN661494.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
HF947334.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
Y18420.1_T	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAATGAAAGA	
KU578007.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAATGAAAGA	
HF947337.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
EU937520.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
PL-6-ALG	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
SY-1-ALG	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
FN552118.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
FN552118.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
U56902.1_V	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
KU361339.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
EU857538.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAATGAAAGA	
DQ151548.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
AF001623.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
JQ965169.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
AB046398.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
KC525952.1	ATGGACGACGAGACAAAGAAATTTAAGAACAAAAACAAGGAGACGAAAGA	
AY170468.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACAAAAGA	
AY340974.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACAAAAGA	
DQ272579.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACAAAAGA	
KU589212.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
FJ525432.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
GQ454870.1	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACGAAAGA	
Consensus	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTTGAAGAACAAAAACAAGGAAACgAAAGA	
	51	100
PC-3-ALG	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
FN661497.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
GQ424348.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
FN661494.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
HF947334.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
Y18420.1_T	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
KU578007.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
HF947337.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
EU937520.1	AGGCGACGAA GTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
PL-6-ALG	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	
SY-1-ALG	AGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCT GTAAACTTAC	
FN552118.1	AGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCT GTAAACTTAC	
FN552118.1	AGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCT GTAAACTTAC	
U56902.1_V	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCT GTAAACTTAC	
KU361339.1	AGGCGACAATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCT GTAAACTTAC	
EU857538.1	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCT GTAAACTTAC	
DQ151548.1	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCC TTAACACTTAC	
AF001623.1	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCC TTAACACTTAC	
JQ965169.1	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCC TTAACACTTAC	
AB046398.1	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGGAGTCTTCTTTTCGGTTCC TTAACACTTAC	
KC525952.1	AGGCGACGATGTTGTTGCAGCGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTGAACACTTAC	
AY170468.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCCGAGTCTTCTTTTCAGTTCCGTAAACTTAC	
AY340974.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCCGAGTCTTCTTTTCAGTTCCGTAAACTTAC	
DQ272579.1	AGGCGACGATGTTGTTGCTGCCGAGTCTTCTTTTCAGTTCCGTAAACTTAC	
KU589212.1	TGGCGACGAC GTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCC ATAAACTTAC	
FJ525432.1	AGGCGACGAC GTTGTTGCCGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCC TTAACACTTAC	
GQ454870.1	AGGTGACGATGTTGTTGCAGCTGAGTCTTCTTTTCGGTTCCGTAAACTTAC	

Consensus AGGCGACgAtGTTGTTGC.GC.GAGTCTTCTTTTCgGTTTCgTAAACTTAC

	101	150
PC-3-ALG	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
FN661497.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
GQ424348.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
FN661494.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
HF947334.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
Y18420.1_T	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
KU578007.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
HF947337.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
EU937520.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
PL-6-ALG	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACT	
SY-1-ALG	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCG GTTGGGTACC	
FN552118.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCG GTTGGGTACC	
FN552118.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCG GTTGGGTACC	
U56902.1_V	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCG GTTGGGTACC	
KU361339.1	ACATCGATCCGACTCTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACC	
EU857538.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACC	
DQ151548.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTAAGTACC	
AF001623.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGACGTGCGTCAGTTAGGTACC	
JQ965169.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTAGGTACC	
AB046398.1	ACATCGATCCGACTCTAATA GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTAGGTACC	
KC525952.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGAACC	
AY170468.1	ACATCGATCCGACTTTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACC	
AY340974.1	ACATCGATCCGACTTTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACC	
DQ272579.1	ACATCGATCCGACTTTGATAACGATGAACGATGTGCGTCAGTTGAGTACC	
KU589212.1	ACATCGATCC AACTTTGATA GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACC	
FJ525432.1	ACATCGATCC AACTCTGATA GCGATGAATGACGTGCGTCAGTTGGGTACC	
GQ454870.1	ACATCGATCCGACTCTGATA GCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGGGTACC	
Consensus	ACATCGATCCGACTcTGATAaCGATGAACGAtGTGCGTCaGTTgaGTACC	

	151	200
PC-3-ALG	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
FN661497.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
GQ424348.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
FN661494.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
HF947334.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
Y18420.1_T	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
KU578007.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
HF947337.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
EU937520.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTTA TTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
PL-6-ALG	CAACAGAA TGCTGCTTTGAACAGGGACTT GTTTCTTGCTC TGAAAGGGAA	
SY-1-ALG	CAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAA	
FN552118.1	CAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAA	
FN552118.1	CAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAA	
U56902.1_V	CAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAA	
KU361339.1	CAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGAGAA	
EU857538.1	CAACAGAA TGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
DQ151548.1	CAACAGAA CGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
AF001623.1	CAACAGAA CGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
JQ965169.1	CAACAGAA CGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
AB046398.1	CAACAGAA CGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
KC525952.1	CAACAGAA CGCCGCTTTGAACAGAGATTTGTTTCTTACTC TGAAAGGGAA	
AY170468.1	CAACAGAA CGCTGCTTTGAACAGAGACTTA TTCCTTACTTTGAAAGGGAA	
AY340974.1	CAACAGAA CGCTGCTTTGAACAGAGACTTA TTCCTTACTTTGAAAGGGAA	
DQ272579.1	CAACAGAA CGCTGCTTTGAACAGAGACTTA TTCCTTACTTTGAAAGGGAA	
KU589212.1	CAACAGAA CA CTGCTTTAAACAGAGACTTA TTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
FJ525432.1	CAACAGAA CGCTGCTTTAAACAGAGACTTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
GQ454870.1	CAACAGAA TGCTGCTTTGAA TAGAGATTTGTTTCTTACTTTGAAAGGGAA	
Consensus	CAACAGAA tGctGCTTTGAACAGaGAcTTgTTtCTTaCTtTGAAAGgGAA	

201

250

PC-3-ALG GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 FN661497.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 GQ424348.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 FN661494.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 HF947334.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 Y18420.1\_T GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 KU578007.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 HF947337.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 EU937520.1 GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 PL-6-ALG GTATCCCTAAC TTGCCTGACAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 SY-1-ALG GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 FN552118.1 GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 FN552118.1 GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 U56902.1\_V GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 KU361339.1 GTATCCCTAAC TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 EU857538.1 GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 DQ151548.1 ATATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 AF001623.1 GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 JQ965169.1 ATATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 AB046398.1 GTATCCCTAAT TTGTCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 KC525952.1 GTATCCCTAAC TTGTCTGACAAAGATAAGGAC TTCCACATAGCTATGATGT  
 AY170468.1 GCATCCCTAAC TTACCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 AY340974.1 GCATCCCTAAC TTACCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCGCATAGCTATGATGT  
 DQ272579.1 GCATCCCTAAC TTACCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCGCATAGCTATGATGT  
 KU589212.1 GCATCCCTGACTTACCTGATAAAGATAAGGAC TTTTCACATAGCTATGATGT  
 FJ525432.1 GTATCCCTAAC TTACCTGACAAAGATAAAGACT TTTTCACATAGCTATGATGT  
 GQ454870.1 GTATCCCTAAC TTACCTGACAAAGATAAAGACT TTTTCACATAGCTATGATGT  
 Consensus GtATCCCTAAC TTgcCTGAtAAAGATAAGGAC TTTTCACaTAGCTATGATGT

251

300

PC-3-ALG TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 FN661497.1 TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 GQ424348.1 TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 FN661494.1 TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 HF947334.1 TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 Y18420.1\_T TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 KU578007.1 TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 HF947337.1 TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 EU937520.1 TATACCGATTAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 PL-6-ALG TATACCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGATGACTCC  
 SY-1-ALG TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGCGATGACGACACT  
 FN552118.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGCGATGACGACACT  
 FN552118.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGCGATGACGACACT  
 U56902.1\_V TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGCGATGACGACACT  
 KU361339.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGACGACTCT  
 EU857538.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGACGACACT  
 DQ151548.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCG TTGCAAAGTGATGACGACACC  
 AF001623.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGACGACACC  
 JQ965169.1 TGTATCGTTT GCGGTTAAGAGTTCATCAT TTGCAAAGTGATGACGACACC  
 AB046398.1 TGTATCGTTT TAGCGGTTAAA AGTTCATCAT TTGCAAAGTGA CGACGACACC  
 KC525952.1 TATATCGTTT TAGCGGTTAAGAGTTCATCG TTGCAAAGTGATGATGACACC  
 AY170468.1 TGTATCGTTT TAGCAGTTAAGAGTTCATCAT TTACAAAGCGATGACGACGCC  
 AY340974.1 TGTATCGTTT TAGCAGTTAAGAGTTCATCAT TTACAAAGCGATGACGACGCC  
 DQ272579.1 TGTATCGTTT TAGCAGTTAAGAGTTCATCAT TTACAAAGCGATGACGACGCC  
 KU589212.1 TGTATCGTTT TAGCAGTTAAGAGTTCATCAT TTACAAAGCGATGACGACACT  
 FJ525432.1 TGTATCGCTT TAGCAGTTAAGAGTTCATCG TTACAAAGCGATGACGACACT  
 GQ454870.1 TATATCGTTT TAGCAGTTAAGAGTTCATTACAAAGCGA CGATGATACC  
 Consensus TgTAtCGTTT TAGCgGTTAAGAGTTCATCa TTgCAAAGtGATGAcGACaCc

301

350

PC-3-ALG ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGT GTTGAAGTAGATTTGTCTGACAA  
 FN661497.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGT GTTGAAGTAGATTTGTCTGACAA  
 GQ424348.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGT GTTGAAGTAGATTTGTCTGACAA

FN661494.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCTGACAA  
 HF947334.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCTGACAA  
 Y18420.1\_T ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCTGACAA  
 KU578007.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCTGACAA  
 HF947337.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCTGACAA  
 EU937520.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCTGACAA  
 PL-6-ALG ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTAGATTTGCCTGACAA  
 SY-1-ALG ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 FN552118.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 FN552118.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 U56902.1\_V ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCCTGACAA  
 KU361339.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 EU857538.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 DQ151548.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 AF001623.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 JQ965169.1 ACGGGCATAACGTACACTCG AGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 AB046398.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGCGTC GAAGTGGATTTGCTGACAA  
 KC525952.1 ACGGGCATAACATATACTCGGGAGGGTGTGAAGTGAATTGCTGACAA  
 AY170468.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTGGATTTGCTGACAA  
 AY340974.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTGGATTTGCTGACAA  
 DQ272579.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTGGATTTGCTGACAA  
 KU589212.1 ACGGGTATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTGGATTTGCCTGACAA  
 FJ525432.1 ACGGGCATAACGTACACTCGGGAGGGTGTGAAGTGGATTTGCTCGACAA  
 GQ454870.1 ACGGGTATGACGTACACTCGGGAAGGTGTGAAGTGAAC TGCTGACAA  
 Consensus ACGGGcATAACGTACACTCGGGAGGGtGTtGAAGTgGATTTGtCTGACAA

351

400

PC-3-ALG ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 FN661497.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 GQ424348.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 FN661494.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 HF947334.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 Y18420.1\_T ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 KU578007.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 HF947337.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 EU937520.1 ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 PL-6-ALG ACTTTGGACC GACATCGTGT AATAATCTAAGGGTATGGTAACCGAACTA  
 SY-1-ALG ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 FN552118.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 FN552118.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 U56902.1\_V ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 KU361339.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 EU857538.1 ACTTTGGACTGACATCGTGTAAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 DQ151548.1 ACTTTGGACTGATGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 AF001623.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTCAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 JQ965169.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 AB046398.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAATCTAAGGGTATCGGTAACCGTACTA  
 KC525952.1 GCTTTGGACTGACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATGGTAACCGTACTA  
 AY170468.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATGGTAACCGTACTA  
 AY340974.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATGGTAACCGTACTA  
 DQ272579.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAACTCTAAGGGTATGGTAACCGTACTA  
 KU589212.1 ACTTTGGACTGACGTCGTGTTAACTCCAAGGGTATGGC AACCGTGCTA  
 FJ525432.1 ACTTTGGGCTGACGTCGTGTTAACTCCAAGGGTATGGC GACCGTACTA  
 GQ454870.1 ACTTTGGACA GACGTTGTGTTAACTCTAAGGGTATGGTAACCGTACTA  
 Consensus ACTTTGGACtGACgTCGTGtTAAtTCTAAGGGTAtGGTAACCGtACTA

