

**UNIVERSITE DE BLIDA 1****Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie****Département des biotechnologies****MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Phytopathologie

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE LA  
FLORE FONGIQUE ASSOCIEE AU DEPERISSEMENT DES  
AGRUMES DANS LA REGION DE MITIDJA**

Par

**Mohammed BENZOHRA**

Devant le jury composé de :

H. BELKAHLA	Professeur, USDB, Blida 1	Présidente
B. BELARBI	Professeur, ENSA El Harrach Alger	Examineur
C. CHAOUIA	Maitre de conférence (MCA), USDB Blida 1	Examinatrice
M. BENCHABANE.	Professeur, USDB, Blida 1	Promoteur
F. AMMAD.	Maitre de conférence (MCB), USDB .Blida 1	Invitée

Blida, Mai 2016

## Résumé

Identification et caractérisation de la flore fongique associée au dépérissement des agrumes dans la région de Mitidja

Notre travail sur terrain, nous a permis de constater que les situations de dépérissement apparaissent et évoluent selon deux cas : un dépérissement foudroyant et un dépérissement progressif. Nous avons noté une moyenne générale du taux d'infection de 42% dont 13.17% représente le dépérissement des extrémités des rameaux (classe 1), 8.68 % de dépérissement partiel (classe 2), 1.93% de dépérissement total (classe 3) et 18.18% d'arbres arrachés (classe 4). Nous avons enregistré aussi une valeur moyenne de la classe du dépérissement de 2,60 et une incidence moyenne de 27.26%.

D'après les résultats des isolements fongiques effectués à partir du bois des arbres dépéris, il a été noté la dominance très apparente des isolats de *Botryosphaeriaceae* (48.89%) suivi par *Fusarium* et *Phoma* avec une fréquence de 15.56%. Les autres agents fongiques ont été retrouvés avec des fréquences plus faibles, *Eutypa* 8.89% puis *Alternaria* 6.67% et *Colletotrichum* 4.44 %. Nous avons démontré aussi le potentiel pathogénique des espèces des *Botryosphaeriaceae* et des *Fusarium*.

A cet effet, les résultats d'isolement et de pathogénicité confirment l'implication direct des espèces de *Fusarium* comme cause de dépérissement et la contribution des espèces des *Botryosphaeriaceae* autant que pathogènes secondaires aggravant la situation, surtout avec la présence des espèces d'*Eutypa*, d'*Alternaria* et des acervules de *Colletotrichum*, qui sont souvent associés aux pycnides de *Phoma*.

Mots clés : Dépérissement, Agrumes, Agents fongiques, *Botryosphaeriaceae*, *Fusarium*, pathogénicité

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE FUNGAL FLORA ASSOCIATED WITH CITRUS DECLINE IN MITIDJA AREA.

Our field work has allowed us to see that Citrus decline situations arise and evolve in two cases: a quick decline and gradual decline. We noted an average infection rate of 42% which represents 13.17% for the decline of the end of branch (Class 1), 8.68% for the partial decline (class 2), 1.93% for the total decline (class 3) and 18.18% for uprooted trees (Class 4); we also recorded an average value of decline Class about 2.60 and an average incidence of 27.26%.

According to fungal isolations results made from decayed trees wood, we noted the dominance of *Botryosphaeriaceae* (48.89%) followed by *Fusarium* and *Phoma* with a frequency of 15.56%. Other fungal agents were found at lower frequencies, *Eutypa* 8.89%, *Alternaria* 6.67% and *Colletotrichum* 4.44%. We have also demonstrated the pathogenic potential of *Botryosphaeriaceae* and *Fusarium* species.

For this purpose, isolation and pathogenicity results confirm the direct involvement of *Fusarium* species as a cause of decline and the contribution of *Botryosphaeriaceae* species as much a secondary pathogens aggravating the situation, especially with the presence of *Eutypa*, *Alternaria* and *Colletotrichum* species, which are often associated with pycnidia of *Phoma*.

Keywords: Decline, Citrus, fungal Agents, *Botryosphaeriaceae*, *Fusarium*, pathogenicity.

### ملخص

#### تحديد وتوصيف الفطريات المرتبطة بموت الحمضيات في منطقة المتيجة

عملنا الميداني، سمح لنا باستنتاج ان ظهور وتطور المرض يتم على حالتين: الموت التدريجي و الموت المفاجئ. لاحظنا أيضا أن متوسط معدل نسبة الإصابة هو 42% ما يمثل 13.17% من بيوس اطراف الاغصان (الدرجة 1) و 8.68% من الموت الجزئي للاشجار (الدرجة 2) و 1.93% من الموت الكلي للاشجار (الدرجة 3) و 18.18% من الاشجار التي تم قلعها (الدرجة 4)، كما سجلنا القيمة المتوسطة لدرجة المرض والمقدرة ب 2.60 ومتوسط معدل تأثير الإصابة المقدر ب 27.26%.

