

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS SETIF

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences
Département des Sciences Biologiques

Pour l'obtention du diplôme de :
DOCTORAT ES SCIENCE
EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Par :

M : ROUAG Nouredine

THEME

ETUDE DE LA FREQUENCE DES PRINCIPAUX VIRUS ET VIROIDES
PHYTOPATHOGENES DES *PRUNUS* CULTIVES EN ALGERIE

Soutenu le : 15 / 11 / 2009

Devant le Jury :

Président : M. HARZALLAH D. Professeur, UFAS SETIF
Directeur de thèse: M. GUECHI A. Professeur, UFAS SETIF
Examineur : M. FENNI M. Professeur, UFAS SETIF
Examineur : M. BENSOLTANE S.A. Professeur, Université Es-Senia Oran
Examineur : M. MAAMECHE B. MCA, Université Hadj Lakhdar Batna
Examineur : M. DEHIMAT L. MCA, Université Mentouri Constantine

Année universitaire : 2008 / 2009

Liste des Tableaux

	page
Tableau 1 : Production arboricole (en 1000 tonnes) dans le monde, en Méditerranée et en Algérie et principaux pays producteurs.....	3
Tableau 2 : Productions, superficies et rendements moyens de l'arboriculture fruitière enregistrés durant les campagnes 1995/1996 et 2004/2005.....	5
Tableau 3 : Evolution des productions des plants de pépinières en Algérie durant la période 1999 – 2001.....	6
Tableau 4 : Place des Prunus cultivés dans la zone d'étude en ha.....	37
Tableau 5 : Nombre d'échantillons par étage bioclimatique et par système de conduite.....	39
Tableau 6 : Nombre d'échantillons prélevés par espèce de rosacée fruitière cultivée...	40
Tableau 7 : Récapitulatif général de l'échantillonnage des viroïdes (2004 – 2008).....	41
Tableau 8 : Echantillons de rosacées fruitières et de rosier testés par ELISA, hybridation moléculaire et RT-PCR.....	54
Tableau 9 : Comparaison des niveaux d'infection selon les systèmes de conduite.....	65
Tableau 10 : Comparaison des niveaux d'infection selon les étages bioclimatiques...	66
Tableau 11 : Fréquence dans le cas de l'étage bioclimatique sub-humide.....	67
Tableau 12 : Fréquence dans le cas de l'étage bioclimatique semi-aride.....	68
Tableau 13 : Fréquence dans le cas de l'étage bioclimatique aride.....	69
Tableau 14 : Comparaison de l'infection des variétés cultivées et variétés porte-greffes.....	69
Tableau 15 : Sensibilité des variétés porte-greffe aux infections virales.....	70
Tableau 16 : Fréquence générale des virus selon les espèces de <i>Prunus</i> (variétés cultivées).....	71
Tableau 17 : Sensibilité des variétés d'abricotier aux infections virales.....	72
Tableau 18 : Sensibilité des variétés de nectarine aux infections virales.....	72
Tableau 19 : Sensibilité des variétés de pêcher aux infections virales.....	73
Tableau 20 : Sensibilité des variétés de prunier aux infections virales.....	74

Tableau 21 : Sensibilité des variétés d'amandier aux infections virales.....	75
Tableau 22 : Sensibilité des variétés de cerisier aux infections virales.....	75
Tableau 23 : Récapitulatif de la fréquence des virus étudiés sur les Prunus cultivés....	77
Tableau 24 : Fréquence du PNRSV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées.....	79
Tableau 25 : Fréquence du PDV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées...	81
Tableau 26 : Fréquence de l'ApMV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées.....	83
Tableau 27 : Fréquence du PPV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées....	85
Tableau 28 : Résultats de la RT-PCR et la Nested RT-PCR suite à une course d'électrophorèse sur gel d'acrylamide 5%.....	87
Tableau 29 : Valeur des densités optiques enregistrées après trois intervalles de temps.....	89
Tableau 30 : Valeur de densité optique enregistrée entre deux périodes d'échantillonnage.....	91
Tableau 31 : Taux d'infection des rosacées fruitières à noyaux par les deux viroïdes..	93
Tableau 32 : Niveau des infections dues à PLMVd sur les rosacées fruitières à noyaux.....	97
Tableau 33 : Niveau des infections dues à HSVd sur les rosacées fruitières à noyaux..	99
Tableau 34 : Récapitulatif des résultats d'analyse obtenus par les trois techniques utilisées	103
Tableau 35 : Comparaison des résultats obtenus par des tests sérologiques et moléculaires (ELISA, hybridation moléculaire et RT-PCR).....	105

Liste des Photos

	page
Photo 1. Symptôme d'oak leaf pattern (en feuille de chêne) associé au PNRSV sur rosier, A - début de l'apparition du symptôme, B - Symptôme assez prononcé.....	60
Photo 2. Symptômes de PNRSV sur amandier, A - des taches chlorotiques circulaires évoluant vers des taches nécrotiques (perforations ou criblures) B.....	60
Photo 3. Symptôme représentant les aires chlorotiques associées aux infections de PNRSV sur prunier.....	61
Photo 4. Symptômes associés à la présence du PDV sur cerisier A - taches chlorotiques très légères sur feuilles, B - des taches brunâtres sur fruits.....	61
Photo 5. Mosaïque chlorotique blanchâtre et jaunâtre associés à la présence de l'ApMV. A - sur prunier, B - sur amandier.....	62
Photo 6. Symptômes sont associés au PLMVd, A - grandes aires chlorotiques sur feuilles, B - plages blanchâtres conjuguées avec des fissures sur fruits de pêcher.....	62
Photo 7. Analyse des produits de la RT-PCR sur gel d'acrylamide 5%.....	86
Photo 8. Radio développée après hybridation moléculaire de la membrane de nitrocellulose par tissue immunoprinting hybridization, cas du PLMVd.....	94
Photo 9. Radio développée après hybridation moléculaire de la membrane de nitrocellulose par tissue immunoprinting hybridization, cas du HSVd.....	94
Photo 10. Hybridation en Dot blot des extraits de TNA d'échantillons de rosacées fruitières à noyaux, hybridés avec des sondes cRNA spécifiques pour PLMVd.....	95
Photo 11. Hybridation en Dot blot des extraits de TNA d'échantillons de rosacées fruitières à noyaux, hybridés avec des sondes cRNA spécifiques pour HSVd.....	95
Photo 12. Hybridation moléculaire de 21 échantillons de rosacées fruitières de la région d'étude.....	101
Photo 13. Détection synchronique des virus par RT-PCR dans 21 échantillons de prunus cultivés sur gel de polyacrylamide 5%.....	103

Liste des Schémas

	Page
Schéma 1. Représentation informatisée d'une particule des Ilarvirus montrant un arrangement des pentamères et hexamères dans une structure quasi icosaédrique (T=3) des Ilarviruses.....	7
Schéma 2. Représentation du génome de l'ApMV similaire à ceux des membres du genre des ilarvirus.....	8
Schéma 3. Structure des <i>Pospiviroid</i> montrant cinq domaines (T, P, C, V et Tr).....	27
Schéma. 4. Les différentes étapes du diagnostic sérologique par DAS-ELISA.....	43
Schéma 5. Protocole général de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	47
Schéma 6. Extraction non organique des acides nucléiques pour la détection des viroïdes.....	50
Schéma 7. Les étapes de la technique de tissue immunoprinting hybridization pour la détection des viroïdes.....	53

Liste des Figures

	page
Fig. 1. Carte géographique représentant la zone d'étude touchée par l'échantillonnage.....	37
Fig. 2. Représentation graphique comparant la fréquence des quatre virus sur les espèces de rosacées fruitières à noyaux.....	77
Fig. 3. Part de fréquence du PNRSV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés.....	79
Fig. 4. Part de fréquence du PDV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés...	81
Fig. 5. Part de fréquence de l'ApMV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés.....	83
Fig. 6. Part de fréquence du PPV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés...	85
Fig. 7. Représentation graphique des densités optiques après trois intervalles de temps.....	89
Fig. 8. Représentation graphique comparant les densités optiques enregistrées entre deux périodes d'échantillonnage printanier et estival, obtenues en DAS-ELISA cas du PNRSV.....	91
Fig. 9. Représentation graphique montrant la fréquence des deux viroïdes dans les espèces de rosacées fruitières à noyaux.....	93
Fig. 10. Représentation graphique comparant de la fréquence du PLMVd sur les espèces de rosacées fruitières à noyaux.....	97
Fig. 11. Représentation graphique comparant de la fréquence du HSVd sur les espèces de rosacées fruitières à noyaux.....	99

Liste des abréviations

ACLSV	Apple Chlorotic Leaf Spot Virus
AgNO₃	Nitrate d'Argent
ALRSV	Apricot Latent Ringspot Virus
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ApL	Apricot Latent Virus
ApMV	Apple Mosaic Virus
APS	Ammonium Persulfate
ArMV	Arabis Mosaic Virus
AsLV	Asian Latent Virus
ASPV	Apple Stem Pitting Virus
bp	Base Paire
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Degrés Celsius
CCR	Conserved Central Region
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CGRMV	Cherry Green Ring Mottle Virus
CLRV	Cherry Leaf Roll Virus
CP	Coat Protein
CRLV	Cherry Rasp Leaf Virus
CSPD	Chemiluminescent Substrate Phosphatase DiSodium
cv.	Cultivar
CVA	Cherry Virus A
Da	Dalton
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich ELISA
DASI-ELISA	Double Antibody Sandwich Indirect ELISA
dATP,	Deoxynucleotide Adenine Triphosphate
dCTP,	Deoxynucleotide Cytosine Triphosphate
dGTP,	Deoxynucleotide Guanine Triphosphate
DIG	Digoxygenine
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphate
DO	Densité Optique
dTTP	Deoxynucleotide Thymine Triphosphate
EDTA	Ethylene diamino Tetra Acetic Acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESFY	European Stone Fruit Yellows Phytoplasma
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization
Fig.	Figure
g	Gramme
GF305	Garde Ferrade Pêcher 305
h	Heure
ha	Hectare
HCl	Acide Hydrochlorohydrique
HSVd	Hop Stunt Viroid
IEM	Immune Electron Microscopy
IgG	Immunoglobulin G
ISEM	Immunosorbent Electron Microscopy
KCl	Chlorure de Potassium.

kDa	Kilo Daltons
KH₂PO₄	Phosphate de Potassium monobasique (anhydre).
M	Molaire
MAbs	Monoclonal antibodies
mg	Milligramme
mg/ml	Milligramme/ Millilitre
MgCl₂	Chlorure de Magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MP	Protéine de mouvement
mRNA	Acide Ribonucléique messenger
MH	Molecular Hybridization
MW	Molecular Weight
MyLRSV	Myrobolan Latent Ringspot Virus
N°.	Numéro
Na₂ H₂O	Phosphate de Sodium, dibasique anhydre.
Na₂ SO₄	Sulfate de Sodium (anhydre).
Na₂CO₃	Carbonate de Sodium (anhydre).
NaCl	Chlorure de Sodium
NaHCO₃	Bicarbonate de Sodium.
NaLS	Sodium Lauryl Sarcosine
NaN₃	Sodium Azide.
NaOH	Soude
nm	Nanometre
nPP	Nitrophényl Phosphate.
nt	Nucléotide
ORF	Open Reading Frame
p/v	poids/volume
Pabs	Polyclonal antibodies
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBNSPaV	Plum Bark Necrosis Stem Pitting-associated Virus
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffer Saline Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDV	Prune Dwarf Virus
PLMVd	Peach Latent Mosaic Viroid
PNB	Produit National Brut
PNDA	Plan National de Développement Agricole
PNRSV	Prunus Necrotic Ringspot Virus
PPV	Plum Pox Virus
PPV-C	Plum Pox Virus (Cherry strain)
PPV-D	Plum Pox Virus (Dideron strain)
PPV-EA	Plum Pox Virus (El Amar strain)
PPV-M	Plum Pox Virus (Marcus strain)
PPV-Rec	Plum Pox Virus (Recombinant)
qx	Quintaux
qx/ha	Quintaux / hectare
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Acide Ribonucléique
RNase	Ribonuclease

RpRSV	Raspberry Ringspot Virus
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
s	Seconde
SAU	Surface Agricole Utile
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SLRSV	Strawberry Latent Ringspot Virus
spp.	Espèces
SSC	Saline Sodium Citrate
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
STE	Sodium Tris-EDTA
StPV	Stocky Prune Virus
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borate-EDTA
TBRV	Tomato Black Ring Virus
TNA	Total Nucleic Acid
TNAs	Total Nucleic Acids
ToRSV	Tomato Ringspot Virus
tr/mn	tour/minute
Tris	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane
TSV	Tobacco Strie Virus
UV	Ultra Violet
V	Volt
µl	Microlitre

REMERCIEMENTS

Ecrire les remerciements... moment presque mythique (...), symbole de la fin souvent inespérée d'une bataille nommée « La Thèse ».

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs les professeurs, Prof. Daoued Harzallah président du jury, et les Prof. Laid Dehimat, Prof. Bakir Maameche, membres de jury pour avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à M. le professeur Abdelhadi Guechi, mon directeur de thèse, qui a mis toutes ses connaissances et son expérience à ma disposition, en me faisant part de ses suggestions les plus judicieuses et de ses critiques les plus constructives. J'ai vraiment apprécié sa façon de travailler, son efficacité et son enthousiasme. Bref, un directeur de thèse digne de ce nom. Et dorénavant un ami. J'espère sincèrement que nous pourrons continuer à travailler ensemble.

Je remercie également M. Arben Myrta, co-directeur de thèse, avec qui j'ai travaillé à l'IAM de Bari, m'a toujours offert la confiance, le temps et les moyens nécessaires à avancer dans ma vie de doctorant. Son optimisme et sa bonne humeur ont fait de tous les moments où nous avons travaillé ensemble des moments agréables, complices et gais.

Mes remerciements vont aussi à tout le staff administratif de L'IAM Bari sous la direction du Dott. C. Lacirignola et le corps professoral, en particulier le Prof. A.M. D'Onghia responsable de la section Integrated Pest Management et du laboratoire de phytovirologie, qui m'ont offert l'opportunité de fréquenter et d'utiliser tous les moyens du laboratoire pour l'accomplissement de cette thèse. Merci aussi à Khaled Djelouah, Slavica Matic, Maher Al Rwahinh et Samer Jarrar chercheurs à l'IAM de Bari, pour leurs interventions ponctuelles et enrichissantes dans mon travail

Enfin, pour clore ces remerciements dans mon entourage professionnel, je voudrai adresser mes vifs remerciements à tous les agriculteurs et responsables de toutes les structures agricoles qui nous ont aidé et facilité la tâche dans leurs vergers, pépinières et parcs à bois.

Je me tourne maintenant vers toutes les personnes qui m'entourent depuis longtemps et dont le soutien m'a été si cher pendant les moments difficiles : ma chère femme Saliha et mes adorables enfants, Nadine, Nidhal, Younes et Douaâ que je tiens à embrasser très fort et leurs dédié ce mémoire.

Noureddine

Sommaire

	Page
Liste des Tableaux	
Liste des Photos	
Liste des Schémas	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
1.1 - Importance économique de l'arboriculture	3
1.1.1 - Production fruitière arboricole dans le monde et en méditerranée.....	3
1.1.2 - Production fruitière arboricole en Algérie.....	4
1.1.3 - Evolution de la production des plants pépinières.....	5
1.2 - Principales maladies virales et de type viral des arbres fruitiers à noyaux	6
1.2.1 - Les maladies virales.....	6
1.2.1.1 - Genre des Ilarvirus.....	7
1.2.1.1.1 - Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV)	8
1.2.1.1.2 - Prune Dwarf Virus (PDV)	12
1.2.1.1.3 - Apple Mosaic Virus (ApMV)	15
1.2.1.2 - Genre de Potyvirus.....	17
1.2.1.2.1 - Plum Pox Virus (PPV) : Sharka.....	18
1.2.1.3 - Genre des Trichovirus.....	22
1.2.1.3.1 - Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV)	22
1.2.1.4 - Genre des Foveavirus.....	24
1.2.1.5 - Genre de Closterovirus.....	25
1.2.1.6 - Genre des Nepovirus.....	25
1.2.2 - Les maladies induites par des agents non identifiés.....	26
1.2.3 - Viroïdes des rosacées à noyaux.....	26
1.2.3.1 - Peach latent mosaic Viroid (PLMVd)	27
1.2.3.2 - Hop Stunt Viroid (HSVd)	29

1.2.4 - Les maladies de phytoplasmes des rosacées fruitières à noyaux.....	32
1.2.4.1 - European stone fruits yellows phytoplasma (ESFY)	32
1.3 - Lutte et techniques d'assainissement.....	32
1.3.1 - La micropropagation des apex méristématiques.....	33
1.3.2 - Assainissement par thermothérapie.....	33
1.3.3 - Assainissement par chimiothérapie.....	34
1.3.4 - Obtention de la résistance par transgénèse.....	35
1.3.5 - Sélection sanitaire et certification.....	35

Chapitre II : Matériels et méthodes

2.1 - Enquêtes aux champs.....	37
2.2 – Echantillonnage.....	38
2.2.2 - Récolte des échantillons pour la détection des virus	38
2.2.1 - Récolte des échantillons pour la détection des viroïdes.....	40
2.3 - Détection sérologique des virus.....	41
2.3.1 - Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA)	41
2.4 - Détection moléculaire des virus.....	44
2.4.1 - Extraction des acides nucléiques Totaux.....	44
2.4.2 - Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)	44
2.4.2.1. Synthèse de DNA complémentaire (cDNA)	44
2.4.2.2 - PCR Primers utilisées.....	45
2.4.2.3 - Nested RT-PCR.....	45
2.4.3 - Analyse des produits de la PCR.....	46
2.4.4 - Coloration argentée.....	46
2.5 - Détection moléculaire des Viroïdes.....	48
2.5.1 - Hybridation moléculaire en dot blot.....	48
2.5.1.1. Extraction totale d'ARN.....	48
2.5.1.2. Précipitation à l'éthanol	48
2.5.1.3. Dénaturation de l'échantillon.....	49
2.5.1.4 Amorces utilisées.....	49
2.5.2 - Technique de Tissue immunoprinting hybridization.....	51
2.5.2.1 - Pré-hybridation et hybridation.....	51
2.5.2.2 - Détection chimioluminescente.....	51

2.6 - Application de trois techniques de détection synchronique des Ilarvirus	54
2.6.1 - Sources de virus.....	54
2.6.2 - Extraction des acides nucléiques.....	55
2.6.2.1 - Extraction des acides nucléiques totaux (TNA)	55
2.6.2.2 - Extraction des acides nucléiques totaux par méthode Non-organique.....	55
2.6.3 - Hybridation en Dot-Blot.....	55
2.6.3.1 - Préparation des membranes et hybridation.....	55
2.6.3.2 - Détection immunologique.....	55
2.6.3.3 - Détection chemiluminiscente.....	56
2.6.4 - Amplification par polymérisation en chaîne RT-PCR.....	56
2.6.4.1 - Transcription inverse.....	56
2.6.4.2 - Réaction de polymérisation en chaîne.....	57

Chapitre III : Résultat et discussions

3.1 - Inspection au champ et symptomatologie.....	58
3.1.1 - Symptômes observés.....	58
3.2 - Fréquence des principaux virus dans la région d'étude.....	63
3.2.1 - Niveau de l'infection générale par les virus.....	63
3.2.2 - Fréquence des principaux virus selon le système de conduite.....	63
3.2.3 - Fréquence des principaux virus par étage bioclimatique.....	65
3.2.3.1 - Fréquence dans l'étage sub-humide.....	66
3.2.3.2 - Fréquence dans l'étage semi-aride.....	67
3.2.3.3 - Fréquence dans l'étage aride.....	68
3.2.4 - Sensibilité des rosacées aux infections virales.....	69
3.2.4.1 - Niveau de l'infection générale des variétés porte-greffe.....	70
3.2.4.2 - Niveau de l'infection générale des variétés cultivées.....	70
3.2.4.3 - Sensibilité des variétés d'abricotier aux infections virales.....	71
3.2.4.4 - Sensibilité des variétés de nectarine aux infections virales.....	72
3.2.4.5 - Sensibilité des variétés du pêcher aux infections virales.....	73
3.2.4.6 - Sensibilité des variétés de prunier aux infections virales.....	73
3.2.4.7 - Sensibilité des variétés d'amandier aux infections virales.....	74
3.2.4.8 - Sensibilité des variétés de cerisier aux infections virales.....	75
3.2.5 - Fréquence individuelle des principaux virus étudiés.....	76

3.2.5.1 - Fréquence du PNRSV dans les rosacées fruitières à noyaux.....	78
3.2.5.2 - Fréquence du PDV dans les rosacées fruitières à noyaux.....	80
3.2.5.3 - Fréquence de l'ApMV dans les rosacées fruitières à noyaux.....	82
3.2.5.4 - Fréquence du PPV dans les rosacées fruitières à noyaux.....	84
3.3 - Détection des virus rares : ACLSV, CVA, CGRMV, ApLV et PBNSPaV.....	86
3.4 - Stabilité du PNRSV aux basses températures de conservation (-20°C)	88
3.5 - Influence des conditions climatiques sur la concentration du PNRSV au champ...	90
3.6 - Détection moléculaire des principaux viroïdes	92
3.6.1 - Niveau de l'infection générale par les viroïdes.....	92
3.6.1.1- Fréquence du PLMVd sur les rosacées fruitières à noyaux.....	96
3.6.1.2 - Fréquence du HSVd sur les rosacées fruitières à noyaux.....	98
3.7 - Application de la détection synchronique sur des échantillons de champs...	100
3.7.1 - Détection synchronique des Ilarvirus par hybridation moléculaire.....	100
3.7.2 - Détection synchronique par multiplex RT-PCR.....	102
3.7.3- Comparaison des résultats des trois techniques.....	103
3.7.4 - Perspectives d'application.....	104
Conclusion générale.....	106
Références bibliographiques	
Annexes	
Article	
Résumés	

Introduction :

Depuis longtemps, l'homme s'est intéressé de prendre soin de ses arbres fruitiers, car dans le verger, a trouvé sa nourriture (fruits,...), un endroit de loisir et de détente, mais aujourd'hui avec le développement économique, le secteur fruitier a pris une autre orientation et constitue un intérêt industriel important dans les pays.

L'arboriculture, spéculation très importante de l'agriculture, constitue une véritable entreprise, hautement spécialisée, très exigeante en matière d'investissement, et la tendance aujourd'hui est dirigée vers la création de grands vergers et non plus aux petits vergers gérés familialement. En Algérie, l'arboriculture occupe environ 6 % de la surface agricole utile (SAU) (Anonyme, 2002).

En Algérie, à partir de l'année 2000, une nouvelle stratégie a été adoptée dans le secteur arboricole. Elle vise l'amélioration et le développement de la production et des rendements, vu leurs valeurs économiques et industrielles. En encourageant les agriculteurs d'établir de nouveaux vergers dans des régions céréalières, l'état s'est vu être affronter à un grand problème, d'une part, les agriculteurs acceptent difficilement le changement de leur système cultural, d'une autre part ne maîtrisent pas les techniques arboricoles.

Cette nouvelle dynamique, a contribué dans le développement d'activité parallèle, telle la création de nouvelles pépinières spécialisées (vigne, olivier, arbres fruitiers et agrumes), dans des régions possédant des conditions pédo-climatiques favorables et des traditions culturelles.

Par ailleurs le secteur arboricole fait face, à plusieurs difficultés et à de sérieux problèmes. De ces derniers, on citera un certain nombre de pathologies d'origine cryptogamiques et bactériennes, dont des procédés de lutte existent et sont plus ou moins connus et maîtrisés par les intervenants dans le domaine de la protection phytosanitaire. En plus de ces derniers, s'ajoute les phytopathologies virales et de type viral, qui causent des pertes considérables sur différents arbres fruitiers, et dont on reste incapable non seulement de diagnostiquer et d'identifier mais également de lutter contre.

L'ensemble de ces agents phytopathogènes, réduit non seulement la production en quantité, mais également la qualité fruitière. Les conséquences qui ont résultent se font sentir sur l'agriculture en particulier et sur l'économie d'une façon générale.

La rude concurrence au niveau mondial dans l'industrie arboricole, et les restrictions imposées aux produits fruitiers surtout sur le plan phytosanitaire, à pousser plusieurs centres de recherches mondiaux, à s'intéresser de près à toutes les maladies des arbres fruitiers, surtout liées aux virus et agents de type viral.

Considérant le fait que l'arboriculture fruitière en Algérie, commence à prendre de l'ampleur et prendre une place importante dans l'agriculture algérienne. Et les objectifs tracés ne peuvent être atteints que par l'établissement d'un programme de certification des espèces fruitières, garantissant une durabilité des vergers créés et des investissements consentis.

Considérant la gravité des problèmes phytosanitaires, le peu d'informations sur la présence des maladies causées par les virus et les agents de type viral et leur incidence sur les rosacées fruitières en Algérie.

En prenant compte de tout cela, et pour contribuer à la résolution des problèmes phytosanitaires en général et celui des virus en particulier, la présente étude est inscrite dont l'objectif principal est l'évaluation de l'état phytosanitaire des arbres fruitiers à noyaux en matière d'infection virale et de type viral.

L'étude proprement dite est articulée sur quatre parties expérimentales bien distinctes mais qui se rejoignent toutes pour répondre à l'objectif principal précité, dont le premier volet du travail expérimental vise l'étude de la fréquence des principaux virus des prunus cultivés dans la région de l'étude, à travers l'analyse sérologique par DAS-ELISA et moléculaire par RT-PCR, et Nested-PCR des échantillons récupérés.

Le deuxième volet de l'étude est affecté à l'étude de la fréquence des principaux viroïdes des prunus cultivés dans la région de l'étude à travers un diagnostic moléculaire basé sur l'emploi de deux techniques à savoir la Tissue immunoprinting hybridization et Dot-Blot hybridization.

Une partie du troisième volet s'intéresse à l'étude de l'influence des conditions climatiques, en particulier les variations de températures sur la concentration virale du PNRSV entre deux périodes différentes d'échantillonnage printanière et estivale. La deuxième partie s'intéresse à l'action des basses températures de conservation sur le titre viral dans les échantillons à travers des tests sérologiques.

L'application de méthodes de diagnostic simple, sensible et fiable, capables d'être utilisées dans un diagnostic de routine en vue de la détection synchronique des trois Ilarvirus a fait l'objectif majeur de l'ultime partie. Expérimentalement, il est réalisé à travers la comparaison de trois techniques de diagnostic synchronique des Ilarvirus (sérologique, hybridation moléculaire et multiplex RT-PCR) appliquées sur des échantillons provenant directement des vergers arboricoles.

Chapitre I : Revue bibliographique

- **Importance économique de l'arboriculture**
- **Principales maladies virales et de type viral des arbres fruitiers à noyaux**
- **Lutte et techniques d'assainissement**

Chapitre I : Revue bibliographique

1.1 - Importance économique de l'arboriculture

1.1.1 - Production fruitière arboricole dans le monde et en méditerranée

Selon l'organisation pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO), la production mondiale en arboriculture fruitière était égale à 465 millions de tonnes en 2005. Cette production a enregistré une augmentation d'environ 30 % durant les dix dernières années. 42% de la production mondiale vient de l'Asie, 14% d'Europe, 13% d'Amérique du Sud, 12,5% d'Amérique du Nord, 12,5% d'Afrique et enfin 6% est produite en Océanie (Anonyme, 2005).

Concernant les principaux pays producteurs, la Chine vient en première position avec environ 36% de la production, alors que l'Inde a produit 12% de la production mondiale (Tableau 1). D'autres pays sont considérés comme de grands pays producteurs tel que le Brésil, les États-Unis (1^{er} pays exportateur), la Turquie, l'Iran (Anonyme, 2005).

Les pays du bassin méditerranéen, considérés autrefois comme région arboricole par excellence, avec 26% de la production mondiale de fruits au début des années 1970, ne couvrent actuellement qu'environ 16% de la production mondiale de fruits. Cette lente érosion s'explique notamment par le développement de la production dans les pays sud-américains, et la montée en puissance de la Chine, cette dernière assure désormais 36% de la production mondiale en fruits (Giove et Abis, 2007).

Tableau 1 : Production arboricole (en 1000 tonnes) dans le monde, en Méditerranée et en Algérie et principaux pays producteurs. (Anonyme, 2005)

Fruit	Monde	Méditerranée		Algérie		Principaux pays producteurs
	Production	Production	%	Production	%	
Abricots	3385	2023	60	145	4	Turquie – Iran
Amandes	1713	798	47	45	3	USA - Espagne
Cerises	3000	883	29			Turquie
Agrumes	24005	5215	22	143	1	Brésil - États-Unis
Dattes	5087	2075	41	516	10	Irak, Algérie
Figues	1022	813	80	70	7	Turquie - Egypte
Pêches	1770	5563	31	95	1	Chine – Italie
Raisins	66197	29835	45	334	1	Italie – France
Olives	14791	14347	97	316	2	Espagne - Italie

1.1.2 - Production fruitière arboricole en Algérie

La contribution de l'arboriculture dans l'agriculture nationale est largement insuffisante. Elle ne couvre que 6% de la surface agricole utile (SAU), alors que les céréales couvrent environ (33%), les fourrages (6%), les cultures maraîchères (3%) tandis que les jachères occupent près de la moitié de la SAU. Malgré les potentialités considérables de l'agriculture algérienne, la production agricole nationale, arrive à satisfaire à peine la demande en produits agricoles, ne dépassant guère les 32 % en céréales, 30 % en légumes secs, et 39 % en produits laitiers (Anonyme, 1998).

A partir des années 2000, l'Algérie, en adoptant le plan national pour le développement de l'agriculture (PNDA), visait le développement de la filière "arboriculture fruitière" à travers l'accroissement du rythme de plantation, l'arrachage des vieilles plantations et l'augmentation des quantités à l'exportation.

Cette politique agricole s'est traduite par l'augmentation des superficies et des productions. En effet, le secteur arboricole et viticole qui couvrait 432 660 ha en 1996, produisant 12 215 020 qx est passé en 2005 à une superficie fruitière de 640 930 ha, produisant 25 674 534 qx (tous fruits confondus). Quant aux rendements, même si on a assisté à une légère amélioration passant de 37,66 qx/ha comme rendement moyen en 1996 à 48,56qx/ha enregistré en 2005 (Tableau 2). Cette amélioration reste insuffisante comparativement aux normes internationales (Anonyme, 2007).

L'augmentation des superficies et des productions est perceptible dans toutes les spéculations arboricoles ; ainsi les vergers agrumicoles qui ne représentaient que 40280ha en 1996 produisant 3227480qx, dont 60 % des vergers, dépassent l'âge de 30 ans et leur potentiel productif est en déclin, ont atteint 43995ha en 2005 produisant 6274060qx ; avec un rendement qui oscillait entre 80,1 en 1996 et 110,83 qx/ha en 2005 (Anonyme, 2007).

Concernant la production viticole, le vignoble occupait 56580ha en 1996, produisant 1967010qx, répartie en raisin de table et raisin de cuve, dont 90 % sont localisés à l'ouest du pays. Ce verger est passé à 69633ha en 2005 produisant 3340210qx ; avec un rendement qui s'est améliorait entre 1996 avec 34,8 qx/ha et 2005 avec 38,37 qx/ha (Anonyme, 2007).

En ce qui concerne la production des rosacées fruitières (pépins et noyaux), à la fin du 1996, le verger national en arbres fruitiers couvrait 88000ha en 1996, produisant 2859340qx et il est arrivé à 140044ha en 2005 produisant 7732440qx ; avec un rendement qui oscillait entre 32,5 enregistré en 1996 et 43,5 qx/ha en 2005 (Anonyme, 2007).

La production oléicole, spéculation traditionnelle et familiale par excellence, couvrait en 160780ha en 1996, produisant 1309640qx (olive d'huile et olive de table). Ce verger est

passé à 239352ha en 2005 produisant 3164890qx avec un rendement qui oscillait entre 8,1 en 1996 et 13,84 qx/ha en 2005.

En fin ce qui à trait à la production phoenicicole, les superficies plantées en palmier dattier, étaient de l'ordre de 87020ha en 1996, produisant 2851550qx de dattes, et sont passées à 147906ha en 2005 produisant 5162934qx ; avec un rendement qui oscillait entre 32,8 en 1996 et 36,37 qx/ha en 2005. Ceci place l'Algérie au quatrième rang mondiale avec 10 % de la production mondiale (Anonyme, 2007).

Tableau 2 : Productions, superficies et rendements moyens de l'arboriculture fruitière enregistrés durant les campagnes 1995/1996 et 2004/2005.

Fruits	Campagne 1995/ 1996			Campagne 2004/2005		
	Sup. (ha)	Prod. (Qx)	Rdt. (qx/ha)	Sup. (ha)	Prod. (Qx)	Rdt. (qx/ha)
Abricots	13040	412330	31,6	22888	1450965	63,4
Prunes	6520	253940	38,9	10002	462160	46,2
Pêches	8500	386540	45,5	13619	950590	69,8
Cerises	2510	52960	8	2385	30810	12,9
Amandes	24860	198690	21,1	35099	453785	12,9
Nèfles	1890	131290	69,5	2378	254125	106,9
Poires	9930	583560	58,8	17218	1581930	91,9
Pommes	11930	641400	53,8	24279	1997120	82,3
Grenades	2890	169540	58,7	6239	413540	66,3
Coings	/	/	/	1344	64220	47,8
Caroubes	1250	29090	23,3	1048	30030	28,7
Noyaux et pépins	88000	2859340	32,5	140044	7732440	55,2
Olives	160780	1309640	8,1	239352	3164890	13,2
Agrumes	40280	3227480	80,1	43995	6274060	142,6
Dattes	87020	2851550	32,8	147906	5162934	34,9
Raisins	56580	1967010	34,8	69633	3340210	35

1.1.3 - Evolution de la production des plants pépinières

Avec le lancement du plan national pour le développement de l'agriculture (PNDA) durant la campagne agricole 1999/2000, surtout dans son chapitre consacré à la reconversion des terres agricoles avec leurs potentialités pédoclimatiques, pour la création de nouveaux vergers arboricoles, on avait assisté à une forte demande en plants de pépinières. Ceci à encourager le secteur de production de plants pépinières à créer de nouvelles pépinières et à produire davantage pour répondre à un demande sans cesse grandissante. A cet effet, la

production en plants pépinières était de l'ordre de 253 000 plants fruitiers, en 1999, passant à 17135704 plants durant l'année 2001 (Tableau 3) (Anonyme, 2007).

Tableau 3 : Evolution des productions des plants de pépinières en Algérie durant la période 1999 – 2001 (Anonyme, 2007).

Produit (unités) \ Année	1999	2000	2001	Moyenne 1999-2001
Plantes forestières	18086000	30147705	17135704	21789803
Plantes fruitières	253000	741631	1345568	780066
Plantes Fourragères	5998000	5773046	4632870	5467972
Plantes ornementales	1319000	2327251	1762823	1803025

1.2 - Principales maladies virales et de type viral des arbres fruitiers à noyaux

1.2.1 - Les maladies virales

Plus d'une trentaine de virus identifiés, une dizaine de maladies de type viral, cinq procaryotes intercellulaires et deux viroïdes affectent les rosacées à noyaux, ont été rapportés à travers les régions arboricoles du monde (Hadidi *et al.*, 1998, Desvignes, 1999).

Les rosacées à noyaux (*Prunus* spp.), sont affectées par de nombreux virus, les plus importants, appartiennent aux genres suivants: Ilarvirus, Potyvirus, Trichovirus et Nepovirus. D'autres virus ont été également rencontrés mais sont moins fréquents, appartiennent aux genres : Closterovirus, Cucumovirus, Tombusvirus, Tobamovirus, Foveavirus et aux Capillovirus.

Les virus membres de ces genres induisent de sérieuses maladies et causent des pertes économiques évidentes à l'arboriculture fruitière à noyaux dans la région méditerranéenne. Les pertes provoquées varient de légères, le cas de l'ACLSV à l'extrêmement grave, le cas du PPV et les effets néfastes des Ilarvirus sur les rosacées à noyaux se situent entre ces deux limites (Uyemoto et Scott, 1992).

Les principaux problèmes posés par les virus et agents de type viral sur les plantes résident dans le fait, que ces agents phytopathogènes sont distribués systématiquement dans la plante et aucun remède chimique n'est disponible. Le seul traitement possible est orienté vers la prévention à travers l'utilisation des plantes certifiées, c'est à dire, des plantes indemnes de virus et qui nécessitent une protection contre les éventuelles réinfections (Dunez, 1986).

1.2.1.1 - Genre des Ilarvirus

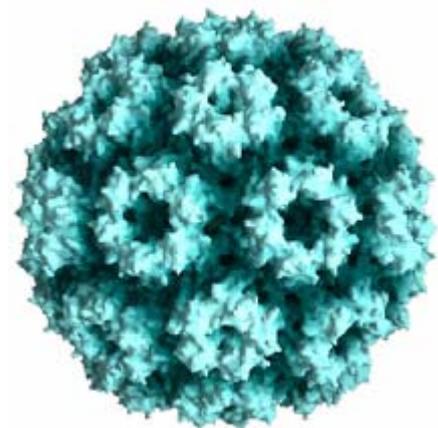
Les virus du genre Ilarviruses (virus labile isométrique) dont le virus de strie du Tabac (TSV), est le virus type (Dunez, 1988), diffèrent entre eux considérablement dans leurs propriétés biologiques. La plupart des Ilarvirus, infectent une large gamme de plantes dont la plupart sont des plantes pérennes. Toutes les espèces appartenant au genre *Prunus* sont considérées comme plantes hôtes, à part quelques exceptions.

Les Ilarvirus peuvent être transmis par inoculation mécanique et la transmission par graine est commune parmi les Ilarvirus et certains d'entre eux sont transmis par le pollen (Mink, 1992, Digaro et al., 1992). Les plus importants Ilarvirus affectant les rosacées à noyaux dans le bassin méditerranéen sont : le Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), le Prune dwarf virus (PDV) et le Apple mosaic virus (ApMV) (Smith et al., 1992).

Structure et organisation du génome des Ilarviruses

Les Ilarviruses ont de particules quasi sphériques, une structure légèrement pléomorphe, avec un diamètre variant de 23-35nm. Ils sédimentent en 3 ou 4 différentes parties avec un coefficient de sédimentation variant entre 75 et 125S (Francki et al., 1985). Les particules contiennent un seul type de protéine du cap (coat protein, CP) et sont subdivisées en unités d'un poids moléculaire variant de 24 et 30 x 10³. Chaque virion est formé de 180 CP molécules, arrangées dans une structure quasi icosaédrique avec une symétrie T=3 (Schéma 1).

Schéma 1. Représentation informatisée d'une particule des Ilarvirus montrant un arrangement des pentamères et hexamères dans une structure quasi icosaédrique (T=3) (Sgro, 1986).



Les Ilarviruses ont une organisation génomique similaire et codent pour des produits analogues à ceux produit par des membres des genres *Bromovirus*, et *Alfamovirus*. Le RNA1 et RNA2 de la famille des *Bromoviridae* code pour des protéines P1 et P2 respectivement, constituant du complexe polymérasique (Quadt et al., 1991). Le RNA est bicistronique avec

deux structures de lectures ouvertes (open reading frame, ORF) codant pour la protéine de mouvement (MP) et la protéine du cap (CP) (Stussi-Garaud *et al.*, 1987) (Schéma 2).

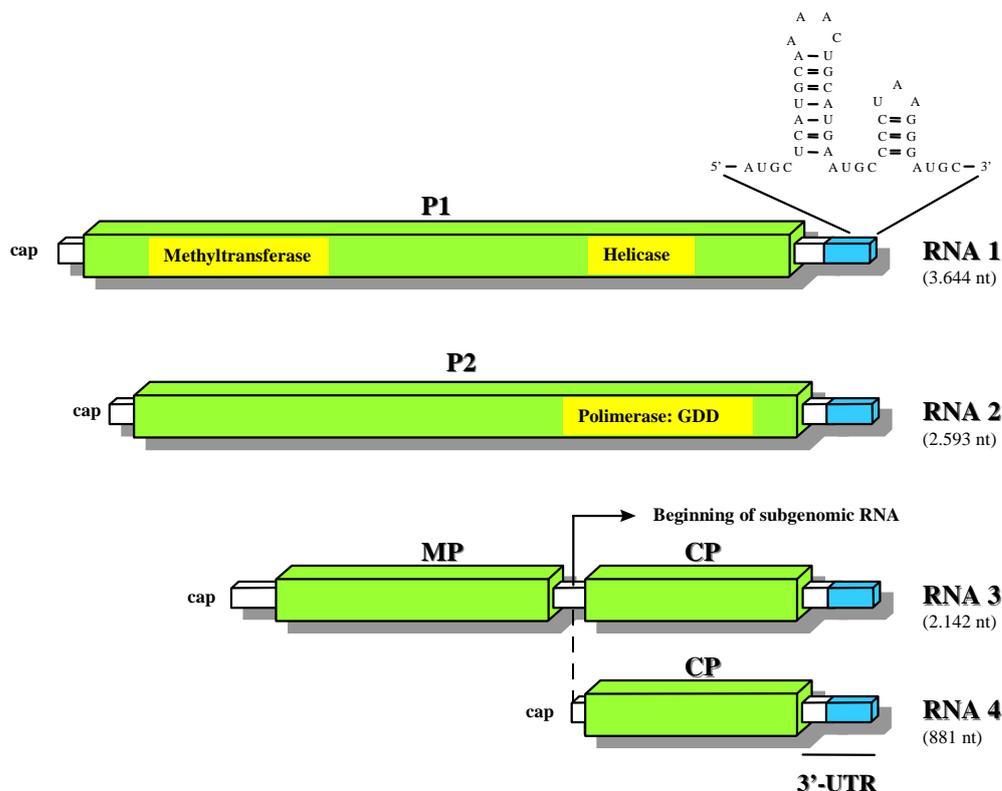


Schéma 2 : Représentation du génome de l'ApMV similaire à ceux des membres du genre des ilarvirus. Les régions colorées en vert correspondent aux structures de lectures ouvertes dans lesquelles les aires jaunes désignent les fonctions des protéines P1 et P2. Les parties blanches sont des régions non codantes. La région 3' non codante (3'-UTP) de tous RNAs présente une zone homologue colorée en bleu de 145 nucléotides (Stussi-Garaud *et al.*, 1987).

1.2.1.1.1 - Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV)

Position taxonomique : Famille : Bromoviridae, Genre : Ilarvirus

Agent causal :

Le virus des tâches annulaires nécrotiques du prunier (PNRSV), a été décrit pour la première fois sur pêcher par Cochan et Hutchins (1941). Le PNRSV est un Ilarvirus, membre du sous-groupe III, selon ses propriétés sérologiques et sa gamme de plantes hôtes (Nyland *et al.*, 1974). Les particules du virus sont isométriques à bacilliformes d'environ 25-35 nm de diamètre avec quatre molécules d'ARN simple-brin (Barbara, 1988).

Le virus a un génome triparti d'ARN, dont les RNAs 1 et 2 codent pour les protéines de la polymérase P1 et P2 et l'RNA 3 code pour la protéine de mouvement (MP), tandis que la protéine du cap (CP) est traduite par un ARN sub-génomique 4 (Aparicio *et al.*, 2001).

Contrairement à d'autres genres de la famille des Bromoviridae, le déclenchement de l'infection par le PNRSV, exige l'attachement de quelques molécules de la protéine du manteau (CP) aux terminaisons 3' de l'inoculum RNAs (Jaspars, 1999).

Répartition géographique

Le PNRSV est présent dans le monde entier, là où on cultive les espèces de *Prunus* ou de *Rosa* et se rencontre fréquemment dans les régions tempérées (Barbara, 1988 ; Diekmann et putter, 1996). C'est l'un des virus phytopathogènes, les plus importants économiquement des rosacées à noyaux (Mink, 1992).

Gamme des plantes hôtes

Le PNRSV infecte naturellement les rosacées à pépins et presque toutes les espèces du genre *Prunus* (Mink, 1992), y compris celles cultivées (abricotier, amandier, cerisier, prunier et pêcher) (Desvignes, 1999) et également quelques espèces ornementales et spontanées (Nyland et al., 1976).

Importance et économique

Le PNRSV est répandu dans toutes les aires arboricoles cultivées par les rosacées. Il peut engendrer des pertes de récolte très significatives, bien qu'il soit souvent asymptomatique. Les pertes de récolte dus aux effets du virus sur la culture, peuvent osciller entre 0 % dans le pruneau Italien à 15 % dans le merisier, et ils peuvent atteindre 100 % de perte quelques années après le début de l'infection sur les pêcheurs (Barbara, 1988, Agawa et al., 1995). Les études effectuées dans la région méditerranéenne ont démontré que le virus est répandu dans les différentes cultures de *Prunus* (Myrta et al., 2000)

Épidémiologie

Le virus est transmis par les grains de pollen et par semence de beaucoup d'espèces de *Prunus*. (Nyland et al., 1976). Sa diffusion rapide aux plantes mûres des rosacées à noyaux est souvent réalisée par l'intermédiaire des grains de pollen (Aparicio et al., 1999 ; Uyemoto et al., 1992). Tandis que la transmission active par les nématodes et les acariens a été rapportée mais le sens biologique n'est pas encore claire (Frizche et Kegler, 1968). On suspecte l'alimentation des thrips pour disséminer le virus du pollen infecté à l'arbre, autrement le virus provenant des grains de pollen infecté reste confiné au niveau de la graine

(Johansen et *al.*, 1994). La propagation par le matériel végétal infecté représente la voie la plus importante dans la dissémination et la diffusion du PNRSV (Dunez, 1994).

La diffusion dans les vergers des rosacées fruitières avait été démontrée d'être associée uniquement aux grains de pollen. Malgré que la dissémination naturelle est habituellement lente mais peut atteindre parfois jusqu'à 10 % par an dans le pêcher et le cerisier (Franckii et *al.*, 1985).

Symptômes

Le PNRSV se présente sous différentes souches et isolats, causant des maladies différentes sur les *Prunus* hôtes cultivées, allant de fortement virulentes jusqu'au sans symptômes. En général, les symptômes de PNRSV apparaissent la première et la deuxième année après l'infection (pendant la phase de choc), plus tard l'infection devient sans symptômes (Diekmann et Putter, 1996), bien que quelques isolats causent des symptômes récurrents annuellement (Nyland et *al.*, 1976).

Le PNRSV, le PDV et l'ApMV sont souvent associés à la mosaïque de l'amandier et sont tous impliqués dans le bassin méditerranéen avec des ampleurs différentes d'étiologie (Martelli et Savino, 1997).

Les symptômes provoqués par le PNRSV varient de l'absence totale des symptômes à la nécrose grave des feuilles (Nyland et *al.*, 1974). Normalement les premiers symptômes apparaissent après l'infection dans toutes les parties de l'arbre ou uniquement sur quelques pousses déterminées.