401

450

PC-3-ALG ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 FN661497.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 GQ424348.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 FN661494.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 HF947334.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 Y18420.1\_T ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAACTAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT

KU578007.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAC TAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 HF947337.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAC TAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 EU937520.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAC TAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 PL-6-ALG ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAC TAACGATGCTCTTTACTTAGCCTTT  
 SY-1-ALG ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA TTTAGCCTTT  
 FN552118.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA TTTAGCCTTT  
 FN552118.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA TTTAGCCTTT  
 U56902.1\_V ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA TTTAGCCTTT  
 KU361339.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAATGATGCCCTTTA TTTAGCCTTT  
 EU857538.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA TTTAGCCTTT  
 DQ151548.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAACGATGCCCTTTA TTTAGCGTTT  
 AF001623.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAACGATGCCCTTTA TTTAGCGTTT  
 JQ965169.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAACGATGCCCTTTA TTTAGCGTTT  
 AB046398.1 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAACGATGCCCTTTA TTTAGCGTTT  
 KC525952.1 ATGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA TTTAGCTTTC  
 AY170468.1 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAAC TAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT  
 AY340974.1 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAAC TAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT  
 DQ272579.1 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAAC TAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT  
 KU589212.1 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAAC TAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT  
 FJ525432.1 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAAC TAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT  
 GQ454870.1 ACGCACTTCGAGTTTGGGGTAGAAC TAACGATGCCCTTTA TTTAGCTTTT  
 Consensus ACGCCCTTCGAGTcTGGGGTAGaAcTAACGATGCcCTTTAcTTAGCcTTT

451

500

PC-3-ALG TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 FN661497.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 GQ424348.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 FN661494.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 HF947334.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 Y18420.1\_T TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 KU578007.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 HF947337.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 EU937520.1 TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 PL-6-ALG TGTAGACAGAACCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 SY-1-ALG TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 FN552118.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGCCCGCTAGATGCAGG  
 FN552118.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGCCCGCTAGATGCAGG  
 U56902.1\_V TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGC GGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 KU361339.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCACTAGATGCAGG  
 EU857538.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 DQ151548.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 AF001623.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 JQ965169.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGACGCAGG  
 AB046398.1 TGTAGACAGAA CCGCAATTTGAGTTATGGT GGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 KC525952.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGT GGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 AY170468.1 TGCAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGACGCAGG  
 AY340974.1 TGCAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGACGCAGG  
 DQ272579.1 TGCAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGACGCAGG  
 KU589212.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTCCGCTAGATGCAGG  
 FJ525432.1 TGTAGACAGAA TCGCAATTTGAGTTATGGT GGACGTCCGT TAGATGCAGG  
 GQ454870.1 TGTAGACAGAA CCGCAACTT GAGTTATGGT GGACGTCCGT TAGATGCAGG  
 Consensus TGTAGACAGAA tCGCAATTTGAGTTATGGcGGACGTCCGCTAGAtGCAGG

501

550

PC-3-ALG GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 FN661497.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 GQ424348.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 FN661494.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 HF947334.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 Y18420.1\_T GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 KU578007.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 HF947337.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG

EU937520.1 GATTCCGGCT GGGTATCATTATTGTTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 PL-6-ALG GATTCCGGCT GGGTATCATTATTGTTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 SY-1-ALG GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGT AGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 FN552118.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 FN552118.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 U56902.1\_V GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 KU361339.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 EU857538.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 DQ151548.1 GATTCCAGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 AF001623.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 JQ965169.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTC GGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 AB046398.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 KC525952.1 GATTCCGGCT GGATATCATTACCTATGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 AY170468.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGTC GGATTTCTTGACTGGGGCTG  
 AY340974.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGTC GGATTTCTTGACTGGGGCTG  
 DQ272579.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGTC GGATTTCTTGACTGGGGCTG  
 KU589212.1 GATTCCAGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 FJ525432.1 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGAGCTG  
 GQ454870.1 AATTCCAGCCGGGTATCACTACC TGTGTGTCAGATTTCTTGACCGGGGCTG  
 Consensus GATTCCgGcGGGTATCATTAccTGTGTGcAGATTTCTTGACcGgAGCTG

551

600

PC-3-ALG CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 FN661497.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 GQ424348.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 FN661494.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 HF947334.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 Y18420.1\_T CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 KU578007.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 HF947337.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 EU937520.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 PL-6-ALG CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 SY-1-ALG CTTTGACTGATTTAGAG TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 FN552118.1 CTTTGACTGATTTAGAG TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 FN552118.1 CTTTGACTGATTTAGAG TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 U56902.1\_V CTTTGACTGATTTAGAG TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 KU361339.1 CTTTGACTGATTTAGAG TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 EU857538.1 CTTTGACTGATTTAGAG TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 DQ151548.1 CTTTGACTGA CTTGGAA TGTGCTGTGTACG TACAAGCTAAAGAACAATTG  
 AF001623.1 CTTTGACTGATTTGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 JQ965169.1 CTTTGACTGATTTGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 AB046398.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 KC525952.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAA GAAACAATTG  
 AY170468.1 GTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA  
 AY340974.1 GTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA  
 DQ272579.1 GTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA  
 KU589212.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG  
 FJ525432.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAG AGAACAATTG  
 GQ454870.1 CTTTGACTGATTTAGAA TGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAGCAATTA  
 Consensus GcTTTGACTGATTTaGaaTGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTg

601

650

PC-3-ALG TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 FN661497.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 GQ424348.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCANGCAGCT  
 FN661494.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 HF947334.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 Y18420.1\_T TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 KU578007.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 HF947337.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 EU937520.1 TTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT  
 PL-6-ALG CTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGTTGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT

SY-1-ALG TTGAA**A**AGCGGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 FN552118.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 FN552118.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 U56902.1\_V TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 KU361339.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 EU857538.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 DQ151548.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 AF001623.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 JQ965169.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**T**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 AB046398.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**T**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 KC525952.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 AY170468.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**T**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 AY340974.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**T**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 DQ272579.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**T**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 KU589212.1 TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 FJ525432.1 TTGAA**A**AGCGAGG**A**AGCTGATGA**A**GT**C**GTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT  
 GQ454870.1 **T**T**A**AA**G**AAGCGAGGGGCTGATGA**G**GT**C**GTAGTTAC**T**AATGTCAGGCAGCT  
 Consensus TTGAA**A**AGCGAGGGGCTGATGA**.GT****c**GTAGTTAC**t**AATGTCAGGCAGCT

651 671

PC-3-ALG TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 FN661497.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 GQ424348.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 FN661494.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 HF947334.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 Y18420.1\_T TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 KU578007.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 HF947337.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 EU937520.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 PL-6-ALG TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 SY-1-ALG TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 FN552118.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 FN552118.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 U56902.1\_V TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 KU361339.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 EU857538.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 DQ151548.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 AF001623.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 JQ965169.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 AB046398.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 KC525952.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 AY170468.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 AY340974.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 DQ272579.1 TGGGAAAT**T**CAACACACGTTG  
 KU589212.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 FJ525432.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 GQ454870.1 TGGGAAAT**T** AACACACGTTG  
 Consensus TGGGAAAT**t**CAACACACGTTG

**Annexe 9.** Efficacité de transmission des sources de CTV identifiées durant l'étude par les populations locales d'*A. gossypii* et *A. spiraeicola* des agrumes

ANOVA à deux facteurs (isolats de CTV et espèce vectrice)

Tests univariés de significativité pour l'infection (transmission)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

	SC	Degr. De	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	1247664	1	1247664	39509364	0,000000
<b>Isolats de CTV</b>	0	2	0	4	0,017023
<b>Vecteurs</b>	0	1	0	0	1,000000
<b>Isolats*Vecteurs</b>	0	2	0	0	1,000000
<b>Erreur</b>	4	114	0		

Annexe 10. Organisation du génome mitochondrial d'*A. gossypii*Organisation du génome mitochondrial d'*A. gossypii*

Gene name	Direction	Position	Size (bp)	Anti/start codon	Stop codon	Intergenic nucleotides*
<b>COI</b>	J	<b>1–1566</b>	<b>1563</b>	<b>ATT</b>	<b>TAA</b>	
tRNA <sup>Leu</sup>	J	1562–1629	68	TAA		5
COII	J	1633–2304	672	ATA	TAA	3
tRNA <sup>Lys</sup>	J	2307–2379	73	CTT		2
tRNA <sup>Asp</sup>	J	2380–2442	63	GTC		0
ATP8	J	2452–2601	150	ATA	TAA	9
ATP6	J	2582–3235	654	ATT	TAA	20
COIII	J	3235–4020	786	ATG	TAA	1
tRNA <sup>Gly</sup>	J	4020–4082	63	TCC		1
ND3	J	4083–4436	354	ATT	TAA	0
tRNA <sup>Ala</sup>	J	4437–4500	64	TGC		0
tRNA <sup>Arg</sup>	J	4500–4564	65	TCG		1
tRNA <sup>Asn</sup>	J	4564–4627	64	GTT		1
tRNA <sup>Leu</sup>	J	4633–4708	76	TAA		5
tRNA <sup>Glu</sup>	J	4691–4752	62	TTC		18
Repeat region	J	4747–5530	784			6
tRNA <sup>Pro</sup>	N	5519–5582	64	GAA		12
ND5	N	5583–7253	1671	ATT	TAA	0
tRNA <sup>His</sup>	N	7309–7372	64	GTG		55
ND4	N	7372–8681	1310	ATA	TA–	1
ND4L	N	8690–8980	291	ATA	TAA	8
tRNA <sup>Thr</sup>	J	8982–9043	62	TGT	1	
tRNA <sup>Pro</sup>	N	9047–9114	68	TGG	3	
ND6	J	9116–9607	492	ATT	TAA	1
Cytb	J	9611–10,726	1116	ATG	TAA	3
tRNA <sup>Ser</sup>	J	10,733–10,798	66	TGA		6
ND1	N	10,809–11,744	936	ATT	TAA	10
tRNA <sup>Leu</sup>	N	11,745–11,809	65	TAG		0
lrRNA	N	11,810–13,069	1260			0
tRNA <sup>Val</sup>	N	13,055–13,131	77	TAC		15
srRNA	N	13,142–13,909	768			10
AT-rich region	J	13,916–14,542	627			6
tRNA <sup>Ile</sup>	J	14,537–14,600	64	GAT		6
tRNA <sup>Gln</sup>	N	14,598–14,663	66	TTG		3
tRNA <sup>Met</sup>	J	14,668–14,733	66	CAT		4
ND2	J	14,734–15,711	978	ATT	TAA	0
tRNA <sup>Ile</sup>	J	15,710–15,771	62	TCA		2
tRNA <sup>Cys</sup>	N	15,764–15,830	67	GCA		8
tRNA <sup>Tyr</sup>	N	15,832–15,869 & 1–29	66	GTA		1

(Zhang *et al.*, 2014)

**Annexe 11.** Rendement moyen des vergers agrumicoles en Algérie par région

Au dessus de 20t/ha		Entre 15-20t/ha		Entre 10-14t/ha	
Wilaya	rendement	Wilaya	rendement	Wilaya	rendement
<b>Mostaganem</b>	25.5	<b>Relizane</b>	19.4	<b>Annaba</b>	13.9
<b>Boumerdes</b>	23.7	<b>El-tarf</b>	17.7	<b>Jijel</b>	12.7
<b>Blida</b>	23.4	<b>Tizi-ouzou</b>	17.3	<b>Bejaia</b>	11.7
<b>Médéa</b>	21.6	<b>Alger</b>	17.0	<b>Bechar</b>	10
		<b>Skikda</b>	15.5		
		<b>Chlef</b>	15.5		

(Bellabas, 2010)

## Valorisations scientifiques des résultats obtenus

Ali Arous S, Guenaoui Y, Draï MI et Djelouah K (2019) First detection of a virulent strain of Citrus tristeza virus (Closteroviridae) in a citrus orchard of Chlef Valley (Algeria). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 49 (2), 321-326.

