

## Contents

|   | Pages     |
|---|-----------|
| Acknowledgements  |           |
| List of Abbreviations   |           |
| List of Tables  |           |
| List of Figures   |           |
| <b>Chapter I INTRODUCTION</b>                                 | <b>1</b>  |
| <b>Chapter II HISTORICAL REVIEW</b>                           | <b>5</b>  |
| 2.1 Main graft – transmissible diseases of citrus             | 5         |
| 2.1.1 Vector – transmitted diseases                           | 5         |
| 2.1.1.1 Tristeza  | 5         |
| 2.1.1.2 Stubborn  | 7         |
| 2.1.1.3 Huanglongbing (HLB, greening)                         | 8         |
| 2.1.1.4 Witches' Broom Disease of Lime (WBDL)                 | 9         |
| 2.1.2 Diseases with mechanically transmissible agents         | 10        |
| 2.1.2.1 Gummy bark  | 10        |
| 2.1.2.2 Exocortis   | 10        |
| 2.1.2.3 Cachexia  | 10        |
| 2.1.2.4 Infectious Variegation                                | 11        |
| 2.1.3 Graft transmissible diseases                            | 11        |
| 2.1.3.1 Psorosis complex: Psorosis-A, Psorosis-B and Ringspot | 11        |
| 2.1.3.2 Oak leaf pattern diseases (OLP)                       | 12        |
| <b>Chapter III OBJECTIVES</b>                                 | <b>13</b> |
| <b>Chapter IV : MATERIAL AND METHODS</b>                      | <b>14</b> |
| 4.1 Monitoring of the main graft - transmissible diseases     | 16        |
| 4.1.1 Sampling  | 16        |
| 4.1.2 Field observation                                       | 16        |

|                          |  |           |
|--------------------------|--|-----------|
| 4.1.3                    | Serological diagnosis  | 18        |
| 4.1.3.1                  | DTBIA (Direct tissue blot immunoassay)                           | 18        |
| 4.1.3.2                  | DAS - ELISA.   | 19        |
| 4.1.3.3                  | TAS - ELISA  | 19        |
| 4.2                      | Sanitary selection of citrus candidate stocks                    | 20        |
| 4.2.1                    | Field selection  | 21        |
| 4.2.2                    | Diagnosis  | 23        |
| 4.2.2.1                  | Indexing on woody indicators                                     | 23        |
| 4.2.2.2                  | Mechanical transmission on herbaceous plants                     | 23        |
| 4.2.2.3                  | Laboratory assays  | 24        |
| 4.3                      | Characterization of the Egyptian CTV sources                     | 27        |
| 4.3.1                    | Indexing on woody indicators                                     | 27        |
| 4.3.2                    | Electron microscope observation                                  | 28        |
| 4.3.2.1                  | Leaf dip   | 28        |
| 4.3.2.2                  | Decoration   | 28        |
| 4.3.3                    | dsRNA analysis   | 28        |
| 4.4                      | Characterization of the Egyptian CPsV sources                    | 30        |
| 4.4.1                    | Biological Indexing  | 30        |
| 4.4.2                    | Serological assay  | 31        |
| 4.5                      | Setting up of immunoprinting technique for the detection of CPsV | 32        |
| <b>Chapter V RESULTS</b> |  | <b>34</b> |
| 5.1                      | Field observations   | 34        |
| 5.2                      | Monitoring   | 36        |
| 5.2.1                    | Serological diagnosis  | 38        |
| 5.3                      | Sanitary selection of citrus candidate stocks                    | 39        |
| 5.3.1                    | Graft transmission to woody indicators                           | 39        |
| 5.3.2                    | Mechanical transmissions   | 40        |
| 5.3.3                    | Serology   | 40        |
| 5.3.4                    | Molecular techniques   | 40        |
| 5.4                      | Characterization of the Egyptian CTV sources                     | 44        |
| 5.4.1.                   | Biological indexing  | 44        |

|   |    |
|---|----|
| 5.4.2. Electron microscope observation              | 44 |
| 5.4.3. Ds RNA analysis                              | 44 |
| 5.5. Characterization of the Egyptian CPsV sources  | 46 |
| 5.5.1. Biological characterization                  | 47 |
| 5.5.2. Serological characterization                 | 47 |
| 5.6 Use of immunoprinting for the detection of CPsV | 49 |

