

Présence en Tunisie de *Spiroplasma citri*, l'agent causal du stubborn des agrumes et de son vecteur, la cicadelle *Circulifer haematoceps*. Contamination de *C. haematoceps* et de *C. opacipennis* par *S. citri*

Asma Najar^a
Sonia Bouachem^a
Jean-Luc Danet^b
Colette Saillard^b
Monique Garnier^b
Jean-Marie Bové^{b*}

^a Institut national de la recherche Agronomique de Tunisie (Inrat), rue Hédi-Karray, 2080 Ariana, Tunisie

^b Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Inra et université Victor-Segalen Bordeaux-2, 71, avenue Édouard-Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon cedex, France

Presence of *Spiroplasma citri*, the pathogen responsible for citrus stubborn disease, and its vector, the leafhopper *Circulifer haematoceps* in Tunisia. Contamination of both *C. haematoceps* and *C. opacipennis*.

Abstract — Introduction. The causal agent of citrus stubborn disease is the motile helical mollicute, *Spiroplasma citri*. It is found exclusively in plant phloem and is naturally transmitted by leafhoppers. Within the framework of the national project for the selection of citrus varieties in Tunisia, *S. citri* has been researched on plants and insects. **Materials and methods.** Citrus plants samples were collected in four regions dedicated to citrus cultivation: Gobba, Hammamet, El Fahs, and Bou Salem. Some leafhoppers were also captured in these regions as well as along the coast of Gabes in Rafrat. ELISA tests were performed using polyclonal antibodies specific for *S. citri*. PCR detection primers were selected in the sequence of the spiralin gene. **Results.** For the very first time in Tunisia, *S. citri* was discovered on citrus plants, on leafhoppers of the *Circulifer opacipennis* species, exclusively found on *Salsola kali* – Chenopodiaceae –, and on leafhoppers of the *C. haematoceps* species. **Discussion.** In order to control the mollicute induced citrus disease in citrus growing regions of Tunisia undergoing crop expansion, a more detailed analysis of the epidemiology is now essential. (© Elsevier, Paris)

Tunisia / Citrus / plant diseases / disease surveillance / vectors / biological control organisms

Présence en Tunisie de *Spiroplasma citri*, l'agent causal du stubborn des agrumes et de son vecteur, la cicadelle *Circulifer haematoceps*. Contamination de *C. haematoceps* et de *C. opacipennis* par *S. citri*.

Résumé — Introduction. L'agent causal du stubborn des agrumes est le mollicute *Spiroplasma citri*, de morphologie hélicoïdale et doué de motilité. Dans les plantes, il est présent uniquement dans le phloème et, dans la nature, il est transmis par des cicadelles. Dans le cadre d'un projet national de sélection de variétés d'agrumes, *S. citri* a été recherché en Tunisie aussi bien dans les plantes que dans les insectes. **Matériel et méthodes.** Des échantillons d'agrumes ont été prélevés dans quatre régions agrumicoles : Gobba, Hammamet, El Fahs et Bou Salem. Les captures de cicadelles ont été effectuées dans ces mêmes régions ainsi que le long de la côte de Gabès à Rafrat. Des tests Elisa ont été réalisés avec des anticorps polyclonaux dirigés contre *S. citri*. Pour la méthode PCR, les amorces ont été choisies dans la séquence du gène de la spiraline. **Résultats.** Pour la première fois en Tunisie, *S. citri* a été mis en évidence sur agrumes, dans les cicadelles de l'espèce *Circulifer opacipennis*, capturées uniquement sur la chénopodiacée *Salsola kali*, et dans les cicadelles de l'espèce *C. haematoceps*. **Discussion.** Afin de mieux contrôler la maladie dans les régions d'extension de la culture des agrumes en Tunisie, une étude plus approfondie de l'épidémiologie doit maintenant être effectuée. (© Elsevier, Paris)