Ali Arous S, Guenaoui Y (2019) Interspecific identification of some aphid species based on the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) partial gene. *Book of Abstracts of the X International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2019"*; 3-6 October, 2019; Jahorina, Bosnia and Herzegovina. ISBN. 978-999976-787-2-0. p1019-1024.

Ali Arous S (2019) Tristeza en Algérie, situation actuelle et perspectives de lutte. 3èmes journées méditerranéennes sur l'agrumiculture, « Identification des créneaux prometteurs dans la filière agrumicole algérienne », Université Hassiba Benbouali de Chlef, 21-23 Janvier 2019.

Ali Arous S, Guenaoui Y et Djelouah K (2017) Current status of citrus tristeza virus (CTV) and its vectors in Chlef valley (Algeria). *Book of Abstracts of the VIII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2017"*; 5-8 October, 2017; Jahorina, Bosnia and Herzegovina. ISBN. 978-999976-718-1-3. p1064-1070.

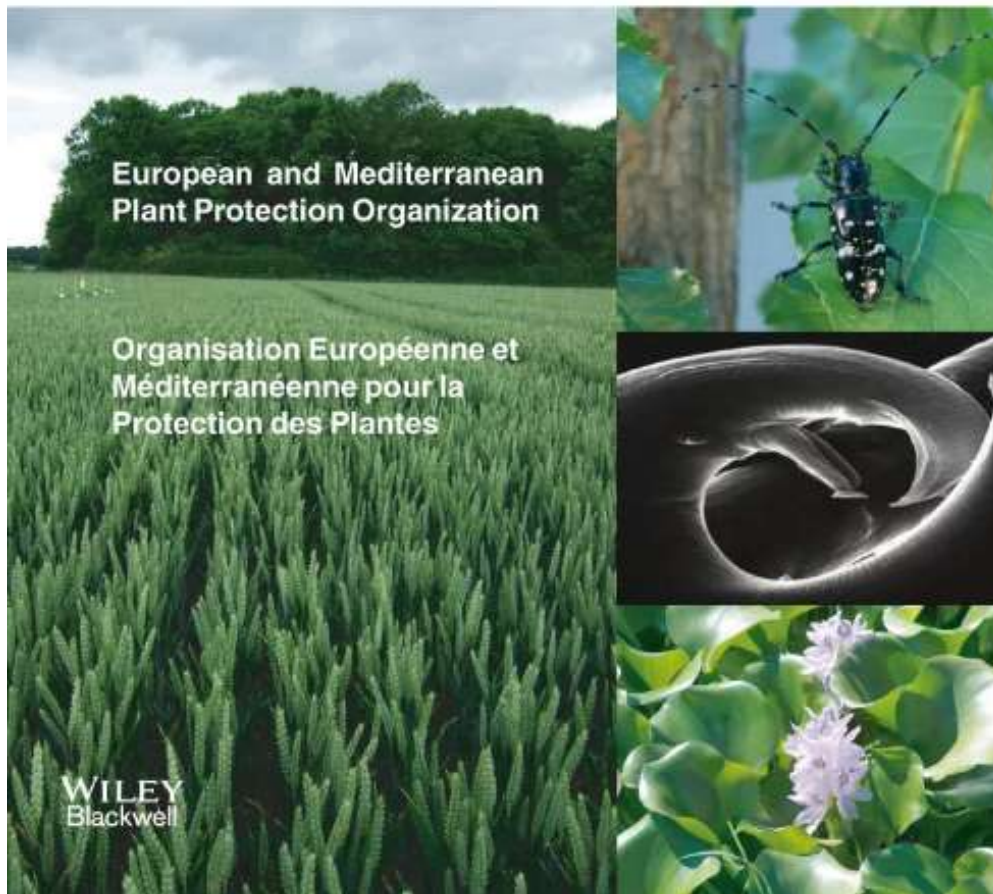
Ali Arous S, Houari A, Meziane M, Djelloul Berkane B, El Madani Bk, Boudjeltia F et Radjah F (2016) Contribution à l'étude de la maladie de la Tristeza et ses pucerons vecteurs potentiels au niveau de la Wilaya de Chlef. Séminaire international "Santé des plantes au service du développement"; 12-14 Avril 2016; Chlef, Algérie.

Volume 49 No. 2 August 2019 ISSN 0250-8052

# Bulletin OEPP EPPO Bulletin



Revue des aspects réglementaires de la protection des végétaux  
A journal of regulatory plant protection



# First detection of a virulent strain of *Citrus tristeza virus* (Closteroviridae) in a citrus orchard of Chlef Valley (Algeria)

S. Ali Arous<sup>1</sup>, Y. Guenaoui<sup>1</sup>, M. I. Drais<sup>2</sup> and K. Djelouah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Nature and Life Science, Abdelhamid Ibn Badis University, site3, EX-ITA, centre ville, Mostaganem (Algeria), 27000; e-mail: asnami1976@gmail.com; yguena@yahoo.fr

<sup>2</sup>International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Via Ceglie, 9, Valenzano (Bari) (Italy), 70010; e-mail: djelouah@iamb.it

A large-scale survey of *Citrus tristeza virus* (CTV) was carried out from 2016 to 2018 in the Chlef Valley, one of the main citrus growing areas in Algeria. In this study a total of 1680 citrus trees from 93 commercial orchards were sampled. The collected samples were tested by direct tissue blot immunoassay analysis and by the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique, and 54 trees were identified as being infected with CTV. This result confirmed that 54 trees were infected by the virus, corresponding to an infection rate of 3.21% throughout the studied area. Five of these local CTV sources were chosen for further molecular investigations to determine the genotype associated with the CTV isolates now spreading in the Chlef area. Characterization with multiple molecular markers showed the presence of the T30 and VT genotypes. This result allowed confirmation of the presence of a virulent strain belonging to the VT genotype. The other CTV isolates were similar to those from the Mitidja region, which showed 99% nucleotide identity with the Spanish mild CTV isolate. This early finding of a strain belonging to the VT genotype is an issue for Algerian citrus producers and needs rapid actions to be taken by the National phytosanitary services, extending the surveillance to other citrus production regions and uprooting the infected trees.

## Introduction

Citrus orchards in Algeria cover an area of approximately 66 000 ha and are located mainly along the coastal zones (MADRP, 2016). Unfortunately, citriculture has been seriously damaged by outbreaks of *Citrus tristeza virus* (CTV) in the Mitidja region, the main citrus cultivation area in Algeria (Fig. 1), reaching an infection rate of 17.6% (Larbi *et al.*, 2015).

CTV, the causal agent of the most important viral diseases of citrus, belongs to the genus *Closterovirus* in the plant virus family *Closteroviridae* (Karasev *et al.*, 1995). It has a positive-sense, single-stranded RNA genome of about 19.3 kb and contains 12 open reading frame (Moreno *et al.*, 2008). CTV is transmissible by grafting and aphids and occurs as diverse strains that range from asymptomatic to severely virulent. CTV can also cause extreme stem pitting in sweet orange and grapefruit regardless of the rootstock (Yokomi *et al.*, 2018).

## Materials and methods

Following the observation of quick decline symptoms associated with CTV infection in several citrus trees located in the Chlef Valley (Ali Arous *et al.*, 2017), the second most important area of citrus cultivation in Algeria, (MADRP, 2016) (Fig. 1), a first survey to assess the status of this

epidemic disease was carried out. The survey was performed every year during the blossom period from March to May in 2016, 2017 and 2018, on a total of 1680 citrus trees belonging to 93 commercial orchards. The area sampled was representative of the main citrus growing areas of the Chlef Valley (Fig. 2). The survey was performed in accordance with the hierarchical method of Gottwald & Hughes (2000) (Fig. 3) or randomly on the diagonals of the fields. The collected samples (new shoots, leaf petioles and pedicels of flowers) were printed (fresh section prepared) onto a nitrocellulose membrane and processed by direct tissue blot immunoassay (DTBIA) analysis (Garnsey *et al.*, 1993; Djelouah & D'Onghia, 2001), using PlantPrint Diagnostics SL© kit (IVIA, Valencia, ES) and the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) technique (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000), using monoclonal antibodies (Domaines Agricoles, UCP, MA).

## Results and discussion

Fifty-four trees were found to be infected with CTV, which corresponds to an infection rate of 3.21%. Several trees were showing clear symptoms of tristeza disease, particularly in a private orchard in the Abiodh Medjadja locality where severe forms of leaf chlorosis and yellowing were recorded on four young trees of mandarin, *Citrus*

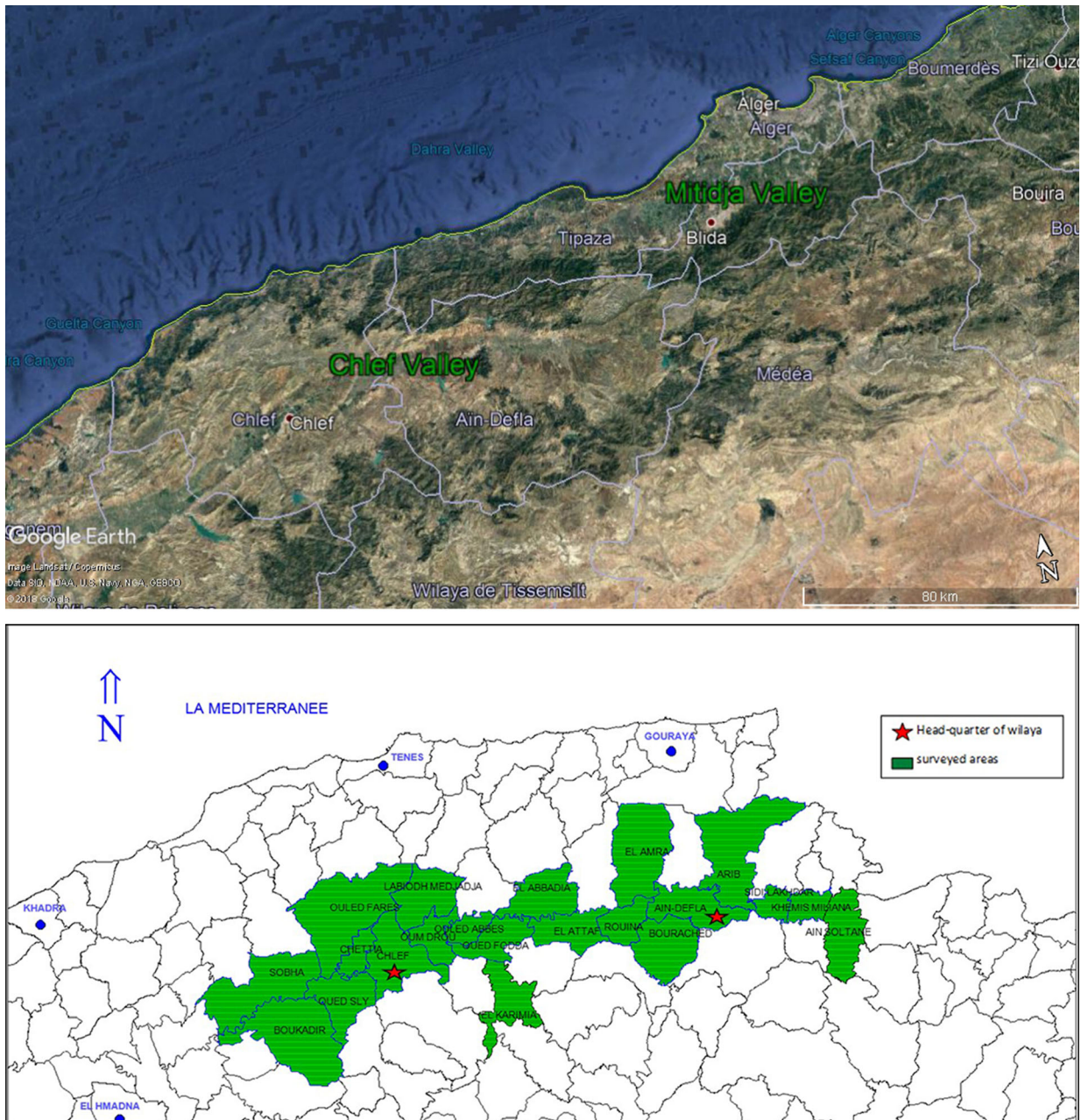


Fig. 1 Geographical location of the study area (Chlef Valley). [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

*reticulata* (Blanco), grafted on *Citrus macrophylla* (Wester) produced by a nursery located in the Mitidja region. It is important to highlight that the trees infected with CTV manifested severe vein corking symptoms before declining. Moreover, heavy stunting and chlorosis were observed on 12-year-old sweet orange trees, *Citrus sinensis* (L. Osbeck), grafted on *C. macrophylla* rootstock, at the Abiodh Medjadja and Oued Sly localities. The plant material in both orchards was imported from Spain in 2006 (Fig. 4).