**Chapter V CONCLUSIONS** 50

**References**

**Annexes**

## List of abbreviations

|             |   |
|-------------|---|
| ARC         | Agricultural Research Center                            |
| BCIP -NBT   | 5Bromo 4Chloro 3Indolyphosphate Nitroblue tetrazolium   |
| BSA         | Bovine serum albumine                                   |
| cDNA        | Complementary deoxyribonucleic acid                     |
| CF II       | Cellulose fibres II                                     |
| cv.         | Cultivar  |
| DAS - ELISA | Double Antibody Sandwich                                |
| DDC         | Desert Development Center                               |
| dNTP        | Deoxynucleotide triphosphate                            |
| DNA         | Deoxyribonucleicacid                                    |
| dsRNA       | Double stranded ribonucleicacid                         |
| EDTA        | Ethylenediamino tetra acetic acid                       |
| e.g.        | Example   |
| ELISA       | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay                      |
| EtOH        | Ethanol   |
| Fig.        | Figure  |
| GTZ         | Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit     |
| FAO         | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| HCL         | Hydrochloric acid                                       |
| IgG         | Immunoglobuline   |
| IAMB        | Istituto Agronomico Mediterraneo, Bari                  |
| ISEM        | Immunosorbent Electron Microscopy                       |
| Mab         | Monoclonal antibody                                     |
| Mabs        | Monoclonal antibodies                                   |
| OLP         | Oak leaf pattern  |
| PAGE        | PolyAcrylamide Gel Electrophoresis                      |
| PBS         | Phosphate Buffer Salt                                   |
| PCR         | Polymerase Chain Reaction                               |
| PVDF        | Polyvinidylene difluoride                               |
| PVP         | Polyvinylpyrrolidone                                    |
| RNA         | Rribonucleic acid                                       |
| rpm         | Revolutions per minute                                  |
| RT- PCR     | Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction         |
| SDS         | Sodium Dodecyl Sulphate                                 |
| SSC         | Salt Sodium Citrate                                     |
| Tab.        | Table   |
| TAE         | Tris Acetic EDTA  |
| TAS - ELISA | Triple Antibody Sandwich                                |
| TBE         | Tris Borate EDTA  |
| TBS         | Tris Buffer Salt  |
| TE          | Tris EDTA   |

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| Tris | Tris (hydroxymethyl) aminomethane |
| U.V  | ultraviolet                       |
| MLO  | Mycoplasma – like organism        |

## Measures

|        |                   |
|--------|-------------------|
| μ      | micro             |
| °C     | degree centigrade |
| bp     | Base paires       |
| Feddan | 0.4 hectare       |
| g      | gram              |
| kDa    | Kilodaltons       |
| kg     | kilogram          |
| h      | hour              |
| Ha     | hectare           |
| M      | molar             |
| mA     | milliampers       |
| mg     | milligram         |
| Min.   | minutes.          |
| ml     | millilitre        |
| mM     | millimolar        |
| Mt.    | Metric tons       |
| nm     | nanometer         |
| V      | volume            |
| V/V    | volume per volume |
| W/V    | Weight per volume |

## Virus and Viroids

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| CCaVd | Citrus Cachexia Viroid              |
| CEVd  | Citrus Exocortis Viroid             |
| CPsV  | Citrus Psorosis Virus               |
| CTV   | Citrus Tristeza Virus               |
| CVEV  | Citrus Vein Enation Virus           |
| CVV   | Citrus Infectious Variegation Virus |
| HLB   | Huanglongbing                       |
| HSVd  | Hopstunt Viroid                     |
| SDV   | Satsuma Dwarf Virus                 |
| WBDL  | Witches' Broom Disease of Lime.     |