Les symptômes typiques de la maladie sont observés en tant que tâches chlorotiques ou nécrotiques sur les jeunes feuilles. Pendant l'évolution de l'infection, les tâches chlorotiques évoluent vers des anneaux nécrotiques qui se détachent pour donner un aspect perforé aux feuilles.

Le PNRSV peut affecter également la qualité des abricots sur lesquels apparaissent des anneaux ou des tâches décolorées et parfois une ligne nécrotique typique. Sur le pêcher, le PNRSV induit des tâches nécrotiques et peut réduire les feuilles en lambeaux et des petits chancres sur les brindilles, quoique les infections soient principalement sans symptômes (Giunchedi et Poggi Pollini, 1984).

Les cerisiers infectés produisent en plus des feuilles petites, des lésions nécrotiques ou des taches, qui donnent une apparence déchirée en lambeaux (Barbara, 1988). Quelques années après l'infection initiale, les arbres montrent un aspect quasi-normal, et dans certains cas, une réduction de la taille d'arbre s'observe, accompagnée d'une réduction de la

production qui peut atteindre jusque à 40 % sur les pêcheurs infectés (Pusey et Yadava, 1991). A signaler que les symptômes provoqués par le PNRSV ne sont pas facilement distingués de ceux provoqués par l'ApMV.

Détection

La détection du PNRSV est obtenue par l'inoculation ou le greffage du matériel infecté sur des plantes indicatrices (herbacées ou ligneuses) qui développent des symptômes évidents. Le PNRSV est facilement transmis par inoculation mécanique (Uyemoto et Scott, 1992). Le greffage des tissus infectés par le PNRSV sur *Prunus serrulata* cv Shirofugen (insertion réalisée pendant la floraison) permet sa détection dans quelques semaines, à travers la décoloration ou la nécrose des tissus entourant l'emplacement d'insertion (Fridlund, 1970). Alternativement, le greffage des tissus infectés sur le *Prunus tomentosa*, cultivar réputé plus résistant que le cerisier Shirofugen, donne une marbrure des jeunes feuilles.

Évidemment, les essais biologiques sont extrêmement sensibles mais ont besoin de temps (3-6 mois pendant la période de floraison, 9-12 mois après une période de repos) afin de développer des symptômes. Le greffage sur le *P. serrulata*, est toujours employé pour la détection du PNRSV présent sur les hôtes de *Prunus* (Mink, 1980 ; Scott et al., 1989).

Egalement la transmission mécanique aux plantes hôtes herbacées est habituellement employée pour différencier le PNRSV du PDV. La transmission à *Cucurbita maximum* cv Buttercup est recommandée. L'inoculation mécanique de *Cucumis sativa* permet de visualiser en premier lieu de remarquables lésions chlorotiques suivis par un arrêt de la croissance des bourgeons axillaires (Clark et Adams, 1977). La transmission du virus est souvent incertaine à partir des tissus de feuille, les pétales représentent une source meilleure d'inoculum.

Les tests sérologiques à travers l'ELISA sont largement répandus pour la détection du PNRSV dans les tissus collectés durant la période de végétation (Torrance et Dolby, 1984). Récemment, des techniques moléculaires ont été développées et employées pour la détection du PNRSV. A cet effet, le PNRSV est détecté par la technique dite tissue immunoprinting hybridization (Knapp et al., 1995), par hybridation moléculaire (Sanchez-Navarro et al., 1996), par PCR (Spiegel et al., 1996 ; Moury et al., 2000), Strain-specific-PCR (Hammond et al., 1998), PCR-ELISA (Candresse et al., 1998b) et par PCR multiplex (Saade et al., 2000). Ces techniques sont actuellement largement répandues pour la détection du PNRSV.

En ce qui concerne l'assainissement du matériel végétal infecté par le PNRSV, la thermothérapie et le microgreffage *in vitro* sont largement employées pour l'obtention de matériel de catégorie « virus – free » (Juárez et al., 1988).

1.2.1.1.2 - Prune Dwarf Virus (PDV)

Position taxonomique : Famille : Bromoviridae, Genre : Ilarvirus

Agent causal

Le Prune Dwarf Virus (virus nanisant du prunier) appartient au sous-groupe IV du genre Ilarvirus et ne possède aucune homologie sérologique avec les isolats du PNRSV (Milbrath, 1955). Le virus a été décrit pour la première fois sur le prunier sous plusieurs noms tels le jaunissement du cerisier (cherry yellows), nanisme du pêcher (peach stunt), etc.

Les virions sont des particules quasi-isométriques à bacilliformes avec un diamètre d'environ 25-35 nm. Les particules qui sédimentent rapidement sont ovales à bacilliformes avec 17-19 nm comme largeur et une longueur qui peut arriver jusqu'à 73 nm (Fulton, 1970).

Le génome est triparti et possède cinq types de particules, qui sont des molécules d'ARN simples brins positives (positive single stranded RNA), ces caractéristiques ont été confirmés par des analyses moléculaires (Rampitsch et Eastwell, 1997).

Répartition géographique

Le PDV est très similaire au PNRSV du point de vue distribution mondiale (Diekmann et Putter, 1996) et se rencontre dans toutes les régions tempérées là où les espèces de *Prunus* sont cultivées (Joseph et al., 1995).

Gamme de plantes hôtes

Toutes les espèces ligneuses du genre *Prunus* (Desvignes, 1999), particulièrement le cerisier doux et amer et le *P. mahaleb* sont des plantes hôtes (Gilmer et al., 1976). Quelques isolats du virus sont épidémiques sur le pêcher (Desvignes, 1999). En comparaison avec le PNRSV, la gamme des plantes hôtes est plus restreinte, le PDV n'a pas été rapporté sur l'houblon et sur le rosier (Desvignes, 1999).

Importance économique

Le PDV est l'un des virus les plus importants économiquement sur les rosacées fruitières à noyaux, particulièrement sur le cerisier doux et amer et sur le pêcher. L'ampleur des dommages dépend de l'espèce d'arbre fruitier, de la variété et de l'isolat virus (Nemeth, 1986 ; Uyemoto et Scott, 1992).

La maladie montre une incidence et une sévérité élevées sur toutes les espèces de *Prunus*. Dans la région méditerranéenne, l'incidence la plus élevée a été enregistrée sur le cerisier (67.2 %) (Myrta et al., 2000), où elle cause des pertes de rendement très élevées

(Nemeth, 1986). Les infections mixtes entre le PDV et le PNRSV agissent synergiquement et mènent souvent au déclin progressif causant la mort des arbres (Cropley, 1968).

Des dommages considérables peuvent également se produire dans les pépinières, se traduisant par un faible taux de reprise de la greffe et une croissance réduite des plantes greffées (Kunze, 1988). Sur les arbres chroniquement infectés, la réduction du nombre de boutons floraux, donnent un aspect dénudé au bois ; alors que le rendement peut être réduit jusqu'à 50 %, et les fruit restants sont grands et fermes (Agawa et al., 1995).

Épidémiologie

Le PDV est aisément transmis par le pollen et surtout par la graine. C'est cette dernière qui est responsable de la dissémination du virus à cause de son utilisation courante comme matériel de propagation dans les pépinières. Il a été rapporté que le virus est présent dans le pollen du cerisier, de l'amandier, du prunier et de l'abricotier (Digiario et al., 1992). Les graines et les pollens constituent donc la principale voie de la transmission normale (Poggi Pollini et al., 1983 ; Digiario et al., 1990). Plus particulièrement dans le *Prunus avium*, le *P. cerasus* et le *P. mahaleb* (Gilmer et al., 1976) ; ou jusqu'à 50 % des jeunes plantes malades peuvent résulter des graines de cerisier infectées. Il semble que le virus est inhibé dans le noyau du pêcher, pendant la moisson donnant des semences indemnes de virus (Desvignes, 1990).

Egalement, la transmission d'arbre à arbre a été rapportée, résultat de la transmission sexuelle pendant la pollinisation. D'autre part, la participation des thrips en tant que vecteurs fortuits a été récemment impliquée (Mink, 1995).

Symptômes

Les symptômes varient considérablement selon l'espèce, l'isolat de virus et la température. Sur le cerisier amer de Montmorency, le PDV cause le jaunissement du cerisier amer «sour cherry yellows» (Jones et Sutton, 1996b).

Le nanisme du prunier «prune dwarf» et l'arrêt du pêcher «stunt peach» sont provoqués par le PDV seul ou par des infections mixtes de PDV et de PNRSV. Le PDV est probablement l'Ilarvirus le plus important, engendrant des dommages préjudiciables aux amandiers, causant la marbrure chlorotique, la line pattern et de temps en temps, l'arrêt de la végétation (Martelli et Savino, 1997). Généralement, le *P. salicina*, les hybrides du prunier, le porte-greffe du cerisier "Mazzard" et "*P. Mahaleb*", certains cultivars de merisiers, abricotiers et amandiers sont des plantes hôtes asymptomatiques (Diekmann et putter, 1996).

Sur le cerisier, le PDV produit des taches chlorotiques, des anneaux et une marbrure diffuse sur les feuilles au printemps. Au niveau des tissus les aires chlorotiques peuvent évoluer et devenir des taches nécrotiques, se détacher par la suite, donnant un aspect perforé, aux feuilles. Les symptômes deviennent progressivement plus légers sur les jeunes feuilles qui se développent plus tard dans la saison. Ces symptômes se reproduisent rarement après la première année de l'infection. (Agawa et al., 1995).

Le prunier infecté, développe des feuilles rétrécies et sont plus épaisses que la normale. Les entre-nœuds tendent à devenir des rosettes au début du printemps mais le développement normal est réduit plus tard dans la saison. (Agawa et al., 1995).

Le PDV semble produire seulement des symptômes légers dans la plupart des cultivars du pêcher et essentiellement aucun symptôme foliaire. Cependant dans le cultivar Muir du pêcher, les infections de PDV produisent un feuillage dense due au rétrécissement des entre-nœuds (Agawa et al., 1995).

Détection

Le PDV est détecté par la transmission mécanique de jus de plantes infectées au moyen de son inoculation à des plantes indicatrices herbacées comme le *Cucumis sativus* L. L'inoculation à *Cucumis sativus* est intensivement pratiquée tandis que la transmission à *Cucurbita maximum* cv Butercup cause une marbrure jaunâtre et un éclaircissement des nervures sur les feuilles qui sont systématiquement infectées. Ces plantes constituent également une bonne source pour la purification du virus (Dunez, 1994).

Le PDV est détecté aussi à travers le greffage d'indicateurs ligneux. Le greffage des jeunes plantes du pêcher issues des semis du GF305, *P. serrulata* cv Shirofugen, a comme conséquence l'apparition d'une nécrose locale après 5 semaines. La réaction est semblable à celle provoquée par le PNRSV mais elle est moins intense. Quant à la réaction de *Prunus tomentosa* Shirofugen lorsqu'il est greffé par les isolats du PDV causant des anneaux et la marbrure jaune, elle est retardée jusqu'à la saison de croissance suivante (Desvignes, 1990). Alors que les symptômes de PDV sur *Sesbannia exaltata*, sont des lésions locales noirâtres sur les cotylédons inoculés (Dunez, 1994).

Le PDV est détecté par voie sérologique à travers les tests ELISA (Barbara, 1988), par hybridation moléculaire (Scott et al., 1992), RT-PCR (Parakh et al., 1995), RT-PCR-ELISA (Rowhani et al., 1998) et RT-PCR multiplex (Saade et al., 2000).

L'assainissement du matériel végétal infecté pour l'élimination de virus, est souvent obtenue par thermothérapie à travers l'exposition des boutures de bois à la chaleur entre 36-37°C pendant 15 jours, on obtient par la suite un matériel de catégorie « virus-free »..

1.2.1.1.3 - Apple Mosaic Virus (ApMV)

Position taxonomique : Famille : Bromoviridae, Genre : Ilarvirus

Agent causal

Le virus de la mosaïque du pommier, appelé également European line pattern, a été classé parmi le sous-groupe III des Ilarvirus (Senevirantne et Posnette, 1970). Il a été décrit pour la première fois par Bradford et Joley (1933). Les particules du virus de l'ApMV sont quasi-isométriques de 25 à 30 nm de diamètre (Cameron et Thompson, 1985).

L'ApMV est caractérisé par un génome triparti et l'infectiosité exige la protéine du cap ou un ARN sub-génomique pour qu'elle se produise (Bol et al., 1971). La séquence des acides aminés codée par RNA1 et RNA2 montre une similitude aux Ilarvirus, mais sont plus étroitement liés à l'AMV qu'à d'autres Ilarviruses (Shiel et Berger, 2000).

Distribution géographique

L'ApMV est un virus phytopathogène très important et présent mondialement sur les arbres fruitiers plus particulièrement dans les régions tempérées, mais moins que le PDV et le PNRSV (Nemeth, 1986 ; Barbara, 1988, Diekmann et putter, 1996). La plupart des hôtes naturels connus sont les espèces de la famille des *Rosaceae* (Barbra, 1988). L'ApMV est fréquent en Europe, rare dans la région méditerranéenne (Myrta et al., 2001) et aux Etats-Unis. (Converse et Casper, 1975).

Gamme de plantes hôtes

Il a été rapporté que l'ApMV infecte environ 65 espèces appartenant à 19 familles différentes (Kriestensen et Thomsen, 1962). La plupart des plantes hôtes naturels connus sont des rosacées. L'ApMV infecte le houblon, le rosier, le noisetier, le pommier et beaucoup d'espèces de *Prunus*. (Nemeth, 1986).

Importance économique

L'ampleur des dommages est liée à la variété de virus et au cultivar des plantes. L'ApMV peut sévèrement affecter la croissance végétative et le rendement (Diekmann et putter, 1996). Il peut causer des pertes significatives, allant jusqu'à la réduction de 20 % de la

production commerciale de l'houblon. Mais son occurrence a été considérablement réduite suite à l'utilisation du matériel végétal de propagation certifié (Nemeth, 1986 ; Barbara, 1988).

La croissance des pêchers infectés par ApMV s'est vue réduite jusqu'à 15%. Heureusement, son incidence globale dans les pays méditerranéens est très limitée comparativement aux autres Ilarvirus (Myrta et *al.*, 2003a). Dans les Pouilles (Italie méridionale), l'ApMV est le virus le plus fréquent avec un taux d'infection atteignant parfois 90 % (Savino, 1990).

Épidémiologie

L'ApMV est transmis par multiplication végétative (Smith et *al.*, 1988). Il est facilement transmis par greffage à travers l'utilisation de greffons infectés et par inoculation mécanique de la sève aux plantes herbacées. Il n'a aucun vecteur connu (Savino, 1985), il ne semble pas transmissible par les graines ou le pollen (Digiario et *al.*, 1990, 1992). Il est disséminé naturellement à travers le greffage des racines. L'ApMV est mécaniquement transmissible à une large gamme de plantes hôtes herbacées mais souvent avec difficulté aux rosacées ligneuses hôtes (Cameron et Thompson, 1985).

Symptômes

Les symptômes varient selon la variété cultivée et l'isolat de virus (Nemeth, 1986). Apple mosaic, Rose mosaic et European line pattern sont des maladies provoquées par le même virus (Fulton, 1968).

Typiquement, l'ApMV induit une mosaïque chlorotique ou des anneaux et la line pattern sur les feuilles (Lansac et *al.*, 1980). Le virus est considéré comme l'une des causes de « yellow line pattern » sur les *Prunus* et « bud failure » de l'amandier (Desvignes, 1999). Les symptômes sont beaucoup plus évidents au printemps et au début de l'été, et deviennent masqués à températures élevées.

Les feuilles infectées montrent des taches vert clair et taches annulaires vert jaunâtres et des lignes ou bandes en feuille de chêne (Oak-leaf pattern). Le virus n'est pas très fréquent sur le pêcher et l'abricotier, mais il est facilement identifié par les taches jaunes, ainsi les pépiniéristes évitent de prendre des boutures des arbres infectés (Desvignes, 1999).

L'ApMV et le PNRSV sont généralement présents dans des infections mixtes sur le pêcher, le prunier, et l'amandier et il est souvent très difficile de les différencier sur la base des symptômes. L'ApMV est rarement détecté sur le cerisier (Barbara, 1988).

Détection

L'ApMV est détecté habituellement par indexage biologique en utilisant les cultivars du pêcher Elberta, les semis de GF 305 (Nemeth, 1986), et les hybrides Shirofuggen du prunier sont recommandés par Dunez (1994).

Pour les rosacées à noyaux, le greffage est réalisé dans serres en verre, sous des conditions contrôlées (Dunez, 1994). La transmission mécanique aux plantes indicatrices herbacées est habituellement effectuée sur le concombre *Cucumis sativus* L. sur lequel le virus induit des lésions primaires chlorotiques sur les premiers cotylédons inoculés et une invasion systémique ayant pour conséquence le jaunissement des nervures et l'arrêt de la croissance (Dunez, 1994).

La détection par sérologie est largement pratiquée mais dans certaines plantes hôtes l'ApMV ne peut être détecté à tout moment. L'ELISA est effectuée dans toute la saison de croissance à partir de jeunes feuilles et également avec des bourgeons nouvellement formés, et moins à partir des feuilles mûres (Fulton, 1967 ; Torrance et dolby, 1984). La concentration du virus est souvent très élevée et régulièrement distribuée dans les différents organes de la plante (feuilles, graines, écorce) (Desvignes, 1990), mais les pétales constituent la meilleure source d'inoculum que les feuilles.

Le virus est détecté à travers les techniques moléculaires : RT-PCR (Rowhani et *al.*, 1995) et RT-PCR-ELISA (Candresse et *al.*, 1998b) et RT-PCR multiplex (Saade et *al.*, 2000). Quant à l'assainissement du matériel végétal, il est obtenu grâce à la thermothérapie en maintenant les pousses à 37°C pendant 2 à 4 semaines.

1.2.1.2 - Genre de Potyvirus

Les Potyvirus sont caractérisés par des particules filamenteuses et flexueuses ayant une longueur variant entre 680 et 900 nm et environ 12 nm de diamètre. La plupart des Potyvirus ont une gamme de plantes hôtes assez limitée et sont transmis par des aphides d'une manière non persistante et dans certains cas par les graines (Nemeth, 1986). Ils peuvent également être transmis par inoculation mécanique.

Deux Potyvirus sont rapportés inféodés aux rosacées à noyaux : Le Plum Pox Virus (PPV) et l'Asian Latent Virus (AsLV).

1.2.1.2.1 - Plum Pox Virus (PPV) : Sharka

Position taxonomique : Famille : Potyviridae, Genre : Potyvirus

Agent causal

Le PPV est l'agent causal de la Sharka, principale maladie virale des rosacées à noyaux en Europe. Le PPV appartient au groupe des Potyvirus.

C'est un virus à ARN simple brin, se présentant sous forme de particules flexueuses ayant approximativement 764 nm de long et 11 nm de diamètre (Roy et Smith, 1994). Le génome est à sens positif, ssRNA codant une grande polyprotéine du 350 KDa (Lain et al., 1989). Trois protéases du virus procèdent le précurseur de la polyprotéine (Garcia et al., 1989).

D'une façon générale, le génome exprime dix produits avec des fonctions différentes. En plus, plusieurs protéines structurales s'accumulent dans le cytoplasme ou dans le noyau comme des corps d'inclusion.

Distribution géographique

La maladie a été rapportée pour la première fois par Attanassov en Bulgarie en 1934, à partir de là, elle a envahi progressivement la plupart des pays européens (Roy et Smith, 1994). Le virus a été introduit en Amérique du Sud et du Nord (Acuna, 1993 ; Roy et Smith, 1994), signalé également en Inde par Bhardhaj et al.(1995), aux Etats-Unis par Levy et al.(2000), en Jordanie par Al Rwahnih et al.(2000) et au Canada par Thompson et al. (2001).

Gamme de plantes hôtes

L'abricotier, le prunier et le pêcher aussi bien que la plupart des porte-greffes du genre *Prunus* sont fortement affectés par le virus : le PPV infecte non seulement les espèces cultivées de rosacées à noyaux mais également les espèces ornementales de *Prunus* (Smith et al., 1992). Les espèces de *Prunus* sauvages peuvent servir de plantes hôtes secondaires importantes pour le virus, influençant l'épidémiologie et le contrôle du virus (Polak, 1997). L'amandier est affecté occasionnellement, sans qu'il montre des symptômes (Nemeth, 1986). L'occurrence du PPV a été rapportée également sur le cerisier (Nemchinov et Hadidi, 1996) et sur le merisier (Crescenzi et al., 1995).

Importance économique

La Sharka est une maladie de grande importance économique à cause de la sévérité des dommages engendrés et la distribution du virus. Le PPV se définit comme étant le

pathogène le plus nuisible des rosacées à noyaux car il cause de lourdes pertes de récoltes du prunier, d'abricotier et de pêcher dans la plupart des pays européens (Dunez et Sutic, 1988).

Environ 100 millions d'arbres de rosacées à noyaux sont actuellement infectés en Europe, et les cultivars susceptibles peuvent subir des pertes de rendement allant de 80-100 % (Kegler et Hartmann, 1998). Le PPV est un virus endémique dans les pays méditerranéens du nord, en Albanie et dans l'ex Yougoslavie (principalement sur le prunier), en Grèce (pêcher et abricotier), et sur pêcher en France et en Italie.

Épidémiologie

La large dissémination du PPV est survenue suite à la propagation du matériel infecté, tandis que localement, la diffusion secondaire est le fruit de plusieurs pucerons vecteurs lesquels transmettent le virus du PPV de façon non persistante (Labonne et *al.*, 1995). Les pucerons vecteurs sont le *Myzus persicae* (Kassanis et Sutic, 1965), *Aphis spiraeicola* (Leclant, 1973), etc. Récemment, des antigènes de PPV ont été trouvés dans des graines immatures sur les téguments de la graine, mais l'infection de jeunes plantes issues de semis à partir des graines n'a pas été confirmée (Myrta et *al.*, 1998a).

Symptômes

Les symptômes changent selon l'espèce, le cultivar, l'isolat de virus, la localité et les conditions saisonnières (Kegler et Hartmann, 1998). Les symptômes de la maladie peuvent apparaître sur les fleurs, les feuilles ou les fruits (Smith et *al.*, 1992).

Les symptômes foliaires consistent à une chlorose (occasionnellement avec des taches nécrotiques), des aires et des bandes ou un jaunissement des nervures secondaires et tertiaires.

Les fruits du prunier et d'abricotier sont déformés et présentent un brunissement interne de la chair. Les noyaux de l'abricotier laissent apparaître souvent des anneaux jaune pâle (Dunez, 1987). Le fruit des variétés du prunier japonais (*P. salicina*) sont tolérant et développent, au mieux, des symptômes légers (Desvignes, 1999). La Sharka est exprimée sur le pêcher par la cassure des bourgeons, initialement par des symptômes de rupture de la coloration des pétales florales (Desvignes et *al.*, 1996).

Les fruits du cerisier développent des anneaux et des dépressions, qui disparaissent graduellement pendant la maturation du fruit (Nemchinov et Hadidi, 1996). Après l'inoculation mécanique par PPV-SwC, on peut observer un jaunissement des nervures et des nécroses le long des bords des feuilles sur le merisier et le cerisier (Crescenzi et *al.*, 1997).

Isolats de PPV

Les isolats de PPV sont groupés dans quatre groupes, distingués par leurs propriétés biologiques, sérologiques, moléculaires et épidémiologiques. Ces groupes sont désignés comme Marcus (M), Dideron (D), EL Amar (EA) et Cherry (C) (Pasquini et Barba, 1997 ; Candresse *et al.*, 1998a). Le PPV-D est l'isolat le plus commun en Europe de l'Ouest. Il a été rencontré également au Chili, aux États-Unis et au Canada (Levy *et al.*, 2000 ; Thompson *et al.*, 2001). Le PPV-M est l'isolat le plus commun en Europe méridionale, orientale et centrale.

Les isolats appartenant aux groupes M ou D, montrent un comportement épidémiologique différent. Le PPV-M se dissémine plus rapidement par les aphides que le PPV-D, particulièrement dans les vergers du pêcher. Le PPV-D est plus commun dans l'abricotier et le prunier et se transmet rarement à partir de ces plantes hôtes vers le pêcher (Adamolle *et al.*, 1994). L'isolat EL Amar (EA) a été à l'origine isolé à partir d'abricotier en Egypte, et jusqu'ici n'a pas été identifié ailleurs. Le PPV-EA diffère des autres dans l'ordre des nucléotides (Wetzel *et al.*, 1991a) et possède des épitopes spécifiques (Myrta *et al.*, 1998b).

Récemment, un nouveau isolat à savoir le PPV-C a été rapporté sur des cerisiers en Europe centrale et de l'Est et en Italie (Nemchinov *et al.*, 1994 ; Crescenzi *et al.*, 1995). Le PPV-C diffère considérablement dans les propriétés moléculaires et sérologiques de tous les autres isolats de PPV (Nemchinov et Hadidi, 1996 ; 1998 ; Myrta *et al.*, 2000).

Isolats recombinants

La recombinaison joue un rôle important dans l'évolution des virus à ARN et fournit des variations imprédictibles de la pathogénicité du virus (Worobey et Holmes, 1999). La première évidence de la recombinaison d'ARN homologues a été rapportée dans l'isolat PPV-o6 de l'ex-Yougoslavie, dont le génome dérive de deux PPV sauvages (Cervera *et al.*, 1993).

Il semble, également que le PPV-SoC pourrait être le résultat d'une recombinaison entre les isolats de PPV et un virus inconnu lié au PPV (Nemchinov *et al.*, 1996). L'analyse moléculaire réalisée récemment sur plusieurs parties du génome (P3-6k1, CI et CP), a confirmé la présence de recombinaison entre les isolats M et D (Glasa *et al.*, 2002).

Détection

Plusieurs méthodes de détection sont disponibles pour la détection du PPV. L'indexage biologique sur les plantes indicatrices ligneuses (les jeunes pêchers GF305 ou *Prunus tomentosa*) et sur les plantes herbacées telles que *Chenopodium foetidum* et *Nicotiana clevelandii*, sont intensivement employées pour la détection du virus (Nemeth, 1986).

Des anticorps polyclonaux et monoclonaux sont habituellement employés dans des tests ELISA avec succès à partir des années 80 (Cambra et *al.*, 1994). En raison de la distribution erratique du virus dans les arbres infectés, plusieurs échantillons provenant du même arbre doivent être examinés.

Le virus est également détecté par Immuno Electron Microscopy (Milne, 1993), Western-Blotting (Pasquini et Barba, 1994), direct tissue immuno Blot assay (Audergon et *al.*, 1994 ; Knapp et *al.*, 1995) et par écoulement latéral (lateral flow) (Mumford et *al.*, 2001). L'Hybridation moléculaire en utilisant des sondes ribosomiques universelles (Varveri et *al.*, 1988 ; Wetzel et *al.*, 1990 ; Nemchinov et *al.*, 1996), et à travers différents types de PCR (Wetzel et *al.*, 1991b), telle la détection sélective à l'aide des amorces spécifiques des isolats (Nemchinov et Hadidi, 1998 ; Levy et Hadidi, 1994 ; Candresse et *al.*, 1995; Olmos et *al.*, 1996 ; 1997) sont souvent utilisées dans la détection du virus.

Actuellement les quatre isolats sont groupés dans quatre groupes différenciés par des caractéristiques biologiques, sérologiques, moléculaires et épidémiologiques. Ainsi la détection des quatre isolats du PPV, se fait à travers l'usage des anticorps monoclonaux spécifiques aux isolats (MAbs) sont déjà disponibles, permettant la découverte opportune des foyers de PPV et l'identification fiable des isolats. Le 4DG5 pour PPV-D (Cambra et *al.*, 1994), AL pour PPV-M (Boscia et *al.*, 1997), EA24 pour PPV-EA (Myrta et *al.*, 1998b) et C.A. pour PPV-C (Myrta et *al.*, 2000).

Les quatre principaux isolats de PPV peuvent également être différenciés en utilisant la technique du PCR Restriction Fragment Length Polymorphism à travers la digestion de la protéine du cap et des produits d'amplification (Candresse et *al.*, 1994 ; Hammond et *al.*, 1998). D'autres techniques sont apparues, telles l'Immuno-Capture-PCR (Wetzel et *al.*, 1992), Print-Capture-PCR (Olmos et *al.*, 1996 ; Cambra et *al.*, 1998), nested-PCR (Olmos et *al.*, 1999) et co-operational-PCR (Olmos et *al.*, 2001). Des riboprobes sont maintenant disponibles pour la détection sélective des isolats PPV-D et PPV-M (Cambra et *al.*, 2002).

La thérapie par microgreffage conventionnelle ou *in vitro* et par thérapie, sont indiquées pour l'obtention de matériel végétal assaini de catégorie « virus-free » (Diekmann et Putter, 1996).

1.2.1.3 - Genre des Trichovirus

Le groupe a été établi comme nouveau genre de virus par Martelli et *al.* (1994). Les Trichovirus ("tricho" du grecque thrix = cheveux) sont des virus à filaments flexueux, ayant

640 - 800nm de long et 12nm de diamètre. Leur ARN est simple brin avec une molécule linéaire (Martelli et *al.*, 1994).

1.2.1.3.1 - Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV)

Position taxonomique

Le virus a été à l'origine classé dans le genre des Closterovirus, par la suite il est rattaché aux Trichovirus dont il est l'espèce type (Martelli et *al.*, 1994).

Agent causal

L'ACLSV se présente comme des particules filamenteuses flexueuses, ayant approximativement 720 nm de long et 12 nm de diamètre encapsidant un ARN simple-brin (Martelli et *al.*, 1994). L'ARN génomique est un brin positif contenant trois ORFs, qui codent une protéine du 50 kDa (protéine du mouvement) et une protéine du cap de 22 kDa (Candresse et *al.*, 1995). Basé sur les anticorps monoclonaux et les analyses de séquençage, les isolats d'ACLSV montrent une grande variabilité (Al Rwahnih, 2003).

Distribution géographique

L'ACLSV est très répandu mondialement dans les arbres fruitiers et les plantes ornementales (Chairez et Lister, 1973 ; Delbos et Dunez, 1988). Il a été rapporté dans la région asiatique orientale, la région eurasienne, l'Amérique du Nord, le Pacifique, l'Australie, la nouvelle Zélande et la Chine (Lister, 1987).

Gamme de plantes hôtes

L'ACLSV est un virus cosmopolite, considéré l'un des virus les plus important économiquement, affectant la plupart des arbres fruitiers de la famille des Rosacées, y compris ceux à pépins et à noyaux (Delbos et Dunez, 1988).

Importance économique

L'ACLSV est économiquement important vu son occurrence mondiale et du fait qu'il affecte les rosacées fruitières cultivées à pépins et à noyaux. Quelques isolats causent des déformations des fruits (Dunez et *al.*, 1972) et des incompatibilités de greffage dans certaines combinaisons porte-greffe greffon influençant la production des pépinières.

Dans les pays méditerranéens (Myrta et *al.*, 2003a), l'ACLSV est rencontré fréquemment sur abricotier, sur lequel l'impact économique de quelques isolats (viruela) est semblable au PPV, mais la maladie n'est pas épidémique.

Épidémiologie

Le virus est transmis par greffage et par inoculation de la sève (Nemeth, 1986). Aucune transmission par les vecteurs ou la graine n'a été rapportée. Différents isolats d'ACLSV se produisent dans la même plante hôte ce qui pourraient suggérer la présence d'une voie de transmission naturelle (Pasquini et *al.*, 1998).

Symptômes

Les symptômes apparaissent généralement sur les feuilles, les fruits et le tronc, et leur sévérité dépend en grande partie de l'espèce hôte et de l'isolat de virus. Les isolats diffèrent dans leurs propriétés sérologiques et symptomatologiques (Chairez et Lister, 1973).

Le virus cause l'incompatibilité du greffage ou une malformation grave des fruits, désignée "Apricot Pseudopox" sur abricotier (Desvignes et Boye, 1989). Quelques isolats provoquent le dédoublement des fruits ou le symptôme de Pseudopox sur les pruniers (Dunez et *al.*, 1972 ; Jelkmann et Kunze, 1995).

Des symptômes similaires à la Sharka ont été observés sur des feuilles de pêcher ; tandis que sur les fruits de cerisier, l'ACLSV seul ou dans des infections mixtes avec le PNRSV cause des taches nécrotiques et des taches creuses (Diekmann et Putter, 1996).

Détection

La détection de l'ACLSV inclut l'indexage biologique sur *Malus platycarpa* et les jeunes plantes du pêcher GF305 qui réagissent avec une marbrure vert-foncée creuse sur les feuilles. Le virus est détecté également à travers la transmission de la sève aux plantes indicatrices herbacées (Diekman et Putter, 1996).

Le virus a une puissance immunogène moyenne et des antisérums polyclonaux ont été produits, ce qui a permis sa détection à travers les tests ELISA (Flegg et Clark, 1979 ; Detienne et *al.*, 1980).

La détection des différents isolats est obtenue aux moyens d'anticorps monoclonaux (Malinowski et *al.*, 1997). La technique de tissue immunoprinting est également pratiquée (Knapp et *al.*, 1995). Quant aux particules virales, elles sont détectées par immuno-electron microscopie (Kerlan et *al.*, 1981). Le virus est détecté par hybridation moléculaire (Kummert

et *al.*, 1995), par RT-PCR (Nemchinov et *al.*, 1995), IC-RT-PCR (Candresse et *al.*, 1995) et par IC-RT-PCR multiplex (Nemchinov et *al.*, 1995).

1.2.1.4 - Genre des Foveavirus

Foveavirus, est un nouveau genre de virus des plantes se présentant sous forme de particules filamenteuses hélicoïdales de 800nm de long. Le virus type est l'Apple Stem Pitting virus (ASPV). Aucun vecteur du virus n'est connu et la transmission se fait à travers la greffe, et sa diffusion est réalisée par le matériel de propagation infecté (Martelli et Jelkmann, 1998).

La structure et l'organisation du génome ressemble étroitement à celle des genres des Potexvirus, Carlavirus et Allexvirus, mais l'ORF 1 et le cistron de la protéine du cap (ASPV uniquement) sont sensiblement plus grands (Martelli et Jelkmann, 1998).

Les virions ont un sens positif, simple-brin, un ARN génomique polyadénylé d'un poids moléculaire de 8.4 à 9.3 Kb, et un seul type de protéine du cap d'une taille de 28 à 44 KDa. Le génome viral définitif se compose de cinq ORFs codant respectivement, les protéines relatives à la réplication (ORF 1), les protéines putatives de mouvement (ORF 2 à 4, constituant le gène triple de bloc), et la protéine du cap (ORF 5). Les virus s'accumulent dans le cytoplasme là où la réplication est susceptible de se produire.

Les principaux Foveaviruses rapportés sur les prunus à noyaux sont : Le Cherry Green Ring Mottle Virus (CGRMV) et l'Apricot Latent Virus (ApLV). Le CGRMV a été décrit la première fois sur cerisier amer aux Etats-Unis (Zagula et *al.*, 1989). Ce virus affecte à peine la qualité du fruit. La détection est basée sur les analyses biologiques à travers l'indexage sur les cultivars de *Prunus serrulata* tel le Kwanzan et le Shirofugen ou sur l'analyse moléculaire en effectuant la RT-PCR (Zhang et *al.*, 1998). Le CGRMV a été transmis par inoculation de sève à partir du cerisier vers le cerisier, mais pas à une gamme de plantes hôtes herbacées. Aucune analyse sérologique n'est actuellement disponible (Boscia et Myrta, 1998).

Le premier rapport d'ApLV a été faite en Moldavie sur l'abricotier cv Silistra infecté d'une manière latente introduit à partir de la Bulgarie (Zemtchic et Verdereskaya, 1993). Gentit et *al.* (2001) ont rapporté que ce virus existe en France et plus récemment il a été détecté en Palestine par Abbadi (2002). Récemment, Nemchinov et *al.* (2000) ont proposé ApLV en tant que nouveau virus appartenant au genre des Foveavirus, et ils ont développé des amorces spécifiques et des sondes d'ARN pour sa détection.

1.2.1.5 - Genre de Closterovirus

Les virus du genre Closterovirus sont représentés par des particules allongées ayant une taille variant de 1250 à 2200 nm. Le genre comporte des virus qui sont transmis uniquement par des aphides d'une façon semi persistante et qui infectent principalement des hôtes dicotylédones. Plusieurs virus membres sont transmissibles par inoculation de sève, avec une certaine difficulté (Martelli et al., 2002).

Le Plum Bark Necrosis Stem Pitting-associated Virus (PBNSPaV) se produit dans la région méridionale de l'Italie (les pouilles). Récemment, le virus a été détecté sur pêcher, cerisier et amandier (Amenduni et al., 2003). Les abricotiers Cv Tyrinthos infectés par le PBNSPaV montraient des symptômes de stem pitting sur le tronc provoquant parfois la mort des arbres. Le virus peut être détecté par des techniques d'analyse moléculaires et par RT-PCR avec succès (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2001).

1.2.1.6 - Genre des Nepovirus

La plupart des Nepovirus ont une large gamme de plantes hôtes, et beaucoup infectent les plantes herbacées et pérennes. Les particules des Nepoviruses sont polyédriques de 28 à 30nm de diamètre, stables, aisément purifiées et transmis par la sève (Murant, 1981).

Ce sont surtout des virus qui sont transmis par deux genres de nématode (*Xiphinema* et *Longidorus*). Le virus type est le Tobacco ring spot virus (ToRSV). Les Nepoviruses les plus communs rapportés sur rosacées à noyaux sont : Tomato black ring virus (TBRV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), Cherry rasp leaf virus (CRLV), Arabis mosaic virus (ArMV), Raspberry ringspot virus (RpRSV), Myrobolan latent ringspot virus (MyLRSV), et Cherry leaf roll (CLR). Ces virus peuvent tous infecter les rosacées à noyaux mais sont rares ou absents en Méditerranée (Nemeth, 1986, Dunez, 1988).

Récemment, deux nouveaux Nepoviruses ont été rapportés sur les rosacées à noyaux en Europe à savoir l'Apricot latent ringspot virus (ALRSV) et le Stocky prune virus (StPV) (Myrta et al., 2002).

Les Nepoviruses peuvent être détectés habituellement par les tests sérologiques (ELISA). Cependant, l'analyse biologique pourrait être également utile pour la détection de ces virus à travers l'indexage sur le pêcher GF 305, ou par inoculation mécanique à diverses espèces *Chenopodium* sp. (Desvignes, 1999).

1.2.2 - Les maladies induites par des agents non identifiés

Plusieurs maladies transmissibles à travers le greffage ont été rapportées sur les rosacées à noyaux mais leurs agents causaux sont toujours inconnus. Parmi les principales maladies dans le bassin méditerranéen on cite le Cherry rusty mottle, Stem pitting, Apricot pit pox, etc. (Dunez, 1988 ; Desvignes, 1999). Ces maladies peuvent être détectées seulement par la transmission à travers le greffage à des plantes indicatrices.

1.2.3 - Viroïdes des rosacées à noyaux

Les viroïdes sont des agents pathogènes des plantes et sont présents dans le monde entier et généralement causent des pertes et des dommages économiques aux vergers des rosacées fruitières à noyaux et à pépins.

Propriétés générales des viroïdes

La structure physique des viroïdes a été observée en premier lieu directement par microscope électronique; sous des conditions non dénaturantes, les viroïdes apparaissent comme une pseudo baguette de 37 nm, mais sous des conditions dénaturantes, ils peuvent être vus comme des molécules circulaires covalentes fermées (Stasys *et al.*, 1995).

Les viroïdes sont les plus petits agents pathogènes connus des plantes. Ils ont un ARN circulaire simple-brin avec une taille de 246-375 nucléotides (Diener, 1991), et ne possèdent aucune protéine du cap ou activité de mRNA (Hasimoto et Koganezawa, 1987. Du moment qu'aucune protéine codée n'a été identifiée pour les viroïdes, leur détection par les techniques sérologiques n'est pas possible. Par conséquent, leur détection est effectuée à travers les méthodes biologiques et moléculaires (Shikata, 1990, Loretto *et al.*, 1998).

Le premier modèle de structure de viroïde accepté a été développé par Keese *et al.* (1987) (Schéma 3). Il divise la molécule en plusieurs régions appelées domaines: la région centrale conservée (CCR) qui retient un grand niveau d'homologie entre les différents viroïdes du même groupe taxonomique et elle est, cependant utilisée dans la classification des viroïdes : la région de pathogénicité (P) à gauche de la CCR qui a une homologie entre les viroïdes ayant la même gamme de plantes hôtes; la région des mutations, dans cette région qui peut affecter l'infectivité et la symptomatologie; la région variable (V) à la droite de la CCR qui a une séquence hautement variable entre les isolats; les deux régions terminales à gauche (T1) et à droite (T2) (Stasys *et al.*, 1995).

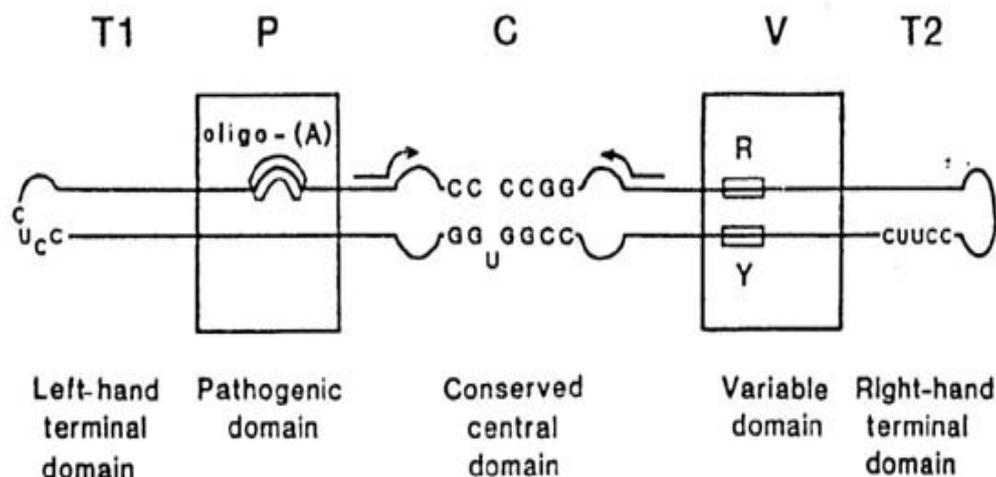


Schéma 3. Structure des *Pospiviroid* montrant cinq domaines: T- terminal gauche P- pathogène C- centrale V- variable Tr- terminale droite (Keese et al., 1987).

Deux viroïdes ont été rapportés sur les rosacées à noyaux à savoir le Hop Stunt Viroïd (HSVd) et Le Peach latent mosaic Viroïd (PLMVd).

1.2.3.1 - Peach latent mosaic Viroïd (PLMVd)

Position taxonomique : Famille : Avsunviroidae, Genre : Pelamoviroid

Agent causal

Le PLMVd est un petit ARN de 335-342 nucléotides (Hernández et Flores, 1992 ; Ambrós et al., 1998, 1999 ; Pelchat et al., 2000). L'ARN est caractérisé par la présence des propriétés d'autoclivage avec des structures en forme de poisson marteau et l'absence d'une région centrale conservée connue (Conserved Central Region : CCR) (Beaudry et al., 1995).

A la différence d'autres viroïdes dans lesquels la structure est sous forme de pseudo-tige ou tige presque complète, le PLMVd a une structure secondaire embranchée peu commune (Navarro et Flores, 1997).

Distribution géographique

PLMVd est présent dans le monde entier dans le germoplasme du pêcher, causant une maladie importante économiquement. Il a été décrit la première fois en France sur le pêcher (Desvignes, 1976), et ensuite, il a été rapporté dans plusieurs pays (Albanese et al., 1992 ; Shamloul et al., 1995, Hadidi et al., 1997) principalement sur pêcher et ses hybrides, mais

également sur prunier, abricotier et cerisier qui sont naturellement infectés (Hadidi et *al.*, 1997 ; Giunchedi et *al.*, 1998).

Le PLMVd est largement distribué en Amérique du Nord et du Sud, en Europe, dans la région méditerranéenne, au Moyen-orient et en Extrême-Orient et récemment, en Australie (Singh et *al.*, 2003 ; Pallás et *al.*, 2003 ; Randles et *al.*, 2003 ; Torres et *al.*, 2004).

Gamme de plantes hôtes

Le viroïde se produit le plus fréquemment sur le pêcher, et moins sur le prunier, cerisier doux et abricotier (Faggioli et *al.*, 1997 ; Hadidi et *al.*, 1997). PLMVd a été récemment trouvé sur le prunier japonais et le plaqueminer (Osaki et *al.*, 1999) et récemment a été rapporté à partir des poiriers sauvages et cultivées (Kiriakopoulou et *al.*, 2001).

Importance économique

Le Peach latent mosaic Viroid (PLMVd) cause une maladie économiquement importante. Le rendement en fruit est diminué dans la qualité et la quantité, et les arbres infectés meurent rapidement (Flores et Liácer, 1988 ; Albanese et *al.*, 1992). L'incidence de PLMVd est relativement haute en Italie (20-50%) (Barba et Faggioli, 1999), l'Espagne (82%) (Badenes et Liácer, 1998) et dans quelques pays du Moyen-orient (29-40 %) (Al Rwahnih et *al.*, 2001 ; Choueiri et *al.*, 2001 ; Ismaeil et *al.*, 2001).

Ces résultats impliquent que le contrôle phytosanitaire du matériel végétal introduit à partir de l'étranger devrait être renforcé, vu le taux élevé de l'infection par PLMVd dans les cultivars étrangers (surtout importés d'Amérique du Nord) (Badenes et Liácer, 1998).

Épidémiologie

Desvignes (1981), a rapporté que sur le pêcher la dissémination est naturelle, et la maladie est transmise par le puceron vert du pêcher (Desvignes, 1986 ; Flores et *al.*, 1992) et par les outils de taille contaminés (Hadidi et *al.*, 1998).

Les tests pour déterminer la transmission du viroïde par les grains de pollen, les semences ou les acariens n'ont donné aucun résultat (Flores et *al.*, 1992). Cependant, l'importance des aphides en épidémiologie de la maladie n'est pas encore connue (Flores et *al.*, 1992). Ceci est confirmé par les travaux de Howell et *al.* (2003).

La maladie de PLMVd peut être transmise par greffage au pêcher GF305 et elle est transmise mécaniquement par les lames contaminées (Desvignes, 1980 ; Flores et *al.*, 1990a), ce qui implique des moyens communs pour son étendue dans les vergers (Hadidi et *al.*, 1997).