Based on defined parameters (origin, symptoms, age, rootstock and location), five local sources of CTV (SY-1-ALG, NN-2-ALG, PC-3-ALG, WN-4-ALG and PL-6-ALG), were inoculated and maintained in the screenhouse for further molecular investigations. The purpose of the study was to determine the genotype associated with the CTV isolates in the Chlef area. Total RNAs were extracted from leaves using the RNeasy® Plant MiniKit (Qiagen, DE). First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). PCR was

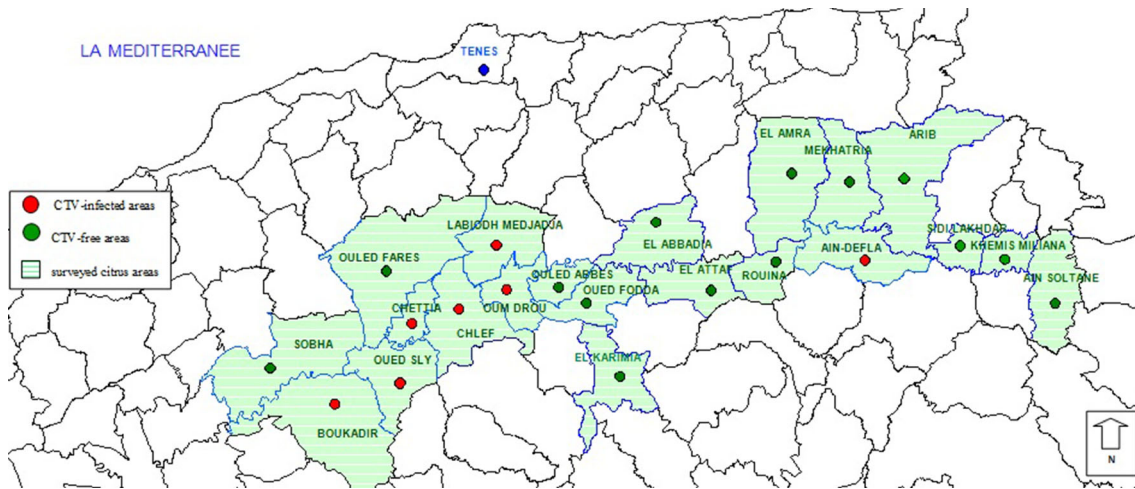


Fig. 2 Distribution of CTV in the study area. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

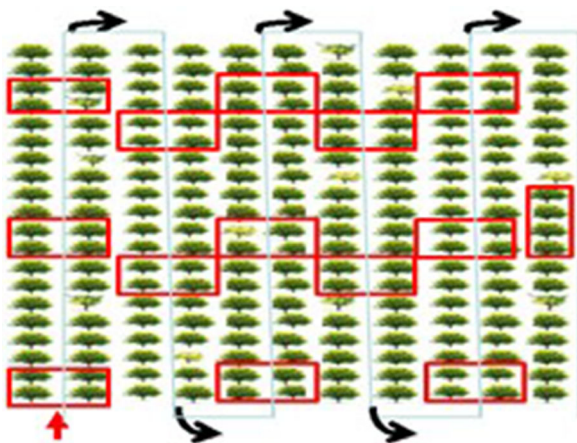


Fig. 3 The hierarchical sampling scheme according to Gottwald & Hughes (2000). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

carried out following the protocol described by Hilf & Garnsey (2000), using a GoTaq® Hot Start Polymerase kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The primer pairs used were targeting the universal coat protein gene (T36CP25) and four specific multiple molecular markers (MMMs), T30POL, T36POL, VTPOL and T3K17, associated, respectively, with the standard isolates T30, T36, VT and T3 (Hilf *et al.*, 2005). Amplification was observed with the five selected isolates when the broad-spectrum T36CP primers were used, confirming the results obtained by DTBIA and DAS-ELISA. The characterization with MMMs showed the presence of the T30 and VT genotypes. Two isolates, WN-5-ALG from a 15-year-old sweet orange tree grafted on sour orange rootstock and PL-6-ALG from a 50-year-old sweet orange *C. sinensis* (L) grafted on a sour orange rootstock *Citrus aurantium* (L), reacted only with T30POL, indicating the presence of the mild T30 genotype. The VT genotype was retrieved from sample NN-2-ALG, from an imported sweet orange tree grafted on *C. macrophylla*

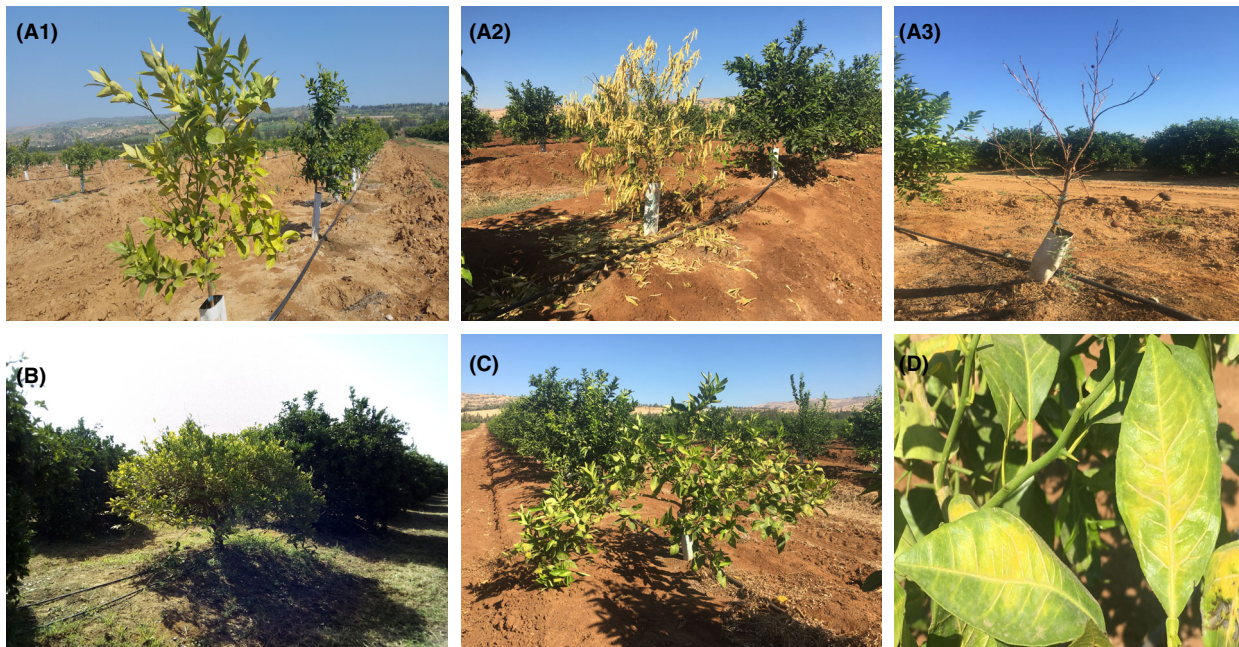
(Wester) and sample SY-1-ALG collected from a young mandarin tree, *C. reticulata* (Blanco), grafted on *C. macrophylla* and produced by a local nursery. Both reacted only with the VTPOL primer, which is a specific marker of the VT strain. PC-3-ALG was designated a mixed infection of T30 and VT genotypes, since this isolate yielded both VTPOL and T30POL markers.

Following the outcome of the MMMs analysis, the PCR products of three sources (SY-1-ALG, PC-3-ALG and PL-6-ALG) were cloned into a pUC18 vector plasmid (Agilent Technologies), and then four clones of each amplicon were sequenced. One of each clone was deposited in NCBI GenBank with accession numbers MK049162–MK049164. Based on the CP gene sequence, CTV isolates PL-6-ALG and PC-3-ALG shared 99.1% nucleotide identity with the moderate T30 strains (Table 1); however, SY-1-ALG was clustered with the group of virulent VT strains (Fig. 5).

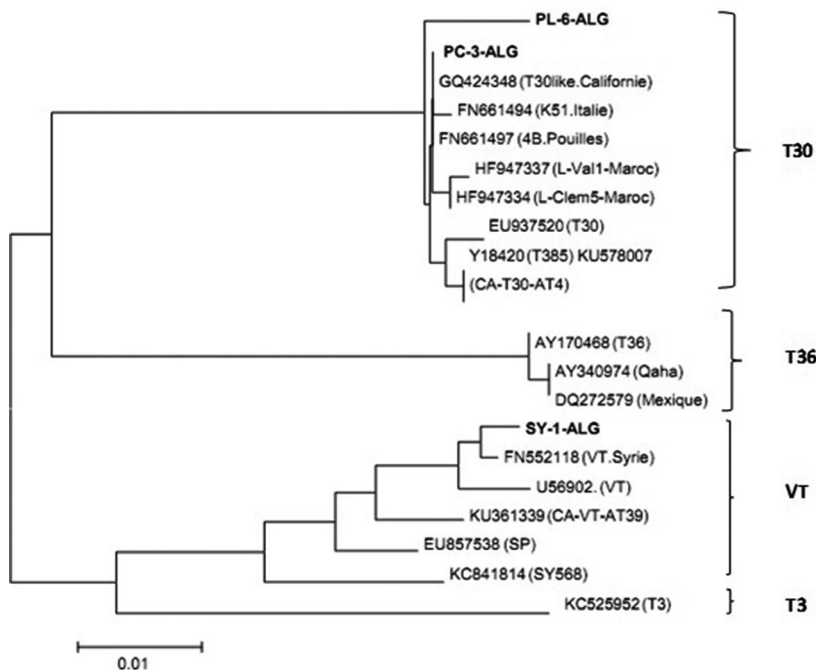
This work allowed confirmation of the presence of virulent strain belonging to the VT genotype represented by the local isolate SY-1-ALG isolated in a private orchard located in the study area. The other CTV isolates were, as expected, similar to those isolated from the Mitidja region, which show 99% nucleotide identity with the Spanish mild CTV isolate T385 (Larbi *et al.*, 2015).

## Conclusions

This is the first report of a VT-like CTV isolate infecting citrus in Algeria. Virulent strains induce rapid decline, stunting and/or seedling yellowing and extreme stem pitting in sweet orange and grapefruit regardless of rootstock (Yokomi *et al.*, 2018). This early finding is of utmost importance as it allows infected trees to be eradicated before natural spread to adjacent fields by aphid vectors can occur; for this purpose, rapid action needs to be taken by the national phytosanitary services, extending the investigations to other regions and eradicating the infected trees.