عملية العزل سمحت لنا بملاحظة هيمنة Botryosphaeriaceae (48.89%)، يليه Fusarium و Phoma بنسبة 15.56%. كما تم العثور على الفطريات أخرى ولكن بنسب منخفضة: Eutypa (8.89%) و Alternaria (6.67%) و Colletotrichum (4.44%). لقد أثبتنا أيضا القدرة التمريضية ل Fusarium و Botryosphaeriacees .

لهذا السبب، فان نتائج العزل والتمريض الاصطناعي تؤكد التورط المباشر ل Fusarium كسبب للمرض ومساهمة Botryosphaeriacees كمسببات ثانوية تزيد في تفاقم الوضع ، خصوصا مع وجود Eutypa و Alternaria و Colletotrichum، والتي غالبا ما تكون مرتبطة مع Phoma.

كلمات البحث: الموت، الحمضيات، Fusarium، Botryosphaeriacees، التمريض الاصطناعي. الفطريات،

## REMERCIEMENT

*Je remercie le bon Dieu de nous avoir donné le courage et l'assiduité dans la réalisation de ce travail et le prions de faire que ce ne soit pas la fin mais le début d'un chemin.*

*Je tiens à remercier mon promoteur Mr BENCHAAABANE. M et la co- promotrice Mme AMMAD. F pour sa patience, ses précieux conseils, le suivi et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.*

*J'exprime mes profonds remerciements au Pr BELKAHLA. H pour avoir accepté d'assurer la présidence du jury.*

*Je remercie vivement Mme CHAOUIA. C et PR BELARBI. B, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail.*

*Un grand merci à notre cher ingénieur de laboratoire de mycologie Fadil Djamila.*

*Je tiens chaleureusement à remercier toute l'équipe de l'ITAFV*

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

*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	
Remerciement	
Table des matières	
Liste des illustrations, graphiques et tableaux	
Introduction.....	12
Chapitre 1 : Données bibliographiques	
<b>I. Généralité sur l'agrumiculture.....</b>	14
I.1.Exigences climatiques.....	14
I.2.Exigence édaphique .....	15
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 des agrumes.....</b>	19
II.1. Les maladies à virus, à viroïdes et à phytoplasmes.....	19
II.1.1. La Tristeza.....	19
II.1.2. Les Psoroses.....	21
II.1.3. Exocortis.....	23
II.1.4. Xyloporose (cachexie).....	23
II.1.5. Stubborn.....	24
II.2. Les maladies bactériennes.....	24
II.2.1. Huanglongbin (HLB) .....	24
II.2.2. Chlorose variegue des agrumes (CVA) .....	25
II.2.3. Le chancre des agrumes.....	26
II.3. Dépérissement d'origine fongique.....	27
II.3.1. Fonte des semis.....	27
II.3.2. La gommose à <i>Phytophthora</i> .....	27
II.3.3. Pourriture fibreuse de racines.....	29
II.3.4. Les pourridiés.....	29
<u>II.3.4.1.</u> Pourritures à Armillaire.....	31
<u>II.3.4.2.</u> Pourriture à <i>Sclerotinia</i> .....	31
<u>II.3.4.3.</u> Pourritures à clitocybe .....	31
<u>II.3.4.4.</u> Pourriture sèche .....	32
<u>II.3.4.5.</u> Pourritures cotonneuses des racines.....	33
<u>II.3.4.6.</u> Pourriture à <i>Rosellinia</i> .....	35
II.3.5. Les pourritures à <i>Botryosphaeriaceae</i> .....	35
<u>II.3.5.1.</u> La gommose à <i>Diplodia</i> .....	35
<u>II.3.5.2.</u> La pourriture à <i>Diplodia</i> .....	36
<u>II.3.5.3.</u> La gommose à <i>Dothiorella</i> .....	36
II.3.6. L'antracnose.....	36
II.3.7. Le mal secco.....	37
II.4. Dépérissement d'origine inconnu.....	39
II.4.1. Citrus blight .....	39

