

# UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie et Agroécologie

## THESE DE DOCTORAT En sciences agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

### ETUDE PROSPECTIVE DES ASPECTS ETIOLOGIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE DES DEPERISSEMENTS DES CITRUS DANS LA MITIDJA (ALGERIE)

Présentée par

**Mohammed BENZOHRA**

Devant le jury composé de :

S. SNOUSSI	Pr	Univ. Blida 1	Président de jury
M. TOUMI	Pr	Univ. Alger 1	Examineur
O. TOUMATIA	Pr	Univ. Alger 1	Examineur
M. BANI	MCA	ENSB. Constantine	Examineur
F. AMMAD	MCA	Univ. Blida 1	Directrice de thèse
M. BENCHABANE	Pr	Univ. Blida 1	Co- Directeur de thèse

Blida, Décembre 2022

## Résumé

### Etude prospective des aspects étiologique et épidémiologique des dépérissements des citrus dans la Mitidja (Algérie)

Le dépérissement des agrumes devient de plus en plus un problème très inquiétant dans la région de la Mitidja (Algérie). Pour cette raison, nous avons réalisé des études sur les aspects épidémiologiques et étiologiques du dépérissement dans 25 vergers d'agrumes répartis sur les cinq régions agrumicoles potentielles de la wilaya de Blida (Affroun, Mouzaia, Oued el-alleg, Boufarik et Larabaa) durant quatre années consécutives (2017/2020). Le diagnostic symptomatologique nous a permis de suivre l'évolution des symptômes qui apparaissent et évoluent selon deux situations, un dépérissement foudroyant et un dépérissement progressif. La surveillance des cas de dépérissement, a permis de constater la présence de plusieurs symptômes sur la végétation et les branches, tels que le jaunissement, le chancre et la défoliation. L'examen des coupes transversales de bois infecté a montré la présence de différentes formes de nécrose interne. Nous avons également enregistré un taux d'infection global de 23,28% représentant un indice de gravité de 1,77 sur une échelle de quatre degrés, et une incidence de 10,76%. Les analyses statistiques ont montré que les facteurs région, âge, porte-greffe, type d'irrigation et texture du sol avaient un effet très significatif sur la variation des paramètres épidémiologiques étudiés. Le comportement épidémiologique du dépérissement dans ces vergers confirme que la propagation de la maladie est favorisée par des techniques culturales telles que l'irrigation et la taille. Les isollements réalisés à partir des tissus nécrotiques des arbres infectés ont permis de détecter la présence d'une flore fongique diversifiée (*Botryosphaeriaceae* 62.39%, *Fusarium sp* 12.54%, *Colletotrichum sp* 12.54%, *Alternaria sp* 6.62% et *Eutypa sp* 3.98%). La caractérisation moléculaire a permis l'identification des espèces suivantes : *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Lasiodiplodia theobromae*., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria gaisen* et *Alternaria alternata*. Nous avons démontré aussi le potentiel pathogénique des espèces des *Botryosphaeriaceae* et des *Fusarium* sur des boutures fraîches d'agrumes.

Mots clé : Mitidja, Agrumes, Dépérissement, Epidémiologie, Etiologie, flore fongique, Pathogénicité.

## Abstract

### Prospective study of the etiological and epidemiological aspects of *citrus* dieback in Mitidja (Algeria)

Citrus dieback is increasingly becoming a very worrying problem in the Mitidja region (Algeria). For this reason, we carried out studies on the epidemiological and etiological aspects of dieback on 25 citrus orchards distributed over the five potential citrus regions of the wilaya of Blida (Affroun, Mouzaia, Oued el-alleug, Boufarik and Larabaa) during four consecutive years (2017/2020). The symptomatological diagnosis allowed us to follow the evolution of the symptoms which appear and evolve according to two situations, a sudden decline and a progressive decline which evolves partially and slowly. The monitoring of the cases of wasting, made it possible to note the presence of several symptoms on the vegetation and the branches, such as yellowing, canker and defoliation. The examination of the cross-sections of infected wood showed the presence of different forms of inner necrosis. We also recorded an overall infection rate of 23.28% representing a severity index of 1.77 on a scale of four degrees, giving an incidence rate of 10.76%. The statistical analyzes showed that the factors region, age, rootstock, type of irrigation and soil texture had a highly significant effect on the variation of epidemiological parameters. The epidemiological behavior of dieback in these orchards confirms that the spread of the disease is favored by cultural techniques such as irrigation and pruning. The isolations from the necrotic tissues of the infected trees put often in evidence the presence of a diversified fungal flora (*Botryosphaeriaceae* 62.39%, *Fusarium* 12.54%, *Colletotrichum* 12.54%, *Alternaria* 6.62% and *Eutypa* 3.98%). The molecular characterization allowed the identification of the species of *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* et *Lasiodiplodia theobromae*., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria gaisen* and *Alternaria alternata*. We also demonstrated the pathogenic potential of *Botryosphaeriaceae* and *Fusarium* species on detached healthy green shoots.

Key words: Mitidja, *citrus*, decline, epidemiology, etiology, fungal flora, pathogenicity.

## الملخص

دراسة استشرافية للجوانب الوبائية والمسببة لموت الحمضيات في الميثة (الجزائر)

أصبح موت الحمضيات على نحو متزايد مشكلة مقلقة للغاية في منطقة الميثة (الجزائر). لهذا السبب، قمنا بإجراء دراسات حول الجوانب الوبائية والمسببة لموت الحمضيات على 25 بستان موزعة على خمس مناطق في ولاية البليلة (العفرون ، موزاية ، وادي العلايق ، بوفاريك والاربعاء) لمدة أربع سنوات متتالية (2020/2019/2018/2017). سمح لنا تشخيص الأعراض بمتابعة تطور المرض الذي يظهر ويتطور وفقاً لحالتين ، موت مفاجئ وموت تدريجي يتطور جزئياً وبيبطء. إن رصد حالات المرض ، جعل من الممكن ملاحظة وجود عدة أعراض على الغطاء النباتي والفروع ، مثل الاصفرار والتقرح وتساقط الأوراق. أظهر فحص المقاطع العرضية للخشب المصاب وجود أشكال مختلفة من النخر الداخلي. كما سجلنا معدل إصابة إجمالي قدره 23.28% والذي يمثل مؤشر شدة قدرها 1.77 على مقياس من أربع درجات ، مما يعطي نسبة تأثير قدرها 10.76%. أظهرت التحليلات الإحصائية أن عوامل المنطقة ، والعمر ، وحامل الطعم ، وطريقة الري ، وقوام التربة كان لها تأثير كبير على تباين العوامل الوبائية. ويؤكد السلوك الوبائي لموت الأشجار في هذه البساتين أن انتشار المرض تحفزه التقنيات الفلاحية مثل الري والتقليم. غالباً ما تشير العزلات من الأنسجة الميتة للأشجار المصابة إلى وجود فطريات متنوعة (*Botryosphaeriaceae* 62.39% ، *Fusarium* 12.54% ، *Colletotrichum* 12.54% ، *Alternaria* 6.62% ، *Eutypa* 3.98%). سمح لنا التوصيف الجزيئي وتسلسل الحمض النووي الريبوزي التعرف على الأنواع التالية :

*Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*,  
*Lasiodiplodia theobromae* *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*,  
*Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria gaisen*, *Alternaria alternata*

لقد بينا أيضاً القدرة المرضية لسلاسل *Fusarium* و *Botryosphaeriaceae* على براعم خضراء منفصلة وشتلات.

الكلمات المفتاحية: الميثة ، الحمضيات ، موت الأشجار ، علم الأوبئة ، مسببات المرض ، الفلورا الفطرية ، القدرة المرضية.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à écrire un « MERCI » sincère à ma promotrice, **Dr Faiza Ammad** et mon co-promoteur **Pr. Messaoud BENCHABANE** qui je leur dois tout mon respect et ma considération. Mes mots ne seront jamais suffisants pour leur exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je salue leur amabilité, leur patience, leur disponibilité et leur souplesse d'esprit.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à **Pr. Sid Ahmed SNOUSSI** qui a gracieusement accepté de présider le jury, mais aussi pour ses encouragements et motivation. Que **Pr. Mohammed TOUMI**, **Pr. Omrane TOUMATIA** et **Dr. Mustapha BANI**, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer à l'expertise de cette thèse et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Un merci très spécial à l'ingénieur de laboratoire de mycologie, notre chère **Djamila FADIL**. Je la remercie énormément pour sa disponibilité, ses précieux conseils et ses encouragements. Je remercie également **Walid BOUARAR**, ingénieurs de laboratoire de virologie, pour leur disponibilité le long de la période de mes expérimentations.

Mes remerciements s'adressent également à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.

Ce travail est dédié à ma formidable famille : A ma très chère **Maman** et mon cher **papa**, qui ont toujours eu pour ceci majeur ma réussite et mon bonheur, maigres récompenses pour l'immense effort et sacrifice.

A ma femme et mes enfants Anes et Ichraq. Que Dieu vous garde et vous protège. Ames chère sœur.

Un grand merci à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Remerciements	
Table des matières	
Liste des illustrations, graphiques et tableau	
Liste des publications et communication nationales et internationales	
Introduction.....	12
Chapitre 1 : analyses bibliographiques.....	14
<b>I. Généralités sur l'agrumiculture.....</b>	<b>14</b>
I.1. Exigences climatiques.....	16
I.2. Exigences édaphiques .....	16
I.3. Importance économique.....	17
I.3.1. Dans le monde.....	17
I.3.2. En méditerranée .....	17
I.3.3. En Algérie.....	18
<b>II. Les maladies de dépérissement.....</b>	<b>19</b>
II.1. Les maladies à virus, à viroïdes et à phytoplasmes .....	19
II.1.1. La Tristeza .....	19
II.1.2. Les Psoroses.....	20
II.1.3. L'Exocortis.....	21
II.2. Les maladies bactériennes .....	21
II.2.1. Le Huanglongbin .....	21
II.2.2. La chlorose variéguée des agrumes (cva).....	22
II.2.3. Le chancre des agrumes.....	22
II.3. Dépérissement d'origine fongique.....	23
II.3.1. La fonte des semis.....	23
II.3.2. La gombose à <i>Phytophthora</i> .....	23
II.3.3. La pourriture fibreuse des racines.....	24
II.3.4. Les pourridiés .....	25
II.3.4.1. La pourriture à Armillaire.....	25
II.3.4.2. La pourriture sèche.....	26
II.3.5. Les pourritures dues aux <i>Botryosphaeriaceae</i> .....	27
II.3.6. L'Anthracnose.....	29
II.3.7. Le Mal secco.....	30
II.4. Dépérissement d'origine inconnu.....	31
II.4.1. Le Citrus Blight .....	31
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	33
<b>I. Etude épidémiologique.....</b>	<b>33</b>
I.1. Situation géographique et climatique de la région d'étude.....	33
I.1.1. Introduction .....	33
I.1.2. La wilaya de blida .....	33
I.2. Caractéristiques des vergers étudiés.....	34
I.3. Conduite culturale.....	36

I.4. Diagnostic symptomatologique.....	37
I.5. Paramètres épidémiologiques des dépérissements .....	37
I.5.1. Taux d'infection.....	37
I.5.2. Gravité de la maladie .....	38
I.5.3. Indice de McKinney .....	39
I.6. Analyse statistique .....	39
<b>II. Étude étiologique.....</b>	<b>39</b>
II.1. Méthode d'échantillonnage .....	40
II.1.1. Prélèvement des échantillons de bois .....	40
II.1.2. Recherche des fructifications des agents causals .....	40
II.2. Diagnostic au laboratoire .....	40
II.2.1. Milieux de culture .....	40
II.2.2. Isolement et recherche des agents causals.....	41
II.2.3. Observation et purification des cultures.....	41
II.2.4. Caractérisation culturelle .....	41
II.2.4.1. Caractérisation micro-morphologique.....	42
II.2.4.2. Induction de la sporulation .....	42
II.2.5. Caractérisation moléculaire.....	43
II.2.5.1. Extraction d'ADN.....	43
II.2.5.2. Amplification de l'adn par PCR .....	43
II.2.5.3. Séquençage et analyse des données.....	44
<b>III. Test de pathogénicité .....</b>	<b>44</b>
III.1. Préparation de matériel végétal .....	44
III.2. Matériel fongique.....	45
III.3. Réalisation de test de pathogénicité.....	45
III.3.1. Test du pouvoir pathogène des espèces de <i>fusarium</i> .....	45
III.3.2. Pouvoir pathogène de l'ensemble des espèces isolées sur les boutures vertes de citrus.....	46
III.3.3. Pouvoir pathogène de quelques espèces isolées sur les plantules de citrus.....	47
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	49
I. Etude épidémiologique.....	49
1. Descriptif symptomatologique.....	49
1.1 Etat des vergers.....	49
1.2 Mode de dépérissement .....	50
1.2.1 Dépérissement rapide .....	50
1.2.2 Dépérissement progressif.....	51
1.3 Symptômes sur la végétation .....	51
1.3.1 Symptômes sur le tronc et les branches.....	51
1.3.2 Symptômes sur les racines .....	51
1.3.3 Symptômes sur les plants remplaces.....	51
1.3.4 Symptômes de l'antracnose.....	51
1.3.5 Description des symptômes sur bois.....	51
2. Distribution spatiale des cas de dépérissement .....	59
3. Paramètres épidémiologiques.....	61
3.1 Estimation des paramètres épidémiologiques.....	61

3.2	Evolution des classes de dépérissement.....	64
3.3	Variabilité épidémiologiques dans les différentes régions .....	65
3.3.1	Indice de gravité.....	65
3.3.2	Taux d'infection.....	66
3.3.3	Taux d'incidence.....	67
3.4	Influence des facteurs étudiés sur les indices épidémiologiques... ..	68
3.5	Etudes des variations temporelles des indices épidémiologiques..	69
3.5.1	Taux d'infection .....	69
3.5.2	Taux d'incidence.....	70
4.	Discussion .....	71
<b>II.</b>	<b>Etude étiologique .....</b>	<b>77</b>
II.1.	Caractérisation et identification des isolats fongiques.....	77
II.1.1.	Caractérisation morphologiques et micro-morphologiques .....	77
II.1.1.1.	Famille des Botryosphaeriaceae.....	77
II.1.1.2.	La flore Fusarienne.....	78
II.1.1.2.1.	<i>Fusarium solani</i> .....	78
II.1.1.2.2.	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	79
II.1.1.3.	<i>Eutypa sp</i> .....	85
II.1.1.4.	<i>Alternaria sp</i> .....	86
II.1.1.5.	<i>Colletotrichum sp</i> .....	87
II.1.2.	Caractérisation moléculaire .....	88
II.1.2.1.	Its (internal transcribed spacer).....	88
II.1.2.2.	Alpha élongation factor ( $\alpha$ e-f) .....	88
II.2.	Aspect quantitatif et qualitatif des isoléments fongique.....	89
II.2.1.	Fréquences d'isolement des champignons en fonction des régions	89
II.2.2.	Fréquences d'isolement des champignons en fonction des variétés	90
II.2.3.	Fréquences d'isolement des champignons en fonction des types des nécroses.....	91
II.3.	Test de pathogénicité.....	92
II.4.	Discussion.....	100
	Conclusion .....	107
	Références bibliographiques.....	110
	Annexes .....	121
	Publication internationales	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Symptomes de la Tristiza .....	20
Figure 1.2 : symptômes de la gommose à <i>Phytophthora</i> .....	25
Figure 1.3 : symptômes de la pourriture seche racinaire.....	27
Figure 1.4 : Symptômes de la pourriture à <i>Botryospheariacée</i> .....	29
Figure 1.5 : Symptômes de dépérissement à <i>Colletotrichum</i> .....	30
Figure 1.6 : Symptômes du Mal secco.....	32
Figure 2.1: Localisation géographique de la zone d'étude.....	34
Figure 2.2 : Test de pathogénicité.....	48
Figure 3.1: Symptomes de dépérissement rapide .....	50
Figure 3.2 : Symptomes de dépérissement progressif .....	51
Figure 3.3 : Symptomes sur tronc et branches charpentières .....	52
Figure 3.4: Symptomes sur les racines .....	53
Figure 3.5 : Symptômes de dépérissement des plants remplacés .....	54
Figure 3.6 : Symptômes de dépérissement à <i>Colletotrichum</i> .....	55
Figure 3.7 : Différentes necroses sur tronc et branches charpentière .....	57
Figure 3.8 : Différentes necroses sur tronc et branches charpentière (suite).....	58
Figure 3.9: Cartes de répartition des cas de dépérissement dans les différents vergers.	60
Figure 3.10 : Taux d'infection, gravité et incidence dans les cinq régions étudiées.....	61
Figure 3.11 : situation générale des vergers étudiés selon différentes classes de dépérissement.....	64
Figure 3.12: analyse en composante principale (ACP) de l'indice de gravité des régions étudiées.....	66
Figure 3.13 : analyse en composante principale (ACP) de l'indice du taux d'infection des régions étudiées.....	67
Figure 3.14 : analyse en composante principale (ACP) de l'indice du taux d'incidence des régions étudiées.....	68
Figure 3.15 : analyse en composante principale (ACP) pour l'influence des facteurs étudiés sur les indices épidémiologiques.....	69
Figure 3.16 : Aspect macroscopique des isolats de <i>Botryospheariacée</i> .....	80
Figure 3.17 : Caractère microscopique des isolats de Botryospheariacée .....	81
Figure 3.18: Les déférentes fructifications sur écorce.....	82
Figure 3.19 : aspect microscopique et macroscopique de <i>Fusarium solani</i> sur milieu PDA.....	83
Figure 3.20: caractéristiques microscopique et macroscopique de <i>Fusarium oxysporum</i> sur milieu PDA.....	84
Figure 3.21 : Caractère macroscopique et microscopique d' <i>Eutypa</i> .....	85
Figure 3.22: Vue microscopique et macroscopique d' <i>Alternaria</i> sp sur milieu PDA ...	86
Figure 3.23 : Vue macroscopique et microscopique de <i>Collelotrichum</i> sp sur milieu PDA.....	87
Figure 3.24 : test de pathogénicité des isolats de <i>Fusarium</i> inoculés sur des boutures fraiches des agrumes.....	95

Figure 3.25 : lésions nécrotiques provoquées par les espèces fongiques inoculés sur l'entre nœud et l'apex des boutures vertes prélevées de Citrus sinensis 'Thomson' et Citrus clementina.....	96
Figure 3.26 : longueur des lésions sur les boutures de thomson et de clémentinier selon le type d'inoculation.....	97
Figure 3.27 : longueur des lésions en bas et en haut du point d'inoculation sur les boutures de thomson et de clémentinier après trois mois d'incubation.....	97
Figure 3.38 : Symptômes de test de pathogénicité sur les plantules de Thomson et de Clementinier.....	99
Tableau 1.1 : Grille de sélection d'un porte-greffe en fonction des aptitudes recherchées.....	15
Tableau 2.1: caractéristiques des vergers étudiés.....	35
Tableau 2.2 : Echelle d'évaluation des symptômes du dépérissement.....	38
Tableau 3.1: Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région de Boufarik.....	61
Tableau 3.2: Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région d'Oued El-Alleug.....	62
Tableau 3.3: Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région de Mouzaia.....	63
Tableau 3.4: Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région de Larabaa.....	63
Tableau 3.5: Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région d'Afroun.....	64
Tableau 3.6 : Analyse de la variance selon le modèle G.L.M.....	70
Tableau 3.7 : Analyse de la variance selon modèle G.L.M.....	71
Tableau 3.8: fréquences d'isolement de la flore fongique associé au dépérissements selon les régions prospectées.....	90
Tableau 3.9: nombre d'isolats et fréquences d'isolement selon les variétés.....	91
Tableau 3.10: Nombre d'isolat fongique selon le type de nécrose.....	92

# LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES

## Publication internationales

Mohammed Benzohra., Faiza Ammad., Messaoud Benchabane. Incidence and epidemiology of wood disease in Algerian citrus orchards. South Asian J Exp Biol; 12 (4): 522-532; 2022

## Communications nationales et internatinales

1. Mohammed BENZOHRA., Faiza AMMAD., Messaoud BENCHABANE. "5 International Conference on Computational and Experimental Science and engineering (ICCESEN-2018). Antalya, Turkey (2018=.
2. Mohammed BENZOHRA., Faiza AMMAD., Messaoud BENCHABANE. Isolation and identification of fungal flora associated with citrus dieback and the highlighting of the antagonist microflora in the Mitidja region. 3<sup>rd</sup> Africa-International Allelopathy Congress, Blida **(2018)**.
3. Mohammed BENZOHRA., Faiza AMMAD., Messaoud BENCHABANE. Isolation and identification of fungal flora associated with citrus dieback in the Mitidja region. First international "Microbes for Life" Webinar, Algiers, Algeria (2021).

## INTRODUCTION

L'agrumiculture est considérée parmi les trois principales cultures fruitières stratégiques dans le monde. En valeur monétaire, elle représente le groupe de fruits le plus important du commerce international avec une production mondiale qui a dépassé 98 millions de tonnes en 2020 [1]. La pratique de cette culture en Algérie date de l'époque coloniale. Les vergers d'agrumes se concentrent principalement dans les plaines irrigables de la Mitidja qui est classée comme la première zone arboricole en Algérie, La wilaya de Blida représente la grande partie de cette plaine [2].

Autrefois, l'Algérie était classée parmi les plus grands producteurs d'agrumes dans le monde, avec une valeur ajoutée considérable [3]. L'agriculture algérienne et notamment l'agrumiculture est sujette à plusieurs problèmes liés à des obstacles d'ordre technique et phytosanitaire. En Algérie, le secteur agrumicole constitue un élément très important de développement agricole, mais la situation dans laquelle se trouve ce secteur nécessite la mise en œuvre des plans de réhabilitation.

Malgré les efforts fournis suite au lancement du programme national de développement agricole (PNDA) en 2000/2001 qui a permis l'extension de la culture des agrumes et l'augmentation de la production, les rendements à l'hectare restent loin des objectifs visés par le ministère de l'agriculture et de développement rural (MADR), en comparaison avec les potentialités déployées. Le vieillissement des vergers, l'arrachage anarchique, le manque de main d'œuvre, le mode de conduite inadéquat et surtout l'état sanitaire seraient à l'origine des baisses enregistrées dans la productivité des vergers d'agrumes ces dernières années [4]. Parmi les maladies les plus redoutables sur les agrumes, les dépérissements sont considérés les plus dommageables sur les potentialités de production et menacent gravement le patrimoine agrumicole.

Plusieurs situations de dépérissement ont été signalées dans le monde, telles que la Tristeza en Espagne [5] et le mal secco en Italie [6, 7] qui ont été nettement identifiées. D'autres situations n'ont pas trouvé une réponse précise ; le cas du Citrus Blight en Floride (USA) [8]. Ces dernières années la zone de la Mitidja a connu une forte attaque de dépérissement des agrumes qui touche l'ensemble des vergers agrumicoles.

Ce dépérissement cause des pertes économiques très inquiétantes, les jeunes sujets de moins de 5 ans ainsi que les arbres en production se sont montrés les plus sensibles [9, 10].

En Algérie, les études sur le dépérissement des agrumes remontent au début de l'année 2006 [9, 10, 11, 12]. Il en ressort de ces études que la situation est très inquiétante. En effet, des taux de dépérissement de plus de 35 % ont été enregistrés dans les régions de Blida, Alger et Tipaza. Dans certaines localités de ces régions, des arrachages massifs ont été exécutés, même un changement de vocation agricole a été effectué en remplaçant les vergers d'agrumes par des cultures maraichères suite à l'échec des opérations de remplacement des arbres dépéris. L'ensemble de ces études a révélé, après des diagnostics phytopathologiques, l'absence d'une causalité virologique ou bactériologique ; orientant ainsi les origines vers une causalité fongique d'origine tellurique.

Dans la continuité de ces travaux scientifiques sur ce problème de dépérissement, notre travail consiste à réaliser une étude sur le dépérissement des agrumes portant sur les aspects épidémiologiques et étiologiques. L'enquête épidémiologique s'est effectuée dans la wilaya de Blida sur quatre campagnes agricoles consécutives (2017, 2018, 2019 et 2020), au niveau de 25 vergers situés dans cinq régions connues par leur vocation agricole (Afroun, Mouzaia, Oued ElAlleug, Boufarik et Larabaa).

L'objectif de notre étude consiste à l'évaluation de la gravité des dépérissements à travers l'estimation des taux d'infection, d'incidence et l'indice de gravité de dépérissement dans les vergers étudiés.

Dans une deuxième étape, des études microbiologiques appropriées (étiologique suivi par des tests de pathogénicité) ont été menées pour l'identification d'éventuelles flores fongiques associées à l'étiologie de ces dépérissements.

# CHAPITRE 1. Données bibliographiques

## I. Généralités sur l'agrumiculture

Les agrumes sont des angiospermes dicotylédones à feuilles persistantes qui sont sexuellement compatible et sont sujets à des mutations. Ils appartiennent à la famille des Rutacées qui comprend trois genres : *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* [13]. Les *Poncirus* regroupent quelques espèces qui ne produisent pas de fruits comestibles, mais sont utilisés comme porte-greffes car ils confèrent une certaine résistance ou tolérances intéressantes. Les *Fortunella* produisent des petits fruits qui se dégustent avec l'épicarpe comme le Kumquats. Les *Citrus* regroupent la plupart des espèces d'agrumes cultivées et renferment plus de 156 espèces. Les principaux agrumes cultivés pour la production de fruits sont : les oranges, les citrons, les limes, les pomelos et les petits agrumes (clémentines et mandarines...) [14].

La pratique du greffage chez les agrumes s'est généralisée au début du dix-neuvième siècle et avait pour objectif initiale la lutte contre le dépérissement dû à un champignon du sol [13,14, 16]. Les recherches réalisées depuis ce temps ont permis de sélectionner des porte-greffes qui agissent sur l'adaptation de l'arbre aux conditions pédoclimatiques, sur ses performances agronomiques et sur sa sensibilité à de nombreuses maladies. Ces travaux ont permis d'élaborer une grille simplifiée des porte-greffes, évalués par rapport à leur réponse à diverses contraintes [14,15, 16] (Tab 1.1).

Sous climat méditerranéen, la croissance des agrumes est discontinue, vu qu'en période hivernale, l'arbre cesse toute croissance visible : il entre en état de dormance, qui est en fait un pseudo-repos végétatif car un certain nombre d'activités métaboliques internes se poursuivent. Nous notons trois phases principales annuelles de croissance et de renouvellement végétatif chez les agrumes, appelées : pousse de printemps, pousse d'été et pousse d'automne. (14,15,16).

**Tableau 1.1** : Grille de sélection d'un porte-greffe en fonction des aptitudes recherchées [14, 16].

<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Détail des observations
Conduite en pépinière	F	F	D	F	M	F	-	F	M	TD	D	F	F	F	F : facile D : difficile TD très difficile M : moyen
<b>Caractéristiques du sol et de l'eau</b>															
Terre sableuse	B	M	M	N	N	M	M	B	N	N	M	-	M	B	B : bien adapté
Terre limoneuse	M	M	B	B	M	N	N	N	B	B	M	M	B	M	M : moyennement adapté
Résistance sècheresse	B	M	M	M	M	M	M	B	N	N	M	M	M	B	N : non adapté
Sol calcaire	B	M	M	N	N	N	N	M	N	M	B	M	-	M	
<b>Maladies et ravageurs du sol</b>															
<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Détail des observations
phytophthora	R	R	R	T	T	T	R	S	T	R	S	T	T	S	R : résistant T : tolérant
Pourridiés	R	R	R	S	S	-	-	R	T	T	S	T	T	S	M : moyennement sensible S : sensible
Nématodes	S	S	S	-	M	M	M	S	T	T	S	S	-	M	
<b>Maladies d'association</b>															
<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Détail des observations
Blight	S	M	-	S	S	M	M	S	S	-	M	-	-	S	R résistant T tolérant
Tristiza stricte	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	M moyennement sensible S sensible
Exocortis	T	T	T	S	S	M	T	T	S	S	T	T	-	S	
<b>Viroses affaiblissant le bois</b>															
<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Détail des observations
Psorose	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	-	S	T	S	R : résistant T : tolérant
Xyloporose	S	T	-	T	T	T	-	M	T	T	T	S	-	S	M : moyennement sensible S : sensible
Tristiza Stem pitting	S	-	-	T	T	T	T	T	R	R	T	M	T	S	
1. Allemow citrus macrophylla 2. Bigaradiers communs 3. Bigaradier Gou Tou 4. Citrange Carrizzo 5. Citrange Troyer 6. Citrumelo 4475											7. Citrumelo Sacaton 8. Citrus Volcameriana 9. Poncirus Trifoliata 10. Poncirus Trifoliata flying-Dragon 11.Mandarine Cléopâtre 12.Tangelo Orlando	13.Mandarine Fuzhu 14.Lime Rangpur			

### **I.1. Exigences climatiques**

Les agrumes présentent une grande capacité d'adaptation à des conditions climatiques très différentes. La culture des agrumes est possible partout où la température moyenne de l'année est supérieure à 13°C et inférieure à 39°C. Les températures moyennes favorables à la culture des agrumes sont de l'ordre de 10 à 12 °C pour les moyennes hivernales et de 22 à 30 °C pour les moyennes estivales. Les basses températures sont néfastes aux agrumes. A moins de 3°C, le gel peut affecter le feuillage, les jeunes pousses et même les rameaux. D'autre part, les températures élevées au moment de la floraison sont très endommageables pour les fleurs. Les Vent sont l'ennemi redoutable des citrus, ils provoquent la chute des fleurs, des fruits, des feuilles et arrivent même à dégarnir les rameaux [13,14,15].

Les agrumes sont des cultures d'origine tropicale, donc elles sont exigeantes en eau, une moyenne de 1200 mm par an est nécessaire pour le bon déroulement du cycle de culture dans le bassin méditerranéen. La satisfaction des besoins en eau des vergers est étroitement liée à la nature du sol, à la climatologie locale, ainsi qu'à l'âge des arbres [14,15,16].

### **I.2. Exigences édaphiques**

Généralement, les arbres fruitiers sont plus exigeants surtout en caractéristiques physiques du sol et moindre par rapport aux caractéristiques chimiques qui peuvent être corrigées par des apports d'engrais et d'amendements. Pour les agrumes, les sols doivent être profonds et de préférence ni trop léger ni trop lourd. Les premiers retiennent insuffisamment l'eau et les éléments minéraux ; les seconds ralentissent la croissance racinaire et favorisent les maladies cryptogamiques. Dans le cas des sols argileux, il est conseillé d'installer un système de drainage ou pratiquer la culture sur buttes afin de favoriser une bonne aération du sol [14,16].

Les agrumes craignent les sols riches en calcaire actif, le taux de ce dernier ne doit pas dépasser 12 %. Le pH du sol doit être voisin de la neutralité (entre 6 et 7), en pH alcalin, l'absorption des oligo-éléments, devient déficiente et les agrumes manifestent des carences en ces éléments. C'est à cet effet que le choix du porte-greffe est l'un des

facteurs essentiels de réussite car il peut conférer à la plante une tolérance à certaines maladies et contraintes abiotiques (salinité, pH, froid, sécheresse, calcaire...) [14,16].

### **I.3. Importance économique**

#### **I.3.1. Dans le monde**

Les agrumes présentent un intérêt économique important pour un grand nombre de pays à travers le monde. Selon les données statistiques de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), en 2020 plus de 137 pays produisaient des agrumes avec une récolte annuelle mondiale qui a dépassé les 98 million de tonnes, ce qui représente plus de 21% de la production fruitière mondiale totale en deuxième place derrière le groupe des bananes [1,17]. Les oranges constituent la majeure partie de la production d'agrumes avec plus de 60 % suivi par les Petits agrumes « Mandarines et Clémentines » avec 23 %, les Citrons et Limes avec 13 % et le Pomelos avec 4 % dont les principaux pays producteurs d'agrumes sont la Chine, le Brésil, les pays du bassin méditerranéen et l'Inde. Ces pays comptent plus des deux tiers de la production totale d'agrumes [1, 17]. Cette place prépondérante qu'elle occupe, s'explique par le fait qu'en plus de leur consommation en produit frais, ces fruits sont aussi couramment utilisés dans la transformation alimentaire industrielle et domestique [17].

#### **I.3.2. En méditerranée**

La méditerranée s'est spécialisée dans le commerce mondiale des agrumes frais, d'une part, la climatologie particulière de cette vaste région, aux hivers frais, permet de produire des oranges et petits agrumes d'une coloration typique et d'une saveur appréciée [17]. D'autre part, cette zone est aussi exempte de certaines maladies de quarantaine qui sévissent dans d'autre région du monde. Ainsi, en fruits frais, le bassin méditerranéen contrôle plus de 60 % de commerce mondiale des oranges et des citrons (hors limes) et plus de 70 % de celui de petits agrumes. Cependant, le débouché industriel, même s'il n'est généralement pas dominant est un élément clé de l'équilibre économique des filières méditerranéenne [1,17]. Il permet de réguler les volumes proposés sur le marché du frais et de valoriser les sous produits des chaines de conditionnement [1,17]. Les principaux producteurs et exportateurs d'agrumes dans la

méditerranée sont : l'Espagne, le Maroc, la Turquie, l'Italie, l'Egypte, la Grèce et la Tunisie [17].

### **I.3.3. En Algérie**

L'agrumiculture en Algérie est très ancienne, elle a été introduite bien avant la Période coloniale [19]. Dans les années quatre-vingt-dix, la production annuelle d'agrumes est estimée de 360 000 tonnes [18]. L'Algérie se trouve ainsi placée au dixième rang mondial et compte parmi les grands producteurs du bassin méditerranéen [18]. Les statistiques les plus récentes fournies par le ministère de l'agriculture et de développement rural (MADR) en 2020 évaluent à 75 592 ha la superficie consacrée aux agrumes en Algérie dont 64 935 ha sont en rapport, assurant une production de 15 643 462 qx avec un rendement de 241 qx/ha (Annexe A). Elles sont localisées en grande partie dans la région Centre où elle occupe 33 344 ha [2].

Selon les statistiques établis par le ministère de l'agriculture et du développement rural, la plaine de la Mitidja, comptabilise 41 % de la superficie agrumicole totale et contribue avec 43 % dans la production nationale des agrumes. Les superficies agrumicoles de la wilaya de Blida représentent la grande partie de cette plaine, elles dépassent les 19 304 ha en assurant une production de 4 254 604 qx dont la production des oranges est la plus dominante [3].

Le verger agrumicole national est d'un âge relativement avancé, avec d'importantes répercussions sur le niveau actuel des rendements ainsi que sur l'évolution future de la production. Près de 55% de la surface du verger est constitué d'arbres âgés de plus de 30 ans, 7% de plus de 50 ans dont la productivité est en dessous du seuil de rentabilité économique [20].

## II. Les maladies de dépérissement

Dans le monde, les limitations les plus sérieuses de la production rentable des agrumes, sont les maladies causées par les bactéries, les champignons et les virus. Ces maladies peuvent provoquer le dépérissement total des arbres et limitent sérieusement la production. Nous désignons par maladies de dépérissement des affections variables par leur nature, aboutissant le plus souvent à la mort de la plante entière. En plus de ces maladies, il y a d'autres problèmes tels que la gommose à phytophthora et les pourridiés, qui exigent un programme de contrôle. [21].

### II.1. Les maladies à virus, à viroïdes et à phytoplasmes

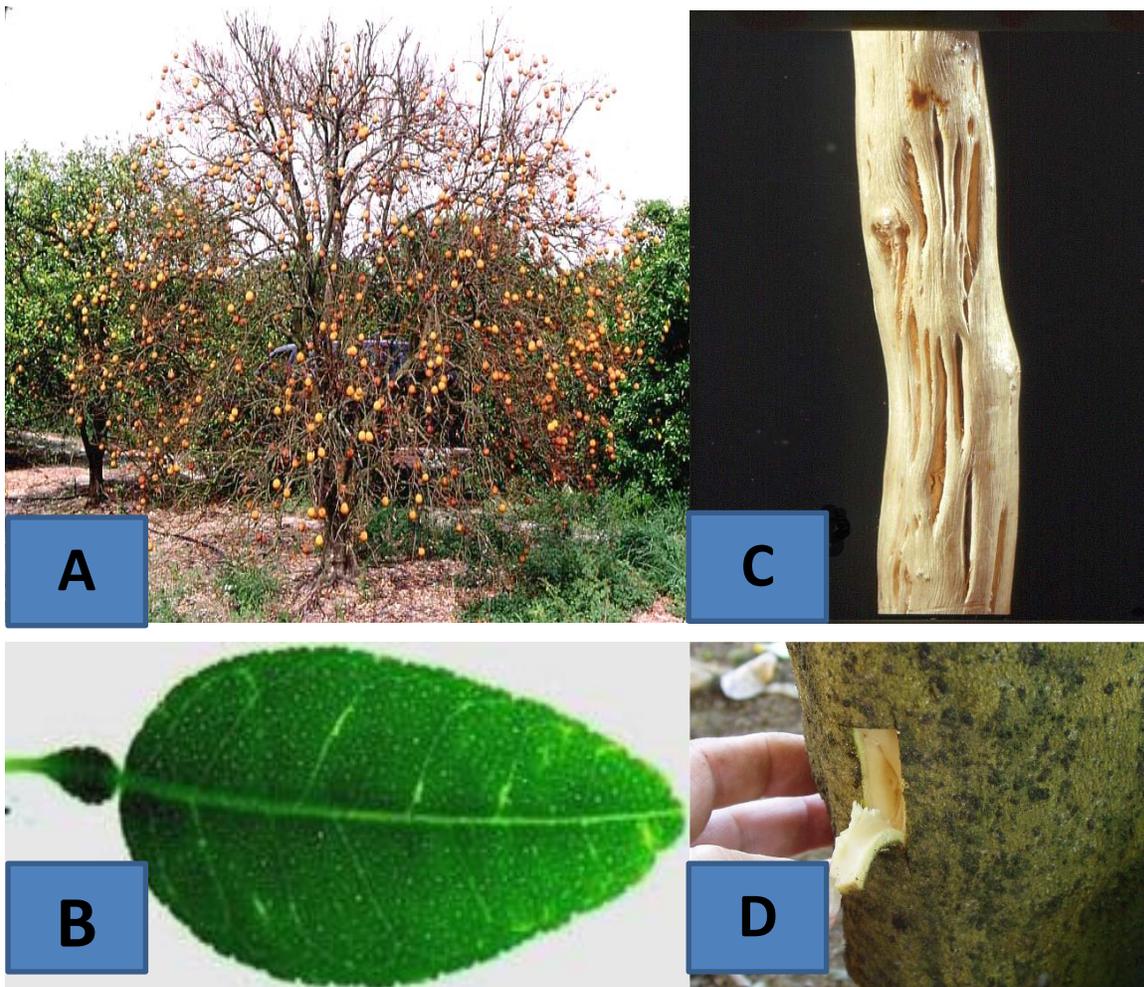
Historiquement, les maladies virales sont considérées comme les plus graves affections qui peuvent atteindre les agrumes car elles sont responsables de troubles qui diminuent, non seulement la productivité des arbres sur les plans qualitatifs et quantitatifs, mais aussi leur longévité. La Tristiza (*Citrus Tristiza Virus*) (CTV) a été parmi les problèmes majeurs, en soulignant que le complexe de Psorose ainsi que les viroïdes sont les plus importants facteurs limitant la production des agrumes [22].

#### II.1.1. La Tristeza

Le *Citrus Tristiza Virus* (CTV) est la maladie la plus grave, car elle est responsable de la mort de plusieurs millions d'arbres dans les pays où elle s'est propagée (Etats-unis, Brésil, Espagne, Argentine et Afrique du sud) [5]. C'est une maladie d'association car elle affecte tous les Citrus greffés sur le porte-greffe bigaradier, sauf pour le cas du citronnier/bigaradier qui est une association tolérante à la maladie. Le verger d'agrumes algérien est menacé par cette grave virose, d'autant plus que le porte-greffe généralement utilisé est le bigaradier, très sensible à cette maladie [24,25].

La propagation de la maladie se fait par bois de greffage et par plusieurs espèces de pucerons selon le mode semi-persistant. Les symptômes du CTV sont extrêmement variables et dépendent de la souche virale, de l'hôte, de l'environnement, et du rapport de greffon / porte greffe [29]. Le symptôme le plus foudroyant de la tristeza est la mort brutale (Quick Decline) affectant l'oranger (Fig 1.1. A), les mandariniers et les pomelos greffés sur bigaradier [5]. Le bois strié (Stem-Pitting) est le symptôme typique de la

maladie, il est observé généralement sur limettiers, pomelos et certaines variétés d'orangers (Fig 1.1.C). Nous pouvons détecter aussi d'autres symptômes, dénommés « Inverse-stem-pitting » (Fig 1.1.D), au niveau de la face interne de l'écorce du porte-greffe et le « Vein clearing » qui consiste en l'éclaircissement en tiret des nervures foliaires (Fig 1.1.B). Les associations porte-greffe/greffon sensibles au CTV donnent des symptômes similaires à ceux causés par certaines maladies des racines et du collet, à savoir un jaunissement des feuilles, un arrêt de croissance et chute anormale des feuilles [26,27,28,29].



**Figure 1.1** : Symptômes de la Tristiza sur orange ; A : Le déclin rapide ;B : Eclaircissement des nervures ;C : Bois strié (stem pitting) ; D : Formation non visible de crêtes sous l'écorce (stem pitting) [27, 28, 29]

### II.1.2. Les Psoroses

La Psorose des agrumes est la première maladie de type virale des agrumes identifiée et décrite par Fawcett. Elle a été observée pour la première fois en Floride et en Californie au début des années 1890 [30,32]. Beaucoup de phytopathologistes pensent que cette affection est due à un complexe de maladies qui partagent des symptômes communs ; c'est ainsi qu'ils ont regroupé les psoroses sous le nom de « *Citri-*vir* psorosis* » dont il existe plusieurs types, chacun étant responsable d'une forme de Psorose [31,32,33,34].

La maladie se traduit par un écaillage spectaculaire de l'écorce du tronc et des branches des orangers, mandariniers, clémentiniers, tangelos et pomelos. [31]. La greffe constitue la seule source de contamination actuellement connue. Notons que la greffe, même entre racines, engendre la maladie, à condition que l'un des sujets soit psorosé [31,33,34].

### II.1.3. L'Exocortis

La maladie de l'Exocortis est causée par le viroïde *Citrus exocortis viroid* (CEVd), Ce viroïde est caractérisé par sa transmission par les outils de taille et par le greffage. Elle ne se manifeste en orangerie que sur les arbres greffés sur *Poncirus trifoliata* et les citranges. [30, 35,36].

Les symptômes en orangerie sont facilement reconnaissables. Il se manifeste sur le porte-greffe par un écaillage plus ou moins prononcé de l'écorce suivant la virulence de la souche de viroïde. Cet écaillage entraîne des perturbations à la circulation de la sève, le développement de l'arbre est entravé ce qui provoque un certain nanisme. Les feuilles jaunissent et tombent, les pousses annuelles sont réduites et les productions sont compromises [35,36].

## II.2. Les maladies bactériennes

Parmi les bactéries phytopathogènes qui menacent le patrimoine agrumicole, nous citons :

### II.2.1. Le Huanglongbin (HLB)

Cette maladie est due à une bactérie (*Candidatus Liberibacter*) située exclusivement dans les tubes criblés du phloème des plantes atteintes. Il existe deux formes de HLB qui s'attaquent à une gamme de plantes identique mais se distinguent par la température à laquelle leurs symptômes sont les plus virulents [37]. L'agent causal du HLB est transmise par deux espèces de psylles: *Trioza erythrae* et *Diaphorina citri* [37].

Les symptômes de la forme asiatique du HLB sont la chlorose des feuilles. En général, les premiers symptômes n'apparaissent que sur un secteur ou une branche de l'arbre. La chlorose se répand et présente des symptômes proches de ceux d'une carence en zinc. On constate un dépérissement des rameaux, l'arbuste contaminé dépérit jusqu'à devenir non productif, le fruit est petit, asymétrique, sa base reste souvent verte, les graines avortent et le goût du fruit devient amer [37].

### II.2.2. La Chlorose variéguée des agrumes (CVA)

La chlorose variéguée des agrumes est causée par *Xylella fastidiosa*, une bactérie fastidieuse Gram-négative confinée au xylème, [38].

Les symptômes de la CVA sont visibles sur les feuilles, les branches et les fruits qui commencent généralement par une chlorose qui s'apparente à une carence en zinc et se manifeste sur un secteur de l'arbre. La face inférieure de la feuille présente une lésion renflée gommeuse, tandis que la face supérieure est atteinte d'une chlorose jaune correspondante [38, 39, 40], les nouvelles feuilles raccourcissent, la plupart pointant vers le haut, Les rameaux dépérissent, la taille du fruit diminue considérablement et son écorce devient dure. La bactérie est transmissible par plusieurs espèces d'insectes piqueurs-suceurs ; les plus importants sont *Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai*, et *Oncometopia fascialis* [41, 42].

### II.2.3. Le chancre des agrumes

Le chancre bactérien est une maladie très grave sur les agrumes dans le monde entier. L'agent causal de la maladie est la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) [43, 44]. Cette maladie produit essentiellement des

taches et des lésions sur les feuilles, les tiges et le fruit. Les premières lésions apparaissent sous la forme de petites taches chlorotiques qui se transforment, en s'élargissant, en lésions présentant des centres nécrosés entourés d'un halo chlorotique. Les lésions anciennes ont souvent l'aspect du liège. La prévalence de lésions chancreuses entraîne l'abscission de la feuille, la chute du fruit et le dépérissement du rameau [43, 44, 45, 46].

La maladie est très grave dans les zones à température élevée (14-38°C) et à pluviosité élevée (plus de 1000 mm par année) pendant la période de végétation. L'infection est également favorisée par des vents dépassant 6,5 m s<sup>-1</sup> et par les blessures. C'est une maladie des zones tropicales et subtropicales, mais elle peut aussi se produire et s'établir dans des zones tempérées ou arides, en absence de mesures de lutte adéquates [47, 48].

### **II.3. Dépérissement d'origine fongique**

Les maladies d'origine cryptogamique s'attaquant aux agrumes sont assez nombreuses. Certaines sont économiquement très importantes, comme la gombose parasitaire, le mal secco et les pourridiés. En effet, grâce à un diagnostic précoce d'une part, et à toute une gamme de fongicides d'autre part, ces affections peuvent être maîtrisées, à condition qu'elles soient traitées au début de l'attaque. Plus la maladie est avancée, moins la lutte est aisée. [42, 49].

#### **II.3.1. La Fonte des semis**

Les agents pathogènes de cette maladie sont des champignons d'origines telluriques ; *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* et *Phytophthora*. C'est une affection qui touche les plus jeunes plants élevés à partir de la graine en pépinière. La maladie se manifeste par la destruction de la tige au niveau de sol, ce qui entraîne le flétrissement, la pourriture et ensuite le dessèchement ou fonte complète des semis. La dissémination de ces agents fongiques est sous forme de « tache d'huile » en présence des conditions optimales à leur croissance; température entre 10 et 30°C, humidité élevée et un faible taux de lumière [50].

### II.3.2. La gommose à *Phytophthora*

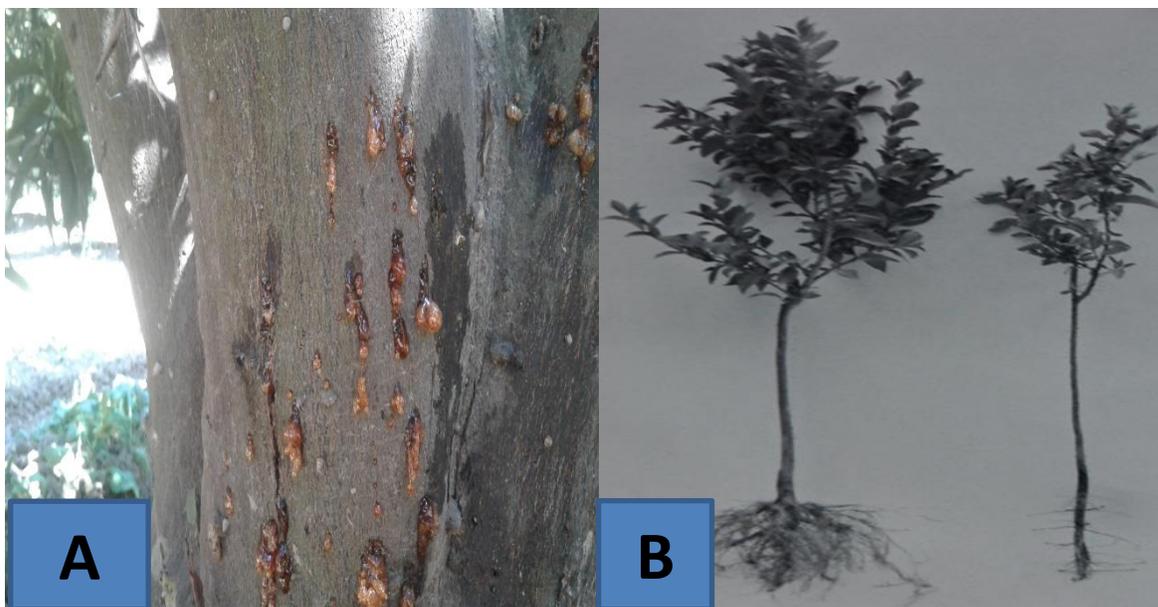
La gommose à phytophthora est l'une des maladies les plus redoutables; rencontrée dans l'ensemble des régions où les agrumes sont cultivés, elle présente des appellations différentes selon les régions [51]. Cette grave maladie est due à un Champignon appartenant au groupe des Péronosporales, du genre *Phytophthora*, dont il existe diverses espèces parasites d'agrumes, notamment : *Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica*[52].

Selon (Wyss ; Graham et Timmer) [50, 53] dans le cas des attaques avancées, le champignon infecte les racines, le collet et le tronc, les branches, les rameaux, les feuilles, les fleurs et même les fruits. L'arbre infecté réagit par des sécrétions de gommages ayant une odeur acide qui obstrue les vaisseaux de la plante, engendrant un arrêt de la circulation de la sève (Fig 1.2). Les parties de l'arbre qui ne sont plus desservies par la sève perdent leurs feuilles, se dessèchent et meurent. Les attaques du collet sont considérées comme les plus graves. La surface des zones attaquées de l'écorce devient humide; la pourriture s'installe et gagne en étendue et en profondeur. Les zones atteintes brunissent et ne tardent pas à se dessécher et se craqueler [54].

### II.3.3. La Pourriture fibreuse des racines

La pourriture fibreuse des racines (Fibrous root rot ou *Phytophthora* root rot) cause la destruction du cortex des racines de nutrition, en laissant la partie centrale de racine intacte (fibres), plusieurs espèces de *Phytophthora spp* sont associées à cette pourriture [55]:

Les deux espèces *Phytophthora nicotianae* et *Phytophthora citrophthora* sont fortement impliquées dans cette pourriture. Les symptômes spécifiques pour cette affection se manifestent par un jaunissement généralisé de la frondaison, chute du feuillage, dépérissement des rameaux et développement de petits bourgeons sur les rameaux, faible développement et abondance de la floraison et les transplants n'arrivent pas à se développer [55].



**Figure 1.2** : symptômes de la gommose causé par *Phytophthora* [52]; A : Symptômes de la pourriture fibreuse des racines causée par *Phytophthora spp*; B : pourriture brune due à *Phytophthora*.

#### II.3.4. Les pourridiés

La Pourriture des racines, encore appelée pourridié, peut être causée chez les *Citrus* par de nombreux Champignons qui s'installent de préférence sur les arbres affaiblis. La maladie apparaît généralement dans des foyers localisés et s'étend, de plus en plus [31].

Quel que soit le champignon responsable de la Pourriture, les symptômes sur la partie aérienne de l'arbre sont presque identiques : les feuilles jaunissent (chlorose), flétrissent et tombent, entraînant un dépérissement progressif de l'arbre (Fig.1.3 et Fig.1.4). Cependant, dans les cas graves, la chute des feuilles est brusque et la mort de l'arbre survient rapidement. Etant donné l'analogie des symptômes aériens qui affectent l'arbre, un diagnostic exact ne peut être établi que sur le système racinaire [31].

##### II.3.4.1. La pourriture à armillaire

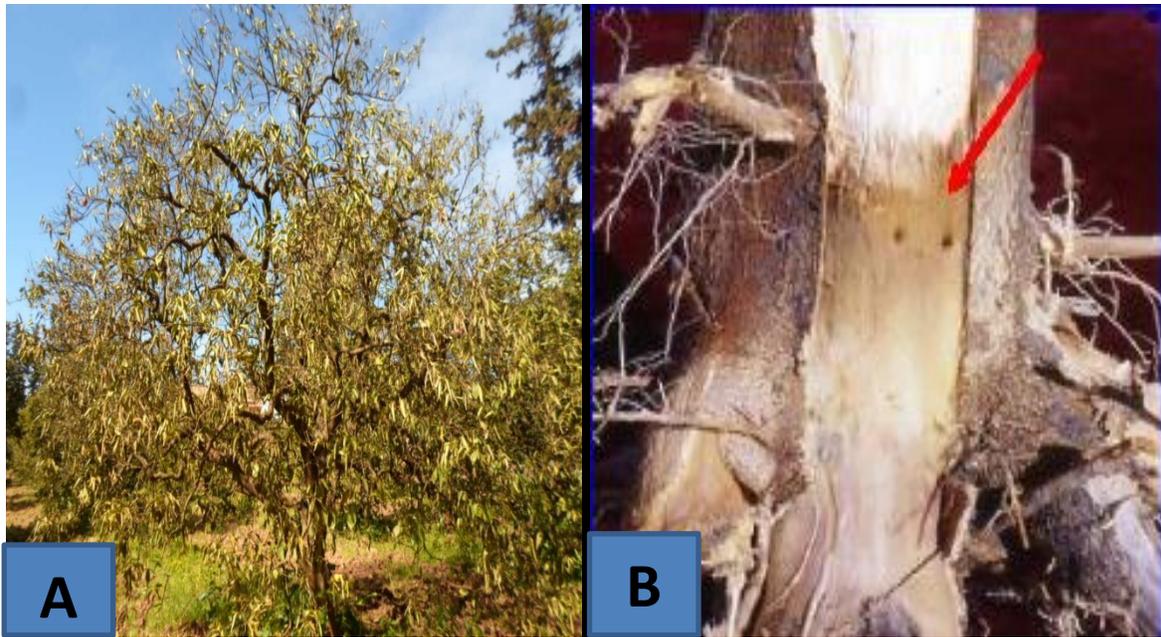
Cette pourriture est due à *Armillaria mellea* (vahl), elle est signalée sur des racines des citrus, de chêne, et de très nombreux autres végétaux. Les symptômes se confondent souvent avec ceux de la gommose, de la pourriture sèche et des accidents résultants de l'excès d'eau. Au-dessous et à l'intérieur de l'écorce de la racine, on trouve

un mycélium blanc, feutré et disposé en éventail [31, 56]. Sur la surface de la racine se forment des rhizomorphes violacés qui stimulent de petites radicelles; ils sont constitués par des vaisseaux de filaments mycéliens dont la couche externe durcit et forme une carapace [56].

#### II.3.4.2. La Pourriture sèche

La Pourriture sèche des racines, peut être causée chez les *Citrus* par une ou plusieurs espèces de *Fusarium* et occasionnellement des parasites secondaires des agrumes trouvés dans le sol [52]. Les premiers symptômes détectés par les agrumiculteurs, montrent que les feuilles se fanent subitement et sèchent en place comme dans le cas de quick décline ou que quelques feuilles tombent (Fig.1.3), en donnant une apparence clairsemée à l'arbre avec plus de brindilles mortes. Ces symptômes sont communs à tout problème causé par un agent qui détruit les racines complètement ou partialement [52]. Les jeunes sujets de moins de 5 ans ainsi que les arbres en production de 15 à 25 ans se sont montrés plus sensibles. La maladie se manifeste fortement au cours de trois périodes: au printemps (pleine floraison), en été (températures élevées) et en automne (début de la maturité des fruits) [57].

L'examen supplémentaire révèle qu'une partie ou la totalité de l'écorce au niveau du collet montre une pourriture humide, ce qui plus tard se dessèche et se craquelles (Fig.1.3). Cela peut produire des petits suintements gommeux, avec une décoloration sombre à noire du bois au-dessous de l'écorce. Cependant la gommose n'est pas considérée comme cause principal de ce problème. Les agents de la gommose à *Phytophthora* n'envahissent pas le bois sous les couches du cambium [52]. Tous les portes greffes communs sont susceptibles, y compris les trifoliés et le Citrange Troyer qui sont résistant à la gommose de la pourriture brune [52].



**Figure 1.3 :** symptômes de la pourriture sèche racinaire [52] ; A :Flétrissement brutale ; B : Brunissement de la partie basale du tronc.