**Fig. 4** Field symptoms of CTV on infected trees. (A1), (A2), (A3) Chronological evolution of decline of a young plant infected by isolate SY-1-ALG. (B) Stunting of a tree infected by isolate NN-2-ALG. (C), Stunting and chlorosis of trees infected by isolate SY-1-ALG. (D) Syndrome of severe vein corking of leaves of a young tree harbouring isolate SY-1-ALG. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**Fig. 5** Phylogenetic tree generated by the neighbour-joining method from the alignment of the nucleotide sequences of the CPg25 marker of the selected local isolates PL-6-ALG, PC-3-ALG and SY-1-ALG with other strain references available in the NCBI database. Evolutionary analysis was conducted in MEGA7.

### Acknowledgements

The authors acknowledge S. Laala (ENSA, El-Harrach, DZ), M. Zemzami (Domaines Agricoles UCP, MA), M. Kerkoud (INRA Angers, FR) and J.-W. Park

(Citrus Center Molecular Research Laboratory, Weslaco, Texas, US) for their technical assistance. Special thanks go to the citrus growers of Chlef Valley for their cooperation by giving the authors access to their orchards.

**Table 1.** Pairwise nucleotide sequence identities (%) in the CP gene

PC-3-ALG	ID	92.5	99.1	100	100	99.5	92.3	93.2	99.7	93	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.2	92.3	92.2	KC841814(SY568)
SY-1-ALG	ID	91.8	ID	92.5	92.4	91.9	<b>98.9</b>	92.6	92.1	92.5	92.3	92.3	92.5	92.1	92.5	92.3	<b>98.2</b>	<b>97.9</b>	93	96.4	KC525952(T3)
PL-6-ALG	ID	ID	ID	<b>99.1</b>	<b>99.1</b>	<b>98.6</b>	91.9	92.3	<b>98.8</b>	92.1	<b>98.9</b>	<b>98.8</b>	<b>98.9</b>	99.7	99.9	99.7	92.8	92.5	91.6	92.9	
GQ424348(T30:USA)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.7	
PL-6-ALG	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
FN661497(4B.pouilles)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
EU937520(T30)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
U5 U56902(VT)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
AY170468(T36)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
AY340974(Qaha)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
FN661494(K51.Italie)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
AY170468(T36)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
Y18420(T385)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
AY340974(Qaha)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
FN661494(K51.Italie)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
FN552118(VT.Syrie)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
DQ272579(Mexique)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
HF947337(L-Val1-Maroc)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
HF947334(L-Clem5-Maroc)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
KU578007(CA-T30-AT4)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
KU361339(CA-VT-AT39)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
EU857538(SP)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
KC525952(T3)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	
KC481814(SY568)	ID	ID	ID	ID	ID	99.5	92.2	93.1	99.7	92.3	99.9	99.7	99.9	99.7	99.9	99.7	92.8	93.1	92.2	92.9	

Values in bold font are the highest nucleotide sequence similarities of CP gene of local CTV isolates to other extant CTV worldwide genotypes.

### Première détection d'une souche virulente de *Citrus tristeza virus* (Closteroviridae) dans un verger d'agrumes de la vallée de Chelif (Algérie)

Une étude à grande échelle portant sur le virus de la tristeza des agrumes (CTV) a été réalisée entre 2016 et 2018, dans la vallée de Chelif, l'une des principales zones de production d'agrumes en Algérie. Cette étude a permis la réalisation de prélèvements sur un total de 1682 arbres d'agrumes issus de 93 vergers commerciaux. Les échantillons récoltés ont été analysés par test d'immunofluorescence directe (ou méthode DTBIA : Direct Tissue Blot Immuno Assay) et par DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Les résultats ont confirmé la présence du virus dans 54 arbres ce qui représente un taux d'infection de 3,21% dans la région étudiée. Cinq de ces sources locales de CTV ont fait l'objet de tests moléculaires complémentaires pour déterminer l'identité des génotypes associés aux isolats de CTV qui se propagent désormais dans la région. La caractérisation réalisée à l'aide de différents marqueurs moléculaires a permis d'identifier les génotypes T30 et VT, le génotype VT étant connu comme correspondant à des souches virulentes du CTV. Les autres isolats de CTV sont apparentés à ceux précédemment détectés dans la plaine de la Mitidja, montrant 99% de similarité nucléotidique avec un isolat modéré du CTV présent en Espagne. Ce nouveau signalement d'une souche appartenant au génotype VT est un sujet d'inquiétude pour les agrumiculteurs algériens et nécessite la mise en œuvre rapides de mesures par les services phytosanitaires afin d'élargir la surveillance aux autres zones de productions d'agrumes et d'éliminer les arbres trouvés infectés.

### Первое обнаружение вирулентного штамма вируса *Citrus tristeza* (Closteroviridae) в цитрусовом саду в долине Хлеф (Алжир)

С 2016 по 2018 год в долине Хлефа, одной из основных зон выращивания цитрусовых в Алжире, было проведено широкомасштабное обследование на наличие вируса цитрусовой тристезы (ВТЦ). Для этого исследования было всего отобрано 1680 цитрусовых деревьев из 93 коммерческих плодовых садов. Отобранные образцы были протестированы методом анализа DTBIA и методом DAS-ELISA и были выявлены 54 дерева заражённых ВТЦ. Этот результат подтвердил, что 54 дерева были заражены вирусом, соответственно уровень инфицирования 3,21% по исследуемым зонам. Пять из этих источников ВТЦ были выбраны для дальнейших молекулярных исследований с целью определения генотипа, связанного с изолятами ВТЦ, распространяющимися в настоящее время в зоне Хлефа. Описание с множественными молекулярными маркерами показало наличие генотипов T30 и VT. Этот результат позволил

подтвердить наличие вирулентного штамма, принадлежащего генотипу VT. Другие изоляты ВТЦ были аналогичны изолятам из региона Митиджа, который показал 99% идентичности нуклеотидов с испанским изолятом ВТЦ. Такое раннее обнаружение штамма, принадлежащего генотипу VT, является серьезной проблемой для производителей цитрусовых Алжира. Оно требует быстрых действий со стороны национальных фитосанитарных служб, распространения исследований на другие регионы и ликвидации заражённых деревьев.

### References

- Ali Arous S, Guenaoui Y & Djelouah K (2017) Current status of citrus tristeza virus (CTV) and its vectors in Chlef valley (Algeria). Book of proceeding of the VIII *International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2017"*; 5-8 October, 2017; Jahorina, Bosnia and Herzegovina. p1064. ISBN 978-999976-718-1-3.
- Bar-Joseph M, Marcus R & Lee RF (1989) The continuous challenge of Citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 292-316.
- Cambra M, Gorris MT, Marroquin C, Román MP, Olmos A, Martínez MC *et al.* (2000) Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* **71**, 75-85.
- Djelouah K & D'Onghia AM (2001) Detection of Citrus Psorosis virus (CPsV) and Citrus tristeza virus (CTV) by direct tissue blot immunoassay. In: *Proceeding for the Mediterranean Network on Certification of Citrus, Options Méditerranéennes B 33*, pp. 108-113. CIHEAM publications, Bari (IT).
- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M & Henderson CT (1993) Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of Citrus tristeza virus (CTV). In: *Proc. 12th Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, pp. 39-50. IOCV, Riverside (US).
- Gottwald TR & Hughes G (2000) A new survey method for *Citrus tristeza virus* disease assessment. In *Proc. 14th Conf. Of IOCV (Brazil, 1998)*, pp. 77-78. IOCV, Riverside (US).
- Hilf ME & Garnsey SM (2000) Characterization and classification of Citrus tristeza virus isolates by amplification of multiple molecular markers. In: *14th Conf. Int. Organ., Riverside, CA. Citrus Virol.*, pp. 18-27.
- Hilf ME, Mavrodieva VA & Garnsey SM (2005) Genetic marker analysis of a global collection of isolates of citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* **95**, 909-917.
- Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV *et al.* (1995) Complete sequence of the Citrus Tristeza virus RNA genome. *Virology* **208**, 511-520.
- Larbi D, Belkahl H, Djelouah K & D'Onghia AM (2015) Monitoring citrus tristeza virus (CTV) in Algeria and characterization of local isolates. *Acta Horticulturae* **1065**, 767-771.
- MADRP (2016) Statistique Agricole, superficies et productions, SERIE B, 2016. Ministry of agriculture, rural development and fishing of Algeria. 77p.
- Moreno P, Ambros S, Albiach-Martí M, Guerri J & Pena L (2008) Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* **9**, 251-268.
- Yokomi R, Selvaraj V, Maheshwari Y, Chiumentì M, Saponari M, Giampetruzzi A *et al.* (2018) Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus tristeza virus in California. *Archives of Virology* **163**, 1795-1804.



# AgroSym 2019

BOOK OF

PROCEEDINGS



*X International Scientific Agriculture Symposium  
"AGROSYM 2019"  
Jahorina, October 03-06, 2019*

## INTERSPECIFIC IDENTIFICATION OF SOME APHID SPECIES BASED ON THE MITOCHONDRIAL CYTOCHROME OXIDASE I (mtCOI) PARTIAL GENE

Samir ALI AROUS\*, Yamina GUENAOUI\*

University Abdelhamid Benbadis of Mostaganem, Algeria

\*Corresponding author: [asnami1976@gmail.com](mailto:asnami1976@gmail.com); [yguenaoui@yahoo.fr](mailto:yguenaoui@yahoo.fr)

### Abstract

Aphid species identification based on host plant and morphological traits is difficult for immature aphids, sometimes even for adult aphids and in other cases for biotypes that have no or very small differences in morphological characters. However, precise identification of aphids is necessary in agriculture because of differences between species and biotypes in virus transmission efficiency or insecticides susceptibility. Fortunately, since the development of molecular techniques, mitochondrial DNA sequences were used for species discrimination and even for intraspecific differentiation between populations. In this study we performed the cytochrome c oxidase subunit I (COI) mitochondrial barcode region on 17 *Aphis gossypii* and 13 *Aphis spiraecola* populations collected from citrus, hibiscus, zucchini, potato and pepper in addition to 03 samples of *Pterochloroides persicae* collected from peach tree. Sequence analysis of the partial mtCOI gene of 709 bp fragment for the three studied species showed the utility of mtCOI as species-distinguishing molecular marker that can be used as reliable species identification of aphid species. In contrast, intraspecific discrimination was not evidenced. The two species of Aphidinae subfamily were identified in a neighbor-joining tree. Mean intraspecific sequence divergence in Aphidinae subfamily was of 6.4%, ranging from 5.8% to 7%. However, the mean interspecific variation between subfamilies (Aphidinae and Lachnidae) was higher than 10% with a range of 9.4% to 10.6%. Intraspecific variations of *A. gossypii* and *A. spiraecola* populations were insignificant with a very low clonal diversity level that varied from 00% to 0.3% and from 00% to 0.9% respectively. This molecular test evidenced that the mtCOI partial gene is a powerful marker to solve the taxonomic ambiguities that the morphological identification cannot decipher.

**Key words:** *Aphids, Identification, mtCOI, Reliability, Molecular.*

### Introduction

The genus *Aphis* is the most species rich genus among Aphididae, with approximately 560 species known in the world (Favret, 2005). Compared to other genera, the species in the genus *Aphis* have remarkable diversity in their host plant utilization (Heie, 1986; Von Dohlen and Teulon, 2003) and display various types of lifecycles; monoecy on woody or herbal plants and heteroecy (Kim *et al.*, 2010). However, due to their rapid radiation, most of the congeneric species are often cryptic in their morphology (Kim *et al.*, 2010). Before molecular tools development for study evolutionary relationships studies, there was little data on the phylogeny of *Aphis* species because of their similar morphologies. Phylogeny within the Aphidini tribe has been partially based on changes in host plant utilization during the evolution of aphids (Komazaki *et al.*, 2010). Morphology and host plant association are significant sources of aphid classification. Heie (1986) asserted that, identification using the morphological characters and host-plant affiliation are more reliable than those based on morphological data alone. However, identification could be restricted by substantial intraspecific variation (Margaritopoulos *et al.*, 2000). There are many reports of using mitochondrial DNA to study aphid phylogeny (Stern, 1995, Turcinavicien *et al.*, 2006, von Dohlen *et al.*, 2006) for species discrimination (Raboudi *et al.*, 2005, Valenzuela *et al.*, 2007) and even for intraspecific differentiation between aphid populations (Boulding, 1998, Anstead

*et al.*, 2002). As a result, they are widely used to solve the taxonomic ambiguities of insect pests. In the light of this, we have decided that it will be very useful to carry out molecular identification work on two economically important aphid species in the study area, *Aphis gossypii* and *A. spiraecola* populations collected on different crops in the Chlef Valley. This study will verify the effectiveness of the partial mitochondrial mtCOI gene as species identification marker and its ability to detect possible intraspecific variations existing within populations of the same species.