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 9 avril 1998

Accepté le 10 septembre 1998

Fruits, 1998, vol. 53, p. 391–396
© Elsevier, Paris

RESUMEN ESPAÑOL, p. 396

Tunisie / Citrus / maladie des plantes / surveillance épidémiologique / vecteur de maladie / auxiliaire de lutte biologique

1. introduction

Le « stubborn » est une maladie grave des agrumes. Elle compromet la production et diminue la longévité de l'arbre. L'agent causal de la maladie est le molluscite de morphologie hélicoïdale *Spiroplasma citri* [1–2]. Dans les plantes, ce spiroplasma n'est présent que dans les tubes criblés et il s'y multiplie. Dans la nature, il est transmis par les cicadelles du genre *Circulifer* : *Circulifer tenellus* (Baker) aux États-Unis [3] et *Circulifer haematocaps* (Mulsant et Rey) dans les pays du pourtour méditerranéen [4]. *C. tenellus*, capturé en Jordanie, s'est révélé capable d'acquiescer *S. citri* et de le transmettre à diverses plantes [5].

En Tunisie, le stubborn n'a été identifié jusqu'à présent que par symptomatologie [6]. Dans le cadre du projet national de Sélection de variétés d'agrumes indemnes de virus et de mycoplasmes prohibés par la législation, des prospections ont été effectuées pour détecter l'agent causal *S. citri* aussi bien dans les plantes que dans les cicadelles.

2. matériel et méthodes

2.1. matériel biologique

Les feuilles d'orangers échantillonnées ont été prélevées sur les arbres de vergers montrant des symptômes plus ou moins nets de stubborn. Les cicadelles ont été capturées dans divers vergers d'agrumes et sur dix sites localisés sur la côte tunisienne s'étendant de Rafrat à Gabès (figure 1). Les chasses ont été effectuées, durant toute l'année, sur les adventices des vergers, sur les plantes spontanées des montagnes à proximité des vergers, dans les champs de betteraves et le long de la côte sur la chénopodiacée sauvage, *Salsola kali*, présente sur les dunes du littoral tout au long de l'année.

Les cicadelles ont été capturées au moyen d'un filet fauchoir d'octobre 1996 à août 1997 et d'un aspirateur D-VAC au mois d'octobre 1997 et en juillet 1998.

Les insectes ont été identifiés et classés par espèces à l'aide des clés de Ribaut [7] et de Della Giustina [8]. La détermination des espèces a été faite sur la base des critères morphologiques et, plus particulièrement, après dissection et observation de l'appareil génital mâle.

2.2. détection de *S. citri*

2.2.1. méthode Elisa-Das

Les nervures centrales des feuilles échantillonnées ont été broyées au moyen d'un homogénéiseur polytron dans un tampon phosphate de sodium additionné de NaCl. Les anticorps polyclonaux utilisés ont été purifiés à partir d'un immun sérum de lapin. La technique Elisa-Das utilisée a été celle de Saillard et Bové [9].

2.2.2. méthode d'amplification de l'ADN pour réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

L'ADN des échantillons de feuilles et de cicadelles a été extrait selon la technique au cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB) [10]. L'ADN a été soumis à 40 cycles d'amplification (45 s à 92 °C, 45 s à 62 °C et 30 s à 72 °C). Les amorces ont été choisies dans la séquence du gène de la spiraline, la protéine majeure de *S. citri*.

Les amplifiats obtenus ont été analysés sur gel d'agarose à 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

3. résultats

3.1. identification des cicadelles capturées

Les prospections réalisées dans les différentes régions de Tunisie ont permis d'identifier 24 espèces de cicadelles sensu lato (tableau I).