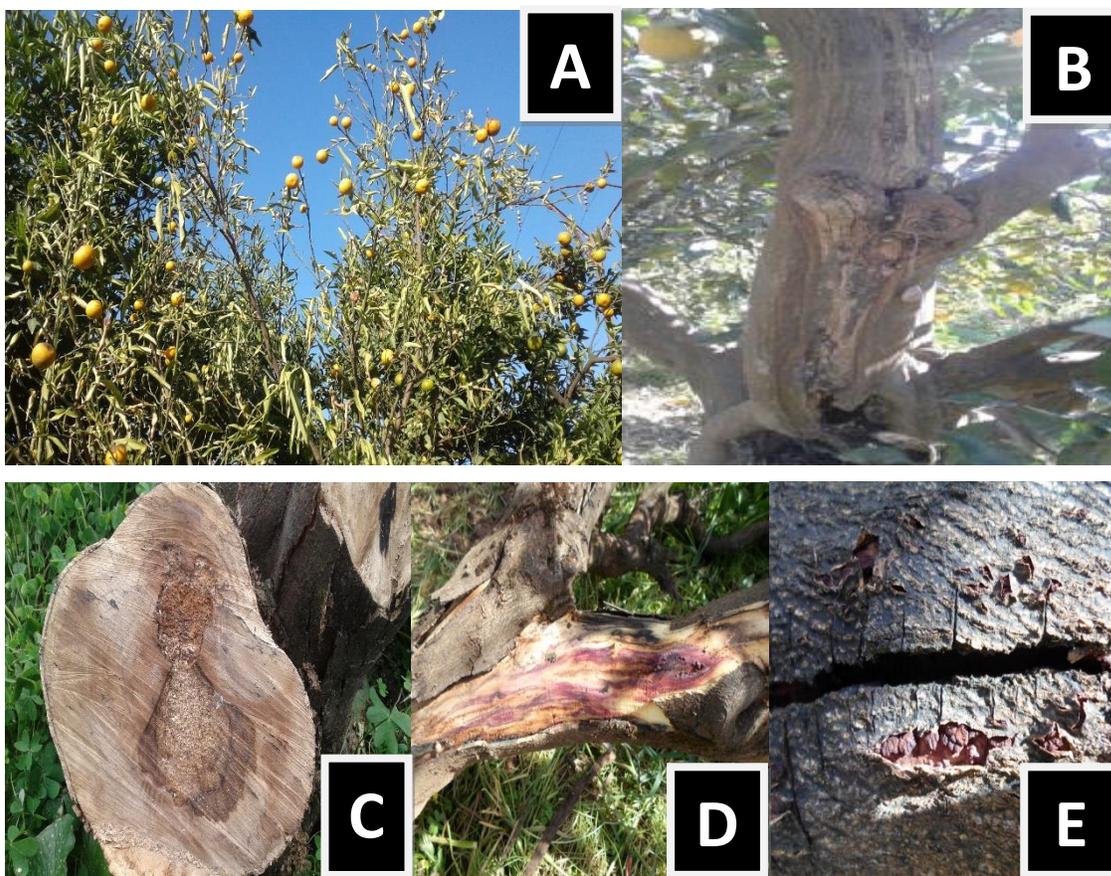
### II.3.5. Les pourritures dues aux *Botryosphaeriaceae*

Les *Botryosphaeriaceae* (*Botryosphaerales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) sont des espèces cosmopolites qui s'attaquent à une large gamme d'hôte [58], y compris les agrumes [59,60,61,62,63,64,65,66]. Sur les agrumes, la maladie est connue sous le nom de *Dothiorella gummosis* et *Dothiorella rot* [67] à cause de la gomme qui peuvent être exsudées par le chancre. De nombreuses espèces de *Botryosphaeriaceae* ont été signalées sur les agrumes dès les années 1900 [68,69]. Au début, *Diplodia natalensis* Pole-Evans a été déclaré comme l'agent causal principale du dépérissement des agrumes, de la gommose et de la pourriture des fruits [65,70,71], il a été signalé dans toutes les régions d'agrumes d'Amérique du Nord et du Sud, les Pays méditerranéens producteurs d'agrumes, l'Afrique du Sud [72], le Japon, La Chine, l'Inde, l'Australie et l'Indonésie [57,73]. Cependant, de nouvelles révisions taxonomiques ont rapporté que *D. natalensis* était un synonyme de *Botryosphaeria rhodina* (anamorphe *Lasiodiplodia theobromae*) [74]. Plus tard, la maladie a été appelée *Dothiorella gummosis*, causée par *Dothiorella gregaria* Sacc. (téléomorphe *Botryosphaeria ribis*) [75]. De nouvelles informations ont révélé que le nom du genre *Dothiorella* a été mal appliqué aux anamorphes avec des conidies hyalines et aseptées qui sont normalement associés à

*Fusicoccum* et *Neofusicoccum* spp. [76]. De plus, d'autres études phylogénétiques ont montré que *B. ribis* est synonyme de *Botryosphaeria parva* (anamorphe *Neofusicoccum parvum*) [77]. Compte tenu de ces nouvelles informations, la maladie ne peut plus être référée comme «*Dothiorella gummosis*». Ainsi, nous nous référons à cette maladie causée par des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* par «Bot gummosis» des agrumes. Des études récentes réalisées en Californie, l'Iran, l'Italie, la Tunisie et l'Algérie ont mis en évidence l'association des espèces de la famille de *Botryosphaeriaceae* au dépérissement des agrumes : *Diplodia seriata*, *D. mutila*, *Dothiorella viticola*, *Doth. iberica*, *Lasiodiplodia citricola*, *L. mithidjana*, *L. parva*, *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *N. parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum* . [68,78,79,80,81,82].

Dans le cas des attaques légères, Les premiers symptômes apparaissent sur une partie de l'arbre et se traduisent par des petits morceaux d'écorce morte accompagnés parfois d'une excrétion de gomme et la production d'un écaillage et d'une craquelure d'écorce, avec détérioration lente de l'arbre (Fig.1.4.A.B.C.D). Dans les cas sévères, les grandes parties d'écorce sont détruites et le bois sous-jacent noirci et meurt par invasion du champignon à partir des parties de l'écorce attaquées (fig.1.4.B.C.D). Chez les arbres affaiblis, le champignon peut causer une "pourriture du cœur" ou la "pourriture du bois". Cette pourriture peut être accentuée par d'autres champignons de pourriture de bois (Fig.1.4.B.C) [52].

Actuellement, la gestion de Bot gummosis sur les agrumes peut être réalisée par la taille des branches et des rameaux morts et par l'enlèvement des déchets de taille avant les périodes de pluie. Cette stratégie est basée sur les résultats d'études sur l'avocat et la vigne [23,83,84,85,86,87]; ces études ont montré que les spores sont libérées à travers les fructifications présentes sur les branches et les rameaux et se propagent par les éclaboussures de pluie et de vent, généralement entre Novembre et Avril (88,89).

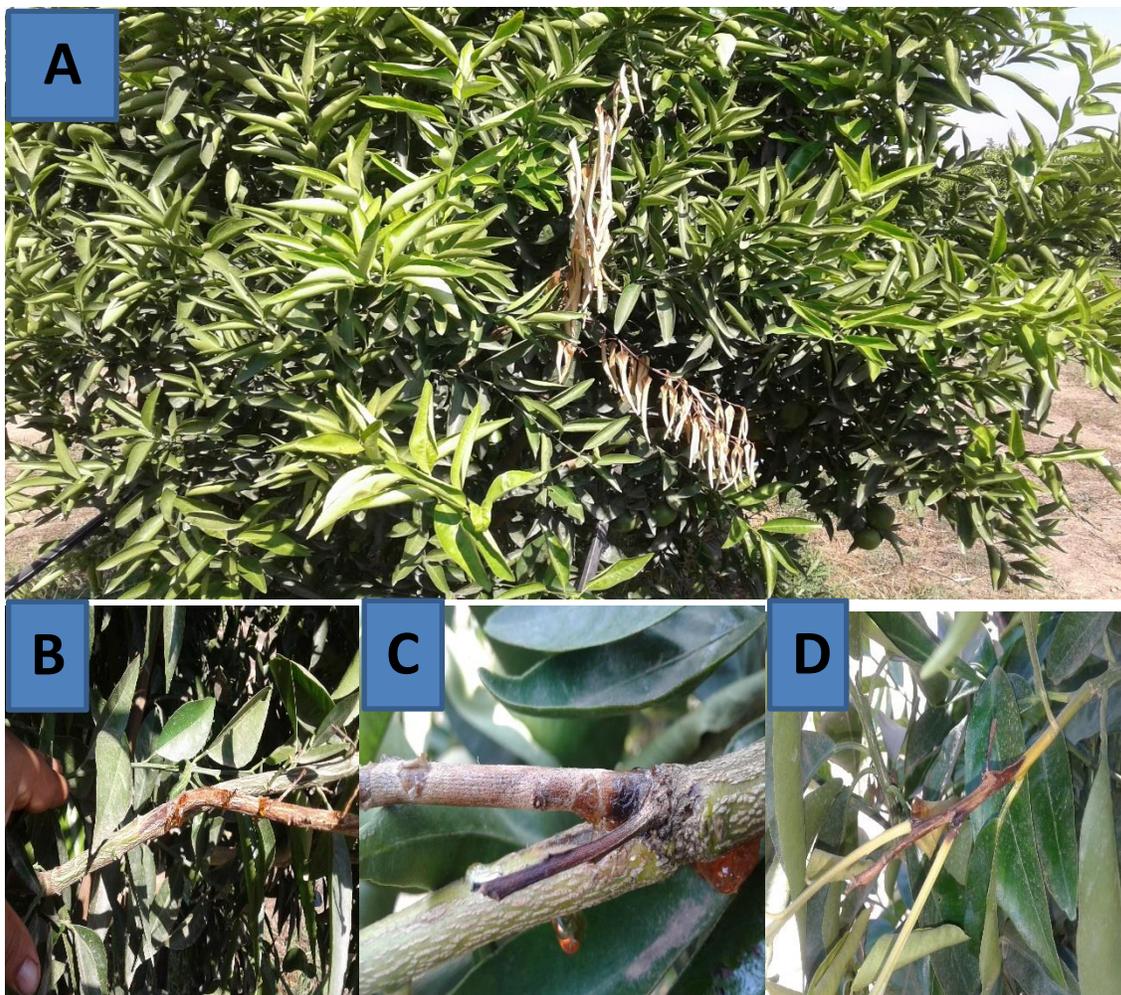


**Figure 1.4** : Symptômes de la pourriture à *Botryosphaeriaceae* [52]; A : dépérissement brutal d'une branche de clémentinier ; B : chancre sur tronc et branche d'un orangier ; C : nécroses sur tronc et branches charpentière d'un orangier ; D : Ecaillage de l'écorce et décoloration violacée du bois ; E : présence des formes fructifications (pycnides) sur l'écorce du tronc et des branches charpentières.

### II.3.6. L'Anthracnose

Cette maladie est causée par *Colletotrichum karstii*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Colletotrichum acutatum*. Les spores du champignon se présentent généralement sur les feuilles et les rameaux desséchés, sous forme de petites taches foncées. La maladie ne se propage qu'avec l'apparition des pluies. Les symptômes les plus courants observés sont : chute des feuilles, dépérissement des rameaux et des pousses (Fig.1.5.A), gommose, nécrose sur les rameaux (Fig.1.5.B.C.D). Des études Récentes [90] ont mis en évidence l'association des deux espèces *C. karstii*, et *C. gloeosporioides*, au dépérissement des rameaux et des pousses de citronnier et ils ont trouvé que les deux espèces sont capables de provoquer le dépérissement des branches d'orange et de mandarine sur terrain. C'est ainsi que les jeunes rameaux et les extrémités

des branches se dessèchent provoquant la chute des feuilles. Il est conseillé de maintenir les arbres dans d'excellentes conditions de végétation. Après l'apparition de la maladie, il est conseillé d'éliminer et d'incinérer les rameaux et les branchettes touchées [52,90].



**Figure 1.5 :** Symptômes de dépérissement à *Colletotrichum* [52,90]; A : dépérissement des rameaux sur clémentinier ; B : exsudation de gomme sur un rameau infesté ; C : chancre sur un rameau infesté ; C : dessèchement des jeunes pousses.

### II.3.7. Le Mal secco

Appellation d'origine italienne désignant les affections des agrumes causées par un champignon *Deuterophoma tracheiphila* qui se développe sur les agrumes, principalement sur citronnier mais aussi sur bigaradier, cédratier et bergamotier. La plupart des cultivars d'oranger, de mandarinier, de clémentinier et de pamplemoussier ne sont qu'occasionnellement affectés [6]. C'est une maladie cryptogamique qui touche les

tissus conducteurs et entrave la circulation de la sève. La maladie pénètre dans la plante par les blessures [91]. L'infection se fait par des conidies produites notamment dans des pycnides au niveau des brindilles flétries. Ces conidies sont véhiculées par l'eau, la croissance du champignon dans la plante et l'expression des symptômes ont lieu à des températures optimales comprises entre 20 et 25°C, au-delà de 30°C, le mycélium cesse de se développer. Dans la région méditerranéenne, les périodes d'infection dépendent des conditions climatiques, le champignon peut survivre au sol et dans les bois de taille pendant plus de 4 mois [92].

Les premiers symptômes apparaissent au printemps, on observe tout d'abord une chlorose des feuilles et des pousses puis un dépérissement des brindilles et des branches (Fig.1.6.C) puis la chute des feuilles desséchées. Les brindilles et les branches infestées présentent des zones grise plomb à gris cendré, sur ces zones apparaissent des petits points noirs (les pycnides) (Fig.1.6. D). Une coupe au niveau des zones infestées montre un bois rose saumon ou orange rouge et une production de gomme au niveau du xylème (Fig.1.6. A et B). Les brindilles et petits rameaux atteints meurent, cette maladie s'étend ensuite vers le bas et atteint les grosses branches [92].

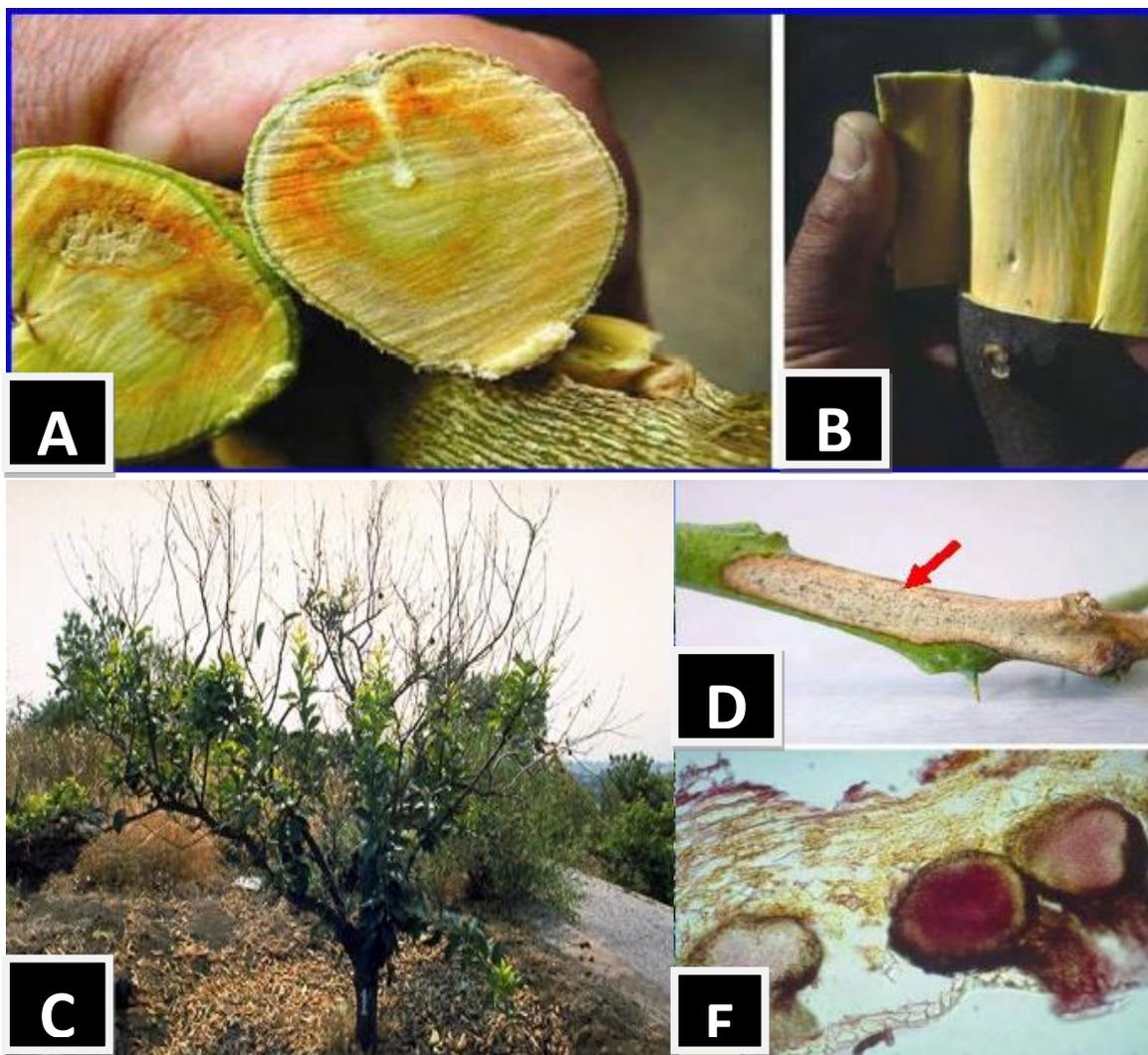
### **III. Dépérissement d'origine inconnu**

#### **III.1. Le Citrus blight**

Le citrus blight est l'un des plus graves problèmes économiques pour les producteurs d'agrumes en Floride (Etats-Unis) et au Brésil. Des millions d'arbres sont perdus chaque année [94]. Les agrumes greffés sur *Poncirus trifoliata* sont très sensibles. Les agrumes greffés sur *Citrus macrophylla*, *C. volkameriana* sont sensibles eux aussi, mais ceux greffés sur *Citrus aurantium* et *C. reshni* sont tolérants et ceux greffés sur *C. sinensis* très résistants [94].

Le mode de transmission de l'agent causal de cette maladie n'est pas encore identifié. [95]. La maladie a été reproduite en plaçant des arbres adultes sains à côté d'arbres malades et en greffant ensemble leurs racines [96]. Ceci suggère une transmission par un agent potentiellement hébergé par le sol, qui affecte la plante de manière systémique. Cependant, les tentatives pour démontrer une transmission par le sol ont échoué. [94].

Le Citrus Blight entraîne un déclin général du feuillage avec flétrissement, défoliation, dépérissement des rameaux et faiblesse des nouvelles pousses. Seul une partie de l'arbre peut être atteinte [97]. Les symptômes du citrus blight peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies à l'exemple du Greening et la Tristeza. La situation est encore compliquée par le fait que le Citrus Blight se rencontre en même temps que d'autres facteurs provoquant un déclin [98].



**Figure 1.6 :** Symptômes du Mal secco [93] ; [A] Décoloration orange-rougeâtre sur branche de mandarinier ; [B] Le rougissement typique du bois ; [C] Défoliation des extrémités des rameaux ; [D] Le dessèchement typique des extrémités des rameaux ; [E] Coupe tangentielle montrant les pycnides de *Phoma tracheiphila*.

## **CHAPITRE 2. Matériel et méthodes**

### **I. Etude épidémiologique**

Dans cette partie d'étude épidémiologique du dépérissement des agrumes, nous nous sommes basés sur la recherche et la détection des symptômes typiques de dépérissement et l'évaluation des dégâts causés par ce dernier.

Dans chaque verger prospecté, nous avons recueilli des informations pouvant afférer avec les états des dépérissements tels que l'âge des arbres, la variété, le porte greffe, le mode de conduite culturale et les caractéristiques pédoclimatiques.

#### **I.1. Situation géographique et climatique de la région d'étude**

##### **I.1.1.Introduction**

En Algérie, la plaine de la Mitidja est considérée comme une région potentielle en agrumiculture. Elle couvre une surface approximative de 140 000 ha. Elle représente 41% de la superficie agrumicole et contribue avec 43% dans la production nationale, elle est limitée à l'est par l'oued Boudouaou, à l'ouest par l'oued Nador tandis que ces deux principaux flancs sont bordés par deux reliefs élevés : les collines du Sahel algérois au nord et l'Atlas Blidéen au sud.

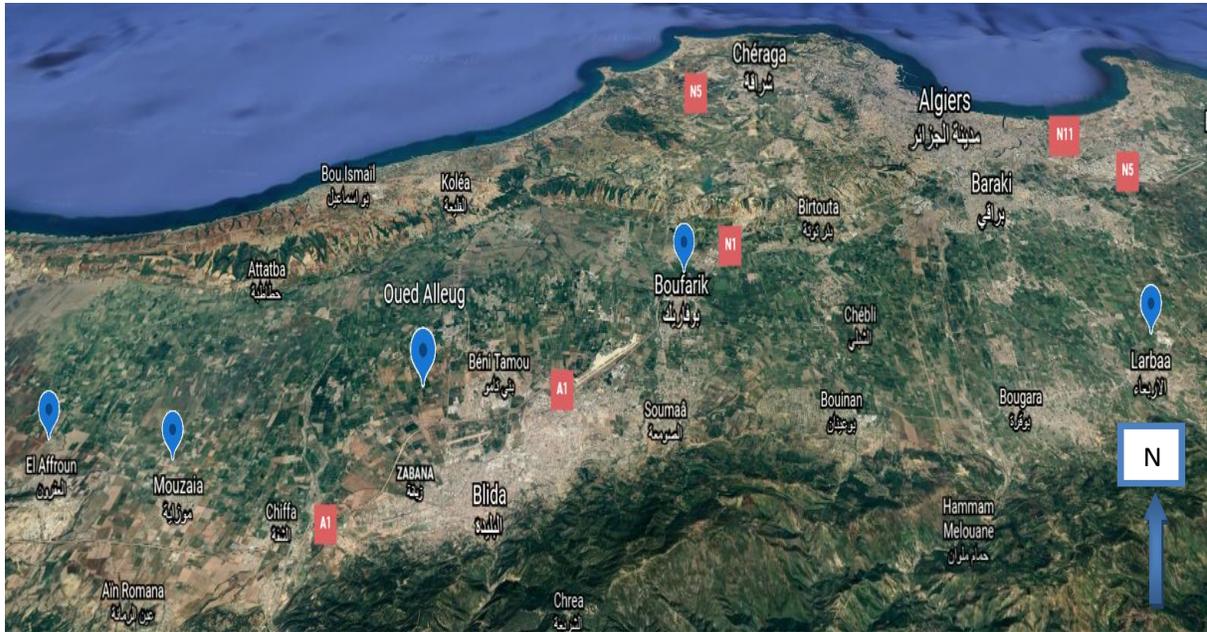
##### **I.1.2.La wilaya de Blida**

Les superficies agrumicoles de la wilaya de Blida représentent la grande partie de la plaine de Mitidja, elle est limitée au nord par la wilaya de Tipaza et la wilaya d'Alger, à l'ouest par la wilaya d'Ain Defla, au sud par la wilaya de Médéa et à l'Est par les wilayas de Boumerdes et de Bouira. La grande partie des vergers agrumicoles de la wilaya de Blida se trouvent concentrés dans les localités d'Oued El Alleug, Boufarik, Mouzaia, Afroun et Larbaa (Fig 2.1).

Le climat de la wilaya de Blida est de type Méditerranéen classé dans l'étage bioclimatique subhumide (Annexe D) et caractérisé par un été chaud et sec et un hiver humide et frais. Les précipitations sont en moyenne de 791 mm par an et atteignent le pic en Décembre et Février, les mois qui donnent environ 30 à 40% des précipitations

annuelles. Inversement, les mois d'été (juin, août) sont les mois les plus chauds de l'année avec une température moyenne de 26.9 °C (office national de météorologie 2022, www.meteo.dz).

Les vergers concernés par notre étude se situent dans cinq localités reconnues par ces vocations agrumicoles depuis l'époque coloniale (Afroun, Mouzaia, Oued elalleug, Boufarik et Larbaa) (Fig 2.1).



www.google earth.com

**Figure 2.1:** Localisation géographique de la zone d'étude (Novembre, 2021)

## I.2. Caractéristiques des vergers étudiés

Notre suivi épidémiologique a été effectué durant quatre campagnes agricoles consécutives (2017-2020), au niveau de cinq sites, comportant 25 vergers.

D'une manière générale, l'âge des vergers étudiés est compris entre 05 et 70 ans, la superficie totale des parcelles est de 75 ha dont la surface de chaque parcelle varie de 1.5 à 7 ha. Le nombre d'arbres total, confondus entre les arbres arrachés et ceux remplacés par des jeunes arbres est de 25 544 arbres, avec des densités de plantation de (5x6) et (3 x 6). Deux porte greffe sont utilisés : Bigaradier et Citrange carrizo. Les vergers étudiés sont caractérisés par une diversité variétale, contenant plusieurs variétés (Tab 2.1).

**Tableau 2.1:** caractéristiques des vergers étudiés

Régions	Vergers	Variété	Age	Porte-greffe	Type d'irrigation	Type de Sol
Affroun	Af1	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Rigole	Argileux
	Af2	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Rigole	Argileux
	Af3	Thomson	[10-20]	Carrizo	Rigole	Lim-sableux
	Af4	Clémentine	> 50	Bigaradier	Rigole	Argileux
	Af5	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Argileux
Mouzaia	Mo1	Thomson	>50	Bigaradier	Rigole	Argileux
	Mo2	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Goute a goutte	Argileux
	Mo3	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Goute a goutte	Argileux
	Mo4	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Argileux
	Mo5	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Argileux
Oued elalleug	Ou1	Thomson	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Ou2	Thomson	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Ou3	Thomson	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Ou4	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Ou5	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
Boufarik	Bf1	Portugaise	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Bf2	Thomson	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Bf3	Thomson	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Bf4	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	Bf5	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
Larabaa	La1	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	La2	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	La3	Thomson	[10-20]	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	La4	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré
	La5	Clémentine	>50	Bigaradier	Rigole	Equilibré

Les analyses de sol effectuées ont mis en évidence que les terrains des vergers étudiés sont composés des sols non salins de texture généralement argileuse (argile 48 à 52%, limon 16 à 24% et sable 24% à 36%) et parfois limoneuse sableuse ou équilibrée (Argile 15 à 24 %, limon 34 à 47 % et sable 28 à 49%). Ces sols sont caractérisés par un

pH alcalin allant de 7.68 à 8.45. Les contraintes constatées concernent quelques paramètres tel que la fertilité chimique en éléments majeurs phosphore et potassium. (Annexe C).

### I.3. Conduite culturale

D'après les observations et le questionnaire effectués lors des visites des sites d'étude, nous avons constaté deux modes de conduite culturale :

Un mode de conduite culturale traditionnel qui se caractérise par l'utilisation des méthodes culturales traditionnelles telles que : un léger labour pendant les périodes printanières et estivales pour éliminer les mauvaises herbes et après chaque irrigation pour minimiser l'évapotranspiration. L'irrigation est assurée à partir de mois de juin jusqu'à le début de mois d'octobre à raison de 6 à 8 irrigations par un système de rigole. L'épandage d'engrais de fond (0.20.25) se fait au mois de novembre jusqu'à décembre à raison de 6 quintaux par hectare et l'engrais de surface l'urée 46% à raison de 6 quintaux par hectare en trois tranches. La taille est effectuée dès la fin de la récolte qui commence à partir du mois de novembre et se termine le mois de février.

Un mode de conduite moderne caractérisé par l'utilisation des méthodes culturale professionnelles tels que l'irrigation et la fertilisation en goutte à goutte, le désherbage par les produits chimiques et du matériel de désherbage mécanique moderne. La fertigation est effectué tous les jours sur la base d'un programme de fertilisation annuel subdivisé selon les stades phénologique de l'arbre dont les unités fertilisantes utilisées sont : 140 à 180 kg d'azote par hectare, 50 à 80 kg de phosphore par hectare et 150 à 180 kg de potassium par hectare par année. En plus de fertilisation foliaire des oligo-éléments tels que le bore, le zinc, le manganèse et le calcium.

Les traitements phytosanitaires sont surtout préventifs, et sont réalisés d'une façon systématique. Ces traitements sont appliqués contre un certain nombre de ravageurs qui peuvent causer des pertes considérables sur le plan économique. Les traitements fongiques les plus appliqués sont le Fosétyl Aluminium contre la gombose à *Phytophthora* et la bouillie bordelaise pour les traitements d'hiver.

#### I.4. Diagnostic symptomatologique

Le diagnostic symptomatologique a pour objectif de retracer l'historique d'apparition des cas de dépérissement et d'étudier leur évolution dans le temps et dans l'espace. A cet effet, nous avons effectué plusieurs visites aux vergers concernés par notre étude pour recueillir le maximum d'informations relatives à l'objet de notre étude. Ce diagnostic consiste à localiser les sujets affectés par les différents types de dépérissement et décrire leurs états symptomatologiques. Sur la base de ces observations ponctuelles, et les prospections effectuées, nous avons classé les symptômes en cinq classes selon la gravité du dépérissement et nous avons d'établi une échelle d'évaluation, par laquelle nous avons estimé le taux de dépérissement, la gravité, et l'incidence de la maladie dans chaque verger prospectés (Tab 2.2).

#### I.5. Paramètres épidémiologiques des dépérissements

Pour l'évaluation des effets des différents états de dépérissements, nous avons utilisé trois paramètres de calculs: Taux d'infection de la maladie, indice de gravité et indice de McKinney (Incidence de la maladie) [59,99,100,101,102].

##### I.5.1. Taux d'infection

Ce taux d'infection est exprimé par le pourcentage (%) des arbres présentant un dépérissement par rapport au nombre total des arbres examinés (N). Les arbres malades sont classés selon l'échelle d'évaluations [59,99,100,101,102]. Ce taux est calculé par la formule suivante:

$$I\% (\%) = \frac{\sum n_i}{N} \times 100$$

- $n_i$  : nombre d'arbres recevant la note  $i$  ( $i = 1$  à  $4$ )
- $N$  : nombre total des arbres du verger

**Tableau 2.2** : Echelle d'évaluation des symptômes du dépérissement adaptée [59,99,100,101,102]

Classe	Etat de l'arbre et symptômes
«0»	* Sain
«1»	* Dépérissement des extrémités des rameaux <input type="checkbox"/> Jaunissement léger ou généralisé <input type="checkbox"/> Enroulement des feuilles et orientation vers le haut <input type="checkbox"/> Présence de lésions nécrotiques <input type="checkbox"/> Brunissement central de racines <input type="checkbox"/> Mort de certaines racines
«2»	*Dépérissement unilatérale (Partiel) <input type="checkbox"/> Dessèchement unilatérale du feuillage <input type="checkbox"/> Ecaillage du tronc et des branches <input type="checkbox"/> Présence de chancre sur le tronc ou branche charpentière <input type="checkbox"/> Rabougrissement <input type="checkbox"/> Brunissement de grandes racines
«3»	*Dépérissement total de l'arbre <input type="checkbox"/> Durcissement des rameaux <input type="checkbox"/> Présence de chancre important en forme de flamme <input type="checkbox"/> Ecaillage accompagné avec des suintements gommeux <input type="checkbox"/> Nécrose interne sur le tronc et les branches charpentières <input type="checkbox"/> Dépérissement foudroyant (la mort subite) <input type="checkbox"/> Dessèchement et Pourriture de racines.
«4»	* Arbre mort, coupé, arraché ou remplacé

### I.5.2. Gravite (sévérité) de la maladie

Pour estimer la valeur moyenne de la classe du dépérissement, la formule suivante a été utilisée [59,99,100,101,102]:

$$G = \frac{\sum (n_i \cdot i)}{n}$$

- G : gravité de la maladie
- $n_i$  : nombre d'arbres recevant la classe  $i$  ( $i = 1$  à  $4$ )
- $n$  : nombre des arbres affectés par le dépérissement

### I.5.3. Indice de mckinney

L'incidence du dépérissement est calculée par l'indice de McKinney qui permet d'évaluer l'altération globale du potentiel de la production d'un verger, il est calculé selon la formule suivante [59,99,100,101,102]:

$$\text{IMc \%} = \frac{\sum (n_i \cdot i)}{N \cdot v}$$

- IMc % : l'indice de McKinney
- $n_i$  : nombre d'arbres recevant la note  $i$  ( $i = 1$  à  $4$ )
- $N$  : nombre total des arbres du verger
- $v$  : valeur la plus élevée de l'échelle d'évaluation

### I.6. Analyse statistique

Afin de vérifier l'impact des différents facteurs susceptibles d'influencer les états de dépérissement dans les vergers étudiés (Année, région, âge, porte greffe, variété, texture de sol et mode d'irrigation), une analyse de variance à un facteur (ANOVA) avec  $P \leq 0,05$  a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab (version 19). Les différences significatives avec un intervalle de confiance à 95 % ont été déterminées en appliquant le test de Tukey pour les différences hautement significatives (HSD). Une analyse principale (ACP) à l'aide du logiciel Past (version 6.0) a été réalisée sur la base d'une matrice de données avec les facteurs précités et les variables (indices épidémiologiques). Les différents regroupements ont été déterminés à travers une classification hiérarchique ascendante (CHA) [59].

## II. Étude étiologique

### II.1. Méthode d'échantillonnage

Nous avons réalisé un échantillonnage ciblé pour rechercher d'éventuels agents fongiques susceptibles de provoquer des états de dépérissement. Les échantillons ont été prélevés aléatoirement à partir des différentes classes symptomatologiques dans chaque verger étudié.

### II.1.1. Prélèvement des échantillons de bois

Nos échantillons ont été obtenus à partir du tronc et des branches des arbres d'agrumes dépéris. Les prélèvements ont été effectués dans des conditions aussi stériles que possible, les outils utilisés (sécateurs, scies) ont été désinfectés par d'hypochlorite de sodium (6%). Les échantillons ont été conservés dans des sacs en papier portant toutes les informations utiles (verger, arbre, date de prélèvement et le type de symptômes) pour une éventuelle analyse au laboratoire. De chaque arbre 2 à 3 fragments de bois ont été découpés, cinq bûchettes (1×1 cm) ont été prélevées de ces derniers (partie saine et infectée) afin de réaliser des isolements de la flore fongique associée aux dépérissements. Ces échantillons ont été conservés au laboratoire pendant 24 à 48 h au maximum avant d'entamer les opérations d'isolement.

### II.1.2. Recherche des fructifications des agents causals

Nous avons collecté les branches et le bois morts infectés montrant la présence des périthèces et des pycnides ont été collectés. A partir de ces fructifications, une préparation des ascospores avec l'eau stérilisée a été réalisé dans des montages lame et lamelle et observé sous un microscope optique pour une éventuelle observation [59].

## II.2. Diagnostic au laboratoire

### II.2.1. milieux de culture

Différents auteurs utilisent divers milieux pour un isolement spécifique, mais pour un recensement global, le milieu le plus utilisé est le PDA (potatos dextrose agar), ce milieu favorise le développement d'un grand nombre de champignons, il permet d'obtenir une bonne croissance et une bonne fructification de ces espèces fongiques et nous avons utilisé aussi un milieu à base d'avoine Oatmeal agar (OA) pour provoquer la sporulation chez les *Botryosphaeriaceae* (Annexe B) [58,59,103].

### II.2.2. **Isolement et recherche des agents causals**

La méthode de diagnostic classiquement utilisée consiste à isoler les microorganismes à partir des fragments de bois sur un milieu PDA. La technique d'isolement décrite par Davet et Rouxe [104] a été adoptée, cette manipulation consiste à une désinfection superficielle des fragments pour éliminer le maximum de la microflore secondaire ou accessoire de la surface. Les fragments ont subi un passage dans une solution d'hypochlorite de sodium (6%) pendant 5 minutes. Ces échantillons ont été rincé à l'eau distillée stérile, séchés entre deux feuilles de papier filtre stérile et déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Ces dernières ont été incubé pendant 4 à 5 jours à dans une étuve a une température de 25°C [58,59,103,104].

### II.2.3. **Observation et purification des cultures**

En vue d'obtenir un développement de cultures fongiques pures, après incubation de 4 à 5 jours à l'étuve (25°C), les colonies développées sont observées afin de localiser celles qui présentent des caractéristiques macro et micromorphologique ressemblant à ceux des agents fongiques recherchés et incriminés dans le dépérissement.

La purification consiste à découper des petits fragments de disque mycélien de 5 mm d'agar et les repiquer sur de nouvelles boîtes de Pétri contenant le même milieu. Ces opérations de repiquages sont répétées autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention de cultures pures et unies, tout en la vérifiant par des observations macroscopique et microscopiques [58,59,103,104].

### II.2.4. **Caractérisation culturelle**

Les cultures purifiées ont été incubées pendant 15 à 20 jours dans une étuve et sous une température de 27 °c, afin d'avoir une croissance optimale. Dès que le développement est apparent; des observations quotidiennes sont effectuées pour détecter d'éventuels caractères cultureux spécifiques aux agents fongiques sélectionnés.

La caractérisation se base sur : la couleur, l'aspect, la forme des colonies, leurs vitesses de croissance et d'éventuels pigmentations. Nous avons utilisé les clés de détermination décrites par Fuskey [106], Phillips [58] et Barnett [105]

#### II.2.4.1. **Caractérisation micro-morphologique**

A partir des cultures pures nous avons réalisé des observations entre lame et lamelle pour des observations microscopiques aux grossissements successifs (10x10) et (10 x 40). Ces observations concernent le mycélium et les caractéristiques d'éventuelles fructifications. Les caractères ainsi observés et photographiés sont comparés à ceux décrits dans les clés de détermination déjà citées [58,59,105,106].

Pour la détermination des différentes espèces du genre *Fusarium*, en plus des critères cités précédemment, nous avons basé sur les caractères micro-morphologiques tel que cités dans la clé de détermination de Fuskey [106] ; comme la morphologie générale des conidies, la formes des extrémités des macro-conidies et la forme des micros-conidies, le nombre de cloison, la longueur et la forme des phialides.

#### II.2.4.2. **Induction de la sporulation**

La sporulation chez les *Botryosphaariacées* a été induite par la culture des isolats pures sur un milieu à base d'avoine Oatmeal agar (OA) et sur des aiguilles de pin et de peuplier doublement autoclavé et fixés dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 2% Phillips *et al* [58]. Les boîtes sont incubées à 25C° avec une photopériode de 12 h pendant 14 jours sous les rayons ultra-violetts. Cette technique a été employée avec succès par plusieurs chercheurs ; Santos et Phillips 2009 [107], Phillips *et al.*, 2013 [58] sur cette famille. Après 14 jours, la couche des pycnides est disséquée horizontalement et le contenu transféré sur une lame dans une goutte d'eau afin de les observés par microscope optique.

#### II.2.5. **Identification et caractérisation moléculaire**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) offre la possibilité de confirmer l'identité des microorganismes isolés et identifié par des méthodes classique (Caractérisation phénotypique) même en faible densité ou concentrations. Cet outil est sollicité pour amplifier spécifiquement des séquences d'ADN de façon exponentielle in vitro [108].

### II.2.5.1. **Extraction d'ADN**

L'ADN des isolats a été extrait selon un protocole optimisé et inspiré de celui de Liu et al [109]. Le mycélium fongique a été broyé dans des tubes contenant 500 µl ml d'une solution de lyse. Dans des tubes Eppendorf stériles de 1.5 ml, le mycélium est écrasé à l'aide des cônes stériles puis incubé à température ambiante pendant 15 min. 150 ml d'une solution composé d'acétate de potassium et 11.5% d'acide acétique glacial sont ajoutés au mélange précédent et vortexé, suivi par une centrifugation à 12.000 rpm pendant une minute. Un volume de 600 µl d'isopropanol est ajouté au surnageant récupéré contenu dans les Eppendorfs stériles, suivi par une deuxième centrifugation pendant 2 min. Après élimination du surnageant le culot est récupéré, lavé avec 300 µl d'éthanol à 70 % par centrifugation à 12.000 rpm pendant 1 min. 40 µl d'eau ultra-pure stérile est additionnée au culot obtenu (ADN) déjà séché sous haute, suivi par une conservation à -20 °C pour une future utilisation [109].

### II.2.5.2. **Amplification de l'ADN par PCR**

Pour l'identification des différentes espèces isolés, nous avons utilisé deux types d'amorces ITS (ITS 1 et ITS4) et gène d'élongation (Alpha élongation factor (A e-f)). Les réactions d'amplification ont été réalisées selon les conditions décrites par Guizhen et al [110]. L'amplification a été réalisé dans un volume de 25µl de mélange réactionnel composé de : 1 µl d'ADN génomique, 0.8 µl de chaque amorce, 2.5 µl du tampon PCR contenant le MgCl<sub>2</sub>; 0.2 µl du mélange désoxynucléoside triphosphate (dNTP), 0.2 µl de Taq ADN polymérase et 19,55 µl d'eau ultra pure (Annexe B). L'amplification a comporté trois étapes ; étape initiale de dénaturation, une étape d'hybridation et une dernière étape d'élongation.

- Première étape : dénaturation à 95 °C pendant 2 min, suivie par 35 cycles, consistant à une dénaturation à 94 °C pendant 1 min,
- Deuxième étape : une hybridation des amorces à 53 °C pendant 40S et
- Troisième étape : une élongation à 72 °C pendant 1 min, suivie d'une phase finale d'élongation finale de 10 min à 72 °C.

Les produits d'amplification PCR ont été séparés par électrophorèse sur 1,5 % de gels d'agarose préparées dans 0,5 x TBE (Tris-Borate 100 mM; pH 8,3; EDTA 2 mM), colorées avec une solution à 0,5 mg / L bromide d'éthidium et visualisé sous lumière UV.

#### II.2.5.3. **Séquençage et analyse des données**

Le séquençage a été réalisé par le service de séquençage Macrogen (USA). La lecture a été réalisée à l'aide du programme Chromas Pro. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences ITS et  $\alpha$  elongation factor ( $\alpha$  e-f) de la base des données internationale NCBI en utilisant l'option BLASTn. Les séquences ayant le maximum d'homologie ont été choisies.

### III. **Test de pathogénicité**

#### III.1. **Matériels végétales**

Le matériel végétal utilisé pour la vérification du pouvoir pathogène des agents fongiques isolés et identifiés a été prélevé des arbres de parc à bois de citrus contrôlé et certifié par les services concernés, provenant de la station de démonstration de l'ITAFV de Beni Tamou (Blida) (Institut technique d'Arboriculture fruitière et vigne). Le matériel végétal utilisé est :

- Des boutures de citrus fraîches de 20 cm de longueurs qui se terminent par 4 à 5 feuilles de la variété Clémentine.
- Des boutures vertes de citrus d'apparence saines de 30 cm de longueur de deux cultivars (Thomson et Clémentine).
- Des plantules de la variété Thomson greffé sur le porte greffe Citrange troyer.

#### III.2. **Matériel fongique**

Le matériel fongique utilisé dans ce test pour la préparation des inoculums était des souches fongiques isolées à partir des échantillons de bois montrant des symptômes de dépérissement qui ont été identifiées et purifiées. Après deux semaines d'incubation sous l'ultra-violet et à l'obscurité pour induction de la sporulation, un volume de 10ml de l'eau distillée stérile a été versés sur la culture fongique pure, dont la surface a été raclée

et la suspension de spores qui servira d'inoculum a été ajustée à  $10^6$  spores/ml à l'aide de la cellule Malassez [58,66,79,82].

En raison de l'absence des fructifications chez quelques cultures fongiques durant leurs incubations, les différents inocula ont été préparées avec des cultures mycéliennes cultivées dans des boites Pétri contenant le milieu PDA [58,66,79,82].

### III.3. **Réalisation de test de pathogénicité**

Trois protocoles de tests de pathogénicité ont été utilisés pour la détermination du pouvoir pathogène des différentes souches fongiques isolées et identifiées.

#### III.3.1. **Test du pouvoir pathogène des espèces de *Fusarium***

Un premier test de pathogénicité a été réalisé en adaptant les techniques décrites par Nemec et al et Yaseen et al [111,112]. Nous avons utilisé des boutures de citrus fraîches de 20 cm de longueurs qui se terminent par 4 à 5 feuilles prélevées des arbres d'apparence saine de la variété Clémentine (Fig 2.2). Ce protocole a été utilisé pour la détermination du pouvoir pathogène des espèces de *Fusarium* (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* *Fusarium equiseti* et *Fusarium sp*) (Annexe F)..

Nous avons préparé la suspension sporale dans des tubes à essai stériles de 60 ml en raison de cinq répétitions pour chaque isolat, en plus de cinq tubes remplis d'eau distillé stérile pour le témoin. Nous avons provoqué des blessures à la base des boutures à l'aide d'un scalpel stérile (Fig 2.2 A et B), ensuite nous avons mis ces boutures blessées dans des tubes contenant les suspension sporale qui ont été déposés au laboratoire de mycologie du département de biotechnologie de l'université de Blida 1, dans des conditions ambiantes. Les observations du développement des symptômes typiques de dépérissement sur les boutures inoculées ont été effectuées pendant un mois.

#### III.3.2. **Pouvoir pathogène de l'ensemble des espèces isolés sur les boutures vertes de citrus**

Dans le deuxième test de pathogénicité, nous avons utilisé des petits fragments de disque mycélien (5 mm de diamètre) prélevé de culture mycélienne pure âgée de sept jours pour inoculer des boutures vertes de citrus d'apparence saines de 30 cm de

longueur (Fig 2.2 A et B) prélevées de jeunes arbres de deux cultivars (Thomson et Clémentine). Les souches utilisées dans ce test pathogénicité sont : *Lasiodiplodia Theobromae* (OC, AC9, BC5, TM4, MC9, BC3, LC3), *Diplodia seriata* (LE1), *Diplodia pseudoseriata*(TME), *Botryosphaeria dothidea* (ACR) et *Botryosphaeria obtusa* (TM3), *Fusarium oxysporum* (MC1 FUS), *Colletotrichum gloeosporioides* (AECOT), *Alternaria alternata* (TM4 ALT) et *Eutypa sp* (AC9 BLANT)(Annexe F).

Pour l'inoculation, nous avons utilisé deux méthodes :

**La première** consiste à couper l'apex des boutures vertes et de placer un petit fragment de disque mycélien sur l'apex coupées [102] et les sites d'inoculation ont été recouverts par des tampons de cotons imbibés d'eau distillée stérile et de para film.

**La deuxième** méthode consiste à la réalisation d'une plaie superficielle sur l'entre-nœud des boutures vertes, avec un scalpel stérile [66,102, 113]. Un petit fragment de disque mycélien (5 mm de diamètre) a été placé sur la plaie fraîchement réalisée de chaque bouture, et la zone inoculée a été recouverte par un coton humidifié stérile et scellée avec du parafilm (Fig. 2.2 A). Les témoins ont été inoculés avec des petits fragments de PDA non colonisé. Trois répétitions ont été utilisées pour chaque espèce fongique et les témoins.

Les boutures inoculées et les témoins ont été déposés dans des conditions ambiantes au laboratoire de mycologie du département de biotechnologie de l'université Blida 1 pendant 8 semaines. Les observations du développement des symptômes sont effectuées d'une façon journalière. Le suivi s'est basé sur la mesure des lésions sur papier millimétrique. La longueur de la décoloration vasculaire a été mesurée vers le haut et vers le bas à partir du point d'inoculation.

### III.3.3. Pouvoir pathogène de quelques espèces isolées sur les plantules de citrus

Pour le troisième test pathogénicité, nous avons utilisé 21 plantules de la variété Thomson greffé sur le porte greffe Citrange troyer. Ces plantules ont été inoculées avec un isolat de chaque espèce purifiée (3 plantules par espèce fongique). Les souches utilisées dans ce test pathogénicité sont : *Lasiodiplodia Theobromae* (OC1 et OC2),

*Fusarium oxysporum* (MC1 FUS), *Colletotrichum gloeosporioides* (AECOT), *Alternaria alternata* (TM4 ALT) et *Eutypa sp* (AC9 BLANT) (Annexe F). Nous avons placé un petit fragment de disque mycélien (5 mm de diamètre) prélevé de culture mycélienne âgée de sept jours sur les plaies fraîchement réalisées sur l'entre-nœud des plantules de Thomson ; l'une sur la variété et l'autre sur le porte-greffe, sans toucher le cambium. Les sites d'inoculation ont été couverts par des tampons de cotons imbibés d'eau distillée stérile et de para film (Fig 2.2 C. D). Trois plantules ont été utilisées comme témoins négatifs. Les témoins ont été inoculés avec des petits fragments de PDA non colonisé. Les plantules inoculées et les témoins ont été déposés dans des conditions ambiantes (cage d'isolement de laboratoire de virologie). Une semaine après l'inoculation, des observations quotidiennes ont été réalisées, qui vise à rechercher des nécroses et des symptômes de dépérissement au niveau du matériel végétal inoculé. Ces plantules ont été observées systématiquement pendant 6 mois [114,115].

Un ré-isolement des espèces fongiques a eu lieu à partir du matériel végétal qui a exprimé les symptômes recherchés, après cinq jours d'incubation, une identification classique (caractérisation macroscopique et microscopique) a été effectuée pour confirmer l'identité de ces agents fongique.



**Figure 2.2 :** Test de pathogénicité ; A : boutures inoculées et couvertes par un coton stérile et du para film ; B : Des pousses trompées dans la suspension de l'inoculum ; C : Installation de l'inoculum sur le site d'infection ; D : Plantules de Thomson inoculées et couvertes par un coton stérile et du para film.

# CHAPITRE 3. Résultats et discussion

## I. Etude épidémiologique

### I.1 Descriptif symptomatologique

Nous avons constaté que la maladie se manifeste fortement au cours de trois périodes: au printemps (pleine floraison), en été (températures élevées) et en automne (début de la maturité des fruits).

#### I.1.1 Etat des vergers

D'après le questionnaire et les observations effectuées lors des visites des vergers étudiés, nous avons relevé les remarques suivantes :

- 2.** La plupart des vergers d'agrumes ont été abandonnés pendant les années quatre-vingt-dix jusqu' aux années deux milles à cause de la situation sécuritaire du pays.
- 3.** Hétérogénéité variétale et végétatif au niveau des différents vergers étudiés suite au remplacement des arbres arrachés à cause du dépérissement.
- 4.** Présence intense des mauvaises herbes dans les vergers à cause d'un itinéraire technique défaillant.
- 5.** La stagnation de l'eau durant les périodes de forte précipitation suite à la destruction des systèmes de drainage.
- 6.** La destruction des racines superficielle par les opérations de discage et de labour en périodes printanières et estivales.
- 7.** Présence des grandes plaies de taille non protégées sur les arbres dans la plupart des vergers.
- 8.** Présence de fumagine et des dégâts des différents ravageurs dans ces vergers à cause de l'anarchie dans le choix et l'emploi des matières actives.

## I.1.2 Mode de dépérissement

Durant nos prospections effectuées dans les différents vergers, nous avons constaté trois types de dépérissement selon la gravité des symptômes :

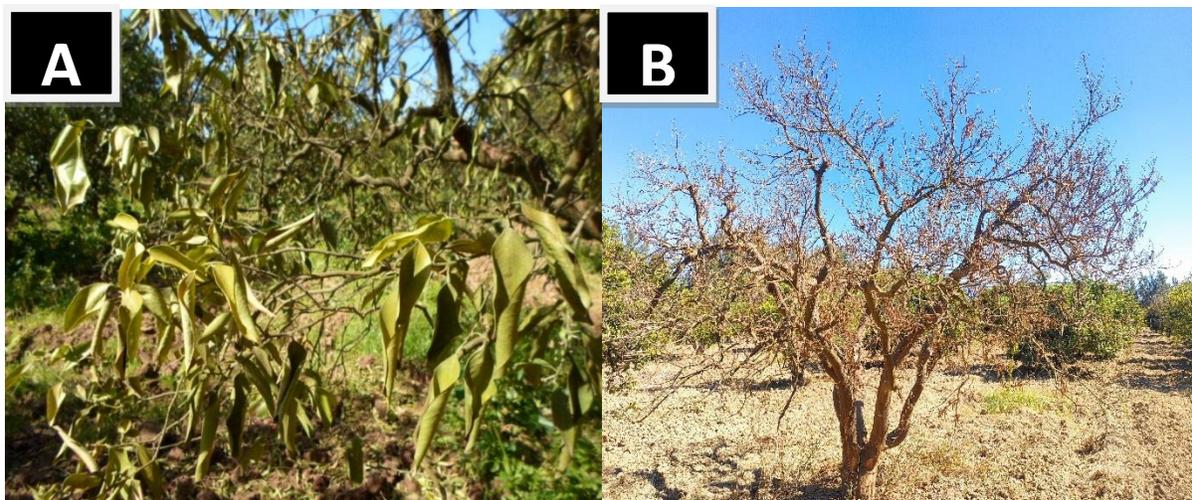
- Dépérissement total de l'arbre (Fig 3.1B)
- Dépérissement partiel ou unilatéral de l'arbre (Fig 3.2 E)
- Dépérissement des extrémités des rameaux (Fig 3.2 D)

Nous avons noté que les situations de dépérissement apparaissent et évoluent selon deux modes : dépérissement rapide (Fig 3.1) et dépérissement progressif (Fig 3.2).

### I.1.2.1 Dépérissement rapide

Pour ce mode, l'arbre passe d'un état sain sans aucun symptôme à une situation de dépérissement total au bout de quelques semaines (Fig 3.1.B). Les premiers signes symptomatologiques observés durant nos prospections sont :

- Changement de coloration des feuilles du vert foncé en vert pale ou carrément jaunâtre, donnant un aspect d'une végétation desséchée et chétive (Fig 3.1.A).
- Enroulements des feuilles vers le haut qui finissent par des dessèchements généralisés suivis de chute de feuillage (Fig 3.1.A).



**Figure 3.1:** Symptômes de dépérissement rapide ; A : Enroulement et flétrissement brutale du feuillage ; B : Dépérissement brutal (personnel).

### **I.1.2.2 Dépérissement progressif**

Pour ce mode, le dépérissement évolue partiellement et lentement, durant quelques années.

### **I.1.3 Symptômes sur la végétation**

Les différentes visites effectuées au niveau des vergers étudiés, ont permis l'observation des symptômes suivants sur la partie herbacée :

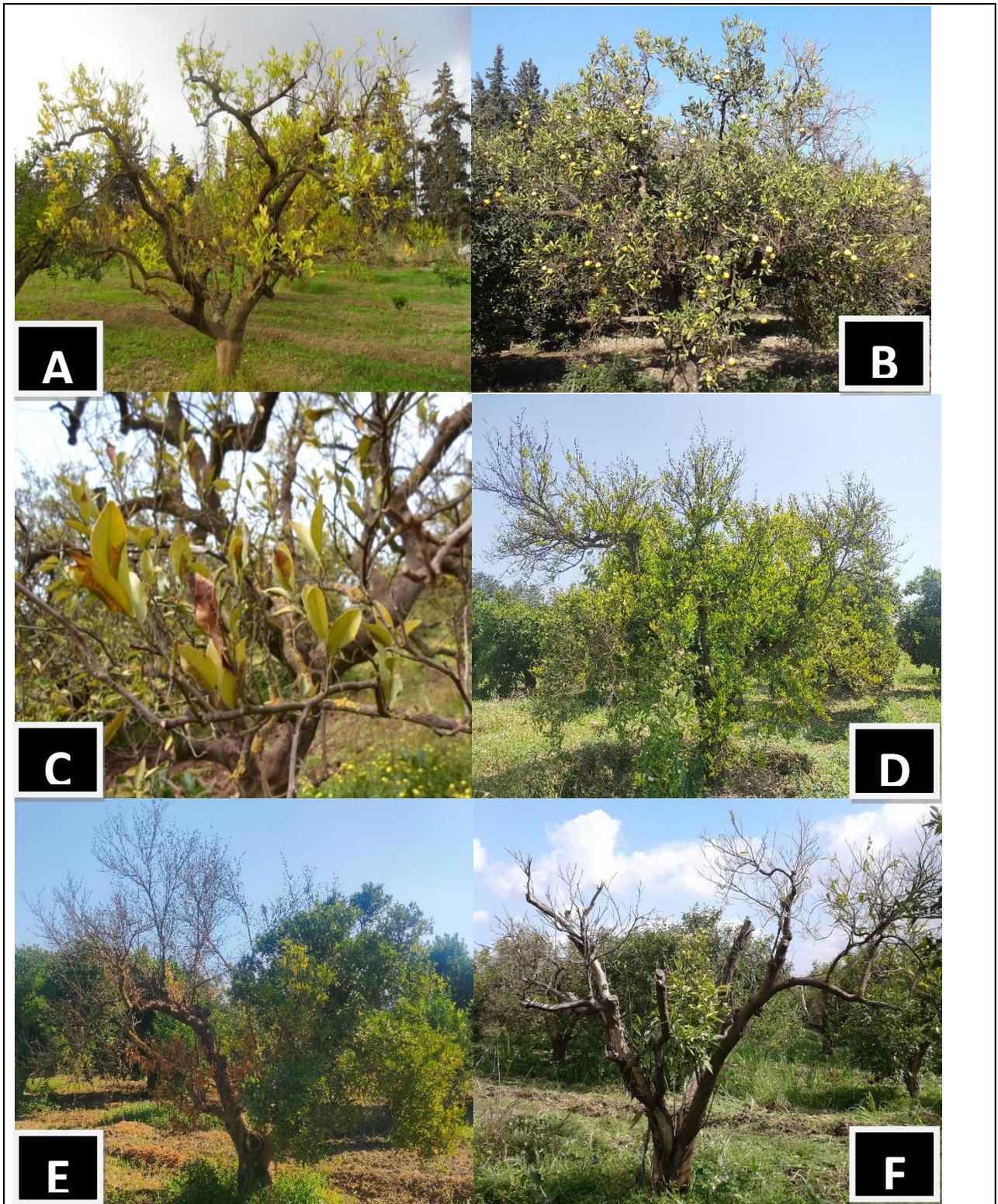
- Un jaunissement léger ou généralisé du feuillage (Fig 3.2 A)
- Une réduction intense de la végétation et des fruits en nombre et en calibre (Fig 3.2 B).
- Un Enroulement et orientent des feuilles vers le haut (Fig 3.2 C).
- Un dépérissement des extrémités des rameaux (Fig 3.2 D).
- Un dépérissement unilatéral des branches porteurs de l'arbre (Fig 3.2 E).
- Un dépérissement progressif de tout l'arbre (Fig 3.2 F).