## Material and methods

### Molecular characterization of aphid's populations

In order to assess the reliability of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase I (mtCOI) partial gene fragment to identify interspecific and intraspecific variation within the Aphidinae subfamily. A genetic approach was performed on Five (5) *A. gossypii* populations (Ag<sub>CITR</sub>, Ag<sub>HIBI</sub>, Ag<sub>COUR</sub>, Ag<sub>POMM</sub> and Ag<sub>POIV</sub>) sampled from citrus (*Citrus sinensis* (Osbeck, 1765): Rutaceae), hibiscus (*Hibiscus syriacus* (L, 1661): Malvaceae), zucchini (*Cucurbita pepo* (L, 1753): Cucurbitaceae), potato (*Solanum tuberosum* (L, 1753): Solanaceae) and pepper (*Capsicum annuum* (L, 1753): Solanaceae) respectively, and five (5) populations of the green citrus aphid *A. spiraecola* collected from the same plant hosts, characterized respectively by ASC<sub>CITR</sub>, ASC<sub>COUR</sub>, ASP<sub>POMM</sub>, ASH<sub>HIBI</sub> and ASPO<sub>IV</sub>. One (1) population of the giant black bark aphid *Pterochloroides persicae* (Pp) (Hemiptera: Lachninae) sampled from peach trees (*Prunus persica* L. Batsch) was added as out of group to assess genetic variation degree between subfamilies. All aphid samples were stored in 70% ethanol at -20°C. Selected available mtCOI sequences were retrieved from NCBI GenBank and used in this study for intraspecific and interspecific variation of the three studied species.

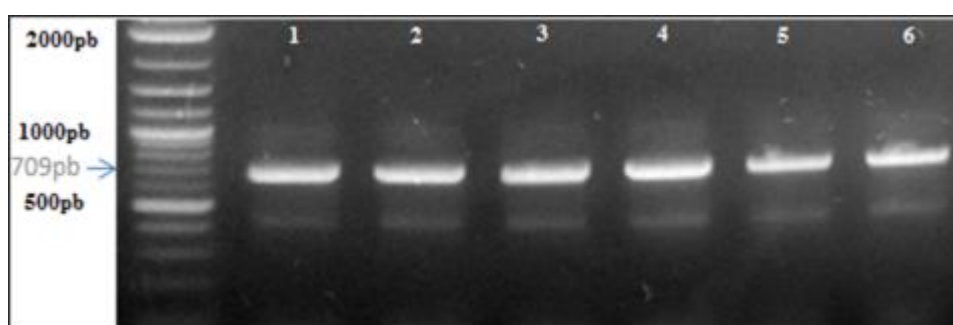
### DNA Extraction and PCR

Aphids stored in 70% ethanol were rinsed twice with RNase and Protease free molecular biology water and then with 100 µl of dellaporta extraction buffer. Five adult apterous aphids were randomly selected from each sample. Total nucleic acids were extracted using the protocol described by Dellaporta *et al* (1983). The Mitochondrial Cytochrome Oxidase I (mtCOI) partial gene fragment (709pb) was amplified using universal barcode primers (LCO1490F) 5'GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG3' and (HCO2198) 5'TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA3' (Folmer *et al*, 1994; Zhang and Hewitt, 1997; Cocuzza *et al*, 2008; Komazaki *et al*, 2010; Sharma and Koabayashi, 2013; Zhang *et al*, 2014, Lee *et al*, 2015 and Lokeshwari *et al*, 2015). Synthesized at Integrated DNA technologies IDT, Coraville, Iowa, USA. PCR was performed in a thermocycler (BIORAD C1000<sup>®</sup>) with the following cycling parameters: five cycle of 94°C for 40s, 45°C for 40s, 72°C for 60s, followed by 35 cycles of 94°C for 40s, 51°C for 40s, 72°C for 60s and 72°C for 10mn as final extension. PCR was performed in a 25 µl total reaction volume containing 0.5 µl of each primer, 2.5 of PCR buffer, 0.5 µl of dNTPs, 0.25 µl taq DNA polymerase (Roche diagnostics international LTD). The amplified products were resolved in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.6µl/ml). PCR products were submitted to further mtCOI sequencing. Homology tests were carried out using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), compared with published sequences available in the NCBI, and matched with corresponding region of mitochondrial COI. All the sequences generated in the present study and retrieved sequences corresponding to COI, were aligned with the multiple sequence alignment software CLUSTAL OMEGA at nucleotide level. Phylogenetic tree was generated using neighbor-joining method (NJ) (Saitou et Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood

method (Tamura *et al.*, 2004). Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

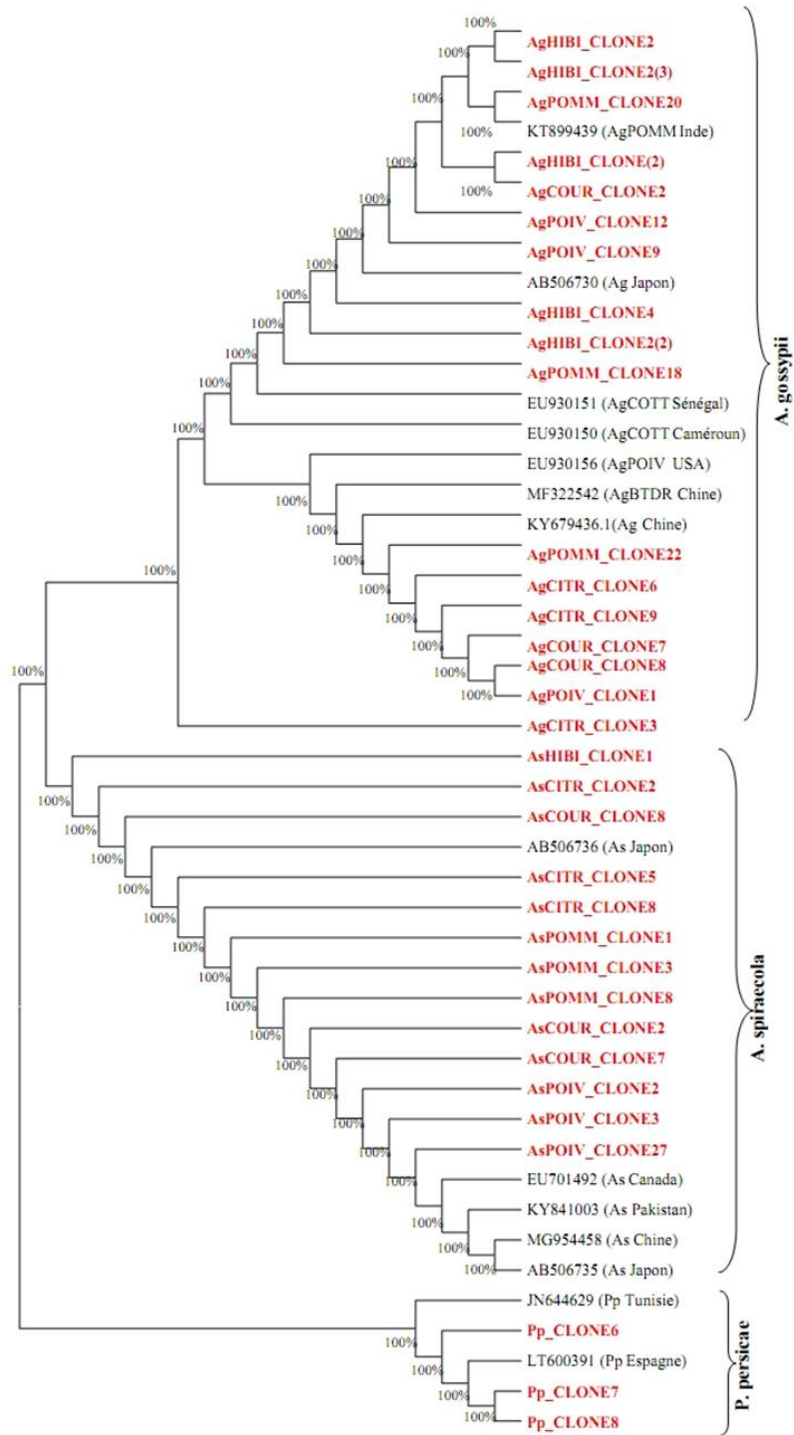
### Results and Discussion

In total, 33 aphids' population were included for COI data set, among them 17 *Aphis gossypii* samples of AgCITR, AgHIBI, AgCOUR, AgPOMM and AgPOIV, 13 *Aphis spiraecola* samples characterized by ASCITR, ASCOUR, ASPOMM, ASHIBI and ASPOIV and three (3) *Pterochloroides persicae* samples found on peach trees. Sequencing of the partial mtCOI gene yielded a 709 bp fragment for *A. gossypii*, *A. spiraecola* and *P. persicae* (Fig 1). Comparison of the replicate sequences for the 33 samples showed no mismatch, indicating no sequencing errors. No pseudo-genes were amplified in any of the sequences subjected to analysis, as indicated by the absence of stop codons. A BLAST search for the sequences showed highest hits for the respective species. The sequences obtained were deposited in NCBI-GenBank with accession numbers MH632726 to MH632734.



**Figure 1.** Polymerase chain reaction products (709pb) were amplified using universal primers set: LCO1490F-HCO2198. PCR products were separated in a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.

The partial sequence of the mtCOI (709bp) of *A. gossypii*, *A. spiraecola* and *P. persicae* generated in this study were compared between them. The results of our molecular analysis based on the mtCOI region revealed that in term of species identification the use of mtCOI gene enabled rapid and effective identification between the three species. The two species of Aphidinae subfamily (*A. gossypii* and *A. spiraecola*) were identified in a neighbor-joining tree. Their mean interspecific sequences divergence was 6.4% with a range of 5.8% to 7%. Mean nucleotide sequence variations between subfamilies (Aphidinae and Lachnidae) was significantly high (10%) with a range of 9.4% to 10.6%. The phylogenetic tree was made to compare the studied aphids' population shown in Fig 2 demonstrated that the aphid samples used in this study were divided in three distinct and robust clades. *A. gossypii* populations were clustered together with mtCOI partial gene marker of several *A. gossypii* worldwide populations. In the same way *A. spiraecola* samples collected from hibiscus, citrus, zucchini, pepper and potato were grouped in a single cluster with *A. spiraecola* species from several parts of the world. A third cluster grouped sequences of the studied *Pterochloroides persicae* with other populations collected overseas.



**Figure 2.** Neighbor-Joining phylogenetic tree depicting evolutionary relationships among various populations of *A. gossypii*, *A. spiraecola* and *P. persicae* collected at Chlef valley based on analysis of a 709 bp mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I – COI DNA fragment.. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7

Comparison of the mtCOI sequences from 17 populations of *A. gossypii* collected from five different host plants showed that there were a little nucleotide variation among them, confirming a relatively recent divergence as reported by various researchers (Lee *et al.*, 2015; Lokeshwari *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013; Komazaki *et al.*, 2010, Carletto *et al.*, 2009). Sequence identity matrix of mtCOI sequences of *A. gossypii* and *A. spiraecola* populations showed a very few nucleotide divergence between the studied population (data not shown).

However intraspecific variations within species was very low, *A. gossypii* and *A. spiraecola* populations showed only 00% to 0.3% and 00% to 0.9% of nucleotide variation respectively. We suggest that intraspecific identification requires other molecular tools, either nuclear or mitochondrial markers in addition to biological assays such as host transfer experiments.