## **Monitoring des principales maladies transmissibles par la greffe et état sanitaire des agrumes en Egypte.**

### **Résumé**

Une enquête a été menée dans les principales régions agrumicoles en Egypte, dans le but de faire un monitoring des virus de la tristeza, de la psorose, de la panachure infectieuse des agrumes et de sélectionner des plantes pour le programme de certification. Des prospections ont été réalisées dans six plantations commerciales et 3 collections variétales, afin d'observer les éventuels symptômes et de prélever des échantillons. On a prélevé des échantillons d'un total de 2857 arbres, dont 54 (49 variétés et 5 porte-greffes) ont été sélectionnés au champ.

Les opérations de monitoring ont été centrées sur les observations des symptômes sur le terrain et des tests sérologiques (immunoprinting et ELISA).

L'état sanitaire des plantes d'agrumes sélectionnées a été évalué au laboratoire (par immunoprinting, ELISA, Dot blot, PCR) et à travers des essais biologiques (transmissions mécaniques et par la greffe).

Par ailleurs, ont été caractérisées partiellement les deux sources égyptiennes de CTV (par indexage biologique, microscopie électronique et analyse des dsRNA) et les 21 sources égyptiennes de CPsV (par voie biologique et sérologique).

On a aussi essayé de détecter la psorose en appliquant la technique d'immunoprinting et en utilisant des anticorps monoclonaux et des explants infectés (des feuilles et des styles) d'origine égyptienne, italienne et libanaise.

Plusieurs symptômes ont été mis en évidence, en particulier sur oranger doux : des trous, un dépérissement général, l'écaillage sévère de l'écorce et la coloration du bois, des manifestations de gommose de l'écorce du type concave gum et stubborn, des anomalies de la ligne de greffe.

42 des 2109 arbres soumis au monitoring (1,9%) se sont avérés positifs au CTV, Le CTV a été trouvé encore une fois dans 2 collections variétales où il avait déjà été signalé et éradiqué. Le CTV a aussi été détecté à Korashia, où se trouve une grande pépinière importante et cela pourrait impliquer un risque de diffusion importante du virus dans le pays. Dans les plantations commerciales, seuls trois arbres de Valencia sont infectés par le CTV.

Les isolats égyptiens de CTV n'appartiennent pas à la souche de type seedling-yellow et un isolat égyptien s'est différencié des isolats de CTV libanais et chinois.

L'incidence du CPsV, jamais rapportée auparavant, s'est élevée à 49,4% dans les collections variétales et à 1,6% dans les plantations commerciales. Toutes les sources égyptiennes de CPsV ont été reconnues par les Mab et de ce fait, elles peuvent être incluses dans un groupe avec les sources italiennes de CPsV. La plupart d'entre elles ont induit des symptômes sur Madame vinous, dweet Tangor et *Chenopodium* spp.

Le CVV n'a été détecté que chez 1 tangelo Minneola dans une orangerie commerciale.

Toutes les plantes candidats sélectionnées sont indemnes de S.citri et HLB, alors que 48% d'elles sont infectées par un ou plusieurs pathogènes : 15% par la psorose, 35% par des viroïdes (cachexie et exocortis), 1 oranger doux par le CTV et 1 tangelo Minneola par le CVV. Seules quatre plantes d'agrume ont répondu d'une manière positive à la transmission mécanique sur *Chenopodiaceae* spp.

L'immunoprinting pour la détection du CPsV par les anticorps monoclonaux a donné des résultats excellents en n'utilisant que des styles ou des stigmates. La mise au point de l'immunoprinting offre un grand avantage pour la détection du CPsV, tout comme pour le CTV, vu que cette technique est rapide et facile à appliquer et se prête aux activités de monitoring des pathogènes et de sélection.

**Mots clés :** certification, agrumes, Egypte, immunoprinting, monitoring, virus, viroïdes, état sanitaire.

---