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

<b>I.</b>	La région d'étude.....	41
	<u>I.1.</u> Localisation .....	41
	<u>I.2.</u> Caractéristiques des vergers étudiés.....	42
	<u>I.3.</u> Conduites culturales.....	43
	<u>I.4.</u> Caractéristiques des sols des vergers étudiés.....	44
<b>II.</b>	L'étude épidémiologique de dépérissements.....	46
	II.1. Diagnostic symptomatologique .....	46
	II.2. Paramètres épidémiologiques des dépérissements.....	47
	II.2.1. Taux d'infection.....	48
	II.2.2. Gravité de la maladie .....	48
	II.2.3. Indice de McKinney .....	48
<b>III.</b>	Étude étiologique.....	49
	<u>III.1.</u> Prélèvement des échantillons .....	49
	<u>III.2.</u> Recherche des fructifications des agents causals .....	49
	<u>III.3.</u> Diagnostic au laboratoire .....	49
	<u>III.3.1.</u> Milieu de culture .....	49
	<u>III.3.2.</u> Isolement et recherche des agents causals .....	50
	<u>III.3.3.</u> Purification .....	50
	<u>III.3.4.</u> Identification .....	50
	<u>III.3.5.</u> Caractères macromorphologiques .....	51
	<u>III.3.6.</u> Caractères micromorphologiques.....	51
	<u>III.3.7.</u> Caractères micromorphométriques .....	51
	<u>III.3.8.</u> Induction de la sporulation .....	52
	<u>III.3.9.</u> Caractérisation moléculaire de <i>Fusarium</i> .....	52
	<u>III.3.9.1.</u> Extraction d'ADN.....	52
	<u>III.3.9.2.</u> Amplification de l'ADN par PCR.....	53
	<u>III.3.9.3.</u> Séquençage et analyse des données.....	54
<b>IV.</b>	Test de pathogénicité .....	54
	<u>IV.1.</u> Préparation de matériel végétal .....	54
	<u>IV.2.</u> Matériel fongique.....	54
	<u>IV.3.</u> Réalisation de test de pathogénicité .....	55
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b>		
<b>V.</b>	Résultats épidémiologiques .....	58
	<u>V.1.</u> Descriptif symptomatologique .....	58
	<u>V.1.1.</u> Description des symptômes externes.....	58
	<u>V.1.2.</u> Description des symptômes sur bois.....	64
	<u>V.2.</u> Distribution des cas de dépérissement.....	67
	<u>V.3.</u> Taux de dépérissement.....	67
	<u>V.4.</u> Discussion .....	73
<b>VI.</b>	Étude étiologique.....	77
	<u>VI.1.</u> Caractérisation et identification des isolats fongiques... ..	77
	<u>VI.1.1.</u> La famille des Botryosphaeriaceae.....	78
	<u>VI.1.2.</u> La flore fusarienne.....	82

<b>II.4.1.1.</b> Caractérisation morphologique.....	82
II.4.1.1.1. <i>Fusarium solani</i> .....	82
II.4.1.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	84
<b>II.4.1.2.</b> Caractérisation moléculaire de la flore fusarienne .....	86
<u>VI.1.3.</u> <i>Phoma sp.</i> .....	87
<u>VI.1.4.</u> <i>Eutypa sp.</i> .....	88
<u>VI.1.5.</u> <i>Alternaria sp.</i> .....	89
<u>VI.1.6.</u> <i>Colletotrichum sp.</i> .....	90
<u>VI.2.</u> Recensement des champignons.....	91
<u>VI.3.</u> Localisation des champignons dans les différentes nécroses....	92
<b>III.</b> Test de pathogénicité .....	93
<b>IV.</b> Discussion .....	96
Conclusion .....	101
Appendices .....	103
Références bibliographiques. ....	119

## LISTE DES ILLUSTRATION, GRAPHIQUES ET TABLEAU

	pages
Figure 1.1 :	21
Symptomes de la Tristiza ; A : Le déclin rapid de l'oranger ; B : Eclaircissement des nervures ; C : Bois strié (stem pitting) ; D : Formation non visible de crêtes sous l'écorce (stem pitting)	
Figure 1.2 :	30
symptômes de la gommose à <i>Phytophthora</i> [61]; A : Début d'exsudation de gomme; B : la gommose dans un stade avancé ; C : Symptômes de la pourriture fibreuse de racines causée par <i>Phytophthora</i> spp ; D : pourriture brune due à <i>Phytophthora</i> .	
Figure 1.3 :	34
symptomes de la pourriture seche racinaire [61]; A : flétrissement puis le dépérissement brutale ; B : brunissement de la partie basale du tronc	
Figure 1.4 :	37
Symptômes de la pourriture à <i>Botryosphaeriaceae</i> [61]; A : Pourriture du cœur provoquée par <i>Diplodia</i> ; B : Fissure et craquelure sur branche due à <i>Dothiorella</i> ; C : Ecaillage de l'écorce due à <i>Diplodia natalensis</i>	
Figure 1.5 :	39
Symptômes du Mal secco [70] ; [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 <i>Phoma tracheiphila</i>	
Figure 2.1:	42
Localisation géographique de la zone d'étude	
Figure 2.2 :	44
Caractéristique physico-chimique du sol des vergers de Thomson	
Figure 2.3 :	45
Caractéristique physico-chimique du sol des vergers de Clémentinier	
Figure 2.4 :	56
Test de pathogénicité; A : Tige inoculée et couverte par le coton imbibé d'eau distillé stérile et le para film ; B : Installation de l'inoculum sur le site d'inoculation ; C : Plantules de Bigaradier inoculées par différentes suspension fongiques ; D : Plantules de Thomson greffées sur Citrange troyer inoculées par différent suspension fongique	
Figure 3.1:	59
Symptomes de dépérissement fodroyant ; A : Enroulement et flétrissement brutale du feuillage ; B : Dépérissement brutal	
Figure 3.2 :	60
Symptomes de dépérissement progressif ; A : Jaunissement généralisées et réduction intense de feuillage ; B : Nécrose et orientation des feuilles vers le haut ; C : Réduction intense de fruits en nombre et en calibre ; D : Dépérissement des extrémités des rameaux ; E : Dépérissement unilatéral; F : Dépérissement progressif	
Figure 3.3 :	61
Symptomes sur tronc et branches charpentières ; A : Ecaillage et craquelure sur la partie porte greffe ; B :	