Parmi ces espèces, *Circulifer haematocaps* est vecteur de *S. citri* en Méditerranée [4]. Au cours des prospections de juin

à août 1997 et de juillet 1998, cette cicadelle a été trouvée sur amarante, betterave et diverses composées dans les vergers d'agrumes. Elle n'a pas été capturée en octobre 1997. Au cours des prospections de juillet 1998, les captures réalisées sur betteraves à Bousalem renfermaient quelques individus de *C. tenellus*, parmi de nombreuses *C. haematoceps*.

3.2. détection de *S. citri*

Les tests Elisa réalisés au mois de juillet sur 20 échantillons de feuilles d'agrumes prélevées dans les vergers ont permis d'identifier deux arbres contaminés par *S. citri*, l'un dans la région de Bou Salem et l'autre dans le Fahs. Par ailleurs, les tests par PCR ont révélé, en plus de ces deux arbres déjà détectés par Elisa, l'existence de deux arbres supplémentaires dans les mêmes régions (figure 2).

Dans les régions de Hammamet et de Gobba, les tests Elisa et par PCR ont été négatifs

Dans quatre des dix sites prospectés, plusieurs lots de la cicadelle *C. opacipennis* (lots de deux insectes), testés par PCR pour détecter la présence de *S. citri*, ont donné des résultats positifs (figure 3 ; tableau I).

En juillet 1998, deux lots (lots de deux insectes) de *C. haematoceps*, parmi les 22 capturées à Bousalem sur betteraves, ont donné des réactions positives pour la présence de *S. citri*, lors de l'utilisation des PCR.

4. discussion

Le travail de prospection entrepris dans les vergers tunisiens a permis de mettre en évidence que *S. citri* était présent dans certains orangers de deux régions : Bou Salem et Fahs.

Dans la région de Hammamet et de Gobba, les tests sur feuilles d'arbres montrant des symptômes plus ou moins nets se sont révélés négatifs. Un tel résultat,