Symptômes

L'infection est généralement latente sur les pêchers pendant 5 à 7 années avant que les symptômes apparaissent. PLMVd est latent sur cerisier doux, abricotier, prunier japonais et sur plaqueminier (Hadidi et *al.*, 2003). De temps en temps, une mosaïque, des taches, des bandes de veine, ou des symptômes de calicot apparaissent sur les feuilles infectées.

Les symptômes les plus remarquables sur le pêcher sont la défoliation, le développement de fleur, et la maturation retardée des fruits. Les symptômes des fruits consistent à plusieurs aires, petites, circulaires et décolorées sur la peau du fruit (Desvignes, 1980), et un aspect aplati irrégulier. Les bourgeons montrent une nécrose, le développement des pousses est retardé et les branches peuvent devenir nécrotiques et tombent ce qui accentue le déclin rapide de l'arbre (Desvignes, 1980, 1986 ; Flores et *al.*, 1990b).

Ce viroïde n'incite pas des symptômes remarquables de feuille (comme son nom latent l'indique) (Flores et *al.*, 2003). Néanmoins, les taches sur le pêcher ou la mosaïque jaune du pêcher se développent de temps en temps sur le feuillage. On a observé également que quelques isolats de PLMVd peuvent causer des maladies comme le Plum spotted fruit (Giunchedi et *al.*, 1997), ou le Peach calico (Malfitano et *al.*, 2002).

Détection

Des isolats latents de PLMVd sont détectés par des tests de protection croisée sur pêcher GF305 (Desvignes, 1980). En outre, l'hybridation moléculaire en Dot-Blot (Ambrós et *al.*, 1995 ; Loretti et *al.*, 1995) et tissue printing hybridization (Faggioli et Barba, 2001), RT-PCR (Shamloul et *al.*, 1995), RT-PCR capture hybridization (Shamloul et Hadidi, 1999) et RT-PCR multiplex (Ragozzino et *al.*, 2003) sont des outils utiles pour la détection du PLMVd.

Par ailleurs comme méthode de thérapie, le microgreffage *in vitro* réussit bien avec quelques cultivars, mais pas avec d'autres (Barba et *al.*, 1995).

1.2.3.2 - Hop Stunt Viroid (HSVd)

Position taxonomique : Famille : Pospiviroidae, Genre : Hostuviroid

Agent causal

HSVd a été décrit pour la première fois au Japon comme agent causal de la maladie d'arrêt du développement de houblon (*Humulus lupulus*) (Yamamoto et *al.*, 1970). Les isolats étroitement liés au Hop Stunt Viroid (HSVd) causent la moucheture des fruits du prunier et du pêcher (HSVd-pêcher ou HSVd-prunier). (Sano et *al.*, 1989).

HSVd est un ARN circulaire à faible poids moléculaire infectieux variant entre 297-303 nucléotides avec des variations d'ordre mineure, qui peuvent former des structures en pseudo tige avec un appariement des bases étendu (Puchta *et al.*, 1989 ; Sano, 2003).

Les isolats de HSVd sont groupés comme, soit prunier-type, houblon-type et citron-type, basé sur des séquences homologues (Shikata, 1990) et deux groupes mineurs représentant, peut-être, des recombinants (Kofalvi *et al.*, 1997). Le nombre élevé de nouvelles séquences d'isolats groupées dans deux groupes de recombinants mineurs suggère que les recombinants putatifs puissent se développer plus fréquemment (Amari *et al.*, 2001b).

Distribution géographique

Le HSVd a été rapporté sur les rosacées à noyaux pour la première fois au Japon (Terai, 1985), et plus tard en Europe, en Méditerranée et au Proche-Orient (Loretti *et al.*, 1998 ; Amari *et al.*, 2000 ; Pallás *et al.*, 2003 ; Torres *et al.*, 2004). Il est également présent aux Etats-Unis et en Australie (Little et Rezaian, 2003).

La gamme de plantes hôtes

Le HSVd infecte l'houblon, le concombre, la vigne, le citronnier, le prunier, le pêcher, le poirier (Shikata, 1990) et plus récemment découvert sur abricotier (Flores *et al.*, 1990b; Astruc *et al.*, 1996) et amandier (Cañizares *et al.*, 1999). Sur les *Prunus*, le prunier japonais et l'abricotier développent les titres de viroïde les plus élevés (Desvignes, 1999), tandis que, le titre de viroïde est beaucoup inférieur sur le pêcher (Hadidi *et al.*, 1992).

Importance économique

Le viroïde est commun sur abricotier dans la bassin méditerranéen avec 34 % d'incidence (Pallás *et al.*, 2003). L'incidence élevée de viroïde, même dans les cultivars locaux, et son vrai impact sur la production reste encore à connaître.

Le viroïde coexiste bien dans les cultivars locaux de l'abricotier sans impact significatif sur la production, mais peut changer dans des conditions environnementales déterminées ou par l'introduction de cultivars étrangers moins adaptés aux conditions locales causant quelques désordres sur les plantes hôtes (Pallás *et al.*, 2003).

Épidémiologie

Le HSVd-prunier est transmis par inoculation mécanique à des plantes de la famille des Cucurbitacées et des Composées (Sano *et al.*, 1989). La dissémination naturelle dans les

vergers se fait par le greffage (Terai, 1985). Cependant, les données expérimentales indiquent clairement la transmission potentielle par l'intermédiaire des outils de taille contaminés (Hirashima et *al.*, 1994).

Aucun vecteur n'est connu, mais son occurrence élevée sur abricotier peut servir de réservoir potentiel et de diffusion certaine à d'autres plantes susceptibles, telles que les pêchers et les pruniers (Cañizares et *al.*, 1998).

Symptômes

Le viroïde peut causer des symptômes ou une infection latente et les plantes montrent des désordres spécifiques ou sont infectées d'une manière latente (Puchta et *al.*, 1989).

Les désordres spécifiques liés aux infections de HSVd, sont l'arrêt de développement de l'houblon (Shikata, 1990), le Cachexia du citronnier (Diener et *al.*, 1988) et la moucheture des fruits du prunier et du pêcher (Sano et *al.*, 1989). Certaines variétés de pêcher et de prunier japonais affectées montrent des décolorations en forme d'anneau sur les fruits sans symptômes sur le feuillage ou la structure de l'arbre (Sano et *al.*, 1989 ; Sano, 2003).

En Europe, le viroïde est asymptomatique sur beaucoup de variétés locales d'abricotier et de pêcher (Grasseau et *al.*, 1999).

Détection

Le viroïde peut être transmis au concombre (*Cucumis sativus*), mais le processus de l'inoculation mécanique à cette plante herbacée est difficile et incertain (Desvignes, 1999). Le microgreffage *In vitro* (Shoot-tip grafting), réussi avec quelques cultivars, mais pas avec tous (Barba et *al.*, 1995).

Le gel d'électrophorèse explore la mobilité distincte du petit viroïde circulaire RNAs peut être employé, mais il est peu convenable avec les analyses à grande échelle (Pallás et *al.*, 2003). La détection par hybridation moléculaire et PCR à l'aide des sondes spécifiques de HSVd ou des amorces non radioactives sont actuellement des méthodes de choix (Hadidi et *al.*, 1992 ; Astruc et *al.*, 1996 ; Pallás et *al.*, 1998 ; Amari et *al.*, 2001a ; 2001b).

En outre, tissue immunoprinting hybridization avec le transfert direct de la matière végétale sur une membrane de nitrocellulose est employée pour la détection de HSVd (Astruc et *al.*, 1996 ; Cañizares et *al.*, 2001 ; Amari et *al.*, 2001a). Cette méthode facilite la détection du viroïde, tout en évitant des procédures de travail d'extraction d'échantillons et permettant la surveillance de l'HSVd sur abricotier au delà de la saison végétative (Amari et *al.*, 2001a).

1.2.4 - Les maladies à phytoplasmes des rosacées fruitières à noyaux

Plusieurs maladies à phytoplasmes d'importance majeure semblent se produire en Europe. Les rosacées à noyaux sont affectées par plusieurs désordres maladifs tel l'enroulement des feuilles d'abricotier, le leptonecrosis du prunier, des jaunissements et déclin des pruniers. Ces maladies affectent sévèrement les récoltes respectives dans la plupart des secteurs où elles sont cultivées en Europe (Carraro et al., 1998).

Les Phytoplasmes ont été découvert et différenciés des virus par Doi et al.(1967). Ils sont épidémiques et ont une longue période d'incubation lorsqu'ils affectent les rosacées à noyaux (Desvignes, 1999). Selon Lorenz et al. (1994) ces maladies sont censées avoir une étiologie commune et maintenant le nom de toutes ces maladies est devenu l'European stone fruits yellows phytoplasma (ESFY).

1.2.4.1 - European stone fruits yellows phytoplasma (ESFY)

L'ESFY est étroitement lié aux phytoplasmas causant la prolifération du pommier (Apple Proliferation) et le déclin du poirier (Pear Decline) (Lorenz et al., 1994). L'Apricot leaf roll est l'une des maladies induites par les phytoplasmes connue en France depuis le début du 20^{ème} siècle. Il engendre de grave dégât et il est d'une importance économique considérable dans la région méditerranéenne (Nemeth, 1986).

L'agent pathogène peut être transmis à la plupart des espèces du genre *Prunus*. Les symptômes sur l'abricotier sont très variables. Il est plus difficile de diagnostiquer la maladie sur le pêcher que sur abricotier. Sur le prunier japonais la maladie est caractérisée par des pousses courtes et minces et un jaunissement et enroulement des feuilles. ESFY est disséminé par le greffage de bourgeons, et par des Psylles (*Cacopsylla pruni*) (Carraro et al., 1998).

La détection des phytoplasmes est effectuée par microscopie de fluorescence et microscopie électronique, et avec succès par PCR (Dieckmann et Putter, 1996). En ce qui concerne l'indexage biologique, des cultivars susceptibles de prunier japonais tels que Ozrak premier et les jeunes plantes du pêcher GF305 sont recommandés comme indicateurs.

1.3 - Lutte et techniques d'assainissement

La lutte contre les viroses consiste actuellement à ne cultiver que des plantes exemptes de virus, à mettre celles-ci à l'abri des vecteurs et autres sources de contamination ou encore à n'utiliser que des variétés résistantes. Ces moyens de lutte sont loin d'être parfaits, mais ils permettent de limiter les méfaits de ces maladies. L'obtention de matériel végétal exempt de

virus à partir de plantes malades est réalisée le plus souvent par la conjugaison de la thermothérapie et la culture de méristèmes.

L'assainissement est devenu avec la libération du commerce mondial plus important, d'où l'instauration du «passeport de la plante», relatif à la qualité et à l'état sanitaire du matériel de propagation (Lovisolò et *al.*, 2000). Au cours de la pratique de l'assainissement des techniques précises de diagnostic des pathogènes, que nous devons éliminer est nécessaire.

1.3.1 - La micropropagation des apex méristématiques

La micropropagation se définit comme étant la technique de multiplication d'un fragment végétal, lorsqu'il est placé sur un milieu nutritif (Lovisolò, 1994).

La micropropagation se réfère à une culture aseptique des cellules, tissus ou organes entiers. Il est possible de régénérer de nouveaux plants à partir de petites parties de tissus de plantes, car chaque cellule possède le même code génétique. Cette cellule est capable de se développer en suivant un chemin programmé pour donner des plantes entières identiques à celle d'origine. La micropropagation trouve son importance dans la capacité de produire des plants en qualité et en quantité désirable (Scott, 1981).

Les apex végétatifs apicaux et axillaires peuvent régénérer la plante entière s'ils sont cultivés *in vitro* sur des substrats artificiels contenant une source de carbone, sels minéraux, hormones et vitamines (Lovisolò, 1994).

Cette application peut se réaliser en quatre phases dans un but d'assainissement. Elle débute par l'établissement des cultures, suivi par les phases de multiplication des explants et de pré-transplantation et se termine par la phase de transplantation. Selon Mathews (1991) l'hypothèse expliquant l'absence des particules virales dans le méristème est basée sur le fait que la synthèse des protéines de la plante est plus active dans la cellule en division, ce qui rivalise avec le RNA viral dans les méristèmes. Ceci soutient que le phénomène de division qui résulte de l'augmentation de l'antagonisme entre le métabolisme cellulaire normal et le processus d'infection virale. Il est aussi possible que dans quelques combinaisons hôte-virus, existe un blocage dans la migration des composants viraux dans les cellules du méristème.

1.3.2 - Assainissement par thermothérapie

La thermothérapie est la plus antique parmi celles utilisées pour l'assainissement des plantes affectées de maladies virales. Elle a été développée à partir de 1936, grâce aux travaux de Kunkel (1935-1936) aux USA sur (Peach Yellow et Peach Rosette). Il est le premier à

avoir pratiqué la thermothérapie, il a élevé les plantes infectées pour trois semaines dans une chambre chauffée à 35°C. Le système est aujourd'hui utilisé pour l'assainissement des plantes infectées de maladies virales.

Caudwell *et al.* (1994) ont obtenu la guérison de boutures de vigne affectée de flavescence dorée en les maintenant à des températures variables entre 40 et 55 °C pour des périodes de temps de dix minutes à dix heures. Pour la majorité des viroses, la guérison a été obtenue en élevant les plantes à 32-38 °C pendant 14 à 50 jours, en prélevant à partir des plantes de jeunes bourgeons.

La majorité des phytovirus se répliquent avec difficulté à des températures supérieures à 32 °C et la réplication est bloquée à des températures dépassant 38 °C. En 1994, Postman a confirmé ces résultats qui sont valables pour les virus et non pour les viroïdes. Dans plusieurs combinaisons virus-hôte, la réplication virale est totalement bloquée à des températures comprises entre 32 et 38 °C et l'élimination de virus dépend du temps d'exposition (Lovislo,1994).

Le traitement thérapeutique est facile à mettre en œuvre vu qu'il ne demande pas d'appareillages ou de structures particulièrement complexes. Il est exécuté dans des chambres climatiques ou des chambres chaudes où les différents facteurs (température, lumière et humidité) peuvent facilement être contrôlés. Cette technique est largement utilisée en association avec les autres techniques citées précédemment (Savino, 1994).

1.3.3 - Assainissement par chimiothérapie

La multiplication des virus est intimement associée aux processus énergétiques et métaboliques de la cellule. Il est difficile de trouver un composé qui est létal pour les virus sans interférer avec la cellule hôte.

Selon Pennazio et Martelli (1983), les chimiothérapeutiques antivirales doivent posséder beaucoup d'exigences pour pouvoir être utilisés les plantes saines, mais la maigre connaissance des mécanismes de réplication des virus dans les cellules végétales, et la difficulté de repérer des composés avec un indice thérapeutique élevé, non toxique pour la cellule et écologiquement neutre, rendent le succès de la pratique de la chimiothérapie en agriculture très maigre.

La chimiothérapie a par contre une importance notable dans l'assainissement si elle est utilisée en combinaison avec d'autres méthodes principalement la culture *in vitro* des apex méristématiques, le micro greffage et la thermothérapie. Les principaux composés qui ont une action thérapeutique ou au moins antagonistes à l'égard des phytovirus sont, selon la

classification de Pennazio et Martelli (1983) et du point de vue assainissement, uniquement le dernier groupe trouve son importance.

- Les inactivateurs de l'infection virale.
- Les inhibiteurs naturels de la transmission.
- Les inductions de résistance de type pré-infection.
- Les facteurs interférentiels d'origine post-infection.
- Les inhibitions de la multiplication virale *in vivo*.

1.3.4 - Obtention de la résistance par transgénèse

Le génie génétique permet de modifier *in vitro* le génome des cellules ainsi que des organismes et de réaliser des organismes génétiquement modifiés (OGM) à travers l'introduction de caractéristiques nouvelles (Berraud, 2001).

Des résultats remarquables ont été récemment notés grâce à la transgénèse : des premières lignées de pruniers et d'abricotiers résistants à la Sharka, par exemple, ont été obtenus. La transgénèse pourrait ainsi contribuer, en complément des approches conventionnelles d'amélioration des plantes, à limiter l'impact de la Sharka (et peut être d'autres maladies virales) sur la production fruitière (Ravelonandro et Dunez, 1995).

1.3.5 - Sélection sanitaire et certification

Là où elles ont été appliquées, les procédures de sélection sanitaire ont apporté une amélioration considérable et durable de la qualité de la production fruitière, notamment dans le cas de pathogènes non disséminés naturellement. Les Ilarvirus, sont responsables de maladies sévères (nanisme des arbres, réduction du rendement et qualité des fruits...etc.). Les virus sont transmis par pollen, et le contrôle de leur transmission naturelle est impossible. L'infection a eu lieu durant la période de pollinisation quand l'arbre est âgé de 4 à 6 ans.

Des comparaisons entre les plantes initialement infectées lors de la transplantation et des plantes infectées par les graines de pollen, montrent significativement un impact réduit dans le cas des infections à pollen dans les 4 à 6 ans de l'âge de l'arbre. Dans la plupart des cas, l'utilisation de plantes saines (libres de virus) est un outil efficace pour contrôler l'impact des Ilarvirus (Bernhard *et al.*, 1975).

Pour un programme de certification des essences (fruits) à noyaux, un compromis entre la simplicité d'automatisation et la sensibilité doit être choisi. En règle générale, un matériel certifié ou certifiable peut être essayé par des méthodes sérologiques ou par

l'hybridation moléculaire non radioactive, alors que des techniques plus sensibles, mais aussi moins onéreuses, comme celles dérivées de l'approche de la PCR, peuvent être appliquées sur les sources originelles ou sur le matériau de base, de même pour celui importé, les bourgeons lors de la mise en quarantaine ou au cours des pratiques sanitaires.

D'après Rawhani et *al* (1995), la sensibilité et la simplicité des nouvelles méthodes moléculaires ont été suffisamment améliorées pour détecter la majorité des phytovirus à des niveaux au-dessous des seuils économiques. Le but pour les années qui viennent est de faire de ces méthodes plus accessibles aux laboratoires spécialisés.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

- **Enquêtes aux champs**
- **Détection sérologique des virus**
- **Détection moléculaire des virus**
- **Détection moléculaire des Viroïdes**
- **Application de trois techniques de détection
synchronique des Harvirus**

Chapitre II : Matériels et méthodes

2.1 - Enquêtes aux champs

Les inspections aux champs et la collection d'échantillons ont été effectuées à travers les principales zones productrices des fruits à noyaux de six Wilayas du pays à savoir Sétif, Bordj Bou Arréridj, Batna, M'sila, Mila et Constantine (Figure 1). Cette zone d'étude couvrait en 2005, 27012ha. (Tableau 4).

Tableau 4 : Place des Prunus cultivés dans la zone d'étude en ha (Anonyme, 2005)

Wilaya	Abricotier	Amandier	Cerisier	Pêcher	Prunier	Total
Batna	6580	264	43	483	356	7726
Sétif	872	2698	66	652	234	4522
Constantine	316	569	110	46	184	1225
M'sila	8610	270	0	680	570	10130
Mila	269	1116	34	83	92	1594
BBA	775	656	16	150	218	1815
Total zone	17422	5573	269	2094	1654	27012
Total Algérie	45650	68050	5410	26510	19870	165490
Taux (%)	38,16	8,19	4,97	7,90	8,32	16,32

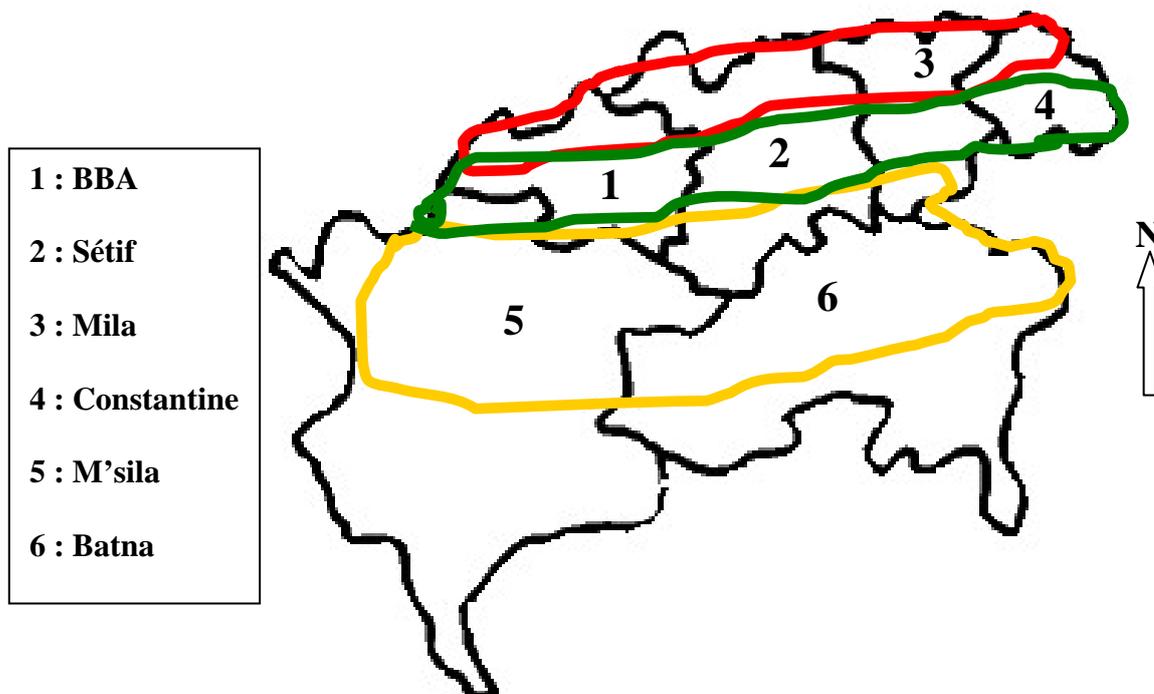


Fig. 1. Carte géographique représentant la zone d'étude touchée par l'échantillonnage.

2.2 - Echantillonnage

Les échantillons ont été prélevés à partir de l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), le cerisier (*Prunus avium* (L.) L., *P. cerasus* L.), le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch) et les nectarines, le prunier (*Prunus domestica* L., *Prunus salicina* Lindley) et l'amandier (*Prunus amygdalus* Batsch, syn. *P. dulcis* (Miller) D.A. Webb) et à deux espèces de *Prunus* utilisées comme porte-greffe, à savoir la Sainte Lucie et le myrobolan (*Prunus Cerasifera* L.).

Les échantillons ont été récoltés aléatoirement à partir de vergers commerciaux, des parcs à bois, collections variétales et de pépinières spécialisées dans la production de plants fruitiers, appartenant tant au secteur privé que étatique, à raison de :

- 10-15 arbres par verger commercial;
- 2 arbres par variété au niveau des collections variétales;
- 4-6 plants / variété au niveau des pépinières.

Les échantillons destinés aux analyses pour la détection des deux viroïdes à savoir le Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) et le Hop Stunt Viroid (HSVd), sont constitués de feuilles matures basales avec leur pétioles, prélevées des quatre cotés de l'arbre durant la période automnale, durant laquelle la concentration des viroïdes est au maximum (Amari et *al.*, 2001 ; Matic et *al.*, 2005).

La technique proprement dite, s'agissait à une impression des pétioles de feuille en pressant le jus de la plante entre les deux doigts, directement au champ sur les membranes de nitrocellulose. De chaque arbre, la sève de trois feuilles est appliquée sur la membrane, sur un plan diagonal, à cause de la répartition inégale des viroïdes à l'intérieur de la plante infectée (Amari et *al.*, 2001 ; Matic et *al.*, 2005).

En ce qui concerne la détection des principaux virus des rosacées fruitières, à travers des analyses sérologiques et moléculaires, 4 à 6 feuilles par arbre étaient prélevées, mis dans des sachets en plastique et stockées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Les normes d'échantillonnage sont de l'ordre de 5 % d'arbres dans les vergers commerciaux et 20 % d'arbres dans les collections variétales et les champs de pieds de mère (au moins deux arbres de chaque variété).

2.2.1 - Récolte des échantillons pour la détection des virus

Durant les inspections des champs, 37 vergers commerciaux, 9 parcs à bois et collections variétales et 11 pépinières ont été visités. L'opération d'échantillonnage effectuée au printemps des années 2005 – 2008 a touché au total 44 variétés, appartenant aux

cinq espèces de *Prunus* cultivées et deux espèces de *Prunus* utilisées comme porte-greffe, à savoir la Sainte Lucie et le myrobolan (*Prunus Cerasifera* L.).

La récolte des échantillons a été soldée par le prélèvement de 967 échantillons dont 519 échantillons issus de vergers commerciaux, 264 échantillons à partir de parcs à bois et collections variétales et 184 échantillons à partir des pépinières (Tableau 5).

Le prélèvement des échantillons a été effectué tout en prenant en considération l'importance relative des espèces et leur distribution dans les différents étages bioclimatiques de la zone d'étude. A cet effet, 288 échantillons ont été prélevés des vergers commerciaux, pépinières et parcs à bois de l'étage Sub-humide, 357 échantillons de l'étage semi-aride et 322 échantillons de l'étage aride (Tableau 5).

Si le prélèvement des échantillons était aléatoire, le choix des vergers n'était pas fortuit, puisque on a essayé de visiter toutes les zones arboricoles des deux wilayas et choisir les vergers les plus représentatifs que possible.

Tableau 5 : Nombre d'échantillons par étage bioclimatique et par système de conduite

Etage bioclimatique	Mode de conduite			
	Pépinières	Parc à Bois	Vergers commerciaux	Total
Sub-humide	/	107	181	288
Semi-aride	115	107	135	357
Aride	69	50	203	322
Total	184	264	519	967

L'opération d'échantillonnage proprement dite dans la région d'étude a été soldée par le prélèvement de 286 échantillons. Les échantillons sont répartis entre les différentes espèces de rosacées fruitières cultivées comme suit : 258 échantillons d'abricotier, 182 de prunier, 121 d'amandier, 140 de pêcher et 148 échantillons de cerisier. A cela s'ajoute 264 échantillons issus de variétés porte-greffes, répartis en 17 échantillons d'abricotier, variété Mechmech, 8 de pêcher Franc Missouri, 17 échantillons de prunier GF 8, 18 échantillons d'amandier amer, 28 échantillons de Sainte Lucie et 8 échantillons de Myrobolan (Tableau 6).

Tableau 6: Nombre d'échantillons prélevés par espèce de rosacée fruitière cultivée.

Espèces	Nombre variétés	Pépinières	Parc à Bois	Vergers commerciaux	Totaux
Abricotier	12	40	46	172	258
Mechemech	1	17	0	0	17
Pêcher	10	19	30	91	140
Nectarine	2	0	0	22	22
Pêcher Franc Missouri	1	0	8	0	8
Prunier	8	19	57	106	182
Prunier GF 8	1	5	12	0	17
Amandier	5	24	40	57	121
Amandier amer	1	13	5	0	18
Cerisier	5	21	56	71	148
Sainte Lucie	1	18	10	0	28
Myrobolan	1	8	0	0	8
Totaux	44	184	264	519	967

2.2.2 - Récolte des échantillons pour la détection des viroïdes

La récolte des échantillons a été soldée par le prélèvement de 1128 échantillons dont 588 échantillons issus de vergers commerciaux, 280 échantillons à partir de parcs à bois et collections variétales et 260 échantillons à partir des pépinières (Tableau 7).

En ce qui concerne l'échantillonnage par espèce, on remarque que l'abricotier vient en première position avec 346 échantillons prélevés, viennent ensuite par ordre décroissant, le prunier : 224 échantillons, le pêcher : 198 échantillons, l'amandier : 195 échantillons, le cerisier : 127 échantillons et enfin les espèces utilisées comme porte-greffe (Sainte Lucie et Myrobolan) avec 38 échantillons (Tableau 7).

Tableau 7: Récapitulatif général de l'échantillonnage des viroïdes (2004 – 2008).

Espèces	Mode de conduite			
	Plants pépinières	Parcs à bois	Vergers commerciaux	Total
Abricotier	79	71	196	346
Pêcher	37	47	114	198
Prunier	45	60	119	224
Amandier	61	64	70	195
Cerisier	12	26	89	127
Autres espèces	26	12	/	38
Total	260	280	588	1128

Il ressort de cette opération, primo, le nombre d'échantillon par espèce reflète plus au moins l'importance de chaque culture dans la région d'étude, l'exemple de l'abricotier qui est largement dominant, secundo, la majorité des variétés cultivées sont d'origines étrangères, mis à part quelques variétés d'abricotier dont l'appellation dénote une origine locale ; mais qui sont absentes sur le catalogue national. S'agit-il vraiment de variétés locales non encore enregistrées ou des dénominations locales pour des variétés importées.

2.3 - Détection sérologique des virus

2.3.1. Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA)

Tous les échantillons récoltés ont été examinés par ELISA à travers le protocole développé par Clark et Adams (1977). Les tests visaient la détection du Prunus Necrotic Ring Spot Virus (PNRSV), du Prune Dwarf Virus (PDV), du l'Apple Mosaic Virus (ApMV), du Plum Pox Virus (PPV), de l'Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) et du Plum Bark Necrosis Stem Pitting Associated Virus (PBNPaV). Les réactifs sérologiques utilisés, étaient des kits d'antisérums commerciaux pourvus par plusieurs firmes internationales (Agdia USA ; Bioreba, Suisse).

Pour la technique du Double Antibody Sandwich – Enzyme linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) (Schéma 4), les puits des plaques de microtitration en polystyrène sont au départ sensibilisés par les IgGs dilués dans le tampon de sensibilisation (annexe 1) et

incubées à 37 °C pendant une durée de 2 h. Les plaques sont alors lavées trois à plusieurs reprises allant de 3 à 5 lavages successifs avec le tampon de lavage pendant 3 minutes chacun.

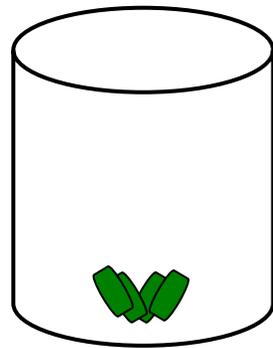
La seconde étape concerne l'ajout des échantillons extraits dans le tampon d'extraction (annexe 1), à raison de deux puits par échantillon pour minimiser les risques d'erreur. Après l'ajout des échantillons (100 µl par puits), les plats sont incubés 2 h à 37 °C ou durant toute la nuit à 4 °C.

Après trois lavages successifs comme précédemment, 100 µl d'anticorps conjugués à la phosphatase alcaline et dilués dans le tampon de conjugaison sont ajoutés à chacun des puits et les plaques ont été incubés à 37 °C pendant 2h (annexe 1). Après trois lavages additionnels, le p-nitrophenylphosphate fraîchement préparé dans le tampon de substrat à raison d'1 mg/ml est additionné à chacun des puits.

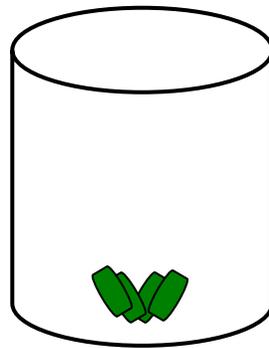
La dernière étape, consiste à l'incubation des plaques à la température ambiante et la mesure photométrique a été prise à 405 nm après 30mn, 1h et 2h avec un lecteur de plaque de microtitration Multiskan plus le de MKII.

Les étapes du protocole suivi sont comme suit (Schéma 4):

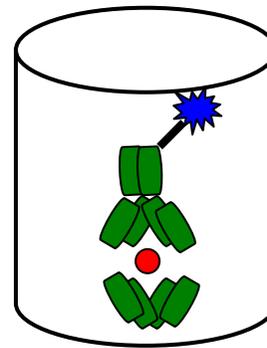
- Les puits de la plaque de titration de polystyrène sont sensibilisés avec des anticorps antigène spécifiques (IgG) dilués au préalable dans le tampon de sensibilisation avec à raison de 100 µl par puits ; Les plats sont alors incubés pour 2h à 37°C, suivi de trois lavage successifs avec le tampon de lavage ;
- Les extraits des échantillons, préparés au préalable dans le tampon d'extraction, sont ajoutés à raison de deux puits par échantillon et incubés durant 3 heures à 37°C ou durant toute la nuit à 4°C. Des témoins positifs et négatifs sont également chargés aux puits dans les mêmes conditions, trois lavages successifs terminent cette étape ;
- La deuxième couche d'anticorps mais conjugués à l'enzyme (phosphatase alcaline), dilués dans le tampon de conjugaison sont ajoutés à raison de 100 µl / puit. Les plaques sont incubés et lavés à la fin de l'étape comme précédemment ;
- Le substrat fraîchement préparé à une concentration de 0.75 mg/ml dans le tampon de substrat et chargé et les plats sont incubés à la température ambiante jusqu'à ce que le changement de couleur développée dans les puits des témoins positifs et une mesure photométrique à 405nm est faite après 1h et 2h par un lecteur de plaque de microtitration.



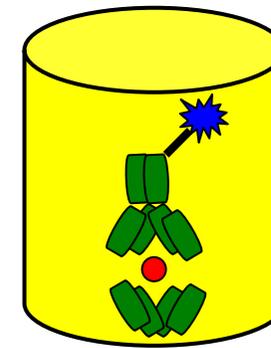
Sensibilisation :
Fixation des anticorps
sur les bords de la
plaque



Formation du
complexe
Anticorps - Antigène



Formation du complexe
Anticorps – Antigène – Anticorps



Production de la
coloration en présence
du substrat spécifique

Schéma 4 : Les différentes étapes de la technique de DAS-ELISA (Clark et Adams, 1977).

2.4 - Détection moléculaire des virus

Tout d'abord, il est important de signaler que la réalisation de toutes les techniques moléculaires a été effectuée auprès de l'Institut Agronomique Méditerranéen de Bari, Italie. La technique adoptée est la RT-PCR, qui est une technique largement utilisée dans la détection des virus infectant les rosacées fruitières à noyaux. Cette technique visait surtout la détection des virus suivant : Cherry Green Ring Mottle Virus (CGRMV), Cherry Virus A (CVA), Apple Latent Virus (ApLV) alors que la Nested - RT-PCR, elle a été utilisée pour la détection du Plum Bark Necrosis Stem Pitting associated Virus (PBNSPaV).

2.4.1 - Extraction des acides nucléiques Totaux

Initialement les acides nucléiques totaux (TNA) ont été extraits à partir de 35 échantillons de Prunus cultivés, en utilisant la méthode de capture par la silica légèrement modifiée, comme décrit par Foissac *et al.* (2001).

100 mg de tissu foliaire ont été extrait dans un (1) ml de tampon d'extraction (Annexe 2). 500 µl de l'extrait sont alors transférés dans des tubes eppendorf et 100 µl de Sarcosyl 10% est ajouté. Tous les tubes sont incubés à une température de 70 C° pendant 10 mn et agités de temps à autre, puis incubés pendant 5 min dans la glace. Après une centrifugation de 6 K pendant 10 min, 300 µl de la mixture est transférée dans de nouveaux tubes contenant : 150 µl EtOH, 300 µl 6 M NaL auxquels on ajoute 25 µl d'une suspension de Silica.

Les tubes sont incubés à la température ambiante pendant 10 min et agités de temps à autre, puis sont centrifugés à une vitesse maximale pendant 1 min. Après avoir jeter le surnageant, les culots sont lavés avec 500µl de tampon de lavage, et centrifugés à 6 K pendant 1 min. après un second lavage, le culot est dissout dans 150 µl d'eau stérile et les tubes sont incubés à 70 C° pendant 4 min. Après une centrifugation à une vitesse maximale de 14 000 tr/mn, pendant 3 min, le surnageant est transféré à de nouveaux tubes et stockés à - 20 C° (Annexe 2).

2.4.2 - Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.4.2.1 - Synthèse de DNA complémentaire (cDNA)

Les TNA ont été utilisés comme modèle pour la production d'un brin complémentaire (single stranded cDNA). Pour cet objectif, 7 µl de TNAs en présence de 22 µl d'eau stérile et 1 µl de amorces hexanucléotide random (1 µg/µl), ont été dénaturés à 95°C pendant 5 min et placés directement sur la glace pendant 3 min. Ensuite, 10 µl de

tampon 5X reverse transcriptase (RT) (Promega), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl M-MLV (200 Units / µl), 2 µl DDT 0.1 M et 5 µl H₂O ont été ajoutés à la mixture qui a été incubée à 42°C pendant 1 heure (Annexe 3).

2.4.2.2 - Amorces PCR utilisées

La PCR a été performée en utilisant les amorces suivantes pour la détection des virus suivants : GRM8316 (5' CCT ATA GCC AGT CTT CAT ATT ATG 3' antisense) et GRM7950 (5' GCA GCC TTT GAC TTT TTT GAG 3' sense) amorces, amplifiant un fragment DNA de 366 bp comme indiqué pour le CGRMV (Rott et Jelkmann, 2001), CVA 11L (5' CAG GAT TCT TGC ACT CTA GC 3' antisense) et CVA 11 R (5' AGG TGA TCG CCT TTA TTG TA 3' sense) amorces amplifiant un fragment DNA de 497 bp comme indiqué pour CVA (**Al Rwahnih, unpublished**) et l'homologue spécifique HALV1 (5' GGA ATA GAG CCC CAA GAG 3'antisense) et complémentaire CALV1 (5'- AGC AAG GTA AAC GCC AAC -3'sense) amorces utilisées qui amplifient le modèle Apr-47, les amorces H-ALV1 et C-ALV1 qui amplifient un fragment de la protéine du cap du ayant environ 200 bp pour la détection de l'ApLV.

Les paramètres des cycles de PCR ont été comme suit : dénaturation à 94 °C pendant 30 sec, annealing à 58 °C pendant 30 sec et l'extension 72 °C pendant 45 sec, totalisant 35 cycles avec une extension finale à 72 °C pendant 7 min (Schéma 5) (Nemchinov and Hadidi, 1998).

2.4.2.3 - Nested RT-PCR

Deux tours de PCR ont été réalisés pour la détection du PBNPaV: RT-PCR a été faite en utilisant les amorces ASP1 (5' GTA GTC CGC TGG TAC GCT ACA AG 3' antisense) et ASP2 (5' CGC TAG GGC TGT GAC TAC CG 3' sense) (Abou Ghanem-Sabanadzovic et *al.*, 2001), suivie de la nested-PCR en utilisant les amorces ASPn1 (5' AGC CAC TAC TGA CCT GTA GC 3' antisense) et ASPn2 (5' ACG AAT CCG AGT TTC GTC GC 3' sense) (Amenduni et *al.*, 2005), amplifiant un produit de 191 bp comme rapporté pour le PBNPaV.

La seconde amplification a été performée dans le thermocycler, la mixture de réaction contenait 1 µl de RT-PCR amplicons, 5 µl 10 x de tampon PCR (Promega), 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl dNTPs 10 mM, 1 µl de amorces spécifiques ASPn1 et 1 µl ASPn2 5 µM, 0.25 µl de la Taq polymérase (Promega) et 38.75 µl d'RNase free water. Les conditions des cycles de PCR avaient une dénaturation initiale réalisée à 92°C pendant 90

sec et les cycles suivants comme suit : dénaturation pendant 20 sec à 92°C, appariement pour 30 sec à 58°C, extension pendant 45 sec à 72°C pendant 30 cycles, et une extension finale pour 5 min à 72°C (Schéma 5) (Annexe 3).

2.4.3 - Analyse des produits de la PCR

Les produits de la PCR ont été analysés par une course électrophorétique verticale sur un gel de polyacrylamide (PAGE 5%). Le gel de polyacrylamide a été préparé en mélangeant la mixture des produits suivants (40% Acrylamide / Bis, 10X tampon TBE, eau distillée, 10% APS) et laisser 15mn pour polymérisation (Annexe 4). L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM d'acide borique, 2.5 mM EDTA, pH 8.0). Des aliquots de 10 µl des produits de la PCR ont été mélangés avec 3 µl de marqueurs XIV (Roche) ont été utilisés comme des marqueurs de DNA. Le gel a été laissé courir à 100 V pendant 1 h, et les produits ont été analysés par coloration argentée.

2.4.4 - Coloration argentée

Le gel a été incubé avec 100 ml de solution d'acide acétique 10% pour 20 min et lavé 3 fois avec de l'eau distillée pendant 30 sec chacun. Le gel par la suite a été incubé avec 100 ml de solution d'acide nitrique 1 % pendant 3 min, rincé 3 fois avec de l'eau distillée, puis incubé avec une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) pendant 20 min.

Après un lavage avec de l'eau distillée, la solution de développement a été ajoutée au gel jusqu'à l'apparition des bandes. La coloration est stoppée par l'ajout d'une solution d'acide acétique 10 % (Annexe 4).

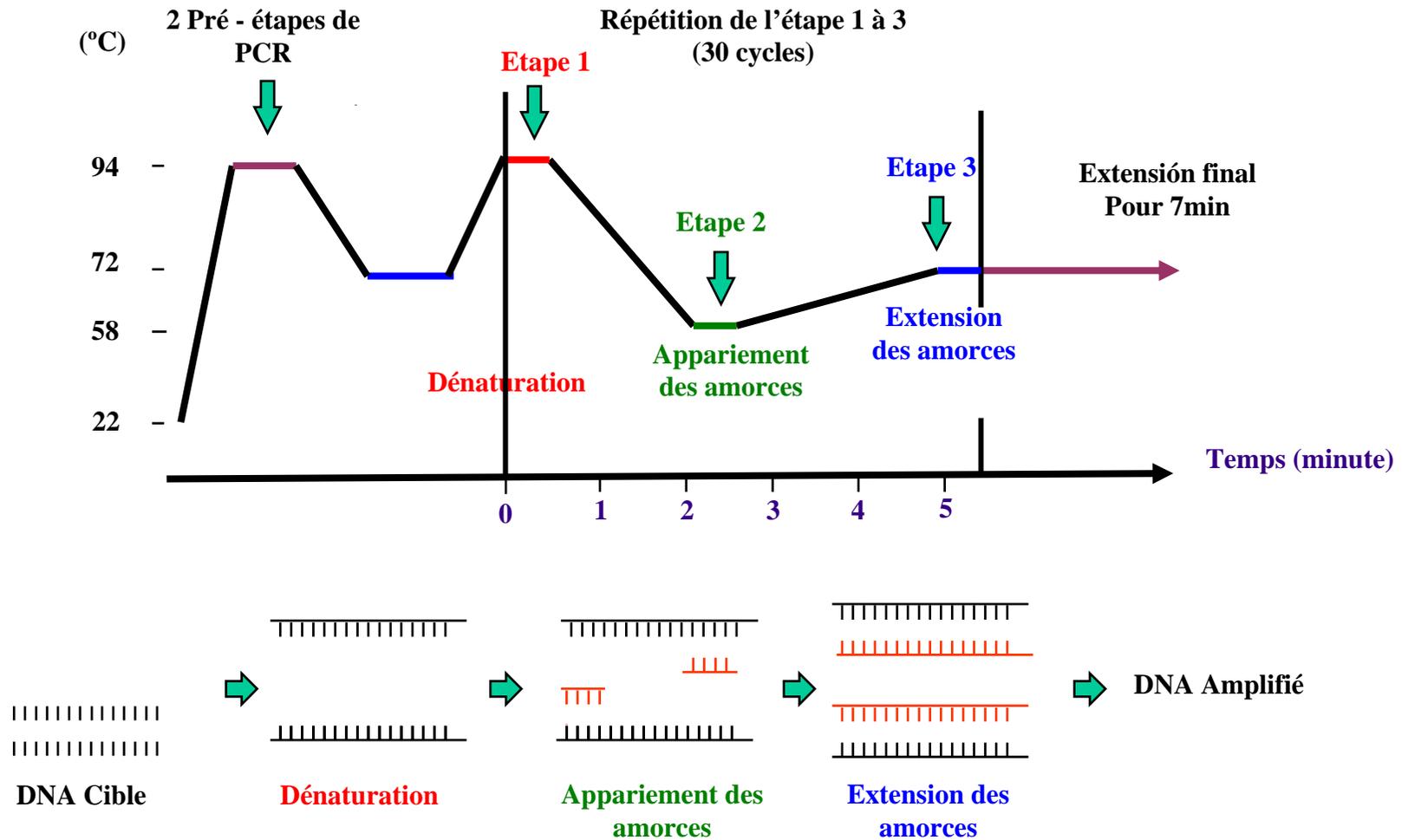


Schéma 5. Protocole général de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Nemchinov and Hadidi, 1998).

2.5 - Détection des Viroïdes

Deux techniques moléculaires d'hybridation ont été employées pour la détection de PLMVd et de HSVd en l'occurrence : l'hybridation en Dot Blot et la technique de tissue immunoprinting hybridation.

2.5.1 - Hybridation moléculaire en dot blot

Cette méthode est employée pour la détection du Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) (Albanese *et al.*, 1992) et le Hop Stunt Viroid (HSVd) (Astruc *et al.*, 1996), en effectuant le marquage avec la DIG de l'acide nucléique avec des sondes d'ARN précédemment produites. (Astruc *et al.*, 1996). La technique proprement dite est composée de plusieurs étapes, et sont décrites ci-dessous.

2.5.1.1. Extraction totale d'ARN

Les acides nucléiques totaux ont été extraits selon la méthode non-organique, décrite par Astruc *et al.* (1996) avec de légères modifications. Un demi gramme de tissu de la feuille est homogénéisé dans un sachet en plastique stérile en présence de 5 ml de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 7.0 500 mM de NaCl et 2 % de metabisulfite de sodium) (Annexe 5). 1 ml de l'extrait est transféré à un tube d'ependorf stérile et mélanger avec 50 µl de SDS (20%).

Les échantillons sont alors incubés à 65°C dans un bain d'eau pendant 30 minutes. Puis, 250 µl de la solution de KOH 5 M sont ajoutés, homogénéisés, incubés dans un bain de glace pendant 20 mn et centrifugé à 13.000 tr/mn pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et incubé durant toute la nuit à - 20°C en présence de 2.5 volumes d'éthanol absolu et de 0.1 volume d'une solution d'acétate de sodium 3M (pH 5.5) (Schéma 6).

2.5.1.2. Précipitation à l'éthanol

Les échantillons (stockés à - 20 °C) sont centrifugés à 13.000 tr/mn pour 15 minutes, et le surnageant est jeté. Les culots sont dissout dans 1 ml d'éthanol froid 70% et centrifugés à 13.000 tr/mn pendant 5 minutes.

Le surnageant est jeté, les culots secs sont dissout dans 50 µl RNase libre d'eau par homogénéisation de la fraction insoluble. 15 µl du surnageant sont sédimentés, et les culots sont employés dans les analyses. L'hybridation en dot blot est alors effectuée comme décrite par les instructions des fabricants (DIG Chemiluminescent detection Kit - Roche).

2.5.1.3. Dénaturation de l'échantillon

Pour chaque 15 µl de la préparation d'échantillon un volume égal du tampon de dénaturation fraîchement préparé (100 mM de NaOH, 5mM EDTA) est ajouté et incubé à la température ambiante pendant 5 minutes. Les membranes en nylon chargées positivement (Hybond N⁺) sont imbibées dans la solution de 2X SSC pendant quelques minutes avant le placement dans l'appareillage de la dot blot (ABN vacuum system micro sample blotting apparatus). Puis 30µl de la préparation d'ARN dénaturée est ajoutée à chaque puit de l'appareil dans des conditions de sous vide (Annexe 5).