Craquelure sur la partie greffon ; C : Exsudation de gomme ; D : Coloration rouge foncé sur branche. E : Fructification macroscopique sur branches.

	Pages
Figure 3.4:	62
Symptomes sur les parties souterraines ; A : Pourriture sèche de la partie sous terrain ; B : Pourriture sèche de racines et destruction totale du pivot ; C : Destruction des vaisseaux conducteur au niveau du collet (pourriture du cœur) ; D : Pourriture sèche et noircissement des racines ; E : Pourriture cotonneuse sur racine; F : Arbres arrachés à cause de dépérissement	
Figure 3.5 :	63
Symptômes de dépérissement sur jeunes plantation ; A : Jaunissement léger d'un plan remplacé ; B : jaunissement généralisé d'un jeune plant ; C : Dépérissement brutal d'un jeune plant ; D : Pourriture de collet sur jeune plant	
Figure 3.6 :	65
Différentes necroses sur tronc et branches charpentière ; 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 et dure en position centrale et sectorielle	
Figure 3.7 :	66
Différentes necroses sur tronc et branches charpentière ; A : Nécrose brune claire et dure en position sectorielle ; B : Nécrose brune foncé et molle en position sectorielle ; C : Nécrose brune claire en position centrale ; D : Point noir entouré d'une liséré ; E : coupe longitudinale d'un nécrose brune et dure en position centrale ; F : Points gris sur bois sain	
Figure 3.8:	68
Situation des dix vergers étudiés selon les déférentes classes de dépérissement et leurs proportions	
Figure 3.9 :	69
situation des vergers Thomson selon les déférentes classes de dépérissement et leurs proportions	
Figure 3.10 :	70
situation des vergers de Clémentinier selon les déférentes classes de dépérissement de et leurs proportions	
Figure 3.11:	71
Taux globale de dépérissement selon déférentes classes symptomatologiques.	
Figure 3.12 :	74
Problème lié au conduite culturale adoptée ; A : Stagnation de l'eau entre les lignes de plantation ; B : Destruction des racines après les opérations de discage	
Figure 3.13:	77
Isolement à partir des fragments de bois ; A : Développement des champignons à partir des buchettes ; B : Buchettes stériles	
Figure 3.14 :	79
Aspect macroscopique des isolats de <i>Botryosphaeriaceae</i> ; A : Isolat de couleur brune avec des plages blanches et d'aspect ras ; B : Isolat brune d'aspect cotonneux avec présence de pigmentation rouge ; C : Jeune 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 ; G : Sporulation sur aiguilles de pin

	Pages
Figure 3.15 :	80
Caractère microscopique des isolats de botryosphaeriaceae ; A : Mycélium septé ramifié et chlamydospores ; B : Mycélium dense avec présence de conidies ; C : conidies mature septés D : Conidies mature septés présentant des stries longitudinales ; E : Cellules conidiogènes libèrent des conidies ; F : Conidies mature non septés ; G : Asques contenant des huit ascospores (Gx10). H : Asque contenant des ascospores (Gx40)	
Figure 3.16:	81
Les différentes fructifications sur écorce ; A.B.C.E : Différentes formes de fructification de pycnide sous loupe (Gx8) ; D : Forme de fructification des périthèces (Gx8). F.G.H.I : Fructification des pycnides sur écorce	
Figure 3.17 :	83
Vue microscopique et macroscopique de <i>Fusarium solani</i> ; A : Micro conidies et macroconidies de <i>Fusarium solani</i> ; B : Les monophialides (G : 40x10) ; C : Vue macroscopique de <i>Fusarium solani</i>	
Figure 3.18:	85
Vue microscopique et macroscopique de <i>Fusarium oxysporum</i> ; A : Micro conidies et macroconidies de <i>Fusarium oxysporum</i> G : 40x10; B : Les monophialides (G : 40x10) ; C et D : Vue macroscopique de <i>Fusarium oxysporum</i>	
Figure 3.19 :	87
vue microscopique et macroscopique du genre <i>phoma</i> ; A : Phialoconidies ; B : Pycnides ; C : Phialides ; D : Mycelium	
Figure 3.20 :	88
Caractère macroscopique et microscopique d' <i>Eutypa</i> ; A : Caractère macroscopique sur PDA ; B : Cellules conidiogènes libèrent des conidies (stylospores) ; C : Stylospores ; D : Fructification sur écorce d'agrumes	
Figure 3.21:	89
Vue microscopique et macroscopique d' <i>Alternaria</i> sp ; A : Vue macroscopique d' <i>Alternaria</i> sur PDA ; B : Mycélium cloisonné et conidies d' <i>Alternaria</i> sp (G : 40x10)	
Figure 3.22 :	90
Vue macroscopique et microscopique de <i>Colleotrichum</i> sp ; A : Culture sur PDA ; B : Acervule ; C : Conidies ; D : Asques et ascospores	
Figure 3.23 :	92
Fréquences des isolats fongiques	
Figure 3.24 :	95
Symptômes de test de pathogénicité. A et B : Nécrose sur tige ; C : Gomme sur tige ; D : Absence de nécrose sur le témoin ; E : Dessèchement des plantules de bigaradier ; F : Dessèchement des extrémités des rameaux ; G : Dégarnissement et dessèchement des extrémités des rameaux ; H : Dégarnissent des rameaux ; I : Dessèchement des brindilles	