### **I.1.4 Symptômes sur le tronc et les branches**

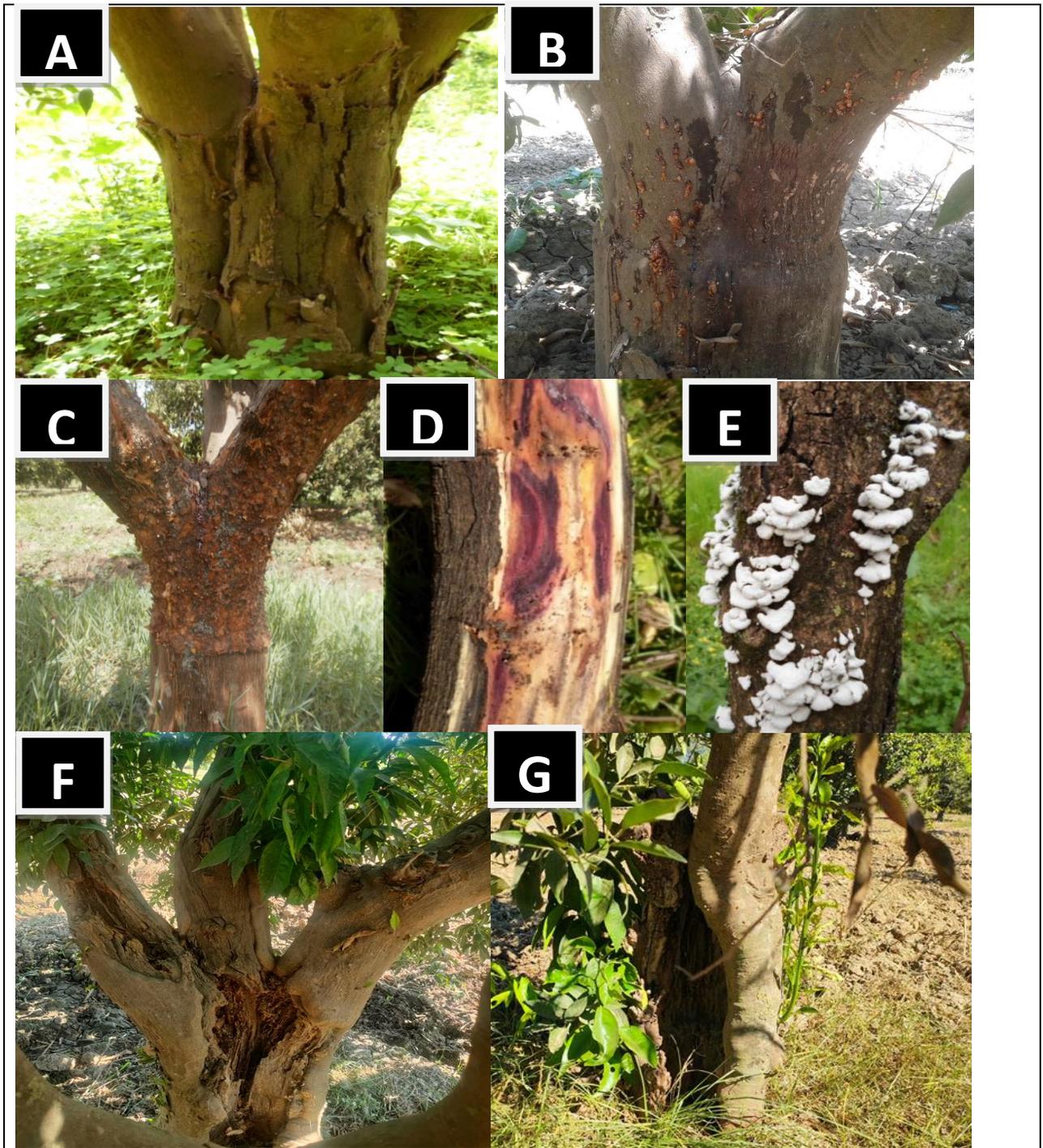
Au niveau du tronc, nous avons noté le décollement et l'écailllements de l'écorce (Fig 3.3 A) accompagnées parfois par sécrétion de gomme (Fig 3.3 B) où apparaitre par la suite des craquelures, des fissures (Fig 3.3 C) et des chancres allongés (Fig 3.3 G et F). Nous avons noté aussi la décoloration du bois (Fig 3.3 D) et la pourriture du bois des branches et du tronc qui se transforme parfois à une pourriture du cœur (Fig 3.3G et Fig 3.4 C). Sur ces arbres, nous avons remarqué la présence des formes de fructifications macroscopique des champignons sur le tronc et les branches charpentières (carpophores, pycnides et périthèces) (Fig 3.3 E).

### **I.1.5 Symptômes sur les racines**

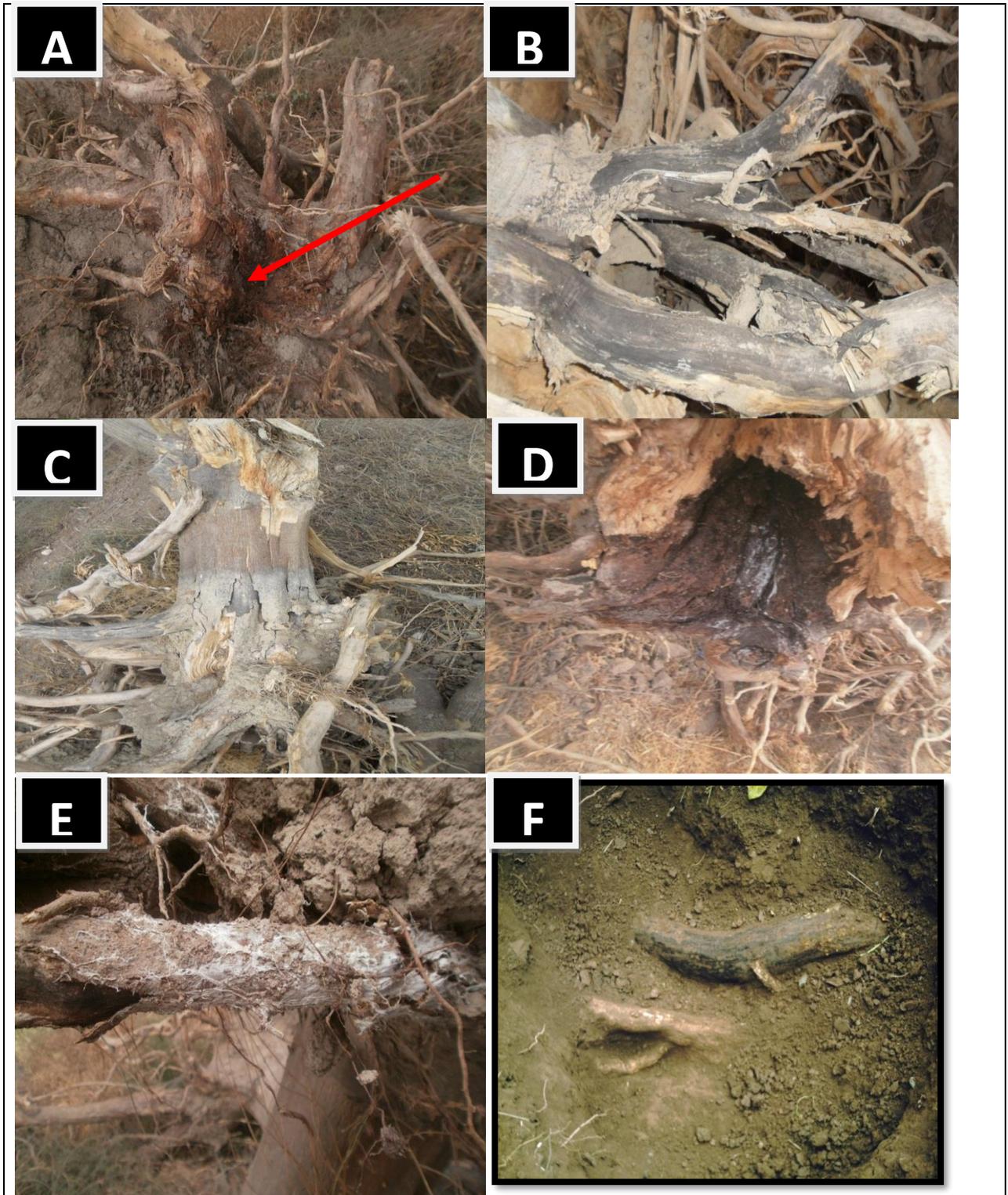
Au niveau des racines, nous avons observé des brunissements (Fig 3.4 A), noircissements (Fig 3.4 B) et pourritures humide, au début, qui plus tard se dessèche (Fig 3.4 C). Nous avons noté aussi que la pourriture commence à partir du pivot ou les extrémités des racines secondaires qui se poursuit jusqu'aux grandes racines et le collet (Fig 3.4 A.B. F).



**Figure 3.2 :** Symptômes de dépérissement progressif ; A : Jaunissement généralisé et réduction intense de feuillage ; B : Réduction intense de fruits en nombre et en calibre; C : Nécrose et orientation des feuilles vers le haut ; D : Dépérissement des extrémités des rameaux ; E : Dépérissement unilatéral; F : Dépérissement progressif (personnel).



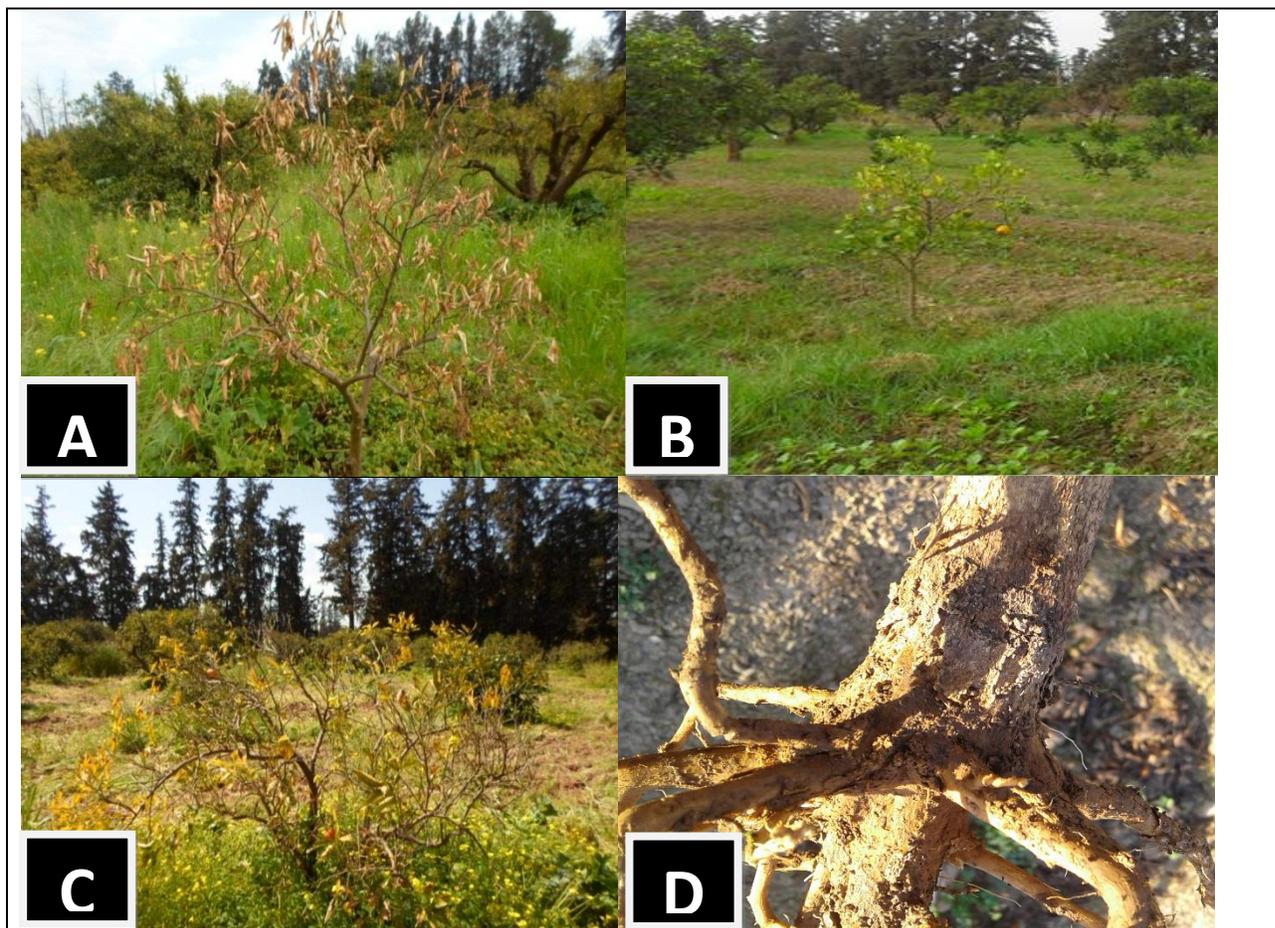
**Figure 3.3 :** Symptomes sur tronc et branches charpentières ; A : Ecaillage et craquelure sur la partie porte greffe ; B : Exsudation de gomme; C : Craquelure sur la partie greffon ; D : Coloration mauve foncé sur branche. E : Fructification macroscopique sur branches (carpophore) ; F : Chancre sur tronc et branches charpentières ; G : Pourriture de cœur du tronc (personnel)



**Figure 3.4:** Symptômes sur les racines ; A : Brunissement des racines et destruction totale du pivot; B : Noircissement des racines; C : Pourriture sèche de la partie sous terrain; D : pourriture du cœur au niveau du tronc; E : Pourriture cotonneuse sur racine; F : noircissement d'une racine secondaire (personnel).

### I.1.6 Symptômes sur les plants remplacés

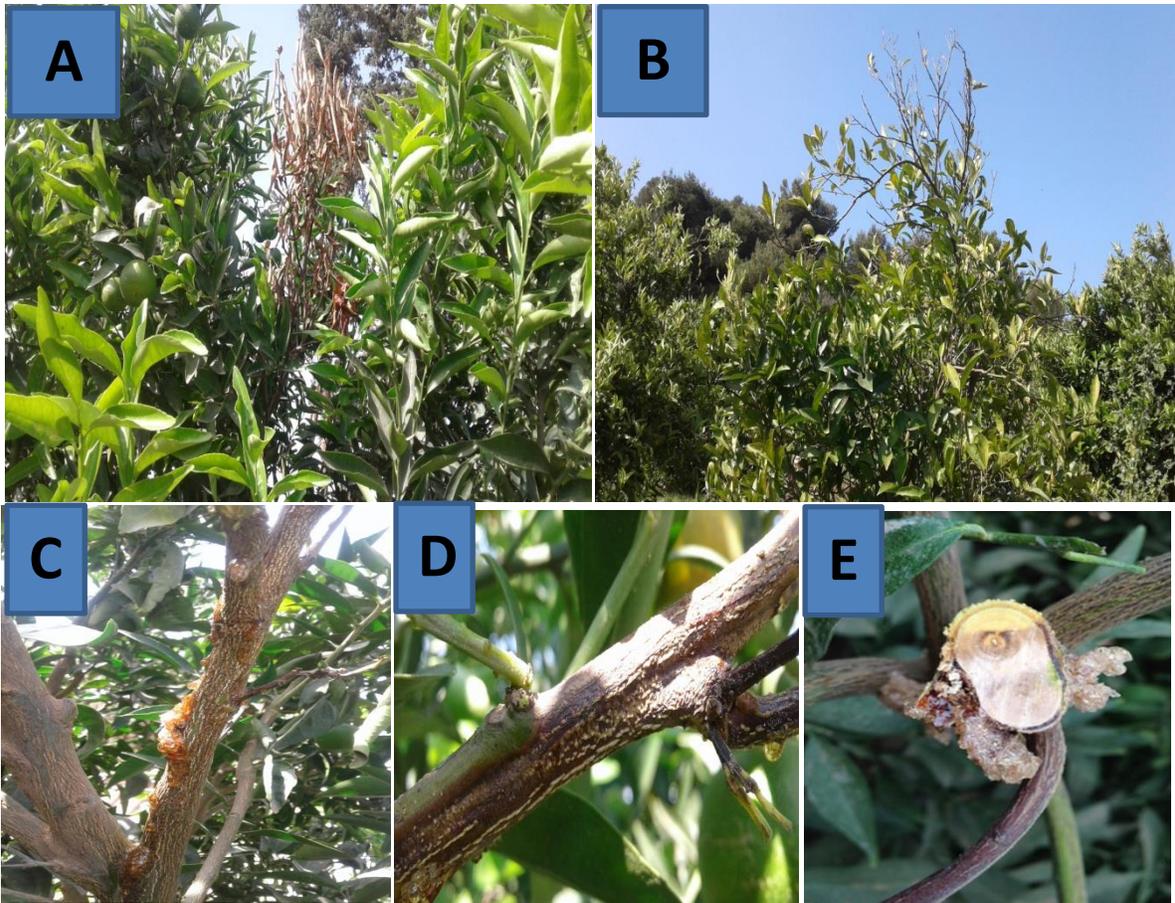
Nous avons noté un dépérissement foudroyant (Fig 3.5 A) et un dépérissement progressif des plantules remplacées (Fig 3.5 C) accompagné par un système racinaire mal développé et parfois accompagné par pourritures de collet (Fig 3.5 D).



**Figure 3.5 :** Symptômes de dépérissement des plants remplacés ; A : Dépérissement brutal d'un jeune plant; B : Jaunissement léger d'un plan remplacé ; C : jaunissement généralisé d'un jeune plant ; D : Pourriture de collet sur jeune plant (personnel).

### I.1.7 Symptômes de l'antracnose

Les premiers symptômes de l'antracnose apparaissent durant les saisons de l'automne et du printemps. Les symptômes les plus couramment observés sont : chute anormale des feuilles, le dessèchement des jeunes rameaux et des extrémités des branches, exsudation de gomme et le chancre sur le bois infecté.



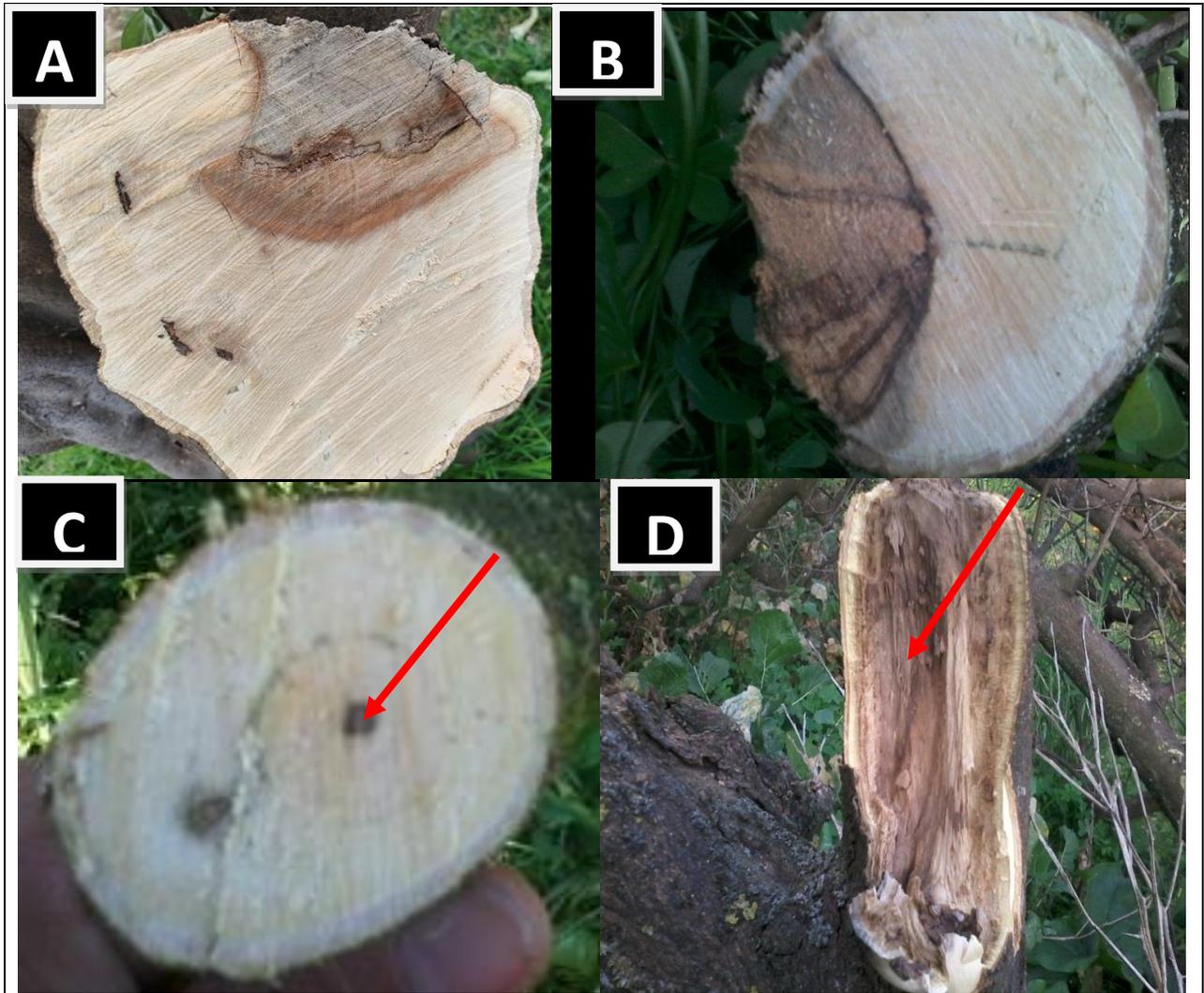
**Figure 3.6 :** Symptômes de dépérissement à *Colletotrichum* ; A : dépérissement d'un seul rameau sur tout l'arbre de clémentinier ; B : dépérissement des extrémités des rameaux ; C : exsudation de gomme sur un rameau infesté ; D : chancre sur un rameau infesté ; E : décoloration interne du bois d'un rameau infesté (personnel).

### I.1.8 Description des symptômes sur bois

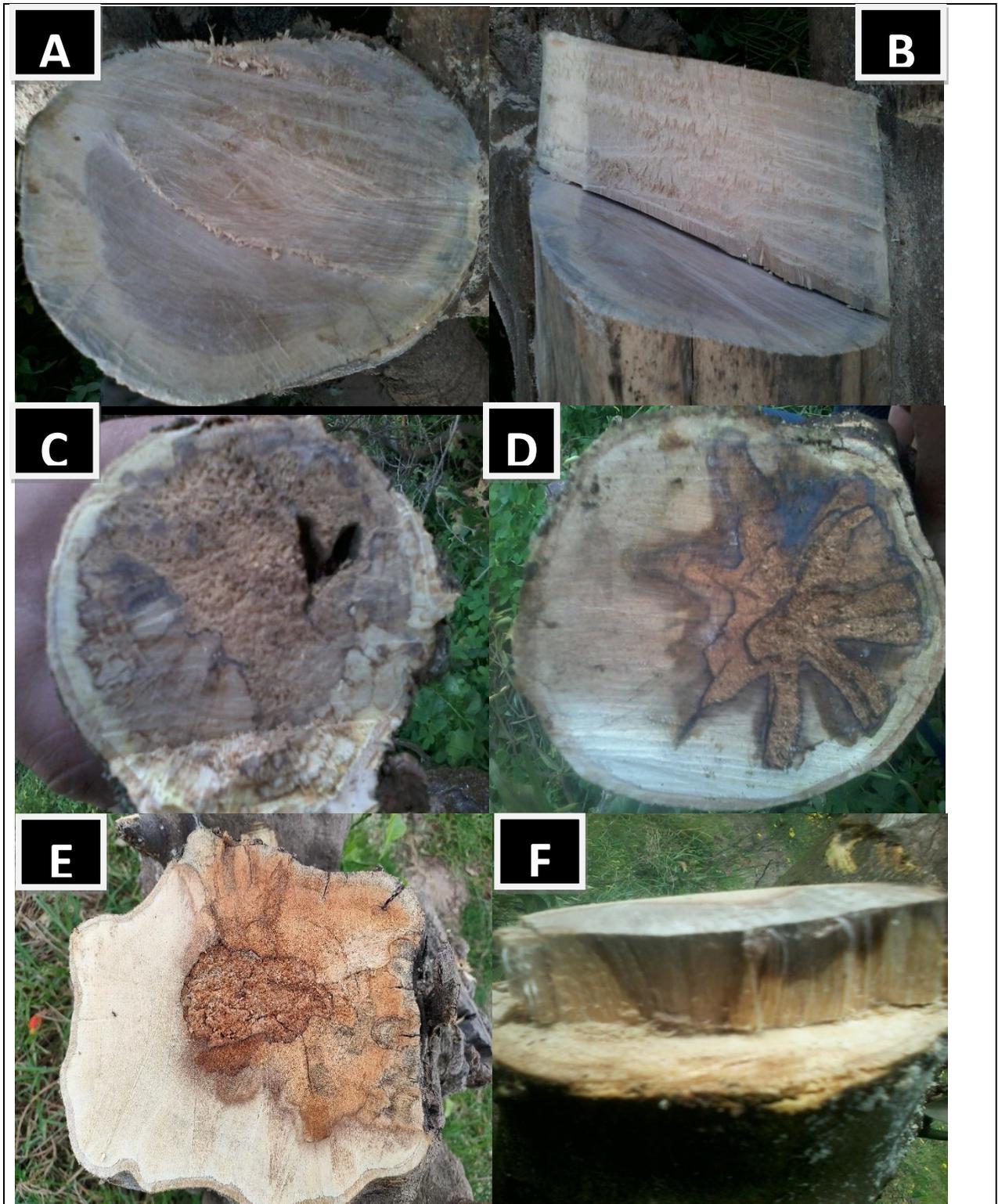
Les coupes transversales et longitudinales sur le tronc et les branches charpentières des plants dépéris, ont montré la présence de plusieurs types de nécroses au niveau de bois. Au total, il y'a sept nécroses principales sur les troncs et les branches charpentières qui se différencient par leurs : couleur, position et consistance (molle, dure, ou une association).

- Nécroses type 1 : Nécrose brune claire en position centrale, avec une consistance dure, entourée par le bois sain (Fig 3.8 A et B).
- Nécrose type 2 : Une nécrose brune foncé à consistance molle en position centrale entourée par le bois sain (Fig 3.8 C).
- Nécrose type 3 : Nécrose brune claire à consistance dure en position sectorielle (Fig 3.7 A)

- Nécrose type 4 : Nécrose brune foncé à consistance molle en position sectorielle (Fig 3.7 B)
- Nécrose type 5 : Nécrose brune clair à consistance dure et molle en position centrale et sectorielle est composée d'une zone dure et molle entourée avec du bois sain (Fig 3.8 E et F).
- Nécrose type 6 : Association des nécroses (complexe) brune clair et foncé à consistance molle et dure en position sectorielle et centrale (Fig 3.8 D).
- Nécrose type 7 : Point noir centrale entouré d'une liséré (Fig 3.7 C)



**Figure 3.7** : Différentes nécroses sur tronc et branches charpentière ; A : Nécrose brune claire et dure en position sectorielle ; B : Nécrose brune foncé et molle en position sectorielle ; C : Point noir entouré d'un liséré ; D : coupe longitudinale d'une nécrose brune et dure en position centrale.



**Figure 3.8 :** Différentes nécroses sur tronc et branches charpentière (suite) ; A et B : Nécrose brune claire et dure en position centrale ; C : Une nécrose brune foncé et molle en position centrale ; D : Association des nécroses (complexe) brune, clair, molle en position sectorielle et centrale; E et F : Nécrose brune claire à consistance dure et molle en position centrale et sectorielle.

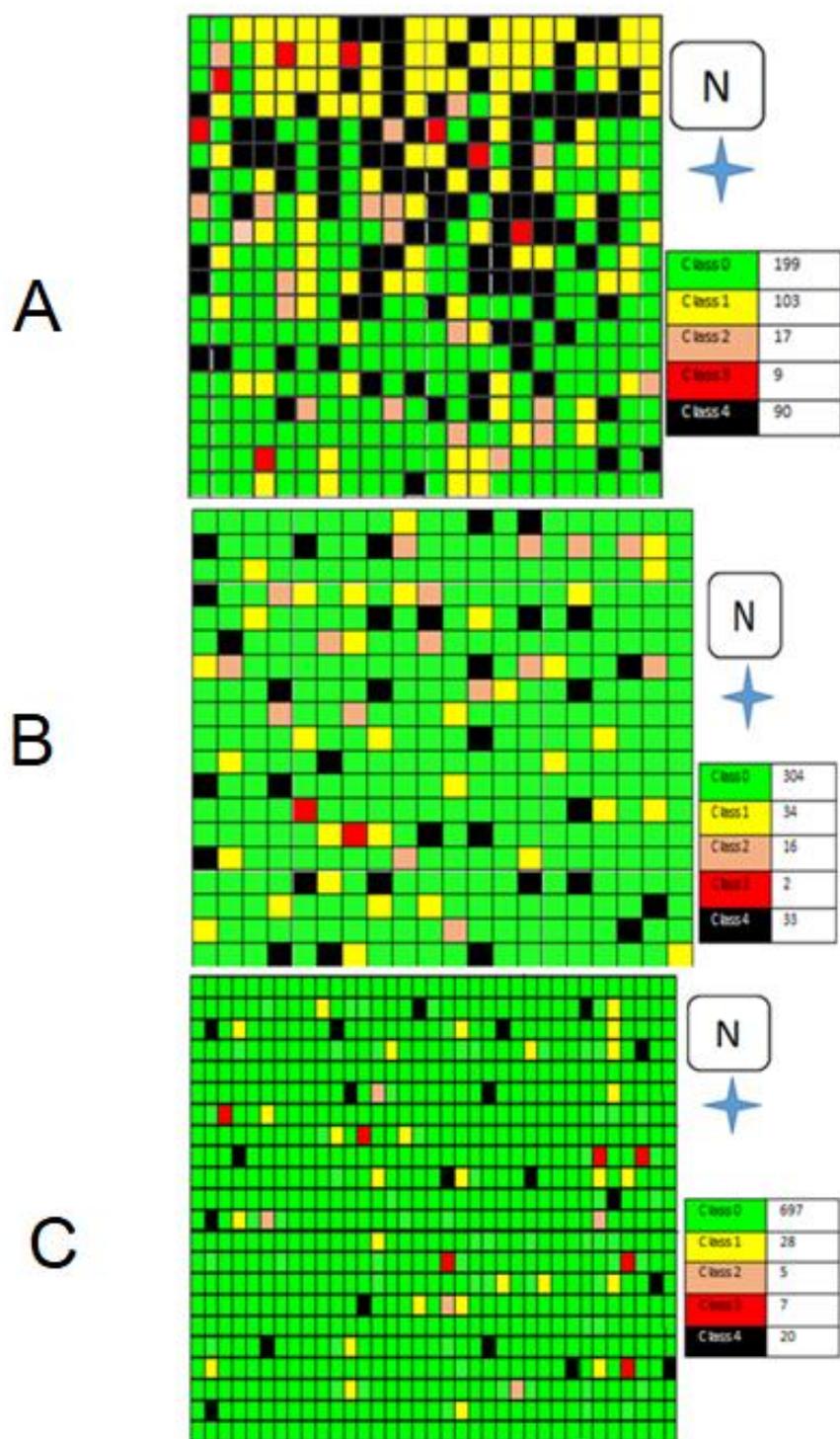
## **I.2 Distribution spatiale des cas de dépérissement**

Nous avons constaté que la distribution des symptômes diffère d'un verger à l'autre selon l'âge des vergers et le mode de conduite.

La distribution des arbres dépéris dans les vergers âgés étudiés est nettement concentrée au centre et dans le côté orienté vers le nord des parcelles (Fig 3.9. A), cette distribution est en fonction de l'orientation des rangés et l'inclinaison des terrains. C'est le cas des vergers de : Oued El-Alleug (OU1 et OU4), Affroun (AF1), Boufarik (BF2, BF3 et BF1), Larabaa (LA2), Mouzaia (MO1 et MO4) où les arbres dépéris sont très concentrés sur la moitié nord et distribués d'une façon généralisée sur la moitié sud (Annexes E). Nous avons remarqué aussi que les vergers de : Affroun (AF3), Mouzaia (MO2) et Larabaa (LA4) sont les seuls qui ont présenté une distribution généralisée sur toute la surface du verger (Annexes E).

Concernant les jeunes vergers (moins de vingt an), nous avons noté la dominance de dépérissement de la classe 1, avec une distribution généralisée sur toute la surface du verger (Fig 3.9.B et C).

Nous avons noté aussi que les arbres atteints du dépérissement dans les vergers irrigués en goutte à goutte, se trouve dans la plus part isolés les unes des autres et se répartissent d'une manière généralisé sur toute la surface du verger (Fig 3.9.C). Alors que, les arbres dépéris des vergers irrigués à la rigole se trouvent alignés l'une à coté de l'autre et se concentre dans le milieu ou dans le côté nord des vergers (Fig 3.9. A et B). Il est à noter que les vergers sont orientés de sud vers le nord et que l'irrigation se faite à la rigole de sud vers le nord.

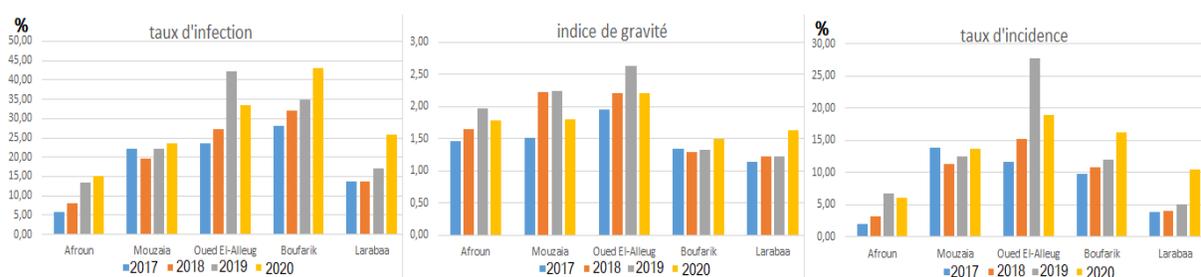


**Figure 3.9:** Cartes de répartition des cas de dépérissement dans les différents vergers ; (A) vergers âgés avec irrigation par rigole; (B) jeunes vergers avec irrigation par rigole; (C) vergers irrigués en goutte-à-goutte.

## I.3 Paramètres épidémiologiques

### I.3.1 Estimation des paramètres épidémiologiques

Nous avons ciblé dans notre étude 25 vergers d'agrumes répartis sur les cinq régions agrumicoles potentielles de la wilaya de Blida (Affroun, Mouzaia, Oued El-Alleug, Boufarik et Larabaa) cumulant 25 544 arbres, sur une superficie de 75 ha. L'estimation globale de la situation de dépérissement dans les vingt-cinq vergers étudiés, nous a permis d'enregistrer une moyenne générale du taux d'infection de 23.28%, nous avons enregistré aussi une valeur moyenne de la classe du dépérissement (indice de gravité) de 1.77 et une incidence moyenne de 10.76% (Fig 3.10).



**Figure 3.10** : Taux d'infection, gravité et incidence dans les cinq régions étudiées

Pour les vergers de la localité de Boufarik, nous avons enregistré taux d'infection allant du 15.60% à 62.23%, indice de gravité entre 1.01 et 1.76 et une incidence allant de 4.38% à 27.40%. Ces valeurs très inquiétantes montrent clairement que le dépérissement dans cette localité est en augmentation rapide, et celle-ci est proportionnelle avec sa gravité et son incidence (Tab 3.1)

**Tableau 3.1**: Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région de Boufarik

Année verger	Taux d'infection				Indice de gravité				Taux d'incidence			
	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020
Bf1	25,42	31,01	26,84	42,20	1,56	1,42	1,40	1,42	9,91	11,02	9,42	14,97
Bf2	28,89	32,35	37,20	42,39	1,31	1,19	1,19	1,47	9,47	9,60	11,03	15,53
Bf3	45,89	53,37	55,01	<b>62,23</b>	1,62	1,64	1,75	<b>1,76</b>	18,53	21,92	24,01	<b>27,40</b>
Bf4	25,00	23,90	33,58	42,77	1,10	1,04	<b>1,01</b>	1,18	6,86	6,22	8,52	12,59
Bf5	<b>15,60</b>	19,36	21,53	25,85	1,12	1,17	1,30	1,64	<b>4,38</b>	5,67	7,00	10,59

L'état des vergers de la localité d'Oued El-Alleug est aussi inquiétant, où nous avons enregistré des indices épidémiologiques très élevés : un taux d'infection qui varie entre 19.15% et 55.17%, un indice de gravité entre 1.59 et 2.79 et une incidence entre 8.37 % et 35.21%. (Tab 3.2).

**Tableau 3.2:** Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région d'Oued El-Alleug

Année Vergers	Taux d'infection				Indice de gravité				Taux d'incidence			
	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020
<b>Ou1</b>	23,24	25,67	37,10	47,00	1,59	2,11	2,43	2,65	9,24	13,52	22,53	31,15
<b>Ou2</b>	22,41	23,59	<b>55,17</b>	29,31	1,49	<b>1,47</b>	2,55	1,65	<b>8,37</b>	8,64	35,21	12,11
<b>Ou3</b>	33,71	36,33	43,51	19,25	2,30	2,38	2,62	2,14	19,42	21,61	28,53	10,28
<b>Ou4</b>	<b>19,15</b>	22,61	32,61	38,65	2,05	2,55	2,78	2,43	9,81	14,41	22,69	23,49
<b>Ou5</b>	19,91	28,66	42,38	33,18	2,36	2,51	<b>2,79</b>	2,14	11,76	17,95	<b>29,52</b>	17,72

Une situation très grave a été enregistrée dans les vergers de la localité de Mouzaia avec un taux d'infection allant de 1.52% à 48.71%, un indice de gravité entre 1 et 3 et une incidence entre 0.38% et 28.80%. Ces valeurs montrent une diffusion rapide de la maladie qui a atteint son maximum en 2020. Il est à noter que les vergers Mo2 et Mo3 sont les seuls qui ont enregistré une régression des indices épidémiologiques sur les deux années 2019 et 2020 avec un taux d'infection pour le Mo2 allant du 24.01% en 2017 à 1.58% en 2020 et un indice de gravité allant de 3 en 2017 à 1 en 2020 et une incidence de 18.01 en 2017 à 0.40 en 2020. Cette régression des indices épidémiologiques a été enregistrée après le placement du système goutte à goutte vers la fin de l'année 2017. Alors que dans le Mo3, l'irrigation était en goutte à goutte dès les premières années de plantation, mais nous avons noté beaucoup de problèmes dans l'emplacement des gouteurs (les gouteurs étaient très proche du collet des arbres), les fréquences d'irrigation et la quantité d'eau dans chaque irrigation. Après le réglage de l'emplacement des gouteurs, des fréquences d'irrigation et la quantité d'eau dans chaque irrigation nous avons enregistré une régression des paramètres épidémiologiques (Tab 3.3).

**Tableau 3.3:** Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région de Mouzaia

Année verger	Taux d'infection				Indice de gravité				Taux d'incidence			
	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020
<b>Mo1</b>	34,90	25,86	43,28	<b><u>48,71</u></b>	2,57	2,48	2,32	2,37	22,39	16,05	25,13	<b><u>28,80</u></b>
<b>Mo2</b>	24,01	14,64	8,05	1,58	<b><u>3,00</u></b>	2,94	2,31	<b><u>1,00</u></b>	18,01	10,75	4,65	0,40
<b>Mo3</b>	5,75	9,64	3,89	<b><u>1,52</u></b>	2,65	1,42	2,22	1,00	3,81	3,43	2,16	<b><u>0,38</u></b>
<b>Mo4</b>	22,81	24,90	27,71	30,10	2,10	2,07	1,98	2,15	11,95	12,89	13,75	16,15
<b>Mo5</b>	23,67	23,27	28,57	36,05	2,23	2,26	2,37	2,55	13,20	13,16	16,90	22,96

Concernant les vergers de la localité de Larabaa qui sont dans la plupart des jeune vergers (20 ans), nous avons enregistré des indices épidémiologiques moins importants que les autres localités : un taux d'infection moyen de 17.61%, indice de gravité moyen de 1.31 et une incidence moyenne de 5.86% (Tab 3.4).

**Tableau 3.4:** Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région de Larabaa

Année verger	Taux d'infection				Indice de gravité				Taux d'incidence			
	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020
<b>La1</b>	10,98	13,09	15,82	30,05	1,06	1,12	1,17	2,16	2,90	3,67	4,64	<b><u>16,21</u></b>
<b>La2</b>	10,80	9,77	13,88	21,85	1,60	1,87	1,87	<b><u>2,40</u></b>	4,31	4,56	6,49	13,11
<b>La3</b>	19,43	18,13	25,52	31,48	1,03	1,06	1,06	1,31	4,99	4,83	6,77	10,33
<b>La4</b>	17,99	18,64	20,86	<b><u>35,72</u></b>	1,01	1,01	<b><u>1,00</u></b>	1,05	4,56	4,73	5,22	9,42
<b>La5</b>	9,41	9,56	<b><u>8,97</u></b>	10,15	1,02	1,09	1,03	1,28	2,39	2,61	2,32	<b><u>3,24</u></b>

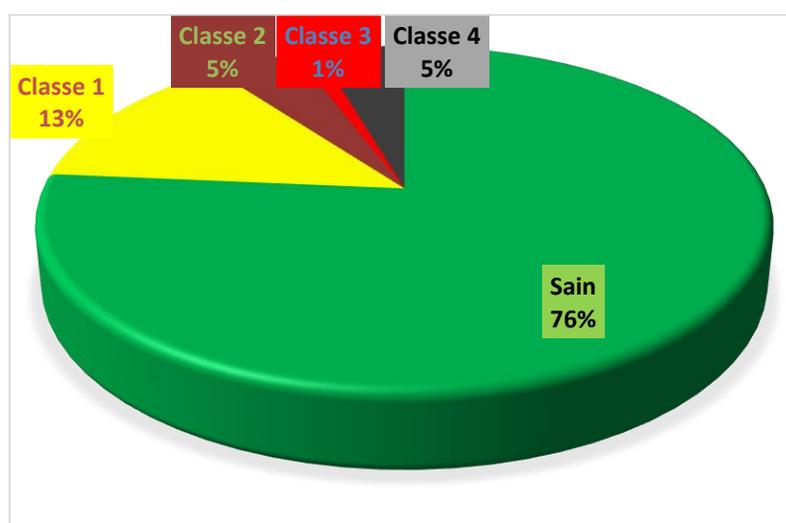
La même situation a été enregistrée dans les vergers de la localité d'ElAfroun (la plupart sont des jeunes vergers Af1, Af2 et Af3). Nous avons enregistré un taux d'infection moyen de 10.81%, un indice de gravité de 1.22 et une incidence de 4.64% (Tab3.5).

**Tableau 3.5:** Taux d'infection, gravité et incidence dans les vergers de la région d'Afroun

Année verger	Taux d'infection				Indice de gravité				Taux d'incidence			
	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020
Af1	8,42	9,32	14,16	17,56	1,17	1,50	1,77	1,96	2,46	3,49	6,27	8,60
Af2	6,3	9,87	15,13	22,48	<b>1,07</b>	1,19	1,21	1,14	1,68	2,94	4,57	6,41
Af3	<b>1,31</b>	2,21	1,55	1,43	1,86	2,27	2,27	2,42	0,61	1,25	0,94	<b>0,45</b>
Af4	8,63	14,21	<b>26,57</b>	22,34	1,75	1,64	<b>2,43</b>	1,80	3,76	5,84	<b>16,16</b>	10,03
Af5	4,84	5,22	10,19	11,30	1,46	1,67	2,18	1,65	1,77	2,17	5,56	4,66

### I.3.2 Evolution des classes de dépérissement

Le taux cumulé des trois classes de dépérissement (classe1, 2, 3) est de 19.07% par rapport à l'ensemble des vergers, avec un taux d'arbres arrachés (classe 4) de 4.54% (Fig 3.11). Globalement, l'évolution des différentes catégories du dépérissement est plus grave dans les régions de : Oued El-Alleug et Mouzaia par rapport aux régions de Larabaa, Boufarik et Afroun. Le pourcentage moyen du dépérissement de la classe « 1 » a atteint 27.07 % pour les vergers de Boufarik, 15.50 % pour les vergers de Larabaa, 12.15 % pour les vergers d'Oued El-Alleug, 7.76 % pour les vergers de la région de Mouzaia et 4.51% pour ceux d'Afroun.



**Figure 3.11 :** Situation générale des vergers étudiés selon différentes classes de dépérissement

Pour le dépérissement de la classe « 2 », nous avons enregistré des taux moyens de 4.48 % pour l'ensemble des régions étudiées. Le taux le plus élevé a été noté à Mouzaia (7.91 %) et le plus faible à la région de Larabaa (1.13%).

Concernant les taux obtenus pour le dépérissement classe « 3 », nous avons noté un taux moyen de 1.19 %. Il varie de 0.16 % pour les vergers de la région de Larabaa à 2.16 % pour les vergers de la région de Mouzaia. Pour le taux d'arrachage affectés à la classe « 4 », nous avons relevé les taux les plus élevés à Mouzaia et Oued El-Alleug respectivement 7.15 % et 9.76 %.

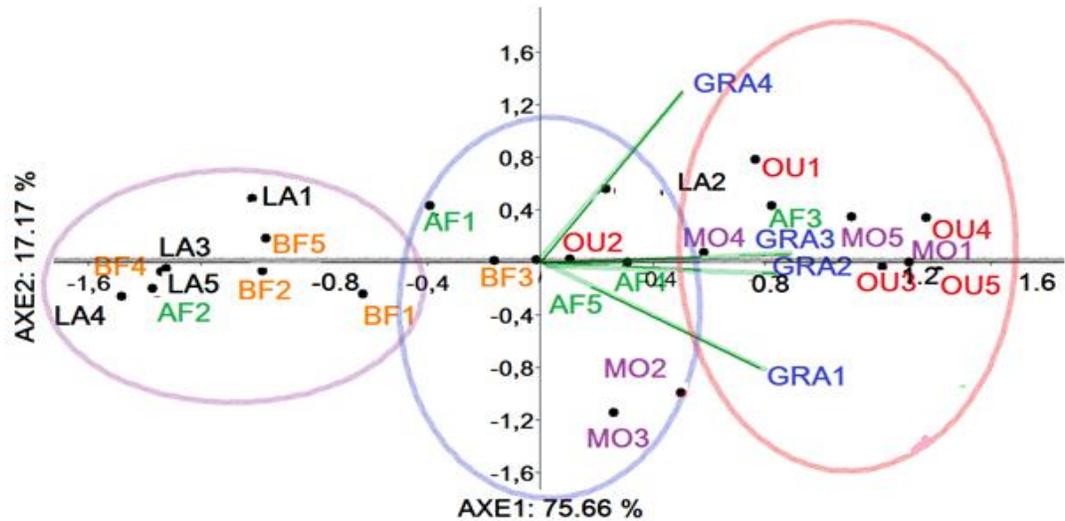
### **I.3.3 Variabilité épidémiologiques dans les différentes régions**

L'évolution des paramètres épidémiologiques (Taux d'incidence, indice de gravité et taux d'infection) dans les cinq régions, durant les quatre d'années d'étude (2017/2020), a été comparée par l'analyse des composantes principales (ACP) (Fig 3.12) associée au classement des groupes à travers une classification hiérarchique (CHA) (Annexe H).

#### **I.3.3.1 Indice de gravité**

Les projections des valeurs de l'indice de gravité (gra) sur les deux axes montrent des contributions de 92.83 % de la variance totale. Les fortes valeurs de projection sont enregistrées sur le premier axe (75.66 %), ce qui révèle une nette différence entre les vergers de Boufarik et Laraba avec ceux de Mouzaia, Oued ElAlleug et Afroun (AF3, AF4, AF5). La classification hiérarchique fait ressortir trois groupes:

- Le groupe 1 désigne une corrélation positive entre les vergers des localités d'Oued Elalleug (OU1, OU3, OU4, OU5), de Mouzaia (MO1, MO4, MO5), du verger AF3 d'Afroun et LA2 de Laraba avec les indices de sévérités enregistrés durant les années d'études (2017, 2018, et 2019 et 2020) (Fig 3.12).
- Le groupe 2 révèle une faible corrélation entre les localités d'Afroun (AF1, AF4, AF5), de Mouzaia (MO2 et MO3) et les vergers OU2 d'Oued ElAllug et BF3 de la région de Boufarik avec les indices de gravité des quatre années d'études (2017, 2018, et 2019 et 2020) (Fig 3.12).
- Le groupe 3 montre une corrélation négative entre les vergers des localités de Boufarik (BF1, BF2, BF4, BF5), de Laraba (LA1, LA3, LA4, LA5) et du verger AF2 d'Afroun (Fig 3.12).

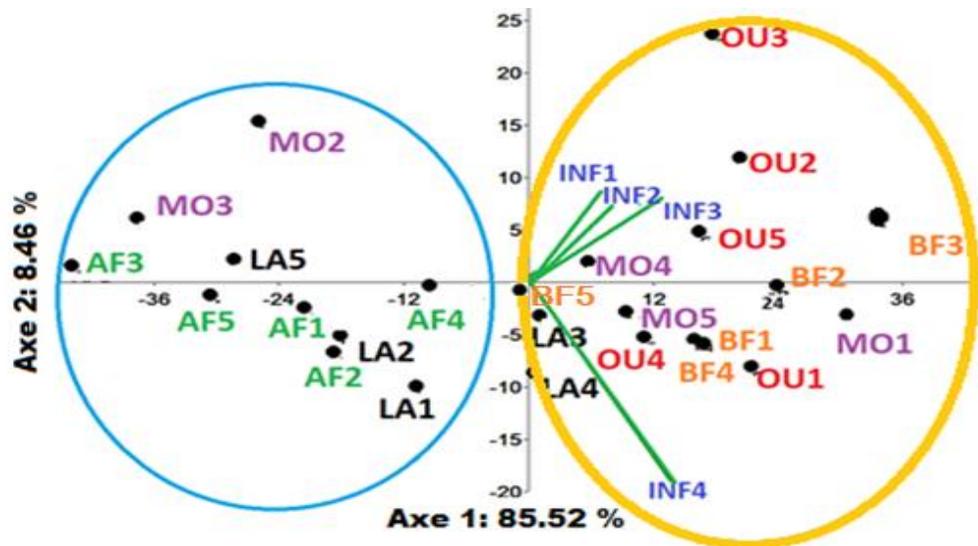


**Figure 3.12:** Analyse en composante principale (ACP) de l'indice de gravité des régions étudiées. AF<sub>i</sub> : Afroun; MO<sub>i</sub> : Mouzaia ; OU<sub>i</sub> : Oued El-Alleug ; BF<sub>i</sub> : Boufarik ; LA<sub>i</sub> : Larabaa ; i=vergers de 1 à 5 ; GRA<sub>i</sub> : indice de gravité, i= 1(2017), 2(2018), 3(2019), 4(2020).

### I.3.3.2 Taux d'infection

L'analyse en composantes principales (Fig 3.13) concernant l'évolution du taux d'infection a révélé une contribution importante (93.98 %) par rapport à la variance totale. La valeur enregistrée sur le premier axe est de 85.52 % mettant en évidence une nette différence entre les vergers des localités des régions de Boufarik, d'Oued Elalleug (BM1, BM2, BM3), de Mouzaia (MO1, MO4 et MO5) et les deux vergers de la localité de Laraba (LA3 et LA4) qui se distinguent des vergers de la localité d'Afroun, de Laraba (LA1, LA2, LA5) et de Mouzaia (MO2 et MO3). La classification hiérarchique ascendante (CHA) (Annexe H) fait ressortir deux groupes :

- Le groupe 1 montre une corrélation positive entre les vergers des localités de Boufarik, d'Oued Elalleug (BM1, BM2, BM3), de Mouzaia (MO1, MO4 et MO5) et les deux vergers de la localité de Laraba (LA3 et LA4) avec le taux d'infection enregistrées durant les années d'études (2017, 2018, 2019 et 2020) (Fig 3.13).
- Le groupe 2 montre une corrélation négative entre les vergers des localités d'Afroun, de Laraba (LA1, LA2, LA5) et de Mouzaia (MO2 et MO3) avec le taux d'infection des quatre années d'étude (Fig 3.13).



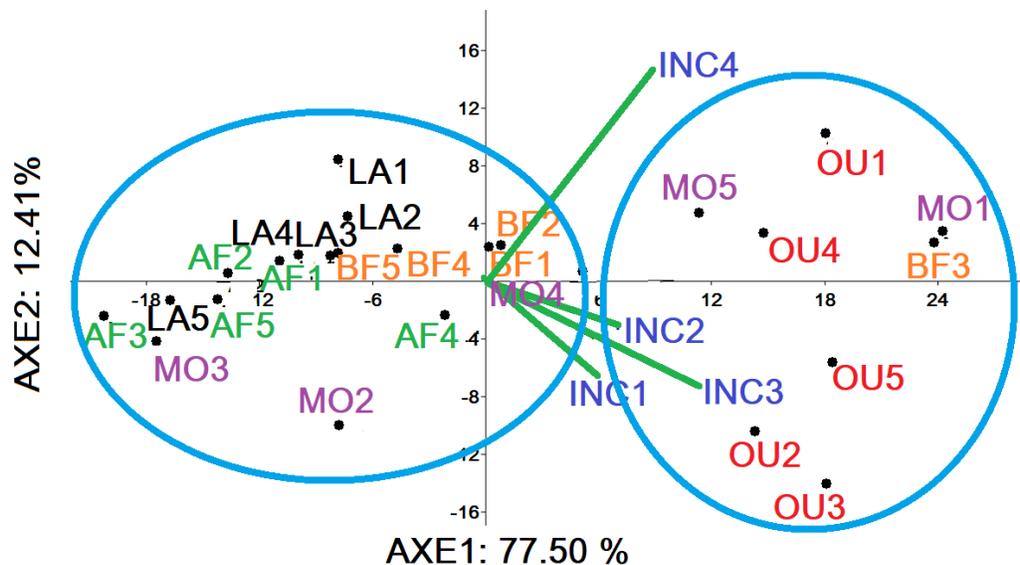
**Figure 3.13** : Analyse en composante principale (ACP) de l'indice du taux d'infection des régions étudiées AF<sub>i</sub> : Afroun; MO<sub>i</sub> : Mouzaia ; OU<sub>i</sub> : Oued El-Alleug ; BF<sub>i</sub> : Boufarik ; LA<sub>i</sub> : Larabaa ; i=vergers de 1 à 5 ; INF<sub>i</sub> : taux d'infection, i= 1(2017), 2(2018), 3(2019), 4(2020).

### I.3.3.3 Taux d'incidence

La Figure 3.14 montre (93.98 %) de contribution du taux d'incidence par rapport à la variance totale. La valeur enregistrée sur le premier axe est de 85.52 % et de 8.46 % sur le deuxième axe mettant en évidence une nette différence entre les vergers des localités des régions d'Oued El-Alleug, de Mouzaia (MO1 et MO5) et de Boufarik (BF3) avec ceux de la région de Laraba, Afroun, Boufarik (BF1, BF2, BF4 et BF5) et Mouzaia (MO2, MO3 et MO4).

Il est a noté que la classification hiérarchique ascendante (CHA) (Annexe H) fait ressortir deux groupes :

- Le groupe 1 montre une corrélation positive entre les vergers des localités d'Oued El-Alleug, de Mouzaia (MO1 et MO5) et de Boufarik (BF3) avec les infections enregistrées durant les années d'études (2017, 2018, 2019 et 2020) (Fig. 3.14).
- Le groupe 2 montre une corrélation négative entre les vergers des localités de Laraba, Afroun, Boufarik (BF1, BF2, BF4 et BF5) et Mouzaia (MO2, MO3 et MO4) avec les infections enregistrées durant les années d'études (2017, 2018, 2019 et 2020) (Fig. 3.14).



**Figure 3.14 :** Analyse en composante principale (ACP) de l'indice du taux d'incidence des régions étudiées AF<sub>i</sub>: Afroun; MO<sub>i</sub>: Mouzaia ; OU<sub>i</sub>: Oued El-Alleug ; BF<sub>i</sub>: Boufarik ; LA<sub>i</sub>: Larabaa ; i=vergers de 1 à 5 ; INC<sub>i</sub> : taux d'incidence, i= 1(2017), 2(2018), 3(2019), 4(2020).

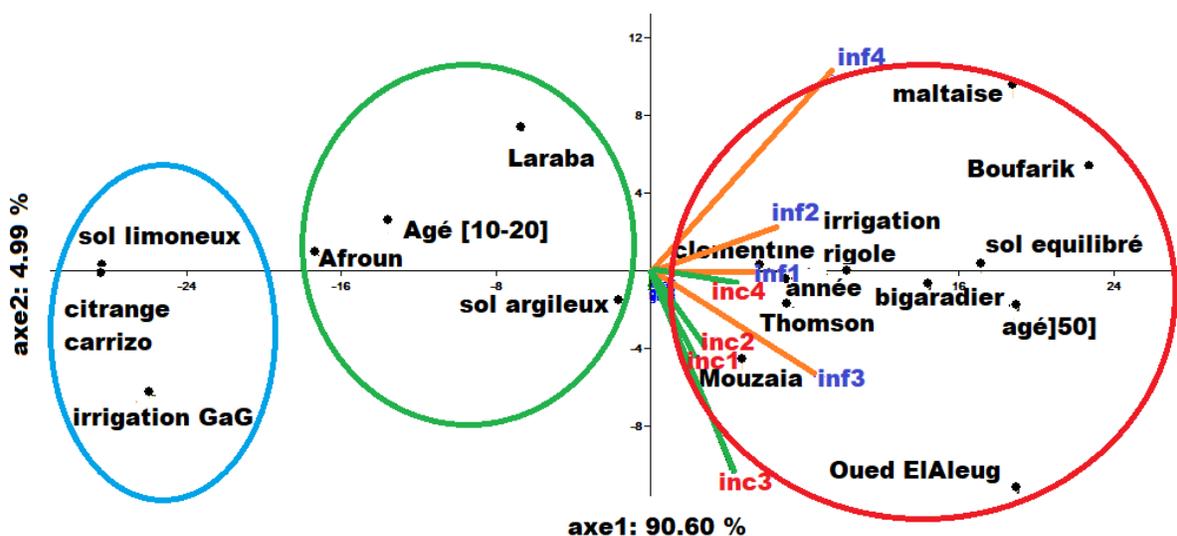
### I.3.4 Influence des facteurs étudiés sur les indices épidémiologiques

La comparaison des différents facteurs étudiés par rapport à l'évolution des paramètres épidémiologiques (Taux d'incidence, indice de sévérité et taux d'infection) durant les quatre d'années d'étude (2017/2020) par l'analyse en composantes principales (ACP) associée au classement des groupes à travers une classification hiérarchique (CHA), a permis de visualiser trois groupes de facteurs (Fig 3.15):

Le premier groupe en rouge montre une corrélation positive entre les facteurs : régions (Boufarik, Mouzaia et Oued ElAleug), variétés (Thomson, Clémentine et Maltaise), année, porte greffe (Bigaradier), irrigation en rigole, âge de plus de 50 ans et sol équilibré avec les taux d'infections et d'incidence enregistrées durant les quatre années d'études (2017, 2018, 2019 et 2020).

Le deuxième groupe en bleu révèle une corrélation négative entre les facteurs porte greffe (citrange carrizo), sol limoneux-sableux et irrigation en goutte à goutte avec les taux d'infections et d'incidence enregistrées durant les quatre années d'études (2017, 2018, 2019 et 2020).

Le troisième groupe en ver est un groupe intermédiaire entre les deux groupes cités. Il rassemble les régions de Laraba et Afroun, sol argileux et âge de moins de 20 ans. Ce groupe est négativement corrélé avec les taux d'infections et d'incidence enregistrées durant les quatre années d'études (2017, 2018, 2019 et 2020).