Des témoins positifs et négatifs (un témoin d'ADN a été inclus comme témoin homologue pour la sonde) sont chargés et exposé aux rayons UV pendant 2 ou 3 minutes pour la fixation de l'acide nucléique sur la membrane.

2.5.1.4 Amorces utilisées

Deux amorces spécifiques pour l'amplification d'un fragment du génome de 337 pb ont été utilisées pour la détection du PLMVd dans cette analyse comme rapporter par Ambròs *et al.* (1998) :

Une amorce descendante

RF-43,5'-d (CTGGATCACACCCCCCTCGGAACCAACCGCT)-3'

Et une amorce ascendante

RF-44,5'-d (TGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACT)-3'

En ce qui concerne la détection du HSVd, deux amorces amplifiant un fragment du génome de 295 pb ont été utilisées dans cette analyse comme rapporter par Amari *et al.* (2001) :

Une amorce descendante

VP-98,5'-d (CTCCAGAGCACCGCGGCCCTC)-3'

Et une amorce ascendante

VP-99,5'-d (CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGC) - 3'

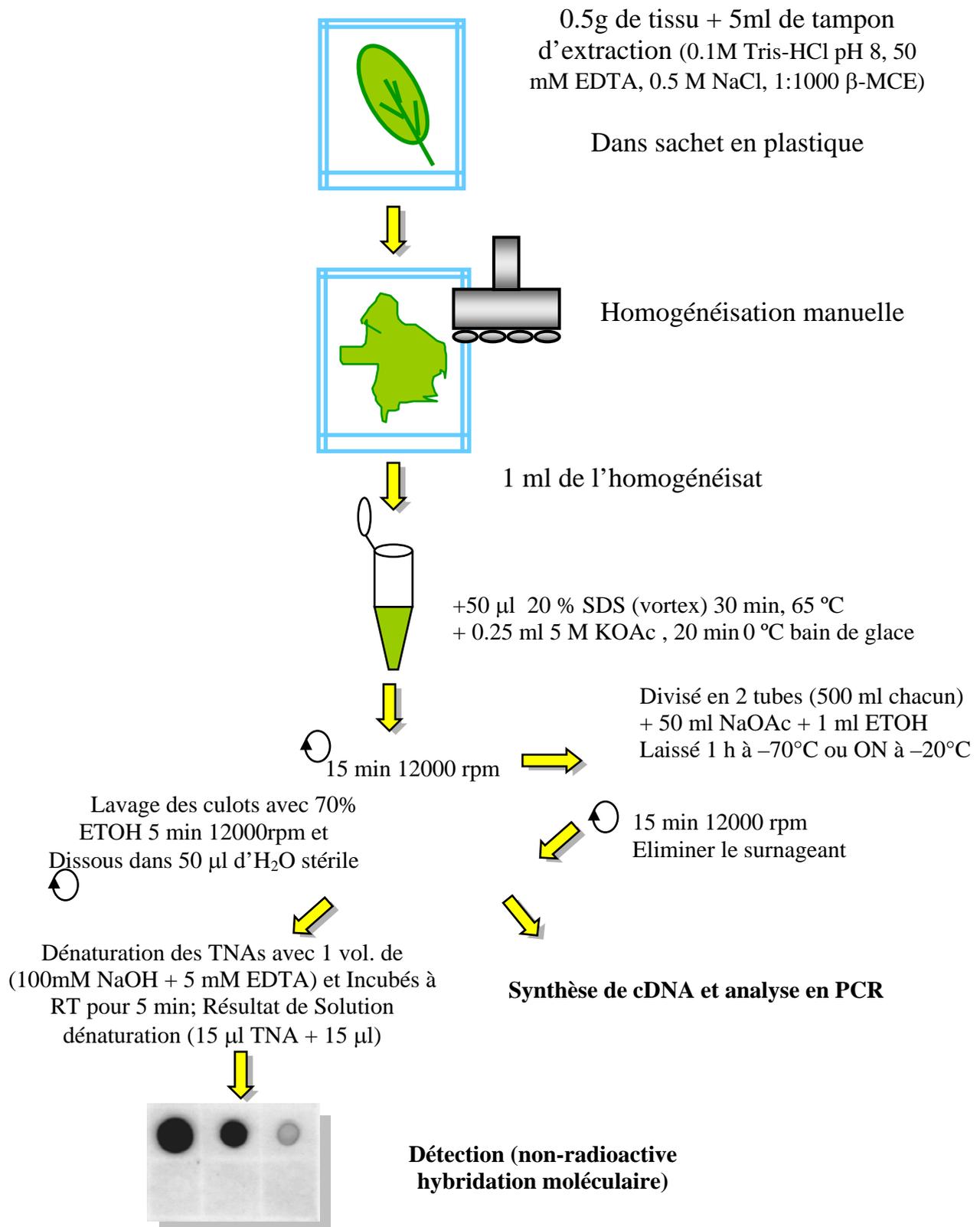


Schéma 6. Extraction non organique des acides nucléiques pour la détection des viroïdes (Astruc *et al.*, 1996).

2.5.2 - Technique de Tissue immunoprinting hybridization

La technique de l'impression des tissus sur une membrane de nitrocellulose requiert des analyses sensibles avec un minimum de manipulations de l'échantillon (Pallás *et al.*, 2003). Des impressions de tissu facilement et rapidement faites en serrant une extrémité fraîche de coupe du pétiole de la feuille sur une membrane en nylon (nitrocellulose).

L'impression est faite généralement en automne. Les membranes imprimées sont stockées à 4°C, et développées plus tard au niveau de l'Institut Agronomique Méditerranéen de Bari (Italie).

2.5.2.1 - Pré-hybridation et hybridation

La membrane est placée dans le cylindre d'incubation contenant 20 ml de la solution de pré-hybridation (Formamide 50 %, 5x SSC réactif de blocage 2 %, Sodium Lauryl sarcosine Na LS 0.1 % et SDS 0.02 %) (Annexe 5). L'étape de Pré-hybridation a été réalisée à 55°C pour 2h. Puis la solution est changée avec une nouvelle solution, et la sonde Ribo-probe) est ajoutée à une concentration de 50-100 ng/ml le tout est incubé à 55°C durant toute la nuit dans le four d'hybridation (Schéma 7).

2.5.2.2 - Détection chimioluminescente

Le jour suivant, la membrane est lavée avec 50ml de la solution de lavage 2X SSC + 0.1% SDS dans un dispositif d'agitation pendant 5 minutes (opération répétée deux fois) et puis, avec la solution de lavage 0.1X de 50 ml SSC + 0.1% SDS à 68°C dans le four d'hybridation pendant 15 minutes (opération répétée deux fois).

Le traitement à la RNase est exécuté pendant 30 minutes à la température ambiante sur un dispositif agitateur en ajoutant 1µg de RNase par ml de solution de SSC 2X. L'élimination de l'excès de la RNase, a été réalisée à travers le lavage de la membrane dans SSC 2X pendant 5 minutes à la température ambiante et rincée dans le tampon de lavage 1 (1X + 0.3% Tween 20) tout en agitant brièvement 5 minutes à la température ambiante.

L'étape de blocage implique l'incubation de la membrane, qui est placée entre deux films en plastique, dans le tampon 2 (solution de blocage diluée 1:10 dans le tampon 1X) (0.15 ml/cm² de membrane) sur le plateau d'agitation pour 1 h à la température ambiante.

Le tampon 2 est jeté et les anticorps anti-digoxigenin-AP dilués dans le tampon 2 (à la dilution indiquée par les instructions du fabricant) sont ajoutés à l'intérieur du films en plastique et agités pendant 30 minutes (Annexe 6).

Les anticorps en excès sont éliminés avec le tampon de lavage (opération répétée deux fois pour une durée de 15 minutes à la température ambiante avec agitation).

La membrane est par la suite stabilisée dans le tampon 3 pendant 2 minutes et exposée au substrat de CSPD (dilué 1:100 dans le tampon 3) pendant 5 minutes à la température ambiante.

La membrane est séchée sur du papier filtre, et mise dans une enveloppe en plastique et tenue dans l'obscurité (37°C pendant 15 minutes) pour augmenter l'activation des enzymes. Dernière étape, le film radiographique est mis sur la membrane et exposé aux rayons X pendant 30 minutes sous l'obscurité. Le film est alors développé en utilisant des solutions de fixation et de développement (Sigma) (Annexe 6).

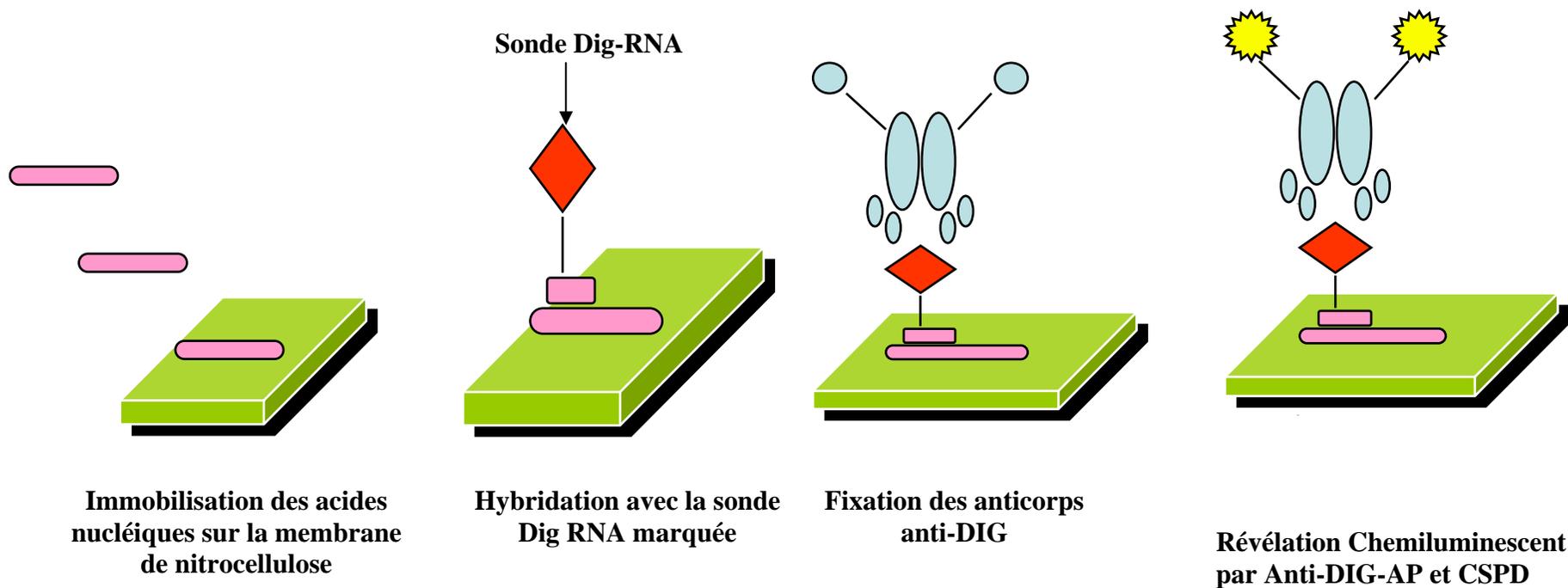


Schéma 7. Etapes de la technique de tissue immunoprinting hybridization pour la détection des viroïdes (Pallás *et al.*, 2003).

2.6 - Application de trois techniques de détection synchronique des Ilarvirus

2.6.1 - Sources de virus

La comparaison a été effectuée sur 21 échantillons infectés naturellement appartenant à différents rosacées fruitières à noyaux (4 abricotier, 2 amandier, 5 cerisier, 4 pêcher et 4 prunier, 1 Sainte Lucie, 1 Myrobolan) (Tableau 8). Toutes les espèces de rosacées fruitières avec différentes combinaisons d'infection (simple, double et triple) ont été utilisées.

Tableau 8 : Echantillons de rosacées fruitières et de rosier testés par ELISA, hybridation moléculaire et RT-PCR

N°	Espèce	Variété	Localisation	Commune	Wilaya
1	Abricotier	Bullida	FP Chakchoukh	Beni Fouda	Sétif
2	Abricotier	Bullida	Amine	Beni Fouda	Sétif
3	Abricotier	Luizet	Bordj Laassa	Ain Azel	Sétif
4	Abricotier	Roussillon	FP Grarem	Grarem	Mila
5	Amandier	Franc Amer	P. Bousselam	Sétif	Sétif
6	Amandier	Marcona	FP Grarem	Grarem	Mila
7	Cerisier	B. Hedelfinen	FP Chakchoukh	Beni Fouda	Sétif
8	Cerisier	Guillaume	FP Chakchoukh	Beni Fouda	Sétif
9	Cerisier	Burlat	FP Athmania	Athmania	Mila
10	Cerisier	Napoléon	P. Latreche	Sétif	Sétif
11	Cerisier	Burlat	FP Grarem	Grarem	Mila
12	Merisier	Ste Lucie	P. Latreche	Sétif	Sétif
13	Myrobolan	Franc	P. Bousselam	Sétif	Sétif
14	Pêcher	GH Hall	P. Bousselam	Sétif	Sétif
15	Pêcher	Spring Rest	FP Athmania	Athmania	Mila
16	Pêcher	My Crest	FP Athmania	Athmania	Mila
17	Pêcher	Dixi red	Belaamri	Salah bey	Sétif
18	Prunier	Methley	Amine	Beni Fouda	Sétif
19	Prunier	G. Japon	Amine	Beni Fouda	Sétif
20	Prunier	Stanley	FP Grarem	Grarem	Mila
21	Prunier	Stanley	Khelifa	Rasfa	Mila

2.6 2 - Extraction des acides nucléiques

2.6.2.1 - Extraction des TNA par méthode Non-organique

Une méthode d'extraction rapide a été alternativement utilisée pour minimiser le temps et simplifier la procédure d'extraction. Classiquement, l'extraction des RNA totaux, exigeait beaucoup de temps et plus de manipulation (Astruc *et al.*, 1996) (Fig.6).

Dans cette extraction, 0.2g de feuilles infectées provenant des boutures utilisées auparavant, ont été homogénéisés en présence de 10 vols (2 ml) de tampon d'extraction (50 mM de citrate de sodium, 5 mM EDTA, pH 8.5). L'homogénéisation a été effectuée dans un sachet en plastique. Les échantillons ont été clarifiés par centrifugation pendant 5 min à 5000rpm. Les surnageants qui contiennent des acides nucléiques partiellement clarifiés ont été stockés jusqu'à leur utilisation dans l'hybridation moléculaire et la réaction de polymérisation en chaîne.

2.6.3 - Hybridation en Dot-Blot

2.6.3.1 - Préparation des membranes et hybridation

L'hybridation moléculaire a été effectuée selon le protocole de Pallás *et al.*, (1997). Où, 4µl des l'extrait des RNA ont été appliqués sur une membrane en nylon (Hybond, Boehringer Mannheim). Les membranes ont été au départ séchées, et exposées pendant 3 min à une source de lumière d'UV light pour fixer les acides nucléiques. Après la fixation, les membranes ont été placées dans une solution d'hybridation pendant 2h à 68 °C composée de (50% formamide, 5X SSC, 0.02% SDS (p/v), 0.1% N-laurylsarcosine et 2% (p/v) de réactif de blocage).

La solution d'hybridation a été par la suite remplacée par une nouvelle solution à laquelle 0.1g/ml de sonde d'ARN de digoxigénine a été ajoutée. Les membranes sont par la suite incubées overnight à 68°C. Après l'hybridation, les membranes ont été lavées 2 fois (5min pour chaque lavage à la température ambiante) dans 2x SSC; 0.1% SDS puis 2 autres fois pendant 15min à 68°C dans 0.1% SSC; 0.1% SDS.

2.6.3.2 - Détection immunologique

Toutes les étapes de la détection immunologique ont été réalisées à la température ambiante. Premièrement, les membranes ont été lavées brièvement pendant 5min dans un tampon de lavage (0.3% Tween-20, 0.1M d'acide malique, 0.15M NaCl, pH 7.5), puis dans le réactif de blocage (Boehringer Mannheim) dilué dans le tampon 1 (0.1M d'acide

malique et 0.15M NaCl, pH 7.5), a été appliqué pendant 30 min à la température ambiante pour bloquer la détection de sites non spécifiques.

Les membranes sont alors incubées pour 30 min en présence d'Anti-digoxigenin-Ap (Fab fragments) conjuguée avec la phosphatase alcaline diluée à 1:10000 dans le tampon 2 (1% réactif de blocage, 0.1M d'acide malique et 0.15M NaCl, pH 7.5). Après le lavage des membranes 2 fois pendant 15 min, dans le tampon de lavage, les membranes ont été équilibrées pendant 5min dans le tampon 3 (0.1M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1M NaCl).

2.6.3.3 - Détection chemiluminescente

Les membranes ont été incubées pendant 5min avec un substrat chemiluminescent CSPD (50µl/5ml du tampon 3), dans un sachet en plastique dans l'obscurité. Après l'élimination de l'excès de substrat, les membranes ont été incubées pendant 15min à 37°C avant l'exposition du film (Kodak-X-Omat AR) aux rayons X à la température ambiante (le temps d'exposition entre 15 - 60min).

2.6.4 - Amplification par polymérisation en chaîne RT-PCR

Les amorces d'oligonucléotides spécifiques pour les trois virus ont été désignées en se basant sur la séquence du génome de chaque virus. Des amorces dégénérées représentant les terminaisons 3' et la protéine virale du cap des trois virus (ApMV, PDV et PNRSV) avec un haut niveau de similitude et 5 double ou triple dégénération ont été utilisées. Egalement des amorces spécifiques sense pour chaque virus ont été désignées et utilisées.

2.6.4.1 - Transcription inverse

La synthèse du premier brin d'ADN complémentaire cDNA pour les RNAs viraux a été étape nécessaire réalisée par RT-PCR (Kofalvi *et al.*, 1997). Premièrement, 2µl d'RNAs viral ont été chauffés pendant 5min à 65°C en présence de 9,5µl d'eau stérile et 100 pmol d'amorce anti-sense Vp77. La mixture est alors progressivement acclimatée avec la température pendant 10 min. Cette étape permet la dénaturation de grandes zones appariées de la séquence virale, puis l'hybridation de l'amorce anti-sense de la matrice du RNA.

Après cela, la mixture a été soumise à une réaction de reverse transcription (RT), en présence de 8U d'AMV (Avian Myeloblastosis Virus) reverse transcriptase, 4µl de 5X du

tampon de la reverse transcriptase (Promega) (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 50mM DTT, 25mM spermidine) et 2µl d'un mélange de dNTPs (10mM of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 40U d'inhibiteur de ribonucléase (HPRI). La mixture totale d'un volume de 20µl a été incubée durant une heure à 42°C.

2.6.4.2 - Réaction de polymérisation en chaîne

5µl (1/4) des produits de Reverse Transcription ont été soumis à une PCR dans un volume final de 50µl, contenant 1U de DNA polymérase thermo-résistante (Ecotaq) en présence de 50pmol de Vp78, Vp79, Vp80 spécifique pour PDV, ApMV et PNRSV respectivement (table.2), 50 pmol de Vp 77, 1µl d'une mixture de dNTPs mix, 5µl de 10X tampon Ecotaq (166mM (NH₄)₂ SO₄, 670mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween-20), 1.5mM MgCl₂. Cette mixture a été soumise à réaction de PCR dans un appareil thermocycler programmable (Pekin Elmer Cetus Corp.).

Les paramètres de la PCR ont été 2 étapes préliminaires de PCR à 94°C pendant 3min puis 72°C pendant 5min suivie de 30 cycles de 3 températures différentes. L'étape de dénaturation pour 35" à 94°C, l'étape d'annealing pendant 35" à 52°C et l'étape d'extension pendant 35" à 72°C, avec une élongation finale à 72°C pendant 7min.

5µl des produits de la PCR ont été analysés par une électrophorèse en gel d'agarose 2 % en PAGE 5% à un voltage constant de 100V pendant une heure. Les gels sont colorés par le Bromide d'Ethidium, et visualisés sous une lumière UV light et photographiés.

- **Inspection au champ et symptomatologie**
- **Fréquence des principaux virus dans la région d'étude**
- **Stabilité du PNRSV aux basses températures de conservation (-20°C)**
- **Influence des conditions climatiques sur la concentration du PNRSV au champ**
- **Détection moléculaire des principaux viroïdes**
- **Application de la détection synchronique sur des échantillons de champs**

Chapitre III : Résultat et discussion

3.1 - Inspection au champ et symptomatologie

Les inspections au champ et la récolte des échantillons ont été effectuées durant les automnes 2004 et 2007, période durant laquelle la concentration est au maximum pour la détection des deux principaux viroïdes des rosacées fruitières à noyaux à savoir le PLMVd et HSVd. Pour la détection des principaux virus des rosacées fruitières à noyaux en l'occurrence, le PDV, le PNRSV, l'ApMV, le PPV, l'ACLSV, le PBSPNaSV et l'ApLV, les analyses échantillons ont été prélevés durant les printemps 2005 – 2008, période qui coïncide avec l'apparition des symptômes et le titre viral est élevé.

3.1.1 - Symptômes observés

Les inspections des champs ne se limite pas à l'observation d'éventuels symptômes dus à la présence d'infections virales, qui seront d'ailleurs détaillés ultérieurement, mais également à l'état sanitaire général du verger.

Des fiches techniques comportant un certain nombre d'informations concernant l'espèce et la variété cultivée, les travaux phytosanitaires d'entretien (préventifs et curatifs), les amendements minéraux apportés. Des informations concernant l'origine du matériel végétal planté (origine des plants, porte-greffe, variété, etc.).

La récolte des informations propres à chaque est nécessaire et peut être parfois utile dans l'explication des symptômes observés d'une part, et nous donne une idée sur l'entretien du verger en général, d'autre part.

L'exploitation de ces fiches et d'après les entretiens eut avec les agriculteurs, il est en ressort que l'entretien phytosanitaire d'une manière générale n'est pas en considération, souvent les interventions sont limités aux traitements chimiques après l'installation des agents Phytopathogènes et l'apparition des symptômes. En plus, les opérations de traitement proprement dite sont très mal maîtrisées, aucun respect ni de la période d'utilisation, ni des doses de traitement, moins encore les délais de rémanence. Pour les maladies virales et de type viral, là, la majorité des agriculteurs ignorent même l'existence de ces pathogènes, ce qui a compliqué un petit peu notre tâche de récolte des échantillons. C'était pour nous l'occasion de mener un travail de sensibilisation et de vulgarisation sur le danger non seulement des maladies virales mais de tous les pathogènes possibles en arboriculture.

Tout au long des inspections, des arbres symptomatiques, ont été observés dans plusieurs vergers; les arbres exhibaient parfois des mosaïque en feuilles de chêne (Photo 1 A et B), fréquemment des taches annulaires chlorotiques (Photo 2A) et des taches

annulaires nécrotiques qui évoluent en perforations (Photo 2B) et de grandes aires chlorotiques (Photo 3), associées avec la présence du PNRSV. Les cerisiers montraient des taches chlorotiques sur les feuilles induites par le PDV (Photo 4A) et des décolorations au niveau des fruits (Photo 4B). Nous avons observé des pruniers infectés qui laissent apparaître des mosaïques chlorotiques jaunâtres (Photo 5A), alors que les amandiers montraient des mosaïques chlorotiques blanchâtres (Photo 5B), ces symptômes sont associés avec la présence de l'ApMV. En revanche, les pêchers, souvent montraient de grandes aires chlorotiques sur feuilles et plages brunâtres (Photo 6A) conjuguées parfois avec des décolorations au niveau des fruits (Photo 6B) qui peuvent évoluer en des fissures profondes ; ces symptômes sont associés avec la présence du PLMVd

Malgré l'observation les symptômes sur différents organes d'arbres infectés, mais ceci ne constitue pas une grande valeur de diagnostic, car beaucoup de causes biotiques (virus, champignon, bactéries, piqûres d'insectes, etc.) et également abiotiques (accidents climatiques : gel, grêle, physiologiques : carence et excès des éléments minéraux, accidents de l'environnement : pollution, phytotoxicité des pesticides, etc.), peuvent être l'origine de symptômes très semblables sur les différents organes des plantes cultivées en général et les arbres fruitiers en particulier (Diekmann and Putter, 1996). Ceci est illustré par les résultats obtenus, certains échantillons qui présentaient des symptômes qu'on soupçonne dus aux virus ont donné des résultats négatifs en DAS-ELISA alors que d'autres qui ne laissaient apparaître aucun symptômes ont résulté positifs. Ce qui confirme le peu de fiabilité accordé aux symptômes dans le diagnostic des maladies virales.

Les différentes études consacrées aux virus et agent de type viral reposent surtout sur des méthodes sérologiques et moléculaires non seulement fiables sur le plan sensibilité et spécificité mais également, actuellement utilisables à grande échelle (Spiegel et *al.*, 1993).

Le diagnostic précoce des maladies virales et de type viral surtout au niveau des parcs à bois, collection variétale et pépinières constitue une opération d'une grande importance car toute infection du matériel végétal de propagation aura de graves répercussions sur toute la production dont on est issu. A cet effet, le présent travail a pour objectif le diagnostic des principales maladies virales et à viroïdes qui infectent les rosacées fruitières à noyaux (abricotier, amandier, cerisier, prunier, pêcher et également les espèces utilisées comme porte greffe). Nous allons essayer d'étudier à travers un échantillonnage qui touchait toute la filière à partir des parcs à bois jusqu'aux vergers en production et les nouvelles plantations.

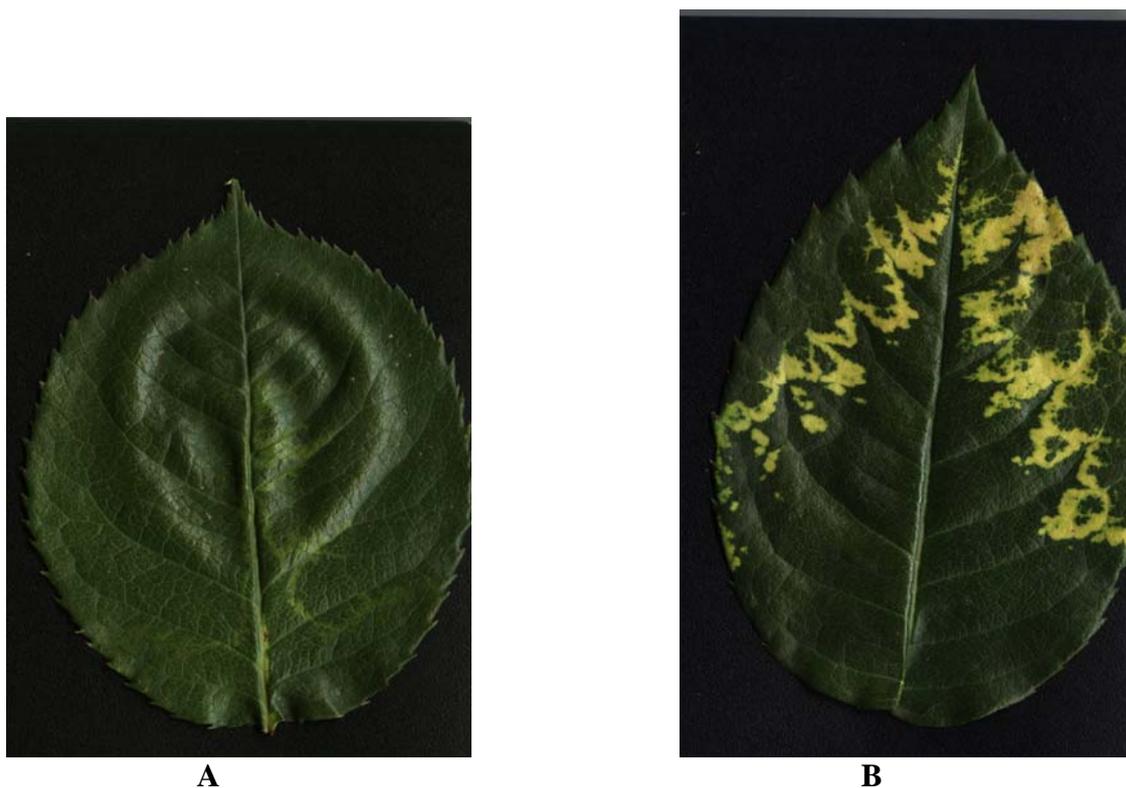


Photo 1. Symptôme d'oak leaf pattern (en feuille de chêne) associé au PNRSV sur rosier, A - début de l'apparition du symptôme, B - Symptôme assez prononcé.

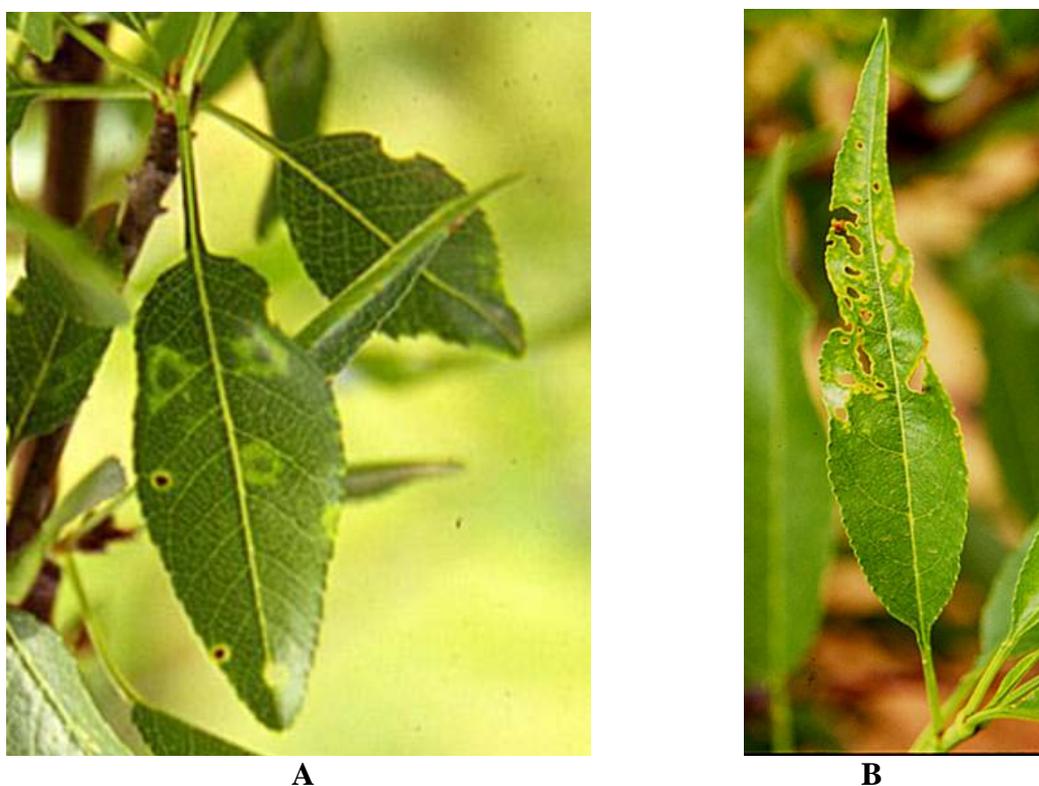


Photo 2. Symptômes de PNRSV sur amandier, A - des taches chlorotiques circulaires évoluant vers des taches nécrotiques (perforations ou criblures) B.



Photo 3. Symptôme représentant les aires chlorotiques associées aux infections de PNRSV sur prunier.



A



B

Photo 4. Symptômes associés à la présence du PDV sur cerisier A - taches chlorotiques très légères sur feuilles, B - des taches brunâtres sur fruits.



A



B

Photo 5. Mosaique chlorotique blanchâtre et jaunâtre associés à la présence de l'ApMV. A - sur prunier, B - sur amandier.



A



B

Photo 6. Symptômes associés au PLMVd, A - grandes aires chlorotiques sur feuilles, B - plages brunâtres sur fruits de pêcher.

3.2 - Fréquence des principaux virus dans la région d'étude

L'objectif de cette partie de l'étude est la détection sérologique par DAS-ELISA des principaux virus des rosacées fruitières à noyaux, il s'agit des trois Ilarvirus, à savoir le Prunus Necrotic Ring Spot Virus (PNRSV), le Prune Dwarf Virus (PDV) et l'Apple Mosaic Virus (ApMV) et un Potyvirus, le Plum Pox Virus (PPV). D'autres virus considérés comme moins fréquents ont été recherchés par voie sérologique (ACLSV et PBNSPaV) et moléculaire (CVA, PBNSPaV et CGRMV) ; leurs résultats seront présentés ultérieurement.

3.2.1 - Niveau de l'infection générale par les virus

L'analyse sérologique des 967 échantillons de rosacées fruitières à noyaux pour la détection des quatre virus cités auparavant (PNRSV, PDV, ApMV et PPV) a révélé l'infection de 170 échantillons toutes espèces confondues et indépendamment du virus présent ce qui représente un niveau d'infection générale de l'ordre 17,58 % (Tableau 9).

Les quatre virus recherchés ont été détectés, si la présence des trois Ilarvirus (PNRSV, PDV, ApMV) en Algérie, a été signalée dans quelques études antérieures (Diekman et Putter, 1996 ; Aouane, 2001), la détection du PPV constitue la première signalisation de ce virus dans notre pays. Des analyses plus sensibles (moléculaire) que les analyses sérologiques sont nécessaires pour la confirmation de cette découverte. Egalement davantage analyses pour la détermination de la nature de l'isolat, la source d'infection et son épidémiologie s'imposent en urgence pour limiter l'extension de ce virus en première phase et son éradication totale en seconde phase de tous les foyers infectés.

Le niveau d'infection générale observé apparaît largement supérieur à celui rapporté par Aouane (2001) qui était de l'ordre de 1,5%. Cette différence entre les deux niveaux d'infection, peut être due à plusieurs raisons entre autre, la différence dans la région touchée par l'étude, par les périodes différentes et également aux espèces et variétés.

Comparativement au plan régional méditerranéen, l'infection moyenne semble être relativement inférieure par rapport au niveau d'infection découvert en au Liban 30 % (Jawhar et al., 1996 ; Chouairi et al., 2003) et en Syrie 13% (Ismail et al., 2003), et 10% en Palestine (Jarrar et al., 2001).

3.2.2 - Fréquence des principaux virus selon le système de conduite

Classiquement les espèces arboricoles se rencontrent au niveau des collections variétales et parcs à bois, dans les pépinières et au niveau des vergers commerciaux. L'objectif de la présente partie de l'étude est la comparaison des niveaux d'infection dans les

trois composantes du secteur arboricole. Les résultats obtenus donnent des taux d'infection plus au moins proches qui varient entre 15,99% enregistré dans le cas des vergers commerciaux (519 testés, 83 infectés), et les 19,57% enregistré dans les cas des pépinières (184 testés, 36 infectés) alors que les parcs à bois étaient infectés à un taux de l'ordre de 19,32% (264 testés, 51 infectés) (Tableau 9).

En matière de sensibilité des espèces dans les différents systèmes de conduite, il ressort que les cerisiers et les Sainte Lucie sont les plus infectés au niveau des pépinières avec 47,62% et 38,89% respectivement comme taux d'infection. En revanche les pruniers et les pruniers GF8 étaient les moins infectés avec 0% comme taux d'infection.

Au niveau des parcs à bois c'est également la Sainte Lucie qui présente le plus grand taux d'infection (40,00%) alors que le prunier GF8 n'était infecté qu'à hauteur de 5,00%. En ce qui concerne les vergers commerciaux, c'est toujours le cerisier qui est le plus infecté avec un taux de 22,54% suivi par le pêcher avec 20,88% alors que l'amandier était le moins infecté avec uniquement 7,02%, ce qui confirme son statut de l'espèce la moins touchée par les maladies virales (Tableau 9).

Comparativement aux résultats rencontrés dans les pays voisins à l'exemple du Maroc, où les vergers ont été infectés à hauteur de (18.5%) et les pépinières (16.2%), alors que le taux d'infection au niveau des parcs à bois est largement inférieur (7.7%) (Bouani 2004).

Si la différence entre les trois taux d'infection apparaît négligeable, l'importance réside dans le fait que ces niveaux sont assez élevés. La gravité qui semble être plus préoccupante réside dans l'infection des parcs à bois où chaque arbre est l'origine de milliers de plants pépinières en premier lieu et arbres commerciaux en phase finale.

Nous avons remarqué que la majorité des parcs à bois sont issus de matériel standard non certifié, alors que d'autres sont constitués de matériel d'origine variétale authentique et certifié sur le plan sanitaire contre un certain nombre de virus entre autres ceux étudiés. L'analyse sérologique a prouvé que ce matériel végétal sain au départ ne l'est plus. Son infection peut être due à plusieurs facteurs : matériel de taille infecté, vecteurs biologiques, etc.

Le contrôle visuel tel qu'il se fait actuellement, pour l'agrèage et la certification des plants pépinières ne constitue nullement une garantie de la qualité sanitaire. Seules les analyses basées sur des techniques fiables et sensibles (sérologiques et moléculaires), peuvent établir avec exactitude la qualité sanitaire et également l'authenticité variétale.

Tableau 9 : Comparaison des niveaux d'infection selon les systèmes de conduite

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux		
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux
Abricotier	40	7	17,50	46	4	8,70	172	19	11,05
Mechemech	17	2	11,76	/	/	/	/	/	/
Pêcher	19	4	21,05	30	15	50,00	91	19	20,88
Nectarine	/	/	/	/	/	/	22	3	13,64
F. Missouri	/	/	/	8	/	0,00	/	/	/
Prunier	19	0	0,00	57	13	22,81	106	22	20,75
Gf 8	5	0	0,00	12	3	25,00	/	/	/
Amandier	24	2	8,33	40	4	10,00	57	4	7,02
A. amer	13	2	15,38	5	1	20,00	/	/	/
Cerisier	21	10	47,62	56	7	12,50	71	16	22,54
Sainte Lucie	18	7	38,89	10	4	40,00	/	/	/
Myrobolan	8	2	25,00	/	/	/	/	/	/
Total	184	36	19,57	264	51	19,32	519	83	15,99
Total échantillons testés				967					
Total échantillons infectés				170					
Taux d'infection moyen				17,58 %					

3.2.3 - Fréquence des principaux virus par étage bioclimatique

Dans le but d'étudier l'influence des conditions surtout climatiques sur le développement et la distribution des virus dans les rosacées fruitières à noyaux en fonction des étages bioclimatiques, nous avons subdivisé la région d'étude en trois étages.

En matière d'échantillonnage, est très peu de différence dans le nombre d'échantillons prélevés par étage bioclimatique. Dans le souci de représentativité et de fiabilité, on a prélevé 288 échantillons à partir de l'étage sub-humide, 357 de l'étage semi-aride et enfin 322 échantillons à partir de l'étage aride (Tableau 10).

Les résultats d'analyse nous donnent des taux d'infection très différents allant de 25,21 % pour l'étage bioclimatique le plus infecté à savoir le semi-aride (357 testés, 90 infectés), suivi par l'étage sub-humide 15,97% (288 testés, 46 infectés) et enfin l'étage le moins infecté en l'occurrence l'aride avec 10,55% (322 testés 34 infectés) (Tableau 10).

On regardant de près les résultats, si l'ordre d'infection entre les étages sub-humide (15,97%) et aride (10,55%) apparaît logique, du fait que la température influe beaucoup sur

le développement des virus. En revanche le résultat obtenu lors de l'étage semi-aride semble avoir d'autres raisons qui influent sur le taux d'infection, espèces et variétés cultivées, période d'échantillonnage, entretien et mesures de précautions, etc.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure qu'il existe vraiment une influence des conditions climatiques sur le développement et la distribution des virus dans les rosacées fruitières à noyaux. Mais cette influence est-elle due aux deux facteurs à savoir les températures et les précipitations, principales composantes et caractéristiques des étages bioclimatiques ? Certes les températures agissent non seulement sur la réplication virale, sur l'apparition et la disparition des symptômes mais également sur la distribution du virus à l'intérieur de la plante infectée (Németh and Kölber, 1980 ; Casper, 1979, Dunez, 1987, Varveri et *al.*, 1988).

Tableau 10 : Comparaison des niveaux d'infection selon les étages bioclimatiques

Etages bioclimatiques	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection (%)
Sub-humide	288	46	15,97
Semi-aride	357	90	25,21
Aride	322	34	10,55
Total	967	170	17,58 %

3.2.3.1 - Fréquence dans l'étage sub-humide

L'influence des conditions sub-humides sur les niveaux d'infection des différentes espèces de prunus ainsi que sur les systèmes de conduites de ces espèces, a été étudiée à travers l'analyse de 107 échantillons issus de parcs à bois et 181 échantillons issus de vergers commerciaux et aucun échantillon n'a été prélevé à partir des pépinières.

Les résultats d'analyse nous donnent un taux d'infection de l'ordre de 17,67 % au des vergers commerciaux (181 échantillons testés, 32 échantillons infectés) alors qu'au niveau des parcs à bois, il est égal à 13,08 % (107 échantillons testés, 14 échantillons infectés) (Tableau 11).

Les deux taux d'infection apparaissent relativement élevés, et ne sont pas loin du niveau général enregistré. Pratiquement toutes les espèces de Prunus cultivées dans cet étage bioclimatique, sont touchées par les virus étudiés à l'exception de l'amandier et du Franc Missouri (pêcher).

Tableau 11 : Fréquence dans le cas de l'étage bioclimatique sub-humide

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux		
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux)
Abricotier	/	/	/	19	1	5,26	50	5	10,00
Mechemech	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Pêcher	/	/	/	4	1	25,00	/	/	/
Nectarine	/	/	/	/	/	/	/	/	/
F. Missouri	/	/	/	4	0	0,00	/	/	/
Prunier	/	/	/	20	4	20,00	38	7	18,42
Gf 8	/	/	/	8	2	25,00	/	/	/
Amandier	/	/	/	12	0	0,00	30	4	13,33
A. amer	/	/	/	5	1	20,00	/	/	/
Cerisier	/	/	/	30	3	10,00	62	16	25,80
Sainte Lucie	/	/	/	5	2	40,00	1	0	0,00
Myrobolan	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Total	/	/	/	107	14	13,08	181	32	17,67
Total échantillons testés				288					
Total échantillons infectés				46					
Taux d'infection moyen				15,97 %					

3.2.3.2 - Fréquence dans l'étage semi-aride

Les résultats d'analyse des échantillons issus de cet étage bioclimatique donnent les parcs à bois comme le système de conduite le plus infecté avec un taux d'infection de l'ordre de 33,64 % (107 échantillons testés, 36 échantillons infectés), suivi par les pépinières 25,22% (115 échantillons testés, 29 échantillons infectés) et enfin les vergers commerciaux ou sur les 135 échantillons testés, 25 échantillons étaient infectés, soit un taux d'infection de 18,51 % (Tableau 12).

Les résultats obtenus donnent cet étage bioclimatique comme étant le plus infecté et l'influence des virus sur les différents systèmes de conduite semblent être plus accentué sur les pépinières et les parcs à bois que sur les vergers commerciaux.

Au niveau de la sensibilité des espèces, il en ressort les taux d'infection semble être liée beaucoup plus au caractère spécifique et variétale plutôt qu'aux conditions climatiques prévalent dans cet zone de la région d'étude.

Tableau 12 : Fréquence dans le cas de l'étage bioclimatique semi-aride

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux		
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux
Abricotier	13	2	15,38	12	3	25,00	42	8	19,05
Mechemech	8	2	25,00	/	/	/	/	/	/
Pêcher	9	4	44,44	26	14	53,85	25	4	16,00
Nectarine	/	/	/	/	/	/	22	3	13,64
F. Missouri	/	/	/	4	0	0,00	/	/	/
Prunier	9	0	0,00	29	9	31,03	30	10	33,33
Gf 8	5	0	0,00	/	/	/	/	/	/
Amandier	19	2	10,53	24	4	16,67	8	0	0,00
A. amer	5	0	0,00	/	/	/	/	/	/
Cerisier	21	10	47,62	8	4	50,00	7	0	0,00
Sainte Lucie	18	7	38,89	4	2	50,00	1	0	0,00
Myrobolan	8	2	25,00	/	/	/	/	/	/
Total	115	29	25,22	107	36	33,64	135	25	18,51
Total échantillons testés					357				
Total échantillons infectés					90				
Taux d'infection moyen					25,21 %				

3.2.3.3 - Fréquence dans l'étage aride

Si les résultats sérologiques dans ce dernier étage bioclimatique, nous donnent un taux d'infection générale de l'ordre 10,55 % qui apparaît le moins touché par les maladies virales comparativement aux étages bioclimatiques.

Ceci s'est traduit sur les taux d'infection des différents systèmes de conduite. Les vergers commerciaux se présentent comme étant les plus infectés à un taux de 12,81 % (203 échantillons testés, 26 échantillons infectés), suivis par les pépinières avec un taux d'infection de l'ordre de 10,14 % (7 échantillons infectés sur les 69 échantillons testés), et enfin les parcs à bois n'étaient infectés qu'à hauteur de 2,00 % (50 échantillons testés, 1 échantillon infecté) (Tableau 13).

Comparativement aux résultats des autres étages bioclimatiques, l'étage aride, est le moins infecté et l'aridité de la zone, semble avoir une grande action dans la réduction des taux d'infection des espèces touchées. Nos déplacements dans la zone relativement tard dans la saison semble avoir une grande influence dans les résultats obtenus.

Tableau 13 : Fréquence dans le cas de l'étage bioclimatique aride

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux		
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux
Abricotier	27	5	18,52	15	0	0	80	6	7,50
Mechemech	9	0	0,00	/	/	/	/	/	/
Pêcher	10	0	0,00	/	/	/	66	15	22,73
Nectarine	/	/	/	/	/	/	/	/	/
F. Missouri	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Prunier	10	0	0,00	8	0	0	38	5	13,16
GF 8	/	/	/	4	1	25			
Amandier	5	0	0,00	4	0	0	19	0	0,00
A. amer	8	2	25,00	/	/	/	/	/	/
Cerisier	/	/	/	18	/	/	/	/	/
Sainte Lucie	/	/	/	1	/	/	/	/	/
Myrobolan	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Total	69	7	10,14	50	1	2,00	203	26	12,81
Total échantillons testés				322					
Total échantillons infectés				34					
Taux d'infection moyen				10,55 %					

3.2.4 - Sensibilité des rosacées aux infections virales

En Comparant les taux d'infection des variétés cultivées et les variétés porte-greffes, on remarque que ces dernières sont plus infectées ; Sur les 96 échantillons testés, 21 échantillons été infectés soit un taux d'infection égal à 21,88 %. Alors que concernant les variétés cultivées, sur 871 échantillons testés, il s'est avéré que 149 sont infectés par l'un des quatre virus étudiés, soit un taux d'infection de l'ordre de 17,11 % (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison de l'infection des variétés cultivées et variétés porte-greffes

Espèces	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection (%)
Variétés cultivées	871	149	17,11
Variétés porte-greffe	96	21	21,88
Total	967	170	17,58 %

3.2.3.1 - Niveau de l'infection générale des variétés porte-greffe

Les résultats sérologiques des échantillons issus des variétés porte-greffes nous donnent un niveau d'infection générale de l'ordre de 21,88 % (Tableau 15). A l'exception des huit (8) échantillons du pêcher franc Missouri qui étaient tous sains, toutes les autres variétés été infectées par l'un des virus étudiés.