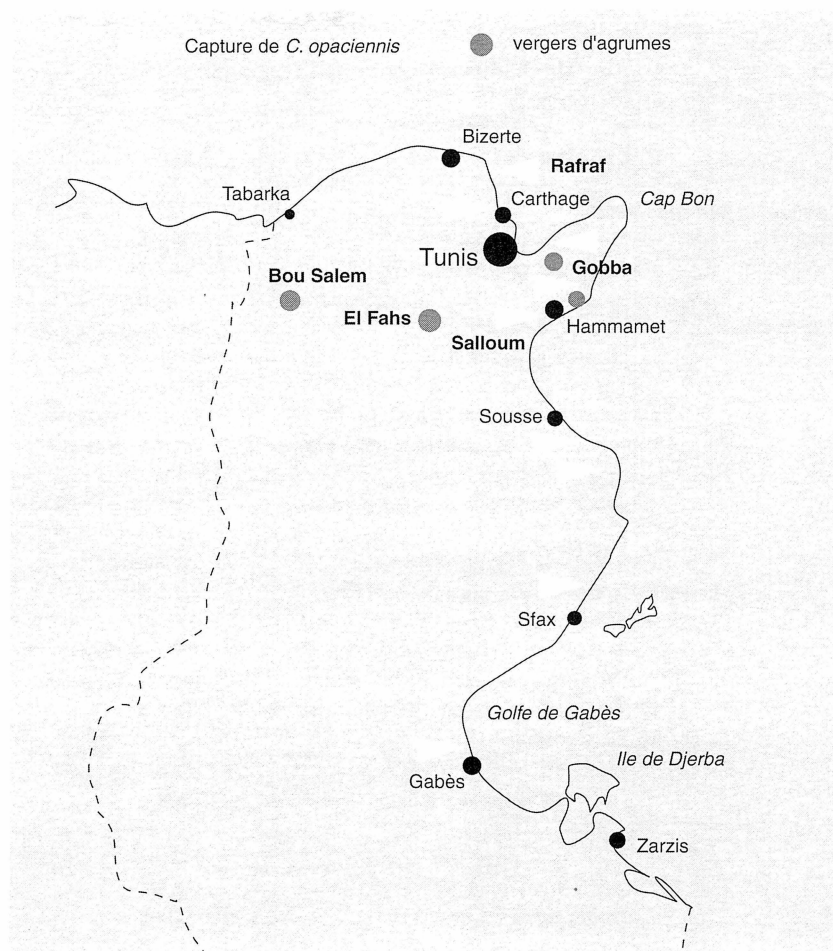


Figure 1. Localisation des vergers contaminés par *Spiroplasma citri* et des sites de captures de *Circulifer opacipennis*, à partir de prospections effectuées sur la côte tunisienne de 1996 à 1998.

associé à la constatation de l'absence de symptômes sévères dans ces vergers, pourrait être dû à une faible concentration de *S. citri* dans les arbres, expliquée par le fait que les températures ne sont pas très élevées dans cette zone. En effet, une bonne multiplication de *S. citri* implique que la température soit au moins égale à 32 °C pendant plusieurs heures dans la journée. Ainsi, en Corse, où les températures sont rarement au-dessus de 32 °C, les symptômes de stubborn sont quasiment inexistant.

Toutes les captures d'insectes effectuées en octobre 1997 sur *Salsola kali*, le long de la côte tunisienne, ont permis de trouver systématiquement l'espèce *C. opacipennis*. Cela concorde avec les résultats obtenus en Israël [11] et en Turquie [12]. Plusieurs lots de cette espèce sont infec-

Tableau I.

Espèces de cicadelles identifiées au cours de prospections effectuées dans différentes régions de Tunisie, mentionnées avec leur lieu de capture.

Sous-famille	Genre et espèce	Lieu de capture
a) Famille des Cicadellidae		
Agalliinae	<i>Austroagallia sinuata</i> (M. et R., 1855)	Fahs
	<i>Anaceratagallia laevis</i> (Zachvatkin, 1946)	Bousalem
Deltocephalinae	<i>Balclutha punctata</i> (F., 1775)	Bizerte, Fahs, Hammamet
	<i>B. saltuella</i> (KBM, 1868)	El Alia
	<i>Chiasmus</i> sp. (Muslant & Rey, 1855)	Fahs
	<i>Cicadulina bipunctella</i> (Mats., 1908)	Alya, Hammamet, Sidi Rais
	<i>Circulifer haematoceps</i> (Mulsant & Rey, 1855)	Bizerte, Bousalem, Fahs
		Hammamet, Sidi Rais, Wechtata
	<i>Circulifer opacipennis</i> (Lethierry, 1876)	Carthage, Chott Meriem, Echraaf, Gabes, Hammamet Nord, Mahdia, Oued Smir, Rafraf, Salloum
	<i>Circulifer tenellus</i> (Baker, 1896)	Bousalem
	<i>Euscelis incisus</i> (Kirschbaum, 1858)	Fahs
	<i>Exitianus capicola</i> (ST., 1855)	Bousalem, Fahs, Hammamet
	<i>Maziripius zizyphi</i> (Bergevin, 1922)	Tuburro Majus
	<i>Neocaliturus fenestratus</i> (H.-S., 1834)	Bizerte, Bousalem
	<i>Opsius lethierryi</i> (Wagner, 1942)	Gobba
	<i>Orosius orientalis</i>	Hammamet
	<i>Phepsius</i> sp. (Fieber, 1866)	Bousalem
	<i>Psammotettix alienus</i> (Dahlbom, 1850)	Fahs
Typhlocybinae	<i>Empoasca</i> sp. (Walsh, 1862)	Bousalem, Bizerte, Fahs, Hammamet, Sbikha
	<i>Eupterix</i> sp. (Curtis, 1833)	Fahs
	<i>Hauptidia marocana</i> (Melichar, 1907)	Gobba
	<i>Liguropia juniperi</i> (Leth., 1876)	Gobba
b) Famille des Delphacidae		
	<i>Laodelphax striatellus</i> (Fennah, 1963)	Fahs, Hammamet, Tekelsa
	<i>Sogatella vibix</i> (Haupt, 1927)	Hammamet
	<i>Toya propinqua</i> (Fieber, 1866)	Hammamet

tés par *S. citri* tant en Tunisie qu'en Turquie et en Israël.