**Figure 3.15** : analyse en composante principale (ACP) pour l'influence des facteurs étudiés sur les indices épidémiologiques. Régions (afroun, mouzaia, oued el-alleug, boufarik et larabaa), variétés (thomson, clémentine et maltaise), porte-greffes (bigaradier, citrange carrizo), texture (argileux, limoneux, équilibré), âge des vergers (moins 50 ans et moins 20 ans), type d'irrigation (goutte à goutte et rigole) ; (inf1, inf2, inf3, inf4)= taux d'infection (2017, 2018, 2019, 2020) ; (inc1, inc2, inc3, inc4)= taux d'incidence (2017, 2018, 2019, 2020).

### 1.3.5 Etudes des variations temporelles des indices épidémiologiques

Les taux d'infection et d'incidence ont été évalués à l'aide d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA) avec  $P \leq 0,05$ . Des différences significatives avec l'intervalle de confiance de 95% ont été détectées en appliquant le test de différence honnêtement significative (HSD) de Tukey. Le logiciel statistique Minitab (version 19) a été utilisé pour effectuer l'analyse statistique.

#### 1.3.5.1 Taux d'infection

Le tableau ci-dessus désigne que le facteur variété montrent un effet non significatif sur la variabilité des taux d'infection ( $P=0,465$   $p>0,05$ ). Le facteur année est moyennement significative ( $P=0,04$   $p<0,05$ ). En revanche, les facteurs région, âge, porte greffe, type d'irrigation et type de sol révèlent l'existence d'une différence hautement

significative avec les valeurs respectives ( $P=0,000$  ;  $p<0,05$ ) et ( $P=0,000$  ;  $p<0,05$ ) ; ( $P=0,001$  ;  $p<0,05$ ) ; ( $P=0,001$  ;  $p<0,05$ ) et ( $P=0,000$  ;  $p<0,05$ ) (tab 3.6)

**Tableau 3.6** : Analyse de la variance.

Sources de la variance	Somme des carrés	DDL	Moyen des Ecarts	F-ratio	P
Régions	7804	4	1951	17,09	0.000***(a)(b)(bc)(c)
Variété	292	2	146	0,77	0.465 <sup>NS</sup> (a)
Age	5479	1	5479,5	40,76	0.000***(a)(b)
Porte greffe	1954	1	1953,7	11,47	0.001***(a)(b)
Irrigation	1865	1	1864,7	10,89	0.001***(a)(b)
Type sol	4205	2	2102,5	14,12	0.000***(a)(b)(c)
Année	1538	3	512,7	2,88	0,04*(a)

**N.S.**: non significative. \* : Probabilité moyennement significative à 5 %. \*\*\* : Probabilité hautement significative à 5 %. Les lettres après les chiffres fait référence aux nombre groupes à l'intérieur de chaque facteur qui diffèrent significativement selon le test HSD de Tukey à  $p\leq 0,05$ .

### I.3.5.2 Taux d'incidence

L'analyse de variance (Tab 3.7) montre que le facteur variété révèle des effets non significatifs sur la variabilité des taux d'incidences ( $P=0,921$ ,  $p=0.06$   $p>0,05$ ) respectivement. Le facteur type d'irrigation et année montre aussi des effets non significatifs ( $P=0,052$   $p\geq 0,05$ ) et les facteurs région, âge, porte greffe et type de sol présentent une différence hautement significative avec les valeurs respectives ( $P=0.000$  ;  $P=0.000$  ;  $p=0.011$  et  $p=0.012$   $p<0,05$ ).

**Tableau 3.7** : Analyse de la variance.

Sources de la variance	Somme des carrés	DDL	Moyen des Ecarts	F-ratio	P
Régions	2565	4	641,22	15,54	0.000*** (a)(ab)(b)(c)
Variété	11,04	2	5,522	0,08	0.921 <sup>NS</sup> a
Age	1462	1	1462,47	28,53	0.000***(a)(b)
Porte greffe	412,7	1	412,67	6,66	0.011***(a)(b)
Irrigation	245,7	1	245,71	3,86	0.052* a
Type sol	568,2	2	284,1	4,66	0.012***(a)(ab)(b)
Année	479.4	3	159.8	2.55	0.06* a

**N.S.:** non significative. \* : Probabilité significative à 5 %. \*\*\* : Probabilité hautement significative à 5 %. Les lettres après les chiffres fait référence aux nombre groupes à l'intérieur de chaque facteur qui diffèrent significativement selon le test HSD de Tukey à  $p \leq 0,05$ .

#### I.4 Discussion

Le dépérissement des agrumes devient de plus en plus un problème très inquiétant dans la région de la Mitidja, et aucune réponse scientifique n'a été apportée à ce sujet de manière claire et précise car leur impact sur les agrumes n'a pas été largement exploré. La plupart des études réalisées dans les différentes zones agrumicoles dans le monde se sont limitées à l'identification et à la pathogénicité des espèces isolées [66,78,81,116,117]. Pour cette raison, nous sommes basés dans la première partie de notre étude sur les aspects épidémiologiques du dépérissement. Nous avons ciblé dans notre étude 25 vergers d'agrumes répartis sur les cinq régions agrumicoles potentielles de la wilaya de Blida (Affroun, Mouzaia, Oued el-alleug, Boufarik et Larabaa) cumulant 25 544 arbres, sur une superficie de 80 ha.

Le diagnostic symptomatologique nous a permis de suivre l'évolution des symptômes qui apparaissent et évoluent selon deux situation, un dépérissement foudroyant où l'arbre passe d'un état sain sans aucun symptôme à une situation de dépérissement total au bout de quelques jours et un dépérissement progressif qui évolue partiellement et lentement. La surveillance des cas de dépérissement, a permis de constater la présence de plusieurs foyers de dépérissement évolutifs regroupant quatre classes de dépérissement: dessèchement des extrémités des rameaux (classe 1) ; dépérissement unilatéral où partiel touchant une partie de l'arbre (classe 2) ;

dépérissement total de l'arbre (classe 3) et des arbres arrachés pour différentes causes (classes 4). Il a été noté aussi la présence de plusieurs symptômes sur la végétation et les branches, tels que le jaunissement, le chancre et la défoliation. Cette symptomatologie constatée ressemble à celle déjà signalé par Adesemoye et al [66], Mohammadi Hamid [113] et Berraf-Tebbal et al [116].

L'estimation globale de la situation de dépérissement dans les vingt-cinq vergers étudiés, nous a permis d'enregistrer une moyenne générale du taux d'infection de 23.28%, nous avons enregistré aussi une valeur moyenne de la classe du dépérissement (indice de gravité) de 1.77 et une incidence moyenne de 10.76%.

Cependant, il est difficile de se prononcer sur l'étiologie de notre dépérissement de façon claire et précise, du fait qu'il y a d'une part une confusion entre les différentes descriptions symptomatologiques correspondant à des maladies de différentes origines (biotique et abiotique) et d'autre part la complexité dans le développement et l'expression des symptômes, mais la présence de symptôme de dépérissement unilatéral qui est considéré comme symptôme typique de la trachéomycose et de plus, la présence de fructifications fongiques sur le tronc et les branches (carpophores et pycnides), nous a permis de nous concentrer beaucoup plus sur les symptômes exprimés par les maladies fongiques. L'examen des coupes transversales et longitudinale des troncs et des branches infectées des arbres symptomatiques a révélé différents types de décoloration du bois, ce type de symptôme est dû au processus de colonisation du bois par des champignons lignicoles provoquant leur décomposition et l'apparition de nécrose. Des situations similaires ont été décrites dans plusieurs vergers d'agrumes, à travers le monde [66,78,81,116]. Des études initiées depuis 2006 [9,10,11,117] dans la région de Mitidja sur ces cas de dépérissement ont révélé l'implication d'une flore fongique diversifiée isolée du bois des arbres atteints.

La distribution des arbres atteints est variable d'un verger à l'autre, d'une manière générale, nous avons noté que les arbres atteints du dépérissement dans les vergers irrigués en goutte à goutte, se trouve dans la plus part isolés les uns des autres et se répartissent d'une manière généralisée sur toute la surface du verger. Alors que, les arbres dépéris des vergers irrigués à la rigole se trouvent alignés l'une à côté de l'autre et se

concentre dans le milieu ou dans le côté nord des vergers. A cet effet, nous pensons que la propagation peut se faire ; soit par les outils de taille, soit par les eaux d'irrigation en fonction de l'inclinaison de terrain, ce qui explique le regroupement et l'alignement des cas de dépérissement dans les mêmes rangers. Alors que le regroupement et la concentration des arbres malades dans la moitié nord du verger est dû à l'inclinaison du terrain et la stagnation des eaux de pluie à cause de la destruction des systèmes de drainage. Cette différence dans la répartition au niveau des vergers est due essentiellement à deux types de facteurs ; des facteurs physiologiques qui sont en relation avec l'âge et l'état nutritionnelle de l'arbre, et des facteurs pédoclimatiques qui sont en relation avec l'environnement de l'arbre. Plusieurs auteurs ont montré que l'expression de la maladie est plus souvent associée à des facteurs de stress abiotiques tels que la sécheresse, les dommages physiques, l'asphyxie racinaire, le gel et les conditions de croissance inappropriées [118,119,120,121,122,123].

Globalement, le descriptif symptomatologique constaté dans nos vergers, de par sa variabilité et son expression différentielle peut s'expliquer par les effets relatifs ou combinés des principales variables prises en considération dans notre étude. En effet, les analyses statistiques ont montré que les facteurs : région, âge, porte greffe, type d'irrigation et texture de sol ont un effet hautement significatif sur la variation des paramètres épidémiologiques. En revanche le facteur année est moyennement significatif. Alors que le facteur variété n'a aucun effet sur ces indices. L'analyse en composante principale (ACP) a montré une nette différence entre les facteurs étudiés qui sont corrélés positivement ou négativement avec les indices épidémiologiques durant les années d'étude (2017-2020).

En analysant le développement des différentes catégories symptomatologiques sur les variétés étudiées, il apparaît que la répartition reste aléatoire et non spécifique au génotype végétal. Les trois variétés étudiées (Thomson navel, Maltaise, Clémentine) ont montré les mêmes symptômes typiques à savoir le dépérissement partiel ou total. En effet, selon Dubos [124], il n'existe pas des variétés résistantes aux maladies du bois par contre, il existe des variétés de sensibilité variable, peu sensibles ou tolérants. Ce même auteur a noté que la sensibilité des variétés suggère l'existence d'interactions complexes

entre la variété, la localité, les conditions de culture et la pression de l'inoculum. Il est à conclure que le classement de la sensibilité des variétés ne constitue pas une constante.

Comme pour l'effet des variétés, différentes hypothèses peuvent expliquer l'impact des portes greffe sur l'expression des symptômes et sur les indices épidémiologiques. Au niveau des parcelles étudiées, les plantes sont greffées sur bigaradier ou citrange carrizo. Les différentes classes de dépérissement durant nos prospections ont été enregistrées surtout sur les variétés greffées sur bigaradier. Plusieurs hypothèses sont formulées pour expliquer cet effet, d'après Aubert et Vullin [14] le Bigaradier est un porte greffe qui craint les excès d'eau et les sols lourds, contrairement au Citrange Carrizo qui supporte moyennement les sols humides, et craint les sols secs. D'un autre côté, selon Castle et al [125], La différence de tolérance des porte-greffes pourrait être due à la quantité d'inoculum présente dans le sol et aux effets des stress physiologiques. D'après les observations effectuées lors des visites des sites d'étude, nous avons remarqué la stagnation de l'eau durant les périodes de fortes précipitations suite à la destruction des systèmes de drainage. Nous avons noté aussi que les agriculteurs utilisent des techniques culturales classiques, telles que les labours et le discage durant les périodes printanières et estivales, ce qui provoque la destruction des racines superficielles et donc l'ouverture de plusieurs sites d'infection pour les parasites de sol. Nous avons remarqué aussi qu'après les opérations de discage, la terre entre les lignes devient plus haute que celle de la ligne de plantation, ce qui provoque la stagnation des eaux de pluie proches des systèmes racinaires des plants d'agrumes et peut provoquer des asphyxies et des pourritures racinaires.

D'un autre côté, l'effet de la texture de sol n'est pas exclu car il s'agit des sols lourds avec un pourcentage d'argile qui dépasse les 40 %. En agriculture, avoir un sol argileux est à la fois un atout et une contrainte : En effet, en raison de sa richesse en minéraux, le sol argileux est très fertile et permet le bon développement des plantes. En revanche, son caractère imperméable et dense le rend relativement difficile à travailler et peut provoquer des asphyxies racinaires. D'autre part, même s'il n'y a pas une destruction physique et une asphyxie, à terme, un séjour long d'eau dans le verger crée une ambiance favorable au développement des maladies [126, 127]. Selon Lossert [13], un sol favorable à l'installation d'un bon système racinaire des arbres, doit être homogène et présente une

bonne perméabilité à l'eau, car les agrumes craignent les excès d'humidité du sol (asphyxie racinaire). Ce sont en général les terres à texture équilibrée qui conviennent le mieux. Dans le cas des sols argileux, il est conseillé d'installer un système de drainage ou pratiquer la culture sur buttes afin de favoriser une bonne aération du sol [14,16].

En ce qui concerne l'irrigation, les plantations irriguées en goutte à goutte ont montré des taux moyens d'incidence, d'infection et de sévérité. En revanche les plantations irriguées à la raie ont montré des taux assez importants. Timmer et al [128], ont mentionné que les vergers irrigués par submersion créent un environnement favorable à l'infection, ce qui favorise la sporulation et la transmission du champignon. Ristaino et Gumpertz [129] ont signalé que la principale raison de la dispersion de l'inoculum de la région infectée vers la région saine est l'eau de surface.

Concernant l'âge des vergers, les jeunes plantation (moins de 20 ans) ont montré des taux moyens d'incidence, d'infection et de sévérité. En revanche les plantations qui appartiennent à la tranche d'âge plus de 50 ans ont montré des taux assez importants. Le Gall et Le Gat [130], pensent que l'âge constitue l'un des principaux facteurs favorisant l'évolution de ce type de maladies car ils traduisent la durée d'exposition des plants au risque de contamination. D'après cette hypothèse, les vieux plants sont plus exposés et plus réceptifs que les jeunes plants.

Pour l'effet de la région sur la variabilité des paramètres épidémiologiques, les vergers prospectés se situent dans des régions agricoles qui se trouvent dans un étage bioclimatique subhumide; elles sont caractérisées par des températures moyennes mensuelles clémentes et des précipitations annuelles qui excèdent 600mm (annexe E); ou les conditions de développement des agents pathogènes sont très favorables. D'après Goulet [131], la pluie semble être un facteur important pour l'infection, et favorise la migration des spores en profondeur, jusqu'à 2 cm à l'intérieur du bois, à partir de la plaie de taille. La quantité de pluie agit comme un facteur déclenchant de la sporulation [132]. Par contre, d'après Migheli et al [133], aucune corrélation n'ait été trouvée entre la quantité de pluie, le nombre de jours de pluie et le pourcentage de plantes infectées, il semble donc que la pluie affecte la dissémination de l'inoculum plutôt que l'infection [133]. Les conditions climatiques influencent certainement l'expression des symptômes des

dépérissements. Des enquêtes réalisées en France et dans d'autres pays Européens, montrent que les taux d'infection et les incidences varient beaucoup d'une parcelle à une autre et à l'intérieur d'une même zone agro climatique [130].

En ce qui concerne les pratiques agricoles dans notre région d'étude, il n'est pas clair à l'heure actuelle si la transmission de ces agents phytopathogènes se produit entre les agrumes et d'autres hôtes poussant à proximité. Par conséquent, des formes de fructification des mêmes champignons ont été retrouvées à la fois sur la vigne et sur les agrumes dans la région de la Mitidja (Algérie) [59,116 133,134,135]. La présence des fructifications de ces agents phytopathogènes sur les branches d'agrumes mortes confirme que les agrumes sont parmi les principaux hôtes de ces agents pathogènes car ils sont capables de compléter leur cycle de vie sur cette culture. L'irrigation par rigole, la taille et le passage du même matériel d'un verger à l'autre aide à la dispersion des spores à l'intérieur et entre les différentes cultures.

Le comportement épidémiologique du dépérissement au niveau des vergers prospectés confirme que la dissémination de la maladie est favorisée par les techniques culturales telles que l'irrigation et la taille. Les résultats de diffusion et de la gravité du dépérissement dans l'ensemble des vergers, confirment la probabilité de la cause biotique et l'implication des travaux culturaux dans la dissémination de la maladie. Notre étude a permis d'améliorer les connaissances sur l'épidémiologie des maladies de bois chez les espèces d'agrumes. Les résultats de notre enquête suggèrent que ces pathogènes infectent les agrumes par les plaies de taille et les blessures provoquées par les travaux culturaux. Les plaies de taille et les blessures constituent non seulement un point d'entrée pour les pathogènes, mais aussi une source de stress pour la plante hôte. Ceci en combinaison avec des facteurs de stress environnementaux qui peuvent être la principale cause de l'accroissement de l'incidence du dépérissement.

Pour mieux élucider ce syndrome, il est nécessaire d'impliquer dans d'autres études épidémiologiques tous les facteurs possibles qui influencent directement ou indirectement le syndrome de dépérissement. Cela permettra de mettre en œuvre des techniques de prévention et des stratégies de gestion afin de minimiser l'incidence de ces pathogènes et de prévenir leur propagation dans de nouveaux vergers.

## II. Etude étiologique

### II.1. Caractérisation et identification des isolats fongiques

La quasi-totalité de la flore fongique isolée est associée avec la symptomatologie des dépérissements enregistrés sur les arbres d'agrumes examinés durant notre étude épidémiologique.

Les colonies fongiques obtenus ont montré des aspects variables (aérien, sub-aérien, cotonneux) et de divers couleurs (gris clair, gris noirâtre, noir, blanc, violet, brunâtre, rouge et rose). Ces observations macroscopiques ont permis l'identification des genres suivants : *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Eutypa*, *Alternaria* et *Colletotrichum*, accompagné d'une flore saprophyte abondante (*Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* et les bactéries), nous avons noté la dominance de certains genres de champignons par rapport aux autres.

#### II.1.1. Caractérisation morphologiques et micro-morphologiques

##### II.1.1.1. La famille des *Botryosphaeriaceae*

Les espèces de cette famille incriminée dans le dépérissement causant la maladie de Black Dead Arm (BDA), ont été fortement isolées dans cette étude.

- **Caractères cultureux** : sur milieu PDA, les espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* présentent des colonies régulières d'un aspect cotonneux (Fig 3.16 A.B.C), il est de couleur blanche au début de l'incubation (Fig 3.16 D) puis vire vers le gris clair pour devenir foncée à noir (vert olive). Le mycélium de cette espèce est aérien, avec le vieillissement de la culture, il devient très dense (Fig 3.16 E.F).
- **Caractères micro morphologique** : le mycélium de ce champignon est coloré d'un brun très foncé à noire, il est cloisonné et ramifier, des chlamydo-spores apparaissent avec le vieillissement de la culture.
- **Formes de fructification** : Aucune fructification n'a été observé sur les cultures de ce genre sur milieu PDA (Fig 3.17 A.B). La plupart des isolats ont formé des stromas conidifères contenant des conidies au bout de 14 jours d'incubation sous les rayons ultra-violet (Fig 3.16 G) et (Fig 3.17 E). L'induction de la sporulation sur les aiguilles de pin a montré des stromas souvent solitaires et parfois groupés. Ils sont globuleux,

de couleur gris au départ et à maturité devient plus foncés (Fig 3.16 G). L'observation microscopique a montré que les conidies sont oblongues, hyalines et aseptés au départ (Fig 3.17 F), à maturité, elles deviennent brunes foncé et septés avec apparition de stries longitudinales irrégulières (Fig 3.17 D).

L'observation sous loupe des rameaux et de l'écorce des branches et des troncs des arbres d'agrumes dépéris a permis, de constater la présence de plusieurs formes de fructification asexuées (pycnides) de couleur gris foncé (Fig 3.18 A.B.C.E) qui sont groupés (Fig 3.18 F.G.H) ou solitaires (Fig 3.18 I), nous avons constaté aussi des formes sexuées (périthèces) de forme globuleuse de couleur gris foncé (Fig 3.18 D).

### **II.1.1.2. La flore fusarienne**

Sur le milieu de culture PDA, nous avons obtenu des cultures fusariennes pures et homogènes. L'observation macroscopique et microscopique de ces cultures a permis l'identification des espèces suivantes : *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et des espèces de *Fusarium* non identifiées.

#### **II.1.1.2.1. *Fusarium solani***

##### **➤ Les caractères cultureux**

Sur milieu PDA, ce champignon produit des colonies d'aspect duveteux ou cotonneux de couleur blanche au départ qui devient brunâtre ou crème par la suite, sur la face inférieure, ils peuvent être pâles, violet, brun bleuâtre ou brun rouge (Fig 3.19 A).

##### **➤ Les caractères microscopiques**

L'observation microscopique de ce champignon a permis l'observation de la présence d'un mycélium cloisonné, qui est parfois épais et parfois fin, en donnant naissance à des conidiophores. Ces derniers se ramifient en monophilies minces et allongées qui produisent des macroconidies et des microconidies. Les macroconidies possèdent de 3 à 5 septa, elles sont abondantes, légèrement incurvées, hyalines, relativement large, droit, robuste et habituellement avec une fin arrondie (Fig 3.19 B et C). Les microconidies sont ovales ou ellipsoïde, hyalines et lisses. Certaines parmi eux sont courbées et

généralement non septées, parfois elles peuvent en avoir jusqu'à deux. Dans des conditions de croissance sous-optimales les espèces de *Fusarium solani* forment également des chlamydospores.

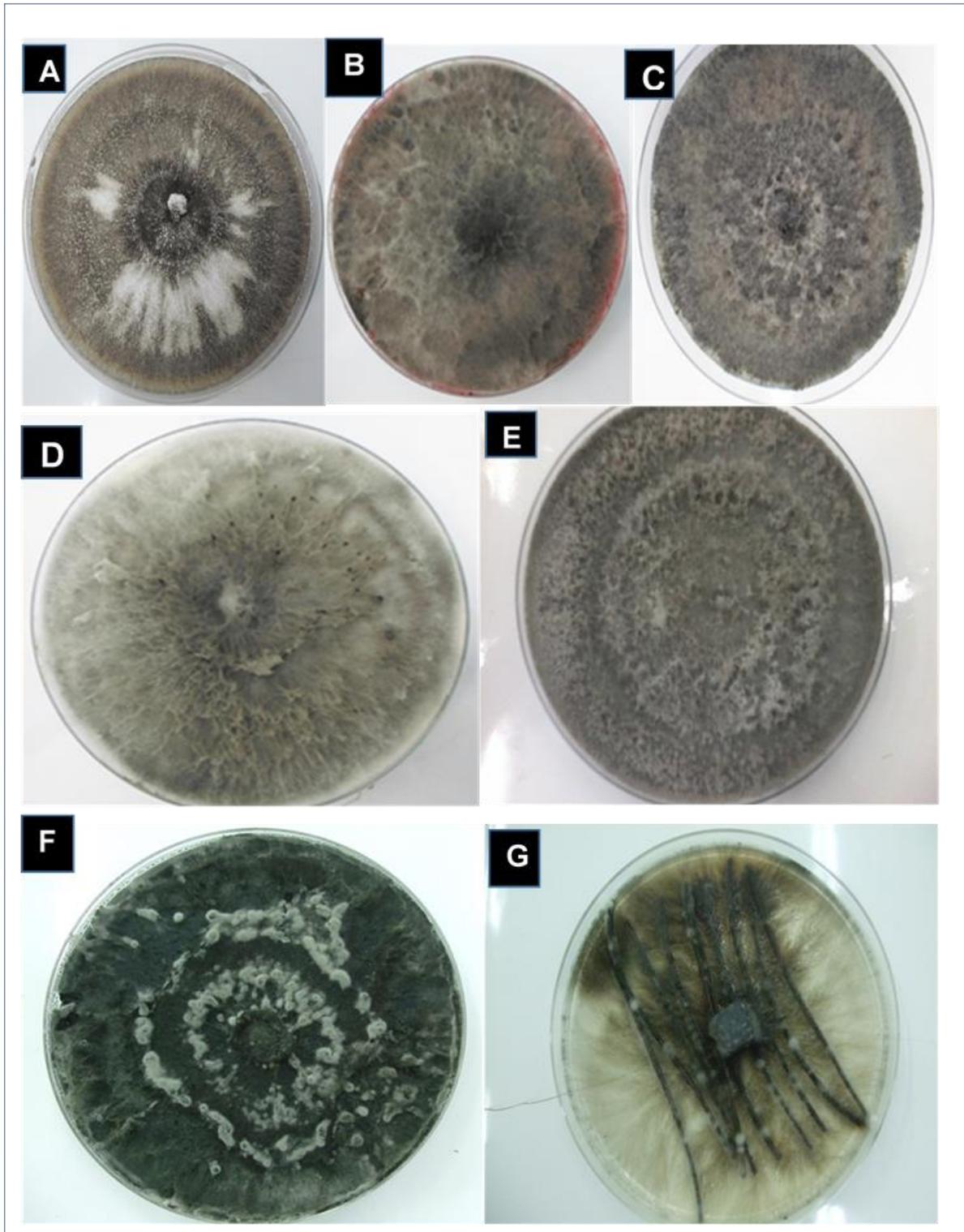
#### **II.1.1.2.2. *Fusarium oxysporum***

##### **➤ Les caractères cultureux**

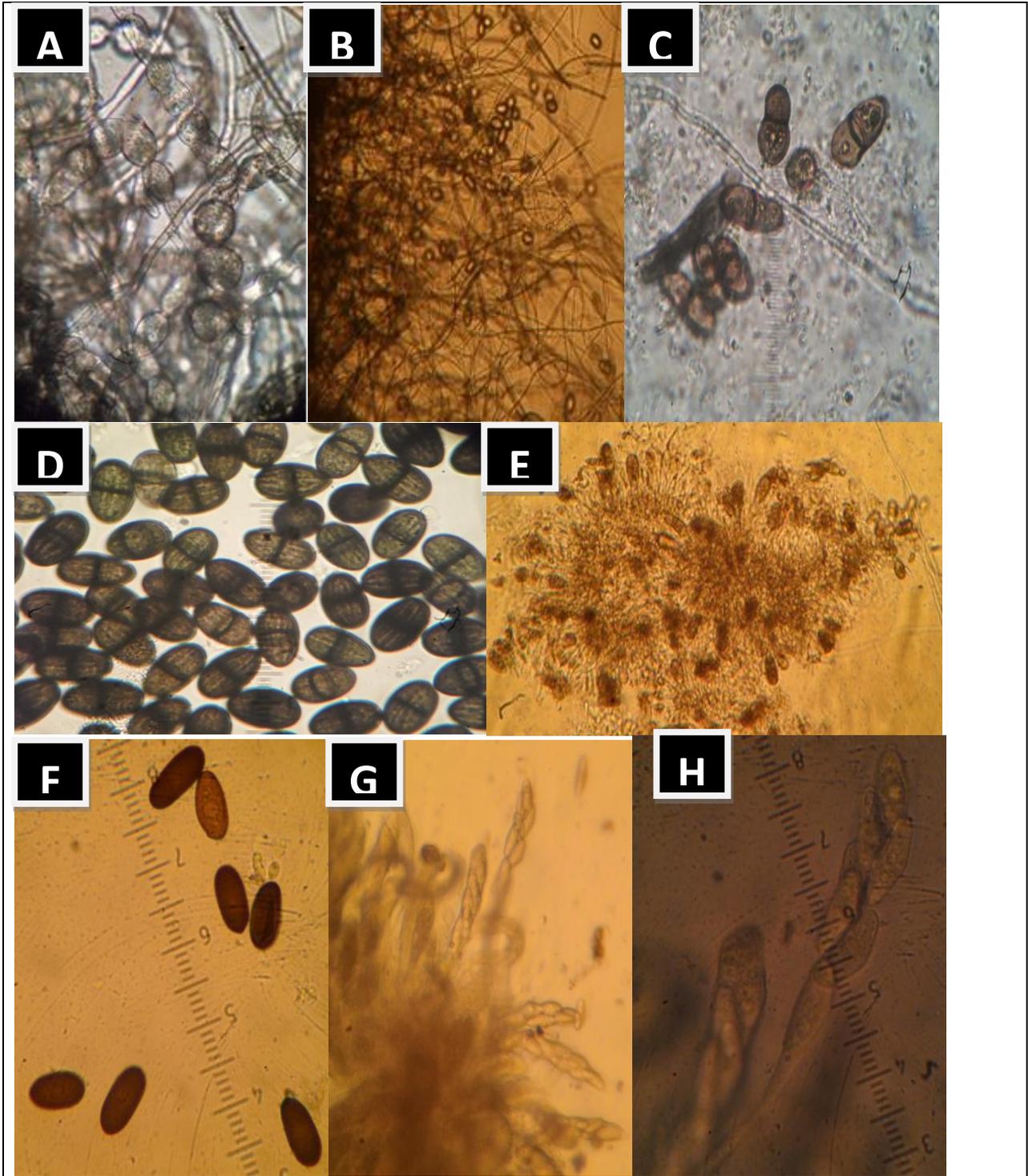
Sur milieu PDA, ce champignon produit des colonies d'aspect duveteux ou cotonneux de couleur blanche au début s'incubation puis devient saumon pale, violet clair, rose et rouge violacé. il peut produire des pigmentations violet clair ou foncé et rouge violacé (Fig 3.20 A.B).

##### **➤ Les caractères microscopiques**

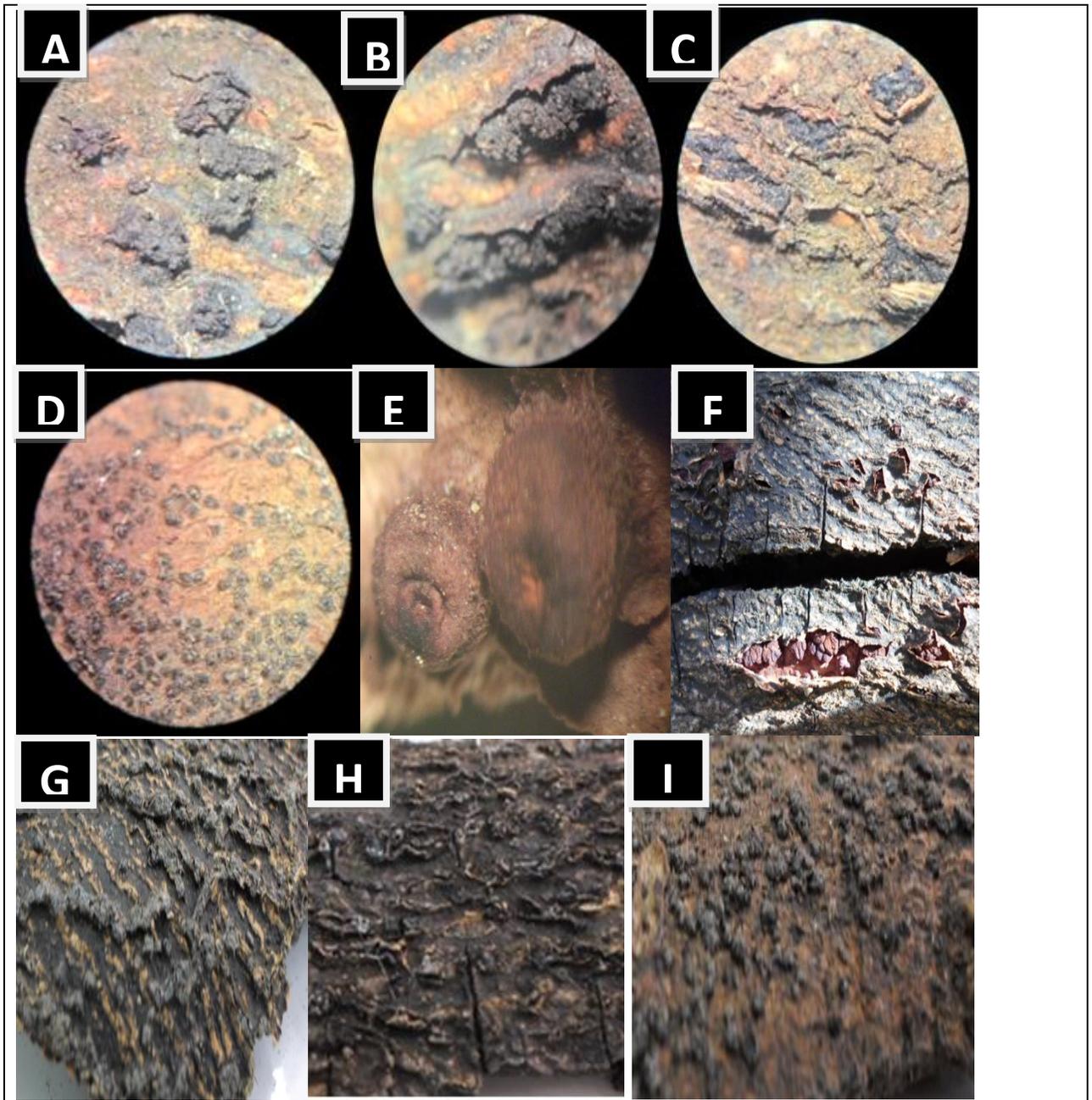
L'observation microscopique a montré un mycélium cloisonné, épais et fin, accompagnés par des macroconidies abondantes. La forme de ces dernières est presque droite et minces, elles ont généralement trois ou quatre cloisons, une cellule basale en forme de pied et une cellule apicale incurvée et effilée. Elles sont généralement produites à partir de phyalides sur les conidiophores. Nous avons noté aussi la présence des microconidies de différente formes : ovales, fusiforme et non cloisonnées. Avec le vieillissement de la culture, nous avons relevés la présence de nombreuses chlamidospores (Fig 3.20 C. D).



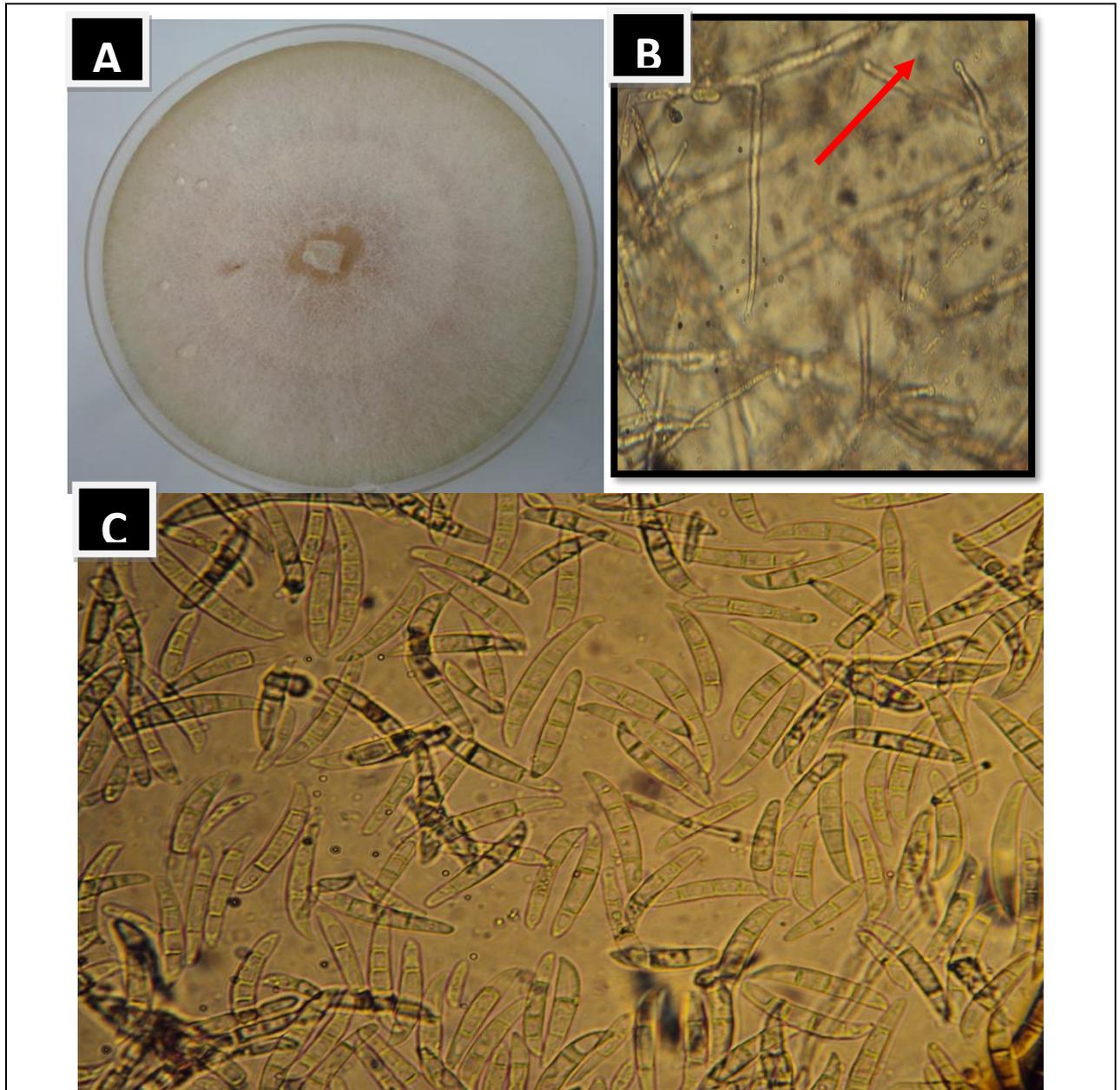
**Figure 3.16** : Aspect macroscopique des isolats de *Botryosphaeriaceae* ; A : Isolat de couleur brune avec des plages blanches et d'aspect ras ; B : Isolat brun d'aspect cotonneux avec présence de pigmentation rouge ; C : isolat de couleur gris et d'aspect subaérien ; D : Jeune isolat de couleur gris et d'aspect cotonneux ; E : Apparition de cordon sur veille isolat ; F : Sporulation sur milieu de culture PDA; G : Sporulation sur aiguilles de pin.



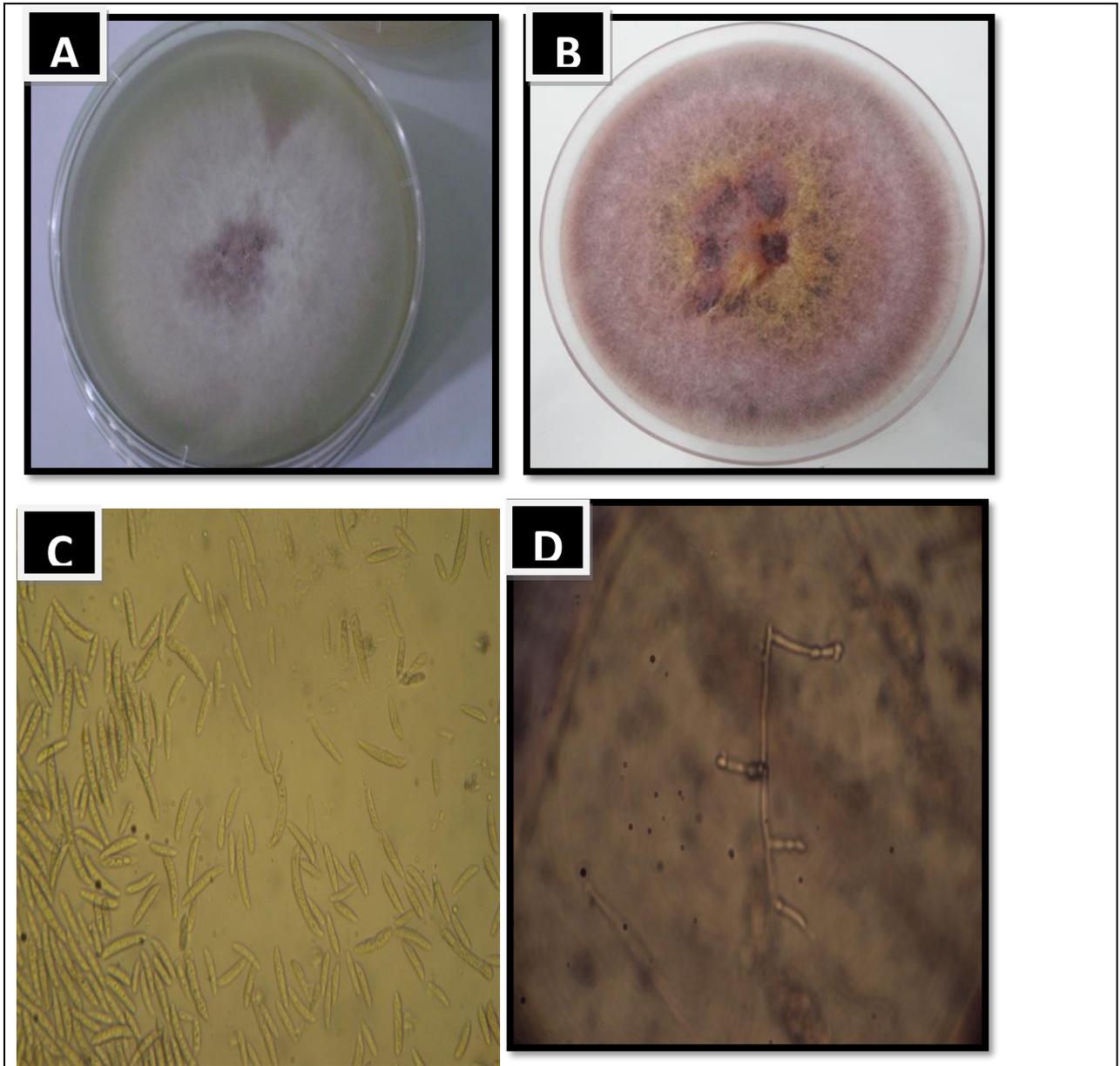
**Figure 3.17 :** Caractère microscopique des isolats de botryosphaeriacée ; A : Mycélium septé ramifié et chlamydospores (G10×10); B : Mycélium dense avec présence de conidies (G10×10) ; C : conidies mature septés (G10×40). D : Conidies mature septés présentant des stries longitudinales (G10×40) ; E : Cellules conidiogènes libèrent des conidies (G10×10) ; F : Ascospore mature non septés (G10×40); G : Asques contenant huit ascospores (G10×10). H : Asque contenant des ascospores (G10×40).



**Figure 3.18:** Les différentes fructifications sur écorce ; A.B.C.E : Formes de fructification asexuée (pycnide) sous loupe (Gx8) ; D : Forme de fructification sexuée (périthèces) (Gx8).F.G.H.I : Mode de regroupement des pycnides sur écorce.



**Figure 3.19** : Aspect microscopique et macroscopique de *Fusarium solani* sur milieu PDA ; A : culture de *Fusarium solani* de couleur blanchâtre et d'aspect sub-aerien ; B : Les monophialides (G : 10x40) ; C : Micro- conidies et macro-conidies de *Fusarium solani* (G : 10x40).

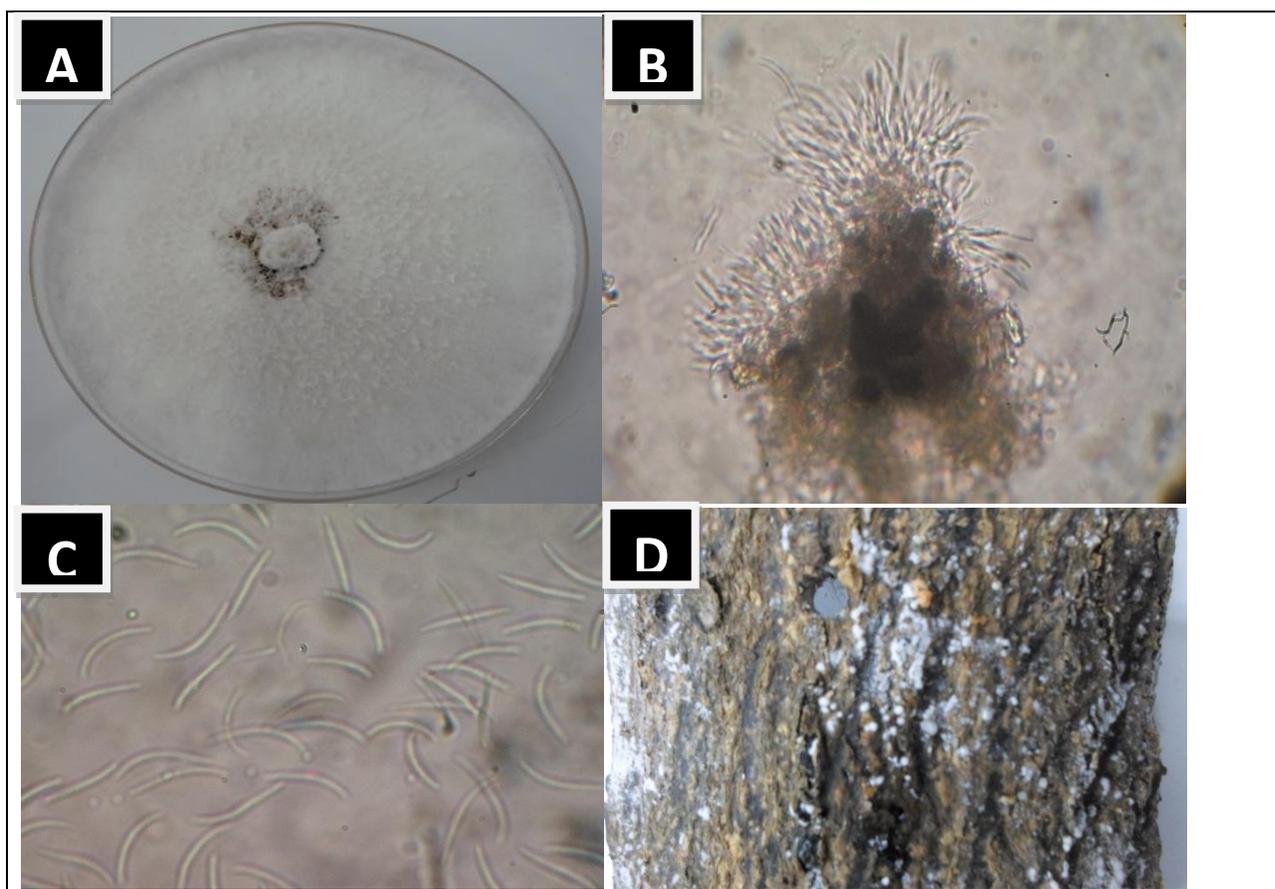


**Figure 3.20:** Caractéristiques microscopique et macroscopique de *Fusarium oxysporum* sur milieu PDA; A et B : culture de *Fusarium oxysporum* de couleur blanche à violet clair d'aspect aérien et sub-aérien avec présence de pigmentation violette ; C : Micro-conidies et macroconidies (G :10\*40); D : Monophialides (G : 10x40).

### II.1.1.3. *Eutypa* sp

Sur milieu PDA, ce champignon présente des colonies régulières vigoureuses d'une couleur blanchâtre d'apparence échevelée avec présence de petites cordons (Fig 3.21 A). Le mycélium devient dense en vieillissant, il forme des fructifications asexuées (pycnides) de forme globuleuses qui contiennent de multitudes de spores ou stylo spores (Fig 3.21 B.C). L'induction de la sporulation chez *Eutypa* a stimulé la formation des stromas conidifères contenant des conidies au bout de 14 jours d'incubation.

L'observation sous loupe de l'écorce des branches et des troncs des arbres d'agrumes dépéris a permis, de constater la présence des formes de fructification asexuées (pycnides) de forme globuleuses.



**Figure 3.21** : Caractère macroscopique et microscopique d'*Eutypa* ; A : Caractère macroscopique sur PDA ; B : Cellules conidiogènes libèrent des conidies (stylospores) (G10×10) ; C : Stylospores (G10×40) ; D : Fructification sur écorce d'agrumes.

#### II.1.1.4. *Alternaria sp*

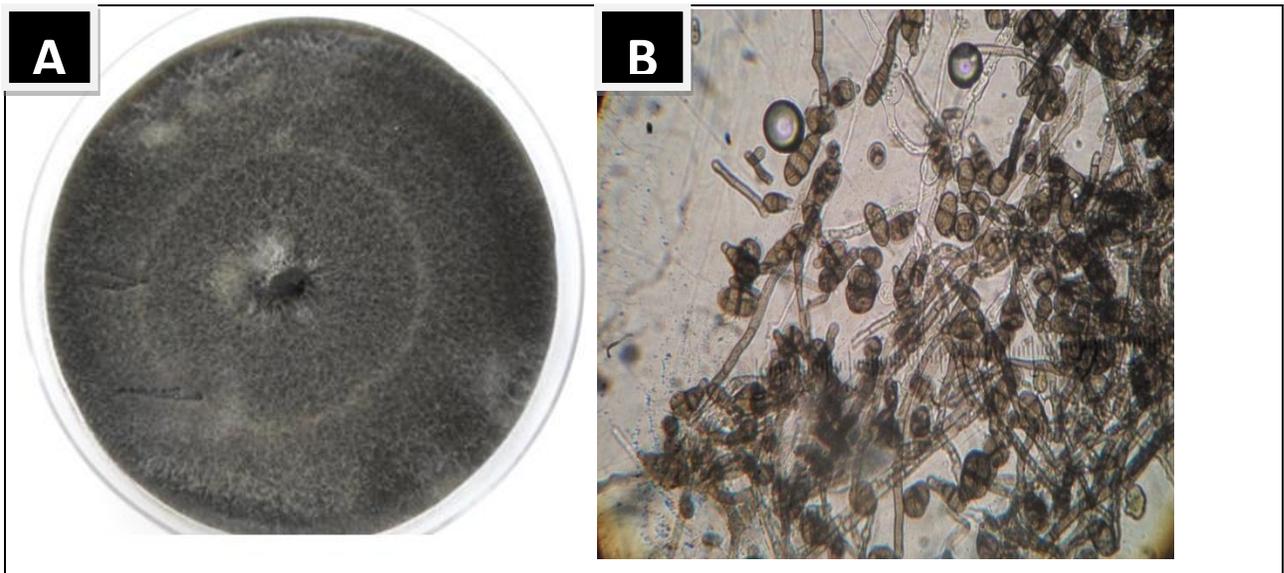
Nous avons aussi noté la présence de quelques isolats appartenant au genre *Alternaria* et nous avons relevés les caractères suivants :

##### ➤ **Caractères culturaux**

Sur milieu PDA, la culture de ce champignon présente des colonies arrondies, régulières d'un aspect cotonneux d'une couleur verdâtre à noirâtre (Fig 3.22A), après 7 jours de culture, les colonies apparaissent noires et duveteuses et présentent une texture épaisse.

##### ➤ **Caractères microscopiques**

L'observation microscopique a montré la présence de Mycélium sombre, ramifié, et cloisonné (Fig 3.22 B). Les conidies sont solitaires et parfois groupées, ovoïdes, cylindriques ou piriformes ; arrondies à la base, verruqueuses atténuées à leur sommet, elles sont mûriformes, brunes et courtes (Fig 3.22 B). Ces spores asexuées sont pluricellulaires : elles sont divisées par des cloisons (ou septas) transversales et/ou longitudinal. Les chaînes de conidies (simples ou ramifiées) sont produites à l'extrémité de bâtonnets marron appelés conidiophores. Les conidiophores sont simples, lisses et parfois ramifiés.



**Figure 3.22:** Vue microscopique et macroscopique d'*Alternaria sp* sur milieu PDA ; A : Vue macroscopique d'*Alternaria* sur PDA ; B : Mycélium cloisonné et conidies d'*Alternaria sp* (G : 10x40)

### II.1.1.5. *Colletotrichum sp*

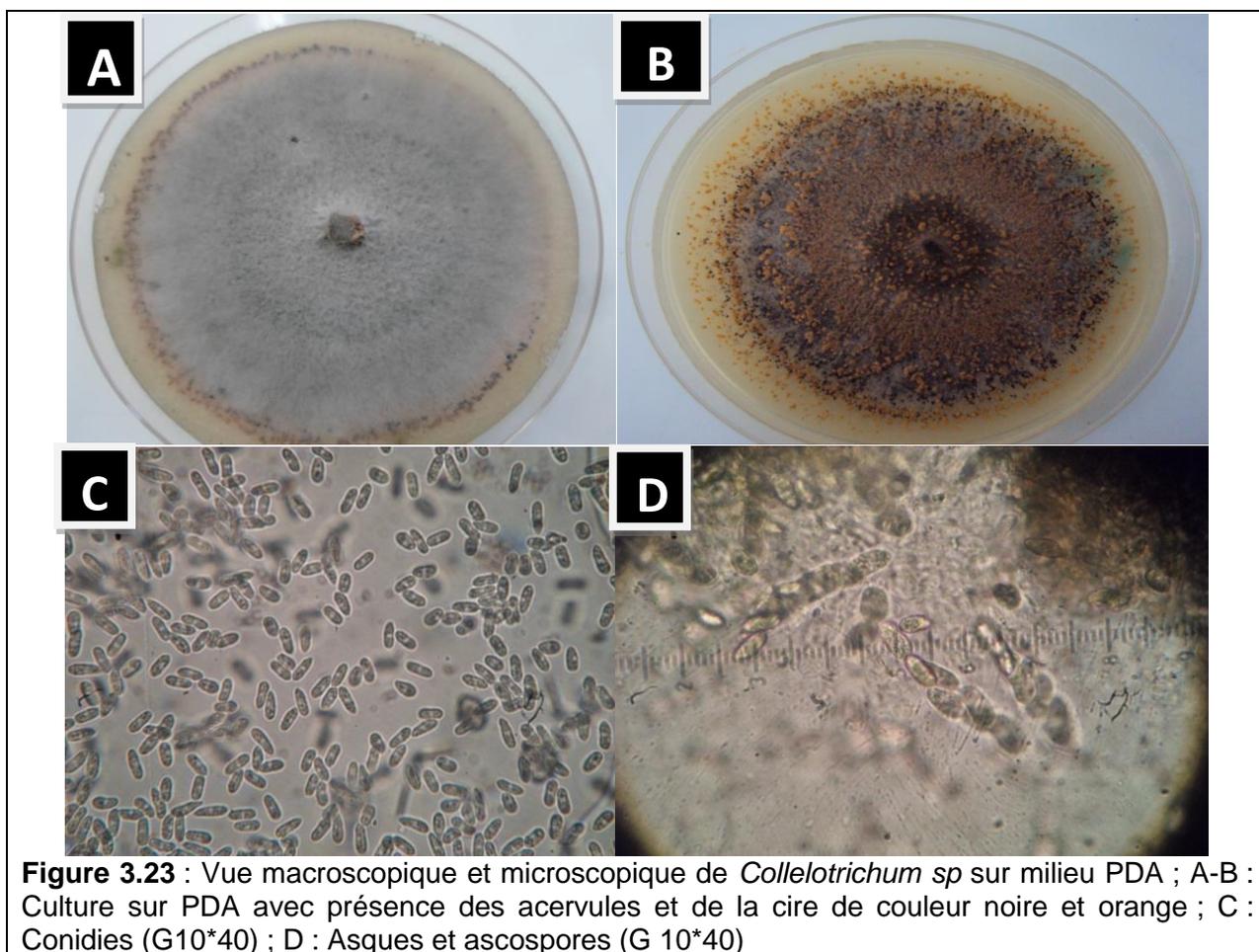
Les espèces de ce genre causant la maladie de l'antracnose sur agrumes, ont été fortement isolées dans cette étude et elles ont montré les caractères suivants :

#### Caractéristiques culturaux

Le champignon présente des colonies régulières d'aspect cotonneux de couleur gris clair ou gris noirâtre avec un mycélium aérien gris foncé. Le conidiophore coloré d'orange est très abondant sur la colonie avec présence des acervules et de la cire de couleur noire et orange (Fig 3.23 A)

#### Caractères microscopiques

Le Conidiophore est simple, allongé et court. Les Conidies sont irrégulières, hyalines, unicellulaires, droites, cylindrique et ellipsoïdes avec une fin arrondie (fig.3.23)



**Figure 3.23** : Vue macroscopique et microscopique de *Colletotrichum sp* sur milieu PDA ; A-B : Culture sur PDA avec présence des acervules et de la cire de couleur noire et orange ; C : Conidies (G10\*40) ; D : Asques et ascospores (G 10\*40)

## II.1.2. Caractérisation Moléculaire

### II.1.2.1. ITS (internal transcribed spacer)

Pour confirmer l'identité des isolats obtenus et identifiés par les caractères macroscopique et microscopique, une caractérisation moléculaire est réalisée, les séquences d'ADN obtenues ont été alignées et comparées avec les espèces des champignons contenues dans la banque de gène (Gen Bank) (NCBI). La recherche effectuée a montré la présence de plusieurs groupes qui correspondent aux séquences ITS (ITS1 et ITS4) des isolats de :

Botryosphaeriaceae présentent 99-100 % d'homologie avec nos isolats: de *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* et *Lasiodiplodia theobromae*.

Les séquences ITS d'un second groupe d'isolats étaient de 95 % identiques à ceux *Colletotrichum gloeosporioides*.

Un troisième groupe d'isolats présentait 98 % d'homologie avec *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum* et *Fusarium equiseti*

Un quatrième groupe d'isolats présentait 95 % d'homologie avec *Alternaria gaisen* et *Alternaria alternata*

### II.1.2.2. Alpha élongation factor ( $\alpha$ e-f)

Des alignements de séquences testées avec le gène  $\alpha$  Elongation factor, ont montré la présence de *Botryosphaeria* réparties en trois groupes: 10% de séquences ont révélé 99 à 100 % d'homologie avec *Botryosphaeria dothidea*, 25% ont montré une similitude avec l'espèce *Botryosphaeria obtusa* forme anamorphe de (*Diplodia seriata*) et 65 % d'homologie avec *Lasiodiplodia theobromae*.

Les séquences ITS des 20 isolats obtenus, ont été déposées au (NCBI) en 2022 (Annexe I). L'analyse phylogénétique a été réalisée avec des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* et 30 séquences de référence extraites de GenBank en utilisant le maximum de vraisemblance composite pour la construction de deux arbres de parcimonie maximale comme représenté sur l'annexe I. L'ensemble des données de  $\alpha$  E-F comprend des séquences de 04 isolats de *Botryosphaeria* issus dans notre étude et 20 séquences de référence extraites de GenBank, nous ont permis la construction d'un troisième arbre (Annexe I).

## **II.2. Aspect quantitatif et qualitatif des isolements fongique**

Les résultats d'isolement de la flore fongique associée au dépérissement des agrumes indiquent que la fréquence d'isolement et les genres isolés diffèrent en fonction des régions d'étude et des variétés d'agrumes étudiées.