	Pages
Tableau 1.1: Grille de sélection d'un porte-greffe en fonction des aptitudes recherchées	16
Tableau 1.2 : Production mondiale des agrumes	17
Tableau 2.1 : Produits utilisés pendant la campagne 2014/2015	43
Tableau 2.2 : Echelle d'évaluation des symptômes du dépérissement	47
Tableau 3.1 : Taux d'infection, de gravité et l'incidence de dépérissement dans l'ensemble des vergers	68
Tableau 3.2: Taux de dépérissement pour les deux catégories de vergers	70
Tableau 3.3 : Taux de dépérissement dans l'ensemble des vergers étudiés	72
Tableau 3.4 : Présentation des espèces identifiées et les souches de référence du GenBank.	86
Tableau 3.5 : Fréquences d'isolement des champignons pour chaque culture	91
Tableau 3.6: Nombre d'isolat fongique selon le type de nécrose	93
Tableau 3.7 : Résultats symptomatologiques du test de pathogénicité	94

## 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 116 millions de tonnes en 2013 [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, elle représente 45% de la superficie agrumicole et contribue avec 50% dans la production nationale des agrumes [2]. La wilaya de Blida avec une superficie qui dépasse les 17429 ha et assure une production de 4400159 qx représente la grande partie de cette plain [3].

Autrefois, l'Algérie était classée parmi les plus grands producteurs d'agrumes dans le monde, avec une valeur ajoutée considérable. Actuellement, la réalité est tout autre, l'agriculture algérienne et surtout 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 de plans de redressement.

Malgré les efforts fournis suite au lancement du programme national de développement agricole (PNDA) 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, 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 très dommageables sur les potentialités de production et menacent gravement le patrimoine agrumicole.

Plusieurs situations de dépérissement gravissimes 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 de réponse précise ; le cas du Citrus Blight en Floride (USA) [8] dont la causalité biotique n'est pas déterminée jusqu'à présent d'une manière claire et précise. 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 signalés 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 de maraichage suite à l'échec des opérations de remplacement des arbres dépéris. L'ensemble de ces études a révélé, après des diagnostics phytopathologique, 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 apporter une contribution complémentaire pour élucider ce problème de dépérissement. A cet effet un diagnostic symptomatologique a été réalisé sur terrain pour l'évaluation de la progression des dépérissements. Sur la base de ce diagnostic un travail de laboratoire a été effectué pour détecter et isoler 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 se croisent naturellement entre eux et sont sujets à des mutations. Ils appartiennent à la famille des Rutacées qui comprend trois genres : *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* qui est le plus important avec 145 espèces. C'est au sein de ce dernier que se rencontrent les principales espèces cultivées : les oranges, les citrons, les limes, les pomelos et les petits agrumes (clémentines, mandarines...) [13].

Depuis le temps, les critères de choix d'un plant d'agrumes ont évolué en entraînant un élargissement de la gamme des variétés et d'espèces disponibles pour servir de porte greffe. L'analyse bibliographie exhaustive faite par FILLERON [14] a permis d'élaborer une grille simplifiée de 15 porte-greffes, évalués par rapport à leur réponse à diverses contraintes. Elle permet d'orienter le choix du pépiniériste qui doit tenir compte de plusieurs critères ; entre autres ; contraintes pédoclimatiques, sanitaires, type de cultivar développé et conduite culturale choisie (Tableau 1.1).