À Chypre, en Irak, au Maroc et en Syrie [13], la cicadelle capturée sur *S. kali* a été décrite sous le nom de *Circulifer haematoceps* ; il n'est pas exclu que la cicadelle *C. opacipennis* ait été également présente puisque, à cette époque, dans les années 1980, *C. haematoceps* et *C. opacipennis* pouvaient être confondus. Aujourd'hui, il est clairement établi qu'il s'agit de deux complexes différents [11, 12, 14]. Toutefois le rôle vecteur de

C. opacipennis dans la transmission de *S. citri* n'a pas encore été démontré.

À l'inverse, l'espèce *C. haematoceps* qui est vecteur de *S. citri* en Méditerranée [4] n'a pas été capturée, en octobre 1997, sur *S. kali* en Tunisie. Toutefois, cette cicadelle est présente sur d'autres plantes en Tunisie, du mois de juin au mois d'août, dans les régions de Bou salem, Wechtata, Fahs, El Alia et Hammamet et elle a été trouvée contaminée par *S. citri* en juillet 1998 à Bousalem.

Le spiroplasma doit aussi être recherché dans la cicadelle *Circulifer tenellus*, déjà signalée en Tunisie par Linnavuori [15] et rencontrée dans la région de Bou-salem.

L'identification des plantes hôtes de *S. citri*, autres que les agrumes, serait judicieuse puisque ces plantes constituent vraisemblablement une source d'inoculum pour les cicadelles. Dans certains pays du pourtour méditerranéen, des plantes sauvages ou cultivées sont naturellement infectées par *S. citri* : deux crucifères (*Sisymbrium irio* et *Hirschfeldia incana*) en Israël [16] et le sésame (*Sesamum indicum*), la vipérine (*Echium* sp.) le crépis (*Crepis echinoides*) en Turquie [17]. De plus la pervenche (*Catharanthus roseus*) est souvent contaminée par *S. citri* dans la nature et, en particulier, au Maroc, en Syrie et Turquie, à Chypre et Dubai, dans le Sultanat d'Oman et en Corse où les analyses ont été faites [13].

La recherche de plantes hôtes de *S. citri* est d'autant plus importante que la région de Bou Salem en Tunisie représente une zone d'extension de la culture des agrumes et que des essais de comportement de plusieurs variétés saines, importées de Corse, sont prévus dans plusieurs régions du pays.

remerciements

Les auteurs remercient M.J. Bonfils pour son aide apportée dans l'identification de certaines cicadelles.

références

- [1] Saglio P., Hospital M., Lafèche D., Dupont G., Bové J.M., Tully J. G., Freundt E.A., *Spiroplasma citri* gen. and sp.n. a mycoplasma like organism associated with 'Stubborn' disease of citrus, *Int. J. Syst. Bact.* 23 (3) (1973) 191-204.
- [2] Markham P.G., Townsend R., Bar-Joseph M., Daniels M.J., Plaskitt A., Meddins B.M., Spiroplasmas are the causal agents of citrus little leaf disease, *Ann. Appl. Biol.* (78) (1974) 49-57.

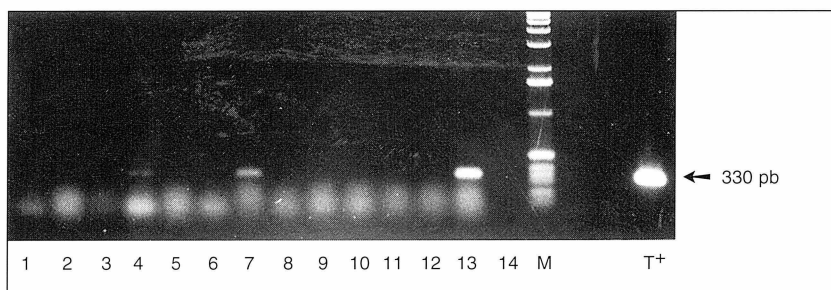


Figure 2.