Les différents isolements réalisés à partir des différents échantillons de bois des arbres présentant des symptômes de dépérissement ont fait ressortir une nette dominance de la flore fongique de la famille des *Botryosphaeriaceae*, sur un total de 327 isolats, nous avons 204 isolats de *Botryosphaeriaceae*, soit 62,39% du total des isolats (Tab 3.8).

Les genres *Fusarium* et *Colletotricum* ont été isolés avec une fréquence de 12,54 %. Les autres genres des agents fongiques ont été retrouvés avec des fréquences plus faibles, le genre *Alternaria* 6.62%, *Eutypa* 3.98% et les genres non identifiés 2,14 % (Tab 3.8).

### **II.2.1.1. Fréquences d'isolement des champignons en fonction des régions**

La comparaison des fréquences d'isolement de la flore fongique issue de différentes régions agrumicoles a montré que les espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été isolées dans les cinq régions d'étude et dans tous les vergers prospectés avec des taux très importants allant de 10,40% à 14,07% (Tab 3.8).

Les espèces des genres *Fusarium* et *colletotricum* ont été isolées aussi dans toutes les localités mais avec des fréquences moins importantes allant de 0,92% à 4,28% (Tab 3.8).

Le genre *Alternaria* a été isolé avec des fréquences très minimes dans toutes les localités. Le genre *Eutypa* a été rarement isolé, sa présence a été marquée au niveau des régions d'ElAffroun, Mouzaia et Oued El-Alleug avec des faibles fréquences. Les autres genres non identifiés ont été isolés avec des faibles fréquences qui ne dépassent pas 1% dans la plupart des régions (Tab 3.8).

**Tableau 3.8:** fréquences d'isolement de la flore fongique associé au dépérissements selon les régions prospectées.

Agent fongique	Afroun	Mouzaia	Oued El- Alleug	Boufarik	Larabaa	TOTAL
<i>Botryosphaeriaceae</i>	42 <sup>a</sup> 12,84% <sup>b</sup>	34 10,40%	44 13,46%	46 14,07%	38 11,62%	204 62,39%
<i>Fusarium</i>	5 1,53%	12 3,67%	14 4,28%	3 0,92%	7 2,14%	41 12,54%
<i>Colletotricum</i>	6 1,83%	14 4,28%	4 1,22%	8 2,45%	9 2,75%	41 12,54%
<i>Alternaria</i>	4 1,22%	4 1,22%	6 1,83%	3 0,92%	4 1,22%	21 6,42%
<i>Eutypa</i>	3 0,92%	2 0,61%	8 2,45%	0 0,00%	0 0,00%	13 3,98%
Autre	1 0,31%	2 0,61%	3 0,92%	1 0,31%	0 0,00%	7 2,14%
<b>Total</b>	61 18,65%	68 20,80%	79 24,16%	61 18,65%	58 17,74%	327 <sup>c</sup> 100%

a. Nombre d'isolat, b. fréquence d'isolement, c. nombre total d'isolats

### II.2.2. Fréquences d'isolement des champignons en fonction des variétés

La fréquence d'isolement et le nombre des genres isolés associés au dépérissement des agrumes sont plus importantes chez les orangeries avec une fréquence de 55.96% (Tab 3.9).

Le nombre des isolats des Botryosphaeriaceae est plus importantes chez les orangeries avec 127 isolats soit 38.84% du total des isolats obtenus, comparé au 77 isolats, soit 23.55% du total des isolats pour les vergers de clémentinier (Tab 3.9).

Les espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Colletotricum* ont été isolées à partir de toutes les variétés, les fréquences les plus importantes ont été retrouvées chez les variétés de clémentine avec 8,56% pour les *Fusarium* et 7,65% pour *Colletotricum* (Tab 3.9).

Le genre *Alternaria* a été isolé 17 fois chez les oranges soit 5,20 % du total des isolats, et 4 fois chez la clémentine, soit 1,22 % du total des isolats (Tab 3.9).

Pour le genre *Eutypa*, nous avons isolé seulement 13 isolats ; 6 isolats chez la clémentine et 7 isolats chez les oranges soit 2,14 % du total des isolats (Tab 3.9).

Les autres isolats non identifiés ont été retrouvés avec des fréquences très faibles que se soit chez les oranges ou la clémentine (Tab 3.9).

**Tableau 3.9:** nombre d'isolats et fréquences d'isolement selon les variétés

Agent fongique	orange	Clémentine	total
<b><i>Botryosphaeriaceé</i></b>	127 <sup>a</sup> 38,84% <sup>b</sup>	77 23,55%	204 62,39%
<b><i>Fusarium</i></b>	13 3,98%	28 8,56%	41 12,54%
<b><i>Colletotricum</i></b>	16 4,89%	25 7,65%	41 12,54%
<b><i>alternaria</i></b>	17 5,20%	4 1,22%	21 6,42%
<b><i>Eutypa</i></b>	7 2,14%	6 1,83%	13 3,98%
<b>Autre</b>	3 0,92%	4 1,22%	7 2,14%
<b>Total</b>	183 55,96%	144 44,04%	327 <sup>c</sup> 100%

a. nombre d'isolats, b. fréquence d'isolement, c. nombre total d'isolats

### II.2.3. Fréquences d'isolement des champignons en fonction des types des nécroses

Les espèces appartenant au *Botryosphaeriaceae* ont été isolées à partir de toutes les nécroses, qu'elles soient complexes, sectorielles ou centrales de couleur claire ou brune de texture molle ou dure (Tab 3.10). La Tab 3.11 révèle que cette famille est la plus isolée à partir du tronc (97 fois), et des branches (67 fois) avec une fréquence de 52.40 %.

Le genre *Fusarium* a été isolé plus particulièrement des nécroses en position sectorielle et centrale, de différentes parties de l'arbre. Par contre, il est absent dans les nécroses complexe et brune clair en position centrale des branches, sa fréquence est de 14.38% (Tab 3.10).

Le genre *Colletotricum* a été surtout présent dans la nécrose brune foncé centrale et sectorielle sur le tronc et les branches. D'autre part, il est absent dans les nécroses brunes clair centrale et sectorielle, sa fréquence est de 16,61%.

Le genre *Alternaria* a été isolé à partir de la nécrose brune foncé centrale, avec une fréquence de 7.03%. Le genre *Eutypa* n'a été isolé qu'à partir du nécrose complexe de la branche et le nécrose brune clair centrale du tronc seulement, avec une fréquence de 9.58%. (Tab 3.10).

**Tableau 3.10:** Nombre d'isolat fongique selon le type de nécrose

Forme	complexe	Centrale				Sectorielle	
		Brune clair	Brune clair f	Brune foncé	Brune foncé	Brune clair	Brune foncé
couleur	Brune foncé et clair	dure	dure	molle	molle	dure	mole
Texture	Dure et molle	branche	tronc	tronc	branch e	branch e	tronc
Origine	branche	branche	tronc	tronc	branch e	branch e	tronc
<b><i>Botryospheariac ee</i></b>	7	30	3	34	26	34	30
<b><i>Fusarium</i></b>	0	0	9	13	7	3	13
<b><i>colletotricum</i></b>	0	0	0	19	7	0	26
<b><i>Alternaria</i></b>	0	0	0	15	7	0	0
<b><i>Eutypa</i></b>	11	0	19	0	0	0	0
<b>Autre</b>	0	0	0	4	2	0	1
<b>Total</b>	18	30	31	81	47	37	69

## II.3. Test de pathogénicité

### II.3.1. Test du pouvoir pathogène des espèces de *fusarium*

Le premier test de pathogénicité a été réalisés sur des boutures fraîches de citrus de la variété Clémentine. Ce protocole a été utilisé pour la détermination du pouvoir pathogène des espèces de *Fusarium*. Après une semaines d'incubation, différents symptômes se sont développées sur le matériel végétal inoculé par les différentes souches fongiques obtenus. Nous avons arrêté l'observation dès l'apparition de jaunissement sur les boutures témoin (Aucun symptôme n'a été observé sur le témoin avant 28 jours) (Fig. 3. 26).

Les boutures de clémentinier inoculés par les isolats de *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* ont montré des symptômes de la pourriture sèche à savoir le flétrissement suivi de dessèchement (Fig. 3. 26); alors que les autres isolats ont induit des symptômes variables sans qu'il ait dessèchement de toutes les boutures. Les principaux observés sont:

- Le Jaunissement et la pourriture de la base des tiges (Fig. 3. 26 A)
- L'enroulement suivi par le flétrissement des feuilles (Fig. 3. 26 B)
- Le dessèchement et la chute des feuilles (Fig. 3. 26 C)
- La pourriture totale des boutures (Fig. 3. 26 C)
- L'apparition de feutrage blanc sur les boutures

En plus des symptômes cités, nous avons noté des différences dans la sévérité et la rapidité d'apparition des symptômes :

- ***Fusarium solani*** a provoqué le dessèchement des feuilles est très rapide par rapport aux autres isolats (dessèchement total des boutures après 11 jours).
- ***Fusarium oxysporum*** a induit le dessèchement total de trois boutures après 16 jours et les deux qui restent après 21 jours d'incubation.
- ***Fusarium sp*** a provoqué le dessèchement d'une seule bouture après 15 jours d'incubation. Les autres boutures ne représentent aucun symptôme.

### **II.3.2. Pouvoir pathogène de l'ensemble des espèces isolées sur les boutures vertes de citrus**

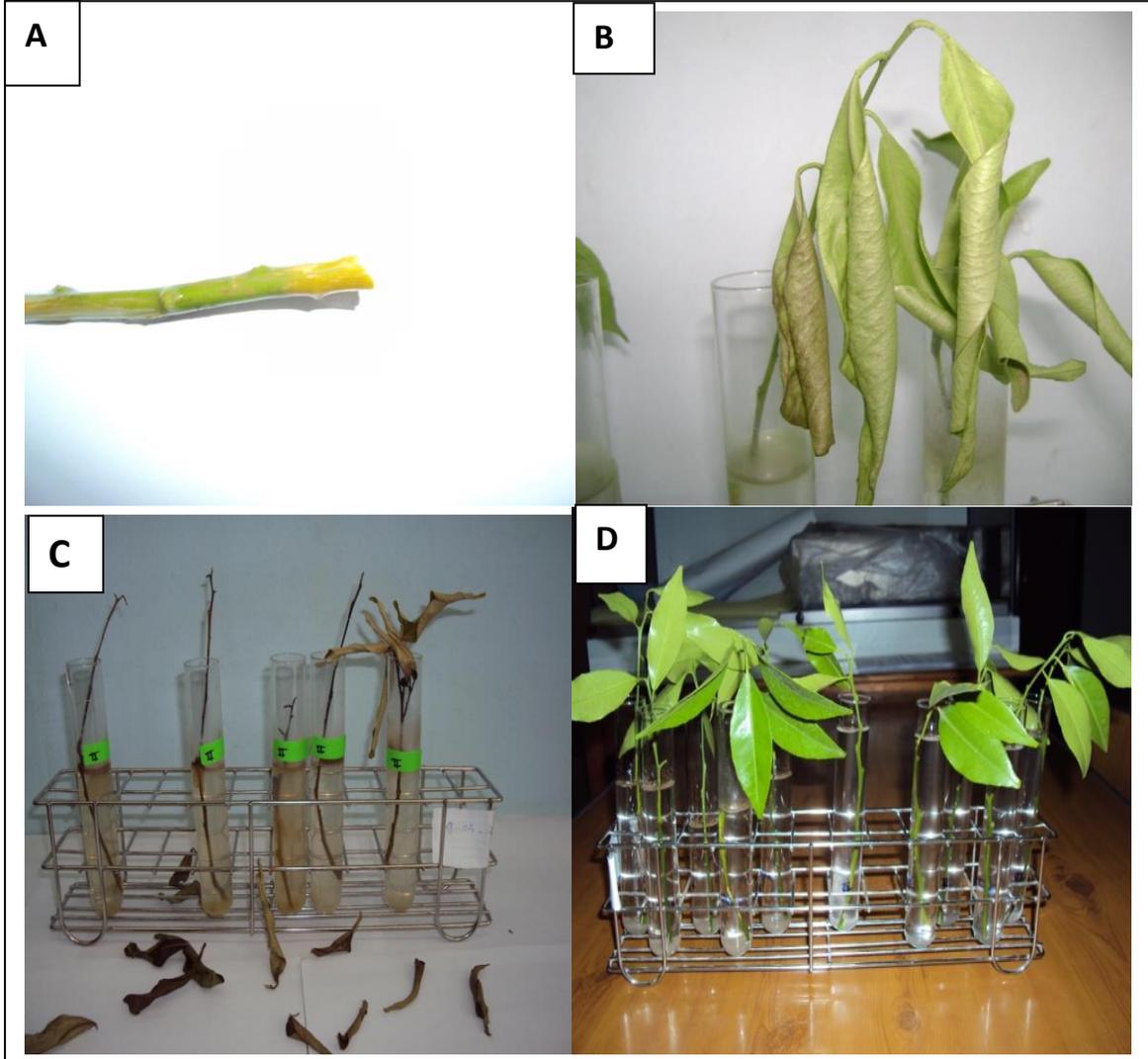
Les résultats de deuxième protocole de pathogénicité ont montré, après trois mois d'incubation, des lésions de couleur brunes et noir sur les boutures vertes des deux cultivars (Thomson et Clémentine). Ces lésions s'étendaient vers le haut et vers le bas à partir du point d'inoculation (Fig 3.27).

Toutes les espèces fongiques testées ont produit des lésions basipetal (en dessous du point d'inoculation) plus longues que les lésions acropetal (en dessus du point d'inoculation). Les boutures du témoin ont montré une légère décoloration autour du point d'inoculation (Fig 3.29).

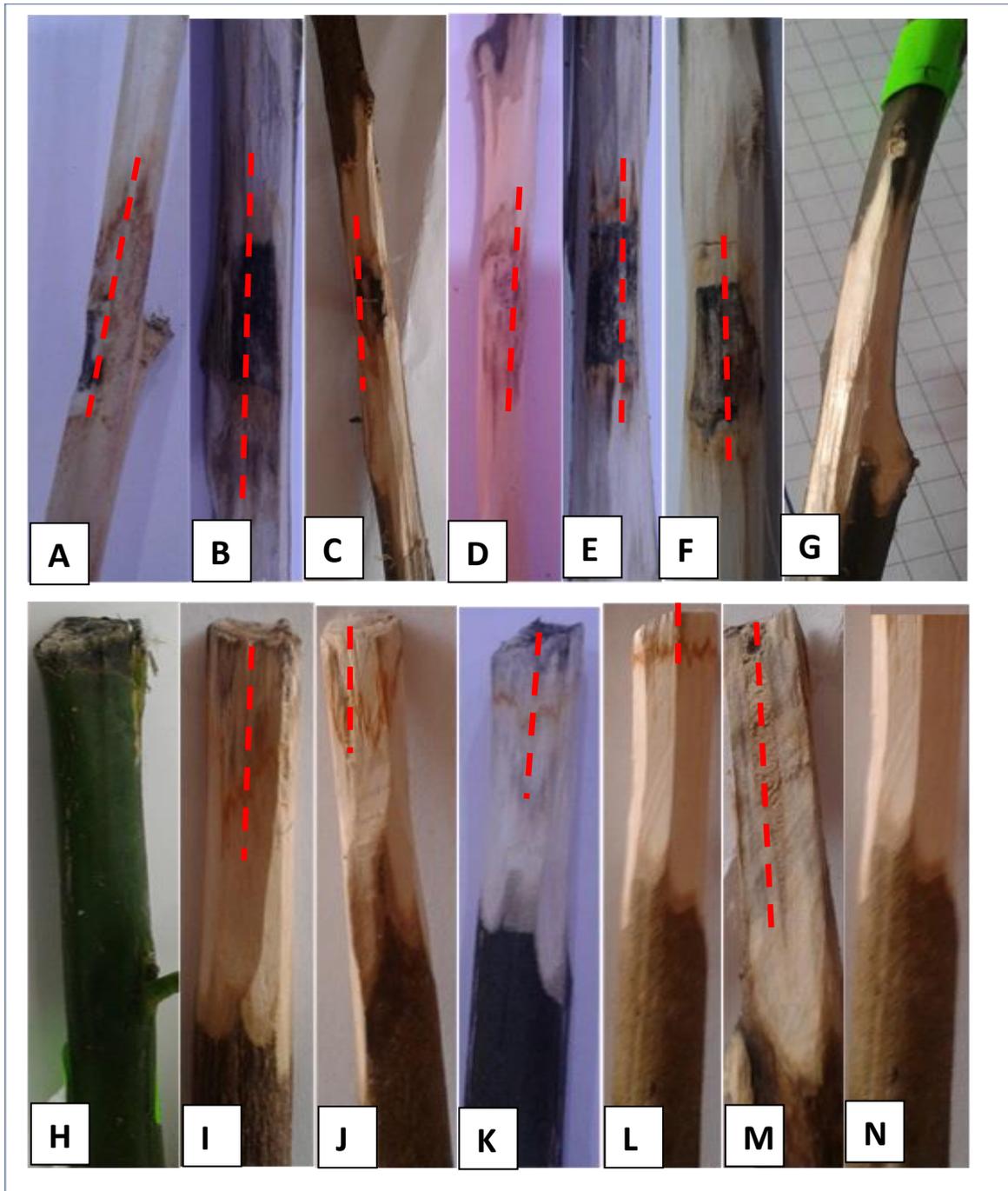
La longueur des lésions obtenus à partir du point inoculation diffère en fonction des souches fongiques et des variétés d'agrumes testées. La moyenne de cette longueur pour *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotricum gloeosporioides* , *Fusarium oxysporum*,

*Alternaria sp* et *Eutypa sp* étaient comme suit (1.46 cm) , ( 1.05 cm ) , ( 0.91 cm), (0.85) et (0 cm), respectivement sur les boutures inoculées au niveau de l'entre nœud (Fig. 3.28). Les mêmes souches fongiques ont provoqué des lésions sur les boutures inoculées au niveau des apex coupés du même matériel végétal, ou nous avons enregistré les longueurs suivantes (1.09 cm) , ( 0.8 cm ) , (0,60 cm), (0.53 cm) et (0), respectivement (Fig 3.28).

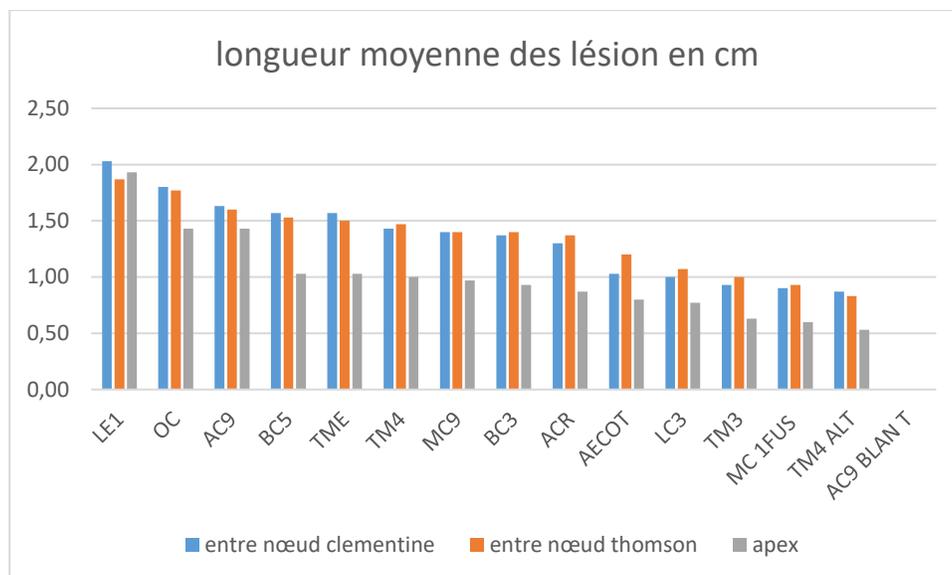
*Lasiodiplodia Theobromae* et *Diplodia seriata* sont les deux espèces fongiques le plus agressive qui ont produit des longues lésions sur les boutures de citrus inoculées, Les isolats LE1 (*Diplodia seriata*) et OC (*Lasiodiplodia Theobromae*) étaient les plus agressives sur les boutures de Thomson et de Clémentine inoculées dans l'entre-nœud alors que pour les boutures inoculées sur l'apex coupé, nous avons les isolats LC3, BC3 et BC5. Les isolats de *Fusarium oxysporum* (MC1 FUS) et *Alternaria sp* (TM4 ALT) sont les moins agressives que ce soit sur les boutures inoculées sur l'entre nœud où sur l'apex coupé (Fig. 3.28). Nous avons noté aussi que la moyenne des longueurs des lésions chez les boutures inoculées dans l'entre-nœud était plus importante que celle des boutures inoculées sur l'apex coupé (Fig 3.28).



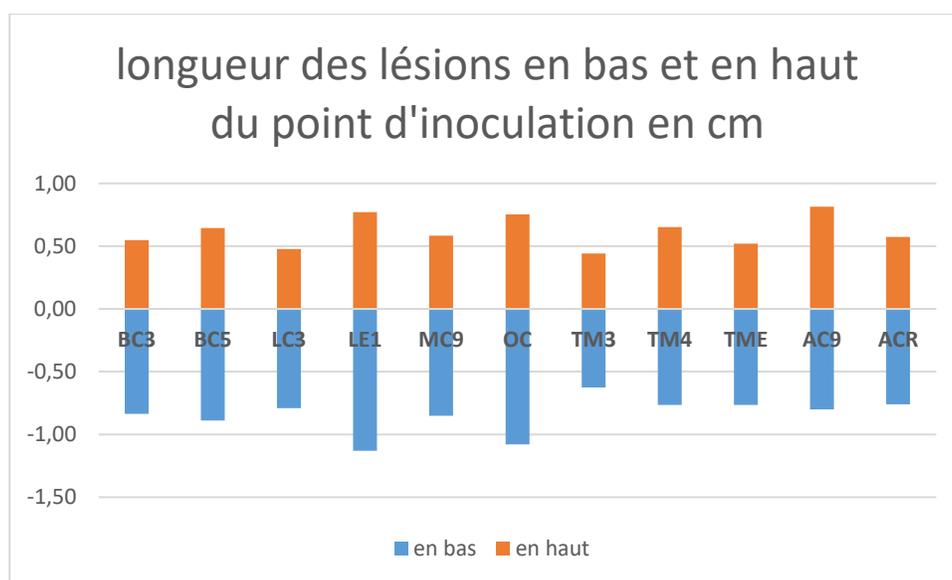
**Figure 3.26** : Test de pathogénicité des isolats de *Fusarium* inoculés sur des boutures fraîches des agrumes. (A) jaunissement de la base de la tige ; (B) enroulement et flétrissement des feuilles provoquées par *Fusarium solani*, après 9 jours de l'inoculation ; (C) dessèchement et chute des feuilles provoquées par *Fusarium solani*, après 18 jours de l'inoculation ; (D) les boutures de témoin à la fin du test de pathogénicité.



**Figure 3.27 :** Lésions nécrotiques provoquées par les espèces fongiques inoculés sur l'entre nœud et l'apex des boutures vertes prélevées de *Citrus sinensis* 'Thomson' et *Citrus clementina*. (A, B, D, E) *L.theobromae* inoculés sur l'entre nœud ; (A) *Diplodia seriata* isolat LE1 ; (B) *L.theobromae* isolat OC ; (C) *Fusarium* MC1FUS ; (D) *L.theobromae* BC3 ; (E) *Botryosphaeria obtusa* isolat TM3 ; (F) *Colletotrichum gloeosporioides* AECOT ; (G) Témoin ; (H, I, K, M) les isolats de *L.theobromae* inoculés sur l'apex ; (H) apparition des nécrose après 15 jours d'inoculation ; (I) *L.theobromae* isolat BC3 ; (J) *Colletotrichum gloeosporioides* isolat AECOT ; (K) *L.theobromae* isolat BC5 ; (L) *Fusarium* isolat MC1FUS ; (M) *Diplodia seriata* isolat LC3 ; (N) Témoin.



**Figure 3.28 :** Longueur des lésions sur les boutures de thomson et de clémentinier selon le type d'inoculation (entre nœud et apex). *Lasiodiplodia Theobromae* (OC, AC9, BC5, TM4, MC9, BC3, LC3), *Diplodia seriata* (LE1), *Diplodia pseudoseriata*(TME), *Botryosphaeria dothidea* (ACR) et *Botryosphaeria obtusa* (TM3), *Fusarium oxysporum* (MC1 FUS), *Colletotrichum gloeosporioides* (AECOT), *Alternaria sp* (TM4 ALT) et *Eutypa sp* (AC9 BLANT).



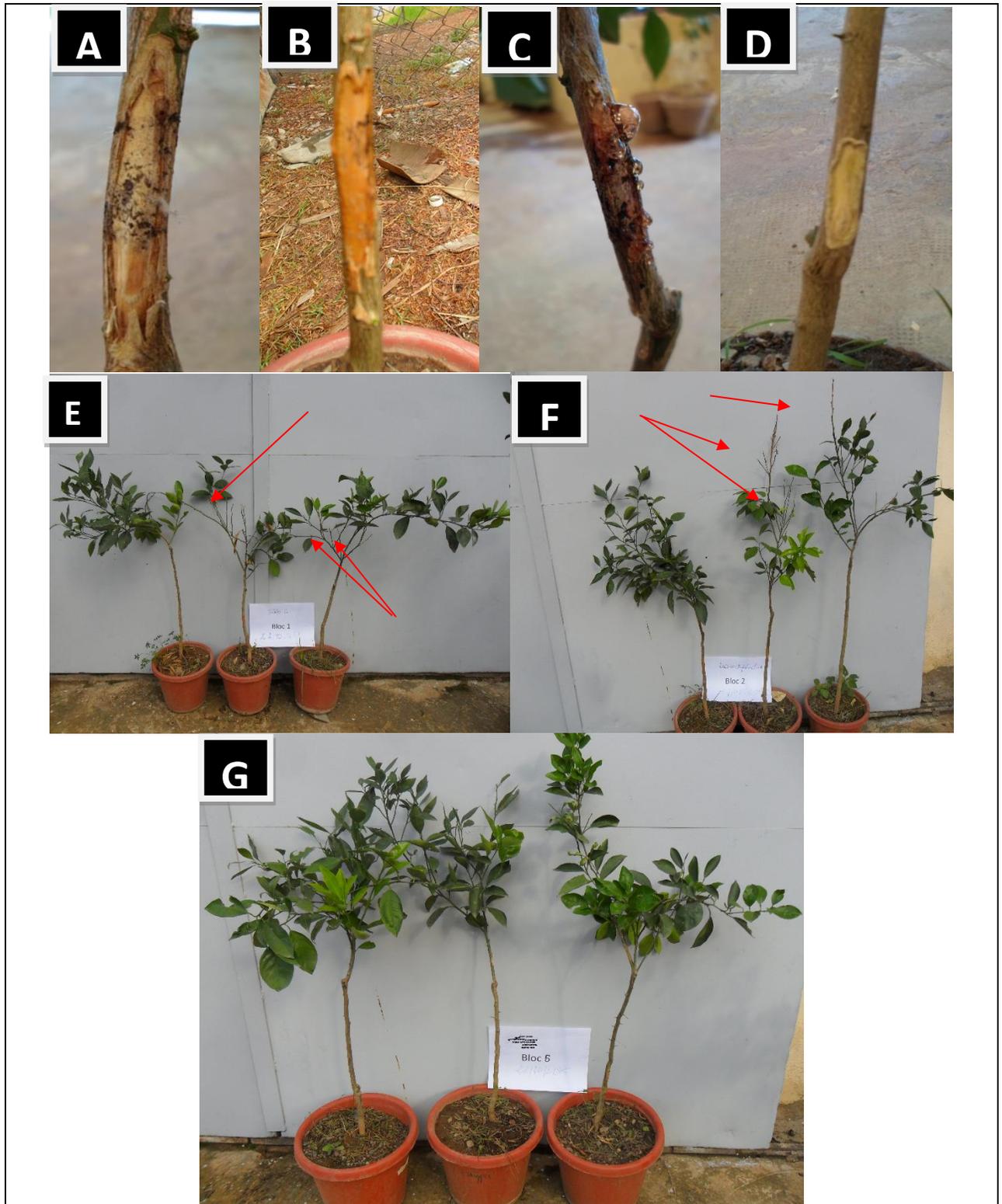
**Figure 3.29 :** longueur des lésions en bas et en haut du point d'inoculation sur les boutures de thomson et de clémentinier après trois mois d'incubation. *Lasiodiplodia Theobromae* (OC, AC9, BC5, TM4, MC9, BC3, LC3), *Diplodia seriata* (LE1), *Diplodia pseudoseriata*(TME), *Botryosphaeria dothidea* (ACR) et *Botryosphaeria obtusa* (TM3).

### **II.3.3. Pouvoir pathogène de quelques espèces isolées sur les plantules de citrus**

Pour le troisième test de pathogénicité, nous avons noté l'apparition des premiers symptômes après un mois d'incubation, les plantules de Thomson greffé sur Citrange troyer inoculés par l'isolat (OC 2) de *Lasiodiplodia theobromae*, ont montré des lésions à partir du point d'inoculation. Cet isolat a induit des nécroses internes et une exudation de gomme alors que les autres isolats n'ont causé que des lésions limités au point d'inoculation. Les plantules du témoin ont montré une légère décolorations autour du point d' inoculation (Fig 3.30. A.B.C.D).

Après trois mois d'incubation, nous avons noté le dessèchement et le dégarnissement (défoliation) des extrémités des rameaux et des brindilles des plantules de Thomson inoculés par les isolats de *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium osysporum* et *collelotrichum gloeosporioides* alors que les autres isolats n'ont causé aucun symptôme. Les plantules du témoin n'ont montré aucun symptomes (Fig 3.30. F.G.H.I).

Après six mois d'inoculation, nous avons noté que les isolats de *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium osysporum* et *collelotrichum gloeosporioides* ont provoqué des lésions nécrotique sur la partie greffon qui s'étalaient vers le haut et le bas à partir du point d'inoculation. Les isolats de *Lasiodiplodia theobromae* (OC 1) et (OC2) sont les isolats les plus agressives qui ont produit les plus longues lésions sur les plantes inoculées. L'isolat de *Lasiodiplodia theobromae* (OC 2) est la seule qui a produit des lésions nécrotiques sur la partie greffon et porte-greffe.



**Figure 3.30 :** Symptômes de test de pathogénicité sur les plantules de Thomson et de Clementinier. A et B : Nécrose sur tige ; C : Gomme sur tige ; D : Absence de nécrose sur le témoin ; E et F : Dégarnissement et dessèchement des extrémités des rameaux provoqués par les isolats de botryosphaeriacee ; G : plantules du témoin en fin du test.

## II.4. Discussion

Les opérations d'isolement, à partir des échantillons du bois des arbres des citrus montrant les symptômes de dépérissement ont mis en évidence l'existence d'une flore fongique assez diversifiée. En effet, après purification et caractérisation mycologique, nous avons noté une fréquence assez importante de 62.39% pour les *Botryosphaeriaceae*. Cette flore fongique a été isolée de tous les échantillons d'agrumes présentant des symptômes de dépérissement. Les fréquences d'isolement des genres *Fusarium*, *Colleotrichum*, *Alternaria* et *Eutypa* sont respectivement de 12.54 %, 12.54, 6.62% et 3.98%.

Notre étude démontre encore une fois la grande diversité de la flore fongique impliquée dans le processus de dépérissement et confirme la présence d'un dépérissement des agrumes associé à des espèces de Botryosphaeriaceae en Algérie. Des résultats similaires ont été indiqués dans des études menées sur ces cas de dépérissement dans la région de la Mitidja [9,10,11,12,116]. Plusieurs cas similaires ont été signalés dans les différentes zones agrumicoles à travers le monde [66,78,81,116,117].

Les espèces des *Botryosphaeriaceae* (*Botryosphaeriales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) sont des espèces cosmopolites endophytes [58,119] qui s'attaquent à une large gamme d'hôte notamment la vigne [59,62,136], l'olivier [61], l'amandier [64], l'avocat [60] et les agrumes [66,82,137]. Elles sont associées aux différents symptômes tels que : le chancre de la tige, la pourriture des fruits, le dépérissement et la gommose [58]. Il en ressort qu'elles sont considérées comme des agents causaux principaux, mais aussi saprophytes opportunistes et parfois comme des pathogènes secondaires intervenant dans le processus de dégradation du bois [119,120,121,123]. L'expression de la maladie est plus souvent associée à des stress abiotiques, tels que la sécheresse, les dommages physiques, l'asphyxie, le gel et les conditions de croissance inappropriées [119, 120,121,123].

L'amplification et le séquençage de l'ADN ribosomal nucléaire des *Botryosphaeriaceae* isolées dans la présente étude, en utilisant les amorces universelles (ITS1, ITS4), le gène Alpha elongation factor (*tef1 $\alpha$* ), montrent une homologie importante

avec nos isolats de : *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* et *Lasiodiplodia theobromae*. La morphologie des conidies étaient les caractéristiques les plus utiles pour identifier et distinguer *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* et *Lasiodiplodia theobromae* des autres espèces de *Botryosphaeriaceae* [115]. La forme et la couleur des conidies et la présence de septa et de stries longitudinales étaient les caractéristiques robustes pour l'identification de ces espèces fongiques. La présence des pycnides et des périthèces de ces espèces fongiques sur bois mort des arbres de citrus a été utilisée pour déterminer et confirmer les caractéristiques morphologiques et culturales.

Au cours de la dernière décennie, des études approfondies ont été menées sur les maladies de bois des arbres fruitiers, notamment celles causées par les *Botryosphaeriaceae* [82,86,113]. Ces espèces fongiques ont été reconnues comme agents de dépérissement des agrumes avec de fortes incidences en Californie [66], en Iran [82,113], en Tunisie [81] et en Algérie [116]. Dans le cas des attaques légères, la maladie apparaît sur une partie de l'arbre et se traduit par des petites sections d'écorce mort accompagnées parfois par une excrétion de gomme [66,113,116,137]. Dans les cas sévères, les grandes parties d'écorce sont mortes et le bois sous-jacent noirci et meurt par invasion du champignon à partir des parties de l'écorce attaquées [52,66,116,137]. Ce champignon peut causer une "pourriture du cœur" ou la "pourriture du bois". La pourriture est accentuée par d'autres champignons de pourriture de bois [52,66,113,116,137]. Ces symptômes présentent une similitude parfaite avec celle de notre diagnostic symptomatologique. Ce qui nous amène à soupçonner l'implication ou l'association de cet agent pathogène avec le dépérissement observé.

Concernant les isolats du genre *Fusarium*, après l'identification morphologique et moléculaire par l'amplification et séquençage de l'ADN, en utilisant les amorces universelles (ITS1, ITS2) et le gène alpha élongation factor, les résultats montrent une diversité des espèces de *Fusarium* isolées dans la présente étude: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium equiseti*, et *Fusarium sp.*

Le genre *Fusarium* figure parmi les plus redoutables champignons qui renferment plusieurs espèces. Ces champignons sont réputés pour provoquer de nombreuses

pathologies dans les grandes cultures. En plus des pertes occasionnées par une diminution de rendement. Ce pathogène est un faisceau d'espèces très variables du point de vue morphologique. Chaque espèce est représentée dans la nature par une majorité de souches saprophytes ou parasites de faiblesse, au sein desquelles peuvent se différencier des formes plus ou moins spécialisées douée d'une véritable virulence, causant la pourriture de diverses cultures agricoles [106,112,137]. Les *Fusarium* sont officiellement classés parmi les deutéromycètes appartenant à l'ordre des hyphales et de la famille des tuberculariacées. De nombreuses espèces de ce genre résistent sous forme de chlamydospores ou d'hyphes dans le sol et représentent une menace potentielle pour les plantes sensibles [9,52,106,112,137]. Même si ces espèces ont été signalées dans la plupart des zones agrumicoles du monde où les dépérissements existent, néanmoins leur responsabilité pathogénique directe fait objet de discussion [9,52,106,112,137].

La fréquence d'isolement du genre *Fusarium* et les résultats de l'analyse symptomatologique, nous a laissé penser à l'implication de ce champignon tellurique dans la causalité du dépérissement dans les vergers d'agrumes étudiés. Les résultats du diagnostic symptomatologique montrent une similitude relative des symptômes observés sur terrain avec celle de la pourriture sèche des racines (dry root rot) qui semble être la plus grave maladie fongique d'origine tellurique. Les premiers symptômes détectés de la pourriture sèche, montrent que les feuilles se fanent subitement et sèchent plus au moins rapidement et tombent, en donnant une apparence ouverte à l'arbre avec plus de brindilles mortes [35,52,57,137]. Ces symptômes sont communs à tout problème causé par un agent qui détruit les racines et affecte complètement ou partialement l'arbre. Les isollements effectués à partir du bois affecté donnent généralement plusieurs espèces de *Fusarium* et occasionnellement des parasites secondaires des agrumes trouvés dans le sol. Eventuellement autres champignons destructifs du bois entrent et détruisent le bois. Un essai d'inoculation artificielle d'arbres en pots a confirmé que ces champignons (*Fusarium*) sont capables de provoquer la maladie, surtout en présence de stress hydrique, de fumure excessive, ou de blessures des racines [35,52,57,137]. L'examen des arbres infectés, en général, révèle une carie sèche des racines fibreuses, des grandes racines et de tronc sous la surface du sol [35,137]. L'altération des racines ou des tissus du collet ouvrent apparemment le chemin d'initiation de la maladie. L'entrée

peut être provoquée par l'asphyxie des racines suite à un excès d'irrigation; ou leurs altérations par les travaux de sol [35,57,66,116].

Dans la présente étude, le test de pouvoir pathogène des isolats de *Fusarium* réalisé sur des boutures fraîches d'agrumes a permis l'observation des symptômes similaires à celle de la pourriture sèche à savoir le jaunissement de la base des pousses inoculées, le flétrissement, le dessèchement et la chute des feuilles. Ces symptômes ont été induits par la plupart des isolats de *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*. Selon Nemec et al [111] les espèces de *Fusarium* synthétisent des toxines qui peuvent réagir avec d'autres espèces que ce soit des saprophytes ou des parasites obligatoires pour engendrer des dégâts.

En se basant sur ces résultats, nous pouvons établir une liaison entre l'activité fusarienne intense exprimée par la fréquence d'isolement élevée et les résultats du test de pathogénicité et du diagnostic symptomatologique qui montre une similitude parfaite avec les symptômes de la pourriture sèche pour se rapprocher à la causalité de dépérissement des agrumes, de ce fait, cette maladie est fortement impliquée dans les processus des dépérissements observés dans les vergers étudiés.

L'antracnose est causée par plusieurs espèces du genre *Colletotrichum*. Cette maladie est longtemps considérée comme secondaire sur agrumes, mais pouvant conduire à des pertes importantes selon les localités et les années. Depuis quelques années, on constate une recrudescence nette de la maladie. Il s'agit d'un complexe fongique regroupant plusieurs espèces réparties en deux Catégories : *Colletotrichum acutatum* et *Colletotrichum gloeosporioides* [31,52]. Les spores de ce champignon se présentent généralement sur les feuilles et les rameaux desséchés, sous forme de petites taches foncées, ces taches deviennent plus sombres suite à la formation des fructifications du champignon, qui sont des acervules de couleur brun foncé. Ces acervules libèrent une gelée sporale rose-saumon caractéristique. Ce champignon est limité aux dessèchements et dépérissements des extrémités des rameaux et il ne peut pas provoquer des dépérissements sévères [31,52,57,137]. Les résultats du test de pathogénicité révèlent que les symptômes provoqués par *Colletotrichum gloeosporioides* sont limités à la défoliation et dans le cas sévère le dessèchement de quelques brindilles.

L'agent pathogène *Alternaria sp* provoque principalement deux maladies sur les agrumes: la maladie des taches brunes et la pourriture noire. Ces deux maladies commencent par des taches nécrotiques d'une coloration brune foncée à noire sur le fruit et se manifestent par des taches nécrotiques noires sur les feuilles qui peuvent suivre les nervures. Elles peuvent se produire également sur les rameaux sous forme de lésions noires [155]. La pourriture noire d'*Alternaria* infecte surtout l'extrémité pédonculaire des fruits. Elle est considérée comme une maladie mondiale, produisant la pourriture interne de tous les agrumes commerciaux [153, 154].

Le genre *Eutypa* est un ascomycète de la famille *Diatrypacée* [137], c'est un champignon polyphage pouvant s'attaquer à plus de 80 plants appartient à 17 familles botaniques dispersées dans le monde [114,137]. *Eutypa* ne peut envahir les tissus ligneux de l'hôte qu'au travers d'une blessure, c'est pourquoi il se développe de préférence sur les arbres et arbustes soumis à une taille régulière et sévère [79,114,137]. En viticulture, ce champignon est restreint au tronc et aux bras des ceps de vigne malades, et n'est pas présent dans les sarments de l'année [138].

Les essais de pathogénicité des espèces de *Botryosphaeriacees* isolées dans cette étude, réalisés sur des plantules d'agrumes ont montré des symptômes ressemblant à ceux de notre descriptif symptomatologique à savoir : la défoliation, le dégarnissement, le dessèchement des brindilles et des extrémités des rameaux et l'excrétion de gomme en plus des lésions nécrotiques observées sur le porte-greffe et le greffon. Nous avons également démontré le potentiel pathogénique de : *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* et *Lasiodiplodia theobromae* sur des boutures vertes des variétés Thomson et Clémentine. Les boutures vertes inoculées ont développé des nécroses interne de couleur et de taille variables. *Lasiodiplodia Theobromae* et *Diplodia seriata* étaient les deux espèces fongiques les plus agressive qui ont produit les lésions les plus longues sur les boutures vertes inoculées. Ces résultats ont été mentionnés dans des essais de pathogénicité menés en Californie et en Afrique du Sud, dans lesquels *Lasiodiplodia Theobromae* et *Diplodia seriata* se sont avérés être l'une des espèces les plus virulentes testées sur les agrumes et la vigne [115,139]. *Lasiodiplodia Theobromae* a également été considérée comme l'espèce la plus agressive sur l'eucalyptus [141,142], la vigne [140,115] et les pistachiers [143]. Le présent résultat confirme que la compatibilité hôte-pathogène a

été démontrée pour *Lasiodiplodia Theobromae* sur les variétés Thomson et Clémentine. Selon Linaldeddu et al. [144] et Chakusary et al. [145], ces différences d'agressivité peuvent être dues à plusieurs facteurs dont la variabilité génétique des isolats, l'âge, le type de tissu de l'hôte, les différences de sensibilité ainsi que les méthodes d'inoculation et les conditions expérimentales. Dans ce cas, un échantillonnage approfondi des agrumes ainsi que d'autres hôtes est nécessaire pour accentuer davantage les résultats et tirer une conclusion finale solide.

Chez les plantes ligneuses, il existe des phénomènes de résistance qui se retrouvent dans le bois. Néanmoins, pour les agrumes, comme pour les autres plantes sélectionnées pour leur intérêt agronomique et économique, l'existence de parasites capables d'outrepasser les défenses végétales est un réel problème.

Le but d'un agent pathogène est de pénétrer dans les tissus de la plante afin d'y puiser les ressources énergétiques nécessaires à son développement et à sa multiplication. D'après Shain 1979 [146] deux zones sont formées à la suite d'une agression : **une zone de réaction** nécrosée et enrichie en composés phénoliques, zone correspondant aux tissus colonisés et une **zone de transition** entourant la zone de réaction et à l'interface avec les tissus sains, constituée de cellules parenchymateuses vivantes capables d'accumuler des composés phénoliques ; cette zone de transition correspond aux quatre barrières du **C.O.D.I.T.** (Compartmentalization Of Decay In Trees) ; d'après Shigo 1984 [147] se sont des barrières anatomiques mises en place au sein du bois limitant la prolifération et les dommages causés par le pathogène , la première correspond à l'occlusion d'un (des) élément(s) de vaisseau par des thylles (évaginations de cellules parenchymateuses associés aux vaisseaux) ou par des gommés (ou gels) à base de pectines [148]. La seconde correspond à des épaisissements pariétaux des dernières cellules de chaque cerne de croissance (bois d'hiver). La troisième barrière comprend la mise en place de rayons ligneux transversaux (unisériés ou plurisériés) formant une barrière discontinue. Enfin, la dernière barrière correspond à des bandes de cellules contenant souvent des composés antimicrobiens. Initiée par le cambium, elle est mise en place juste après infection et sépare le bois sain du bois infecté. C'est la barrière la plus efficace et la plus durable. L'ensemble de ces barrières contient des composés phénoliques [149]. Le cytoplasme des cellules qui

demeurent vivantes, contient de grandes quantités de phénols. Un autre rôle supposé est la formation de **zones stratégiques** isolées permettant l'accumulation de phytoalexines sans nuire aux zones saines. Ceci entraîne aussi une limitation de la diffusion des nutriments vers le pathogène et de toxines ou d'enzyme fongiques vers les zones saines. Les cellules associées aux vaisseaux (CAV) sont un des éléments important du tissu xylémien et sont très impliquées dans les réactions de défense. Elles subissent une réorganisation fonctionnelle avec amplification de l'appareil de transfert suite à des épaissements localisés de la paroi. La polarisation des flux se traduit par une augmentation de l'excrétion de gommés et de phytoalexines vers les éléments de vaisseaux [150]. L'apposition de couches protectrices et la formation de thylles sont aussi le signe d'une réorganisation structurale. La résistance physique est rarement systémique. Le renforcement des parois, de même que la réponse hypersensible, ne concernent qu'une zone restreinte et proche du site de l'attaque.

## CONCLUSION

Le dépérissement des agrumes devient de plus en plus un véritable problème très inquiétant dans la région de Mitidja, et aucune réponse n'a été apportée à ce sujet d'une manière claire et précise. Pour cela nous avons réalisé une étude sur ce sujet dans cette région.

Notre travail apporte une contribution partielle à la question encore posée du phénomène de dépérissement des agrumes dans la région de la Mitidja. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que le problème du dépérissement est en progression continue, en diminuant considérablement le potentiel de la production et en augmentant la possibilité pour d'autres maladies de s'installer facilement.

La surveillance des cas de dépérissement a permis de constater la présence de plusieurs foyers évolutif regroupent quatre classes. Nous avons noté que les situations de dépérissement apparaissent et évoluent selon deux cas : un dépérissement foudroyant et un dépérissement progressif. Nous avons noté aussi la présence de plusieurs symptômes sur la végétation et les branches, tels que le jaunissement, le chancre, nécrose sur bois et la défoliation. Notre travail sur terrain, nous a permis d'enregistrer une moyenne générale du taux d'infection de 23.28 %, nous avons enregistré aussi une valeur moyenne de la classe du dépérissement de 1.77 et une incidence moyenne de 10.76 %. Ces valeurs très inquiétantes montrent clairement que le dépérissement dans tous les vergers prospectés est en augmentation, et celle-ci est proportionnelle avec sa gravité et son incidence.

D'après les résultats des isollements fongiques effectués à partir du bois des arbres dépéris, il a été noté la dominance très apparente des isolats des *Botryosphaeriaceés* (62.39%) qui ont été isolés de tous les échantillons d'agrumes présentant des symptômes de dépérissement. Les autres genres des agents fongiques ont été retrouvés avec des fréquences plus faibles, *Fusarium* et *Collelotrichum* avec une fréquence de 12.54%, *Alternaria* 6.62% et *Eutypa* 3.98%. L'amplification et le séquençage des ADN ribosomal nucléaire, en utilisant les amorces universelles (ITS1, ITS4), le gène Alpha factor élongation ( $\alpha$  E F) des souches isolées dans la présente étude, montrent la présence de plusieurs groupes qui corresponds au séquences ITS (ITS1 et ITS4) et ( $\alpha$  E

F) des isolats de : *Diplodia pseudoseriata*, *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea* et *Lasiodiplodia theobromae*. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum* et *Fusarium equiseti*, *Alternaria gaisen* et *Alternaria alternata*.

Notre étude démontre encore une fois la grande diversité de la flore fongique impliquée dans le processus de dépérissement et confirme la présence d'un dépérissement des agrumes associé à des espèces de *Botryosphaeriaceae* en Algérie. Nous avons démontré aussi le potentiel pathogénique des espèces des *Botryosphaeriaceae* et des *Fusarium* sur des boutures fraîches d'agrumes.

A l'issue de notre travail, il se dégage que le dépérissement des agrumes est en effet un problème complexe qui ne trouve pas son origine dans une cause unique, mais plutôt la conjugaison de plusieurs facteurs biotiques (causes directes). Les résultats épidémiologiques et étiologiques obtenus, confirment que les causes directes fortement impliquées dans le dépérissement des agrumes au niveau des vergers prospectés, sont des causes biotiques représentées principalement par des agents fongiques suivants : *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *Diplodia pseudoseriata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et la contribution des espèces d'*Eutypa* sp, *Alternaria gaisen* et *Alternaria alternata* autant que pathogènes secondaires aggravant la situation, surtout avec la présence des espèces de *Colletotrichum gloeosporioides*.

D'un autre côté, l'évolution des situations de dépérissements (rapides et parfois lents) est liée à la sensibilité des arbres due à l'absence d'entretien des vergers et à la présence des conditions favorables au développement de cette maladie ; notamment l'âge des vergers, le porte greffe et les propriétés physiques du sol (terrain lourd) et la conduite culturale adoptées, particulièrement l'irrigation et le travail de sol qui constituent des facteurs de risque dans de telles infections.

## PERSPECTIVES

Cette étude mérite d'être poursuivie par d'autres travaux plus poussés qui incluraient l'élargissement des prospections à toutes les zones agrumicoles du pays, en suivant notre échelle d'évaluation dans la classification des symptômes du dépérissement et l'approfondissement de la recherche en utilisant des méthodes immunologiques et moléculaires. Cela permettra de mettre en œuvre des techniques de prévention et des stratégies de gestion afin de minimiser l'incidence de ces pathogènes et de prévenir leur propagation dans de nouveaux vergers.

Pour parer à ce genre de problèmes, il est impératif de sensibiliser les agrumicultures et d'établir un programme de lutte prophylactique. Dans ce contexte les techniques culturales, notamment le travail de sol et l'irrigation doivent être amélioré en utilisant des techniques plus moderne tels que l'irrigation en goutte à goutte et le désherbage chimique et mécanique. Il faut surtout éviter la plantation des agrumes dans les bas-fonds sans étudier le drainage à faire dans les sols lourds, parmi les méthodes les plus utilisées la plantation sur buttes qui permet l'aération et le réchauffement rapide de la partie racinaire. En fin, il faut garder les arbres en bonne vigueur en pratiquant un programme de traitement, fertilisation et d'irrigation adéquat.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO). 2020. Available from: <http://www.fao.org>. [accessed March 18th, 2020].
2. Ministère de l'agriculture et du développement rural, Données statistiques ; Alger, 2015. 15p.
3. Baci L. Les contraintes au développement du secteur des fruits et légumes en Algérie : faiblesse des rendements et opacité des marchés. In : Allaya M. (ed.). Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000. Montpellier : CIHEAM, 1995. p. 265-277 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 14)
4. Journées Méditerranéennes sur l'Agrumiculture Situation actuelle et perspectives : *Université Hassiba Benbouali de Chlef 9-11 Décembre 2014*.
5. Leblanc F., Fournier P., Etienne J. , 2005. Tristeza (Citrus Tristeza Virus).Edit. « CIDRA ».CARIBFRUITS.[http://caribfruits.cirad.fr/production\\_fruitiere\\_integree/protection\\_raisonnee\\_des\\_vergers\\_maladies\\_ravageurs\\_et\\_auxiliaires/tristeza](http://caribfruits.cirad.fr/production_fruitiere_integree/protection_raisonnee_des_vergers_maladies_ravageurs_et_auxiliaires/tristeza)
6. CMI.1978. *Distribution Maps of Plant Diseases* No. 155 (edition 3). CAB International, Wallingford, Royaume-Uni
7. Perrotta G; Graniti, A. 1988. *Phoma tracheiphila*. In: *European handbook of plant diseases* Ed. by Smith, I.M.; Dunez, J.; Lelliot, R.A.; Phillips, D.H.; Archer, S.A., pp.396-398. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Royaume-Uni.
8. Fermino Carlos, E., "Transcriptional profiling on trees affected by citrus blight and identification of an etiological contrast potentially associated with the disease", Phd thesis, University of Florida, (2004), 103p
9. Benchabane, M., Fadil, D., Lamîn, S., Yahou, S., Guettache, T.& Taua D 2008. Etat du dépérissement des agrumes dans la région agrumicole de la Mitidja (Algérie). Symposium Méditerranéen sur la Protection Phytosanitaire des agrumes, Rabat, Maroc. pp : 81-89
10. Abdelguerfi, Y et Benzohra, M., 2010. Etude étiologique de dépérissement des agrumes dans la région de BENI TAMOU (W.Blida) : recherche des agents fongiques, p 80
11. Lamine, S., 2011. Impact du dépérissement des agrumes dans la région de la Mitidja : étude étiologique et épidémiologique, p173
12. Yahou, S., 2015. Le dépérissement des agrumes: étude étiologique et épidémiologique, p103.
13. Loussert, R., 1987. "Les agrumes, Arboriculture", Ed. Lavoisier, Paris, vol 1, 109p
14. Aubert, M et Vullin, G. Pépinière et plantation d'agrumes. Ed Cirad., 1997. 184p.
15. Loussert, R. "Les agrumes", bailliere.ed, (1985), 135p.

16. Camille, J., Franck, k., Marion, H. Les clémentiniers et les autres petites agrumes. Ed Cired., 2013. 363 p.
17. United States Department of Agriculture (USDA), Citrus: World Markets and Trade, 2021. Available from: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. [accessed July , 2021].
18. Données statistiques du service de la direction des services agricoles (DSA) ; Blida. 3p.
19. Mutin g. 1969. La Mitidja décolonisation et espace géographique. Ed OPU, 587p
20. Institut technique d"arboriculture fruitière et de la vigne « ITAFV », "La production fruitière", ITAFV, (2012).
21. Roistacher, C.N., "The economics of living with citrus disease: Huanglongbing (greening) in Thailand", in: Proceedings of the 13th conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, (1996), 279-285.
22. Praloran, J.C., "Les agrumes", Ed. Maison neuve et la Rose, France, (1971),565p.
23. Amponsah, N. T., Jones, E. E., Ridgway, H. J., and Jaspers, M. V. 2009. Rainwater dispersal of *Botryosphaeria* conidia from infected grapevines. N. Z. Plant Prot. 62:228-233.
24. Vogel R, 1980. Influence des maladies transmissibles sur le développement et la production du clémentinier en corse-Rev. Edit. « Fruits », 37(4) : 229-235.
25. Lachance P., 2006. Maladies et ravageurs des agrumes. Protection des plantes. [http://protectiondesplantes.blogspot.com/2006\\_12\\_01\\_archive.html](http://protectiondesplantes.blogspot.com/2006_12_01_archive.html)
26. Van-Regenmortel M.H., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstents E.B., Estes M.K., Maniloff J., Mayo M.A., Geoch D.J., Pringle C.R, Wickner R.B., 2001. The classification and nomenclature of viruses, primarily based on the 7 th ICTV report of the international committe on taxonomy of viruses (book), Academic press, Sandiego wien Newyork: 1024.
27. Waliace et Darke., 1972 IN Walter Reuther, E., Clair, C and Glenn E. C., 1978. thé citrus industry. Vol4. Chap n°1. pp: 1-61.
28. Wallace, J.M. "Virus and Virus like Disease" In: Reuther, W., Calavan, E.C., Carman, G.E., (eds), "The Citrus Industry Volume IV Crop Protection", University of California, USA, (1978), 67-184
29. Mary Olsen, Milk Matheron, Milk McClure, Zhongguo, Xiong. 2000. Diseases of citrus in Arizona, pp123.
30. Roistacher, C.N., "The economics of living with citrus disease: Huanglongbing (greening) in Thailand", in: Proceedings of the 13th conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, (1996), 279-285.
31. Jamoussi, B., 1955. Les maladies de dépérissement des Agrumes, revue de mycologie, suppeément colonial, orstom. pp : 1- 48.
32. Garcia, M.L., Sanchez de la Torre, M.E., Dal Bo, E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E., Milne, R.G. and Grau, O., 1997. Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. Plant Pathology 46 (6) :830-836.