Les résultats d'analyse montrent que la sensibilité des différentes espèces utilisées comme porte-greffe varie d'une manière très sensible, allant du complètement sain comme avancé précédemment pour le franc Missouri au très infectée pour le cerisier Sainte Lucie avec 39,29 % comme taux d'infection. Mais pour cette variété, vu que la majorité des échantillons infectés proviennent de la même pépinière située dans la localité de Sidi Haider (Sétif), ceci, nous, empêche de conclure vraiment que cette espèce est sensible aux maladies virales. En revanche l'abricotier variété Mechmech avec (11,76 %), utilisé comme porte-greffe semble développé une certaine résistance aux infections virales comparativement aux autres espèces du genre *Prunus* (Tableau 15).

Tableau 15 : Sensibilité des variétés porte-greffe aux infections virales

Variétés	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Mechmech PG	17	2	11,76
Franc Missouri PG	8	0	0,00
Prunier GF 8 PG	17	3	17,65
Amandier amer PG	18	3	16,67
Sainte Lucie PG	28	11	39,29
Myrobolan PG	8	2	25,00
Total	96	21	21,88

3.2.4.2 - Niveau de l'infection générale des variétés cultivées

Le niveau d'infection générale dans cette catégorie de variétés a atteint 17,11%, ou sur les 871 échantillons testés prélevés à partir de six espèces cultivées, 149 échantillons été infectés par l'un des quatre virus étudiés (Tableau 16).

Concernant la sensibilité des différentes espèces de prunus aux virus étudiés, il ressort que le pêcher avec un taux d'infection de l'ordre de 27,14%, apparaît comme l'espèce la plus

infectée, alors que l'amandier avec un taux de 8,26% se présente comme le moins infecté confirmant ainsi son statut de l'espèce la moins infectée parmi tous les *Prunus* (Tableau 16).

Nos résultats apparaissent légèrement inférieurs à ceux trouvés sur le plan méditerranéen, non seulement sur le plan pourcentage mais également dans l'ordre de sensibilité des espèces. Une décade d'année d'analyse à travers plusieurs pays méditerranéens donne l'ordre et les taux suivant : le cerisier doux se présente comme l'espèce la plus infectée avec 53,8%, suivi par le pêcher avec 33,3%, prunier 27,8%, amandier 26,6% et en fin l'abricotier comme l'espèce la moins touchée par les virus étudiés avec un taux de 9,6% (Myrta *et al.*, 2003).

Tableau 16 : Fréquence générale des virus selon les espèces de *Prunus* (variétés cultivées)

Espèces	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection (%)
Abricotier	258	30	11,63
Pêcher	140	38	27,14
Nectarine	22	3	13,64
Prunier	182	35	19,23
Amandier	121	10	8,26
Cerisier	148	33	22,30
Total	871	149	17,11

3.2.4.3 - Sensibilité des variétés d'abricotier aux infections virales

Au total onze variétés et un certain nombre d'échantillons de variétés inconnues ont été touché par l'opération d'échantillonnage. Si pour certaines variétés l'origine étrangère est confirmée, en ce qui concerne les variétés qui apparaissent locales vu leur résonance arabe reste à confirmer.

Concernant le niveau d'infection générale de l'abricotier (11,63 %), il apparaît très proche du celui trouvé dans le pourtour Méditerranéen (9,6 %) (Myrta *et al.* 2003).

En matière de sensibilité des différentes variétés d'abricotier, d'une manière générale, si en expectant la variété Boulaachour qui est totalement indemne, le taux d'infection varie de 8,33 % pour la variété la moins infectée et 15,38 % pour la variété la plus infecté à savoir Bullida (Tableau 17).

Tableau 17 : Sensibilité des variétés d'abricotier aux infections virales

Abricotier	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Boulaâchour	16	0	0,00
Canino	12	1	8,33
Rouge Roussillon	20	3	15,00
Sayeb	21	2	9,52
Bullida	39	6	15,38
Rosé	25	3	12,00
Baffi	20	2	10,00
Luizet	45	6	13,33
Wardi	14	2	14,29
Khaoukhi	8	1	12,50
Bargoug	19	2	10,53
Inconnue	19	2	10,53
Total	258	30	11,63 %

3.2.4.4 - Sensibilité des variétés de nectarine aux infections virales

Uniquement 22 échantillons ont été récoltés à partir de deux variétés de nectarine. Le niveau d'infection générale est de l'ordre de 13,64 % (22 échantillons testés, 3 échantillons infectés) (Tableau 18).

La sensibilité aux virus rencontrés est presque identique chez les deux variétés de nectarine à avoir Red June et Nectarosa 13,33 % et 14,29 % respectivement. Du moment que les nectarines sont des variétés hybrides de pêcher, la comparaison avec cette dernière espèce semble donné une certaine résistance des nectarines.

Tableau 18 : Sensibilité des variétés de nectarine aux infections virales

Nectarine	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Red June	15	2	13,33
Nectarosa	7	1	14,29
Total	22	3	13,64 %

3.2.4.5 - Sensibilité des variétés du pêcher aux infections virales

On signale d'emblée que d'après l'échantillonnage toutes les variétés cultivées dans la zone d'étude sont d'origine étrangère et d'après les résultats d'analyse, aucune variété des huit étudiées n'est indemne de virus. Le niveau d'infection générale du pêcher est de l'ordre de 27,14% (140 échantillons testés, 38 infectés) (Tableau 19).

Ce taux d'infection donne le pêcher comme l'espèce la plus touchée par les virus au niveau de la zone d'étude. Comparativement au plan Méditerranéen, le taux d'infection national est légèrement inférieur à celui enregistré au bassin Méditerranéen qui est de l'ordre de 33,3 % (Myrta et *al.*, 2003).

La variété May Crest se présente comme étant la variété la plus infectée avec un taux d'infection de l'ordre de 87,50%, alors que la variété Cardinal est la moins infectée avec un taux de 10,00% (Tableau 19).

Tableau 19 : Sensibilité des variétés de pêcher aux infections virales

Pêcher	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Red Haven	20	2	10,00
G Hall	26	6	23,08
May Crest	8	7	87,50
Spring Crest	8	2	25,00
Dixi Red	31	13	41,94
Spring Time	15	3	20,00
Cardinal	20	2	10,00
Inconnue	12	3	25,00
Total	140	38	27,14 %

3.2.4.6 - Sensibilité des variétés de prunier aux infections virales

Le niveau d'infection générale des variétés de prunier est de l'ordre de 19,23 % (182 échantillons testés, 35 Echantillons infectés). Mis à part la variété Mélisse qui ne présente aucun échantillon infecté, le reste des variétés sont toutes touchées par les virus étudiés (Tableau 20).

Le prunier sur le plan méditerranéen semble être plus infecté (27,8 %) que la zone d'étude, mais ceci est du principalement à la sensibilité des variétés du prunier au PPV dans la rive nord du bassin méditerranéen (Myrta et *al.*, 2003).

En ce qui concerne la sensibilité des différentes variétés du prunier, qui sont d'ailleurs toutes d'origine étrangère, Stanley apparaît comme la variété la plus infectée avec un taux de 35,29 % ; c'est une très ancienne variété de prunier, et ce taux est peut être probablement du à l'utilisation de matériels de taille infectés. Les virus étudiés sont facilement transmis mécaniquement par les outils de taille (ciseaux et sécateurs). En revanche la variété prune d'Agen a développé une certaine résistance envers les virus étudiés puisqu'elle n'est infectée que par un taux de l'ordre de 11,11 % (Tableau 20).

Tableau 20 : Sensibilité des variétés de prunier aux infections virales

Prunier	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Santa Rosa	50	7	14,00
Golden Japan	32	7	21,88
Stanley	34	12	35,29
Méliste	8	0	0,00
Methley	16	5	31,25
Prune d'Agen	18	2	11,11
Reine Claude	8	1	12,50
Inconnue	16	1	6,25
Total	182	35	19,23 %

3.2.4.7 - Sensibilité des variétés d'amandier aux infections virales

L'étude sérologique a révélé que l'amandier est infecté à hauteur de 8,26 % comme taux d'infection générale (121 échantillons testés, 10 échantillons infectés). Toutes les variétés cultivées dans la région sont infectées à part la variété Texas qui est totalement indemne (Tableau 21). L'amandier dans la zone d'étude semble être moins infecté comparativement à l'échelle méditerranéenne ou on a enregistré un taux d'infection de 26,6 %, cette différence est peut-être due aux variétés cultivées dans les deux zones.

En matière de sensibilité des variétés d'amandier, Marcona se présente comme la variété la plus infectée avec un taux de 19,05 %, alors que Texas est indemne.

Tableau 21 : Sensibilité des variétés d'amandier aux infections virales

Amandier	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Commun	34	3	8,82
Ferragnes	40	1	2,50
Marcona	21	4	19,05
Texas	10	0	0,00
Inconnue	16	2	12,50
Total	121	10	8,26

3.2.4.8 - Sensibilité des variétés de cerisier aux infections virales

Les analyses sérologiques donnent un niveau d'infection générale du cerisier égal à 22,30 % (148 échantillons testés, 33 infectés). Toutes les variétés de cerisiers doux sont infectées par l'un des quatre virus étudiés (Tableau 22). Si au niveau régional méditerranéen, le cerisier est la première espèce infectée par les principaux virus des *Prunus*, avec un taux de l'ordre de 53,8 %, dans la zone d'étude, ce taux est largement inférieur, il n'est égal qu'à 22,30 %.

En matière de sensibilité des variétés, Guillaume est la plus infectée ou tous les échantillons testés ont été infectés soit un taux de 100 %, alors que Bigarreau est la variété la moins infectée avec un taux de 8,00 % (Tableau 22).

Tableau 22 : Sensibilité des variétés de cerisier aux infections virales

Cerisier	Echantillons testés	Echantillons infectés	Taux d'infection
Napoléon	48	8	16,67
Burlat	47	11	23,40
Hedelfein	12	4	33,33
Bigarreau	25	2	8,00
Guillaume	8	8	100,00
Inconnue	8	0	0,00
Total	148	33	22,30 %

3.2.5 - Fréquence individuelle des principaux virus étudiés

Les quatre étudiés ont été détectés dans la région d'étude. Le PPV a été détecté pour la première fois non seulement dans la région d'étude mais en Algérie.

En observant de près les résultats consignés dans le tableau 23, on remarque que les Ilarvirus viennent en première position avec respectivement les taux de fréquence suivants : PNRSV (13,65%), l'ApMV (11,45%), le PDV (5,51%) et le PPV se place en dernière position avec (2,14%).

Le PNRSV avec un taux de fréquence de l'ordre de (13,65%), est le virus le plus présent dans la région d'étude. Il représente 60 % du total des échantillons infectés (Fig. 2), ceci confirme les différents travaux de diagnostic de ce virus qui le donne comme étant le virus le plus répandu par le monde dans les Prunus cultivés.

L'ApMV avec un taux de fréquence de 11,45%, représente un pourcentage 24 % des échantillons infectés, ce qui laisse le place en seconde position parmi les virus étudiés qui infectent les Prunus cultivés (Fig. 2).

Le PDV avec un taux de fréquence général égal à 5,51%, représente 11 % des échantillons infectés. Il se classe en dernière position parmi les trois Ilarvirus (Fig. 2).

Le PPV avec un taux de fréquence de 2,14%, ce qui représente 5 % des échantillons infectés (Fig. 2). Malgré que le PPV vienne en dernière position en matière de fréquence, mais L'importance réside dans la découverte des premiers foyers d'infection dans la région. Ceci nous pousse à suggérer qu'on est en face à une introduction nouvelle ce virus puisque les travaux de diagnostic antérieurs font référence à son absence totale de l'Algérie.

La nature de transmission du plus dangereux virus des rosacées fruitières, à travers plusieurs espèces de pucerons vecteurs, et à travers le matériel végétal de propagation constituent les deux plus plausibles raisons de sa détection en Algérie. Par conséquence, la confirmation par d'autres méthodes de diagnostic surtout moléculaires, pousse les pouvoirs publics (service de la protection des végétaux) à agir vite par un screening plus élargi autour des premiers foyers infectés pour leur élimination et leur éradication.

Tableau 23 : Récapitulatif de la fréquence des virus étudiés sur les Prunus cultivés

Espèces	PNRSV			ApMV			PDV			PPV		
	Tes.	Inf.	%	Tes.	Inf.	%	Tes.	Inf.	%	Tes.	Inf.	%
Abricotier	258	18	6,98	86	9	10,47	86	8	9,30	172	3	1,74
Mechemech	17	0	0,00	8	0	0,00	8	0	0,00	9	0	0,00
Pêcher	140	37	26,43	105	8	7,62	105	5	4,76	50	0	0,00
Nectarine	22	3	13,64	/	/	/	/	/	/	7	0	0,00
F. Missouri	8	0	0,00	4	0	0,00	4	0	/	4	0	0,00
Prunier	182	18	9,89	95	15	15,79	95	5	5,26	87	6	6,90
Gf 8	17	1	5,88	4	1	25,00	4	0	0,00	13	0	0,00
Amandier	121	7	5,79	56	1	1,79	56	0	0,00	65	2	3,08
A. amer	18	3	16,67	8	1	12,50	8	0	0,00	10	0	0,00
Cerisier	148	35	23,65	64	10	15,63	64	5	7,81	84	0	0,00
Sainte Lucie	28	8	28,57	16	6	37,50	16	2	12,50	12	0	0,00
Myrobolan	8	2	25,00	8	1	12,50	8	0	0,00	/	/	/
Total	967	132	13,65	454	52	11,45	454	25	5,51	513	11	2,14

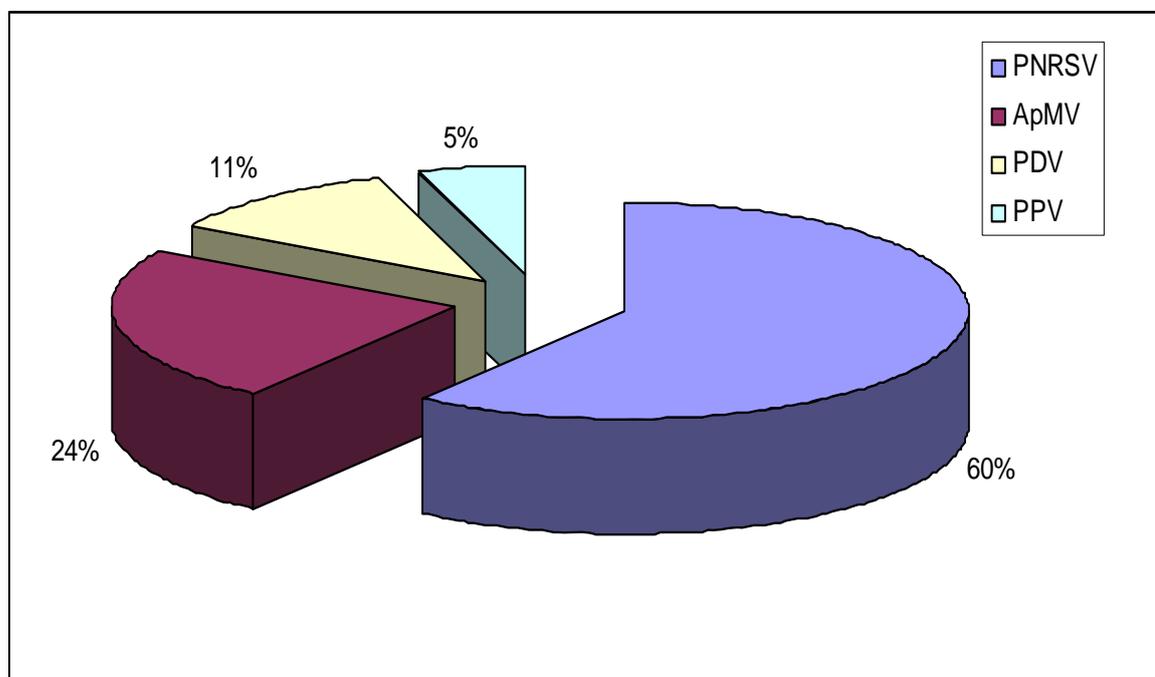


Fig. 2. Représentation graphique comparant la fréquence des quatre virus sur les espèces de rosacées fruitières à noyaux.

3.2.5.1 - Fréquence du PNRSV dans les rosacées fruitières à noyaux

Dans la zone d'étude, les résultats sérologiques montrent que le cerisier est l'espèce la plus infectée et la plus sensible aux attaques par le PNRSV avec un taux de 24,43% (93 échantillons testés, 35 échantillons infectés), en revanche l'abricotier, se classe en dernière position avec un taux de l'ordre de 6,55% (258 échantillons testés, 18 échantillons infectés). Le reste des espèces de prunus à savoir le pêcher, le prunier et l'amandier se positionne intermédiairement entre les deux premières espèces fruitières citées, avec des taux d'infection de l'ordre de 23,53%, 9,55% et 7,19% respectivement (Tableau 24).

Par rapport au total des échantillons infectés, si le PNRSV représente 35 % des échantillons totaux infectés, la présence de ce virus dans l'abricotier ne représente que 9% du total des échantillons infectés. Au niveau des autres prunus cultivés, en l'occurrence le pêcher, le prunier et l'amandier, le PNRSV est présent dans 33 %, 13 % et 10 % des échantillons infectés respectivement (Fig. 3).

Comparativement au niveau Méditerranéen, Myrta et *al.* (2003) ont enregistré un ordre d'infection et de fréquence complètement différent, puisque l'amandier vient en première position avec 48%, suivi de l'abricotier 42%, cerisier 6%, pêcher 48%, et enfin 7% pour le prunier.

Plus proche de nous, en Tunisie, le PNRSV représente 33 % des échantillons totaux infectés d'amandier, 15 % du pêcher, 12 % de prunier, 10 % de cerisier et uniquement 5 % d'abricotier (Zermadini et *al.*, 1996). L'explication de la forte infection d'amandier comparativement au cas Algérien, réside dans le fait que l'amandier est le plus dominant en Tunisie, couvrant de grandes superficies.

En matière de présence de PNRSV dans les trois systèmes de conduite, les parcs à bois apparaissent les plus infectés par le PNRSV avec un taux de fréquence de l'ordre de 16,29%, alors que les vergers commerciaux et les pépinières sont infectés d'une manière presque égale avec 13,65%, 13,04% respectivement (Tableau 24).

D'une manière générale, la fréquence enregistrée dans les trois systèmes de conduite, peut être considérée comme identique, cependant, celle des pépinières et des parcs à bois est préoccupante, en regard à l'importance du matériel végétal de multiplication dans la propagation du virus dans la région de l'étude et dans les autres zones arboricoles qui s'approvisionnent en plants et en boutures des ces derniers.

Tableau 24 : Fréquence du PNRSV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux			Taux moyen
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	
Abricotier	40	0	0,00	46	6	13,04	172	12	6,98	6,55
Mechemech	17	0	0,00	/	/	/	/	/	/	
Pêcher	19	2	10,53	30	15	50,00	91	20	21,98	23,53
Nectarine	/	/	/	/	/	/	22	3	13,64	
F. Missouri	/	/	/	8	0	0,00	/	/	/	
Prunier	19	0	0,00	57	7	12,28	106	11	10,38	9,55
Gf 8	5	0	0,00	12	1	8,33	/	/	/	
Amandier	24	0	0,00	40	4	10,00	57	3	5,26	7,19
A. amer	13	3	23,08	5		0,00	/	/	/	
Cerisier	21	11	52,38	56	8	14,29	71	16	22,54	24,43
Sainte Lucie	18	6	33,33	10	2	20,00	/	/	/	
Myrobolan	8	2	25,00	/	/	/	/	/	/	25,00
Total	184	24	13,04	264	43	16,29	519	65	12,52	13,65 %
Total échantillons testés							967			
Total échantillons infectés par le PNRSV							132			
Taux d'infection moyen par le PNRSV							13,65 %			

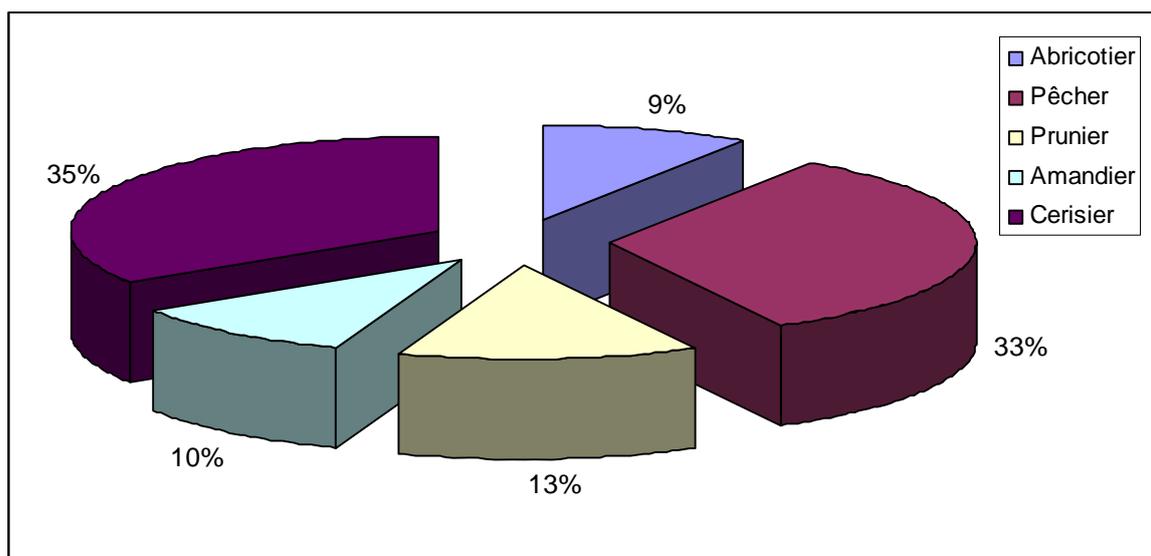


Fig. 3. Part de fréquence du PNRSV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés.

3.2.5.2 - Fréquence du PDV dans les rosacées fruitières à noyaux

Mis à part l'absence de toute infection des échantillons d'amandier, le reste des espèces de prunus cultivés dans la région d'étude sont infectés par le PDV à des taux relativement proches. D'une manière générale, la fréquence moyenne du PDV qui est égale à 5,51 % est la moins importante parmi les Ilarvirus comparativement aux autres membres de ce genre à savoir le PNRSV et l'ApMV.

En rapport avec les taux de fréquence enregistré, qui ne dépassent guère la barre de 10%, on remarque que les espèces infectés peuvent être classées en deux groupes ; un premier groupe composé d'abricotier et cerisier qui sont moyennement infectés avec 8,51% et 8,75%) respectivement, et un deuxième groupe composé de prunier et de pêcher dont les taux de fréquence respectifs sont 5,05% et 4,59% (Tableau 25).

Sur la base de la présence du PDV dans les échantillons infectés, nous pouvons subdivisées les espèces infectées en deux groupes : les plus infectées, le cas de l'abricotier et le cerisier où le PDV est présent dans 32% des échantillons infectés et les moyennement infectés, le cas du pêcher et du prunier où le ce virus est présent dans 17%, et 19% des échantillons infectés, respectivement (Fig. 4).

Comparativement toujours aux résultats de l'étude menée par Myrta *et al.* (2003), suite une décade d'échantillonnage et d'analyse, il ressort que le cerisier est l'espèce la plus infectée par le PDV avec 67% du total des échantillons infectés, suivi par l'amandier (25 %), l'abricotier (12%), le pêcher (10%) et en dernière position le prunier avec 15%. Le PDV au niveau de la zone d'étude est moins fréquent chez toutes les espèces fruitières à noyaux.

En ce qui concerne la fréquence du PDV dans les différents systèmes de conduite, également les parcs à bois sont les plus infectés avec un taux de fréquence de l'ordre de 11,96 tandis que les pépinières et les vergers commerciaux, sont faiblement infectés avec des taux de fréquence de l'ordre de 6,02 % et 5,51%, respectivement (Tableau 25).

La remarque signalée dans le cas du PNRSV est réitérée ici, dans le cas du PDV relative à l'importance du matériel végétal de multiplication dans la propagation du virus dans la région de l'étude et dans les autres zones arboricoles qui s'approvisionnent en plants et en boutures des ces derniers.

Tableau 25 : Fréquence du PDV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux			Taux moyen
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	
Abricotier	16	1	6,25	8	3	37,50	62	4	6,45	8,51
Mechemech	/	/	/	/	/	/	8	0	0,00	
Pêcher	17	1	5,88	16	3	18,75	72	1	1,39	4,59
Nectarine	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
F. Missouri	/	/	/	4	0	0,00	/	/	/	
Prunier	/	/	/	24	3	12,50	71	2	2,82	5,05
Gf 8	/	/	/	4	0	0,00	/	/	/	
Amandier	8	0	0,00	16	0	0,00	32	0	0,00	0,00
A. amer	8	0	0,00	/	/	/	/	/	/	
Cerisier	18	1	5,56	12	2	8,33	34	2	5,88	8,75
Sainte Lucie	8	2	25,00	8	0	0,00	/	/	/	
Myrobolan	8	0	0,00	/	/	/	/	/	/	0,00
Total	83	5	6,02	92	11	11,96	279	9	3,23	5,51 %
Total échantillons testés							454			
Total échantillons infectés par le PDV							25			
Taux d'infection moyen par le PDV							5,51 %			

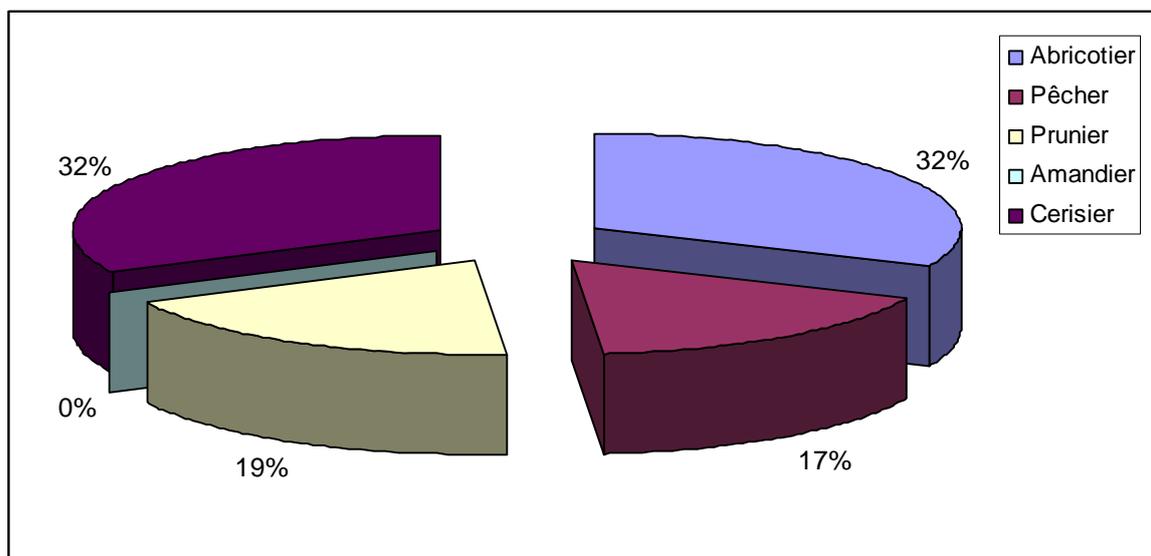


Fig. 4. Part de fréquence du PDV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés.

3.2.5.3 - Fréquence de l'ApMV dans les rosacées fruitières à noyaux

D'emblée on remarque que toutes les espèces de prunus cultivées dans la région d'étude sont touchées par l'ApMV à des taux relativement différents. D'une façon générale, la fréquence moyenne de l'ApMV est égale à 11,45 % ce qui le place dans une position intermédiaire parmi les trois Ilarvirus.

La sensibilité des rosacées fruitières à noyaux à l'ApMV semble être d'après les résultats obtenus, avoir une prédilection pour le cerisier et le prunier, qui sont infectés à hauteur 20% et 16,16%, respectivement. Comme on peut qualifier l'abricotier et le pêcher comme moyennement infectés avec 9,57% et 7,34%, en revanche l'amandier est l'espèce la moins sensible aux attaques de l'ApMV avec un taux égal à 3,13% (Tableau 26).

En regardant la part de fréquence de l'ApMV dans les échantillons infectés, on remarque qu'il est présent dans 31 % des échantillons du prunier et d'abricotier infectés, ce pourcentage diminue dans les cas du pêcher et d'abricotier à 18% et 16%, et il n'est que de 4% dans le cas de l'amandier (Fig. 5).

Contrairement au PDV qui était plus fréquent dans les pays du pourtour méditerranéen que dans la zone d'étude, l'ApMV semble être plus fréquent dans la zone d'étude que dans les pays méditerranéens ; puisque les pourcentages d'infection de la plupart des espèces de Prunus ne dépassaient guère les 4 % (Amandier : 3 %, Abricotier : 4%, Cerisier : 3%, Pêcher : 3%, Prunier : 1%) Myrta et *al.* (2003).

Les résultats obtenus nous montrent également, que toujours les parcs à bois sont les plus infectés par l'ApMV avec un taux de fréquence de l'ordre de 16,30, suivis par les pépinières avec 14,46% et enfin les vergers commerciaux, viennent en dernière position, ne sont infectés qu'à hauteur de 11,45%.

Nous pouvons conclure que les trois Ilarvirus (PNRSV, ApMV et PDV) infectent beaucoup plus les parcs à bois et les pépinières, ceci est peut être du à la multiplication des opérations de taille et de coupes de boutures opérées au niveau des arbres constituant ces vergers. Il est connu que la majorité des virus, et les Ilarvirus en particulier sont transmis par matériel de greffage et par transmission mécanique à travers les outils de taille (sécateurs, greffoirs, scie, etc.).

Vu l'importance des taux d'infection enregistrés, il est nécessaire de passer à l'arrachage du matériel végétal existant et son remplacement par un matériel certifié, tout en veillant à le préserver sain à travers la désinfection de tous les outils et matériel utilisé dans les opérations techniques des pépinières et parcs à bois.

Tableau 26 : Fréquence de l'ApMV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux			Taux moyen
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	
Abricotier	16	1	6,25	8	1	12,5	62	7	11,29	9,57
Mechemech	/	/	/	/	/	/	8	0	0	
Pêcher	17	3	17,65	16	4	25	72	1	1,39	7,34
Nectarine	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
F. Missouri	/	/	/	4	0	0	/	/	/	
Prunier	/	/	/	24	4	16,67	71	11	15,49	16,16
Gf 8	/	/	/	4	1	25	/	/	/	
Amandier	8	0	0	16	1	6,25	32	0	0	3,13
A. amer	8	1	12,5	/	/	/	/	/	/	
Cerisier	18	2	16,67	12	2	25	34	6	17,65	20,00
Sainte Lucie	8	4	50	8	2	25	/	/	/	
Myrobolan	8	1	12,5	/	/	/	/	/	/	12,50
Total	83	12	14,46	92	15	16,30	279	25	8,96	11,45 %
Total échantillons testés							454			
Total échantillons infectés par l'ApMV							52			
Taux d'infection moyen par l'ApMV							11,45 %			

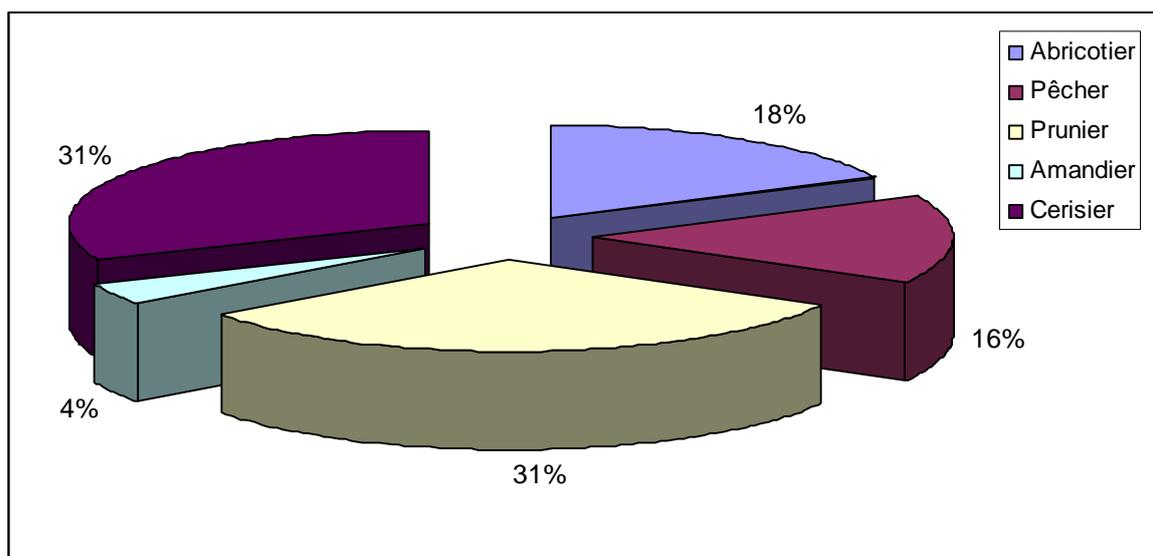


Fig. 5. Part de fréquence de l'ApMV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés.

3.2.5.4 - Fréquence du PPV dans les rosacées fruitières à noyaux

Le principal résultat qu'il faut signaler est la détection pour la première fois en Algérie du Plum Pox Virus (Sharka). Les premiers tests de diagnostic effectués par l'INPV El Harrach à travers les principales zones arboricoles de l'Algérie font état de son absence (communication personnelle). D'autres échantillons (5) soupçonnés par l'ITAF Boufarik d'être infectés par le PPV, les analyses sérologiques et moléculaires effectués par l'INRA Montpellier à infirmer ces résultats (Aouane, 2003).

Les résultats d'analyses sérologiques indiquent le PPV est présent dans 11 échantillons sur les 513 échantillons testés ce qui nous donne un taux d'infection moyen de l'ordre de 2,14%. Il a été détecté en gros sur les échantillons de prunier (6%), sur 2,67 % d'amandier et enfin 1,66 % d'abricotier. (Tableau 27). Le pêcher et le cerisier ne présentaient aucun échantillon malade et de ce fait, totalement indemnes (0 %) du PPV.

Par rapport au total des échantillons infectés, le PPV est présent dans 58 % des échantillons de prunier, 26 % d'amandier et seulement 16 % d'abricotier (Fig. 6). Comparativement à l'échelle régionale, le PPV semble privilégié les mêmes espèces surtout le prunier et l'abricotier alors que l'amandier semble être plus résistant (Myrta et al., 2003).

La détection du PPV en Algérie sur amandier, s'explique par le fait que la majorité des vergers sont créés à partir de plants originaires de Bulgarie, avec les programmes spéciaux du ministère de l'agriculture pendant les années soixante dix. La Bulgarie est qualifié pays d'origine de la Sharka.

En matière de fréquence du PPV au niveau des différents systèmes de conduite, la Sharka est totalement absente dans les pépinières, infecte les parcs à bois à hauteur de 4,62 % et les vergers commerciaux à hauteur de 2,14 %.

A lumière des ces résultats, et vu les infections déclarés au niveau des parcs à bois, un certain nombre de mesures d'urgences s'imposent. Il faut procéder dès à présent à la délimitation de tous les foyers infectés, de les mettre en quarantaine, l'arrachage de tous les plants mis en cause et d'intensifier les traitements anti-aphidiens : plusieurs espèces de pucerons sont considérés comme vecteur potentiel du PPV.

En plus, si c'est possible continuer les analyses sérologiques et moléculaires au niveau de tous les agriculteurs qui se sont approvisionnés en plants à partir des pépinières infectées pour l'application des mêmes mesures.

Tableau 27 : Fréquence du PPV et taux d'infection (%) dans les rosacées cultivées

Espèces	Pépinières			Parc à Bois			Vergers commerciaux			Taux moyen
	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	Test.	Inf.	Taux	
Abricotier	20	0	0,00	34	2	5,88	118	1	0,85	1,66
Mechemech	9	0	0,00	/	/	/	/	/	/	
Pêcher	/	/	/	17	0	0,00	33	0	0,00	0,00
Nectarine	/	/	/	/	/	/	7	0	0,00	
F. Missouri	4	0	0,00	/	/	/	/	/	/	
Prunier	22	0	0,00	23	2	8,70	42	4	9,52	6,00
Gf 8	7	0	0,00	6	0	0,00	/	/	/	
Amandier	10	0	0,00	26	2	7,69	29	0	0,00	2,67
A. amer	10	0	0,00	/	/	/	/	/	/	
Cerisier	5	0	0,00	22	0	0,00	57	0	0,00	0,00
Sainte Lucie	10	0	0,00	2	0	0,00	/	/	/	
Myrobolan	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,00
Total	97	0	0,00	130	6	4,62	286	5	1,75	2,14 %
Total échantillons testés							513			
Total échantillons infectés par le PPV							11			
Taux d'infection moyen par le PPV							2,14 %			

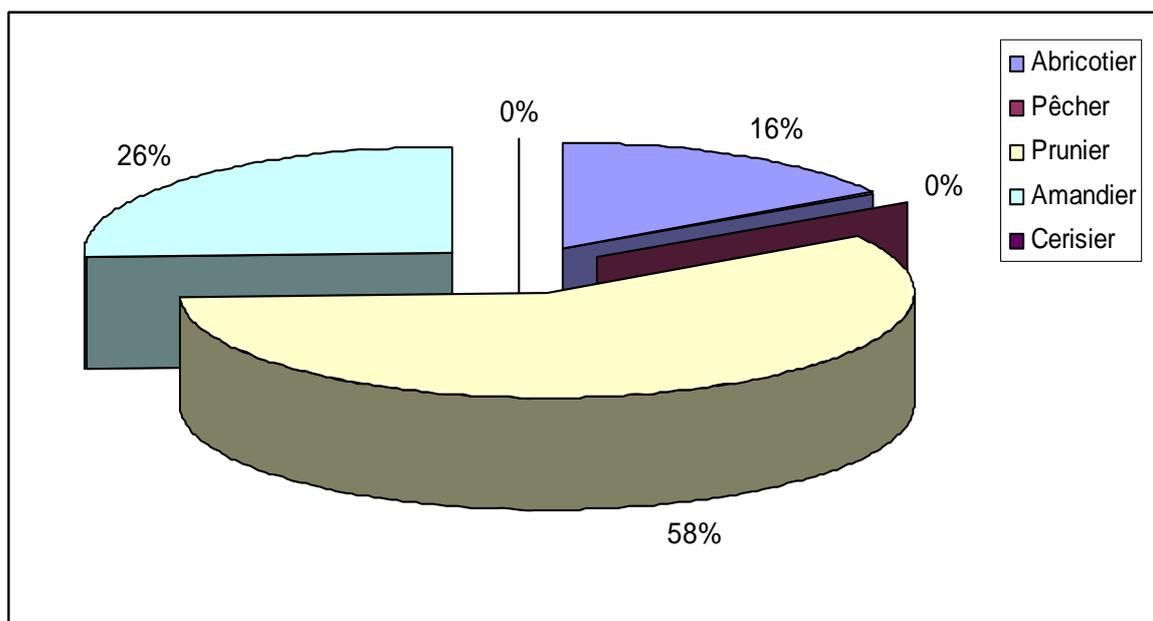


Fig. 6. Part de fréquence du PPV dans les échantillons infectés des Prunus cultivés.

3.3 - Détection des virus rares : ACLSV, CVA, CGRMV, ApLV et PBNSPaV

La détection sérologique a concerné également d'autres virus, qui se rencontrent moins fréquemment que ceux déjà étudiés, à savoir l'Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV), le Plum Bark necrosis Stem Pitting Associated Virus (PBNSPaV). L'analyse sérologique de 75 échantillons montre l'absence totale de ces deux virus dans la région d'étude.

Par ailleurs l'analyse moléculaire sur des gels d'agarose 2% ou gel d'Acrylamide 5% des produits de la Nested RT-PCR pour le diagnostic du PBNSPaV et la RT-PCR des mêmes échantillons pour la recherche de l'ACLSV, le Cherry Green Ring Mottle Virus (CGRMV), l'Apricot Latent Virus (ApLV) ainsi que le Cherry Virus A (CVA), fait ressortir l'absence totale des quatre premiers virus cités. En revanche, le dernier virus (CVA) était présent dans 5 échantillons (Photo 7). Ce qui donne un taux d'infection de l'ordre 10,67% (8 échantillons infectés, 75 échantillons testés) (Tableau 28). Ceci constitue également la première détection de ce virus dans la région d'étude et en Algérie.

Le CVA a été détecté sur 5 abricotiers, 2 pêchers et 1 prunier, malgré que ce virus a été découvert initialement sur cerisier (Jelkman, 1995), aucun échantillon de cette espèce végétale, n'a été détecté infecté. Mais cette détection sur les autres prunus confirme leur sensibilité au CVA (James and Jelkman, ; Svanella-Dumas et al. 2005).

L'incidence et la fréquence du CVA sur les rosacées à noyaux, ont été menées dans le monde. Par contre il a été signalé en Angleterre (Il a été découvert sur cerisier doux et amer (*Prunus cerasus* and *P. avium*) en Allemagne, Canada, Grande Bretagne et Pologne (James and Jelkman, 1998, Kirby et al., 2001, Komorowska and Cieślińska, 2004). En plus des espèces de cerisiers, il a été rapporté sur abricotier et pêcher et récemment sur prunier en France (Svanella-Dumas et al. 2005).

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 38 39 M



Photo 7. Analyse des produits de la RT-PCR sur gel d'acrylamide 5%. Echantillons algériens (17 à 27), 38 et 39 témoins positifs (CVA), M: Marqueurs moléculaires.

Tableau 28 : Résultats de la RT-PCR et la Nested RT-PCR suite à une course d'électrophorèse sur gel d'acrylamide 5%

Espèce	Variété	Lieu dit	N° PCR	PBNSPaV	ALV	CVA	CGRMV
Prunier	G. Japan	Athmania	1	-	-	-	-
Prunier	Mytheley	Athmania	3	-	-	-	-
Pêcher	Dixired	Athmania	5	-	-	-	-
Abricotier	Roussillon	Athmania	7	-	-	-	-
Pêcher	Spring Rest	Athmania	9	-	-	-	-
Pêcher	My Crest	Athmania	11	-	-	-	-
Prunier	Stanley	Athmania	13	-	-	-	-
Cerisier	Burlat	Athmania	15	-	-	-	-
Merisier	Ste Lucie	Athmania	17	-	-	-	-
Abricotier	Bouhila	Brahim	19	-	-	-	-
Abricotier	Mechmech	Brahim	21	-	-	-	-
Abricotier	Louzi	Brahim	23	-	-	-	-
Abricotier	Rosi	Brahim	24	-	-	-	-
Abricotier	Inconnu 1	Farid	25	-	-	-	-
Abricotier	Louzi	Maamar	27	-	-	-	-
Abricotier	Inconnu 2	Djamel	29	-	-	-	-
Abricotier	Bafi	Billel	31	-	-	+	-
Abricotier	Louzi	Hamel S	33	-	-	+	-
Abricotier	Mechmech	Hamel S	35	-	-	-	-
Abricotier	Louzi	Adjadj M	39	-	-	+	-
Abricotier	Mechmech	Adjadj M	41	-	-	-	-
Prunier	G. Japan	Amine	43	-	-	+	-
Abricotier	Bullida	Amine	45	-	-	+	-
Pêcher	Nectarosa	Amine	49	-	-	+	-
Pêcher	J.Hall	Amine	51	-	-	+	-
Abricotier	Luzet	Amine	53	-	-	+	-
Prunier	Mytheley	Amine	55	-	-	-	-
Cerisier	Hedelfinen	Chakhchoukh	57	-	-	-	-
Cerisier	Hedelfinen	Chakhchoukh	59	-	-	-	-
Cerisier	Guillaume	Chakhchoukh	61	-	-	-	-
Abricotier	Bullida	Chakhchoukh	65	-	-	-	-
Abricotier	Bullida	Chakhchoukh	67	-	-	-	-
Prunier	Santa rosa	Chakhchoukh	69	-	-	-	-
Cerisier	Napoleon	Chakhchoukh	71	-	-	-	-
Rosier	Inconnu	Jardin	75	-	-	-	-
Pêcher sain	GF 305	IAM	//	-	-	-	-

3.4 - Stabilité du PNRSV aux basses températures de conservation (-20°C)

Les références bibliographiques consultées insistent beaucoup sur la réalisation rapide du test DAS-ELISA au maximum deux à trois jours après la récolte des échantillons. Les virus étant des entités microscopiques sensibles à la conservation et sont thermolabiles ; le stockage que ce soit en feuilles fraîches ou extrait influence beaucoup les résultats d'analyse.

Dans ce but, une partie de l'étude s'est intéressée à la stabilité du PNRSV pendant la conservation pendant des périodes différentes à des températures de -20°C , à chaque fois qu'on réalise un test une partie de l'extrait d'échantillon est utilisée immédiatement et une autre partie est conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

Les résultats obtenus (Tableau 29) montrent que la densité optique (DO) enregistrées par le lecteur des microplaques de titration, des échantillons frais infectés, suite une lecture photométrique après 2 heures, dépasse dans la majorité des échantillons la valeur de 3,00.

En effet, les huit échantillons positifs pour le PNRSV pris comme base de l'étude, ont donné une des DO supérieures à 3.000 lorsqu'ils sont immédiatement analysés, après leurs prélèvements des vergers.

Par contre les valeurs des DO commencent à diminuer après les avoir conservés à des intervalles de temps allant à trois semaines ; par conséquence, on a enregistré après une semaine de conservation à -20°C , des DO inférieures ou égales à 1,50 pour la majorité des échantillons, et sont autour de 1,00 après deux semaines de conservation et chutent aux alentours de 0,5 après trois semaines de stockage (Fig. 7). Ce qui signifie que tous les échantillons qui ont des DO inférieure à 1,00 sont considérés comme négatifs vu que les témoins négatifs nous donnent souvent des DO proches de 0,5 ; rappellent ici, la règle pour considérer qu'un échantillon est positif si sa valeur en DO est deux fois supérieure à celle du témoin négatif.