### Conclusion

In the present study, we have shown the utility of the mitochondrial cytochrome oxidase mtCOI gene as a molecular marker distinguishing different species of aphids. This is the first time in Algeria that this molecular technique has been used for aphid species identification. Although this molecular tool has demonstrated a high reliability for interspecific aphid's identification, it couldn't decipher intraspecific variations between different populations of *A. gossypii* and *A. spiraecola* collected from various host plant. We considered the work as pioneer trial of molecular identification of aphid species. It will help to solve taxonomic ambiguity of *Aphis* genus populations present on crops of the valley leading in one hand to precise determination and thus adequate sustainable management strategy, and in the other hand allows prompt and reliable identification of alien aphid species that can be of great economic importance.

### References

- Favret C. (2014) Aphid Species File. Version 5.0/5.0. Available online at <http://Aphid.SpeciesFile.org> (retrieval date 09/05/2014).
- Komazaki S., Osakabe M.H. (1998). Variation of Japanese *Aphis gossypii* clones in the life cycle, host suitability and insecticide susceptibility, and estimation of their genetic variation by DNA analysis. *Aphids in natural and managed ecosystems*. 83-89.
- Komazaki S., Toda S. (2008). Difference in host preference, life cycle pattern, and insecticide susceptibility among *Aphis gossypii* clones and genetic relationships inferred from internal transcribed spacer 2 sequences of rDNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101, 565-572.
- Rebijith K.B., Asokan R., Krishna V., Krishna Kumar N.K., Ramamurthy V.V. (2012). Development of species-specific markers and molecular differences in mitochondrial and nuclear DNA sequences of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Fla. Entomol.* 95, 674-682.
- Wang L., Zhang S., Luo J.Y., Wang C.Y., Lu L.M., Zhu X.Z. (2016). Identification of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) Biotypes from Different Host Plants in North China. *PLoS ONE*. 11 (1), e0146345.
- Anstead J.A., Burd J.D., Shufran K.A. (2002). Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: Haplotype and host associations. *Bull. Entomol. Res.* 92, 17-24.
- Boulding E.G. (1998). Molecular evidence against phylogenetically distinct host races of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Genome* 41, : 769-775.
- Carletto J., Lombaert E., Chavigny P., Brévault T., Lapchin L., Vanlerberghe-Masutti F. (2009). Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Mol. Ecol.* 18, 2198-2212
- Chen Y., Vanlerberghe-Masutti L., Wilson J., Barchia I., McLoon M.O., Smith T., Herron G.A. (2013). Evidence of superclones in Australian cotton aphid *Aphis gossypii* Glover (Aphididae: Hemiptera). *Pest. Manag. Sci.* 69, 938-948.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.

- Heie O.E. (1986). The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. III. Family Aphididae: subfamily Pterocommatinae & tribe Aphidini of subfamily Aphidinae. Fauna Entomologica Scandinavica. Leiden, The Netherlands, E.J. Brill/ Scandinavian Science Press Ltd.
- Kim H., Lee W., Lee S. (2010). Morphometric relationship, phylogenetic correlation, and character evolution in the species-rich genus *Aphis* (Hemiptera: Aphididae). PLoS ONE. 5, e11608.
- Komazaki S., Shigehara T., Toda S. (2010). Diversity of Japanese *Aphis gossypii* and comparison with other *Aphis* species based on the mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. Ann. Entomol. Soc. Am. 103, 916-924.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 33, 1870-1874.
- Lee Y., Lee W., Lee S., Kim H. (2015). A cryptic species of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) complex revealed by genetic divergence and different host plant association. Bulletin of Entomological Research. 105, 40-51.
- Lokeshwari D., Krishna Kumar N.K., Manjunatha H. (2015). Molecular diversity of the *Aphis gossypii* (Hemiptera Aphididae): A potential vector of Potyviruses (Potyviridae). Ann. Entomol. Soc. Am. 108(4), 621-633.
- Margaritopoulos J., Tsitsipis J., Zintzaras E and Blackman R.L. (2000) Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. Bulletin of Entomological Research 90, 233-244.
- Raboudi F., Mezghani M., Makni H., Marrakchi M., Rouault J.D., and Makni., M. (2005). Aphid species identification using cuticular hydrocarbons and cytochrome b gene sequences. J. Appl. Entomol. 129: 75-80.
- Saitou N and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4, 406-425.
- Savolainen V., Cowan R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K., Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: An introduction to DNA barcoding. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 360, 1805-1811.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 101, 11030-11035.
- Turcinaviciene J., Rakauskas R., and Pedersen B.V. (2006). Phylogenetic relationships in the "grossulariae" species group of the genus *Aphis* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae): molecular evidence. Eur. J. Entomol. 103:597-604.
- Valenzuela I., Hoffmann A.A., Malipatil M.B., Ridland P.M and Weeks A.R. (2007). Identification of aphid species (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae) using a rapid polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method based on the cytochrome oxidase subunit I gene. Aust. J. Entomol. 46: 305-312.
- Von Dohlen C. D., Rowe A.C and Heie O.E. (2006). A test of morphological hypotheses for tribal and subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Hemiptera: Aphididae) using DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 38: 316-329.
- Von Dohlen C.D and Teulon, D.A.J. (2003) Phylogeny and historical biogeography of New Zealand indigenous Aphidini aphids (Hemiptera, Aphididae): an hypothesis. Annals of the Entomological Society of America 96, 107-116.
- Zhang D.X., Hewitt G.M. (1997). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. Trends Ecol. Evol. 11 (6), 247-251.
- Zhang S., Luo JY., Wang C.Y., Lu L.M., Li CH., Jiang W.L. (2014). Complete mitochondrial genome of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Mitochondrial DNA: 1-2.

# BOOK OF PROCEEDINGS



*VIII International Scientific Agriculture Symposium  
Jahorina, October 05-08, 2017*



**AGRO** 2017  
**sym**

## CURRENT STATUS OF CITRUS TRISTEZA VIRUS (CTV) AND ITS POTENTIAL APHID'S VECTORS IN CHLEF VALLEY (ALGERIA)

Samir ALI AROUS<sup>1\*</sup>, Yamina GUENAOUI<sup>1</sup>, Khaled DJELOUAH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University Abdelhamid Benbadis of Mostaganem, Algeria

<sup>2</sup>International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Valenzano (Bari), Italy

\*Corresponding author: samirtaifour@yahoo.fr

### Abstract

Field observation in citrus orchards in Chlef valley showed many cases of decline and other typical symptoms of tristeza disease mostly in plants grafted on sour orange which is the dominant rootstock in the valley. A survey of *citrus tristeza virus* (CTV) was carried out during the spring of 2016 to evaluate its current situation and to identify the potential aphid's vectors. Total of 1680 samples collected from 93 orchards located in 21 communes were tested by DTBIA/DAS-ELISA. The analyses have confirmed the presence of CTV in 54 samples through the study area on citrus trees of different species, varieties, ages and origins, whereas the inventory of citrus aphids species carried out during the same period highlighted the presence of two important CTV vectors which are *Aphis gossypii* (Glover) and *A. spiraecola* (Patch). However, there was no evidence of the presence of the major vector *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy).

**Keywords:** *Citrus*, *CTV*, *Aphids*, *vector*, *Chlef valley*.

### Introduction

For several decades, citriculture has been considered as the most important fruit crop sector in Algeria and part of its traditional agriculture. Before the French colonization (1830), more than 22 000 citrus trees, mainly orange trees, were already grown in the Mitidja area (near Algiers). Currently, citrus orchards cover an area of 45,040 ha, or 0.6% of the agricultural land, and 11% of lands reserved to fruit trees crops, 90% of this crop is located along the coastal zones in 13 different regions, four of them represent 55% of the total area (Bilda, Chlef, Mascara and Relizane). Chlef valley is the second most important in Algeria, and citriculture is covering about 6000 hectares, however the crop is facing to serious issues, among them salinity and drought. To face these two obstacles, growers use the sour orange rootstock (*Citrus aurantium*), which is very adequate for such soil (salty and alkaline) and dry weather, furthermore the sour orange is tolerant to gummosis which was the major disease of citrus in the past, whereas the emergence of new diseases as Tristeza in the valley since 2010 (Ali Arous *et al*, 2016), which induced several cases of decline on sweet orange grafted on sour orange, had obliged the citrus industry in the valley to start thinking to an alternative rootstock which is adequate both to the new biotic and abiotic conditions. The current study contribute to understand better the current status of this epidemic disease and its epidemiology by monitoring CTV and its vectors in the main citrus growing areas of the valley. The work may help authorities to set up strategy to protect citrus industry from the serious threat of Tristeza citrus disease.

## **Material and methods**

### **II.1. Citrus aphids monitoring**

Thirteen (13) citrus orchards situated in eight different locations in Chlef valley were chosen to carry out the sampling from March to May 2016. On each of the ten trees per orchard ten shoots were weekly observed (100 shoot per orchard) choosing them randomly at different height and orientation and collecting ten young shoots per tree. Collected shoots have been put in polyethylene bags and examined in the laboratory where infestation rate and aphid's identification were performed by using the universal dichotomy identification key Blackman R.L. and Eastop V.F. (2000).

Since valuable documents for studying ecological characteristics of the aphids can be obtained by taking photographs from aphid colonies and their closest environment, a lot of photos were made in the studied citrus orchards.

### **II.2. CTV survey**

In order to investigate the presence and the incidence of CTV in the Chlef valley citrus groves a second survey was carried out during the blossom period in March and April 2016.

A total of 93 groves, representative of the main citrus growing areas in Chlef valley were chosen for monitoring. About 25% of the trees were sampled from each selected grove according to the hierarchic method of Gottwald and Hughes (2000) or randomly on the diagonals of the fields. Most of the visited groves were homogenous in terms of age, rootstocks, density and variety. Age of surveyed trees ranged between 1 to over 40 years. Each sample was made by 10-15 closed flowers, leaves and petioles taken from each site of the canopy of the selected trees. Samples were put in plastic bags, labeled and stored in a refrigerator box containing ice pads. Fresh flowers were printed on the CTV membranes in the laboratory. A total of 1680 samples were collected.

All collected samples were analyzed by DTBIA for the detection of CTV using stems and leaf petioles (Bar Joseph *et al.*, 1979; Cambra *et al.*, 2000). Positive samples have been confirmed by DAS-ELISA tests.

## **Results and discussion**

### **III.1. Results of Citrus Tristeza Virus (CTV) survey**

As shown in table 1, a total of 54 infected trees of different categories were detected by DTBIA test, which represent around 3.21% as infection rate, in term of citrus surface, 8.07% of the total area prospected were contaminated, whereas the survey has revealed that 16% of citrus groves are infected by CTV (Tab 1).

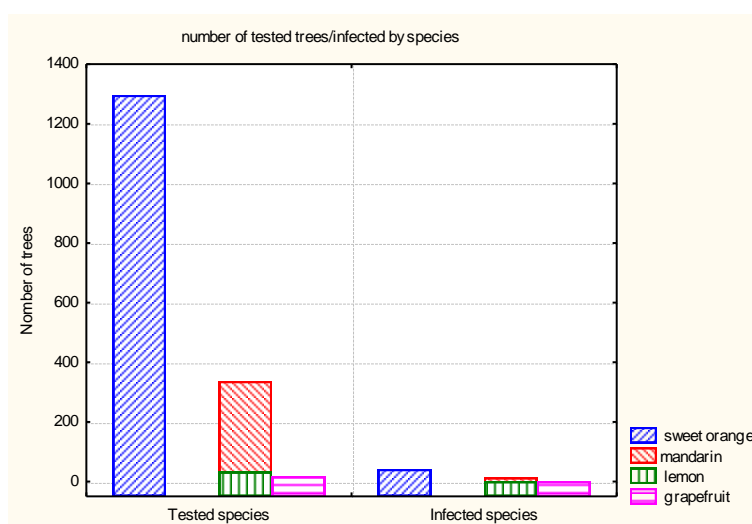
**Table 1.** Results of the CTV survey in the study area

	Total (N)	infected	% of infection
Orchard	93	15	16 %
Surface (ha)	660	53.3	8.07 %
Trees	1680	54	3.21 %

### III.2. Study of some epidemiological parameters of Tristeza disease.

#### III.2.1. Citrus species

Majority of CTV infected trees were sweet oranges (41trees) out of 1296 trees tested; sweet orange was the widest group on this study, because it is the most important cultivated group in Chlef valley (DSA, 2016). The second important group is mandarin with 13 infected trees out of 336 tested trees, whereas no grapefruit or lemon positive cases have been recorded. According to the survey, most positive cases were detected on sweet orange species.