#### 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 leurs sont néfastes. A – 3 °C, le gel peut affecter le feuillage, les jeunes pousses et même les rameaux. Par contre, les

températures élevées au moment de la floraison sont très endommageables pour les fleurs. Les Vents sont l'ennemi redoutable des citrus, ils provoquent la chute des fleurs, des fruits, des feuilles et arrivent même à dégarnir les rameaux [15].

Les agrumes sont des cultures d'origine tropicale, donc 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 [15]. 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. Pour le climat de la Méditerranée, il y a cinq (5) périodes durant lesquelles l'irrigation est nécessaire, mais à des volumes variables : d'avril à mi-mai est de 50 à 60 mm/mois, de mi-mai à mi-juillet 90 mm/mois, de mi-juillet à mi-août 120 à 130 mm/mois, de mi-août à fin septembre 90 mm/mois et de fin septembre à fin octobre 50 à 60 mm/mois.

### 1.2. Exigences édaphiques

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 [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...) [16].

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

<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Détail des observations
Conduite en pépinière	F	F	D	F	M	F	-	F	M	T D	D	F	D	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 M : moyennement adapté N : non adapté
Terre limoneuse	M	M	B	B	M	N	N	N	B	B	M	M	-	B	M	
Résistance sècheresse	B	M	M	M	M	M	M	B	N	N	M	M	-	M	B	
Sol calcaire	B	M	M	N	N	N	N	M	N	M	B	M	-	-	M	
Sol acide	N	M	M	B	B	B	B	M	B	B	M	-	-	B	M	
chlorures	B	M	M	N	N	M	M	M	N	N	M	M	B	M	B	
bore	B	M	M	M	M	M	-	-	N	N	M	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	15	Détail des observations
phytophthora	R	R	R	T	T	T	R	S	T	R	S	T	-	T	S	R résistant
Pourridiés	R	R	R	S	S	-	-	R	T	T	S	T	-	T	S	T tolérant
Nématodes	S	S	S	-	M	M	M	S	T	T	S	S	-	-	M	M moyennement sensible
Charançons	T	S	-	S	S	S	-	S	S	-	S	S	-	-	S	S sensible
<b>Maladies d'association</b>																
<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Détail des observations
Blight	S	M	-	S	S	M	M	S	S	-	M	-	-	-	S	R résistant
Tristiza stricte	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	-	T	T	T tolérant
Tatter leaf	-	T	T	S	S	S	S	-	S	S	T	T	-	T	T	M moyennement sensible
Exocortis	T	T	T	S	S	M	T	T	S	S	T	T	-	-	S	S sensible
<b>Viroses affaiblissant le bois</b>																
<b>Porte-greffe</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Détail des observations
Psorose	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	-	S	-	T	S	R résistant
Cristacortis	T	S	-	T	T	T	-	T	T	T	S	S	-	T	S	T tolérant
Xyloporose	S	T	-	T	T	T	-	M	T	T	T	S	-	-	S	M moyennement sensible
Tristiza Stem pitting	S	-	-	T	T	T	T	T	R	R	T	M	-	T	S	S sensible
1 Allemow citrus macrophylla						6 Citrumelo 4475					11 Mandarine					
2 Bigaradiers communs						7 Citrumelo Sacaton					Cléopâtre					
3 Bigaradier Gou Tou						8 Citrus Volcameriana					12 Tangelo Orlando					
4 Citrange Carrizzo						9 Poncirus Trifoliata					13 Severnia buxifolia					
5 Citrange Troyer						10 Poncirus Trifoliata flying- Dragon					14 Mandarine Fuzhu					
															15 Lime Rangpur	

### I.3. Importance économique

#### I.3.1. Dans le monde

Selon les données statistiques de la FAO [1], en 2013 plus de 142 pays produisaient des agrumes avec une production annuelle qui a dépassé les 116 million de tonnes. Les agrumes sont classés parmi les trois principales cultures fruitières dans le monde dont (60% d'Oranges, 18% de Petits agrumes « Mandarines et Clémentines », 11% de Citrons et Limes, et 5% de Pomelos). 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]. Les principaux pays producteurs d'agrumes sont le Brésil, les pays du bassin méditerranéen, la Chine et les États-Unis. Ces pays comptent plus des deux tiers de la production totale d'agrumes [1].