Résultats d'une PCR effectuée sur de l'ADN extrait de quelques échantillons prélevés sur agrumes dans les vergers de la région de Bou Salem et de Hammamet. Pistes 1 et 12 : agrumes sains de la serre de Bordeaux ; piste 13 : agrume atteint de stubborn, cultivé en serre dans la région de Bordeaux ; pistes 2 à 6 : agrumes de la région de Fahs en Tunisie ; pistes 7 à 11 : agrumes de la région de Bou Salem en Tunisie. M : marqueur de taille 1 kb ; T⁺ : contrôle positif, amplification de l'ADN génomique de *S. citri*.

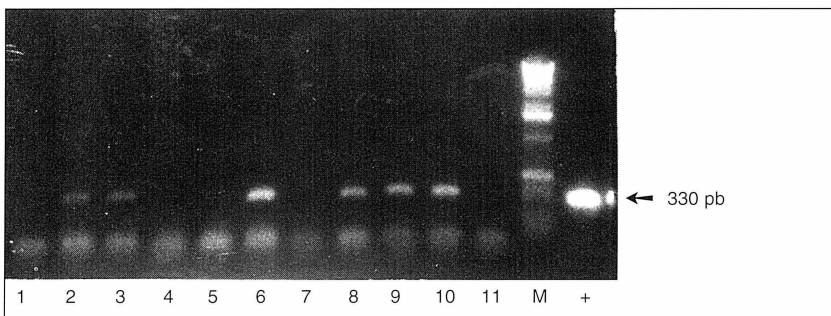


Figure 3.

Résultats d'une PCR effectuée sur l'ADN d'individus de *Circulifer opacipennis* capturés à Salloum et Hammamet en Tunisie. Piste 1 et 2 : *C. opacipennis* capturés à Salloum ; piste 3 à 10 : *C. opacipennis* capturés à Hammamet ; piste 11 : amplification effectuée sur ADN de cicadelle d'un élevage sain de Bordeaux. M : marqueur de taille 1 kb ; + : contrôle positif, amplification de l'ADN génomique de *S. citri*.

Tableau II.

Détection, par la technique PCR, de *Spiroplasma citri* chez des individus de *Circulifer opacipennis* capturés sur *Salsola kali* au cours de prospections effectuées en Tunisie.

Lieu de capture	Nombre de lots* positifs / nombre de lots testés
Carthage	3 / 10
Hammamet	6 / 23
Rafraf	6 / 17
Salloum	1 / 3