33. Da Graça, J.V. and Korsten, L., "Citrus huanglongbing: review, present status and future strategies", *Diseases of Fruits and Vegetables*, Volume I, (2004), 229-245.
34. Martin S., Alioto D., Meline R G., Garnsey S M., Garcia M L., Grau O., Guerri J., Moreno P., 2004. Detection of citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridisation, RT-PCR and Immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Eur.J. plant pathology* 110: 747-757.
35. Klotz, J et Fawcett, H. S., 1952. Les maladies des citrus traduit de l'anglais par Comelli, A et Le Maître J. en coul. Soc, d'edit. Techn. Col. 152p.
36. Loussert, R., 1989. Les agrumes, production. Ed. Sci. Vol 2, Liban. 289p.
37. Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO), Problèmes phytosanitaire du secteur des agrumes et politiques de lutte (Troisième section), CCP : CIO3/3.
38. Lambais, M.R., Goldman, M.H.S., Camargo, L.E.A., Goldman, G.H., "A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity", *Current Opinion in Microbiology*, (2000), 3:459-462.
39. Oliveira, A.C., Vallim, M.A., "Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay", *Phytopathology*, (2002), 92:1048–1054.
40. Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, W., Van Elsas, J.D., Van Vuurde J.W.L., Azevedo, J.L., "Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants", *Appl Environ Microbiol* (2002), 68:4909-4914.
41. He, C.X., Li, W.B., Ayres, A.J., Hartung, J.S., Viranda, V.S. and Teixeira, D.C., "Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts". *Plant Disease*, (2000), 84:622–626.
42. EPPO., "European and Mediterranean Plant Protection Organization", (2010). [www.eppo.org](http://www.eppo.org).
43. Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., Vidaver, A.K., "Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. Citri..." *Systematic and Applied Microbiology*, (2005), 28:494-518.
44. Schubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, G.H., Dixon, W.N., "Meeting the Challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida-Again", *Plant Disease*, (2001), 85:340-356
45. OEPP/EPPO., "Fiches informatives sur les organismes de quarantaine, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri", Bulletin préparé par le CABI et l'OEPP pour l'UE sous contrat N°90/399003, (1997). 8p
46. Polek, M., Vidalakis, G., Godfrey, K., "Citrus Bacterial Canker Disease And Huanglongbing (Citrus Greening)", University of California, Division of agriculture and natural resources, (2007), 12p

47. Li, W., Brlansky, R.H., Hartung, J.S., "Amplification of DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* from historic citrus canker herbarium specimens", *Journal of Microbiological Methods*, (2006), 65:237– 246
48. Dunger, G., Arabolaze, A.L., Gottig, N., Orellano, E.G., Ottado, J., "Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses", *Plant Pathol*, (2005), 54:781–788
49. Roistacher, C.N., "EcoPort slide shows", (2010). [www.ecoport.org](http://www.ecoport.org)
50. Graham, J.H., Menge, J.A., "Root diseases", In: Timmer, L.W & Duncan, L.W., (eds), "Citrus Health Management", APS Press, Inc. St. Paul, MN, (1999), 126-135
51. Rieufli, p.1951. Le mildiou des agrumes, gommose parasitaire des arbres, pourriture brune des fruits, *Terres Marocaines*, T.XXV, Fax.260, P222-223.
52. Klotz, L. 1973. *Color Handbook of Citrus Diseases*. University of California. Division Riverside, California. 122 pp.
53. Wyss, Dunant, 1949. La gommose ou les gommoses des Aurantiacées. *Rev. Franc : de l'oranger*, p 165.
54. Anonyme, 1976 *La protection phytosanitaire des agrumes en Algérie*. Ed. Cibageigy. Alger ,159p.
55. Timmer, L. W., Graham, J. H., "Fungal diseases of citrus that resemble systemic, graft-transmissible diseases", Department of Plant Pathology University of Florida, IOCV, USA, (2006), [http://www.ivia.es/iocv/enfermedades/Fungal\\_diseases/verfoto.php?fichero](http://www.ivia.es/iocv/enfermedades/Fungal_diseases/verfoto.php?fichero)
56. Roger, L.1951. *Phytopathologie des pays chauds*, 225 P ; Edit. Le chevalier, Paris.
57. Fawcett, H.S., 1936. *Citrus diseases and their control*; 2ème édition Edit. McGrawhill Book company. I.N.C. New- York and London. 656p.
58. Alan J.L. Phillips, Bernard Slippers, Johannes Z. Groenewald and Pedro W. Crous., 2013. Plant pathogenic and endophytic *Botryosphaerales* known from culture. *Studies Mycology* 76
59. Ammad F., Benchabane M., Toumi M. 2014. Fungal Pathogens Associated with Grapevine Wood lesions in Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. Vol. 4, No. 6, p. 8-15, 2014
60. Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D. H., Adaskaveg, J. E., and Eskalen, A. 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Dis*. 97:1580-1584
61. Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Krueger, W. H., and Gubler, W. D. 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence, and distribution in California. *Plant. Dis*. 97:231-244
62. Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., and Gubler, W. D. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Dis*. 90:1490-1503
63. Úrbez-Torres, J. R. 2011. The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr*. 50(Suppl.):S5-S45

64. Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Trouillas, F. P., and Michailides, T. J. 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia* 102:1350-1368
65. Brown, G. E., and Lee, H. S. 1993. Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Phytopathology* 83:1204-1208
66. Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Lynch, S. C., and Eskalen, A. 2014. Identification of species of Botryosphaeriaceae causing Bot gummosis in citrus in California. *Plant Dis.* 98:55-61
67. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. 2000. Compendium of citrus diseases (Second Edition). APS press. 3340 Pilot Knob Road. St.Paul, Minnesota. 55121-2097, USA.
68. Carbone, I., and Kohn L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
69. Chen, S., Fichtner, E., Morgan, D., and Michailides, T. 2013. First report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* causing death of graft union of English walnut in California. *Plant Dis.* 97:993.
70. Childs, J. F. L. 1978. Rio Grande gummosis of citrus trees. Part 1. A brief review of the history and occurrence of Rio Grande gummosis. *Plant Dis. Rep.* 62:390-394.
71. Feder, W. A., and Hutchins, P. C. 1966. Twig gumming and dieback of the 'Robinson' tangerine. *Plant Dis. Rep.* 50:429-430.
72. Leavitt G. M. 1990. The occurrence, distribution, effect and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico. Ph.D. dissertation, University of California, Riverside.
73. Reuther, W., Calavan, E. C., and Carman, G. E., eds. 1978. The Citrus Industry, Vol. 4. University of California Press, Berkeley.
74. Alves, A., Correia, A., Luque, J., and Phillips, A. J. L. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96:598-613.
75. Smith, C. O. 1934. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*. *J. Agric. Res.* 49:467-476.
76. Denman, S., Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J.-C., Pascoe, I., and Wingfield, M. J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stud. Mycol.* 45:129-140.
77. Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2004. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96:1030-1041.
78. Polizzi G, Aiello D, Vitale A, Giuffrida F, Groenewald J, Crous P. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus

- in Italy. *Plant Disease*. 2009; 93(11):1215– 1215. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1215A> PMID: 30754593
79. Mayorquin JS, Wang DH, Twizeyimana M, Eskalen A. Identification, distribution, and pathogenicity of *Diatrypaceae* and *Botryosphaeriaceae* associated with Citrus branch canker in the southern California desert. *Plant Disease*. 2016; 100(12):2402–2413. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0362-RE> PMID: 30686172
80. Adesemoye AO, Eskalen A. First Report of *Spencermartinsia viticola*, *Neofusicoccum australe*, and *N. parvum* Causing Branch Canker of Citrus in California. *Plant Disease*. 2011; 95(6):770. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0092> PMID: 30731919
81. Hamrouni N, Nouri M, Trouillas F, Said A, Sadfi-Zouaoui N, Hajlaoui M. *Dothiorella* gummosis caused by *Dothiorella viticola*, first record from citrus in Tunisia. *New Disease Reports*. 2018; 38:10–10. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.010>.
82. Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi Goltapeh E, Zare R, Phillips AJ. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. 2010; 25:1–10. <https://doi.org/10.3767/003158510X524150> PMID: 21339962
83. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud. Mycol.* 55:235-253.
84. Eskalen, A., Faber, B., and Bianchi, M. 2013. Spore trapping and pathogenicity of fungi in the *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* associated with avocado branch canker in California. *Plant Dis.* 97:329-332.
85. Rolshausen, P. E., Urbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J., and Gubler, W. D. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *Am. J. Enol. Vitic.* 61:113-119.
86. Úrbez-Torres, J. R., Battany, M., Bettiga, L. J., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R. J., Verdegaal, P., and Gubler, W. D. 2010. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Dis.* 9:717-724.
87. Úrbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathol.* 6:261-270.
88. Eskalen, A., Faber, B., and Bianchi, M. 2013. Spore trapping and pathogenicity of fungi in the *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* associated with avocado branch canker in California. *Plant Dis.* 97:329-332.

89. Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., and Gubler, W. D. 2010. First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassipora* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. *Plant. Dis.* 94:785.
90. Joey S. Mayorquin, Mohamed T. Nouri, Beth B. Peacock, Florent P. Trouillas, Greg W. Douhan, Craig Kallsen, and Akif Eskalen. 2019. Identification, Pathogenicity, and Spore Trapping of *Colletotrichum karstii* associated with Twig and Shoot Dieback of Clementine Mandarin and Navel Orange in California. *Plant Disease*. DOI: 10.1094/PDIS-08-18-1425-RE
91. De cicco, v.; ippolito, a.; salerno, m. 1987. Duration of the infective capacity of soil containing mal secco infected lemon twigs. *Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Granada, Spain, 20-26 September, 1987*, pp. 175-176.
92. EPPO/OEPP., "Deuterophoma tracheiphila", Data Sheets on Quarantine Pests, CABI and EPPO for the EU, (2007), under Contract 90/399003, 5p.
93. Briansky, R.H., Derrick, K.S., Roberts, P.D and Timmer, L.W, 2007. Florida Citrus Pest Management Guide: Blight; 2207. Greasy spot, pp : 144-180.
94. Migheli, Q., Cacciola, S.O., Balmas, V., Pane, A., Ezra, D., Magnano di San Lio, G., "Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: A potential threat to lemon production worldwide", *APS, Plant Disease*, (2009), 93(9):852-867.
95. Nickel, O., 1987. Double-stranded RNA isolated from "decelinio" affected pera sweet orange. *Fitopatologia Brasileira* 12, p 398-399.
96. Tucker, D.P.H.; Lee, R.F.; Timmer, L.W.; Albrigo, L.G.; Bransky, R.H. 1984. Experimental transmission of citrus blight. *Plant Disease* 68, 979-980p.
97. OEPP/CABI., vitrus blight disease. In organisme de quarentaine pour l'europe 2 éme edition cab international. Wallingford, royaume-uni. 71p.
98. Wutscher, H. K., Smith, P.F., 1988. Failure to propagate citrus blight in reconstituted trees. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society* 101. pp:62.
99. Ippolito, A., "Dannosità delle malattie", lecture presentation, Università degli Studi di Bari, (2010), 18p
100. Pollastro, S., Pichierri, A., Masiello, N., Habib, W., Carlucci, A., Lazzizzera C., Frisullo, S., Faretra, F., "Il mal dell'esca della vite: interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia (Mesvit), Sud Stampa, Bari, Italia, (2007), pp.32
101. Gottwald, T.R., Bergamin-Filho, A., "Quantitative epidemiology tools: Their application and interpretation for citrus diseases", *International Organization of Citrus Virologists, IOCV*, (2010), 93p
102. RODRIGUEZ-GALVEZ, Edgar., GUERRERO, Pakita., BARRADAS, Carla., CROUS, Pedro W., ALVES, Artur., 2016. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *british mycological society*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
103. Crous et al. 2009. *Plant-pathogenic fungi*. Cramer, Berlin

104. Davet, P; Rouxe, F., "Détection et isolement des champignons du sol", INRA, Paris, (1997), 177p
105. Barnett, H ET Barry Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi, third edition. Burgess publishing company. 239p.
106. Seifert, K., 1996. Fusarium interactive key (Fuskey). Agriculture and agro-food Canada, N°A 24.65p.
107. Santos J.M. and Phillips A.J.L., 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal diversity* 34: 111-125.
108. Mullis K., and Faloona F.1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155:335-350.
109. Liu D., Colose S., Baird R. and Pederson J. (2000). Rapid mini preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38:471-15.
110. Guzhen L. and Mitchell T.G (2000). Rapid identification of pathogenic fungi directly from culture by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2860-2865.
111. Nemeč, S., Baker, R. and Burnett, H. 1980. Pathogenicity of *Fusarium solani* to citrus roots and its possible role in blight aetiology. *Proceedings of the Florida State Horticult. Society* 93:36-41.
112. Thaer Yaseen., Anna Maria D'Onghia. 2010. *Fusarium* spp. Associated to Citrus Dry Root Rot: an Emerging Issue for Mediterranean Citriculture. *Acta Horticulture*. DOI: [10.17660/ActaHortic.2012.940.89](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.940.89)
113. Mohammadi Hamid,. Espargham Nahid., and Gramaje David. 2020. A Survey of Trunk Disease Pathogens within Citrus Trees in Iran. *Plants* 2020, 9, 754; doi:10.3390/plants9060754
114. Trouillas, F. P., and Gubler, W. D. 2010. Pathogenicity of *Diatrypaceae* species in grapevines in California. *Plant Dis.* 94:867-872
115. Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., and Gubler, W. D. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* 92:519-529.
116. Berraf-Tebbal A, Mahamedi AE, Aigoun-Mouhous W, Špetík M, Čechová J, Pokluda R, Baránek, M, Eichmeier A, Alves A (2020) *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PLoS ONE* 15: e0232448
117. Aloï F, Riolo M, Parlascino R, Pane A, Cacciola SO (2021) Bot Gummosis of Lemon (*Citrus \_ limon*) Caused by *Neofusicoccum parvum*. *Journal of Fungi* 7:294. <https://doi.org/10.3390/jof7040294>
118. Desprez-Loustau M L, Marcais B, Nageleisen L M, Piou D and Vannini A (2006) Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* 63 : 597–612

119. Slippers B and Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106
120. Van Niekerk JM, Strever AE, Du Toit G, Halleen F and Fourie PH (2011) Influence of water stress on Botryosphaeriaceae disease expression in grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 151–165
121. Zhang ZX, Deng DF, Qi WJ, Fan SS, Cao Y, Huang JG and Liu ZY (2013) Botryosphaeria dothidea, the causal agent of a new canker disease of Tatarian dogwood (*Cornus alba*) in China. *Australasian Plant Pathology* 42: 113–119
122. Sakalidis M L, Hardy G E S J and Burgess TI (2011a) Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology* 4: 1–14
123. Bostock RM, Pye MF and Roubtsova TV (2014) Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual Reviews of Phytopathology* 52: 517–549
124. Dubos B (2002a) maladies cryptogamiques de la vigne. bourdeaux, edition 13 Féret
125. Castle W S, Tucker D P H, Krezdorn A H, and Youtsey C O (1993) Rootstocks for Floridacitrus (Univ. Florida Publ. SP-42), 2nd ed. 15May 2020. [https://crec.ifas.ufl.edu/extension/citrus\\_rootstock/Rootstock-Literature/Rootstocks%20for%20Florida%20Citrus.pdf](https://crec.ifas.ufl.edu/extension/citrus_rootstock/Rootstock-Literature/Rootstocks%20for%20Florida%20Citrus.pdf)
126. Srivastava AK and Singh S (2009) Citrus Decline: Soil Fertility and Plant Nutrition, *Journal of Plant Nutrition* 32: 197-245
127. PRALORAN J.C. 1971.les agrumes. ed.G.P. Maisonneuve et Larose, Paris, 565p.
128. Timmer LW, Peever TL, Solel Z, Akimitsu K (2003) Alternaria diseases of citrus novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea* 42: 99–111
129. Ristaino JB, Gumpertz ML (2000) New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics cause by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Reviews of Phytopathology* 38: 541–57
130. Le Gall D et Le Gat Y (1994) Évaluations de la nuisibilité de l'eutypiose au vignoble. *Annales A.N.P.P. (Association nationale de protection des plantes)*. 4e conférence Internationale sur les maladies des plantes. 6 au 8 décembre 1994, Bordeaux, France. A.N.P.P., Paris, tome III. p. 1271- 1284
131. Goulet E (2008) les maladies de bois au vignoble: chercheurs et techniciens autour de la table, *Compte rendu de journée thématique sur les maladies du bois (IFV, Toulouse)*, p3
132. Dubos B (2002b) Les maladies cryptogamiques de la vigne champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Edition Ferret (2ème édition), 200p

133. Migheli Q, Cacciola SO, Balmas V, Pane A, Ezra D, Magnano di San Lio G (2009) Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: a potential threat to lemon production worldwide. *Plant Disease* 93: 853–867
134. Ammad F, Benchabane M, Toumi M, Belkacem N, Guesmi A, Ameer C, et al. Occurrence of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine dieback in Algeria. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2014; 38(6):865–876. <https://doi.org/10.3906/tar-1404-15>.
135. Ammad F (2006). Dépistage et diagnostic des maladies de dépérissement de la vigne (Eutypiose et viroses) dans quelques vignobles Algériens. PhD, University of Blida, Algeria (thesis in French).
136. Úrbez-Torres, J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 50(Suppl.):S5-S45
137. Klotz, L. J. 1978. Fungal, bacterial and non-parasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. Pages 1-66 in: *The Citrus Industry*, Vol. 4. W. Reuther, E. C. Calavan, and G. E. Carman, eds. University of California Press, Berkeley
138. Dubos B., 1996. Eutypiose de la vigne. *Eutypa lata* (pers : fr) Tur : CR. Acad. Agric. France. 92 (1) 21-30.
139. Dubos B., 1999. Les maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. *Edition Ferret*, 200.
140. Loest, F. C. 1950. Orchard practices in relation to “collar rot” of citrus. *Farming South Africa* 25:331-333, 340.
141. Van Niekerk, J.M.; Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Fourie, P.H.; Halleen, F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeria species on grapevines. *Mycologia* 2004, 96, 781–798.
142. Pavlic, D.; Slippers, B.; Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathol.* 2007, 56, 624–636.
143. Mohali, S.; Slippers, B.; Wingfield, M.J. Pathogenicity of seven species of the Botryosphaeriaceae on *Eucalyptus* clones in Venezuela. *Australas. Plant Pathol.* 2009, 38, 135–140.
144. Úrbez-Torres, J.R.; Leavitt, G.M.; Guerrero, J.C.; Guevara, J.; Gubler, W.D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* 2008, 92, 519–529.
145. Michailides, T.J.; Morgan, D.P.; Felts, D. First report of *Botryosphaeria rhodina* causing shoot blight of pistachio in California. *Plant Dis.* 2002, 86, 1273
146. Shortle, W.C. Mechanisms of Compartmentalization of Decay in Living Trees. *Phytopathology* 1979, 69, 1147, doi:10.1094/phyto69-1147

147. Shigo, A.L. Compartmentalization: A Conceptual Framework for Understanding How Trees Grow and Defend Themselves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1984, 22, 189–214, doi:10.1146/annurev.py.22.090184.001201.
148. Rioux, D.; Nicole, M.; Simard, M.; Ouellette, G.B. Immunocytochemical Evidence that Secretion of Pectin Occurs During Gel (Gum) and Tylosis Formation in Trees. *Phytopathology* 1998, 88, 494–505, doi:10.1094/phyto.1998.88.6.494.
149. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composées phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
150. Fleurat-Lessard P., Harche-Kaid M., Faucher M., bonnemain J.L (2000). La cellule associée aux visseaux(CAV), unité de contrôle des flux de nutriments et des réactions de défense dans l'arbre. Acte du 4<sup>eme</sup> colloque sur l'arbre. Eds Isabelle Quentin, Montréal, pp122-127.
151. Linaldeddu BT, Deidda A, Scanu B, Franceschini A, Serra S, Berraf-Tebbal A, et al. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal Diversity.* 2014; 71(1):201–214. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0301-x>.
152. Chakusary MK, Mohammadi H, Khodaparast SA. Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species on forest trees in the north of Iran. *European Journal of Forest Research.* 2019:1–20. <https://doi.org/10.1007/s10342-019-01200-7>
153. Akimitsu, K., Peever, T. L., Timmer, L. W. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology*, 4: 435-446.
154. Botina A, B. L., García M, M. C., Romero B, Y. (2019). Pre- and post-harvest factors that affect the quality and commercialization of the Tahiti lime. *Scientia Horticulturae*, 257.
155. Timmer, L. W. (1998). Diseases of fruit and foliage. Pages 107-115 in: *Citrus Health Management*. L. W.

## Annexes

### Annexe A

#### Bilan de la production agrumicole 2019/2020

WILAYA	Sup.compl. ha	Sup.en rap. ha	Production qx	Rdt qx/ha
1 ADRAR	0	0	0	0,0
2 CHLEF	5 705	5 258	1 299 230	247,1
3 LAGHOUAT	11	11	585	53,2
6 BEJAIA	1 994	1 809	219 100	121,1
7 BISKRA	87	77	2 967	38,5
8 BECHAR	46	40	4 118	103,0
9 BLIDA	17 429	16 461	4 200 727	255,2
10 BOUIRA	437	384	38 423	100,1
11 TAMANRASSET	182	182	4 782	26,3
13 TLEMCEM	2 652	2 345	326 240	139,1
15 TIZI-OUZOU	1 419	1 219	284 313	233,2
16 ALGER	5 693	4 724	957 360	202,7
18 JIJEL	377	307	28 859	94,0
21 SKIKDA	2 784	2 386	560 300	234,8
22 S.B.ABBES	2	2	200	100,0
23 ANNABA	559	473	64 100	135,5
24 GUELMA	806	602	130 000	215,9
26 MEDEA	47	32	2 858	89,3
27 MOSTAGANEM	4 727	3 977	1 156 761	290,9
29 MASCARA	4 444	4 130	372 150	90,1
30 OUARGLA	21	16	1 160	72,5
31 ORAN	221	202	19 197	94,9
33 ILLIZI	126	69	4 619	66,9
35 BOUMERDES	2 137	1 931	392 080	203,0
36 EL-TARF	2 125	1 796	374 000	208,2
39 EL-OUED	31	31	452	14,6
41 SOUK-AHRAS	8	6	549	91,5
42 TIPAZA	4 249	3 612	872 167	241,5
43 MILA	3	0	0	0,0
44 AIN-DEFLA	1 651	1 377	253 900	184,4
45 NAAMA	2	2	140	70,0
46 A.TEMOUCHENT	394	394	33 201	84,3
47 GHARDAIA	1 052	762	64 307	84,4
48 RELIZANE	4 596	4 534	1 041 185	229,6
<b>TOTAL ALGERIE</b>	<b>66 017</b>	<b>59 151</b>	<b>12 710 030</b>	<b>214,9</b>

## **Annexe B**

### **1. Milieux de culture**

**Milieu PDA** (POTATO Dextrose Agar) (Rapilly, 1968):

Pomme de terre 200g

Dextrose 20g

Agar 20g

Eau distillée 1000ml

Autoclavage 20 minutes à 120°C.

### **2. Milieu à la farine d'avoine (Oatmeal agar)**

Farine d'avoine 40 g

Agar 15 g

Eau distillée 1000 ml

Autoclavage 20 minutes à 120°C

### **3. L'eau gélosé 2%**

Eau distillé stérile 1000 ml

Agar 20g

Mélanger les deux composants

Remuer jusqu'à la dissolution total des composants

Stériliser dans l'autoclave 20 mn à 120°C.

### **4. Solution de lyse pour extraction d'ADN**

HCL 400mM (pH 8,0) : 60 ml ; EDTA (pH 8,0) : 150 ml Nacl:30 ml; SDS (1%): 10 ml; compléter le volume à 100 ml avec l'eau distillé stérile.

La solution d'acétate d'ammonium : 60 ml d'acétate d'ammonium 5M ; 11,5 d'acide acétique glacial et 28.5 ml d'eau distillé stérile.

### **5. Milieu réactionnel (25 µl)**

0.8 d'ADN génomique, 1 µl de chaque amorce, 5 µl du tampon PCR contenant le MgCl<sub>2</sub> (10 Mm tri-HCL ph 90 ; 50 Mm KCL ; 1.5 Mm MgCl<sub>2</sub> ; 1 µl du mélange désoxynucléoside triphosphate (dNTP), 0.3 µl de Taq ADN polymérase et 40.9 d'eau.

# Annexe C

## Bulletin d'analyse de sol des vergers étudiés



Référence N°: 2756  
Buletin edité le: 23/07/1018

### Données du consultant

EAC3,BOUZA DJILALAI ex domaine 13 09210 Affroun

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

### DONNÉES DE L'EXPLOITATION, PARCELLE ET CULTURE

Propriété: eac03 Culture: ORANGER/CARRIZO/NAVELATE  
Parcelle: ARBIA Production: 0 q/Ha  
Cadastre: Polygone 0 Parcelle 1 Type:  
Localité: Affroun Surface: 1,5 Ha  
C.P.: 09210 (Blida) Identification: 2

### Résultats de l'analyse du sol

Fertial Laboratoire agronomique BP 3088 Route Des Salines Annaba Tél: 038.53.96.10 / Fax: 038.53.93.42	échantillon n° T-16068	Code-barres 
--	---------------------------	-----------------

Sable 24% Limon 24% Argile 52%

Texture: Argileuse

				Très faible	Faible	Normal	Élevé	Très élevé	
Conductivité (1/5 mS/cm)	0,22	Non salé	CE				0,22		mS/cm
pH eau (1/2.5)	8,35	Alcalin	pH				5,5		
C/N	11,71	Normal	C/N				11,71		
Carbonates	2,32	23200,00	CaCO <sub>3</sub>				2,32		%
Calcaire actif	-	-	C.actif						%
Matière organique	2,82	28200,00	MO				2,82		%
Azote Total	0,14	1400,00	N				0,14		%
Phosphore (Olsen)	0,05	14,2	P				14,2		p.p.m.
Potassium échangeable	0,3	132,9	K				0,3		meq/100gr
Magnésium échangeable	2,4	291,8	Mg				2,4		meq/100gr
Calcium échangeable	18,0	3603,2	Ca				18,0		meq/100gr
Sodium échangeable	0,1	25,3	Na				0,1		meq/100gr

(Données analytiques interprétées par le Système Sidra)

### Interprétation de l'Analyse

Il s'agit d'un sol très lourd, avec un drainage interne très mauvais et une capacité de rétention de l'eau et des engrais très élevée. Il y a risque de rétrogradation du phosphore et de potassium, ainsi que d'asphyxie racinaire dans les cas extrêmes. En général le sol est de fertilité élevée. Le sol ne présente pas de problèmes de salinité. Le pH actuel du sol est alcalin et peut produire des problèmes d'assimilation de micro-éléments. Pour la culture ORANGER le pH du sol le plus adéquat est compris entre 6,5 et 7. Le rapport C/N indique que la matière organique est suffisamment décomposée. La teneur en carbonates est faible. Il est donc difficile qu'il y ait des fixations de phosphore qui réduisent sa disponibilité. Il n'y a pas de risque grave de carence induite en Mg. Il n'y a pas de risque grave de carence induite en K.

### Recommandation de Fertilisation

Fertilisation de fond	Kg/Ha
N.P.Ks 04-20-25	562
T.S.P. 46% P2O5	0
sulfate de potassium 0-0-50	944
<b>Fertilisation d'entretien</b>	
SULFAZOT	158

L'engrais de couverture doit être réparti sur 3 applications

Signé : Conseiller Agronomique. FERTIAL Laboratoire Agronomique

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

Société des Fertilisants d'Algérie FERTIAL SPA Route des Salines BP 3088  
Tel : 38 53 93 10 à 14 / 038 53 93 17 Fax : 038 53 93 42  
Email : fertial@fertial-dz.com

Données du consultant

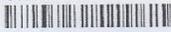
EAC3, Bouaza Djilali ex domaine 13 09210 Bourabaa mohamed

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

DONNÉES DE L'EXPLOITATION, PARCELLE ET CULTURE

Propriété: eac03 Culture: ORANGER/CARRIZO/NAVEL POWELL  
Parcelle: SONDA Production: 0 q/Ha  
Cadastre: Polygone 0 Parcelle 1 Type:  
Localité: **Afroun** Surface: 1,5 Ha  
C.P.: 09210 (Blida) Identification: 1

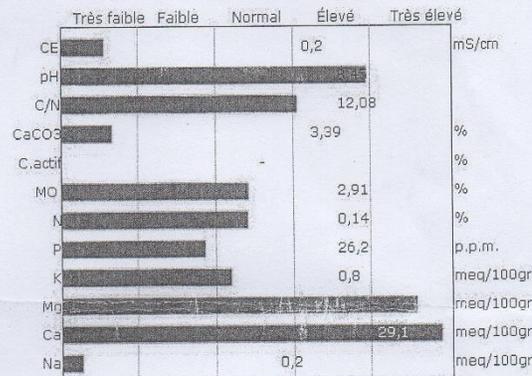
Résultats de l'analyse du sol

Fertial Laboratoire agronomique BP 3088 Route Des Salines Annaba Tél: 038.53.96.10 / Fax: 038.53.93.42	échantillon n° T-16070	Code-barres 
--	---------------------------	---

Sable 28% Limon 20% Argile 52%

Texture: Argileuse

Conductivité (1/5 mS/cm)	0,2	Non salé
pH eau (1/2.5)	8,45	Alcalin
C/N	12,08	Élevé
Carbonates	3,39	33900,00
Calcaire actif	-	-
Matière organique	2,91	29100,00
Azote Total	0,14	1400,00
Phosphore (Olsen)	0,08	26,2
Potassium échangeable	0,8	304,9
Magnésium échangeable	6,3	767,3
Calcium échangeable	29,1	5831,6
Sodium échangeable	0,2	41,4



(Données analytiques interprétées par le Système Siddra)

FERTIAL SPA / Groupe Villiar Mir - Route des Salines - ANNABA

Interprétation de l'Analyse

Il s'agit d'un sol très lourd, avec un drainage interne très mauvais et une capacité de rétention de l'eau et des engrais très élevée. Il y a un risque de rétrogradation du phosphore et de potassium, ainsi que d'asphyxie racinaire dans les cas extrêmes. En général le sol est de fertilité élevée. Le sol ne présente pas de problèmes de salinité. Le pH actuel du sol est alcalin et peut produire des problèmes d'assimilation de micro-éléments. Pour la culture ORANGER le pH du sol le plus adéquat est compris entre 6,5 et 7. Le rapport C/N est élevé ce qui indique que la matière organique est peu décomposée, processus qu'il faut favoriser en incorporant de l'azote au sol. Cette valeur peut signifier que la fertilisation du sol est déficiente ou qu'il y a un problème d'accumulation d'eau. La teneur en carbonates est faible. Il est donc difficile qu'il y ait des fixations de phosphore qui réduisent sa disponibilité. Le rapport Ca/Mg est normal. Il n'y a pas de risque grave de carence induite en K.

Recommandation de Fertilisation

Fertilisation de fond	Kg/Ha
N.P.Ks 04-20-25	150
T.S.P. 46% P2O5	0
sulfate de potassium 0-0-50	0
Fertilisation d'entretien	
SULFAZOT	132

L'engrais de couverture doit être réparti sur 3 applications

Observations

Le porte greffe adapté à ce sol c'est le citrange carrizo

Signé : Conseiller Agronomique. FERTIAL Laboratoire Agronomique

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

Société des Fertilisants d'Algérie FERTIAL SPA Route des Salines BP 3088  
Tel : 038 53 93 10 à 14 / 038 53 93 17 Fax : 038 53 93 42  
Email : fertial@fertial-dz.com

**Données du consultant**

soufiane TSOURI  
EAC3: **Chaoui** ex domaine 13 09210 **Mouzaia**

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

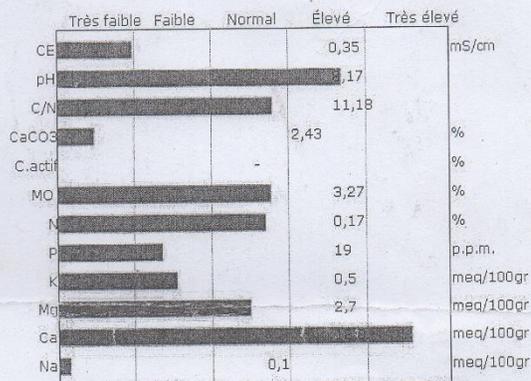
**DONNÉES DE L'EXPLOITATION, PARCELLE ET CULTURE**

Propriété: eac03 Culture: ORANGER/AMER/THOMSON  
Parcelle: CITRON Production: 0 q/Ha  
Cadastre: Polygone 0 Parcelle 1 Type:   
Localité: **Mouzaia** Surface: 1 Ha  
C.P.: 09210 (Blida) Identification: 1

**Résultats de l'analyse du sol**

Fertial Laboratoire agronomique BP 3088 Route Des Salines Annaba Tél: 038.53.96.10 / Fax: 038.53.93.42	échantillon n° T-16066	Code-barres 
--	---------------------------	---

Sable 36%	Limon 16%	Argile 48%
Texture: Argileuse		
Conductivité (1/5 mS/cm)	0,35	Non salé
pH eau (1/2.5)	8,17	Alcalin
C/N	11,18	Normal
Carbonates	2,43	24300,00
Calcaire actif	-	-
Matière organique	3,27	32700,00
Azote Total	0,17	1700,00
Phosphore (Olsen)	0,06	19
Potassium échangeable	0,5	179,8
Magnésium échangeable	2,7	333,2
Calcium échangeable	18,8	3769,5
Sodium échangeable	0,1	23,0



(Données analytiques interprétées par le Système Siddra)

**Interprétation de l'Analyse**

Il s'agit d'un sol très lourd, avec un drainage interne très mauvais et une capacité de rétention de l'eau et des engrais très élevée. Il y a risque de rétrogradation du phosphore et de potassium, ainsi que d'asphyxie racinaire dans les cas extrêmes. En général le sol est de fertilité élevée. Le sol ne présente pas de problèmes de salinité. Le pH actuel du sol est alcalin et peut produire des problèmes d'assimilation de micro-éléments. Pour la culture ORANGER le pH du sol le plus adéquat est compris entre 6,5 et 7. Le rapport C/N indique que la matière organique est suffisamment décomposée. La teneur en carbonates est faible. Il est donc difficile qu'il y ait des fixations de phosphore qui réduisent sa disponibilité. Le rapport Ca/Mg est normal. Il n'y a pas de risque grave de carence induite en K.

**Recommandation de Fertilisation**

<b>Fertilisation de fond</b>	<b>Kg/Ha</b>
N.P.Ks 04-20-25	893
T.S.P. 46% P2O5	342
sulfate de potassium 0-0-50	0
<b>Fertilisation d'entretien</b>	
SULFAZOT	144
	L'engrais de couverture doit être réparti sur 3 applications

**Observations**

LE porte greffe adapté c'est le citrange carrizo

Signé : Conseiller Agronomique. FERTIAL Laboratoire Agronomique

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

Société des Fertilisants d'Algérie FERTIAL SPA Route des Salines BP 3088  
Tel : 038 53 93 10 à 14 / 038 53 93 17 Fax : 038 53 93 42  
Email : fertial@fertial-dz.com

**Données du consultant**

sofiane TSOURI

EAC3, Chaoui ex domaine 13 09210 Mouzaia

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

**DONNÉES DE L'EXPLOITATION, PARCELLE ET CULTURE**

Propriété: eac03

Parcelle: ARBIA

Cadastre: Polygone 0 Parcelle 1

Localité: Mouzaia

C.P.: 09210 (Blida)

Culture: ORANGER/CARRIZO/NAVELATE

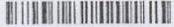
Production: 0 q/Ha

Type: Goutte-à-goutte (g. à g.)

Surface: 1,5 Ha

Identification: 1

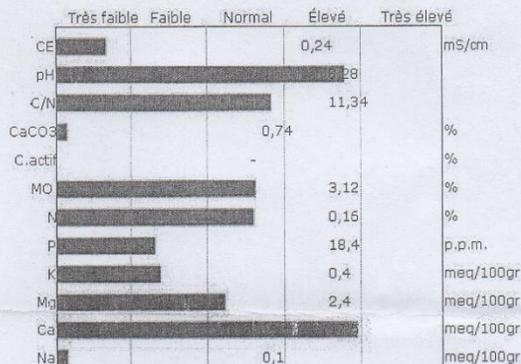
**Résultats de l'analyse du sol**

Fertial Laboratoire agronomique BP 3088 Route Des Salines Annaba Tél: 038.53.96.10 / Fax: 038.53.93.42	échantillon n° T-16067	Code-barres 
--	---------------------------	---

Sable 24% Limon 24% Argile 52%

Texture: Argileuse

Conductivité (1/5 mS/cm)	0,24	Non salé
pH eau (1/2.5)	8,28	Alcalin
C/N	11,34	Normal
	%	p.p.m.
Carbonates	0,74	7400,00
Calcaire actif	-	-
Matière organique	3,12	31200,00
Azote Total	0,16	1600,00
	meq/100gr	p.p.m.
Phosphore (Olsen)	0,06	18,4
Potassium échangeable	0,4	152,5
Magnésium échangeable	2,4	296,7
Calcium échangeable	17,5	3505,0
Sodium échangeable	0,1	23,0



(Données analytiques interprétées par le Système Siddra)

FERTIAL SPA / Groupe Viljar Irir - Route des Salines - ANNABA

**Interprétation de l'Analyse**

Il s'agit d'un sol très lourd, avec un drainage interne très mauvais et une capacité de rétention de l'eau et des engrais très élevée. Il y a risque de rétrogradation du phosphore et de potassium, ainsi que d'asphyxie racinaire dans les cas extrêmes. En général le sol est de fertilité élevée. Le sol ne présente pas de problèmes de salinité. Le pH actuel du sol est alcalin et peut produire des problèmes d'assimilation de micro-éléments. Pour la culture ORANGER le pH du sol le plus adéquat est compris entre 6,5 et 7. Le rapport C/N indique que la matière organique est suffisamment décomposée. La teneur en carbonates est faible. Il est donc difficile qu'il y ait des fixations de phosphore qui réduisent sa disponibilité. Il n'y a pas de risque grave de carence induite en Mg. Il n'y a pas de risque grave de carence induite en K.

**Recommandation de Fertilisation**

Fertilisation de fond	Kg/Ha	
N.P.Ks 04-20-25	415	
T.S.P. 46% P2O5	0	
sulfate de potassium 0-0-50	982	
<b>Fertilisation d'entretien</b>		
SULFAZOT	153	L'engrais de couverture doit être réparti sur 3 applications

**Observations**

le porte greffe adapté à ce sol c'est le citrange carrizo.

Signé : Conseiller Agronomique.

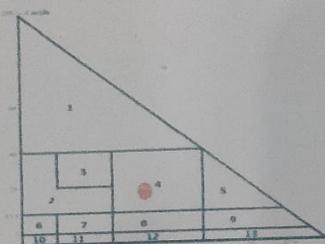
FERTIAL Laboratoire Agronomique

**FERTIAL**  
Les Fertilisants d'Algérie

Client		Parcelle		Échantillon		Rapport n°:	
Nom:	BARKI Mohamed	nom:	chambre 05	N° lab:	T-21-129	prélèvement:	00/01/1900
adresse:		surface:	3	N° F.R:	-	arrivée lab:	-
tél:	LARABAA	prof.cm:	60	masse:	-	édition:	08/12/202
fax:	-	cailloux %:	10				
e-mail:	-	Coord.GPS	-				

### Granulométrie sans décarbonatation (NF X 31-107)

argile %	23,2
limon fin %	23
limon grossier %	19,7
sable fin %	29,4
sable grossier %	2,6
texture: argile limono-sabeuse	

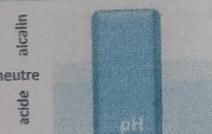


- 1 : argiles
- 2 : argilo-sableuse
- 3 : argilo-sablo-limoneuse
- 4 : argile limono-sableuse
- 5 : argilo-limoneuse
- 6 : sablo-argileuse
- 7 : sablo-limono-argileuse
- 8 : limono-sablo-argileuse
- 9 : limono-argileuse
- 10 : sableuse
- 11 : sablo-limoneuse
- 12 : limono-sableuse
- 13 : limons

Indice de battance (calculé) -

### pH & conductivité

pH eau (NF ISO 10390)	8,7
conductivité (µS/cm) (NF ISO 11265)	494

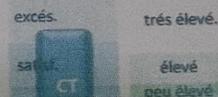


### Etat calcique

calcaire total % (NF ISO 10693)

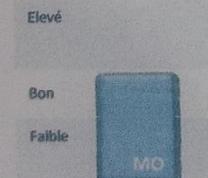
25

calcaire actif %



### Matière Organique & CEC

carbone organique % (NF ISO 14235)	12,37
matière organique % (NF ISO 14235)	2,1
CEC Metson à pH 7 (méq/kg) (NF X 31-130)	88

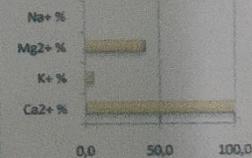


### Complexe Argilo-Humique

saturation du complexe %

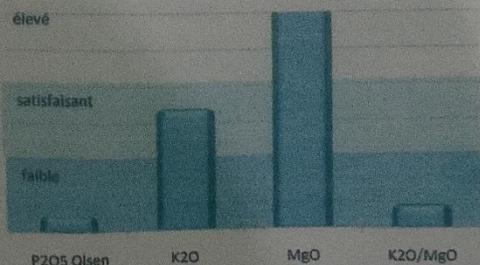
458,7

Ca <sup>2+</sup> %	412,4
K <sup>+</sup> %	5,9
Mg <sup>2+</sup> %	40,4
Na <sup>+</sup> %	-
H <sup>+</sup> %	0,0

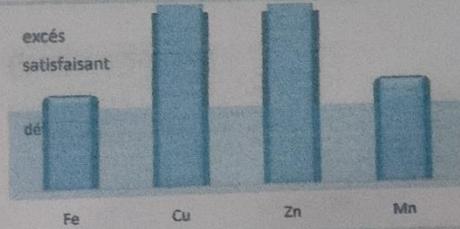


### Éléments majeurs

Élément	Teneur du sol g/kg	Optimum (g/kg)
P2O5 Olsen NF ISO 11263	0,010	0,05
K2O NF X 31-108	0,24	0,14
MgO NF X 31-108	0,72	0,12
CaO NF X 31-108	10,18	-
Na2O NF X 31-108	-	-
K2O/MgO	0,34	-



oligos-éléments		
élément	teneur du sol (ppm)	Optimum (ppm)
Fe (EDTA)	20,3	20
Cu (EDTA)	2,26	1
Zn (EDTA)	2,34	1
Mn (EDTA)	9,2	8



### INTERPRETATION DES RESULTATS



SPA PROFERT au capital  
de 700.000.000,00 DA  
RC: 98 B 0182154 00/06  
Tél: +21334102531

Adresse siège: 4 chemins, Béjaia  
NIF: 0998060 182 15472  
Fax: +213402745 / +2134102230

Adresse usine: Zone d'activité SOUK ELLILE,  
Mostaganem  
Article: 0601 0200 900  
Mobile: +213555623198 / 99

Client		Parcelle		Échantillon		Rapport n°: RT-21-127	
Nom:	BARKI Mohamed	nom:	coté nord 03	N° lab:	T-21-127	prélèvement:	00/01/1900
adresse:	<b>BOUFARIK</b>	surface:	2	N° F.R.:	-	arrivée lab:	-
tél:		prof.cm:	60	masse:	-	édition:	08/12/202
fax:	-	cailloux %:	10				
e-mail:	-	Coord.GPS:	-				

### Granulométrie sans décarbonatation (NF X 31-107)

argile %	23		1 : argiles	8 : limono-sablo-argileuse
limon fin %	22,1		2 : argilo-sableuse	9 : limono-argileuse
limon grossier %	23,7		3 : argilo-sablo-limoneuse	10 : sableuse
sable fin %	33,1		4 : argile limono-sableuse	11 : sablo-limoneuse
sable grossier %	2,3		5 : argilo-limoneuse	12 : limono-sableuse
texture:	argile limno-sabeuse		6 : sablo-argileuse	13 : limons
			7 : sablo-limono-argileuse	
			Indice de battance (calculé)	-

pH & conductivité		Etat calcique	
pH eau (NF ISO 10390)	8,5	calcaire total % (NF ISO 10693)	26
conductivité (µS/cm) (NF ISO 11265)	551	calcaire actif %	-
		excès.	très élevé.
		satisf.	élevé
		peu élevé	

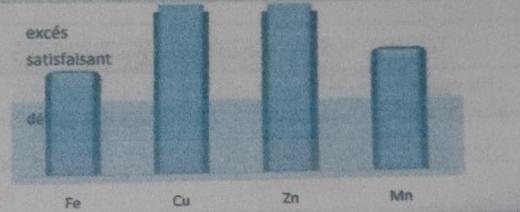
Matière Organique & CEC		Complexe Argilo-Humique	
carbone organique % (NF ISO 14235)	9,64	saturation du complexe %	469,0
matière organique % (NF ISO 14235)	1,7	Ca2+ %	427,4
CEC Metson à pH 7 (méq/kg) (NF X 31-190)	84	K+ %	12,4
		Mg2+ %	29,3
		Na+ %	-
		H+ %	0,0
		Na+ %	0,0
		Mg2+ %	50,0
		K+ %	100,0
		Ca2+ %	

Éléments majeurs		
Élément	Teneur du sol g/kg	Optimum (g/kg)
P2O5 Olsen NF ISO 11263	0,050	0,05
K2O NF X 31-108	0,49	0,14
MgO NF X 31-108	0,50	0,12
CaO NF X 31-108	10,07	-
Na2O NF X 31-108	-	-
K2O/MgO	0,98	-

Élément	État
P2O5 Olsen	faible
K2O	élevé
MgO	élevé
K2O/MgO	satisfaisant

oligos-éléments		
élément	teneur du sol (ppm)	Optimum (ppm)
Fe (EDTA)	24,3	20
Cu (EDTA)	2,90	1
Zn (EDTA)	3,96	1
Mn (EDTA)	11,7	8



### INTERPRETATION DES RESULTATS



# RAPPORT D'ANALYSE DE TERRE

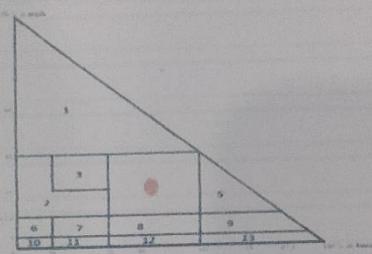
BESSALAM AHMED

Page 1 sur 2

Client		Parcelle		Échantillon		Rapport n°: RT-21-128	
Nom:	BARKI Mohamed	nom:	P50 n°04	N° lab:	T-21-128	prélèvement:	00/01/1900
adresse:		surface:	4	N° F.R:	-	arrivée lab:	-
tél:	<b>QUEDELALLEUG</b>	n:	60	masse:	-	édition:	08/12/202
fax:	-	cailloux %:	10				
e-mail:	-	Coord.GPS	-				

## Granulométrie sans décarbonatation (NF X 31-107)

argile %	24,6
limon fin %	25,3
limon grossier %	20,8
sable fin %	29,8
sable grossier %	1,8
texture:	argile limono-sabeuse

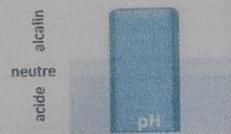


- 1 : argiles
- 2 : argilo-sabeuse
- 3 : argilo-sablo-limoneuse
- 4 : argile limono-sabeuse
- 5 : argilo-limoneuse
- 6 : sablo-argileuse
- 7 : sablo-limono-argileuse
- 8 : limono-sablo-argileuse
- 9 : limono-argileuse
- 10 : sableuse
- 11 : sablo-limoneuse
- 12 : limono-sableuse
- 13 : limons

Indice de battance (calculé) -

## pH & conductivité

pH eau (NF ISO 10390)	8,6
conductivité (µS/cm) (NF ISO 11265)	452



## Etat calcique

calcaire total % (NF ISO 10693)

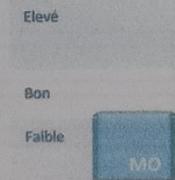
24

calcaire actif %

excés. très élevé.  
satisf. élevé  
peu élevé

## Matière Organique & CEC

carbone organique % (NF ISO 14235)	11,82
matière organique % (NF ISO 14235)	2,0
CEC Metson à pH 7 (méq/kg) (NF X 31-130)	92



## Complexe Argilo-Humique

saturation du complexe %

429,1

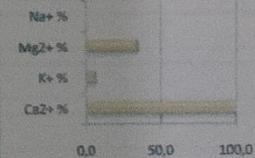
Ca<sup>2+</sup> % 387,4

K<sup>+</sup> % 7,1

Mg<sup>2+</sup> % 34,6

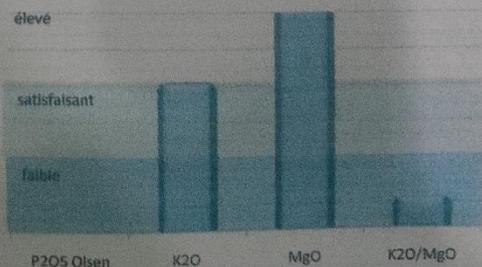
Na<sup>+</sup> % -

H<sup>+</sup> % 0,0

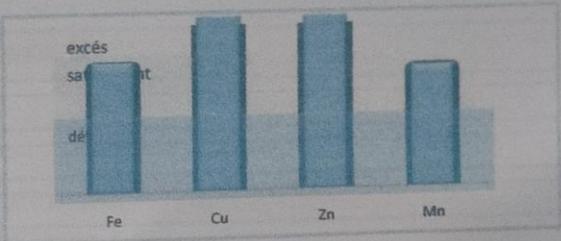


## Éléments majeurs

Élément	Teneur du sol g/kg	Optimum (g/kg)
P2O5 Olsen NF ISO 11263	0,00	0,05
K2O NF X 31-108	0,31	0,15
MgO NF X 31-108	0,64	0,13
CaO NF X 31-108	10,00	-
Na2O NF X 31-108	-	-
K2O/MgO	0,48	-



oligos-éléments		
élément	teneur du sol (ppm)	Optimum (ppm)
Fe (EDTA)	30,1	20
Cu (EDTA)	2,37	1
Zn (EDTA)	2,15	1
Mn (EDTA)	11,4	8



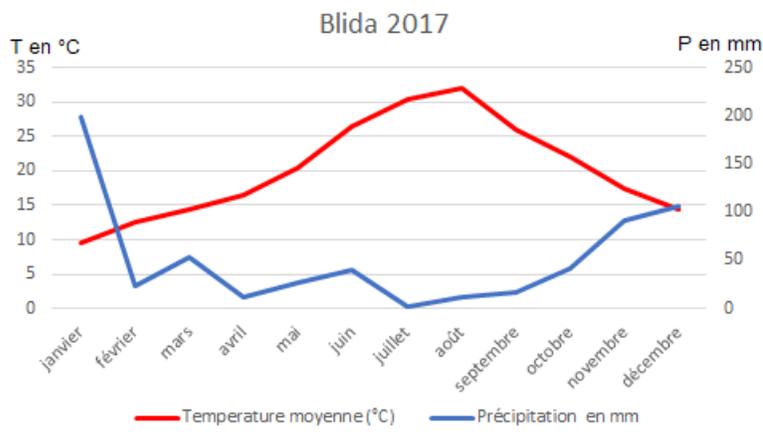
**INTERPRETATION DES RESULTATS**



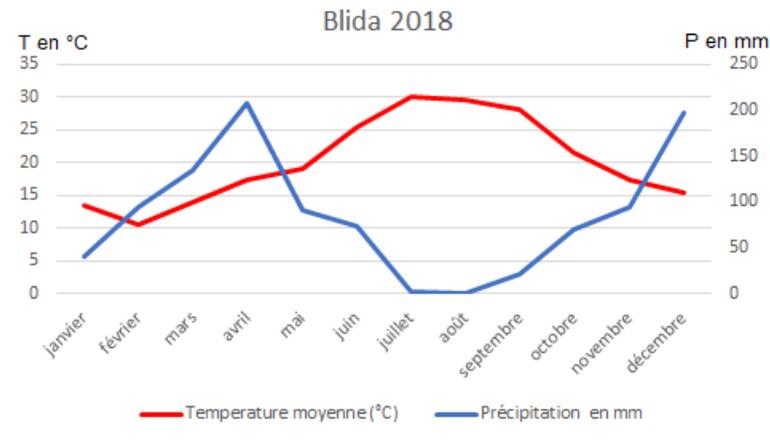
	SPA PROFERT au capital de 700.000.000,00 DA	Adresse siège: 4 chemins, Béjaia	Adresse usine: Zone d'activité SOUK ELLILE, Mostaganem
	RC: 98 B 0182154 00/06	NIF: 0998060 182 15472	Article: 0601 0200 900
	Tél: +21334102531	Fax: +213402745 / +2134102230	Mobile: +213555623198 / 99

## Annexe D

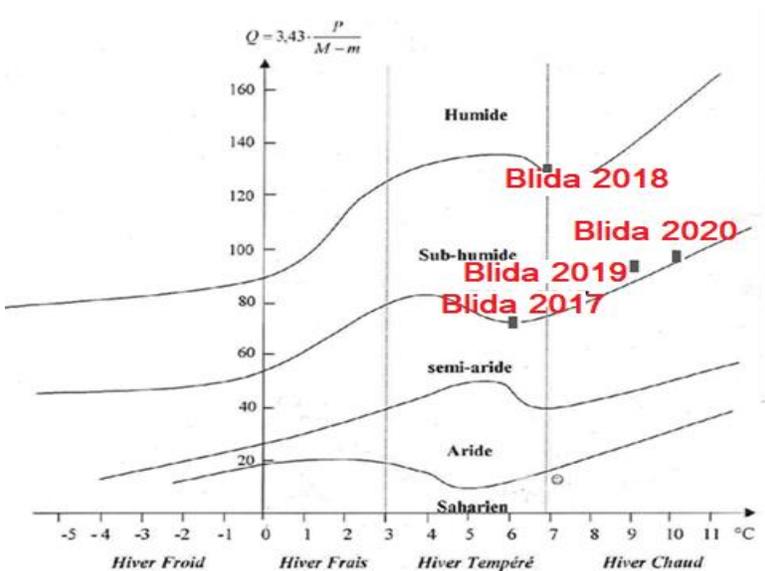
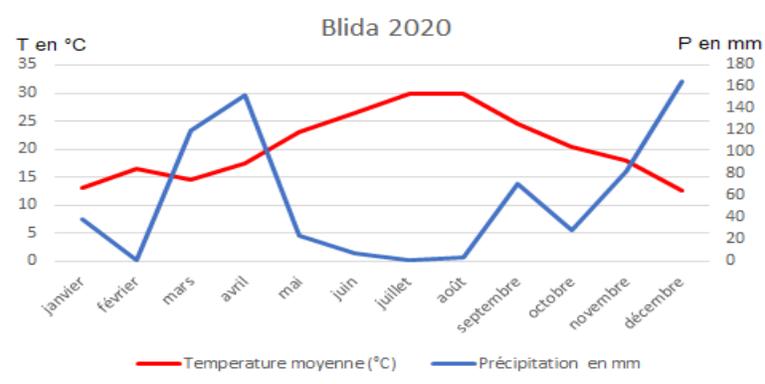
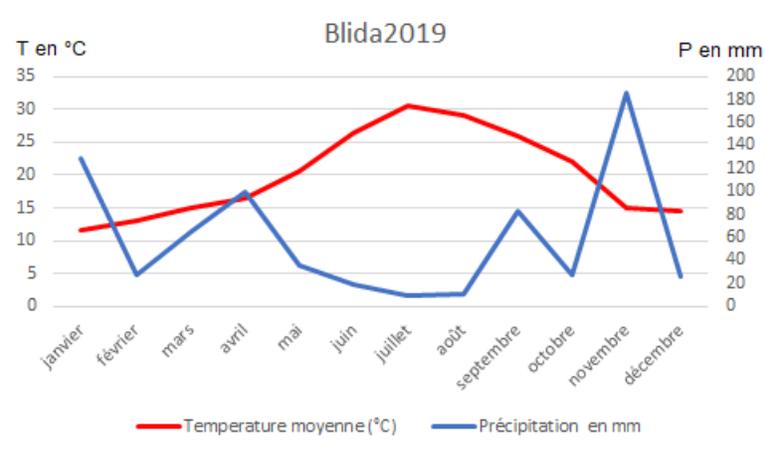
### DIAGRAMMES OMBROTHERMIQUE ET CLIMAGRAMME D'EMBERGER DE LA WILAYA DE BLIDA (2017, 2018, 2019, 2020)



**A**



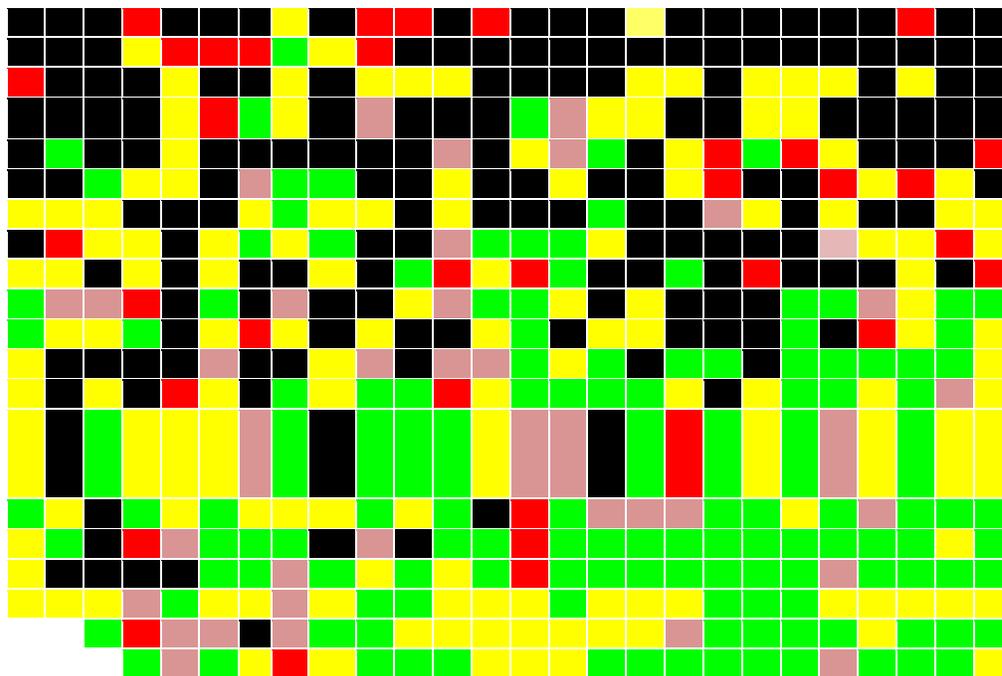
**B**



**A : 2017, B : 2018, C : 2019, D : 2020, E : climagramme d'Emberger de la wilaya de Blida (2017, 2018, 2019, 2020)**

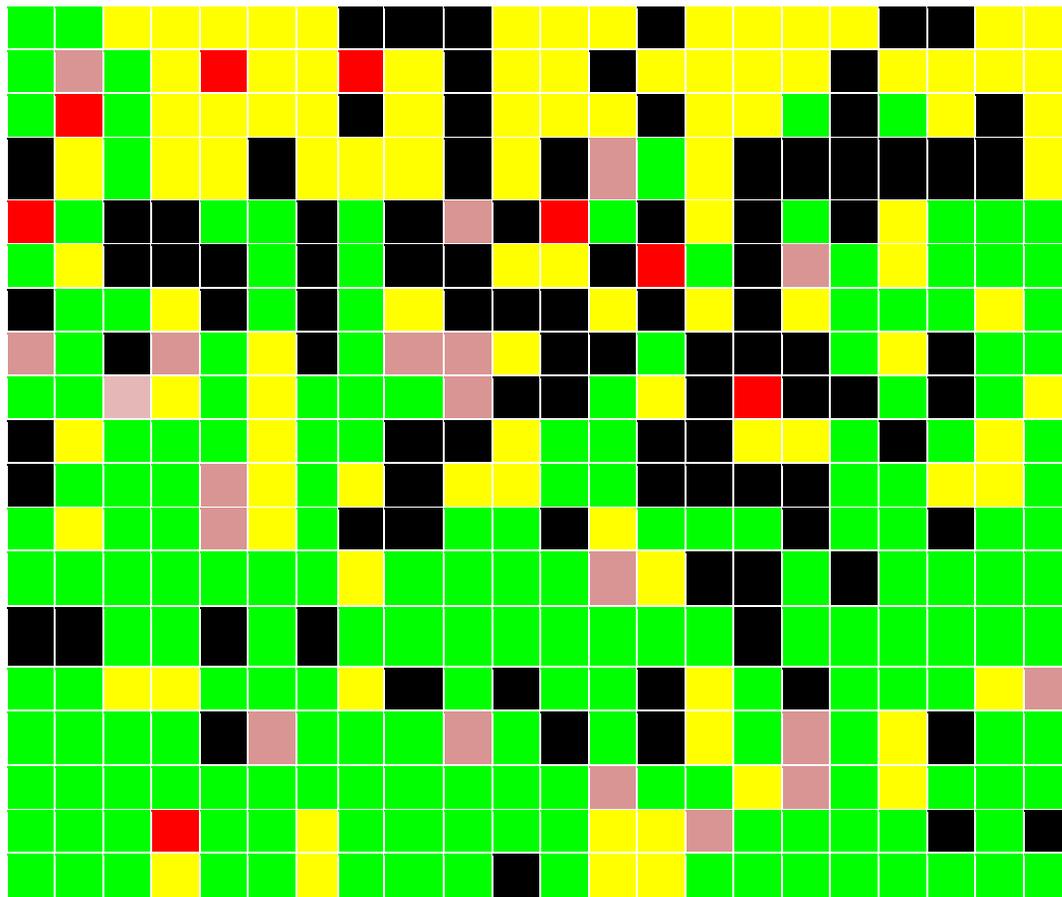
## Annexe E

Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger  
OU1



	Arbres sains	<b>Classe 0</b>	351
	Dépérissement des extrémités des rameaux	<b>Classe 1</b>	33
	Dépérissement partiel	<b>Classe 2</b>	32
	Dépérissement total	<b>Classe 3</b>	33
	Arbres arrachés ou remplacés	<b>Classe 4</b>	66
	Sans plantation		