Tableau 1.2 : Production mondiale des agrumes [17]

Espèces	Production en million de tonnes		
	2011/2012	2012/2013	Premiers pays producteurs
<b>Oranges fraîches</b>	<b>53,61</b>	<b>51,29</b>	<b>Brésil, USA, Chine</b>
<b>Mandarines et tangerines</b>	<b>23,62</b>	<b>24,20</b>	<b>Chine, UE, Japon</b>
<b>Pamplemousses</b>	<b>5,62</b>	<b>5,24</b>	<b>Chine, USA, Afrique du sud</b>
<b>Citrons et limes</b>	<b>6,67</b>	<b>6,58</b>	<b>Mexique, Argentine, UE</b>

#### I.3.2. En méditerranée

Après une production méditerranéenne d'agrumes record de 22,5 millions tonnes en 2013-2014, le Comité de liaison de l'agrumiculture méditerranéenne (CLAM) qui regroupe la majorité des pays méditerranéens producteurs et exportateurs d'agrumes dont l'Espagne, le Maroc, la Turquie, l'Italie, l'Égypte, la Grèce, la Tunisie, prévoit une baisse pour la campagne 2014-2015. Il s'attend à un recul d'environ 7% imputé à des pays comme l'Italie (-24%), l'Espagne, le Maroc et la Grèce (de -10 à -15%). Deux facteurs expliquent cette situation :

l'alternance végétative, phénomène propre à la production agricole, qui impacte, d'une année à l'autre le rendement et les conditions climatiques défavorables, notamment les excès de température et l'absence de pluies, dont souffriraient certains pays [18].

### I.3.3. En Algérie

L'agrumiculture en Algérie est très ancienne, elle a été introduite bien avant la Période coloniale. Depuis une vingtaine d'année la production annuelle d'agrumes est estimée de 400 000 tonnes. L'Algérie se trouve ainsi placée au dixième rang mondial et compte parmi les grands producteurs du bassin méditerranéen [19]. Les statistiques les plus récentes (2015) du ministère de l'agriculture et du développement rural évaluent à 66 155 ha les superficies consacrées aux agrumes en Algérie dont 59 565 ha sont en rapport assurant une production de 12 251 616 qx avec un rendement de 220 qx/ha. Elles sont localisées en grande partie dans la région Centre où elle occupe 35 056 ha [2].

Selon les statistiques établis par le ministère de l'agriculture et du développement rural, la plaine de la Mitidja, comptabilise 45% de la superficie agrumicole et contribue avec 50% dans la production nationale des agrumes. Les superficies agrumicoles de la wilaya de Blida représentent la grande partie de cette plaine, elles dépassent les 17 429 ha en assurant une production de 4 400 159 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 mycoplasmes, les champignons et les virus. En plus de plusieurs maladies qui causent la mort des arbres (dépérissement) ou limite sérieusement la production, il y a beaucoup de problèmes qui exigent un programme de contrôle.

Nous désignons par maladies de dépérissement des affections variables par leur nature, mais caractérisées par une évolution généralement lente, aboutissant le plus souvent à la mort de la plante entière [21].

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

Historiquement, les virus ont été les maladies les plus destructives en agrumiculture. La Tristiza (CTV) a été parmi les problèmes majeurs, mais le complexe de psorose ainsi que les viroïdes sont les plus importants facteurs limitant la production des agrumes. Les maladies à virus sont considérées comme les plus graves affections qui peuvent atteindre les agrumes, car leur action néfaste entraîne dans la plupart des cas le dépérissement complet [22].

#### II.1.1. La Tristeza

Le *Citrus Tristiza Virus* 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 (Afrique du sud, Argentine, Brésil, Espagne, etc.) ; des millions d'arbres greffés sur Bigaradier ont été décimés par le CTV [23]. Ce virus est considéré comme une des affections les plus destructives de toutes les plantes cultivées [24]. 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 [25].

Le virus de la tristeza appartient à l'ordre des *Nidovirales*, famille des *Closteroviridae* et au genre *Closterovirus* [26]. Ce virus mesure 10 à 12 µm de largeur et 2.000 µm de longueur, il présente une forme filamenteuse très facilement observable sous microscope électronique. La particule virale contient un ARN monocaténaire d'environ  $6,5 \times 10^6$  Da enveloppé par une capsidie protéique. La propagation de la maladie se fait par bois de greffage et par plusieurs espèces de pucerons selon le mode semi-persistant : *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Myzus persicae*, *Toxoptera aurantii* et *Toxoptera citricida*. Les aphides virulifères sont capables de transmettre le virus 24 h après son acquisition.

Il existe trois souches de virus différentes par leur sévérité, la spécificité du vecteur et de la gamme d'hôte [27] :

La souche I (CTV-CD): provoque un dépérissement rapide qui entraîne la mort brutale de l'arbre.

La souche II (CTV-SP) : entraîne le bois strié, elle est considérée comme étant une souche sévère, causant des striures ou cannelures dans le bois. Cette souche cause une diminution de la productivité de l'arbre [28].

La souche III (CTV-SY) : qui provoque le jaunissement de semis, est une souche sévère induisant une chlorose pouvant amener à un fort dépérissement et même à la mort de l'oranger doux, du pamplemoussier et dumandarinier greffés sur bigaradier [28].

Les symptômes du CTV sont extrêmement variables et dépendent de la souche du virale, de l'hôte, de l'environnement, et du rapport de greffon / porte greffe [29]. Le symptôme le plus foudroyant de la tristeza est mort brutale (Quick Decline) affectant l'oranger, les mandariniers et les pomelos greffés sur bigaradier [23]. Le bois strié (Stem-Pitting) est le symptôme typique de la maladie, il est observé généralement sur limettiers, pomelos et certaines variétés d'orangers.