**Figure. 1.** Infected trees by species

Even though 13 only mandarin were contaminated by Tristeza virus, the infection rate (3.86%) was higher than in sweet oranges (3.16%); the survey highlighted that the occurrence of citrus tristeza virus was significant, with about 24% of mandarin orchards and 14.5% of sweet orange groves CTV infected (Fig 1). According to Kitajima *et al* (1974) et Muller *et al* (1974), *Citrus sinensis* (L), *Citrus reticulata* (Blanco) et *Citrus paradisi* (Macf) are the principal host of CTV.

#### III.2.2. Age of orchards

The survey shown that CTV were present in all categories of citrus orchards regardless their age, unless the youngest plantations of less than 7 years. Prospection allowed the assessment of CTV status in function of age of trees, the lowest infection rate (1.7%) was recorded in the oldest trees (more than 40 years old), which were planted during the French colonial period, followed by the groves aged between 18 and 39 years old (3.7%). However, the highest infection rate was found in the tree of 8 to 17 years old, whereas no positive case was recorded in trees aged less than 7 years. In 2011 the first CTV infection case in Chlef valley

was detected, the tree was 6 years old, another case has been detected a year after, the tree was 62 years old ( Ali arous *et al*, 2016)

According to Rebours (1950), till the second world war, Algerian citrus industry was one of the most important in the Mediterranean basin, at that time bud-woods groves already exist, they were under rigorous varietal assessment and pests investigation. Thus it is difficult to know the origin of CTV infection found in old orchards, we think that natural dissemination by aphids and illegal grafting were probably associated to this situation, the first quick decline were detected since 1948, CTV has been mentioned associated to these cases. Infected vegetal material imported from overseas into Mediterranean countries including Algeria is the cause if these first contaminations (Bové, 1966).

### III.2.3. Origin of plant materials

The study has focused on the origin of plantation, Analysis shown that the incidence rate of the disease in orchard planted with plant material brought from Mitidja region were the highest, we recorded 11 contaminated orchard out of 48 tested; whereas , from two orchard created with plant material imported from Spain, one was infected (Tab 2)

**Table 2.** Situation of CTV/origin of plants

Origin/Plants	orchard (N)	Infected orchard	%
Mitidja	48	11	22.9
Unkown	39	03	7.6
Spain	02	01	50
Ain Defla	01	00	00
Bir safsaf(Chlef)	02	00	00

In old groves with unknown origin, the survey came out 3 contaminated orchards out of 39 analyzed. We stressed that trees produced locally were completely free of CTV.

Result of investigation highlights that 36 plants came from different nurseries of Mitidja have been diseased plus 7 imported plant from Spain, all plants were 8 to 17years old. This report excludes thus the role of aphid vectors; more likely, contamination took place in nurseries, since natural dissemination take long time to become significant (Gambra *et al*, 1988).

### III.2.4. Rootstocks

The survey has supported that sour orange rootstock *Citrus aurantium* (L) is dominant in Chlef valley: 85.7% of tested tree were grafted on it, only 12.3% were grafted on citrange *Poncirus trifoliata* (L), furthermore 14.2% of infected groves had trees with combination *C. sinensis* or *C. reticulata/C. aurantium* (Tab 3). Sour orange is well adapted to calcareous soils, which are widely present in the valley; it is also tolerant to gummosis and drought. but very sensible to Tristeza, the most destructive disease of citrus (Lacirignola and D'onghia, 2009; D'onghia *et al*, 2009; Roistacher, 1991).

**Table 3.** Situation of CTV/ rootstocks

rootstocks	orchards (N)	Infected orchards	Tested trees	Infected trees	% infection (trees)
sourorange	84	12	1440	44	3

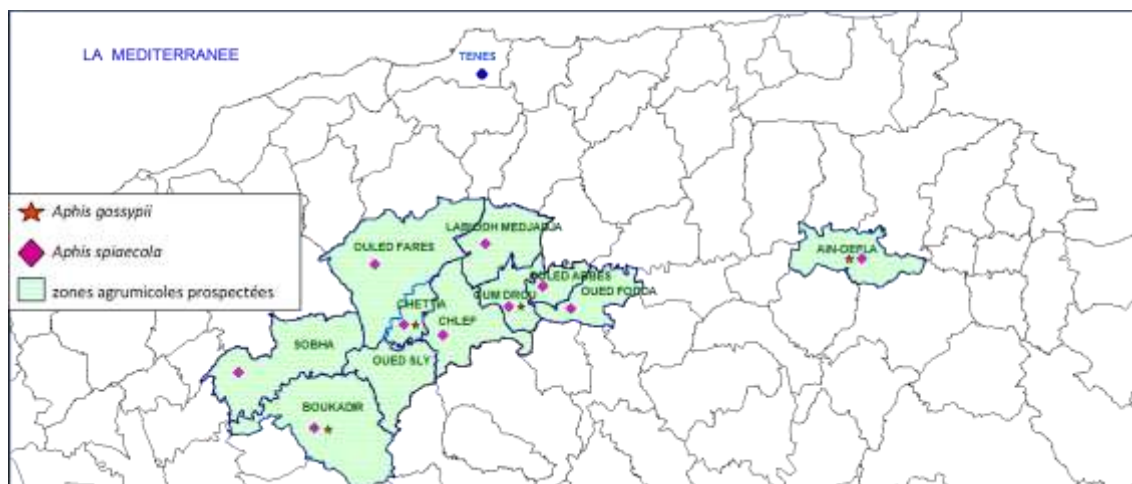
citrange	07	03	208	10	4.8
volkameriana	02	00	32	00	00

Even though the resistance of citrange and volkameriana *Citrus volkamerana* (Ten and Pasq) rootstocks to decline due to CTV, their use must consider other crucial biotic and abiotic parameters like (salinity, freeze, gummosis...), to ensure the future of citrus industry in any region (Yokomi, 2009).

#### IV. CTV Aphid vectors monitoring in the study area

A survey of frequency, abundance and infestation rate of aphid vectors population was done from March to May 2016 in 13 orchards located in 8 different areas.

Dichotomy identification of aphid populations encountered during the monitoring has revealed only two species among about fourteen related to citrus (Blackman et Eastop, 2000; Remaudière, 1996). Both species belong to the genus of *Aphis*, *Aphis gossypii* (Glover 1877), *Aphis spiraecola* (Patch 1934) (Homoptera: Aphidoidea) (Remaudière, 1996).



**Figure 2.** Repartition of *A. gossypii* and *A. spiraecola* in the study area.

*A. spiraecola* was the dominant species during the survey, the green citrus aphid is strongly related to rutaceae family (Blackman and Eastop, 2000) it is the dominant species in many Mediterranean countries (Abou Kubaa *et al*, 2009; Baloglu and Birisik, 2009 and Delkhosh and Tousi, 2009), whereas *Aphis gossypii* (Glover) was less frequent than *A. spiraecola* (Fig 2), the average of infestation rate was 2.8%, its occurrence frequency was around (23.8%), the infestation rate of the melon aphid during a survey carried out in 2010 in the valley recorded around 43% (Ali Arous *et al*, 2016). However, there was no evidence of the presence of the major vector *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy).

#### Conclusion

The survey has shown the rapid dissemination of tristeza virus through citrus groves of Chlef valley, its status is changing constantly. Investigation has revealed very important technical information and confirmed the role of nurseries and informal propagation materiel movement in the high incidence of the virus. Natural dissemination by aphids in the spread of the disease is not clearly established for which more studies are required. Management policy and strategies for disease control and quarantine should be taken in order to limit the spread of the disease through citrus orchards of the region.

## References

- Abou Kubaa R., Addante R., Jamal M. et D'onghia A.M. (2009). Occurrence and distribution of Citrus tristeza virus (CTV) and its vectors in Syria In: Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry Options Méditerranéennes, Série B: Studies and Research, N° B 65, - IAM-Bari "Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes".
- Ali Arous S., Houari A., Meziane M., Djelloul Berkane B., Madani B.K., Boudjeltia F. and Radjah F. (2016). Contribution à l'étude de la maladie de la Tristeza et ses pucerons vecteurs potentiels au niveau de la wilaya de Chlef: Séminaire international "Santé des plantes au service du développement": 12-14 Avril 2016. Chlef, Algérie.
- Baloglu S., Birisik N. (2009). Historical review of Citrus tristeza virus (CTV) and its vectors in turkey, In: Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry Options Méditerranéennes, Série B: Studies and Research, N° B 65, - IAM-Bari "Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes".
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moskovitz, M., Pursifull, D.E., Clark, M.F. and Loebenstein, G. (1979). The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 69: 190-194.
- Blackman R.L and Eastop V.F. (2000). Aphids on the world's crops. An identification and information guide. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Chichester. 466p.
- Bové J.M. (1966). Citrus virus diseases in the Mediterranean area. Proceedings of meeting on phytiatric and phytopharmacy. Marseille (France).
- Cambra M., Gorris M.T., Roman M.P., Terrada E., Garnsey S.M., Camarasa E., Olmos A and Colomer M. (2000). Routine detection of Citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies, pp 34-41.
- Cambra M., Serra J., Villalba D. and Moreno P. (1988). Present situation of the citrus tristeza virus in the Valencian Community, p.1-7. In: Timmer L.W. et Garnsey S.M (eds). Proc. 10th Conf. IOCV.
- D'Onghia AM. (2009). Citrus certification in the Mediterranean region. In: Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry Option Méditerranéennes, Série B: Studies and Research, N° B 65, - IAM-Bari "Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes".
- Delkhosh H.R. and Tousi N. (2009). Historical review of Citrus tristeza virus and its vectors in Iran, In: Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: A serious threat to the Mediterranean citrus industry. Option Méditerranéennes, Série B: Studies and Research, N° B 65, -IAM-Bari "Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes"
- DSA. Chlef (2016). Direction des services agricoles. Service statistiques. Bilan agricole 2015-2016.
- Gottwald T.R. and Hughes G. (2000). A new survey method for Citrus tristeza virus disease assessment. In Proc. 14th Conf. Of IOCV,(Brazil, 1998),IOCV Riverside: 77-78.
- Gottwald T.R., Garnsey S.M. and Yokomi R.K. (1993). Potential for spread of citrus tristeza virus and its vector, the brown citrus aphid. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 106: 85-94.
- Kitadajima E.W., Muller G.W. et Costa A.S. (1974). Electron microscopy of tristeza-infected *Passiflora gracilis* Jacq. In: LG Wethers M Cohen (eds). Proc. 6th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Univ. Calif. Div Agric. Sci. Richmond, California, pp 79-82.
- Lacirignola C. and D'Onghia A.M. (2009). The Mediterranean citriculture: production and perspectives. CIHEAM- Mediterranean Agronomic Institute, Valenzano (Ba) Italy, pp 13-17.

- Muller G.W., Costa A.S., Kitadjima E.W. and Camargo L.J.B. (1974). Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora* spp. In: LG Weathers, M Cohen (eds.). Proc. 6th Conf. Int. Citrus Virol., Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Richmond. California, pp 75-78.
- Rebours H. (1950). Les agrumes. Rapport de l'union des syndicats des producteurs d'agrumes en Algérie. 3e édit., 502p.
- Remaudière G. and Remaudière M. (1997). Catalogue of the world's Aphididae, INRA, Paris, 473p.
- Roistacher C.N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome (Eds.) 286p.
- Yokomi R.K. (2009). Natural spread of severe citrus tristeza virus isolates in citrus preinfected with mild CTV isolates. Proc. 11th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Riverside, pp 86-92.