La diminution de la densité optique après un temps de conservation à -20°C est due principalement à l'action conjuguée de la température et du tampon d'extraction utilisée, soit à l'action de l'un des deux. Kryczynski et *al.* (1992), ont prouvé que les échantillons qui sont conservés à -20°C subissent une diminution de la concentration virale.

Tableau 29 : Valeur des densités optiques enregistrées après trois intervalles de temps.

Espèces	Echantillons Frais	Conservation des échantillons à - 20°C		
		Une semaine	Deux semaines	Trois semaines
Prunier	2,95	2,65	0,50	0,45
Pêcher	3,01	3,01	0,93	0,48
Rosier	2,65	2,3	0,99	0,39
Prunier	3,20	2,79	1,01	0,42
Amandier	2,12	2,07	1,23	0,38
Cerisier	3,76	3,36	1,09	0,33
Abricotier	3,25	2,25	1,00	0,79
Pêcher	3,67	3,09	0,44	1,01

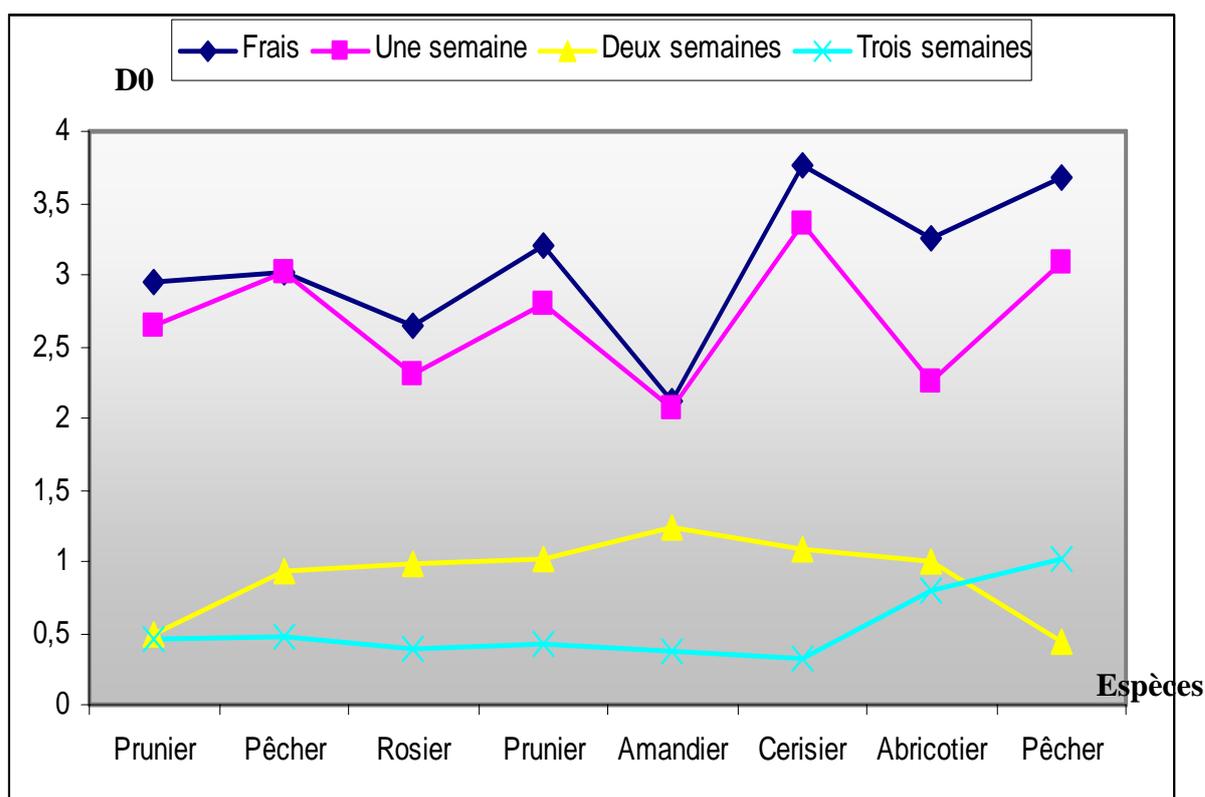


Fig. 7. Représentation graphique des densités optiques après trois intervalles de temps.

3.5 - Influence des conditions climatiques sur la concentration du PNRSV au champ

Plusieurs auteurs insistent sur la période d'échantillonnage et les meilleurs organes là où la concentration est maximale. En effet, la majorité des chercheurs sont unanimes que la période printanière qui coïncident avec la reprise végétative est la période la plus propice pour la récolte des échantillons surtout si on désire réaliser des analyses sérologiques pour la détection d'éventuelles infections virales.

Pour étudier l'action de l'un des facteurs de l'environnement sur la concentration virale dans les arbres infectés, à savoir les variations de températures. On a pris comme base d'étude le PNRSV, le virus le plus dominant dans la région. En effet, les échantillons qui ont donné les plus fortes DO en DAS-ELISA durant la période printanière (Avril – Mai) où la moyenne des températures était égale à 20,42 °C, ont été échantillonnés une seconde fois mais cette fois, pendant la période estivale (juillet) où la moyenne des températures enregistrée avoisinait les 29°C dans la ville de Sétif (Anonyme, 2008).

Les résultats sérologiques sur les huit échantillons infectés, qui avaient des DO en DAS-ELISA supérieurs dans leur majorité la valeur de 3,00 au printemps, sept échantillons n'ont donné que des DO inférieurs à 0,5 presque égale au témoin négatif et un seul échantillon (un pêcher) a résulté positif (DO = 1,89), mais cette valeur est comme même inférieure à celle enregistrée durant l'échantillonnage printanier (Tableau 30).

Les résultats obtenus confirment ainsi, le rôle des hautes températures dans la diminution du titre viral dans les plantes infectées. La diminution de la concentration virale est due surtout aux températures élevées qui selon Dal Zotto et *al.* (1999) et Nidá et *al.* (2003), limitent la réplication des virus qui se traduit par la réduction du titre viral à l'intérieur des tissus de la plante infectée.

Ceci, confirme aussi que le choix de la période d'échantillonnage est primordial dans toute étude de détection et d'évaluation du PNRSV. Nidá et *al.* (2003), suggère que la saison la plus propice pour détecter les virus est celle qui suit la levée de dormance (période de croissance active ou la période printanière) dans les différentes organes fleur, branche et les feuilles pour la majorité des variétés de pêcher, d'amandier et de prunier.

Tableau 30 : Valeur de densité optique enregistrée entre deux périodes d'échantillonnage

Espèce	Lieu-dit	DO au printemps	DO en été
Prunier	Sidi-Khlifa	3,15	0,41
Prunier	Beni- Fouda	3,01	0,39
Prunier	//	3,18	0,46
Prunier	//	3,20	0,47
Amandier	//	3,12	0,41
Cerisier	//	3,76	0,43
Abricotier	//	3,25	0,36
Pêcher	//	3,09	1,89
Total arbres infectés		8	1

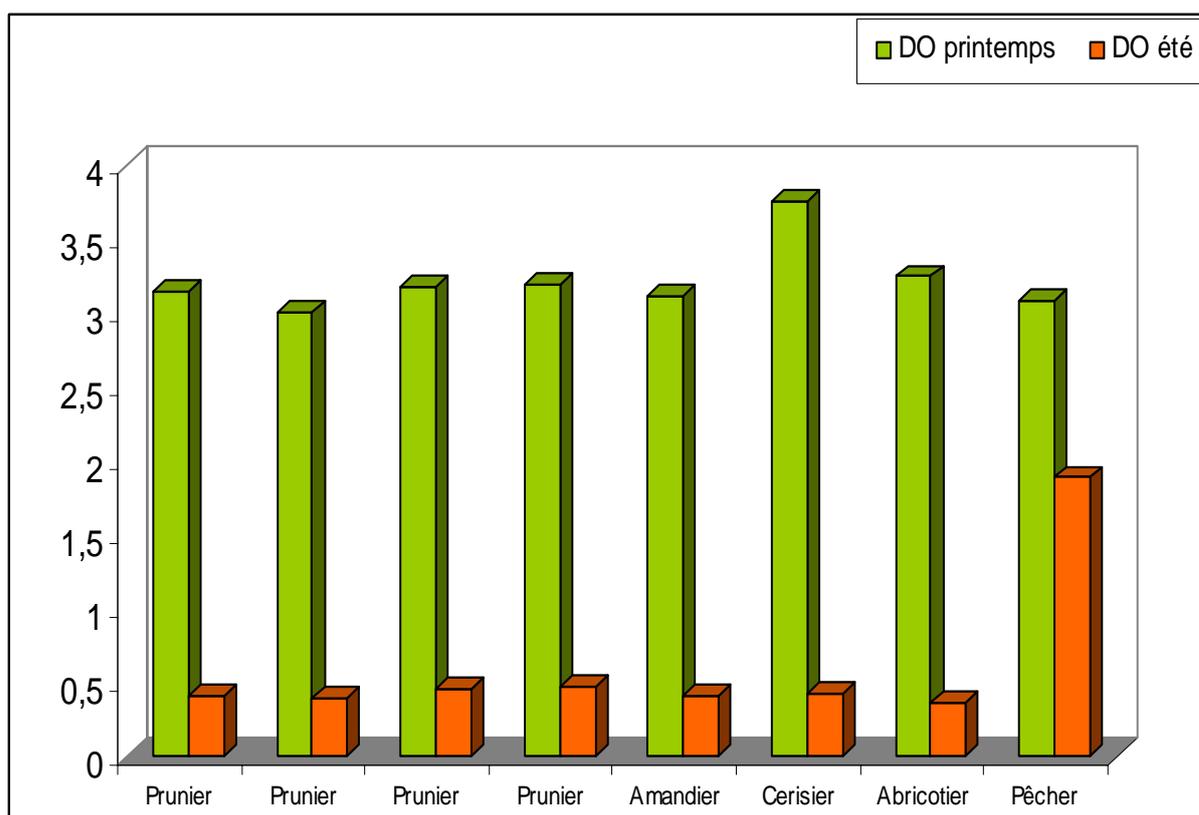


Fig.8. Représentation graphique comparant les densités optiques enregistrées entre deux périodes d'échantillonnage printanier et estival, obtenues en DAS-ELISA cas du PNRSV.

3.6 - Détection moléculaire des principaux viroïdes

3.6.1 - Niveau d'infection générale par les viroïdes

Durant les automnes 2004 - 2007, les 1128 échantillons récoltés ont été au départ imprimés sur de membranes de nitrocellulose et analysés par la technique d'immunoprinting hybridization pour la détection du *Peach Latent Mosaic Viroid* (PLMVd) et du *Hop Stunt Viroid* (HSVd).

Les membranes ont été développées au niveau de l'Institut Agronomique Méditerranéen de Bari, là où le signal sur la radio est bien clair et visible, les résultats d'analyses sont acceptés et sont consignés dans leurs tableaux correspondants. Alors que, là où le signal n'est pas clair et les résultats apparaissent douteux, les échantillons correspondants seront analysés une deuxième fois par la technique de Dot-Blot hybridization qui est plus sensible que la première, pour statuer définitivement sur la positivité de l'échantillon et l'infection ou non des arbres.

Les résultats finaux montrent que 63 échantillons étaient infectés par l'un des deux viroïdes ou les deux ensembles, ce qui représente un taux moyen d'infection dans la région d'étude de l'ordre de 5,59 % (1128 échantillons analysés, 63 infectés) (Tableau 31).

Au départ, 28 échantillons infectés ont été détectés par la technique de tissu immunoprinting hybridization (Photo 8 et 9), alors que 35 échantillons ont été détectés après une deuxième analyse à travers la technique d'hybridation en Dot-Blot (Photo 10 et 11).

Si le pêcher et s'est montré l'espèce la plus touchée par les viroïdes avec un taux d'infection de l'ordre de 12,12 %, l'abricotier est relativement infecté puisqu'il est infecté à hauteur de 6,36 %. En revanche le prunier et le cerisier sont faiblement infectés, leurs niveaux d'infections correspondants (4,91 et 4,72%) ne dépassent guère les 5%. L'amandier et les espèces porte-greffes sont totalement indemnes des deux viroïdes (Fig. 9).

Des ces résultats, il en ressort que les deux viroïdes existent en Algérie, sur diverses espèces de prunus cultivés, mais leur fréquence réelle et leur incidence sur la production et le potentiel productif restent à établir. Davantage investigations et contrôles dans les différentes zones arboricoles s'imposent..

Vu le danger réel prouvé suite à l'infection par les viroïdes par diverses études menées dans plusieurs régions du monde, il est nécessaire de les inclure dans la liste des pathogènes nuisibles aux arbres fruitiers classe A en algérie.

Tableau 31 : Taux d'infection des rosacées fruitières à noyaux par les deux viroïdes

Espèces	Nombre d'échantillons		Taux d'infection %
	Testés	Infectés	
Abricotier	346	22	6,36
Pêcher	198	24	12,12
Prunier	224	11	4,91
Amandier	195	0	0,00
Cerisier	127	6	4,72
Autres Prunus	38	0	0,00
Total	1128	63	5,59 %

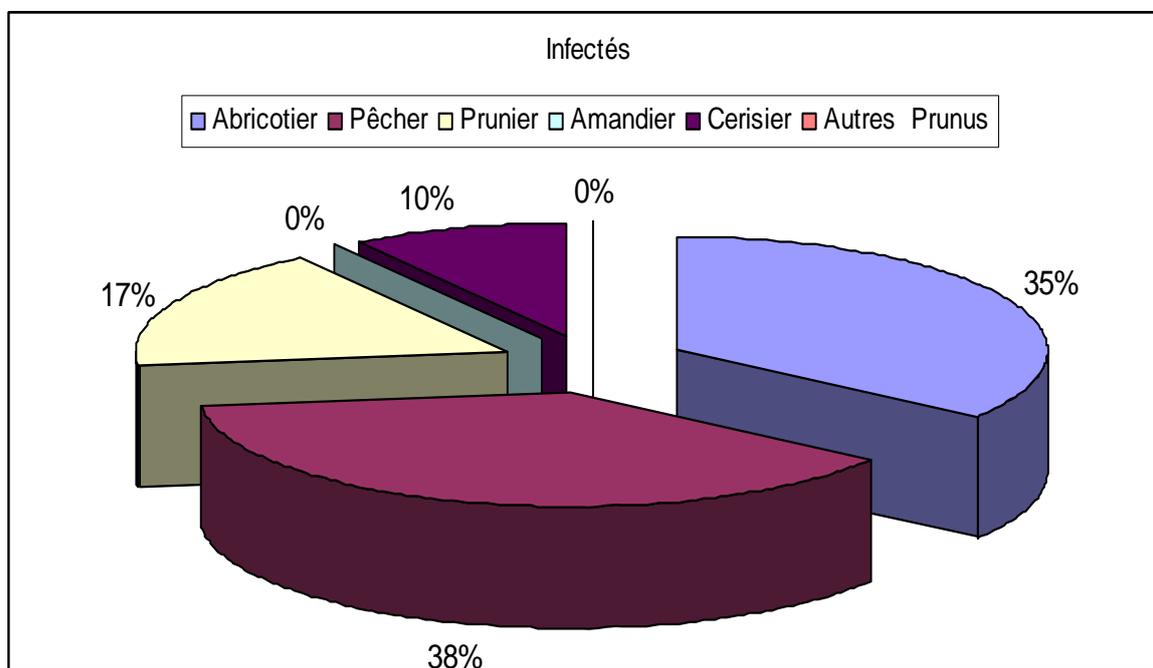


Fig. 9. Représentation graphique montrant la fréquence des deux viroïdes dans les espèces de rosacées fruitières à noyaux.

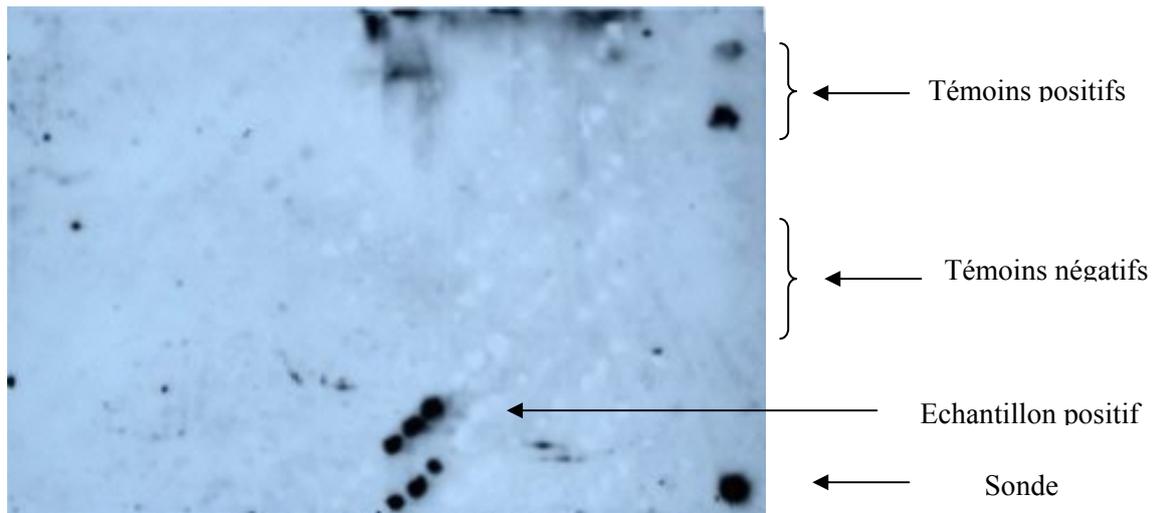


Photo 8. Radio développée après hybridation moléculaire de la membrane de nitrocellulose par tissu immunoprinting hybridization, cas du PLMVd. Les échantillons sont imprimés dans les lignes A – H et colonnes 1 à 11. Les cases 12A – 12D sont imprimées par les témoins positifs (PLMVd). Les cases 12E et 12F sont imprimées par les témoins négatifs. La case 12 H est réservée à la sonde plasmide DNA.

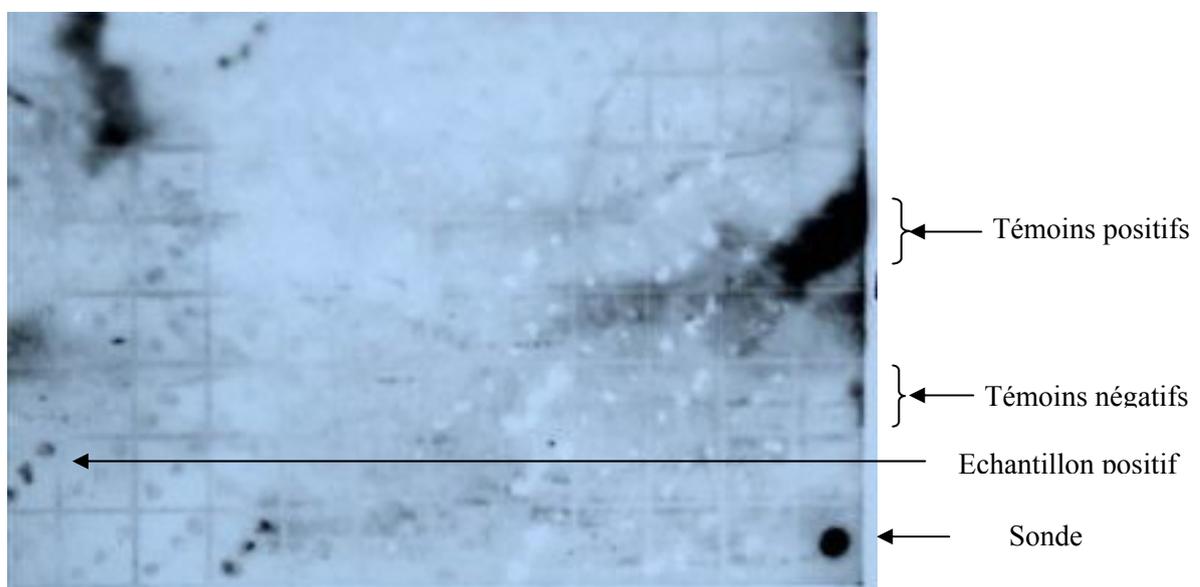


Photo 9. Radio développée après hybridation moléculaire de la membrane de nitrocellulose par tissu immunoprinting hybridization, cas du HSVd. Les échantillons sont imprimés dans les lignes A – H et colonnes 1 à 11. Les cases 12A – 12D sont imprimées par les témoins positifs (HSVd). Les cases 12E et 12F sont imprimées par les témoins négatifs. La case 12 H est réservée à la sonde plasmide DNA.

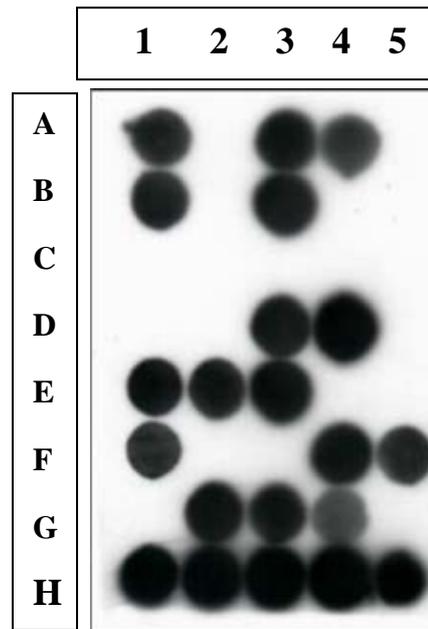


Photo 10. Hybridation en Dot blot des extraits de TNA d'échantillons de rosacées fruitières à noyaux, hybridés avec des sondes cRNA spécifiques pour PLMVd. Les échantillons sont mis dans les lignes A à H et les colonnes 1 à 4. Les témoins négatifs sont déposés dans les lignes D-5 et E-5. Les témoins positifs (PLMVd) est déposé dans la ligne F-5, la case G-5 est laissée vide et le plasmide DNA dans la ligne H-5.

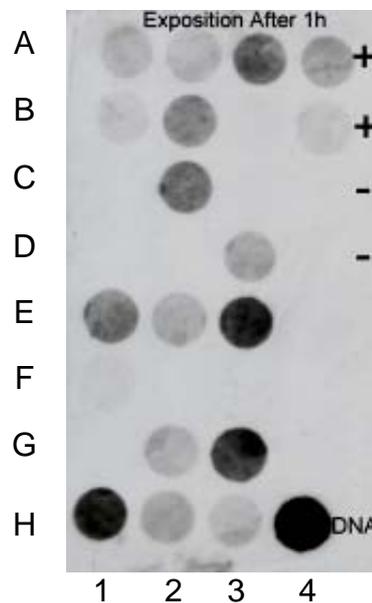


Photo 11. Hybridation en Dot blot des extraits de TNA d'échantillons de rosacées fruitières à noyaux, hybridés avec des sondes cRNA spécifiques pour HSVd. Les échantillons sont mis dans les lignes A à H et les colonnes. Les témoins positifs (HSVd) sont mis dans les cases A-4 et B-4). Les témoins négatifs sont mis dans les cases C-4 et D-4. Le plasmide DNA dans la case H-4.

3.6.1.1 - Fréquence du PLMVd et sensibilité des rosacées fruitières à noyaux

La fréquence du Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) dans la région d'action a été étudiée à travers deux techniques d'hybridation moléculaire. Nous rappelons que la première signalisation en Algérie du PLMVd a été faite par en 1996 par Diekman et Putter.

L'analyse à travers tissue immunoprinting a fait ressort la présence du PLMVd dans 17 échantillons de prunus cultivés alors que l'analyse par Dot-Blot hybridization a révélé la présence de ce viroïde dans 19 autres échantillons.

Au total 36 échantillons se sont avérés infectés par le PLMVd sur les 1128 échantillons analysés. Ceci nous donne un taux d'infection moyen de l'ordre de 3,19 %. Le PLMVd a été rencontré sur l'abricotier, le pêcher et le prunier, le reste des espèces à savoir le cerisier, l'amandier, la Sainte Lucie et le myrobolan sont totalement sains (0,00%) (Tableau 32).

Si les niveaux d'infection individuelle d'abricotier et de prunier avec respectivement 2,89% et 1,79%, nous laisse qualifier les pourcentages détectés comme des traces et ne constitue nullement une situation préoccupante. Celui du pêcher avec 11,11%, confirme d'une part la sensibilité de cette espèce à ce viroïde partout au monde et d'autre part, nous pousse à penser réellement à l'assainissement et la certification du matériel végétal de toutes les variétés de pêcher utilisées en Algérie.

La fréquence relativement élevée observée au niveau des variétés de pêcher (61 % du total des échantillons infectés) (Fig. 10), est peut être due principalement à sa propagation à travers les outils de taille utilisés qui ne sont jamais stérilisés ou désinfectés. Il est connu que les viroïdes, n'ont aucun vecteur biologique de transmission, les seules voies de transmission sont la transmission mécanique à travers les outils de taille et à travers la multiplication de matériel végétal infecté.

Comparativement au plan régional, le résultat du pêcher apparaît légèrement faible par rapport aux résultats obtenus dans de précédents travaux de diagnostic dans quelques pays méditerranéens, ou on a enregistré des niveaux beaucoup plus élevé surtout sur pêcher, cette espèce de prunus est infecté à hauteur de 15 % en France (Desvignes, 1999), entre 20 et 50 % en Italie (Barba and Faggioli, 1999), 40% en Syrie (Ismaeil et *al.*, 2001).

Tableau 32 : Niveau des infections dues à PLMVd sur les rosacées fruitières à noyaux

Espèces	Echantillons Testés	Echantillons infectés	Taux d'infection (%)
Abricotier	346	10	2,89
Pêcher	198	22	11,11
Prunier	224	4	1,79
Amandier	195	0	0,00
Cerisier	127	0	0,00
Autres Prunus	38	0	0,00
Total	1128	36	3,19 %

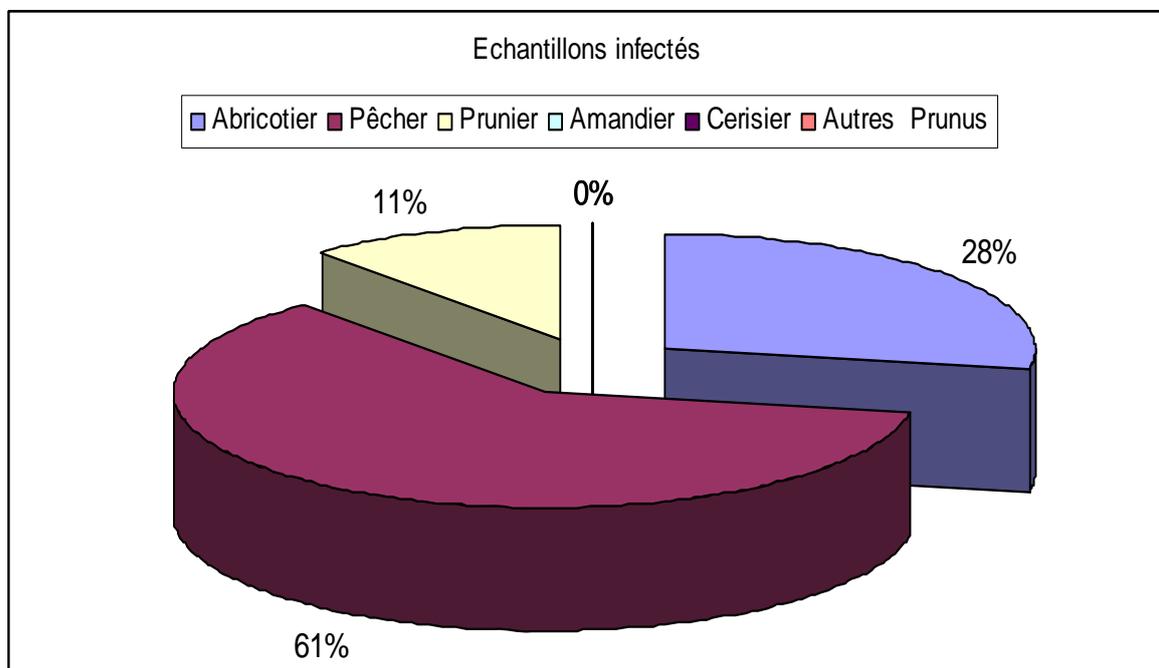


Fig. 10. Représentation graphique comparant de la fréquence du PLMVd sur les espèces de rosacées fruitières à noyaux.

3.6.1.2 - Fréquence du HSVd et sensibilité des rosacées fruitières à noyaux

L'objectif de cette analyse est la recherche du Hop Stunt Viroid (HSVd) dans les plantations agricoles en Algérie et sa fréquence dans la région d'étude. Il faut rappeler que ce viroïde, a été détecté dans la majorité des pays méditerranéens, avec qui l'Algérie, a d'énormes échanges commerciaux, particulièrement en matière de produits et intrants agricoles.

Comme précédemment, l'analyse des 1128 échantillons par la tissue immunoprinting hybridization fait ressortir l'infection de 26 échantillons et l'analyse par Dot-Blot hybridization a révélée la présence de 15 autres échantillons infectés parmi les échantillons qui étaient douteux. Au total, 41 échantillons sont infectés par le HSVd, ce qui est égal à un taux moyen d'infection de l'ordre de 3,63 % (Tableau 33).

Ceci représente la première détection de ce viroïde en Algérie sur les prunus cultivés et confirme encore une fois la présence du HSVd dans les pays Méditerranéens, là ou il est commun (Canizares et al., 1998, 2001).

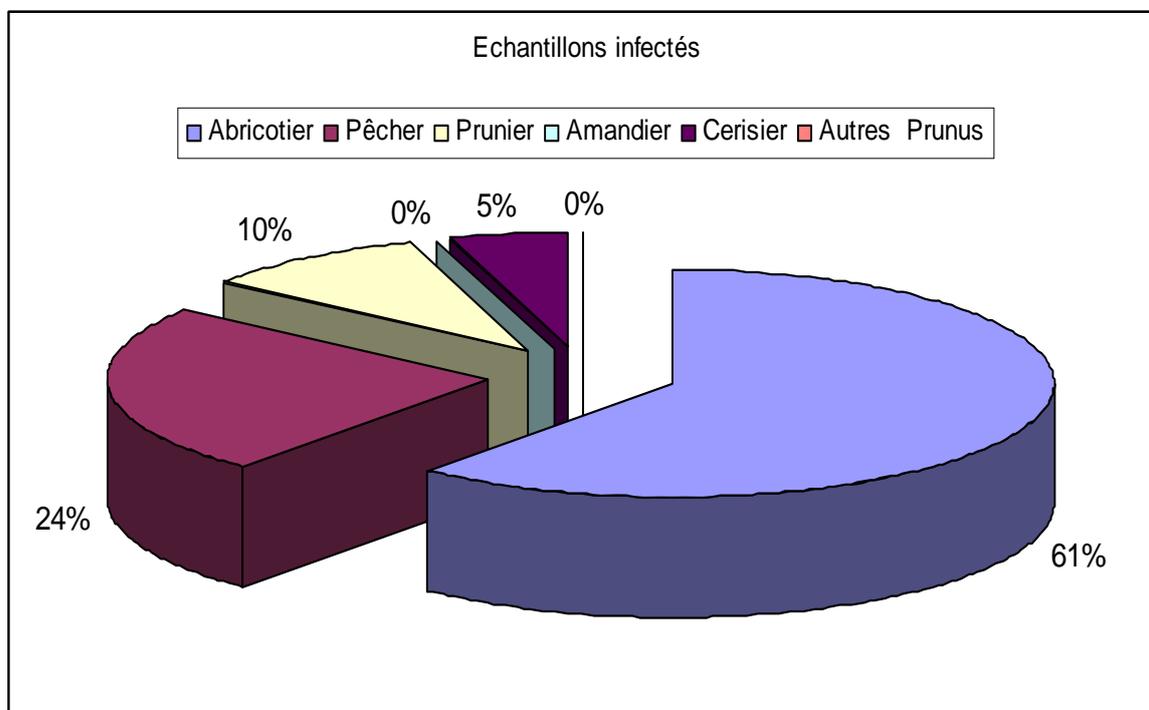
Le HSVd a été rencontré sur abricotier, pêcher, prunier et cerisier par contre l'amandier, la Sainte Lucie et le myrobolan se sont montrés totalement sains. Il semble avoir une certaine prédominance dans l'abricotier (7,23%) et le pêcher (5,05%). Ceci représente 61% et 24 % du total des échantillons infectés (Fig. 11). En revanche le prunier le cerisier, à la lumière de leurs niveaux d'infection individuelle, peuvent être jugé très faible avec respectivement (1,79 et 1,57%).

D'une façon générale, les niveaux d'infection n'apparaissent pas alarmants, mais, il faudrait peut être, multiplier les analyses et les contrôles dans les autres régions de l'Algérie pour avoir une idée réelle sur la distribution et la fréquence de ce viroïde dans le pays.

Sur le plan régional, nos résultats apparaissent très faible comparativement aux résultats obtenus dans pareils travaux de diagnostic dans quelques pays méditerranéens, ou on a enregistré des niveaux beaucoup plus élevé surtout sur l'abricotier à titre d'exemple, cette espèce de *Prunus* est infecté à hauteur de 19 % en Jordanie (Al-Rwahnih et al., 2001), 28 % au Liban (Chouairi et al., 2003), 10 % au Maroc et 5 % en Grèce (Amari et al, 2000).

Tableau 33 : Niveau des infections dues à HSVd sur les rosacées fruitières à noyaux

Espèces	Echantillons Testés	Echantillons infectés	Taux d'infection (%)
Abricotier	346	25	7,23
Pêcher	198	10	5,05
Prunier	224	4	1,79
Amandier	195	0	0,00
Cerisier	127	2	1,57
Autres Prunus	38	0	0,00
Total	1128	41	3,63 %

**Fig. 11.** Représentation graphique comparant de la fréquence du HSVd sur les espèces de rosacées fruitières à noyaux.

3.7 - Application de la détection synchronique sur des échantillons de champs

De plus en plus, la détection des virus, a recours à des techniques sérologiques et moléculaires. Mais vu le nombre important des échantillons à analyser, ceci a poussé les chercheurs à développer des techniques de détection simultanée de plus d'un virus à la fois. Pour voir l'applicabilité de la détection simultanée des trois Ilarvirus en même temps dans des échantillons qui proviennent directement des vergers, on a essayé deux techniques d'hybridation moléculaire (dot – blot, multiplexe RT-PCR).

A cet effet, des échantillons de feuilles ont été récoltés à partir des cinq espèces de *Prunus* spp. (Tableau 36). Ces échantillons sont suspectés d'être infectés par un, deux voire même les trois Ilarvirus en même temps suite à une première analyse sérologique. Les échantillons ont été analysés au départ par hybridation moléculaire non isotopique et par multiplex RT-PCR et les résultats sont comparés à ceux obtenus par DAS-ELISA.

Les résultats sérologiques des 21 échantillons montraient que les infections individuelles ont concerné 2 échantillons infectés pour chacun des trois virus l'ApMV, le PDV et le PNRSV. La DAS-ELISA a révélé également que 2 échantillons étaient infectés par l'ApMV et le PDV en même temps, 3 échantillons infectés par l'ApMV et le PNRSV et 2 échantillons infectés par le PDV et le PNRSV, alors que, uniquement 1 échantillon a été infecté par les trois virus en même temps (ApMV, PDV et PNRSV). Les tests sérologiques ont montré également que sept (7) échantillons testés étaient négatifs (Tableau 34). On note que la règle prise pour déclarer qu'un échantillon est positif, il faut que la valeur d'absorbance (Densité optique : DO) soit égale ou supérieure à trois fois la DO des témoins négatifs.

3.7.1 - Détection synchronique des Ilarvirus par hybridation moléculaire

Les mêmes échantillons testés par DAS-ELISA ont été par la suite analysés par hybridation moléculaire. A cet effet, les extraits totaux de RNA ont été appliqués sur des membranes de nitrocellulose (3 répétitions pour chaque échantillon) et détectés séparément par des sondes spécifiques marquées à la digoxigénine (Photo 12-A, B et C).

Les analyses par hybridation moléculaire, ont détecté 1 seul échantillon infecté par l'ApMV, 2 avec le PDV et 3 par le PNRSV. Deux (2) échantillons étaient doublement infectés par l'ApMV et PDV, 2 échantillons infectés par l'ApMV et le PNRSV et 3 échantillons ont donné un signal positif sur les membranes hybridées par les sondes spécifiques du PDV et du PNRSV respectivement. 1 échantillon a résulté infecté par les trois virus en même temps (ApMV, PDV et PNRSV); et enfin, 6 échantillons étaient négatifs par hybridation moléculaire (Tableau 34).

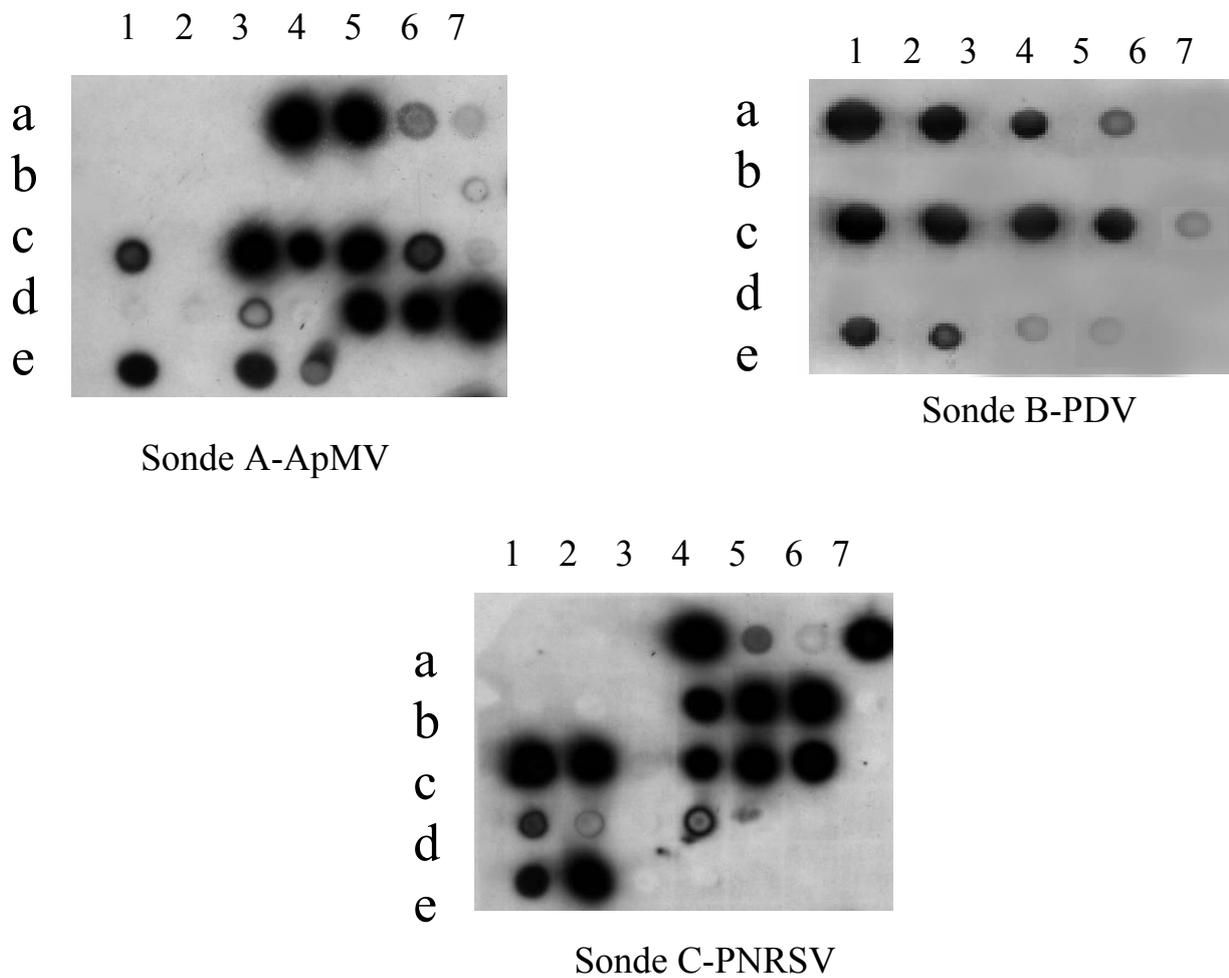


Photo 12. Hybridation moléculaire de 21 échantillons de rosacées fruitières de la région d'étude. A- première répétition de la membrane hybridée avec la sonde d'ApMV, B- seconde répétition hybridée avec la sonde spécifique du PDV et C - troisième répétition de la membrane hybridée avec la sonde spécifique du PNRSV marquée à la digoxigénine.

3.7.2 - Détection synchronique par multiplex RT-PCR

Les mêmes extraits totaux de RNA testés par hybridation moléculaire ont été amplifiés par PCR en utilisant un cocktail d'amorces. Pour les trois Iarvirus testés ApMV, PNRSV et PDV, des bandes assez claires sont observées sur le gel de polyacrylamide représentant les séquences cibles (417, 356 et 517bp, respectivement) dans les différents isolats analysés.

En tenant compte de cette variabilité, 2 échantillons des 21 analysés ont été trouvés infectés individuellement par l'ApMV, 5 par le PDV et 5 par le PNRSV (Tableau 34). Des infections doubles ont été également rencontrés (2 pour l'ApMV et le PDV, 3 pour l'ApMV et le PNRSV et aucun (0) échantillon n'a été rencontré infecté par le PDV et le PNRSV ensemble). En fin, dans 3 échantillons, les trois ilarvirus ont été détectés ensemble et un seul échantillon a résulté négatif, totalement sain (Tableau 35).

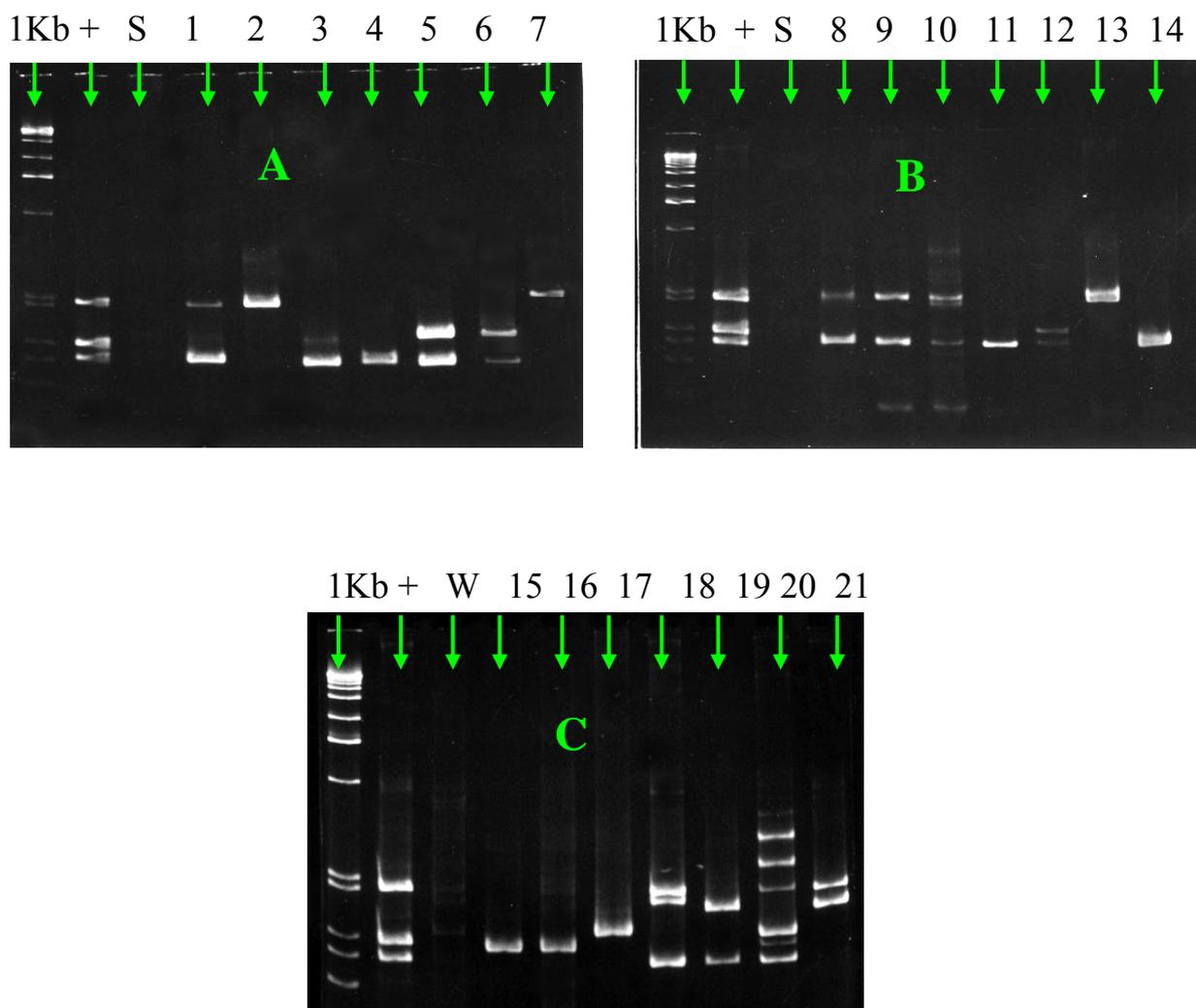


Photo 13. Détection synchronique des virus par RT-PCR dans 21 échantillons de prunus cultivés sur gel de polyacrylamide 5% (gel A, B et C). 1Kb est le marqueur. + sont les témoins sains. W est l'eau stérile des réactions RT-PCR.

3.7.3- Comparaison des résultats des trois techniques :

Les analyses comparatives des différentes techniques utilisées montraient que si les résultats obtenus DAS-ELISA et par hybridation moléculaire étaient sensiblement identiques, en revanche ceux obtenus par RT-PCR, étaient fortement consistants.

En effet, le nombre d'échantillons infectés, détectés par DAS ELISA et par MH égalait 14 échantillons positifs pour l'un des trois virus individuellement ou par des infections mixtes et triple. Alors que par RT-PCR, 20 échantillons négatifs sur les 21 échantillons testés, c'est-à-dire un seul échantillon s'est avéré négatif. Largement inférieur aux sept et six avérés négatifs avec la DAS-ELISA et la MH, respectivement.

On constate qu'aucune infection mixte par le PNRSV et le PDV n'a été détectée par RT-PCR, ceci s'explique par la détection des trois virus ensemble dans les deux échantillons qui se sont avérés infectés par ces deux virus lors de l'analyse par DAS-ELISA et MH. Egalement, on note que le nombre d'échantillon infecté individuellement par le PNRSV et le PDV était largement supérieur avec la RT-PCR qu'avec les deux autres techniques.