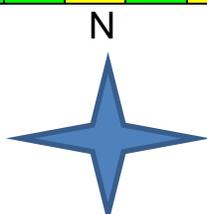
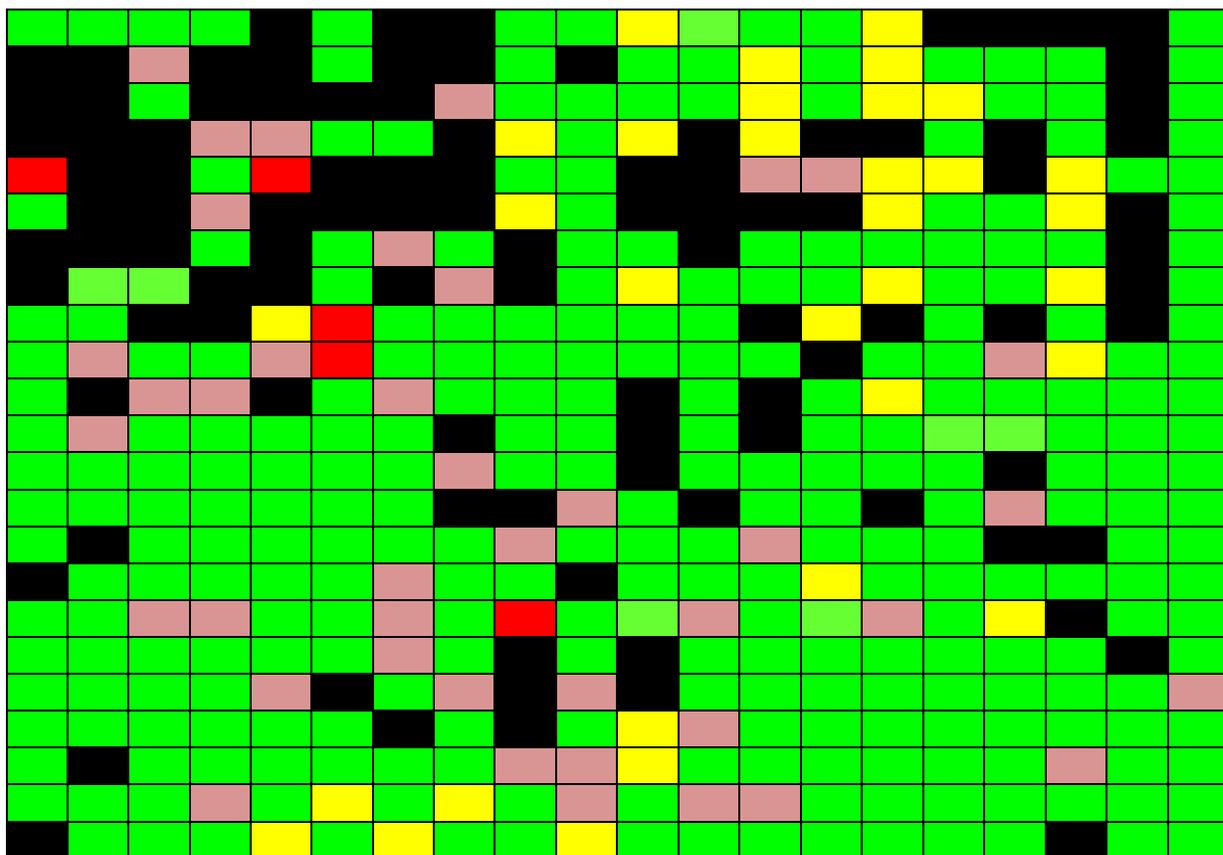
## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger OU4



	Arbres sains
	Dépérissement des extrémités des rameaux
	Dépérissement partiel
	Dépérissement total
	Arbres arrachés ou remplacés

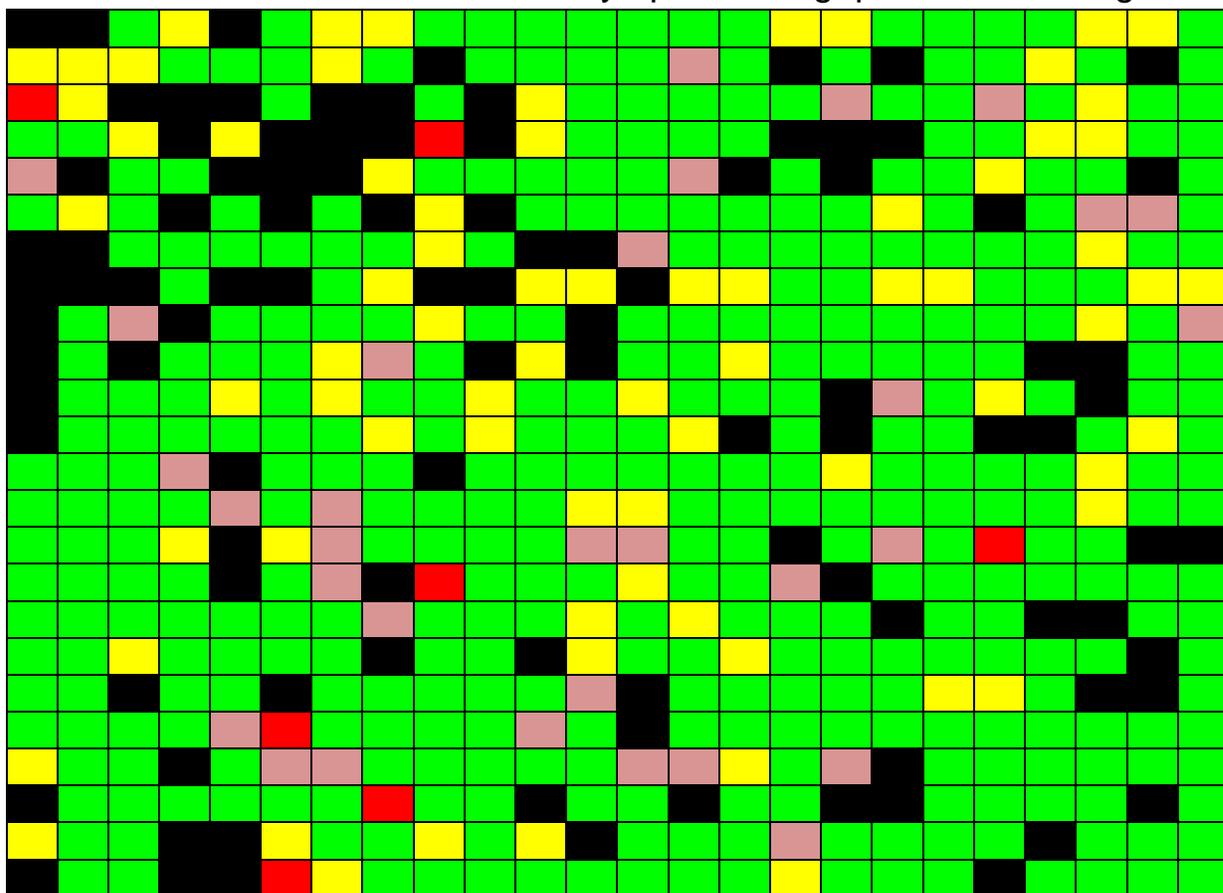
<b>Classe 0</b>	199
<b>Classe 1</b>	103
<b>Classe 2</b>	17
<b>Classe 3</b>	9
<b>Classe 4</b>	90

## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger AF1



	Arbres sains	<b>Classe 0</b>	297
	Dépérissement des extrémités des rameaux	<b>Classe 1</b>	31
	Dépérissement partiel	<b>Classe 2</b>	38
	Dépérissement total	<b>Classe 3</b>	5
	Arbres arrachés ou remplacés	<b>Classe 4</b>	89

## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger LA2



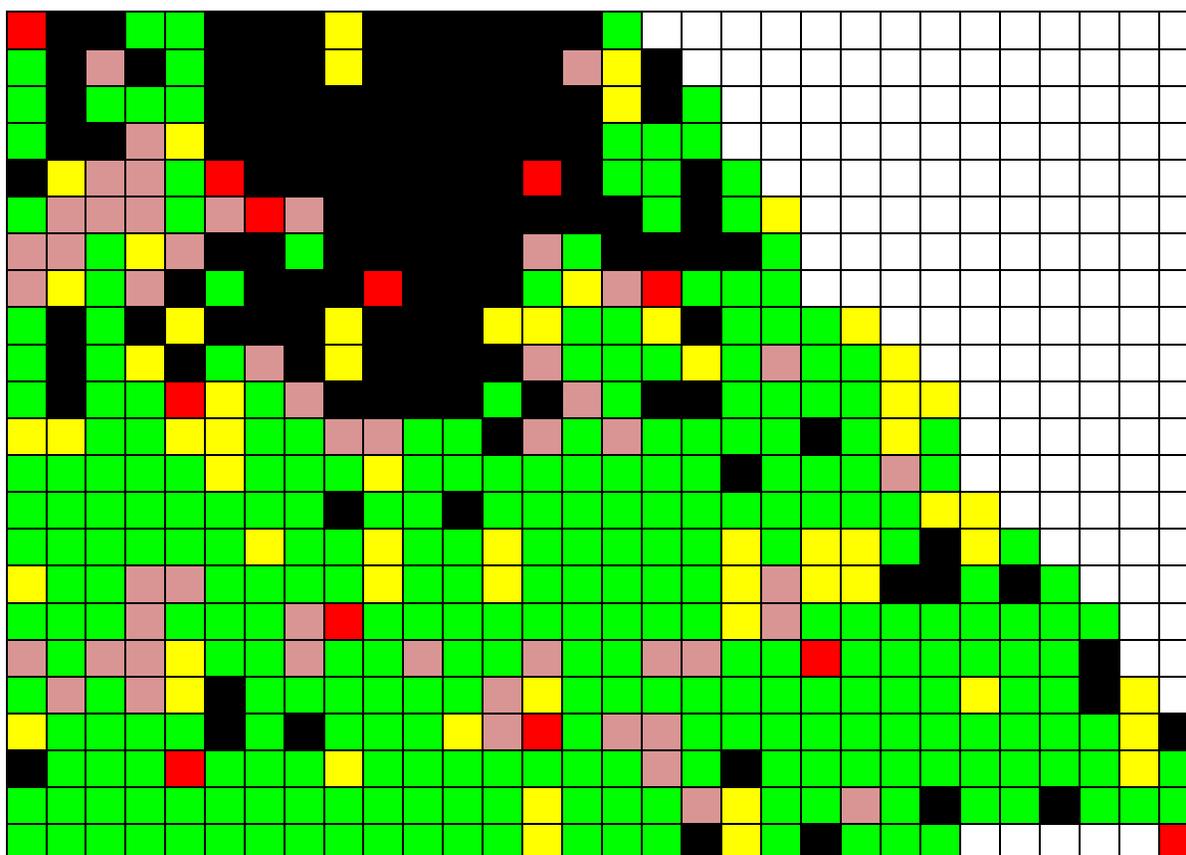
N



Classe 0	427
Classe 1	51
Classe 2	21
Classe 3	6
Classe 4	71

<span style="color: green;">■</span>	Arbres sains
<span style="color: yellow;">■</span>	Dépérissement des extrémités des rameaux
<span style="color: pink;">■</span>	Dépérissement partiel
<span style="color: red;">■</span>	Dépérissement total
<span style="color: black;">■</span>	Arbres arrachés ou remplacés
<span style="color: white;">■</span>	Sans plantation

## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger MO4

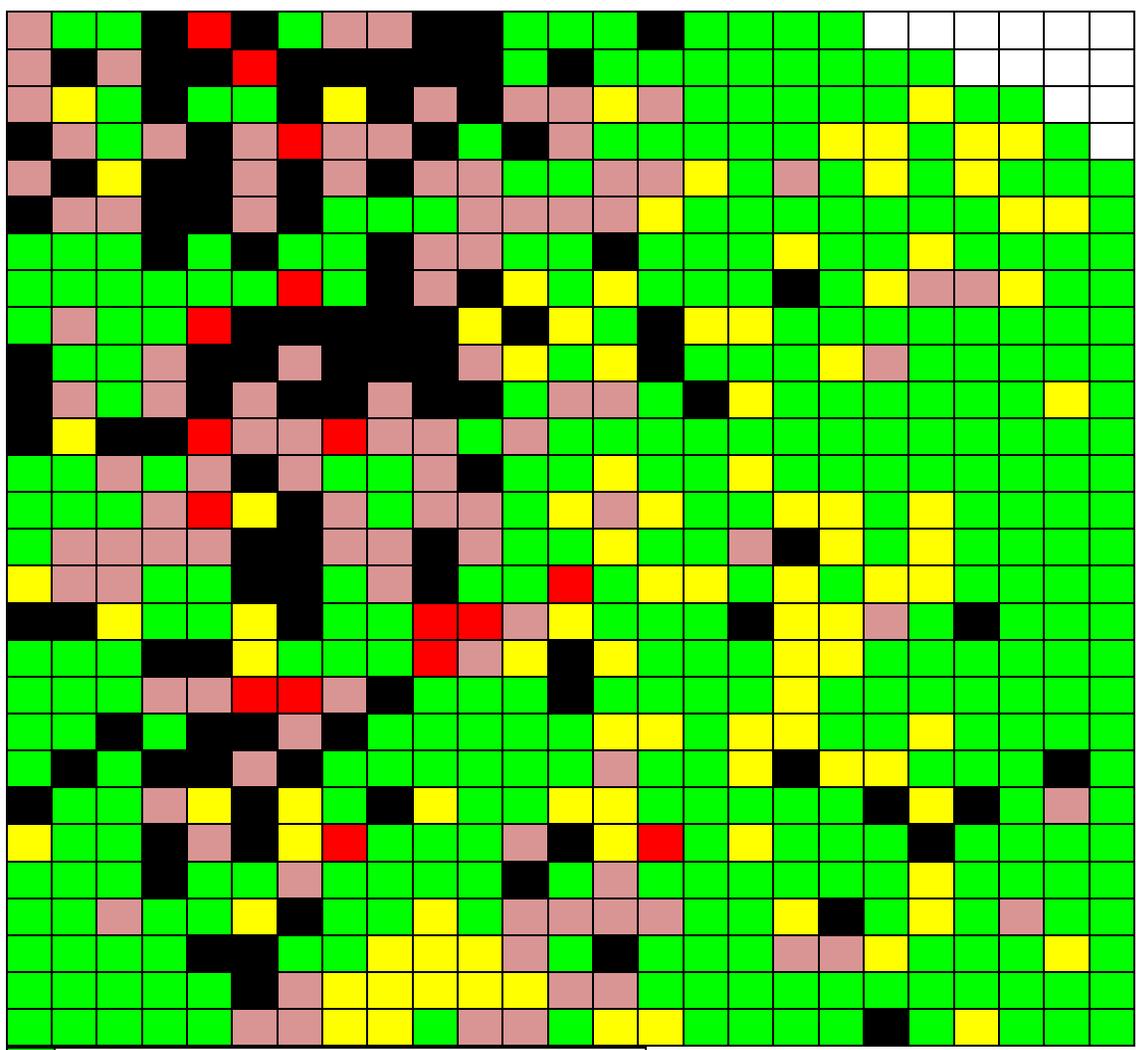


	Arbres sains
	Dépérissement des extrémités des rameaux
	Dépérissement partiel
	Dépérissement total
	Arbres arrachés ou remplacés
	Sans plantation



<b>Classe 0</b>	356
<b>Classe 1</b>	55
<b>Classe 2</b>	42
<b>Classe 3</b>	10
<b>Classe 4</b>	122

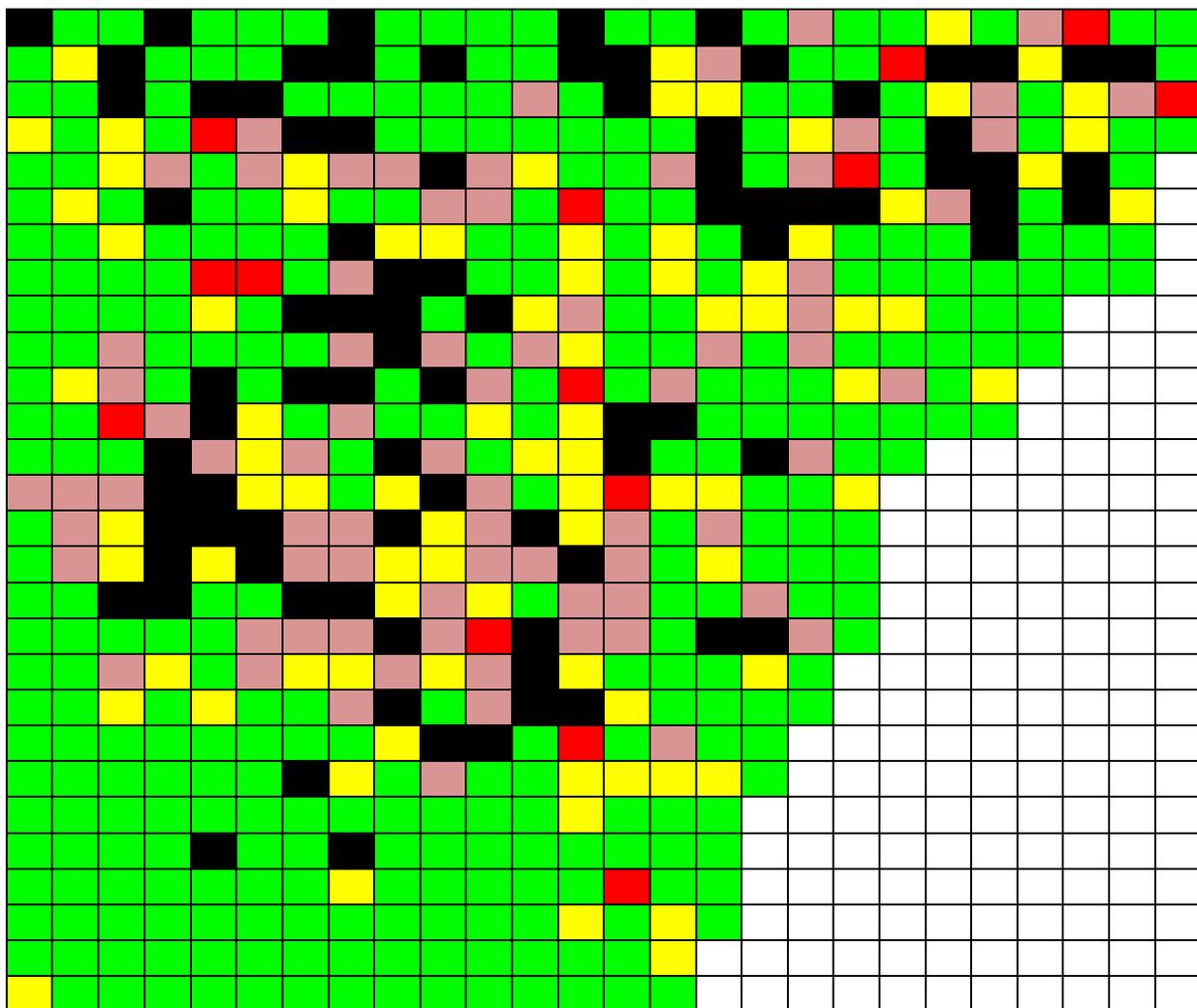
# Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger MO1



	Arbres sains
	Dépérissement des extrémités des rameaux
	Dépérissement partiel
	Dépérissement total
	Arbres arrachés ou remplacés
	Sans plantation

<b>Classe 0</b>	500
<b>Classe 1</b>	110
<b>Classe 2</b>	106
<b>Classe 3</b>	18
<b>Classe 4</b>	128

# Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger BF3

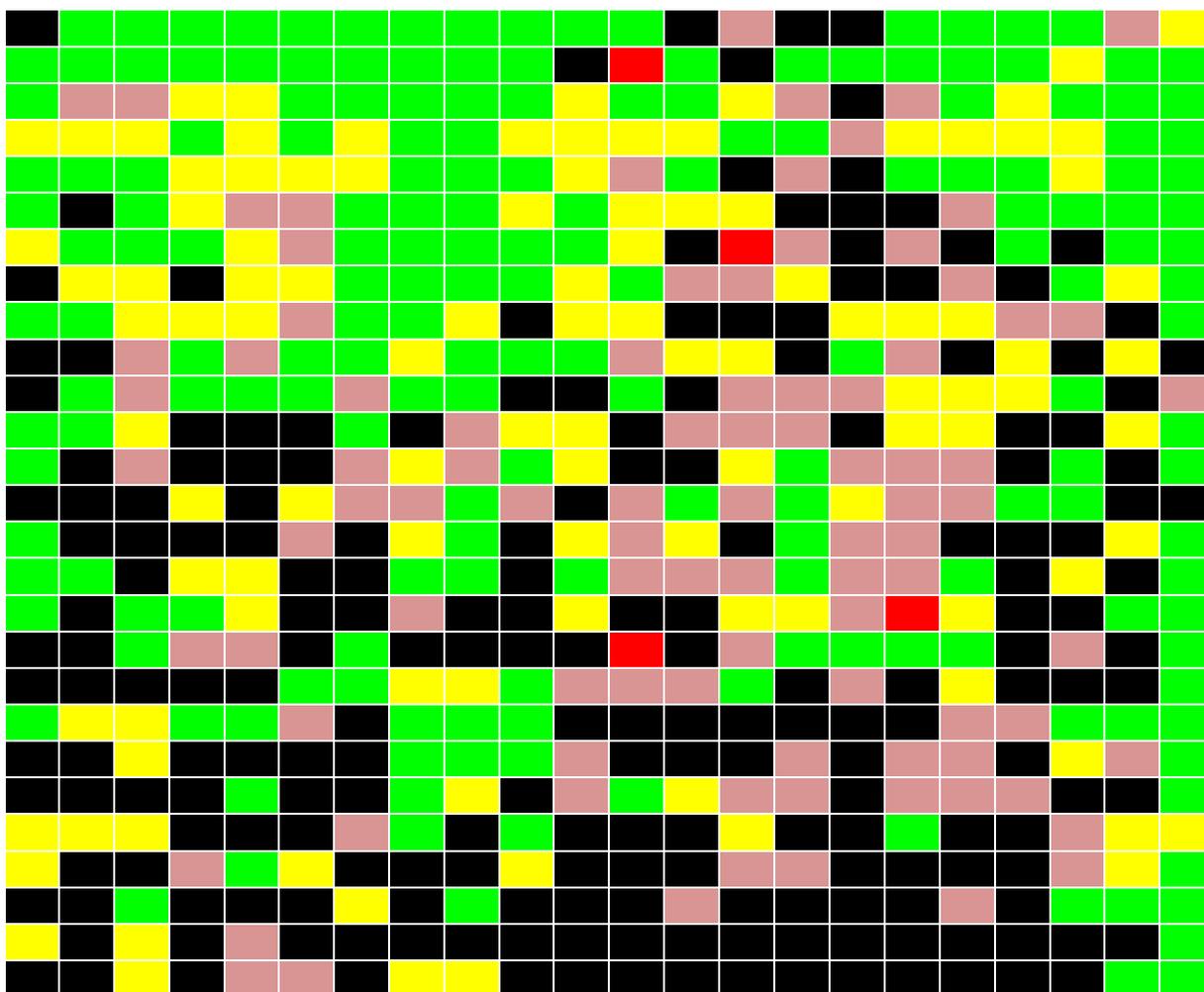


	Arbres sains
	Dépérissement des extrémités des rameaux
	Dépérissement partiel
	Dépérissement total
	Arbres arrachés ou remplacés
	Sans plantation

<b>Classe 0</b>	485
<b>Classe 1</b>	77
<b>Classe 2</b>	54
<b>Classe 3</b>	14
<b>Classe 4</b>	74

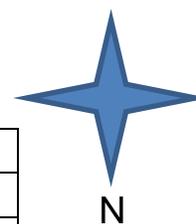


## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger BF2

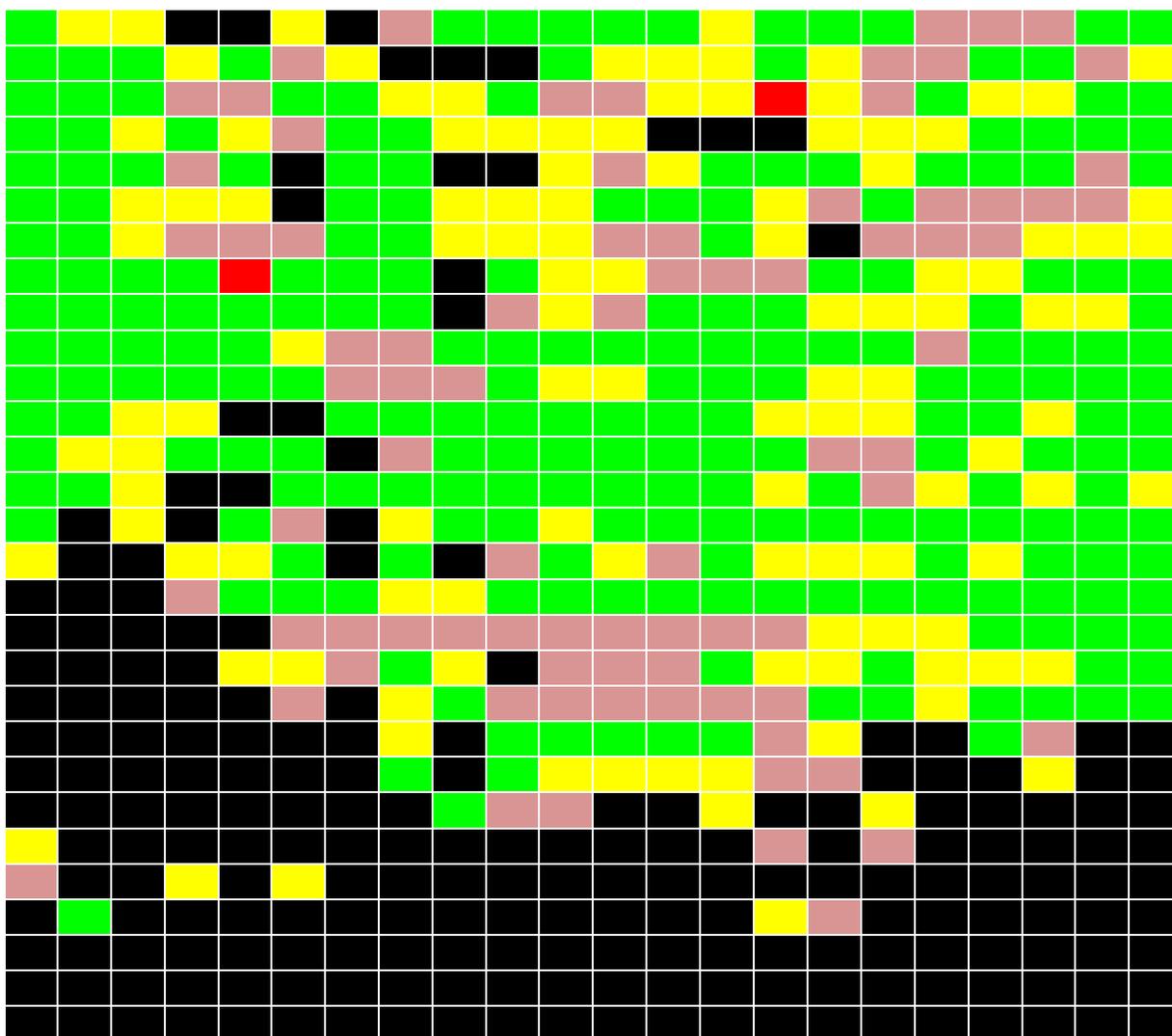


	Arbres sains
	Dépérissement des extrémités des rameaux
	Dépérissement partiel
	Dépérissement total
	Arbres arrachés ou remplacés
	Sans plantation

<b>Classe 0</b>	317
<b>Classe 1</b>	124
<b>Classe 2</b>	87
<b>Classe 3</b>	4
<b>Classe 4</b>	106



## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger LA2

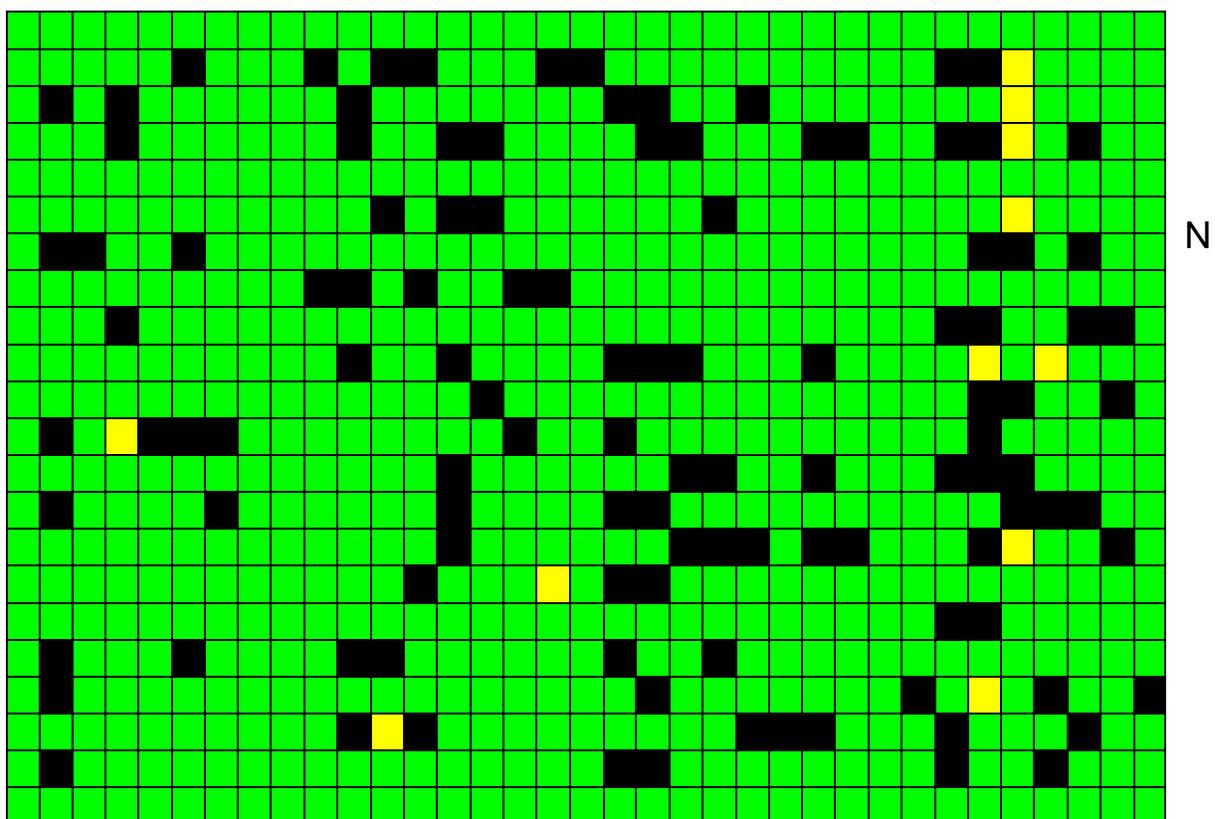


	Arbres sains
	Dépérissement des extrémités des rameaux
	Dépérissement partiel
	Dépérissement total
	Arbres arrachés ou remplacés
	Sans plantation

<b>Classe 0</b>	255 Arbres
<b>Classe 1</b>	107
<b>Classe 2</b>	73
<b>Classe 3</b>	2
<b>Classe 4</b>	201



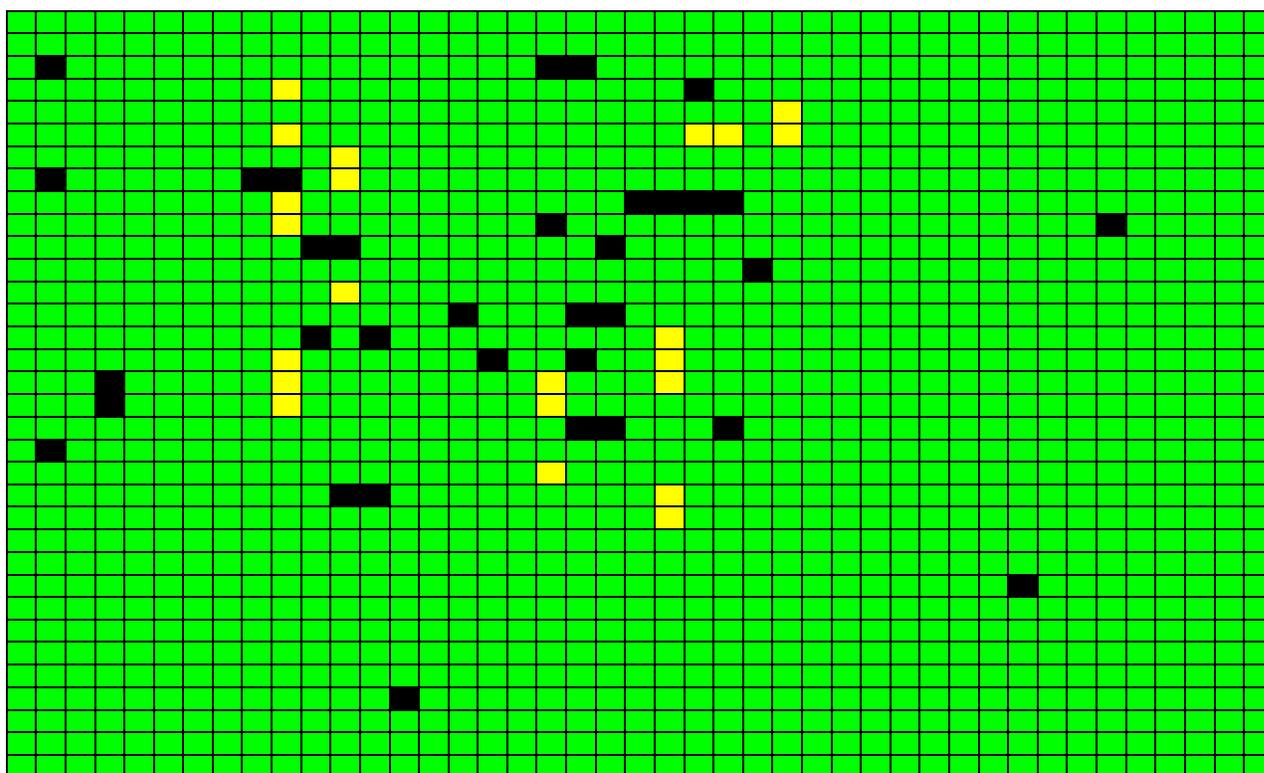
## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger MO2



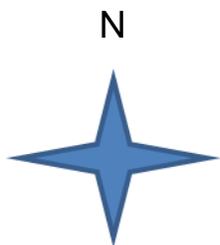
	Arbres sains	<b>Classe 0</b>	644
	Dépérissement des extrémités des rameaux	<b>Classe 1</b>	12
	Dépérissement partiel	<b>Classe 2</b>	0
	Dépérissement total	<b>Classe 3</b>	0
	Arbres arrachés ou remplacés	<b>Classe 4</b>	114
	Sans plantation		



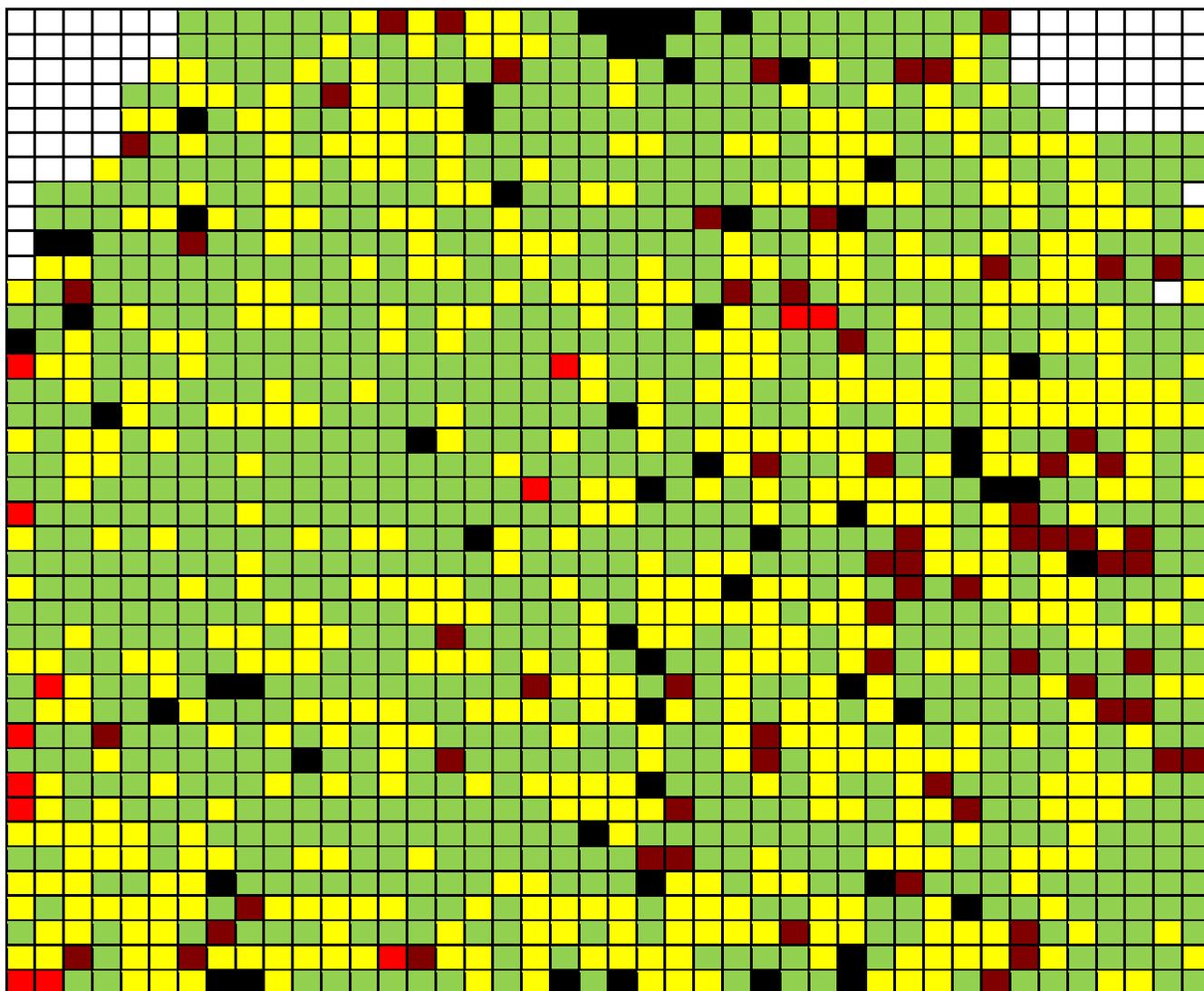
## Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger AF3



	Arbres sains	<b>Classe 0</b>	1621
	Dépérissement des extrémités des rameaux	<b>Classe 1</b>	22
	Dépérissement partiel	<b>Classe 2</b>	0
	Dépérissement total	<b>Classe 3</b>	0
	Arbres arrachés ou remplacés	<b>Classe 4</b>	34
	Sans plantation		



# Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger BF1

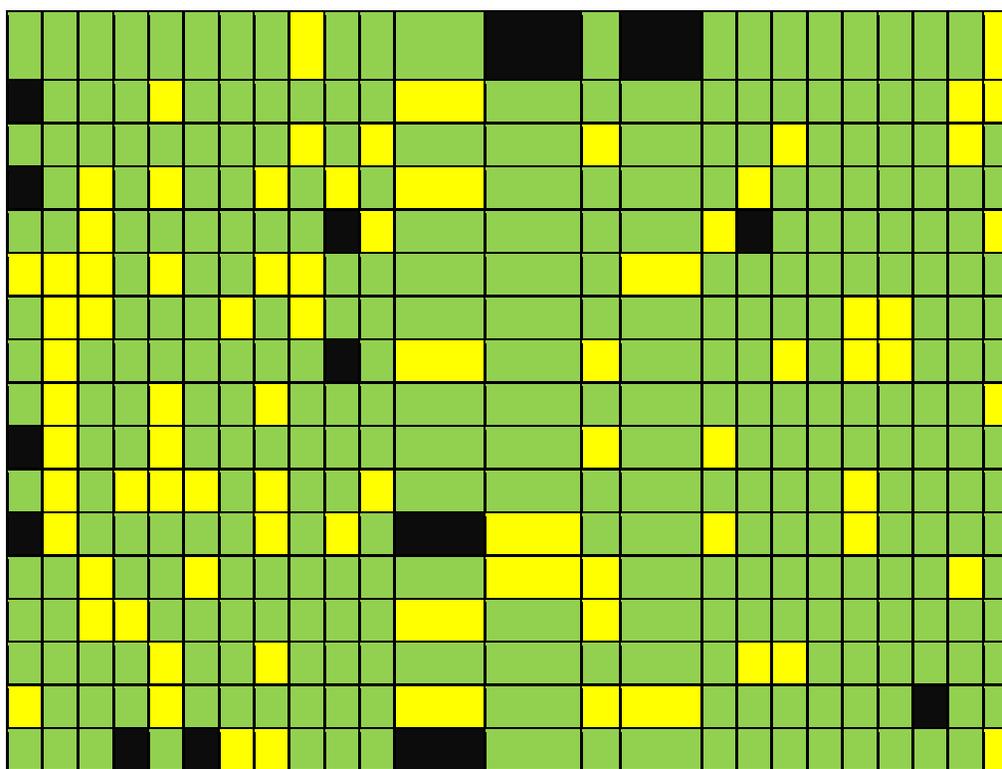


Classe 0	1035
Classe 1	685
Classe 2	80
Classe 3	5
Classe 4	30



N

Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le verger LA4



Classe 0	311
Classe 1	81
Classe 2	0
Classe 3	0
Classe 4	14



N

## Annexe F

### Liste des isolats de Botryosphaeriaceés utilisés dans le teste de pathogénicité

isolats	identité	hôte
ACR52	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR27	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR59F	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR561	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR44F	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR27F	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR5F	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
ACR5	<i>Botryosphaeria dothidae</i>	Citrus
MC9	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Citrus
TM4	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Citrus
BC5	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Citrus
AC9	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Citrus
OC	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Citrus
TME7	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME8	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME8F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME9	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME331F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME332F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME45F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME46F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME3F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
TME54F	<i>Dilopdia pseudo seriata</i>	Citrus
LE3F	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE3	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE7	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE8	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE8F	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE9	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE1	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE1F	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE45	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE46	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus
LE54	<i>Dilopdia seriata</i>	Citrus

## Annexe G

### Taux d'infection, gravité et incidence dans la région d'El-Afroun

VERGER	Vaiété	Années	Taux d'infection %	Gravité (classe moyenne)	Taux d'incidence %
<b>AF1</b>	thomson	2020	17,56	1,96	8,60
	thomson	2019	14,16	1,77	6,27
	thomson	2018	9,32	1,50	3,49
	thomson	2017	8,42	1,17	2,46
<b>AF2</b>	thomson	2020	22,48	1,14	6,41
	thomson	2019	15,13	1,21	4,57
	thomson	2018	9,87	1,19	2,94
	thomson	2017	6,30	<b><u>1,07</u></b>	1,68
<b>AF3</b>	thomson	2020	<b><u>1,43</u></b>	2,42	0,45
	thomson	2019	1,55	2,27	0,94
	thomson	2018	2,21	2,27	1,25
	thomson	2017	1,31	1,86	<b><u>0,61</u></b>
<b>AF4</b>	clementine	2020	22,34	1,80	10,03
	clementine	2019	<b><u>26,57</u></b>	<b><u>2,43</u></b>	<b><u>16,16</u></b>
	clementine	2018	14,21	1,64	5,84
	clementine	2017	8,63	1,75	3,76
<b>AF5</b>	clementine	2020	11,30	1,65	4,66
	clementine	2019	10,19	2,18	5,56
	clementine	2018	5,22	1,67	2,17
	clementine	2017	4,84	1,46	1,77
<b>total</b>			10,65	1,72	4,48

### Taux d'infection, gravité et incidence dans la région de Mouzaia

Verger	Vaeiété	Années	Taux d'infection %	Gravité (classe moyenne)	Taux d'incidence %
<b>MO1</b>	thomson	2020	<b><u>48,71</u></b>	2,37	<b><u>28,80</u></b>
	thomson	2019	43,28	2,32	25,13
	thomson	2018	25,86	2,48	16,05
	thomson	2017	34,90	2,57	22,39
<b>MO2</b>	thomson	2020	1,58	1,00	0,40
	thomson	2019	8,05	2,31	4,65
	thomson	2018	14,64	2,94	10,75
	thomson	2017	24,01	3,00	18,01
<b>MO3</b>	thomson	2020	<b><u>1,52</u></b>	<b><u>1,00</u></b>	<b><u>0,38</u></b>
	thomson	2019	3,89	2,22	2,16
	thomson	2018	9,64	1,42	3,43
	thomson	2017	5,75	<b><u>2,65</u></b>	3,81
<b>MO4</b>	clementine	2020	30,10	2,15	16,15
	clementine	2019	27,71	1,98	13,75
	clementine	2018	24,90	2,07	12,89
	clementine	2017	22,81	2,10	11,95
<b>MO5</b>	clementine	2020	36,05	2,55	22,96
	clementine	2019	28,57	2,37	16,90
	clementine	2018	23,27	2,26	13,16
	clementine	2017	23,67	2,23	13,20
total			21,95	2,20	12,85

### Taux d'infection, gravité et incidence dans la région d'Oued elaleug

Verger	Vaeiété	Années	Taux d'infection %	Gravité (classe moyenne)	Taux d'incidence %
OU1	thomson	2020	47,00	2,65	31,15
	thomson	2019	37,10	2,43	22,53
	thomson	2018	25,67	2,11	13,52
	thomson	2017	23,24	<b>1,59</b>	9,24
OU2	thomson	2020	29,31	1,65	12,11
	thomson	2019	<b>55,17</b>	2,55	<b>35,21</b>
	thomson	2018	23,59	1,47	<b>8,64</b>
	thomson	2017	22,41	1,49	8,37
OU3	thomson	2020	19,25	2,14	10,28
	thomson	2019	43,51	2,62	28,53
	thomson	2018	36,33	2,38	21,61
	thomson	2017	33,71	2,30	19,42
OU4	clementine	2020	38,65	2,43	23,49
	clementine	2019	32,61	2,78	22,69
	clementine	2018	22,61	2,55	14,41
	clementine	2017	<b>19,15</b>	2,05	9,81
OU5	clementine	2020	33,18	2,14	17,72
	clementine	2019	42,38	<b>2,79</b>	29,52
	clementine	2018	28,66	2,51	17,95
	clementine	2017	19,91	2,36	11,76
total			31,67	2,25	18,40

### Taux d'infection, gravité et incidence dans la région de Boufarik

Verger	Vaeiété	Années	Taux d'infection %	Gravité (classe moyenne)	Taux d'incidence %
<b>BF1</b>	thomson	2020	42,20	1,42	14,97
	thomson	2019	26,84	1,40	9,42
	thomson	2018	31,01	1,42	11,02
	thomson	2017	25,42	1,56	9,91
<b>BF2</b>	thomson	2020	42,39	1,47	15,53
	thomson	2019	37,20	1,19	11,03
	thomson	2018	32,35	1,19	9,60
	thomson	2017	28,89	1,31	9,47
<b>BF3</b>	thomson	2020	<b><u>62,23</u></b>	<b><u>1,76</u></b>	<b><u>27,40</u></b>
	thomson	2019	55,01	1,75	24,01
	thomson	2018	53,37	1,64	21,92
	thomson	2017	45,89	1,62	18,53
<b>BF4</b>	clementine	2020	42,77	1,18	12,59
	clementine	2019	33,58	<b><u>1,01</u></b>	8,52
	clementine	2018	23,90	1,04	6,22
	clementine	2017	25,00	1,10	6,86
<b>BF5</b>	clementine	2020	25,85	1,64	10,59
	clementine	2019	21,53	1,30	7,00
	clementine	2018	19,36	1,17	5,67
	clementine	2017	<b><u>15,60</u></b>	1,12	<b><u>4,38</u></b>
Total			34,52	1,36	12,23
Total			34,52	1,36	12,23

## Taux d'infection, gravité et incidence dans la région de Laraba

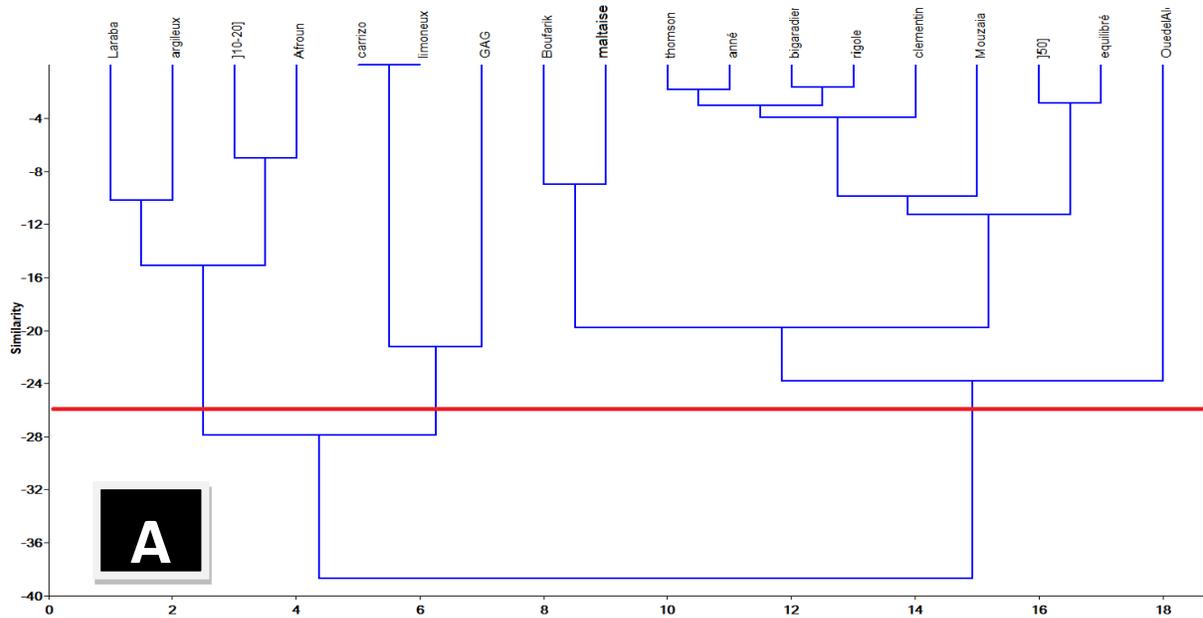
Verger	Variété	Années	Taux d'infection %	Gravité (classe moyenne)	Taux d'incidence %
LA1	thomson	2020	30,05	<b><u>2,16</u></b>	<b><u>16,21</u></b>
	thomson	2019	15,82	1,17	4,64
	thomson	2018	13,09	1,12	3,67
	thomson	2017	10,98	1,06	2,90
LA 2	thomson	2020	21,85	2,40	13,11
	thomson	2019	13,88	1,87	6,49
	thomson	2018	9,77	1,87	4,56
	thomson	2017	10,80	1,60	4,31
LA 3	thomson	2020	31,48	1,31	10,33
	thomson	2019	25,52	1,06	6,77
	thomson	2018	18,13	1,06	4,83
	thomson	2017	19,43	1,03	4,99
LA 4	clementine	2020	<b><u>35,72</u></b>	1,05	9,42
	clementine	2019	20,86	<b><u>1,00</u></b>	5,22
	clementine	2018	18,64	1,01	4,73
	clementine	2017	17,99	1,01	4,56
LA 5	clementine	2020	10,15	1,28	3,24
	clémentine	2019	<b><u>8,97</u></b>	1,03	2,32
	clémentine	2018	9,56	1,09	2,61
	clémentine	2017	9,41	1,02	<b><u>2,39</u></b>
total			17,61	1,31	5,86
total			17,61	1,31	5,86

Taux d'infection, gravité et incidence dans les différentes régions de la wilaya Blida

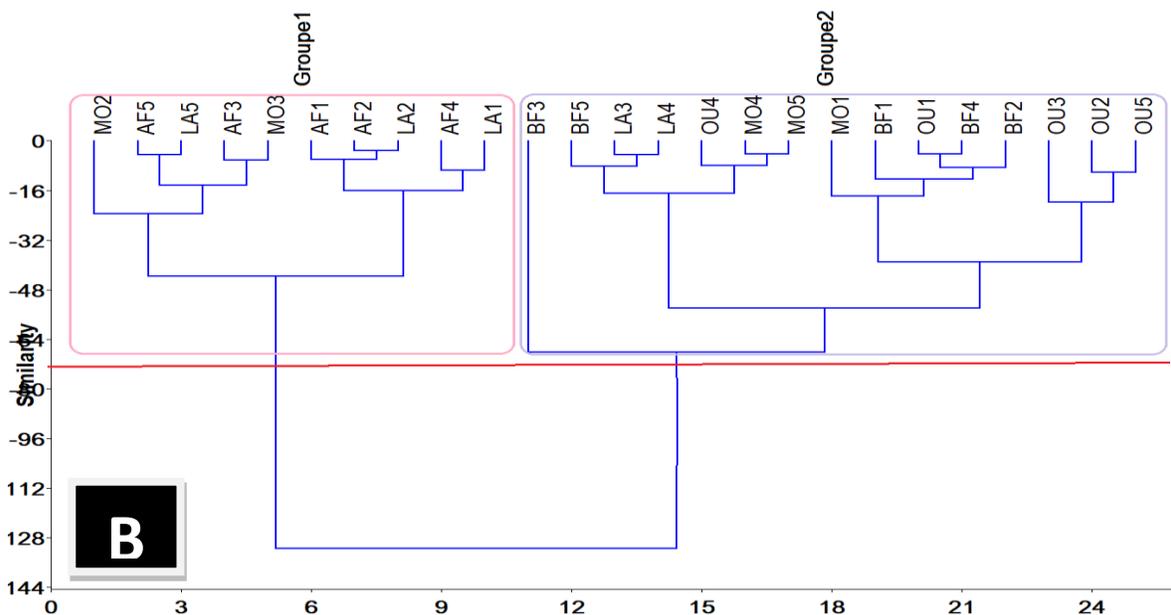
	verger	inf1	inf2	inf3	inf4	gra1	gra2	gra3	gra4	inc1	inc2	inc3	inc4
afroune	AF1	8,42	9,32	14,16	17,56	1,17	1,50	1,77	1,96	2,46	3,49	6,27	8,60
	AF2	6,3	9,87	15,13	22,48	1,07	1,19	1,21	1,14	1,68	2,94	4,57	6,41
	AF3	1,31	2,21	1,55	1,43	1,86	2,27	2,27	2,42	0,61	1,25	0,94	0,45
	AF4	8,63	14,21	26,57	22,34	1,75	1,64	2,43	1,80	3,76	5,84	16,16	10,03
	AF5	4,84	5,22	10,19	11,30	1,46	1,67	2,18	1,65	1,77	2,17	5,56	4,66
mouzaia	MO1	34,90	25,86	43,28	48,71	2,57	2,48	2,32	2,37	22,39	16,05	25,13	28,80
	MO2	24,01	14,64	8,05	1,58	3,00	2,94	2,31	1,00	18,01	10,75	4,65	0,40
	MO3	5,75	9,64	3,89	1,52	2,65	1,42	2,22	1,00	3,81	3,43	2,16	0,38
	MO4	22,81	24,90	27,71	30,10	2,10	2,07	1,98	2,15	11,95	12,89	13,75	16,15
	MO5	23,67	23,27	28,57	36,05	2,23	2,26	2,37	2,55	13,20	13,16	16,90	22,96
oued elalleug	OU1	23,24	25,67	37,10	47,00	1,59	2,11	2,43	2,65	9,24	13,52	22,53	31,15
	OU2	22,41	23,59	55,17	29,31	1,49	1,47	2,55	1,65	8,37	8,64	35,21	12,11
	OU3	33,71	36,33	43,51	19,25	2,30	2,38	2,62	2,14	19,42	21,61	28,53	10,28
	OU4	19,15	22,61	32,61	38,65	2,05	2,55	2,78	2,43	9,81	14,41	22,69	23,49
	OU5	19,91	28,66	42,38	33,18	2,36	2,51	2,79	2,14	11,76	17,95	29,52	17,72
boufarik	BF1	25,42	31,01	26,84	42,20	1,56	1,42	1,40	1,42	9,91	11,02	9,42	14,97
	BF2	28,89	32,35	37,20	42,39	1,31	1,19	1,19	1,47	9,47	9,60	11,03	15,53
	BF3	45,89	53,37	55,01	62,23	1,62	1,64	1,75	1,76	18,53	21,92	24,01	27,40
	BF4	25,00	23,90	33,58	42,77	1,10	1,04	1,01	1,18	6,86	6,22	8,52	12,59
	BF5	15,60	19,36	21,53	25,85	1,12	1,17	1,30	1,64	4,38	5,67	7,00	10,59
larabaa	LA1	10,98	13,09	15,82	30,05	1,06	1,12	1,17	2,16	2,90	3,67	4,64	16,21
	LA2	10,80	9,77	13,88	21,85	1,60	1,87	1,87	2,40	4,31	4,56	6,49	13,11
	LA3	19,43	18,13	25,52	31,48	1,03	1,06	1,06	1,31	4,99	4,83	6,77	10,33
	LA4	17,99	18,64	20,86	35,72	1,01	1,01	1,00	1,05	4,56	4,73	5,22	9,42
	LA5	9,41	9,56	8,97	10,15	1,02	1,09	1,03	1,28	2,39	2,61	2,32	3,24