*lot de 2 cicadelles

- [3] Kaloostian G.H., Oldfield G.N., Pierce H., Leafhopper natural vector of citrus stubborn diseases, *Calif. Agric.* (1975) 29 (2) 14–15.
- [4] Fos A., Bové J.M., Lallemand J., Saillard C., Vignault J.C., Ali Y., Brun P., Vogel R., La cicadelle *Neolaliturus haematoceps* (Mulsant & Rey) est le vecteur de *Spiroplasma citri* en Méditerranée, *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.* (1986) 137A 97–107.
- [5] Rasooly R., Raccach B., Klein M., Laboratory transmission of the citrus stubborn disease agent by a leafhopper from the *Circulifer tenellus* complex from the Jordan valley, *Phytoparasitica* 22 (1994) 209–218.
- [6] Jamoussi D., Les viroses des citrus en Tunisie et les moyens de lutte, *Ann. de l'Inrat* 39 (2), 1966, 60 p.
- [7] Ribaut H., Homoptères Auchénorhynques II (Jassidae), Paul Chevalier, Faune de France, Paris, France, 1952, 474 p.
- [8] Della Giustina W., Homoptères Cicadellidae. Vol. 3 Compléments, Inra, Paris, France, 1989, 350 p.
- [9] Saillard C., Bové J.M., Application of Elisa to spiroplasma detection and classification, in: Tully J.G., Razin S. (Eds), *Methods in mycoplasmaology*, vol I, F10, Academic Press, New York, 1983, pp. 471–476.
- [10] Maixmer M., Ahrens U., Seemuller E., Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure, *Eur. J. Plant Pathol.* 101 (1995) 241–250.
- [11] Klein M., Raccach B., Morphological characterization of two populations of *Circulifer* (Homoptera: Cicadellidae) from Israel, *Israel J. Entomol.* (xxv–xxvi) (1991–1992) 97–103.
- [12] Baspinar H., Kersting U., Sengoca C., Uygun N., Studies on taxonomy, distribution and host plants of Turkish species of *Circulifer* Zakhvatkin (Homoptera: Cicadellidae), *Türk. Entomol. Derg.* 17 (3) (1993) 129–140.
- [13] Bové J.M., Virus and virus-like diseases of citrus in the Near East region, FAO, Rome, Italy, 1995, 518 p.
- [14] Klein M., Raccach B., Separation of two leafhopper populations of the *Circulifer haematoceps* complex on different host plants in Israël, *Phytoparasitica* 19 (2) (1991) 153–155.
- [15] Linnavuori R., A leafhopper material from Tunisia, with remarks on some species of adjacent countries, *Ann. Soc. Ent. France (N.S.)* 7 (1) (1971) 57–73.
- [16] Clark M.F., Flegg C.L., Bar-Joseph M., Rottem S., The detection of *Spiroplasma citri* by Enzyme-link Immunosorbent Assay (Elisa), *Phytopath. Z.* (92) (1978) 332–337.
- [17] Kersting U., Sengonca Ç., Çinar A., Detection of *Spiroplasma citri* in non-citrus host plants and their associated leafhopper vectors in southern Turkey, *FAO Plant Prot. Bull.* 40 (3) (1992) 89–94.

Presencia en Tunecia de *Spiroplasma citri*, el agente causal del stubborn de los agrios y de su vector, la cicadela *Circulifer haematoceps*. Contaminación de *C. haematoceps* y de *C. opacipennis* por *S. citri*.

Resumen — Introducción. El agente causal del stubborn de los agrios es el mollicuto *Spiroplasma citri*, de morfología helicoidal y dotado de motilidad. En las plantas, se halla presente únicamente en el floema y, en la naturaleza, es transmitido por cicadelas. En el marco de un proyecto nacional de selección de variedades de agrios, *S. citri* se investigó en Tunecia tanto en las plantas como en los insectos. **Material y métodos.** Se tomaron muestras de agrio en 4 regiones agrumícolas: Gobba, Hammamet, El Fahs y Bou Salem. Las capturas de cicadelas se realizaron en estas mismas regiones así como a lo largo de la costa de Gabès en Rafraf. Se realizaron tests ELISA con anticuerpos policlonales dirigidos contra *S. citri*. Para el método PCR, los cebos se escogieron en la secuencia del gen de la spiralina. **Resultados.** Por primera vez, en Tunecia, se evidenció *S. citri* en los agrios, en las cicadelas de la especie *Circulifer opacipennis*, capturadas únicamente en la chenopodiacea *Salsola kali*, y en las cicadelas de la especie *C. haematoceps*. **Discusión.** Para mejor controlar la enfermedad en las regiones de extensión del cultivo de los agrios en Tunecia, se tiene que realizar ahora un estudio más detenido de la epidemiología. (© Elsevier, Paris)

Túnez / Citrus / enfermedades de las plantas / vigilancia de enfermedades / vectores / organismos para control biológico