De ces résultats, ressort et se confirme, la très grande sensibilité des techniques moléculaires sur les réactions immuno-enzymatiques.

Tableau 34: Récapitulatif des résultats d'analyse obtenus par les trois techniques utilisées

Infections	ELISA	MH	RT-PCR
ApMV	2	1	2
PDV	2	2	5
PNRSV	2	3	5
ApMV + PDV	2	2	2
PNRSV + PDV	2	2	0
ApMV + PNRSV	3	3	3
ApMV + PDV + PNRSV	1	1	3
Sains	7	6	1
Total	21	21	21

3.7.4 - Perspectives d'application

Des méthodes sérologiques (ELISA) ont été utilisées pour la détection des Ilarvirus sur de grandes quantités d'échantillons, mais celles-ci souffraient de quelques limites importantes (sensibilité, spécificité des anticorps, temps, etc.). D'autres techniques ont été introduites pour la détection des ilarvirus; elles sont plus sensibles, fiables et économiques. Jusqu'à présent ces méthodes n'ont pas trouvées une voie dans l'utilisation commerciale. La détection simultanée par RT-PCR du PNRSV et du PPV, a été appliquée avec succès comme rapporté par Kolber *et al.*, (1997), aussi l'ApMV et le PNRSV par Immuno Capture-PCR (Candresse *et al.*, 1997).

Par PCR on était capable de détecter et d'amplifier simultanément les trois ilarvirus dans les tissus frais. La haute sensibilité de la multiplexe PCR pour la détection des ilarvirus affectant les rosacées fruitières comparativement à l'hybridation moléculaire rend cette technique proposable pour le screening des ilarvirus des rosacées fruitières habituellement réalisé par des tests sérologiques (ELISA) qui donnaient des résultats erratiques (Uyemoto *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1992).

Les sondes non radioactives utilisées dans l'hybridation moléculaire en vue de la détection des infections naturelles des rosacées fruitières à noyaux se sont révélées plus sensibles que les tests sérologiques (DAS-ELISA), confirmant ainsi, les données déjà rapportées dans le cas de la détection sérologique et moléculaire du PNRSV (Sánchez-Navarro *et al.*, 1998), et également, la possibilité d'une détection simultanée par hybridation moléculaire non isotopique pour plusieurs virus à la fois (Sánchez-Navarro *et al.*, 1999).

Les résultats obtenus montrent que l'amplification simultanée par RT-PCR est réalisée avec succès sur les *Prunus* à noyaux infectées naturellement sous des conditions de champs et montrent également la forte sensibilité de la PCR lorsqu'elle est comparée à l'ELISA et à l'hybridation moléculaire. Les échantillons qui donnaient des signaux négatifs avec l'ELISA ont pu donner des bandes correspondant à un ou plus des trois Ilarvirus dans le cas de l'hybridation moléculaire.

Tableau 35 : Comparaison des résultats obtenus par des tests sérologiques et moléculaires (ELISA, hybridation moléculaire et RT-PCR)

N°	Espèce	Variété	Localisation	ApMV			PDV			PNRSV		
				ELISA	MH	RT-PCR	ELISA	MH	RT-PCR	ELISA	MH	RT-PCR
1	Abricotier	Bullida	FP Chakchoukh	-	-	++	++	++	++	++	++	++
2	Abricotier	Bullida	Amine	-	-	-	-	-	-	++	++	++
3	Abricotier	Luizet	Bordj Laassa	++	++	++	++	++	++	-	-	-
4	Abricotier	Roussillon	FP Grarem	++	++	++	++	++	++	-	-	-
5	Amandier	Franc Amer	P. Bousselam	-	-	-	-	-	-	-	-	++
6	Amandier	Marcona	FP Grarem	-	-	-	-	-	-	-	-	++
7	Cerisier	B. Hedelfinen	FP Chakchoukh	++	-	++	-	-	-	-	-	-
8	Cerisier	Guillaume	FP Chakchoukh	-	-	-	++	++	++	-	-	-
9	Cerisier	Burlat	FP Athmania	++	++	++	++	++	++	++	++	++
10	Cerisier	Napoléon	P. Latreche	-	-	-	-	-	-	++	++	++
11	Cerisier	Burlat	FP Grarem	-	-	-	++	++	++	-	-	-
12	Merisier	Ste Lucie	P. Latreche	++	++	++	-	-	-	-	-	-
13	Myrobolan	Franc	P. Bousselam	++	++	++	-	-	-	++	++	++
14	Pêcher	GH Hall	P. Bousselam	-	-	-	-	-	++	-	-	-
15	Pêcher	Spring Rest	FP Athmania	++	++	++	-	-	-	++	++	++
16	Pêcher	My Crest	FP Athmania	++	++	++	-	-	-	++	++	++
17	Pêcher	DiXi red	Belaamri	-	-	-	-	-	++	-	-	-
18	Prunier	Methley	Amine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Prunier	G. Japon	Amine	-	-	++	++	++	++	++	++	++
20	Prunier	Stanley	FP Grarem	-	-	-	-	-	++	-	++	-
21	Prunier	Stanley	Khelifa	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Totaux				8	7	10	7	7	10	8	9	12

Conclusion générale

L'étude de l'état sanitaire des rosacées fruitières en matière d'infection par les agents phytopathogènes transmissibles à travers le matériel végétal de propagation constitue un préalable pour l'établissement de tout programme de production et de certification des plants arboricoles indemnes.

Le présent travail, trouve son importance dans cet ordre d'idée du moment qu'il constitue la première et la plus importante étude menée en Algérie, vu son impact et son étendue, qui s'intéresse à l'évaluation phytosanitaire de la fréquence des maladies virales et de type viral dans les rosacées fruitières à noyaux.

L'étude a été menée à travers un échantillonnage entrepris en 2004 et terminé en 2008, soldé par la collecte de 967 échantillons pour la détection sérologique et moléculaire des virus et 1128 échantillons pour les analyses moléculaires, en vue du diagnostic des viroïdes.

L'échantillonnage a concerné 37 vergers commerciaux totalisant 519 échantillons, 11 pépinières avec 184 échantillons et 9 parcs à bois et collections variétales avec 264 échantillons, réparties en trois étages bioclimatiques de six wilayas de l'Est Algérien.

Les analyses sérologiques et moléculaires ont montré la présence dans la région de l'étude, des principaux virus et viroïdes inféodés aux rosacées fruitières à noyaux dans le monde, confirmant par là des signalisations antérieures en Algérie, du PNRSV, PDV, ApMV et du PLMVd. En revanche l'étude, fait référence à la première détection en Algérie du PPV, CVA et du HSVd. Par ailleurs, l'étude a montré également l'absence dans la région de l'étude des virus suivants : le PBNPaV, CGRMV, ApLV et l'ACLSV, malgré que ce dernier a été détecté auparavant en Algérie.

Le niveau général d'infection rencontré par les principaux virus dans la région d'étude a été égal à 17,58 % alors que celui des viroïdes est de l'ordre de 5,59 %. Si le niveau d'infection par les virus apparaît préoccupant, nécessitant une prise en charge réelle de ce problème phytosanitaire ; celui des viroïdes, apparaît légèrement faible, mais nécessite comme même une vigilance à travers le contrôle continu en vue de limiter les risques de leur propagation et de dissémination par le matériel végétal de multiplication.

Les résultats d'analyse donnent les membres du genre des *Ilarvirus* (ApMV, PDV et PNRSV), comme étant les virus les plus fréquents dans les prunus cultivés en Algérie avec une prédominance pour le PNRSV avec un taux d'infection de l'ordre 13,65%. Alors que le reste des virus détectés (PPV, CVA) sont moins fréquents que les premiers, mais la détection particulière du PPV, constitue un danger important pour l'arboriculture algérienne.

La présence de ces agents pathogènes au niveau des arbres fruitiers, cause une large gamme de maladies et de désordres et affectent ainsi les sujets malades dans leur croissance et réduisent leur production. Leur fréquence dans les espèces fruitières varie selon plusieurs facteurs : espèce, variété cultivée, système de conduite et conditions environnementales.

En plus des virus, d'autres agents transmis par le matériel végétal de propagation, ont été détectés en Algérie à savoir le PLMVd et HSVd à des taux d'infection moyen de l'ordre de 3,19 % et 3,63 % respectivement. Alors que le niveau général d'infection par les deux viroïdes ensemble est égal à 5,59 %. On peut le qualifier comme faible comparativement aux niveaux d'infection enregistrés dans les pays du pourtour méditerranéen.

L'étude a montré que toutes les espèces de *Prunus* cultivées sont sensibles aux principaux virus et viroïdes connus, quelque soit le système de conduite (pépinières, parcs à bois et vergers commerciaux). Le danger de cette sensibilité réside dans les taux d'infection des parcs à bois anormalement élevés, qui constituent ainsi un réservoir de multiplication des espèces puisque chaque plant malade, est l'origine de milliers de plants pépinières et de futurs vergers commerciaux.

Si tous les systèmes de conduite des *Prunus* sont sensibles aux infections virales et à viroïdes, on note comme même, des différences dans les taux d'infection individuels des espèces. Les résultats obtenus donnent des taux d'infection plus au moins proches qui varient entre 15,99% enregistré dans le cas des vergers commerciaux, et les 19,57% enregistré dans les cas des pépinières alors que les parcs à bois étaient infectés à un taux de l'ordre de 19,32%.

On s'est intéressé également à l'influence des conditions climatiques liées surtout aux variations de températures sur la fréquence des virus et des viroïdes, nous avons remarqué que ces dernières semblent n'avoir aucune action directe sur la présence ou l'absence des virus mais beaucoup plus leur influence se fait sentir sur l'augmentation et la réduction de la concentration virale dans l'arbre infecté. Nous avons enregistré des différences en fonction de l'étage bioclimatique, il en ressort que l'étage bioclimatique semi aride été le plus infecté avec 25,21%, suivi par l'étage sub-humide 15,97% et enfin l'étage le moins infecté en l'occurrence l'aride avec 10,55%.

D'une manière générale, les conditions climatiques interviennent et régissent l'apparition des symptômes, et de ce fait, nous oblige à intervenir tôt juste au démarrage végétatif pour la recherche d'éventuels symptômes et pour la collecte d'échantillons.

Non seulement, il faut aller le plus tôt que possible pour l'observation des symptômes et le prélèvement des échantillons, mais également, il faut procéder aux analyses sérologiques et moléculaires aussitôt que possible, car la conservation même à -20°C des échantillons, agit

beaucoup sur la concentration virale et peut parfois fausser complètement les résultats d'analyse.

Indépendamment des systèmes de conduites et des étages bioclimatiques, la sensibilité des prunus aux virus et viroïdes varie beaucoup selon l'espèce et selon la variété. En effet, les variétés porte-greffes, avec un taux d'infection égal à 21,88 %, apparaissent plus infectées que les variétés cultivées qui ne sont infectées qu'à hauteur de 17,11 %. Concernant la sensibilité des différentes espèces de prunus aux virus étudiés, il ressort que le pêcher avec un taux d'infection de l'ordre de 27,14%, apparaît comme l'espèce la plus infectée, alors que l'amandier avec un taux de 8,26% se présente comme le moins infecté.

L'établissement d'un programme de certification des plants arboricoles en Algérie, nécessite au préalable une connaissance parfaite de l'état sanitaire des différentes espèces et variétés de *Prunus* cultivées surtout tout ce qui a trait aux agents phytopathogènes transmissibles par le matériel végétal de propagation. Le but est d'arriver à sélectionner des clones et des cultivars à partir des vergers, intéressants pour nos agriculteurs et qui s'adaptent aux différentes caractéristiques pédoclimatiques, afin de constituer un matériel de base qui sert à par la suite à la production et la distribution de plants certifiés sur le plan sanitaire et phytotechnique.

La constitution de ce matériel de base, nous amène à analyser un nombre d'échantillons très élevé, à travers des méthodes de diagnostic simple, facile, fiable et moins coûteuse; ceci nous a poussé à comparer différentes méthodes de diagnostic sérologiques et moléculaires afin de tester leur applicabilité sur des diagnostics de masse.

A cet effet, la détection simultanée de l'ApMV, PDV et PNRSV a été menée avec succès en utilisant une mixture d'amorces en hybridation moléculaire et en RT-PCR. La détection simultanée par hybridation moléculaire a été simplifiée en utilisant des extraits bruts obtenus par une extraction non organique. Il en ressort que la détection moléculaire simultanée des trois ilarvirus est très pratique et possède tous les avantages pour être incluse dans les procédures de diagnostic de masse.

Perspectives et Recommandations

A la lumière des conclusions tirées de cette étude préliminaire, qui n'a certes concerné qu'une partie de l'Algérie, d'ailleurs nous pousse à suggérer son élargissement vers les autres régions et zones arboricoles de l'Algérie, afin d'arriver à avoir une idée globale. Ceci réalisé, trouve son importance et son utilité dans l'orientation des diagnostics et des virus qu'on doit cibler, ce qui nous fait gagner beaucoup de temps et d'argent.

Une fois le travail préliminaire accompli, nous suggérons de passer à une étape plus approfondie qui concerne la caractérisation des isolats algériens des virus détectés, qui peuvent avoir des différences non seulement sur le plan adaptation mais également sur le plan génétique, se traduisant par des comportement plus virulents. Les virus et les viroïdes sont des entités pathogènes, très labiles, changent beaucoup, et ce qui est considéré comme caractère stable dans une région, est très variable dans une autre région ; de ce fait, les études de caractérisations des virus et isolats s'imposent avec acuité en Algérie.

L'établissement d'un programme national de certification semble être une demande très raisonnable et fortement désirable sous ces conditions et doit être entamé dès que possible pour minimiser les risques de dissémination des virus spécialement le PPV. Les mouvements du matériel de propagation à l'intérieur du pays doivent être contrôlé par un service de certification, et l'application d'un strict règlement de quarantaine pour les futures importations.

Il ne suffit pas de produire et de commercialiser des plants sains pour être à l'abri des maladies virales et de type viral, mais, il faut veiller à maintenir ce matériel végétal sain à travers la multiplication des contrôles et des inspections, et également à travers l'étude de l'épidémiologie des différents virus et viroïdes, surtout qui sont transmis par des vecteurs biologiques actifs comme dans le cas du complexe PPV- pucerons.

Références Bibliographiques

Abbadi, H. (2002). Identification of *Apricot latent virus* (ApLV) in Palestine and survey for the presence of ApLV and *American plum line pattern virus* (APLPV) in southern Italy. Collection Master of Science. n.259. Mediterranean Agronomic Institute of Bari.41p.

Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Mahboubi, M., Di Terlizzi, B., Sabanadzovic, S., Savino, V., Uyemoto J.K., Martelli G.P. (2001). Molecular detection of a *closterovirus* associated with *apricot stem pitting* in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, **83** (2): 125-132.

Acuña, R. (1993). Outbreaks of plum pox virus in Chile. In: *Abstracts of Conference on plum pox*. Bordeaux, Oct. 1993, pp. 77.

Adamolle, C., Quiot, L., Bousalem, M., Boeglin, M. and Quiot, J.B. (1994). Le point sur l'utilisation de sérums anti-protéines non structurales pour l'étude de la Sharka. *EPPO Bulletin*, **24**: 657-668.

Al Rwahinh, M., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and D, Boscia. (2000). First record of plum pox virus in Jordan. *Journal of Plant Pathology*, **3**: 243.

Al Rwahnih, M., Myrta, A., Abou-Ghanem, N., Di Terlizzi, B. and Savino, V. (2001). Viruses and viroids of stone fruits in Jordan. *EPPO Bulletin*, **31**: 95-98.

Al Rwahnih, M. (2003). *Studies on the variability of apple chlorotic leaf spot virus*. PhD Thesis, University of Bari (Italy). 62p.

Albanese, G., Giunchedi, L., La Rosa, R. and Poggi-Pollini, C. (1992). Peach latent mosaic viroid in Italy. *Acta Horticulturae*, **309**: 331-338.

Amari, K., Cañizares, M.C., Myrta, A., Sabanadzovic, S., Srhir, M., Gavriel, I., Caglayan, K., Varveri, C., Gatt, M., Di Terlizzi, B. and V. Pallás. (2000). First report on *Hop stunt viroid* (HSVd) from some Mediterranean countries. *Phytopathologia Mediterranea*, **39**: 271-276.

Amari, K., Cañizares, M.C., Myrta, A., Sabanadzovic, Di Terlizzi, B. and Pallás, V. (2001a). Tracking Hop stunt viroid infection in apricot trees during a whole year by non-isotopic tissue printing hybridisation. *Acta Horticulturae*, **550**: 315-320.

Amari, K., Gomez, G., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Pallás, V. (2001b). The molecular characterization of 16 new sequence variants of *Hop stunt viroid* reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *Journal of General Virology*, **82**: 953-962.

Ambrós, S., Desvignes, J.C., Llácer G. and Flores, R. (1995). Peach latent mosaic and pear blister canker viroids: detection by molecular hybridization and relationships with specific maladies affecting peach and pear trees. *Acta Horticulturae*, **386**: 515-521.

Ambrós, S., Hernández, C., Desvignes, J.C. and Flores, R. (1998). Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the

existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. *Journal of Virology*, **72**: 7397-7406.

Ambrós, S., Hernández, C., and Flores, R. (1999). Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroids in its natural host. *Journal of General Virology*, **80**: 2239-2252.

Amenduni T., Minafra A., Savino V. (2003). Detection of Plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNPaV) from different stone fruit species and optimization of diagnostic tools. In: Proceedings of the 19th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, July 21-25, Valencia, Spain (abstracts).

Amenduni T., Hobeika C., Minafra A., Boscia D., Castellano, M.A., Savino V. (2005). Plum bark necrosis stem pitting-associated virus in different stone fruit species in Italy. *Journal of Plant Pathology* **87**: 131-134.

Anonyme, (1998). Statistiques agricoles. Ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR). Alger, 1998

Anonyme, (2002). Statistiques agricoles. Ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR). Alger, 2002.

Anonyme, (2005). FaoStat. Food and Agriculture Organisation. Statistiques agricoles. Roma, Italy.

Anonyme, (2005). Statistiques agricoles. Ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR). Alger, 2005.

Anonyme, (2007). Statistiques agricoles. Ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR). Alger, 2007.

Anonyme, (2008). Données météorologiques. Office national de météorologie. Station Ain Sfiha, Sétif.

Aouane. B. (2001). State of the art for the certification in the Mediterranean – country reports : Algeria. In: **Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V.** Production and exchange of virus-free plant propagating material in the Mediterranean region.(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **35**. Pp. 67-74.

Aouane B., (2003). Preliminary studies on stone fruit tree viruses in Algeria: In: Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region.*(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **45**, Pp. 29-32.

Aparicio F., Sánchez-Pina M.A., Sánchez-Navarro J.A., Pallás, V. (1999). Location of prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) within pollen grains from infected nectarine tree by *in situ* hybridisation. *European Journal of Plant Pathology*. **115**:2, 247.

Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A., Olsthoorn, R.C.L., Pallás, V. and Bol, J.F. (2001). Recognition of *cis*-acting sequences in RNA 3 of *Prunus necrotic ringspot virus* by the replicase of *Alfalfa mosaic virus*. *Journal of General Virology*, **82**: 947-951.

Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T. and Pallás, V. (1996). Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology*, **102**: 837-846.

Atanasoff, D., 1935. Plum Pox a new virus disease. Year book University of Sofia, faculty of Agriculture, **11**: 49-69.

Audergon, J.M., Dosba, F., Karayiannis, I. And Dicenta, F. (1994). Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la Sharka. *EPPO Bulletin*, **24**: 741-748.

Badenes, M.L. and LIácer, G. (1998). Occurrence of peach latent mosaic viroid in American peach and nectarine cultivars in Valencia, Spain. *Acta Horticulturae*, **472** (2): 565-570.

Barba, M. and Faggioli, F. (1999). I viroidi agenti causali di malattie degenerative dei fruttiferi. *Rivista di Frutticoltura*, **2**: 69-73.

Barba, M., Cupidi, A., Loretti, S., Faggioli, F., Martino, L. (1995). *In vitro* micrografting: a technique to eliminate *peach latent mosaic viroid* from peach. *Acta Horticulturae*, **386**: 531-535.

Barbara, D.J. (1988). Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV). *In: European Handbook of Plant Diseases I. M. Smith et al., (eds.)*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 17-19.

Bernhard, R., Saunier, R. and C Marenaud (1975). Evolution et performance d'un clone sanitaire de pêcher issu de thérapie après huit années d'observation. *Acta Horticulturae*, **44** : 69-79.

Beaudry, D., F. Bussière, F. Lareau, C. Lessard and J.P. Perreault. (1995). The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Research*, 1995, Vol. 23, No. 5: 745-752

Beraud, J. (2001). Le technicien d'analyse biologique : guide théorique et pratique. Ed. TEC-DOC, Paris, New York. P. 92.

Bhardwaj, S.V., Kohosla, K., Sharma, D.R. and Thakur, P.D. (1995). Detection of plum pox virus in India. *Acta Horticulturae*, **386**: 237-241.

Bol, J.F., van Vloten-Doting, L. and Jaspars, E.M.J. (1971). A functional equivalence of top component a RNA and coat protein in the initiation of infection by alfalfa mosaic virus. *Virology*, **46**: 73-85.

Boscia D., Myrta A., (1998). Serological detection of viruses included in certification protocols for stone fruits. *Options méditerranéennes*, Série B N°19. Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean: problems and prospects.

Boscia, D., Zeramardini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M.T., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. (1997). Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, **103**: 477-480.

Bouani, A. (2004). Etat sanitaire des essences fruitières à noyau au Maroc. Collection Master of Science. n. . Mediterranean Agronomic Institute of Bari. 32 p.

Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Perez, E., Camarasa, E., Garcia, J.A., Moya, J.J., Lopez-Abella, D., Vella, C. and Sanz, A. (1994). Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *EPPO Bulletin*, **24**: 569-577.

Cambra M., Olmos A., Asensio M., Esteban O., Gorris M.T., Candresse T. and Boscia D. (1997). Detection and typing of prunus viruses in plant tissues and in vectors by print and spot-capture PCR, Heminested-PCR and PCR-ELISA. *Acta Horticulturae*. **472**: 257-263.

Cambra, M., Olmos, A., Asensio, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Candresse, T. and Boscia, D. (1998). Detection and typing of Prunus viruses in plant tissues and in vectors by print and spot-capture PCR, heminested-PCR and PCR-ELISA. *Acta Horticulturae*, **472**: 257-263.

Cambra, M., Olmos, A. and Gorris, M.T. (2002). Protocol for the diagnosis of quarantine organism. *DIAGPRO Project of European Union* (SMT 4-CT98-2252).

Cameron, H.R. and Thompson, M. (1985). Seed transmission of apple mosaic virus in hazelnut. *Acta Horticulturae*, **193**: 131.

Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Wetzel, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J.B. and Dunez, J. (1994). Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *EPPO Bulletin*, **24**(3): 585-594.

Candresse, T., Lanneau, M., Revers, F., Grasseau, N., Macquaire, G., German, S., Malinovsky, T. and Dunez, J. (1995). An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Horticulturae*, **386**: 136-147.

Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Revers, F., Mcquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J.B. and Dunez, J. (1998a). Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology*, **88**: 198-204.

Candresse, T., Kofalvi, S.A., Lanneau, M. and Dunez, J. (1998b). A PCR-ELISA procedure for the simultaneous detection and identification of prunus necrotic ringspot (PNRSV) and apple mosaic (ApMV) ilarviruses. *Acta Horticulturae*, **472** (2): 219-226.

Cañizares, M.C., Marcos, J.F. and Pallás, V. (1998). Studies on the incidence of hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus armeniaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Horticulturae*, **472**(2): 581-585.

Cañizares, M., Marcos, J. and Pallás, V. (1999). Molecular characterization of an almond isolate of hop sunt viroid (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *European Journal of Plant Pathology*, **105**: 553-558.

- Cañizares, M.C., Aparicio, F., Amari, K. and Pallás, V. (2001).** Studies on the aetiology of Apricot “Viruela” Disease. *Acta Horticulturae*, **550**: 249-258.
- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P. and E. Refatti, (1998).** Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology*. **80** (3): 233-239.
- Casper, R. (1979).** Anwendung neuen serologischen Verfahrens (ELISA) zum Nachweis pflanzenpathogener Viren Mitteilungen aus der Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem, **191**: 191-209.
- Caudwell, A., Iarrue, J. and V. Tassart., (1994).** Caractères porteurs de la flavescence dorée chez les vignes porte-greffes en particulier le 3309C et le Fercal. *Agronomie*, **14** :83-94.
- Cervera, M.T., Riechmann, J.L., Martin, M.T. and Garcia, J.A. (1993).** 3'-Terminal sequence of the plum pox virus PS and $\delta 6$ isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology*, **74**: 329-334.
- Chairez, R., and R.M. Lister, (1973).** A comparison of two strains of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus. *Phytopathology*. **63**:1458-1464.
- Choueiri, E., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Khazzaka, K., Sabanadzovic, S., Di Terlizzi, B., Jreijiri, F. and Martelli, G.P. (2001).** First record of Peach latent mosaic viroid in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, **83**(2): 225-227.
- Choueiri, E., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Khazzaka, K., Sabanadzovic, S., S. El Zammar, and F. Jreijiri. (2003).** Viruses of stone fruit trees in Lebanon. In: Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region.*(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **45**, pp.25-27.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977).** Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, **34**: 475-483.
- Cochran L.C. and Hutchins L.M. (1941).** *Phytopathology* **31**: **860**.
- Converse, R.H. and Casper, R. (1975).** A member of the apple mosaic virus group occurring in *Rubus*. *Acta Horticulturae*, **44**: 63-64.
- Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Levy, L., Piazzolla, P. and Hadidi, A. (1995).** Plum pox virus in sweet cherry. *Acta Horticulturae*, **386**: 219-225.
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Boscia, D., Piazzolla, P. and Hadidi, A. (1997).** Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease*, **81**: 711-714.
- Cropley, R. (1968).** Synergism and interference between necrotic ringspot virus and prune dwarf virus in fruit trees. *Tagungsberichte*, **97**: 139-142.

- Crosslin J.M., Hammond R.W. and Hamerschlag F.A. (1992).** Detection of prunus necrotic ring spot virus in herbaceous hosts and *Prunus* hosts with a complementary RNA probes. *Plant Disease*. **76**: 1132-1136.
- Dal Zotto. A., S.F. Nom, J.A. Di Rienzo and D.M. Docampo., (1999).** Fluctuations of prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. *Plant Disease* **83**, 1055–1057
- Diener, T. O., Smith, D., Hammond, R., Albanese, G., La Rosa, R. and Davino, M. (1988).** Citrus B viroid identified as a strain of hop stunt viroid. *Plant Disease* **72**, 691-693.
- Delbos, R.P. and Dunez, J. (1988).** Apple chlorotic leaf spot virus. In: Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A., Philips, D.H. and Archer, S.A. (eds.), *European Handbook of Plant Disease*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 5-7.
- Desvignes, J.C., (1976).** The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF 305 indicator. *Acta Horticulturae*. **67**:315-323.
- Desvignes, J.C. (1980).** Different symptoms of the peach latent mosaic. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **15**: 183-190.
- Desvignes, J.C. (1981).** Epidémiologie de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd). In. 1^{er} Colloque Rech. Fruitières - Bordeaux, pp. 263.
- Desvignes, J.C. (1986).** Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. *Acta Horticulturae*, **193**: 51-57.
- Desvignes J.C., (1990).** Les Virus des Arbres Fruitières. *CTIFL*. Paris. 126 pp.
- Desvignes, J.C. (1999).** *Virus diseases of fruit trees*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. CTIFL, Paris.
- Desvignes, J.C. and Boye, R. (1989).** Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. *Acta Horticulturae*, **235**: 31-38.
- Desvigne. J.C., Pascal. G., Nathalie. G., Catherine. C et Isabelle. E., (1996).** Dommages provoqués par le Peach Latent Mosaic Viroid sur Pêcher. Cultures fruitières. Phytoma. La Défense des Végétaux. N **479**.
- Detienne, G., Delbos, R.P. and Dunez, J. (1980).** Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of an apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **15**: 39-45.
- Di Terlizzi, B., Murolo, O., Savino, V. and M. Digiario, (1992).** Viruses of peach, plum and apricot in Apulia. *Acta Horticulturae*. **309**, 367-372.
- Diekmann, N., and Putter, C.A.J. (1996).** *Stone Fruits*. FAO/IFGRI Technical Guidelines for the safe Movements of Germplasm **16**, pp 54.
- Diener, T. O., (1991).** Subviral pathogens of plants: viroid and viroid-like satellite RNAs. *FASEB Journal*, 2808-2813.

- Digiario M., Di Terlizzi B. and Savino V. (1990).** Ilarviruses and almond pollen. Proceeding of the 8th Mediterranean phytopathological Union. Agadir Morocco. 81-82.
- Digiario M., Di Terlizzi B. and Savino V. (1992).** Ilarvirus in apricot and plum pollen. *Acta Horticulturae*. **309**: 93-99.
- Doi, Y., M. Teranaka., K. Yora. and H. Asuyama. (1967).** Mycoplasma or PLT group like Microorganisms found in the phloem broom, aster yellows or Paulownia witches' broom. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **33** (4): 259-266.
- Dominguez, S., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, Pallás, Garcia-Brunton, J. and Cano, A. (1998).** Studies on the incidence of ilarviruses and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in apricot trees in the Murcia region (Spain) using serological and molecular hybridization methods. *Acta Horticulturae*, **472** (1): 203-210.
- Dunez J. (1986).** Primarily Observation on Virus and Virus-like Diseases of Stone Trees in the Mediterranean and Near East Countries. *FAO Plant Protection Bulletin*. **34**: 43-48.
- Dunez, J. (1987).** *Plum Pox Disease of Stone Fruit Trees*. Rome, Italy: FAO.
- Dunez J. (1988).** Situation of virus and virus like diseases of stone fruits in the Mediterranean and near east region. *In: Fruit crop sanitation in the Mediterranean and near east region*. 227-276.
- Dunez J. (1994).** Virus and MLO of fruit trees. Course of the International Centre for Mediterranean Agronomic Studies. *CIHEAM. IAM-Bari*. Italy. 198pp
- Dunez, J. and D. Susic, (1988).** Plum pox virus (PPV) *In: European Handbook of Plant Diseases* (I. M. Smith et al., ed) 44-46, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dunez, J., Marenaud, C. Delbos, R. and Lansac, M. (1972).** Variability of symptoms induced by the apple chlorotic leaf spot (CLSV). A type of CLSV probably responsible for bark split disease of prune trees. *Plant Disease Reporter*, **56**: 293-295.
- Faggioli, F. and Barba, M. (2001).** Le diagnosi del viroide del mosaico latente del pesco. *In: Atti POM A32-volume II*. Locorotondo 4-7 dicembre 2001, pp. 675-681.
- Faggioli, F., Loretto, S. And Barba, M. (1997).** Occurrence of peach latent mosaic viroid (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Disease*, **81**: 423.
- Flegg, C.L. and Clark, M.F. (1979).** The detection of Apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. *Annales of Applied Biology*, **91**: 61-65.
- Flores, R. and Liácer, G. (1988).** Isolation of a viroid-like RNA associated with peach latent mosaic disease. *Acta Horticulturae*, **235**: 325-332.
- Flores, R., Hernández, C., Garcia, S. and Liácer, G. (1990a).** Is apricot 'viruela' (pseudopox) induced by a viroid? *In: Proceedings of the 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Agadir*, pp. 453-455.

- Flores, R., Hernández, C., Desvignes, J.C. and Llácer, G. (1990b).** Some properties of the viroid inducing the peach latent mosaic disease. *Research in Virology*, **141**: 109-118.
- Flores, R., Hernández, C., Avinent, L., Hermoso, A., Llácer, G., Juárez, J., Arregui, J.M., Navarro, L. and Desvignes, J.C. (1992).** Studies on the detection, transmission and distribution of peach latent mosaic viroid in peach trees. *Acta Horticulturae*, **309**: 325-330.
- Flores, R., Hernández, C., Llácer, G., Shamloul, A.M., Giunchedi, L. and Hadidi, A. (2003).** In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. *Viroids*. CSIRO Publish., Collingwood, Australia, pp. 156-160.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M.J. and P. Gentit, (2001).** Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capilo and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (DOP RT-PCR). *Acta Horticulturae*, **550**: 37-43.
- Francki R.I.B., Milne R.G. and Hatta T. (1985).** Atlas of plant viruses. Boca Raton, Florida. CRC Press.
- Fridlund, P.R. (1970).** Temperature effects on virus disease symptoms in some *Prunus*, *Malus* and *Pyrus* cultivars. *Washington Agricultural Experiment Station Bulletin* 726.
- Fritzche R. and Kegler H. (1968).** Nematoden als vectoren von virus krankheiten der obstgehölze. *Tagungsber Dal DDR*. Germany. **97**: 289-295.
- Fulton, R.W. (1967).** Serology of viruses transmitted from cherry, plum, apple and rose. *Phytopathology*, **57**: 811.
- Fulton, R.W. (1968).** Serology of viruses causing cherry necrotic ringspot, plum line pattern, rose mosaic and apple mosaic. *Phytopathology*, **58**: 635-638.
- Fulton, R.W. (1970).** Prune dwarf virus. *C.M.I./AAB Descriptions of Plant Viruses*, 19.
- Garcia, J.A. and Riechmann, J.L. and Lain, S. (1989).** Proteolytic activity of the plum pox potyvirus protease in *Escherichia coli*. *Virology*, **170**: 362-369.
- Gentit, P., Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Peypelut, M., and T. Candresse, (2001).** Characterisation of two different apricot latent virus variants associated with *peach asteroid spot* and *peach sooty ringspot* diseases. *Archives of Virology*, **146**: 1453-464.
- Gilmer, R.M. and Way, R.D. (1976).** Pollen transmission of necrotic ringspot and prune dwarf viruses in sour cherry. *Phytopathology*, **50**: 624-625.
- Giove and Abis. S., (2007).** Place de la Méditerranée dans la production mondiale de fruits et légumes. Les notes d'analyse du CIHEAM N=°23. Paris. Pp 1-22
- Giunchedi, L. and Poggi Pollini, C. (1984).** Principali malattie da virus e virus-simili delle drupacee in Italia. *Informatore Fitopatologico*, **34**: 75-90.
- Giunchedi, L., Gentit, P., Nemchinov, L., Poggi-Pollini, C. and Hadidi, A. (1997).** Plum spotted fruit: a disease associated with peach latent mosaic viroid. *Acta Horticulturae*, **472** (2): 571-579.

Giunchedi, L., Poggi-Pollini, C., Gentit, P., Nemchinov, L. and A. Hadidi, (1998). Plum spotted fruit: a disease associated with peach latent mosaic viroid. *Acta Horticulturae*, **472**: 571-579.

Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Subr, Z., Kudela, O. and Quiot, J.B. (2002). A natural population of recombinant Plum pox virus is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 843-853.

Grasseau, N., Macquaire, G., Boyé, R., Cornaggia, D. and Desvignes, J.C. (1999). Peach red marbling and peach sooty ringspot, two new virus-like degenerative diseases of *Prunus*. *Plant Pathology*, **48**: 395-401.

Hadidi, A., Giunchedi, L., Osaki, H., Shamloul, A.M., Crescenzi, A., Gentit, P., Nemchinov, L., Piazzolla, P. and Kyriakopoulou, P.E. (2003). Peach latent mosaic viroid in temperate fruit hosts. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. *Viroids*. CSIRO Publish., Collingwood, Australia, pp. 161-164.

Hadidi, A., Giunchedi, L., Shamloul, A.M., Poggi Pollini, C. and Amer, A.M. (1997). Occurrence of peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Disease*, **81**: 154-158.

Hadidi, A., Khetarpal, R.K., Koganezawa, H. (1998). Plant Virus Disease Control. *APS Press*, St. Paul. 684 p.

Hadidi, A., Terai, Y., Powell, C.A., Scott, S.W., Desvignes, J.C., Ibrahim, L.M. and Levy, L. (1992). Enzymatic cDNA amplification of hop stunt viroid variants from naturally infected fruit crops. *Acta Horticulturae*, **309**: 339-344.

Halk E.L., Hsu H.I. and Franke L. (1984). Production of antibodies against three ilarviruses and alfalfa mosaic virus and their use in serotyping. *Phytopathology*. **74**: 367-372.

Hammond, R., Howell, W.E., Mink, G.I. and Crosslin, J.M. (1998). Strain-specific polymerase chain reaction assays for discrimination of prunus necrotic ringspot virus isolates. *Acta Horticulturae*, **472** (1): 235-242.

Hasimato, J and Koganezawa, H. (1987). Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar viroid. *Nucleic Acids Res.* **15**: 7045-7052.

Hernandez, C. and Flores, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3711-3715.

Heuss-La Rossa K., Hammond R., Crosslin J.M., Hazel C. and Hammerschlag F.A. (1995). Monitoring of prunus necrotic ringspot virus infection by hybridisation with cRNA probe after *in vitro* micrografting. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*. **120**: 928-931

Hirashima, K., Noguchi, Y., Ushijima, K. and Kusano, N. (1994). Diagnosis of plum dapple fruit disease by polyacrylamide gel electrophoresis and mechanical transmission. *Bull. Fukuoka. Agric. Res. Cent.*, B-**13**: 65-68.

- Howell, W.R., Skrzeczkowski, L., Pike, K.S., Eastwell, K.C. and Crosslin, J. (2003).** Non-transmission of Peach latent mosaic viroid by aphids, page 58. 19th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops. Valencia, Spain. July 21-25 (abstract).
- Ismaeil, F., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. (2001).** First record of Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid in Syria. *Journal of Plant Pathology*, **82** (2): 227.
- Ismaeil, F., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. (2003).** Viruses of stone fruit trees in Syria. In: Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region.*(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **45**, pp. 37-41.
- James D., Jelkmann W., (1998).** Detection of cherry virus A in Canada and Germany. XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops ISHS Acta Horticulturae **472**, 299-303.
- Jarrar, S., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and V. Savino, (2001).** Viruses of stone fruits in Palestine. *Acta Horticulturae*, **550** (1): 245-249.
- Jaspars, E.M.J. (1999).** Genome activation in alfamo- and ilarviruses. *Archives of Virology*, **144**: 843-863.
- Jawhar, J., Di Terlizzi, B., Khoury, W. and V. Savino, (1996).** Preliminary account of the phytosanitary status of stone fruit trees in Lebanon. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **26**, 161-166.
- Jelkmann W, 1995.** Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *Journal of General Virology* **76**, 2015- 2024.
- Jelkmann, W. and Kunze, L. (1995).** Plum pseudopox in German prune after infection with an isolate of apple chlorotic leaf spot virus causing plum line pattern. *Acta Horticulturae*, **386**: 122-125.
- Johansen, E., Edwards, M.C. and Hampton R.O. (1994).** Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 363-386.
- Jones, A.L. and Sutton, T.B. (1996b).** Sour cherry yellows. In: *Diseases of tree fruits in the East*. Michigan State University Publish, pp. 94.
- Joseph M., Zehr E., Bird G., Ritcher D., Uriu K. and Uyemoto J. 1995.** Compendium of Stone Fruit Diseases. *The American Phytopathology Society*. APS Press. 98pp.
- Juárez, J., Arregui, J.M., Camarasa, E., Cambra, M., Llácer, G., Ortega, C., Ortega, V., Navarro, L. (1988).** Recovery of virus-free peach trees from selected clones by shoot-tip grafting in vitro. *Acta Horticulturae*, **235**: 177-82.
- Kassanis, B. and Sutic, D. (1965).** Some results of recent investigations on sharka (plum pox) virus disease. *Zastita bilja*, **16**: 335-340.

Keese, P., Osorio-Keese, M.W., and Symons, R.H. (1987). Coconut tinangaja viroid; sequence homology with coconut cadang-cadang viroid and other potato spindle tuber related RNAs. *Virology*, **162**: 508-510.

Kegler, H. and Hartmann, W. (1998). Present status of controlling conventional strains of plum pox virus. In: Hadidi, A., Khetarpal, R.K. and Koganezawa, H. (eds.). *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 616-628 .

Kerlan, C., Mille, B. and Dunez, J. (1981). Immunosorbent electron microscopy for detecting apple chlorotic leaf spot and plum pox viruses. *Phytopathology*, **71**: 400-404.

Kirby, M. J., M. J. Kirby and A. and N. Adams, (2001). Occurrence of Cherry Virus A in the UK. New disease report. *Plant Pathology* (2001) **50**, 801

Kiriakopoulou, P.E., Giunchedi, L. and Hadidi, A. (2001). Peach latent mosaic and pome fruits viroids in natural infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implication on possible origin of these viroids in the Mediterranean region. *Journal of Plant Pathology*, **83** (1): 51-62.

Knapp, E., Da Càmara Machado, A., Pùhringer, H., Wang, Q., Hanzer, V., Weiss, H., Wiess, B., Katinger, H. and Laimer Da Càmara Machado, M. (1995). Localization of fruit tree viruses by immuno tissue printing in infected shoots of *Malus* and *Prunus* sp. *Journal of Virological Methods*, **55**: 157-173.

Kofalvi, S.A., Marcos, J.F., Cañizares, M.C., Pallás, V. and Candresse, T. (1997). Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: evidence for recombination between HSVd isolates. *Journal of General Virology*, **78**: 3177-3186.

Kolber M., Nemeth M., Krizbai L., Szemes M. and Kiss-Toth E. (1998). Detectability of prunus necrotic ringspot and plum pox virus by RT-PCR, ELISA and indexing on woody indicators. *Acta Horticulturae*. **472**: 243-247.

Komorowska B. and M. Cieślińska, (2004). First Report of *Cherry virus A* and *Little cherry virus-1* in Poland. *Plant disease*. **88**: 909.

Kryczynski. M.S., Szyndel. A., Stawiszynska. A and Anderszwroblewska. (1992). Detection of prunus ringspot virus by bioassay and IEM technique during the vegetation period of sour cherry trees. *Acta horticulturae* **309**, fruit tree virus diseases. Pp 99 – 104.

Kummert, J., Colinet, D. and Lepoivre, P. (1995). Detection of plant viruses by molecular hybridization using non-radioactive probes. *EPPO Bulletin*, **25**: 301-313.

Kunkel. L. O. (1936): Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of peach. *Phytopathology* **26**, 8U9-S30.

Kunze, L. (1988). Prune dwarf virus (PDV). In: Smith, I.M. *et al* (eds.). *European handbook of Plant Diseases*. Blackwell, Oxford, pp. 11-12.

Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J.B., Avinent, L. and Llácer, G. (1995). Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*, **386**: 207-218.

- Lain, S., Riechmann, J.L. and Garcia, J.A. (1989).** The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research*, **13**: 157-172.
- Lansac, M., Detienne, G., Bernhard, R. and Dunez, J. (1980).** Analysis of nine isolates of almond mosaic. *Acta Phytopathologica*, **15**: 1-4, 359-366.
- Leclant, F. (1973).** Aspect écologique de la transmission de la sharka (plum pox) dans le sud-est de la France. Mise en évidence de nouvelles espèces d'aphides vectrices. *Annales de Phytopathologie*, **5**: 431-439.
- Levy, I. and A. Hadidi, (1994).** Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR 3' non-coding region PCR analysis. *EPPO Bulletin*, **24**: 595-604
- Levy, L., Damstegt, V. and Welliver, R. (2000).** First report of *Plum pox virus* (Sharka Disease) in *Prunus Persica* in the United States. *Plant Disease*, **84** (2): 202.
- Lister, R.M. (1987).** Apple chlorotic leaf spot trichovirus. *Descriptions and Lists from the VIDE Database*.
- Little, A. and Rezaian, M.A. (2003).** Grapevine viroids. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. *Viroids*. CSIRO Publish., Collingwood, Australia, pp. 195-206.
- Lorenz, K.H., Dosba, F., Poggi Pollini, C., Llacer, G. and E. Semuller., (1994).** Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **101**, 567-575.
- Loretti, S., Faggioli, F. and Barba, M. (1995).** A rapid extraction method to detect peach latent mosaic viroid by molecular hybridization. *Acta Horticulturae*, **386**: 560-564.
- Loretti, S., Faggioli, F. Borrallé, R. and M. Barba, (1998).** Occurrence of viroid in temperate fruit trees in Italy. *Acta Horticulturae*. **472** (2), 561-564.
- Lovisol, O, (1994).** Risanamento de material affecto da virus. Quaderno, IAM Bari, CIHEAM, Italy.
- Lovisol, O., Colariccio, A and Masenga, V. (2000).** New experimental hosts and further information on citrus leprosis virus. Proceedings Conference IOCV, Riverside (US) **14**:164-173.
- Machado, M. (1998).** A broad-spectrum PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of plum pox isolates. *Acta Horticulturae*, **472** (2): 483-490.
- Malfitano, M., Di Serio, F., Covelli, L., Ragazzino, A., Hernández, C. and Flores, R. (2002).** Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico contain a characteristic insertion. In: *Absracts of XII International Congress of Virology* , Paris, July 27th-August 1st 2002.
- Malinowski, T., Cielinska, M., Zawadzka, B., Interewicz, B. and A Porebska, (1997).** Characterisation of monoclonal antibodies against apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and their application for detection of ACLSV and identification of its strain. *Phytopath. Polonica*, **14**: 35-40.

- Martelli, G. P., and W. Jelkmann, (1998).** Foveavirus, a new plant virus genus. *Archives of Virology*, **143/6**: 1245-1249.
- Martelli, G.P. and Savino, V. (1997).** Infectious diseases of almond with special reference to the Mediterranean area. *EPPO Bulletin*, **27**: 525-534.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., Yoshikawa, N. (2002).** Virology division news: The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, **147/10**: 2039-2044
- Martelli, G.P., Candresse, T. and Namba, S. (1994).** Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*, **134**: 451-455.
- Matic S., Al –Rwahnih M., Myrta A., 2005.** Occurrence of stone fruit viroids in Bosnia and Herzegovina. *Phytopatologia Méditerranée* **44**: 285 -290.
- Matthews R.E.F. (1991).** *Plant Virology. 3rd ed. Academic Press.* New York.
- Milbrath J.A. (1955).** Mechanical transmission of the virus responsible for sour cherry yellows, prune dwarf and peach stunt. *Phytopathology (Abstract)*. **49**: 545.
- Milne, R.G. (1993).** Electron microscopy of *in vitro* preparations. In: Matthews REF (eds.). *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 215-251.
- Mink G.I. (1980).** Identification of rugose mosaic-diseased cherry trees by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*. **64**: 691-694.
- Mink, G.I. (1992).** Ilarvirus vectors. *Advances in Disease Vector Research*, **9**: 261-281.
- Mink, G.I. (1995).** In: Kumar, J., Chaube, H.S., Singh, U.S. and Mukhopadhyay, A.N. (eds.). *Plant Diseases of International Importance*, 3. Diseases of Fruit Crops, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 335-356.
- Mink, G.I. and Aichele, M. D. (1984).** Detection of prunus necrotic ringspot and prune dwarf viruses in *Prunus* seed and seedlings by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, **68**: 378-381.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J.P., Candresse, T. and Poupet, A. (2000).** ELISA testing of shoots grown *in vitro* and the use of IC-RT-PCR improve the detection of Prunus necrotic ringspot virus in rose. *Phytopathology*, **90**: 522-528.
- Mumford, R.A., Perrin, A.S. and Danks, C. (2001).** The diagnosis of plum pox virus in the UK: from strain differentiation to on-site detection. *Acta Horticulturae*, **550**: 65-70.
- Murant, A.F., (1981).** Nepoviruses. In: Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, (Kurstak, E. Eds.).Elsevier, Amsterdam.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. (1998a).** Study on the transmission of plum pox potyvirus through seeds. *Phytopatologia Mediterranea*, **37**: 41-44.

- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. and Savino, V. (1998b).** Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica*, **42**: 248-250.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. and Boscia, D. (2000).** Properties of two monoclonal antibodies specific to the cherry strain of plum pox virus (PPV-C). *Journal of Plant Pathology*, **82**: 95-103.
- Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kölber, M., Németh, M., Di Terlizzi, B., Cambra, M. and Savino, V. (2001).** Existence of two serological subclusters of *Plum Pox Virus*, strain M. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 845-848.
- Myrta, A., Terlizzi, B.D., Savino, V., Martelli, G.P. (2002).** Sanitary status of the mediterranean stone fruit industry. *Acta Horticulturae*, **582**: 83-94
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. and Martelli, G.P. (2003a).** Virus diseases affecting the mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region.*(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **45**, pp. 15-23.
- Myrta, A., Potere O., Ismaeil F. and Boscia, D. (2003b).** PPV distribution on *Prunus*: experiences of diagnosis with ELISA. In: Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region.*(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **45**, pp. 15-23.
- Navarro, B. and Flores, R. (1997).** Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 11262-11267.
- Nemchinov, L. and Hadidi, A. (1996).** Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus, *Phytopathology*, **86**: 575-580.
- Nemchinov, L., and Hadidi, A. (1998).** Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup. *Journal of Virological Methods*, **70**: 231-234.
- Nemchinov, L. Shamloul, A. M., Zemtchik, E. Z., Verderevskaya, T. D., and A. Hadidi, (2000).** *Apricot latent virus*: a new species in the genus Foveavirus. *Archives of Virology*, **145** (9): 1801-1813.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., and Verderevskaya, T. (1994).** Plum pox virus in sour cherry: Confirmation of its identity by RT-PCR, cloning and nucleotide sequencing of the genomic 3' non-coding region. In: Int. Conf. Fund. Appl. Problems Phytovirol., Yalta, Crimea, Ukraine, pp. 11.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J.A. and Verderevskaya, T. (1995).** Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Horticulturae*, **386**: 51-62.

Nemchinov, L., Hadidi, A., Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T. and Damsteegt, V. (1996). Sour cherry strain of plum pox potyvirus (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology*, **86**: 1215-1221.

Németh, M. (1986). *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Németh, M. and M. Kölber (1980). GF 31, a reliable Myrobolan field indicator for rapid detection of plum pox virus; *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **15** (1-4): 207-212.

Nidá. S., Akel. M., Abdullah. A and Aydah. A., (2003). Seasonal variation of Prunus Necrotic Ringspot Virus Concentration In Almond, Peach, And Plum Cultivars. *Phytopathol. Mediterr.* **42**, 155–160

Nyland G., Gilmer R.M. and Moore J.D. (1974). Prunus ringpot group. En: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. U.S. Dep. Agricultural Handbbook. 437. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 104-132.

Nyland, G., Gilmer, R.M. and Moore, J.D. (1976). “ Prunus “ ringspot group. In: Gilmer, R.M., Moore, J.D., Nyland, G., Welsh, M.F. and Pine, T.S. (eds.). *Virus Diseases and Non-infectious Disorders of Stone Fruits in North America*. Agriculture Handbook No. **437**, USDA, Washington, DC, USA, pp. 104-132.

Ogawa I.M., Zehr E.I., Bird G.W., Ritchie D.F., Uriu K. and Uyemoto J.K. (1995). Compendium of stone fruit diseases. *APS press*. USA. 98pp.

Olmos, A., Bertolini, E. And Cambra, M. (2001). Simultaneous and Co-operational amplification (Co-PCR) for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, **106**: 51-59.

Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T. and M. Asensio, (1997). Simultaneous detection and typing of Plum Pox Potyvirus (PPV) isolates by Heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, **68**: 127-137.

Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. and Terrada, E. (1999). New device and method for capture, riverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, **27**: 1564-1565.

Olmos, A., Dasi, M.A., Candresse, T. and Cambra, M. (1996). Print capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research*, **24**: 2192-2193.

Osaki, H., Yamamuchi, Y., Sato, Y., Tomita, Y., Kawai, Y., Miyamoto, Y., and Ohtsu, Y. (1999). Peach latent mosaic viroid isolated from stone fruits in Japan. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, **65**: 3-8.

Pallás V., Más P. and Sánchez-Navarro J.A. (1997). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. In: *Plant virus protocols: from virus isolation to*

transgenic resistance. *Methods in Molecular Virology*. Humana Press, Totowa. **81**: 461-468.

Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A., Más, P., Cañizares, M.C., Aparicio, F. and Marcos, J.F. (1998). Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. In: Di Terlizzi, B., Myrta, A. and Savino, V. *Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean countries: problems and prospects* (eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **19**, pp. 191-207.

Pallás, V., Amari, K., Gomez, G., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. and Di Serio, F. (2003a). Viroids of stone fruits: Incidence and diseases in the Mediterranean. In: Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Savino, V. *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*.(eds.) Bari. Options Méditerranéennes Série B. n° **45**, pp. 129-133.

Pallás, V., Torres, H., Myrta, A. and Gomez, G., (2003b). Validation of the 'tissue-printing' technique for detecting stone fruit viroids. In: *Virus and Virus-like Diseases of Stone fruits, with Particular Reference to the Mediterranean Region*. Option Méditerranéennes, Sér. B/N° **45**, (A. Myrta, B. Di Terlizzi, V. Savino, ed.), Bari, Italy, 135-137.

Parakh, D.R., Shamloul, A.M., Hadidi, A., Scott, S.W., Waterworth, H.E., Howell, W.E. and Mink, G.I. (1995). Detection of *prune dwarf ilarvirus* from infected stone fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae*, **386**: 421-430.

Pasquini, G. And Barba, M. (1994). Serological characterization of Italian isolates of plum pox potyvirus. *EPPO Bulletin*, **24**: 615-624.

Pasquini, G. and Barba, M. (1997). Plum pox potyvirus strains: an overview . In: *Proceedings of the Middle European Meeting '96 on Plum Pox*. Budapest, 2nd-4th October 1996, pp. 168-171.

Pasquini, G., Faggioli, F., Pilotti, M., Lumia, V. and Barba, M. (1998). Characterization of apple chlorotic leaf spot virus isolates from Italy. *Acta Horticulturae*, **472**: 195-202.

Pelchat, M., Levesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., Levesque, S., Lehoux, J., Thompson, D. A., Eastwell, K.C., Skrzeczkowski, L.J. and Perreault, J.P. (2000). Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine North American peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure. *Virology*, **271**: 37-45.

Pennazio, S. and G.P. Martelli, (1983). Il punto sulla chemioterapia delle virosi delle piante. *DIF Piante*. **5**: 291-320.

Poggi Pollini C., Giunchedi L. and Vicchi V. (1983). Sulla frequenza dei virus che si trasmettono per polline in semenzali di alcune drupacee. *Informatore Fitopatologico*. **4**: 75-78.

Postman JD (1994). Elimination of viruses from clonal pear germplasm. *Acta Horticulturae*. **367**:72-75.

- Puchta, H. K. Ramm, R. Luckinger, Freimuller and H.L. Songer, (1989).** Nucleotide sequence of a hop stunt isolate from German grapevine rootstock 5BB as determined by PCR-mediated sequence analysis. *Nucleic Acid. Res.* **14**, 5841.
- Pusey P.L. and Yadava U.L. (1991).** Influence of Prunus ringspot virus on growth, productivity, and longevity of peach trees. *Plant Disease.* **75**: 847-851.
- Quadt R., Rosdorff H.J.M., Hunt T.W. and Jaspars E.M.J. (1991).** Analysis of the protein composition of alfalfa mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology.* **182**: 309-315.
- Ragozzino, E., Faggioli, F., Alioto, D. and Barba, M. (2003).** Detection and differentiation of *Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid* in stone fruit trees in Italy using multiplex RT-PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, XLII: 79-84.
- Rampitsch, C. and Eastwell, K.C. (1997).** The complete nucleotide sequence of prune dwarf ilarvirus RNA-1. *Archives of Virology*, **142**: 1911-1918.
- Randles, J.W., Rezaian, M.A., Hanold, D., Harding, R.M., Skrzeczkowski, L. and Whattam, M. (2003).** Viroids in Australasia. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. *Viroids*. CSIRO Publish., Collingwood, Australia, pp. 279-282.
- Ravelonandro, M and J. Dunez (1995).** Récents progrès dans la lutte contre la sharka des arbres fruitiers à noyaux. *Cahiers Agriculture*, **4** : 153- 161.
- Rosner A., Shibolet Y., Spiegel S., Krisbai L. and kolber M. (1998).** Evaluating the use of Immuno Capture and sap dilution PCR for the detection of PNRSV. *Acta Horticulturae.* **472**: 227-233.
- Rosner, A., Mallenin, L. and Spiegel, S. (1997).** The use of short and long PCR products for improved detection of prunus necrotic ring spot in woody plants. *Journal of Virological Methods*, **67**: 135-141.
- Rott, M.E. and W. Jelkmann, (2001).** Charecterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 411-420.
- Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D. and Golino, D.A. (1995).** Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, **85**: 347-352.
- Rowhani, A., Biardi, L., Routh, G., Daubert, S.D. and Golino, D.A. (1998).** Development of a sensitive colorimetric-PCR assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Disease*, **82**: 880-884.
- Roy, A.S. and Smith, I.M. (1994).** Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin*, **24**: 515-523.
- Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Pallas, V. (2000).** Simultaneous detection of the three ilarviruses

affecting some fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology*, **90**: 1330-1336.

Sánchez-Navarro J.A., Cano E. and Pallás V. (1996). Non-radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. *Plant Pathology*. **45**: 375-382.

Sanchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Rowhani, A. and Pallas, V. (1998). Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridisation and PCR for the detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus in herbaceous and Prunus Hosts. *Plant Pathology*, **47**: 780-786.

Sánchez-Navarro J.A., Cañizares M.C., Cano E.A. and Pallás V. (1999). Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridisation. *Journal of Virological Methods*. **124**: 49-55

Sano, T. (2003). Hop stunt viroid in plum and peach. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. *Viroids*. CSIRO Publish., Collingwood, Australia, pp. 165-167.

Sano, T., Hataya, T., Terai, Y. and Shikata, E. (1989). Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *Journal of General Virology*, **70**: 1311-1319.

Savino V. (1985). Virosi del mandorlo. *Italia Agricola*. **122** : 115-124.

Savino, V. (1990). Lotta ai virus e alle virosi delle drupacee. La Sharka in Puglia, diagnosi e lotta. Un caso concreto d'intervento. I virus e le virosi delle drupacee (con particolare riferimento alla Sharka). Sharka e vivaismo frutticolo in Puglia. pp.49- 60.

Savino, V. (1994). La lutte contre virus et les maladies à virus des essences à noyaux. Quaderno, CIHEAM, IAM Bari, Italy

Savino, V.; Martelli, G.P.; Terlizzi, B. di; Digiario, M.; Murolo, O.; Di Terlizzi, B.; Barba, M. . (1995). Eradication of sharka in Apulia: state of the art. XVIth International Symposium on fruit tree virus diseases, 27 June - 2 July, 1994, Rome, Italy. *Acta Horticulturae*. No **386**, 248-252; 5

Scott, G.E. (1981). Genetics of resistance in corn. In Gordan, D.T. et al. (1981). Virus and Virus like disease of maize in the United States. PP. 141-144.

Scott S.W., Barnett O.W. and Burrows P.M. (1989). Incidence of Prunus necrotic ringspot virus in selected peach orchards of South Carolina. *Plant Diseases*. **73**: 913-916.

Scott, S.W., Bowman-Vance, V. and Buchman, E.J. (1992). The use of nucleic acid probes for the detection of Prunus necrotic ringspot virus and prune dwarf virus. *Acta Horticulturae*, **309**: 79-83.

Seneviratne, S.N. and Posnette, A.F. (1970). Identification of viruses isolated from plum trees affected by decline, line pattern and ringspot diseases. *Annals of Applied Biology*, **65**: 115-125.

Sgro J.Y., Jacrot B. and Chroboczek J. (1986). Identification of regions of brome mosaic virus coat protein chemically cross-linked in situ to viral RNA. *European Journal of Biochemistry*. **154**: 69-76.

Shamloul, A. M., and Hadidi, A. (1999). Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization. *Journal of Virological Methods*, **80**: 145-155.

Shamloul, A.M., Minafra, A., Hadidi, A., Waterworth, H.E., Giunchedi, L. and Allam, E.K. (1995). Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequence of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Horticulturae*, **386**: 522-530.

Shiel, P.J. and Berger, P.H. (2000). The complete nucleotide sequence of apple mosaic virus (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to alfalfa mosaic virus than to other ilarviruses. *Journal of General Virology*, **81**: 273-278.

Singh, R.P., Ready, K.F.M. and Hadidi, A. (2003). Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S. *Viroids*. CSIRO Publish., Collingwood, Australia, pp. 255-264.

Smith I.M., Dunez J., Phillips D.H., Lelliot R.A. and Archer S.A. (1988). European handbook of plant diseases. *Blackwell Scientific Publication*. Oxford.

Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R. and Harris, K.M. (eds.) (1992). *Quarantine pests for Europe*. Data sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. CAB International, Wallingford, UK, and European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France.

Spiegel, S., E.A. Frison and R.H. Converse. (1993). Recent Developments in therapy and virus detection procedures for international movement of clonal plant germplasm. *Plant Dis.* **77**:1176-1180.

Spiegel, S., Scott, S.W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N.N. and Rosner, A. (1996). Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, **102**: 681-685.

Stasys, R.A., Dry, B.I., and Rezaian, M.A. (1995). The termini of a new citrus viroid contain duplications of central conserved regions from two viroid groups. *FEBS Letter*, **358**: 182-184.

Stussi-Garaud C., Garaud J.C., Berna A. and Godefroy-Colburn T. (1987). *In situ* location of an alfalfa mosaic virus non-structural protein in plant cell walls: correlation with virus transport. *Journal of General Virology*. **68**: 1779-1784.

Svanella-Dumas L., A. Marais, P. Gentit, J. Lamorte and T. Candresse (2005). First Report on the Natural Occurrence of *Cherry virus A* in Mirabelle Plum (*Prunus domestica* var. *insititia*). *Plant disease*. **89**: 433.

Terai, Y. (1985). Symptoms and graft transmission of plum dapple fruit disease. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, **51**: 363.

- Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M. and James, D. (2001).** First report of Plum pox potyvirus in Ontario, Canada. *Plant Disease*, **85** (1): 97.
- Torrance, L. and Dolby, C.A. (1984).** Sampling conditions for reliable detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. *Annals of Applied Biology*, **104**: 267-276.
- Torres, H., Gómez, G., Stamo, B., Shalaby, A., Aouane, B., Gavriel, I., Kominek, P., Caglayan, K., Sipahioglu, M., Michelutti, R., Myrta, A. and Pallás, V. (2004).** Detection by Tissue Printing of Stone Fruit Viroids, from Europe, the Mediterranean and North America. *Acta Horticulturae*. **657**: 379-383.
- Uyemoto J.K. and Scott S.W. (1992).** Important disease of Prunus caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*. **76**: 5-11.
- Uyemoto J.K., Luhn C.F., Asai W.K., Beede R., Bentel J.A. and Fenton R. (1989).** Incidence of ilarviruses in young peach trees in California. *Plant Disease*. **73**: 217-220.
- Uyemoto, J.K., Asai, W.K. and Luhn, F. (1992).** Ilarviruses: evidence for rapid spread and effects on vegetative growth and fruit yields of peach trees. *Plant Disease*, **76**: 71-74.
- Varveri C., Ravelonandro M. and Dunez J. (1987).** Construction and use of a cloned cDNA probe for the detection of plum pox virus in plants. *Phytopathology*. **77**: 1221-1224.
- Varveri, C., Barelett, A., Bidwell, D.E., Clark, D.E. and A.N. Adams (1998).** The detection of the viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*, **33**: 165-167.
- Verwoed et al. (1989).** A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*. **17**: 362.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R.P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A.E. and Dunez, J. (1991a).** Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology*, **72**: 1741-1746.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1991b).** A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, **33**: 355-365.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1992).** A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, **39**: 27-37.
- Worobey, M. and Holmes, E.C. (1999).** Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, **80**: 2535-2543.
- Yamamoto, Kagami, Kurokawa, Nishimura, Kubo, Inoue and Muryama, (1970).** *Mem. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **7**: 491, 1970. (AAB Description of Plant Viruses September 1988) No. 326.

Zagula, K. R., Aref N. M., and D.C. Ramsdell, (1989). Purification, serology, and some properties of a mechanically transmissible virus associated with green ring mottle disease in peach and cherry. *Phytopathology*, **79**: 451-456.

Zemtchik, E. Z., and T.D. Verderevskaya, (1993). Latent virus on apricot unknown under moldovian conditions. *Selskohozeaystvennaya Biologia (Russian Agricultural Biology)* **3**: 130-133.

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

Zhang, Y. P., Kirkpatrick, B. C., Smart, C.D., and J.K. Uyemoto, (1998). cDNA cloning and molecular characterisation of cherry green ring mottle virus. *Journal of General Virology*, **79**: 2275-2281.

Annexe 1

Tampons utilisés en DAS-ELISA

Tampon de lavage PBS - T pH 7.4 : Phosphate Buffer Saline –Tween

- Phosphate de sodium, dibasique anhydre ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$). 1.15g
- Chlorure de sodium (NaCl). 8g
- Phosphate de Potassium monobasique (anhydre) (KH_2PO_4). 0.2g
- Chlorure de potassium (KCl). 0.2g
- Tween-20. 0.5g

Tampon d'extraction pH 7.4 :

- PBS -T 1000 ml
- Sulfate de sodium (anhydre) (Na_2SO_4). 1.3g
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW24-40.000. 20g
- Sodium Azide (NaN_3). 0.2g
- Albumine grade II. 2g

Tampon de substrat pH 9.8:

- Eau distillée 800 ml
- Chlorure de Magnesium (MgCl_2). 0.1g
- Sodium Azide (NaN_3). 0.2g
- Diethanolamine. 97ml

Tampon de conjugaison pH 9.6:

- PBS - T 1000 ml
- Bovine Serum Albumin (BSA). 2g
- Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) MW24-40.000. 20g
- Sodium Azide (NaN_3). 0.2g

Tampon de sensibilisation pH 9.6 :

- d'eau distillée 1000 ml
- Carbonate de Sodium (anhydre) (Na_2CO_3). 1.59g
- Bicarbonate de Sodium (NaHCO_3). 2.93g
- Sodium Azide (NaN_3). 0.2g

Annexe 2

Tampons et solutions utilisées dans l'extraction des TNA

Tampon d'extraction

Guanidine thiocyanate	4.0 M
NaOAc pH	5.2 0.2 M
EDTA	25 mM
KOAc	1.0 M
PVP - MW24-40.000.	2.5%
Na ₂ S ₂ O ₅ (ajouté juste avant utilisation)	2%

Nal

Na ₂ SO ₃	0.75g
Eau distillée	40ml
Nal (Sigma SS379) MW 149.9	36g

Tampon de lavage

Tris-HCl	10.0 mM pH 2.0 avec HCl
EDTA	0.5 mM
NaCl	50.0 Mm
Ethanol	50%

Annexe 3

Produits utilisés dans la réaction de polymérisation en Chaîne (RT-PCR)

Solution de la Reverse Transcriptase pour la synthèse du cDNA (RT-PCR)

dNTP (nucléotides) 2,5 Mm	2,5 µl
DTT (DL- Ditiotreitolo) 100 mM	2,0 µl
Tampon (5X) Tris HCl, pH 8,3	10 µl
Enzyme (M- MLV- Reverse transcriptase)	0,7 µl
H ₂ O millipore	4,8 µl

Solution de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

dNTPs 10mM for each	1 µl
PCR buffer 10x	2.5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl
Upstream primers 10 mM	1 µl
Downstream primers 10 mM	1 µl
Taq DNA polymerase (Promega)	5 units
Water sterile to a final volume of 23 µl	
Then we add 2µl cDNA for each sample	

Annexe 4

Produits utilisés pour la préparation du gel Acrylamide (5%)

Réactifs

40% Acrylamide / Bis	1.3 ml
10X Tampon TBE	1 ml
Eau distillée	7.7 ml
10% APS*	150 µl

* APS: Ammonium persulfate

Coloration et développement du gel polyacrylamide

Solution de coloration par les nitrates d'Argent

AgNO ₃	100 mg
Solution 37% de Formaldéhyde	150 µl

Solution de développement (100 ml)

Carbonate de Sodium (Na ₂ CO ₃)	3.0 g
Solution 37% de Formaldéhyde	150 µl
Thiosulfate de Sodium	6 µl

Annexe 5

Tampons et solutions utilisés dans l'hybridation moléculaire

Tampon d'extraction (1X) pH 7.0

Tris-HCl pH 8.0	100mM
EDTA pH 7.0	50mM
NaCl	500mM
Métabisulfite de sodium	2 %

Tampon de dénaturation

Pour 5 ml

NaOH (100mM)	0.019g
EDTA (5mM)	50µl

SSC Solution (20X) pH 7.0

NaCl	3M
Na-Citrate pH 7.0	0.3M

Solution de Préhybridation

Pour 5 ml

Formamide (50 %)	2.5ml
SSC (20X)	1.5ml

Solution de blocage

Pour 1 ml

NaLS 10%	50µl
SDS 10 %	10µl

Solution de blocage Stock

Réactifs de blocage 10% (w/v) dans Tampon 1, autoclave et stocké à 4 °C

Tampon de lavage

Pour 1 litre

SSC (2X)	100 ml (SSC 20X)
SDS 0.1%	10 ml 10%

Annexe 6

Tampons utilisés dans la détection Chemiluminescente

Tampon 1 pH 7.5

Acide maléique	0.1M
NaCl pH 7.5	0.15M
(Ajusté avec NaOH et autoclavé)	

Tampon de lavage

Tampon 1
0.3 % Tween-20 (w/v)

Tampon 2

Tampon 1 (No Tween-20)	<u>Pour 50 ml</u> 45ml
Solution de blocage Stock	5ml

(1 % de la concentration finale de réactifs de blocage, Solution de blocage Stock diluée à raison 1:10 dans le Tampon 1)

Tampon 3

Tris-HCl	0.1mol/l
NaCl	0.1mol/l
MgCl ₂	50mmol/l pH 9.5

Solution de Substrat (CSPD)

CSPD	<u>Pour 1 ml</u> 10 µl
Tampon 3	1 ml

Evolution des superficies arboricoles en (ha) en Algérie durant la période 1995 – 2005

Espèces	Années										
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
ABRICOTS	13040	13460	13770	13680	13950	13390	13530	14660	16330	19375	22888
PRUNES	6520	6770	6250	5780	5800	5920	6090	6420	7340	7970	10002
PECHES	8500	9070	8800	9590	10000	9930	10840	10750	11500	12368	13619
CERISES	2510	2520	2320	2230	2270	2260	2270	2300	2360	2393	2385
AMANDES	24860	25190	27440	26490	26820	27150	26980	27720	30630	30453	35099
NEFLES	1890	1950	1850	1980	1940	1970	2120	2100	2210	2155	2378
POIRES	9930	9540	9300	10420	10470	10940	11550	11920	12340	14438	17218
POMMES	11930	12190	12260	12870	13020	13480	1404	15240	18080	19861	24279
GRENADES	2890	3270	3810	3890	3890	4220	4380	4810	5130	5858	6239
COINGS		520	500	500	520	560	570	620	660	1078	1344
CAROUBES	1250	1280	1270	1270	1240	1210	1160	1160	1140	1066	1048
AUTRES	4680	4240	4540	3930	4170	4090	4090	3730	3580	3387	3545
FIGUES	40110	36760	35980	34910	35730	36000	38070	3938	44030	45920	46592
NOYAUX ET PEPINS	88000	90000	92110	92630	94090	95120	97620	101430	111300	120402	140044
OLIVES	160780	165040	162840	165260	165600	168080	177220	190550	209730	226337	239352
AGRUMES	40280	38810	40240	41110	40780	41380	41680	42250	42942	43560	43995
DATTES	87020	96560	96520	97990	100120	101820	104390	120830	128800	136774	147906
VIGNOBLE	56580	55670	52030	51730	50650	51010	51450	54160	60465	62532	69633

(Anonyme, 2007)

Evolution des productions fruitières en (qx) en Algérie durant la période 1995 - 2005

Espèces	Années										
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
ABRICOTS	412330	800000	398500	581100	741400	563540	677240	737330	1084690	879910	1450965
PRUNES	253940	299610	242670	206660	253210	263530	248480	304220	325290	382310	462160
PECHES	386540	452910	386970	451530	609110	591400	576740	657670	739640	804620	950590
CERISES	52960	32110	33450	25960	38750	41680	30000	43760	25650	31550	30810
AMANDES	198690	335610	193960	216410	256020	264830	251990	322870	332340	379850	453785
NEFLES	131290	147970	125460	117040	144520	134850	140170	149810	199310	186650	254125
POIRES	583560	558100	472360	601320	816860	741760	926460	1098000	1161440	1331760	1581930
POMMES	641400	738690	655250	753850	873180	965170	1049000	1210380	1355420	1653720	1997120
GRENADES	169540	214480	228130	185200	211660	256390	208170	374740	339610	398050	413540
COINGS		23880	25190	20720	19020	19920	23170	23290	30710	44550	64220
CAROUBES	29090	32230	24000	37660	41350	39520	46400	45920	38860	41910	30030
AUTRES		94410	115950	81120	89870	97520	98020	63500	73150	55720	43165
NOYAUX PEPINS	2859340	3730000	2901890	3278570	4094950	3980110	4275840	5031490	5706110	6190600	7732440
OLIVES	1309640	3133340	3194740	1240600	3633810	2171120	2003390	1919260	1676270	4688000	3164890
AGRUMES	3227480	3337440	504040	4179860	535550	4326350	699600	5194590	5599300	6091110	6274060
DATTES	2851550	3606370	3029930	3873130	4275830	3656160	4373320	4184270	4723040	4426000	5162934
VIGNOLE	1967010	1692410	1924470	1469030	1781530	2038010	1961590	2343970	2779680	2839000	3340210

(Anonyme, 2007)

Evolution des rendements arboricole (qx/ha) en Algérie durant la période 1995 – 2005 (Anonyme, 2007).

PRODUITS	Années											MOYENNE
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
ABRICOTS	31,6	59,4	28,9	42,5	53,1	42,1	50,1	50,3	66,4	45,4	63,4	48,47
PRUNES	38,9	44,3	38,8	35,8	43,7	44,5	40,8	47,4	44,3	48	46,2	42,97
PECHES	45,5	49,9	44	47,1	60,9	59,6	53,2	61,2	64,3	65,1	69,8	56,41
AMANDES	8	13,3	7,1	8,2	9,5	9,8	9,3	11,6	10,9	12,5	12,9	10,28
CERISES	21,1	12,7	14,4	11,6	17,1	18,4	13,2	19	10,9	13,2	12,9	14,95
NEFLES	69,5	75,9	67,8	59,1	74,5	68,5	66,1	71,3	90,2	86,6	106,9	76,03
POIRES	58,8	58,5	50,8	57,7	78	67,8	80,2	92,1	94,1	92,2	91,9	74,73
POMMES	53,8	60,6	53,4	58,6	67,1	71,6	74,7	79,4	75	83,3	82,3	69,07
GRENADES	58,7	65,6	59,9	47,6	54,4	60,8	47,5	77,9	66,2	67,9	66,3	61,16
CAROUBES	23,3	25,2	18,9	29,7	33,3	32,7	40	39,6	34,1	39,3	28,7	31,34
FIGUES FRAICHE	15	15,5	13	12,1	14,2	15,1	10,7	15,2	14,4	14,1	15	14,02
NOYAUX PEPINS	32,5	41,4	31,5	35,4	43,5	41,8	43,8	49,6	51,3	51,4	55,2	43,4
OLIVE	8,1	19	19,6	7,5	21,9	12,9	11,3	10,1	8	20,7	13,2	13,84
AGRUMES	80,1	86	87,1	101,7	111,2	104,6	112,8	122,9	130,4	139,8	142,6	110,83
DATTES	32,8	37,3	31,4	39,5	42,7	35,9	41,9	34,6	36,7	32,4	34,9	36,37
VINOBLE	34,8	35,3	37	28,4	35,2	40	61,6	40,8	38,5	35,5	35	38,37

(Anonyme, 2007)

SHORT COMMUNICATION

VIRUSES AND VIROIDS OF STONE FRUITS IN ALGERIA

N. Rouag¹, A. Guechi², S. Matic³ and A. Myrta^{4*}

¹Department of Agronomy, UFAS Sétif, Road of Scipion, 19000 Sétif, Algeria

²Department of Biology, UFAS Sétif, Road of Scipion, 19000 Sétif, Algeria

³Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi and Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Bari, Via Amendola 165/A, 70126 Bari, Italy

⁴Istituto Agronomico Mediterraneo, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano (BA), Italy

SUMMARY

Field surveys were carried out in the major stone fruit growing areas of eastern Algeria to assess the sanitary status of stone fruits. A total of 454 samples from peach, apricot, almond, sweet and sour cherry, plum and myrobalan were tested by ELISA or RT-PCR for the presence of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apricot latent virus* (ApLV), *Cherry virus A* (CVA), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), and Plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNPaV). The overall average infection level was 10.4%. The most frequent virus was PNRSV (56.8%), followed by PDV (27.2%) and ApMV (22.7%). The most infected species was cherry (21.9%) and the less almond (4.4%). ACLSV, ApLV, CVA, CGRMV and PBNPaV were not detected. Of 531 samples tested for the presence of viroids by tissue-print hybridization, 28 (5.2%) were infected. *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) and *Hop stunt viroid* (HSVd) were detected in 15 and 13 samples, respectively. This is the first large-scale study on viruses and viroids of stone fruits in Algeria and reports for the first time the presence of HSVd in the country.

Key words: *Prunus*, ELISA, RT-PCR, tissue-print hybridization, incidence, sanitary status, viroids.

In Algeria, little is known on virus and viroid diseases of stone fruit trees. Records are limited to the occasional finding of *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) (Aouane, 2003) and of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (Torres *et al.*, 2004).

To gather a better insight of the sanitary status of stone fruits in eastern Algeria, a survey was carried out for the presence of PNRSV, PDV, ApMV, ACLSV, *Apricot latent virus* (ApLV), *Cherry virus A* (CVA), *Cherry*

green ring mottle virus (CGRMV), Plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNPaV), PLMVd and *Hop stunt viroid* (HSVd).

Field inspections were conducted and sample collected in spring 2005 and 2006 in the districts of Setif, Bordj bou Arreridj, M'sila, Mila, Batna, Mila and Constantine where a surface of ca. 27,000 ha is given over to stone fruit trees. Leaf samples were collected from nearly 5 % of the trees in 23 commercial orchards and 13 mother blocks and from 20 % of the trees in a varietal collection (at least two trees per each variety).

Sampled species were peach (109 samples), plum (98), apricot (91), almond, (68), cherry (64) and myrobalan (24) (Table 1). All samples were tested by DAS-ELISA (Clark and Adams, 1977) using commercial kits for PNRSV, PDV and ApMV (Agdia, USA), and an antiserum to ACLSV kindly supplied by Dr. D. Boscia. Thirty-five additional samples were tested by RT-PCR using protocols and primers designed for ApLV (Nemchinov and Hadidi, 1998), CVA (M. Al Rwahnih, personal communication) and CGRMV (Rott and Jelkmann, 2001), and by nested RT-PCR for PBNPaV (Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2001; Amenduni *et al.*, 2005).

Tissue-print hybridization (TPH) was used for the detection of PLMVd and HSVd (Pallás *et al.*, 2003) in leaves collected from 170 apricots, 128 peaches, 87 cherries, 86 plums, 35 almonds, and 25 myrobalans. Fresh cut ends of leaf petioles were pressed on nylon membranes from each sample in triplicate, directly in the field in autumn 2004. Membranes were stored at 4°C, and developed later in the Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Italy. Leaves were also stored at 4°C and kept as backup for RT-PCR assays on those samples that gave doubtful responses (Astruc *et al.*, 1996; Ambrós *et al.*, 1998).

Some of the surveyed trees showed foliar symptoms ranging from yellowing, chlorotic/necrotic ringspots and oak leaf patterns, which were associated with the presence of ilarviruses. As shown in Table 1, a total of 15 cherries, 10 peaches, 10 apricots, 5 plums, 4 myrobalans and 3 almonds tested positive for at least one virus. Whereas the average infection level determined by ELISA was 10.4%, infection rates of individual host species were: cherry, 23.4% (15/64); myrobalan, 16.7%

Corresponding author: A. Myrta

Fax: + 39 080 4673185

E-mail: myrta@certiseurope.it

* Present address: Certis Europe, Via A. Guaragna 3, 21047 Saronno (VA) Italy

Table 1. Relative incidence of stone fruit viruses detected by ELISA.

Species	Nr. of samples		Infection rate (%)	Virus-infected trees (No.)		
	Tested	Infected		PNRSV	PDV	ApMV
Peach	109	10	9.2	9	0	1
Plum	98	5	5.1	2	1	2
Apricot	91	9	9.9	7	1	2
Almond	68	3	4.4	2	1	0
Cherry	64	14	21.9	4	9	2
Myrobalan	24	3	12.5	1	0	3
Total	454	44		25	12	10
Mean infection rate (%)			10.4			

Table 2. Viroids detected by tissue-print hybridization.

Species	Number of trees		Infection rate (%)	Viroid-infected trees (No.)	
	Tested	Infected		PLMVd	HSVd
Apricot	170	10	5.8	2	8
Peach	128	18	14.0	13	5
Cherry	87	0	0	0	0
Plum	86	0	0	0	0
Almond	35	0	0	0	0
Myrobalan	25	0	0	0	0
Total	531	28		15	13
Mean infection rate (%)			5.2		

(4/24); apricot, 11% (10/91); peach, 9.2% (10/109); plum, 5% (5/98); and almond, 4.4% (3/68). Viruses detected were PNRSV, PDV and ApMV, in 53.2%, 25.6% and 21.3% of the samples, respectively (Table 1). No infection by ACLSV was found. Double infection by PNRSV+ApMV was detected in one myrobalan tree and by PDV+ApMV in an apricot and a cherry tree.

PNRSV prevailed in infected trees of peach (90%), apricot (78%) and almond (67%). Cherries were mainly infected by PDV (64%), and myrobalan by ApMV (100%); plums by PNRSV (40%) and ApMV (40%). Virus infections were found only in imported cultivars, i.e. cherry (cvs Guillaume, Hedelfingen, Napoléon, and Burlat), Apricot (cvs Bulida and Rouge Roussillon), Prune (cvs Stanley and Golden Japan), Peach (cvs Mycrest, Dixired, GH Hall, and Nectarosa), Almond (cv. Marcona). Setif and Mila were the locations that hosted the most infected orchards. The highest infection rate was observed in commercial orchards followed by mother blocks and varietal collections.

No ApLV, CVA, CGRMV and PBNSPaV were detected by RT-PCR and nested RT-PCR. However, since only 35 samples were analysed, additional testing appears desirable.

TPH assays disclosed that 28 of 531 samples (5.2%) were positive for PLMVd and HSVd, both of which were present in peach (14% infection) and apricot

(5.8% infection), but not in cherry, almond, plum and myrobalan (Table 2). These findings were confirmed by RT-PCR assays carried out on doubtful positive samples (not shown). Here again, viroids were detected only in imported peach (cvs Red Haven, Dixi Red and My Crest) and apricot (cvs Bulida and Bafi). This represents the first record of HSVd in Algeria.

The present survey has shown that the level of viral infection of stone fruit trees from eastern Algeria is lower than that reported from other Mediterranean countries (Myrta *et al.*, 2003). Ilarviruses were the only pathogens detected, PNRSV being the most common, followed by PDV and ApMV.

Although the overall average infection rate by viroids was also relatively low, PLMVd had an incidence in peach comparable with that recorded from other Mediterranean countries like Spain (Badenes and LIácer, 1998), Italy (Barba and Faggioli, 1999), Syria (Ismaeil *et al.*, 2001), Albania (Torres *et al.*, 2004) and Bosnia and Herzegovina (Matic *et al.*, 2005). The same applies to HSVd infections to apricot, which compare well with records from south-east Spain (Cañizares *et al.*, 1998), Syria (Ismaeil *et al.*, 2001), western Turkey and Egypt (Torres *et al.*, 2004).

The fair sanitary status of eastern Algerian fruit tree industry, as it appears from the present work, suggests that the implementation of a national certification pro-

gramme could prove highly beneficial for a rapid improvement of the local nursery and fruit industry and would successfully limit the dissemination of graft-transmissible diseases in the country.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grateful thanks are expressed to Dr. D. Boscia, Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Bari, Italy for the gift of the antiserum to ACLSV and to Dr. M. Al Rwahnih, University of California, Davis, CA, USA for the primers to CVA.

REFERENCES

- Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Mahboubi M., Di Terlizzi B., Sabanadzovic S., Savino V., Uyemoto J.K., Martelli G.P., 2001. Molecular detection of a *closterovirus* associated with Apricot stem pitting in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* **83** : 125-132.
- Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R., 1998. Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. *Journal of Virology* **72**: 7397-7406.
- Amenduni T., Hobeika C., Minafra A., Boscia D., Castellano M.A., Savino V., 2005. Plum bark necrosis stem pitting-associated virus in different stone fruit species in Italy. *Journal of Plant Pathology* **87**: 131-134.
- Aouane B., 2003. Preliminary studies on stone fruit tree viruses in Algeria. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (eds.). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* **45**: 29-32.
- Astruc N., Marcos J.F., Macquaire G., Candresse T., Pallás V., 1996. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 837-846.
- Badenes M.L., LIácer G., 1998. Occurrence of peach latent mosaic viroid in American peach and nectarine cultivars in Valencia, Spain. *Acta Horticulturae* **472**: 565-570.
- Barba M., Faggioli F., 1999. I viroidi agenti causali di malattie degenerative dei fruttiferi. *Rivista di Frutticoltura* **2**: 69-73.
- Cañizares M.C., Marcos J.F., Pallás V., 1998. Studies on the incidence of hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus armeniaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Horticulturae* **472**: 581-585.
- Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**: 475-483.
- Ismaeil F., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., 2001. First record of Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid in Syria. *Journal of Plant Pathology* **82**: 227.
- Matic S., Al Rwahnih M., Myrta A., 2005. Occurrence of stone fruit viroids in Bosnia and Herzegovina. *Phytopathologia Mediterranea* **44**: 285-290.
- Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., Martelli G.P., 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (eds.). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* **45**: 15-23.
- Nemchinov L., Hadidi A., 1998. Apricot latent virus: A novel stone fruit pathogen and its relationship to apple stem pitting virus. *Acta Horticulturae* **472**: 159-164.
- Pallás V., Amari K., Gómez G., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Di Serio F., 2003. Viroids of stone fruits: Incidence and diseases in the Mediterranean. In: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (eds.). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* **45**: 129-133.
- Rott M.E., Jelkmann W., 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 411-420.
- Torres H., Gómez G., Pallás V., Stamo B., Shalaby A., Aouane B., Gavriel I., Kominek P., Caglayan K., Sipahioglu M., Michelutti R., Myrta A., Fiore N., 2004. Detection by tissue printing of stone fruit viroids, from Europe, the Mediterranean and North and South America. *Acta Horticulturae* **657**: 379-383.

Résumé

La connaissance de l'état sanitaire des rosacées fruitières en matière des agents phytopathogènes transmissibles par matériel végétal de propagation constitue un préalable pour l'établissement de tout programme de production et de certification des plants arboricoles indemnes. A cet effet, le présent travail, s'est intéressé à l'étude de la fréquence des principaux virus et viroïdes inféodés aux prunus cultivés en Algérie. Les résultats sérologiques et moléculaires de 967 échantillons provenant de trois étages bioclimatiques et de trois systèmes de conduite différents nous ont donné un taux d'infection général de l'ordre de 17,58 %. Quatre principaux virus à savoir trois *Ilarviruses* (PNRSV, PDV et ApMV) et le PPV ont été détectés par DAS-ELISA en plus du CVA qui a été détecté par RT-PCR. La détection du PPV et du CVA constitue une première signalisation en Algérie. Les résultats d'analyse des *prunus spp* nous ont donné que la sensibilité est liée à l'espèce et à la variété cultivée, puisque les variétés porte-greffes sont infectées à hauteur de 21,88 %, alors que les variétés cultivées ne sont infectées qu'à hauteur de 17,11 %. Il en ressort également que le pêcher avec un taux d'infection de l'ordre de 27,14%, est l'espèce la plus infectée, alors que l'amandier avec un taux de 8,26% se présente comme le moins infecté. Concernant le diagnostic des deux principaux viroïdes (PLMVd et HSVd), au total 1128 échantillons ont été prélevés à la fin de la saison végétative (septembre-octobre, 2004 - 2007) et analysés par dot-blot hybridation et tissue-immunprinting hybridization. Les résultats nous donnent un taux de fréquence égal à 5,59 % quant à la fréquence individuelle, on a enregistré des taux de l'ordre de 3,19 % et 3,63 % respectivement pour le PLMVd et HSVd. La détection du HSVd dans la région d'étude constitue la première signalisation en Algérie. L'influence des hautes températures de champs et les basses températures de conservation (- 20°C) agit négativement dans la réduction du titre viral à l'intérieur de la plante infectée.

Mots clés : Rosacées fruitières à noyaux, virus, viroïdes, diagnostic sérologique, RT-PCR, Dot-Blot, tissue immunoprinting hybridization.

Summary

The sanitary status of stone fruits trees regarding pathogens transmissible with propagating material constitute a preliminary measure for the establishment of any certification program for the production of healthy plant. For this purpose, the main objective of this research was to quantify the incidence of several virus and viroids infecting *prunus* species cultivated in commercial orchards, nurseries and mother blocks in the eastern part of Algeria. Serological and molecular results of 967 samples collected from three bioecological stages gives a general rate of infection equal at 17,58%. For major virus, three Ilarviruses (PNRSV, PDV and ApMV) and PPV were detected by DAS-ELISA and CVA was detected by RT-PCR. The detection of PPV and CVA constitute the first report in Algeria. Results show also that the sensitivity is related to *Prunus* species and varieties. Rootstock varieties were more infected (21,88%) than scions varieties (17,11%). In addition, peach varieties were the most infected with 27,14% as infection rate, and almond was the less stone fruit species infected with only 8,26%. Regarding, the principles viroids (PLMVd and HSVd), a total of 1128 samples were collected in autumn season (2004 – 2007) and analysed with two molecular techniques: Tissue immunoprinting hybridization and Dot-Blot hybridization. A result gives 59 % as general rate of infection for the viroids, individually PLMVd and HSVd was detected in 3,19 % and 3,63% respectively. This is the first record HSVd in Algeria. The influence of high temperatures in open fields and low temperatures used for samples conservation, in infected trees by PNRSV, were studied and results shows that both, reduce the concentration of virus in infected samples.

Key words: Stone fruits, virus, viroids, diagnostic, serological, RT-PCR, Dot-Blot, tissue immunoprinting hybridization

ملخص

إن معرفة الحالة الصحية للوزيات المثمرة ذات النواة فيما يخص الإصابة بالآفات المنتقلة عن طريق الأجزاء الإكثارية تمثل شرطا أساسيا لوضع أي برنامج مصادقة للشتللات المثمرة السليمة. لأجل هذا الغرض، اهتم العمل التالي بدراسة نسب تواجد أهم الفيروسات والفيرويدات في الورديات المثمرة المزروعة في الجزائر. أعطت نتائج التحاليل السيرولوجية والجزيئية من خلال فحص 967 عينة جنيت من ثلاث طبقات تتميز بمناخ مختلف وكذلك من ثلاث كفيات زراعية، أن نسبة معدل الإصابة يقدر بـ 17,58%. كما أثبتت الاختبارات السيرولوجية عن تواجد أهم أربع الفيروسات، ثلاث منها تنتمي إلى جنس إيليرافيروس (ApMV, PNRSV, PDV) وكذلك PPV بينما فيروس CVA أكتشف بواسطة اختبار RT-PCR. يعتبر اكتشاف فيروسي PPV و CVA أول إعلان عن تواجدهما في الجزائر. أما فيما يخص حساسية أنواع الورديات المثمرة لهذه الفيروسات، أعطت نتائج التحاليل أن الأصناف المستعملة كطعوم هي أكثر حساسية من الأصناف المثمرة حيث قدرت الأولى بـ 21,88% أما الثانية فقدرت بـ 17,11%. على غرار ذلك، فإن الخوخ كان أكثر الأنواع إصابة بنسبة تساوي 27,14% على العكس من هذا، اللوز كان أقل الأنواع إصابة بنسبة قدرت بـ 8,26%. أما الكشف على زوج من الفيرويدات وهما (PLMVd, HSVd)، من خلال التحاليل التي أجريت على 1128 عينة جمعت وقت نهاية التكاثر الخصري (سبتمبر - أكتوبر، 2004-2008) بواسطة تقنيات dot-blot hybridization و Tissue. immunprinting hybridization، النتائج أعطت معدل نسبة إصابة يقدر بـ 5,59%، أما فرديا، فكانت الإصابة بفيرويد PLMVd معادلة لـ 3,19% و 3,63% في حالة فيرويد HSVd. ويعتبر اكتشاف فيرويد HSVd أول إعلان عن تواجده في الجزائر. تحققت كذلك الدراسة من التأثير السلبي لدرجات الحرارة الدنيا (-20) المستعملة في حفظ العينات والقصوى المسجلة في الحقول على تركيز الفيروسات في العينات المصابة بـ PNRSV.

الكلمات الدالة

الوزيات المثمرة ذات النواة، فيروسات، فيرويدات، DAS-ELISA Tissue immunprinting, RT-PCR, Dot-Blot, hybridization