## Annexe H

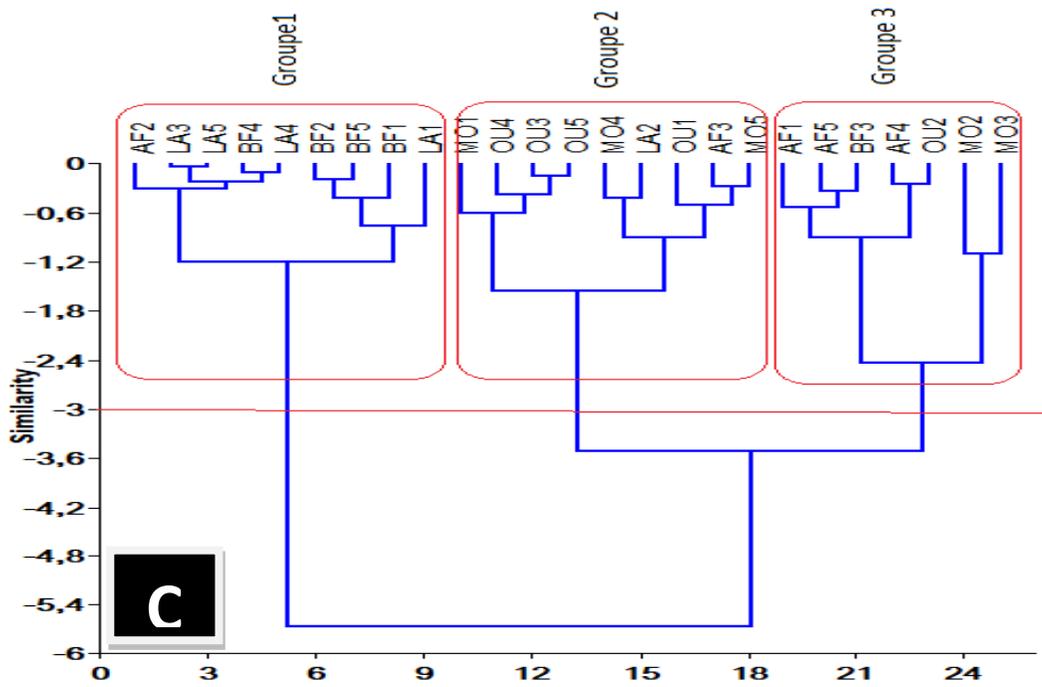
### Classification ascendante hiérarchique (CHA) des indices épidémiologiques



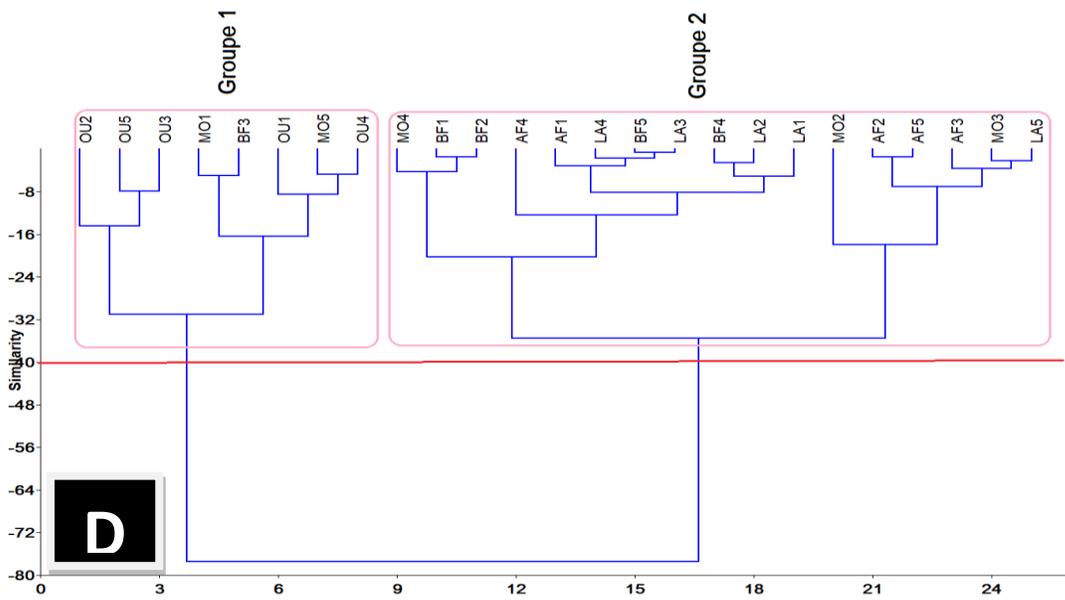
**A** : l'influence des facteurs étudiés sur les indices épidémiologiques



**B** : taux d'infection



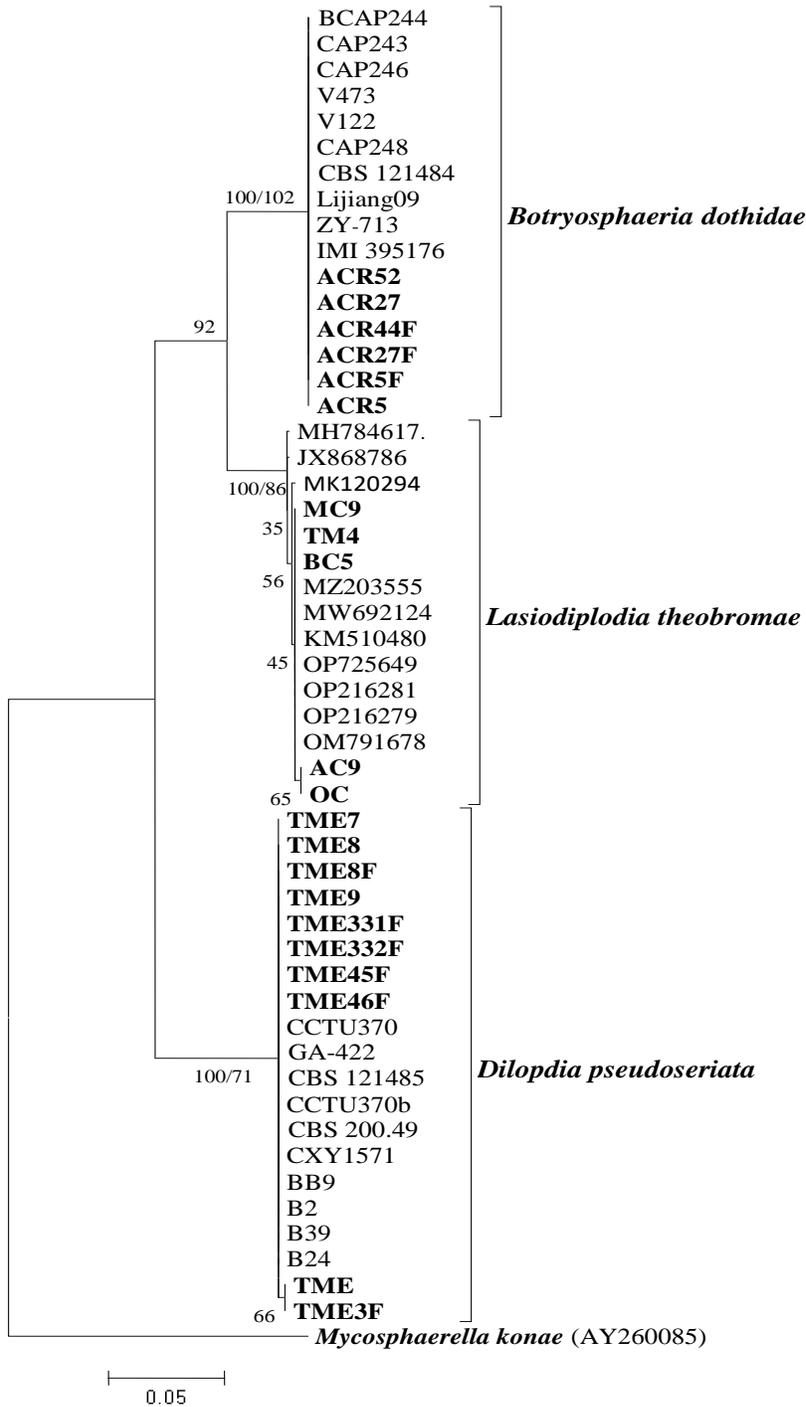
**C : indice de gravité**



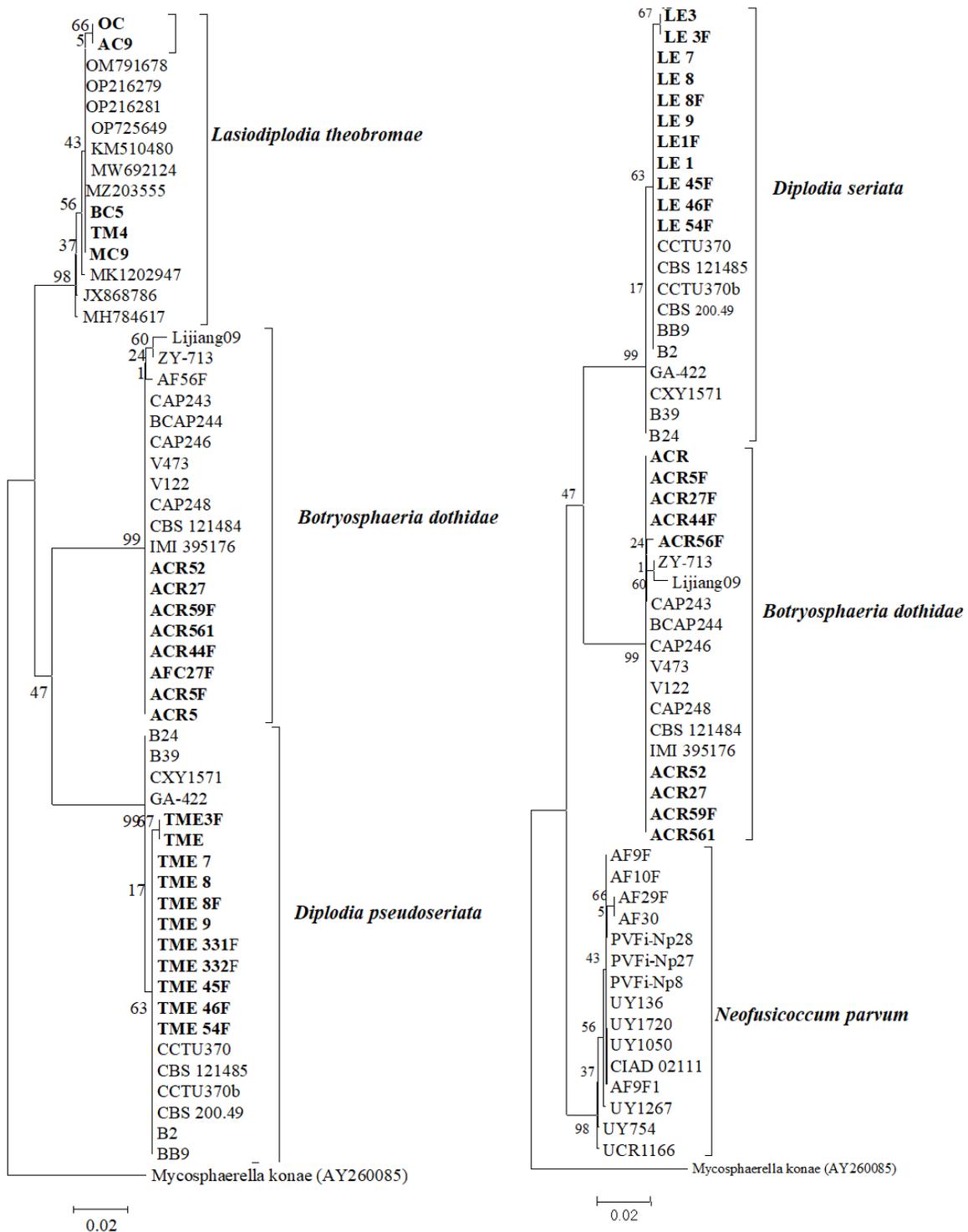
**D : taux d'incidence**

# Annexe I

Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADN comparé avec le gène d'élongation et les séquences ITS



**Figure 3.24 :** Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADN comparé avec ITS montrant les relations entre les souches obtenues et les souches des espèces les plus proche du genre *Diplodia*, *Lasiodiplodia* et *Botryosphaeria*. Les isolats obtenus dans cette étude sont indiqués en gras. Le nombre figurant au niveau des nœuds indique les valeurs de *bootstrap*. Les barres indiquent les distances de substitution par position de nucléotide.



Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADN comparé avec le gène d'élongation (Alpha élongation factor ( $\alpha$  e-f)) montrant les relations entre les souches obtenues et les souches des espèces les plus proche du genre *Diplodia*, *Lasiodiplodia* et *Botryosphaeria*. Les isolats obtenus dans cette étude sont indiqués en gras. Le nombre figurant au niveau des nœuds indique les valeurs de *bootstrap*. Les barres indiquent les distances de substitution par position de nucléotide.



**REGULAR ARTICLE**

## Incidence and epidemiology of wood disease in Algerian citrus orchards

Mohammed Benzohra\*, Faiza Ammad, Messaoud Benchabane

*Laboratoire de recherche sur la protection et la valorisation des produits agrobiologiques, Département de biotechnologie  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université' de Blida1, BP 270, 09000 Blida, Algeria*

### ARTICLE INFO

*Article History:*

Received: 23 Apr 2022

Revised: 13 Jun 2022

Accepted: 15 Jun 2022

*\*Corresponding Author:*

Email:

[mohamedbenzohra@gmail.com](mailto:mohamedbenzohra@gmail.com)

Telephone: +213-0770893739

*Keywords:* Algeria, Botryosphaeriaceae, citrus, epidemiology and wood diseases

### ABSTRACT

The wood diseases are very damaging to the culture of citrus and many hosts around the world. It is considered as a complex pathosystem that requires the analysis of its various aspects. In this context, we conducted epidemiological and etiological studies. Our studies were conducted for four consecutive years (2017-2020) on 25 orchards from five localities in Algeria. The results of symptom diagnosis showed the presence of different categories of symptoms; these are the total and/or partial dieback. The examination of the cross-sections of infected wood showed the presence of different forms of inner necrosis. The isolations from the necrotic tissues of the infected trees put often in evidence the presence of a diversified fungal flora dominated by Botryosphaeriaceae fungi. We also recorded an overall infection rate of 23.28% representing a severity index of 1.77 on a scale of four degrees, giving an incidence of 10.76%. The overall assessment of the dieback situation in the studied orchards showed a rapid increase in all epidemiological indices. The statistical analyzes showed that the factors region, age, rootstock, type of irrigation and soil texture had a highly significant effect on the variation of epidemiological parameters. However, the factor year is only moderately significant. On the other hand, the factor cultivar, has no significant effect on these indices. The epidemiological behavior of dieback in these orchards confirms that the spread of the disease is favored by cultural techniques such as irrigation and pruning.

### 1. Introduction

Citrus is considered one of the three most important strategic fruit crops in the world and is the largest fruit group in international trade with a world production of over 123 million tonnes in 2020 (FAO, 2020). Citrus is one of the most popular fruits grown in Algeria. Moreover, citrus production is an important agricultural and economic activity in the country. Oranges and

mandarins are traditionally produced for local consumption and for export. A large part of the Algerian citrus orchards are located in the Mitidja plain, which is known for its agricultural vocation; the wilaya of Blida, with an area of more than 17429 ha, ensures a production of 4400159 quintals and represents the largest part of this plain (MADR, 2015). Currently, the reality is quite different, as Algerian citrus cultivation is facing various problems related to technical and

phytosanitary obstacles. In recent years, cases of citrus dieback have occurred in all citrus orchards in the Mitidja region, at first sporadically, but then with increasing frequency and concern. This dieback causes very worrying economic losses. The first symptoms observed are browning of the inner wood, wilting and death of twigs and branches in different citrus varieties; in many cases, the dieback is sectorial. These citrus dieback diseases have been reported since early 2000 (Benchabane et al., 2008). The studies carried out in Algeria on the states of citrus dieback in the Mitidja showed a worrying epidemic evolution in some orchards, where the mortality rate reached 5 to 10%. Massive uprooting occurred in some localities of these regions; even a change of agricultural vocation was carried out, replacing citrus orchards with other crops after the failure of measures to replace the dead trees. Isolates obtained from infected trees put often in evidence the presence of a diverse fungal flora. The occurrence of these species depends on various conditions, such as orchard management, cultivars, rootstocks, plant age, and pedoclimatic conditions (Benchabane et al., 2008; Benzohra et al., 2010; Lamine et al., 2011; Berraf-Tebbal et al., 2020). The impact of dieback on citrus has not been extensively explored. Thus, it is highly likely that the diversity and the epidemiology of these fungi on citrus in Algeria is not well understood and, moreover, is causing more damage than previously thought. In this context, we conducted epidemiological and etiological studies. Our studies were conducted in 25 orchards for four consecutive years (2017-2020). The objectives of this study were (i) to describe the

related symptoms and to locate the affected objects, (ii) to evaluate the damage caused by dieback and express the rate of decline compared to the total number of trees, and (iii) to isolate and identify fungi associated with citrus dieback.

## 2. Materials and Methods

Our epidemiological follow-up was conducted between 2017 and 2020 during the fall to spring period when the disease was well established. Field surveys were conducted in the following regions of Blida Province (Algeria): El Afroun, Mouzaia, Oued El-Alleug, Boufarik and Larabaa (Fig 1). Five orchards were visited in each region; several plantations were evaluated with a total area of 80 ha. A total of 25544 plants (Table 1) were visually inspected for symptoms of dieback. The regions, citrus species, rootstock, age of planting, type of irrigation, and soil texture are provided in Table 1. All orchards were planted in north-south oriented rows in a plane area. Cultivation practices were the same in all orchards: light plowing in spring and summer, irrigation with 6 to 8 irrigations through a canal system, except in orchards 2 and 3 in the Mouzaia region, which were drip irrigated, application of basic fertilizer (0, 20, 25) at a rate of 6 quintals/hectare and surface fertilizer 46% urea in three rates, and pruning at the end of harvest.

The province of Blida is located about 30 km from the sea and has a typical Mediterranean climate, i.e. mild and relatively rainy winters with dry and hot summers that are very windy. During the survey period (2017-2020), the average annual rainfall was 695 mm, of which 165 mm fell in

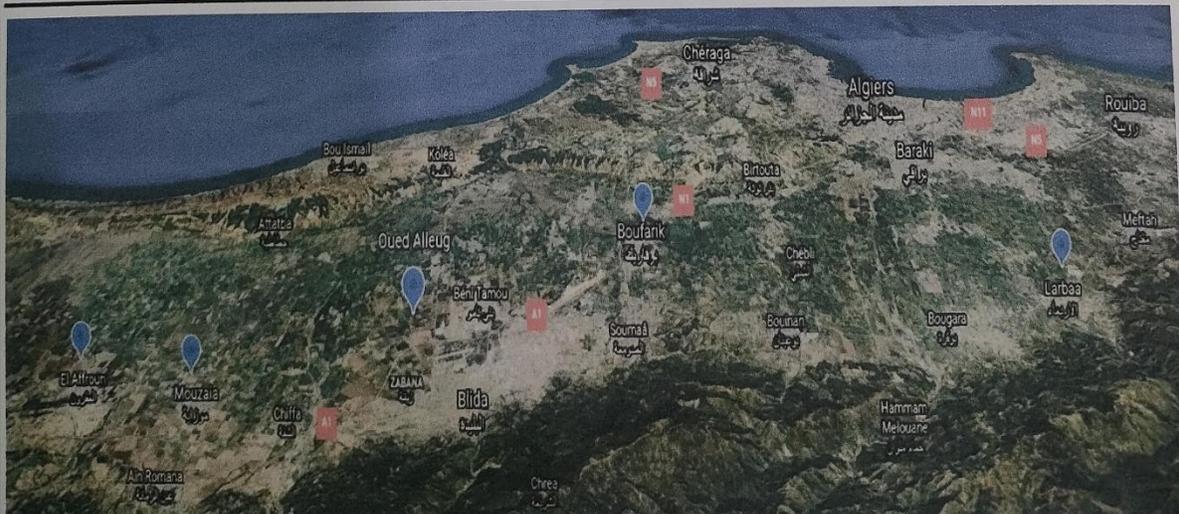


Figure 1: Map indicating the regions where field surveys and sampling were conducted. [www.google-earth.com](http://www.google-earth.com) (November 2021)

Regions	Orchards	Cultivar	Age	Rootstock	Irrigation system	Soil texture
Afroun	AF1	Citrus sinensis	20	Sour orange	channal	clay
	AF2	Citrus sinensis	20	Sour orange	channal	clay
	AF3	Citrus sinensis	20	Citrange Carrizo	channal	sandy laom
	AF4	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	clay
	AF5	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	clay
Mouzaia	MO1	Citrus sinensis	50	Sour orange	channal	clay
	MO2	Citrus sinensis	20	Sour orange	drip	clay
	MO3	Citrus sinensis	20	Sour orange	drip	clay
	MO4	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	clay
	MO5	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	clay
Oued ElAlleug	OU1	Citrus sinensis	50	Sour orange	channal	balanced
	OU2	Citrus sinensis	50	Sour orange	channal	balanced
	OU3	Citrus sinensis	50	Sour orange	channal	balanced
	OU4	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	balanced
	OU5	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	balanced
Boufarik	BF1	Citrus sinensis maltaise	50	Sour orange	channal	balanced
	BF2	Citrus sinensis	50	Sour orange	channal	balanced
	BF3	Citrus sinensis	50	Sour orange	channal	balanced
	BF4	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	balanced
	BF5	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	balanced
Larabaa	LA1	Citrus sinensis	20	Sour orange	channal	balanced
	LA2	Citrus sinensis	20	Sour orange	channal	balanced
	LA3	Citrus sinensis	20	Sour orange	channal	balanced
	LA4	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	balanced
	LA5	Citrus clementina	50	Sour orange	channal	balanced

Table 1: Characteristics of orchards surveyed in Algeria.

December; the average minimum temperature in the coldest months (January and February) was 6 °C, while the average maximum temperature in the warmest months (July and August) was 36 °C (data from the National Meteorological Office website, <http://www.meteo.dz>).

### 2.1. Disease assessment

This diagnosis consists in describing the related symptoms and locating the citrus trees affected by decline in each orchard in order to produce detailed maps showing the exact location of symptomatic plants. The method used consists in evaluating the sanitary status according to a graded scale with five classes: no symptoms = class 0; wilting, defoliation and shoots dieback = class 1; partial dieback = class 2; total dieback = class 3 and uprooted tree = class 4. The infection rate (I) expressed as a percentage (%) of infected trees compared to the total number of trees examined N. This index is calculated according to the following formula (Pollastro et al., 2007; Gottwald et al., 2010; Ammad et al., 2014):  $I(\%) = \sum(n_i/N)100$ , where  $n_i$  is the number of trees that received the note  $i$  ( $i= 1-4$ ), and  $N$  is the total number of trees. The incidence (IMc %) of decline allows the

evaluation of the overall alteration of the production potential of each orchard. This index is calculated according to the following formula (Pollastro et al., 2007; Gottwald et al., 2010; Ammad et al., 2014):  $IMc(\%) = \sum n_i.i/N.v$ , where  $n_i$  is the number of trees that received grade  $i$  ( $i= 1-4$ ), and  $v$  is the highest value of the rating scale. The severity of the disease (G) allowed to know the average value of the class of dieback. This index was estimated using the following formula (Pollastro et al., 2007; Gottwald et al., 2010; Ammad et al., 2014):  $G = \sum(n_i.i)/N$ .

### 2.2. Fungal collections and isolations

Transverse and longitudinal sections of the trunk of citrus trees were collected for isolation. Approximately 90 trunk and branch pieces showing canker symptoms were collected from 30 randomly selected trees (approximately 5 to 60 years old) in 25 orchards. The samples were transported to the laboratory. Trunk and branch pieces were rinsed with water to remove organic debris, dried, and then briefly disinfected with sodium hypochlorite (NaOCl, 2%) for 4 minutes, rinsed, and dried on sterilized filter paper. Isolations were made from the edge of all categories of necrosis at the

boundary between necrotic and healthy tissue. Small sections (2 to 3 mm<sup>2</sup>) were cut with a sterile scalpel, and five to six pieces were placed on potato dextrose agar (PDA). The cultures were incubated in the dark at 25°C. We recorded weekly observations of fungal development; pure cultures of fungal isolates were obtained by transferring hyphal tips from the colony margins to fresh PDA plates (Barnett et al., 1972; Seifert, 1996; Phillips et al., 2013; Adesemoye et al., 2014).

### 2.3. Statistical analysis

To verify the effects of the different factors that may influence the dieback states of citrus trees in the studied orchards, a one-way analysis of variance (ANOVA) with  $P \leq 0.05$  was performed using Minitab software (version 19). Significant differences with a 95% confidence interval were determined by applying Tukey's test for honestly significant differences (HSD). A principal analysis (PCA) using Past software (version 6.0) was performed based on a data matrix with the above factors and variables (epidemiological indices). The different groupings were determined by cluster analysis (Ammad et al., 2014).

## 3. Results

### 3.1. Disease symptoms

In vegetation, the first observed symptoms of dieback are yellowing, drying, rapid leaf fall, making the tree look open and thin, with more dead twigs than usual. This symptom becomes alarming, after the dieback of the ends of the twigs ( Fig2.a), which is often followed by a total ( Fig2.b) or unilateral dieback of the tree ( Fig2.c). The branches and trunk show discoloration, cankers, fissures and cracks associated with gumming and the formation of fruiting bodies on the bark (basidiocarps, pycnidia, and perithecia) ( Fig2.e-g). At the roots, we observed browning, darkening, and wet rotting at the beginning, which later dried out. We observed the same situation in the replaced plants ( Fig2.d)

### 3.2. Inner necrosis

Examination of cross-sections of infected branches and trunks collected from symptomatic trees showed the presence of different forms of inner necrosis. Overall, there are five main categories, distinguished by color, position, and consistency (soft, hard, or association) (Fig. 3): (a) central light,



Figure 2: Dieback symptoms on citrus species in Algeria; (a) The dieback of the ends of the twigs (class 1); (b) Unilateral or partial dieback (class 2); (c) Total dieback (class 3); (d) Total dieback of young tree; (e) Branch cankers on citrus sinensis; (f) Pycnidia formed on the bark.



Figure 3: Different forms of necrosis on citrus in Algeria: (a) central hard, light necrosis; (b) sectorial light hard necrosis; (c) sectorial brown soft necrosis; (d): irregular wood discoloration and complex necrosis; (e): brown spot and arch-shaped necrosis.

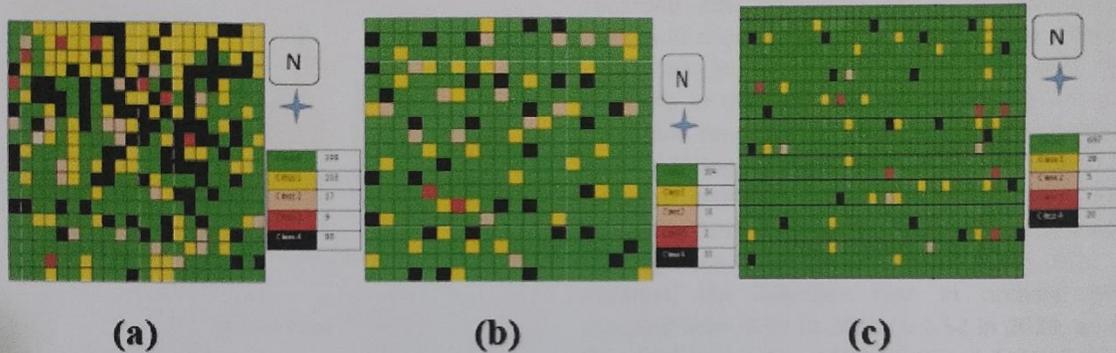


Figure 4: Distribution maps of dieback cases for the different orchards; (a) older orchards with channel-irrigation; (b) young orchards with channel-irrigation; (c) drip-irrigated orchards.

hard necrosis. (b): sectorial light, hard necrosis; (c): sectorial brown, soft necrosis; (d): irregular wood discoloration and complex necrosis (all forms); (e): brown spots and arch-shaped necrosis (Fig. 3).

### 3.3. Distribution of dieback cases

Depending on the age and management practices of the orchard, the distribution of dieback cases varies from orchard to orchard, although all of the symptoms described above are present in all of the orchards studied, although to varying degrees. Preliminary observations of tree dieback distribution maps prepared for each orchard indicate that the distribution of infected trees in older orchards (over 50 years of age) is clearly concentrated in the northern half of the plots (Fig4.a); this distribution depends on the orientation of the rows and the inclination of the land.

The young orchards (less than 20 years old), are dominated by Class 1 dieback with a general distribution over the entire orchard area (Fig4.b). Concerning the irrigation system, we found that the trees affected by dieback in the drip-irrigated orchards are mostly isolated from each other and distributed over the entire orchard area (Fig. 4c). In contrast, the affected trees in the canal-irrigated orchards (Fig4.a) are adjacent to each other in a

row and are concentrated in the northern half of the orchards. Note that the orchards are oriented from south to north and that irrigation in most orchards is carried out by a canal system from south to north, according to the orientation of the rows and the inclination of the plots.

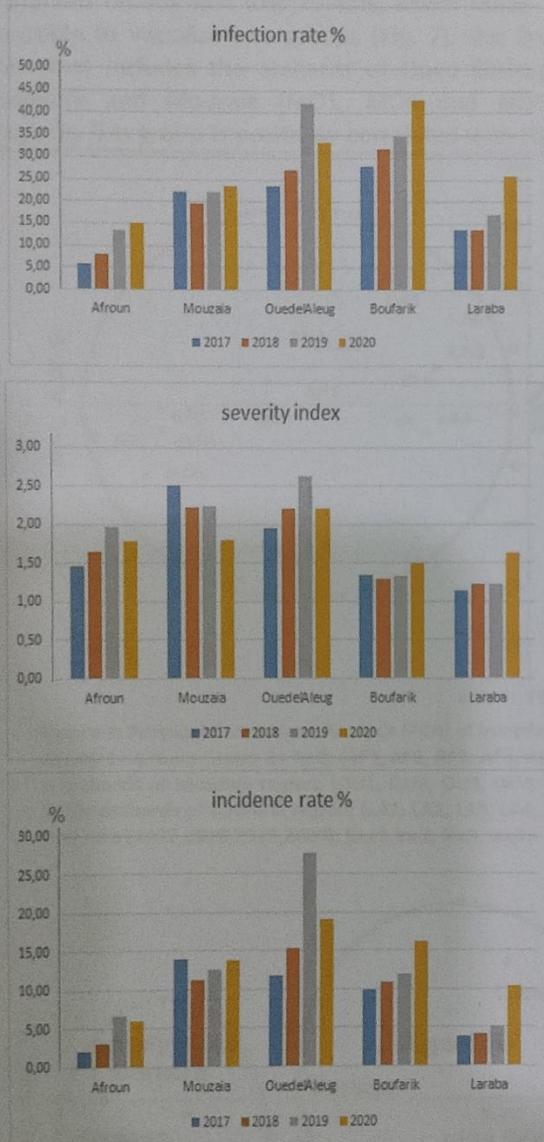
### 3.4. Fungal isolation and identification

Based on colony morphology and conidial characteristics, a diversified fungal flora was identified. In addition to a rich saprophytic flora (*Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, and Bacteria), we found that certain fungal species were dominant compared to others. *Botryosphaeriaceae* fungi were the most abundant species isolated, with a frequency of 48%. *Botryosphaeriaceae* fungi were isolated from all samples of citrus that showed disease symptoms, they were isolated from all necrosis, whether sectorial or central and light or brown of soft or hard texture. Other fungal genera sporadically isolated from citrus cankers were *Fusarium sp.*, *Eutypa sp.*, *Alternaria sp.*, and *Colletotricum sp.*

### 3.5. Disease data

The monitoring of dieback cases has revealed the presence of several progressive areas of tree death, which are divided into three types: twigs-end

dieback (Class 1); unilateral or partial dieback affecting part of the tree (Class 2); and total tree dieback (Class 3). We recorded an overall infection rate of 23.28%, corresponding to a severity index of 1.77 on a scale of four degrees, giving an incidence of 10.76%. The assessment of the situation of dieback in the studied orchards showed a rapid increase in all epidemiological indices (Fig. 5).



**Figure 5: Infection rate, severity index and incidence rate recorded in the five regions during the four years of study (2017/2020).**

Concerning the infection rate, the highest values were recorded in Boufarik, Oued El-Alleug and Mouzaia regions (Fig 5), where the average percentage of disease expression was respectively: 34.52%, 31.67% and 21.95%, while the infection rate in Larabaa and Afroun orchards (Fig 5) was

17.61% and 10.65%, respectively. The highest incidence rates were recorded in Oued ElAleug, Mouzaia and Boufarik (Fig 5) with 18.40%, 12.85% and 12.24%, respectively, while the lowest rates were recorded in Larabaa (5.87%) and Afroun (4.48%) regions. However, the highest values of severity index (Fig 5) were recorded in Oued ElAleug (2.25), Mouzaia (2.2) and Afroun (1.72) regions.

Concerning the situation in each orchard, we recorded the evolution of all epidemiological indices in most orchards during the four years of cultivation studied (Fig 5). The MO2 and MO3 orchards in the locality of Mouzaia are the only ones that recorded a decrease in epidemiological indices during the last three years (Fig 6), with the infection rate in the MO2 orchard ranging from 24.01% in 2017 to 1.58% in 2020 and the incidence varying from 18.01 in 2017 to 0.40 in 2020. In contrast, the infection rate in orchard MO3 dropped from 9.64 in 2018 to 1.52 in 2020, as did the incidence rate, which dropped from 3.43 in 2018 to 2.16 in 2019 and 0.38 in 2020.



**Figure 6: infection and incidence rate recorded in the region of Mouzaia during the four years of study (2017/2020).**

### 3.5.1. Epidemiological variability in different regions

The evolution of epidemiological parameters

(incidence rate and infection rate) in the five regions during the four years of the study was compared by principal component analysis (PCA) (Fig 7) associated with the classification of groups by cluster analysis. The projections of the values of infection and incidence rates on the two axes show contributions that exceed 89.52% of the total variance. The highest projection values are recorded on the first axis 79.43%, which made it possible to visualize two groups (Fig. 7): the first one that includes the orchards of Oued ElAleug, Boufarik and Mouzaia (MO1, MO4 and MO5) regions, this group is positively correlated with the

infection and incidence rates recorded during the four years of the study (2017/2020); the second group, which includes the orchards of Laraba and Afroun regions, two orchards of Mouzaia region (MO2 and MO3) and one orchard in Boufarik region (BF5). This group is correlated negatively with infection and incidence rates recorded during the four years of the study.

The comparison of the average of the different factors studied with the evolution of the epidemiological parameters by principal component analysis (PCA), combined with the

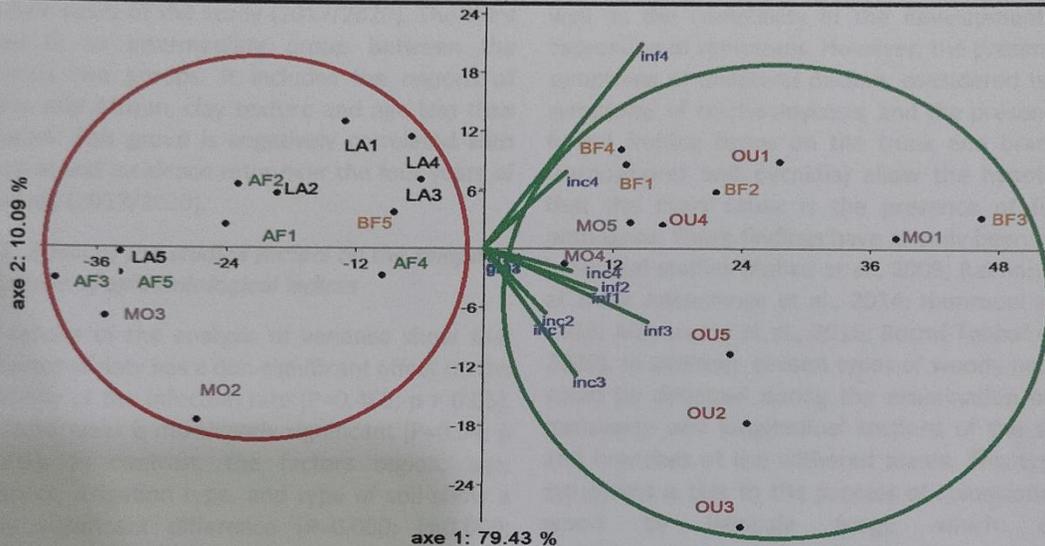


Figure 7: Principal Component Analysis (PCA) of infection and incidence rate in different orchards. Group 1= Green; Group 2= Red; (AF1, AF2, AF3, AF4, AF5)= orchards of Afroun region; (MO1, MO2, MO3, MO4, MO5) = orchards of Mouzaia region; (OU1, OU2, OU3, OU4, OU5)= orchards of Oued elaleug region; (BF1, BF2, BF3, BF4, BF5)= orchards of Boufarik region; (LA1, LA2, LA3, LA4, LA5)= orchards of Laraba region; (inf 1, inf2, inf3, inf4)= infection rate (2017,2018,2019,2020); (inc1,inc2, inc3, inc4)= incidence rate

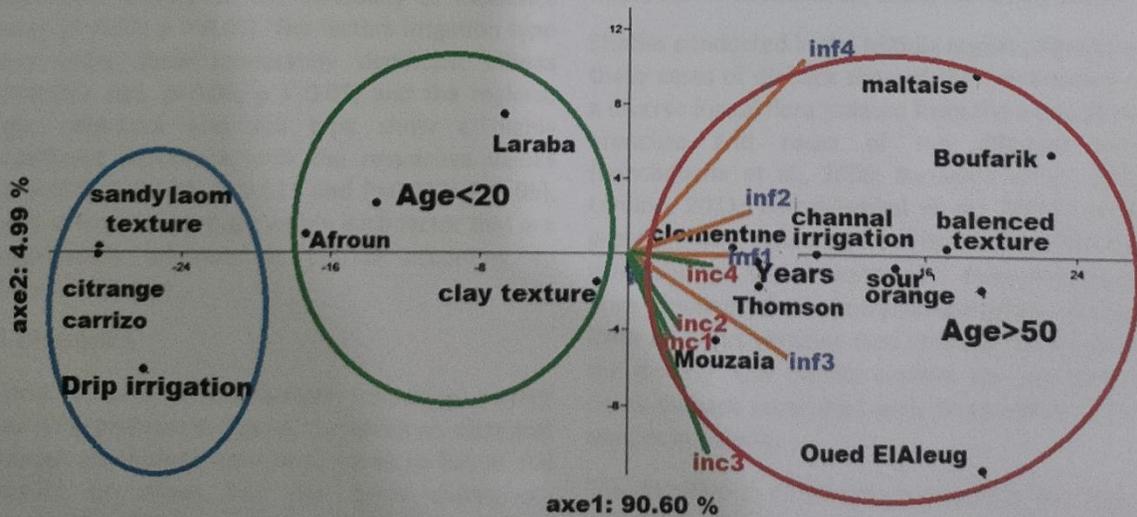


Figure 8: Principal Component Analysis (PCA) for the effect of the factors studied on the rate of infection and incidence. Group 1=Red; Group 2=Bleu; Group 3=Green; Thomson=Citrus sinensis; Clementine=Citrus clementina; Maltaise= Citrus sinensis maltaise.

classification of the groups by cluster analysis, allowed to highlight three groups ( Fig 8): The first group shows a positive correlation between the factors regions (Boufarik, Mouzaia and Oued ElAleug), varieties (Citrus sinensis, Citrus clementina and Citrus sinensis maltaise), year, rootstock (Sour Orange), channel irrigation, age over 50 years and balanced texture with the infection and incidence rates over the four years of study. The second group shows a negative correlation between the factors rootstock (Citrange Carrizo), sandy loam texture, and drip irrigation with infection and incidence rates recorded over the four years of the study (2017/2020). The third group is an intermediate group between the previous two groups. It includes the regions of Laraba and Afroun, clay texture and age less than 20 years. This group is negatively correlated with infection and incidence rates over the four years of the study (2017/2020).

### **3.5.2. Effect of the studied factors on the temporal variations of epidemiological indices**

The results of the analysis of variance show that the factor variety has a non-significant effect on the variability of the infection rate ( $P=0.465$ ;  $p > 0.05$ ). The factor year is moderately significant ( $P=0.04$ ;  $p > 0.05$ ). In contrast, the factors region, age, rootstock, irrigation type, and type of soil show a highly significant difference ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.001$ ;  $P=0.001$ ;  $P=0.000$   $p \leq 0.05$ ), with at least two groups within each factor that are significantly different at  $p \leq 0.05$  according to Tukey's HSD test. Analysis of variance shows that variety has non-significant effects on the variability of incidence rates ( $P=0.92$ ;  $p > 0.05$ ). The factors irrigation type and years show moderately significant effects ( $P=0.052$  and  $p=0.06$ ;  $p > 0.05$ ) and the regions, age, rootstock and soil type show a highly significant difference with the respective values ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.011$  and  $P=0.012$ ;  $P \leq 0.05$ ), with at least two groups within each factor that are significantly different at  $p \leq 0.05$  according to Tukey's HSD test.

## **4. Discussion**

Citrus dieback is increasingly becoming a very worrying problem in Algeria, for which no clear and precise conclusions have been made so far, as the impact on citrus has not been extensively researched. Most studies conducted in different citrus areas have been limited to the identification and pathogenicity of isolated species (Polizzi et al.,

2009; Adesemoye et al., 2014; Hamrouni et al., 2018; Berraf-Tebbal et al., 2020; Aloï et al., 2021). For this reason, in the present study, we focus on the epidemiological aspects of dieback in 25 citrus orchards in the Mitidja region. The results of symptomatological diagnoses showed the presence of different categories of symptoms in almost all studied orchards. These are mainly total or partial dieback. However, it is difficult to make a clear and precise statement about the etiology of our decline due to the confusion between the different symptomatological descriptions corresponding to diseases of different origin (biotic and abiotic), as well as the complexity in the development and expression of symptoms. However, the presence of symptoms of unilateral decline, considered typical symptoms of tracheomycosis, and the presence of fungal fruiting forms on the trunk and branches (carpophores and pycnidia) allow the hypothesis that the main cause is the presence of fungal pathogens. These findings have already been noted in several studies (Polizzi et al., 2009; Raimondo et al 2010; Adesemoye et al., 2014; Hamrouni et al., 2018; Mayorquin et al., 2016; Berraf-Tebbal et al., 2020). In addition, several types of woody necrosis could be detected during the examination of the transverse and longitudinal sections of the stems and branches of the withered plants. This type of symptoms is due to the process of colonization of wood by lignicole fungi, which cause decomposition and the appearance of necrosis; similar situations have been described in several citrus orchards around the world (Polizzi et al., 2009; Adesemoye et al., 2014; Hamrouni et al., 2018; Berraf-Tebbal et al., 2020; Aloï et al., 2021).

Studies conducted in the Mitidja region (Algeria) on these cases of dieback showed the involvement of a diverse fungal flora isolated from the wood of the branches and roots of the affected trees (Benchabane et al., 2008; Benzohra et al., 2010; Lamine, 2011; Berraf-Tebbal et al., 2020). In the present study, isolations from the wood of infected trees showed the presence of a diversified fungal flora dominated by Botryosphaeriaceae isolated from all citrus samples that showed symptoms of the disease. Our results confirm the presence of citrus dieback associated with Botryosphaeriaceae species in Algeria.

The distribution of the affected trees is variable. In general, we observed that in drip-irrigated orchards, the trees affected by dieback are mostly isolated from each other and widely distributed

throughout the orchard. Whereas the affected trees of channel-irrigated orchards are aligned next to each other in the row and are concentrated in the northern side of the orchards. Therefore, we believe that propagation can occur from plant to plant spontaneously or through cultural operations such as tillage, pruning and irrigation, which explains the alignment of affected trees in the same rows. Several authors have indicated that *Botryosphaeriaceae* can infect their hosts either through wounds or endophytically through natural openings (Michailides, 1991; Kim et al., 1999; Smith, 2001), direct penetration was also possible on apples through the formation of appressoria (Kim et al., 1999). The grouping and concentration of diseased trees in the northern half of the orchard is due to the stagnation of rainwater as a result of the absence of drainage systems. Disease expression is more often associated with abiotic stress factors such as drought, physical damage, waterlogging, frost, and unsuitable growing conditions (Desprez-Loustau et al., 2006; Slippers et al., 2007; van Niekerk et al., 2011; Sakalidis et al., 2011; Zhang et al., 2013; Bostock et al., 2014). Overall, the symptomatological description observed in our orchards can be explained by their variability and their differential expression by the relative or combined effects of the main variables considered in our study. The statistical analyzes showed that the factors rootstock, soil texture, age, region and type of irrigation have a highly significant effect on the variation of epidemiological parameters. However, the factor year is only moderately significant. The factor variety has no significant effect on these indices. The principal component analysis (PCA) showed a significant difference between the studied factors, which are highly correlated with the epidemiological indices recorded in the study years (2017-2020).

The analysis of the evolution of the different symptomatological categories in the studied cultivars shows that the distribution is random and not specific to the genotype of the plant. The principal component analysis showed a positive correlation between the variety factor and the infection and incidence rates observed in the four years of study, although the effect on the variability of the epidemiological parameters was not significant. According to Dubos (2002a), there are no cultivars resistant to wood diseases, but there are cultivars with different sensitivity, not very sensitive or tolerant. The same author stated that

the susceptibility of cultivars suggests the presence of complex interactions between cultivar, location, growing conditions and inoculum pressure. It can be concluded that cultivar susceptibility classification is not a constant.

Several hypotheses were formulated to explain the influence of rootstock on the expression of dieback symptoms. In the present study, the varieties grafted to Sour Orange showed higher percentages of the disease compared to the varieties grafted on Citrange carrizo. According to Jung et al (2000), the emergence of the disease is highly dependent on the rootstock and the composition of the soil. According to Castle et al (1993) and Graham (1995), the different tolerance of rootstocks could be due to the amount of inoculum present in the soil and to the effects of physiological stresses (Hutchison et al., 1972; Castle et al., 1993; Graham, 1995).

On the other hand, the effect of soil texture is not excluded, because it is heavy soils with a percentage of borer that exceeds 40%. In agriculture, having a clay soil is both an advantage and a constraint. Indeed, due to its richness in minerals, clay soil is very fertile and allows good development of plants. In addition, due to its impermeability and density, it is relatively difficult to work and can lead to suffocation of the roots. However, even if neither physical destruction nor suffocation occurs, a long stay of water in the orchard creates a favorable atmosphere to the development of diseases in the long term (Srivastava et al., 2009). Regarding age, young plantings (under 20 years old) showed average incidence, infection and severity rates. On the other hand, plantations belonging to the age group above 50 years had high rates. Le Gall et al (1994) hypothesizes that age is one of the main factors favoring the development of this type of disease, since it reflects the duration in which the plants are exposed to the risk of contamination. According to this hypothesis, old plants are more exposed and susceptible than young plants.

Concerning the effect of region on the variability of epidemiological parameters, it is not clear at present whether transmission of these plant pathogens occurs between citrus and other hosts growing nearby. Therefore, fruiting forms of the same fungi were found in both grapevine and citrus in the Mitidja region (Algeria) (Ammad et al., 2014; Ammad et al., 2014b; Ammad et al., 2014c; Berraf-Tebbal et al., 2020). In the present study, numerous perithecia were observed on dead citrus

branches, indicating that citrus is one of the main hosts of these pathogens. The studied orchards are located in agricultural areas that are in a subhumid bioclimatic stage characterized by mild monthly average temperatures and annual precipitation greater than 600 mm; or conditions are very favorable for pathogen development. According to Galet (1999) and Goulet (2008), rain seems to be an important factor for infection, favoring the migration of spores from the cut to depth, up to 2 cm inside the wood. Indeed, the amount of rain acts as a triggering factor for spore formation (Dubos, 2002b). However, no correlation was found between the amount of rain, the number of rainy days and the percentage of infected plants. Moreover, no infection was observed after the end of the rain, so it seems that the rain affects the spread of the inoculum rather than the infection (Migheli et al., 2009).

Regarding irrigation, drip-irrigated plantings had average rates of incidence, infection, and severity. On the other hand, channel irrigated plantings showed high rates. According to Timmer et al (2003), the submerged irrigated orchards create an environment conducive to infection that promotes sporulation and fungal transmission. Ristaino and Gumpertz (200) reported that the main reason for the spread of inoculum from the infected region to the healthy region is surface water.

The results of the distribution and severity of dieback in all orchards confirm the probability of a biotic cause and the involvement of cultural work in the spread of the disease. Our study has improved knowledge of the epidemiology of woody diseases in citrus species. The results of our study suggest that these pathogens infect citrus via pruning wounds and injuries caused by cultural operations. Pruning wounds and injuries are not only an entry point for pathogens, but also a source of stress to the host plant. Combined with environmental stressors, this may be the primary cause of increased incidence of dieback. To better understand this syndrome, further epidemiological studies need to include all possible factors that directly or indirectly influence the wasting syndrome. This will allow the implementation of prevention techniques and management strategies to minimize the occurrence of these pathogens and prevent their spread to new orchards.

#### Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Ms. DJ.

Fadil (University of Blida1, Algeria) for his technical assistance. We would also like to thank Dr. M. Belatrach (University of Blida1, Algeria) for her relevant recommendations.

#### References

- Adesemoye AO, Mayorquin JS, Wang D H, Twizeyimana M, Lynch SC, and Eskalen A (2014) Identification of species of *Botryosphaeriaceae* causing Bot gummosis in citrus in California. *Plant Diseases* 98:55-61
- Aloi F, Riolo M, Parlascino R, Pane A, Cacciola SO (2021) Bot Gummosis of Lemon (*Citrus \_ limon*) Caused by *Neofusicoccum parvum*. *Journal of Fungi* 7:294. <https://doi.org/10.3390/jof7040294>
- Ammad F, Benchabane M, Toumi M (2014) Fungal Pathogens Associated with Grapevine Wood lesions in Algeria. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 4: 8-15.
- Ammad F, Benchabane M, Toumi M (2014b) Diversity of Fungal Trunk Pathogens Associated with Grapevine Dieback of Grapevine in Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences* 7: 35-39
- Ammad F, Benchabane M, Toumi M, Belkacem N, Guesmi A, Ameer C, Lecomte P, Merah O. (2014C) Occurrence of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine dieback in Algeria. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38(6):865-876
- Barnett, H and Barry Hunter, B (1972) *Illustrated genera of imperfecti fungi*, third edition. Burgess publishing company. 239p
- Benchabane M, Fadil D, Lamîn S, Yahou S, Guettache T et Tava T (2008) Etat du dépérissement des agrumes dans la région agricole de la Mitidja (Algérie). *Symposium Méditerranéen sur la Protection Phytosanitaire des agrumes*, Rabat, Maroc. pp : 81-89
- Benzohra, M et Abdelguerfi, Y (2010) Etude étiologique de dépérissement des agrumes dans la région de BENI TAMOU (W.Blida) : recherche des agents fongiques. PhD, University of Blida, Algeria (thesis in french)
- Berraf-Tebbal A, Mahamedi AE, Aigoun-Mouhous W, Špetík M, C echová J, Pokluda R, Baránek, M, Eichmeier A, Alves A (2020) *Lasiodiopodia mitidjana* sp. nov. and other *Botryosphaeriaceae* species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PLoS ONE* 15: e0232448
- Bostock RM, Pye MF and Roubtsova TV (2014) Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual Reviews of Phytopathology* 52: 517-549
- Castle W S, Tucker D P H, Krezdorn A H, and Youtsey C O (1993) *Rootstocks for Floridacitrus* (Univ. Florida Publ. SP-42), 2nd ed. 15May 2020. [https://crec.ifas.ufl.edu/extension/citrus\\_rootstock/Rootstock-Literature/Rootstocks%20for%20Florida%20Citrus.pdf](https://crec.ifas.ufl.edu/extension/citrus_rootstock/Rootstock-Literature/Rootstocks%20for%20Florida%20Citrus.pdf)
- Desprez-Loustau M L, Marçais B, Nageleisen L M, Piou D and Vannini A (2006) Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* 63 : 597-612
- Dubos B (2002a) *maladies cryptogamiques de la vigne*. bourdeaux, edition 13 Féret
- Dubos B (2002b) *Les maladies cryptogamiques de la vigne champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne*. Edition Ferret (2ème édition), 200p

- FAO (2020) Available from: <http://www.fao.org>. [accessed March 18th, 2020]
- Galet P (1999) Précis de pathologie viticole, 3ème édition, 81- 86p
- Gottwald T R, Bergamin-Filho A (2010) "Quantitative epidemiology tools: Their application and interpretation for citrus diseases", International Organization of Citrus Virologists, IOCV, (2010), 93p
- Goulet E (2008) les maladies de bois au vignoble: chercheurs et techniciens autour de la table, Compte rendu de journée thématique sur les maladies du bois (IFV, Toulouse), p3
- Graham J H (1995) Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology* 85:111–117
- Hamrouni N, Nouri M, Trouillas F, Said A, Sadfi-Zouaoui N, Hajlaoui M (2018) *Dothiorella* gummosis caused by *Dothiorella viticola*, first record from citrus in Tunisia. *New Disease Reports* 38:10–10
- Hutchison DJ and Grimm GR (1972) Variation in *Phytophthora* resistance of Florida rough lemon and sour orange clones. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 85:38–39
- Jung T, Blaschke H, Obwald W (2000) Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49: 706-718
- Jurick WMII, Vico I, Gaskins VL, Janisiewicz WJ and Peter KA (2013) First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot on apple fruit in Maryland. *Plant Diseases* 97: 999
- Kim KW, Park EW, and Ahn KK (1999) Pre-penetration behaviour of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. *Plant Pathology Journal* 15 : 223–227
- Lamine S (2011) Impact du dépérissement des agrumes dans la région de la Mitidja : étude étiologique et épidémiologique, p173. PhD, University of Blida, Algeria (thesis in french)
- Le Gall D et Le Gat Y (1994) Évaluations de la nuisibilité de l'eutypiose au vignoble. *Annales A.N.P.P.* (Association nationale de protection des plantes). 4e conférence Internationale sur les maladies des plantes. 6 au 8 décembre 1994, Bordeaux, France. A.N.P.P., Paris, tome III. p. 1271- 1284
- Marsberg A, Kemler M, Jami F, Nagel J H, Postma-Smidt A, Naidoo S, Wingfield M J, Crous P W, Spatafora J W, Hesse C N (2017) *Botryosphaeria dothidea*: A latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology* 18: 477–488
- Mayorquin JS, Wang DH, Twizeyimana M, Eskalen A (2016) Identification, distribution, and pathogenicity of *Diatrypaceae* and *Botryosphaeriaceae* associated with Citrus branch canker in the southern California desert. *Plant Disease* 100(12):2402–2413
- Michailides TJ (1991) Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. *Phytopathology* 81: 566–573
- Migheli Q, Cacciola SO, Balmas V, Pane A, Ezra D, Magnano di San Lio G (2009) Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: a potential threat to lemon production worldwide. *Plant Disease* 93: 853–867
- Ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR), Données statistiques ; Alger, 2015. 15p
- Phillips Alan JL, Slippers B, Groenewald Johannes Z and Crous Pedro W (2013) Plant pathogenic and endophytic *Botryosphaeriales* known from culture. *Studies in Mycology* 76
- Polizzi G, Aiello D, Vitale A, Giuffrida F, Groenewald J, Crous P (2009) First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy. *Plant Disease* 93 (11):1215
- Pollastro S, Pichierri A, Masiello N, Habib W, Carlucci A, Lazzizzera C, Frisullo S, Faretra F (2007) "Il mal dell'esca della vite: interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia (Mesvit), Sud Stampa, Bari, Italia, (2007), pp.32
- Raimondo F, Nardini A, Salleo S, Cacciola SO, Gullo MAL (2010) A tracheomycosis as a tool for studying the impact of stem xylem dysfunction on leaf water status and gas exchange in *Citrus aurantium* L. *Trees* 24(2):327–333.
- Ristaino JB, Gumpertz ML (2000) New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics cause by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Reviews of Phytopathology* 38: 541–57
- Sakalidis M L, Hardy G E S J and Burgess TI (2011a) Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Ecology* 4: 1–14
- Seifert K (1996) *Fuskey-Fusarium* interactive key. Agriculture and AgriFood, Canada
- Slippers B and Wingfield MJ (2007) *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90–106
- Smith H (2001) Biology of *Botryosphaeria dothidea* and *Sphaeropsis sapinea* as endophytes of Eucalypts and Pines in South Africa (Unpublished doctoral thesis). University of the Free State, Bloemfontein, South Africa
- Srivastava AK and Singh S (2009) Citrus Decline: Soil Fertility and Plant Nutrition, *Journal of Plant Nutrition* 32: 197-245
- Timmer LW, Peever TL, Solel Z, Akimitsu K (2003) *Alternaria* diseases of citrus novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea* 42: 99–11
- Van Niekerk JM, Strever AE, Du Toit G, Halleen F and Fourie PH (2011) Influence of water stress on *Botryosphaeriaceae* disease expression in grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 151–165
- Zhang ZX, Deng DF, Qi WJ, Fan SS, Cao Y, Huang JG and Liu ZY (2013) *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of a new canker disease of Tatarian dogwood (*Cornus alba*) in China. *Australasian Plant Pathology* 42: 113–119