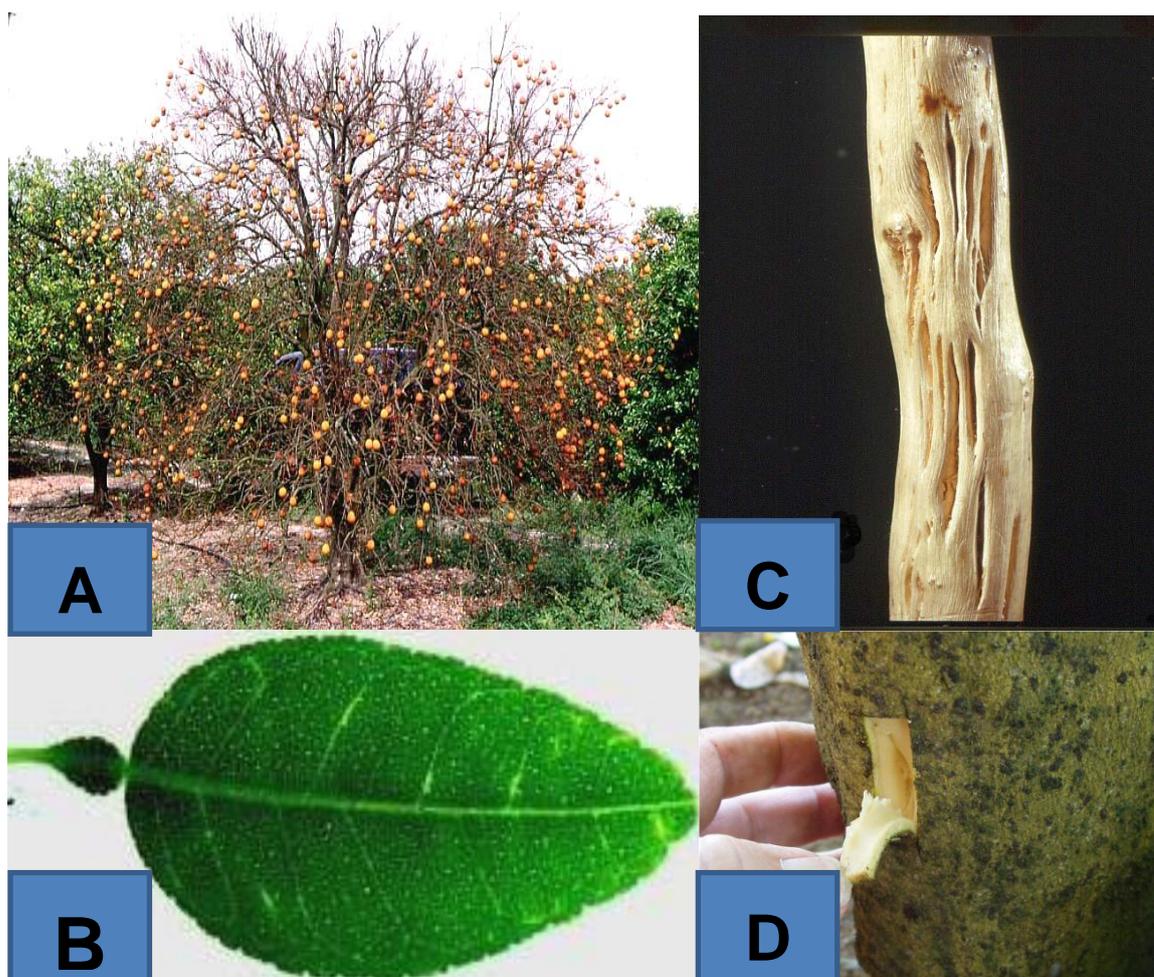


Figure 1.1 : Symptômes de la Tristiza ; A : Le déclin rapide de l'oranger ; B : Eclaircissement des nervures ;C : Bois strié (stem pitting) ; D : Formation non visible de crêtes sous l'écorce (stem pitting) [27, 28, 29]

### II.1.2. Les Psoroses

La Psorose des agrumes est la première maladie de type viral 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]. Beaucoup de phytopathologistes pensent que l'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 « *Citriovirus psorosis* » dont il existe plusieurs types, chacune étant responsable d'une forme de Psorose [31].

L'agent causal de la psorose est le *citrus psorosis virus* (CPSV ou le CPSaV), il appartient au genre des *ophiovirus* qui est proposé pour la

classification de le CPsV [32]. Le CPsV est un virus multipartite non enveloppé. Son génome est un ARN monocaténaire négatif (anti messenger), segmenté (trois segments d'ARN) et composé de 1100-1200 nucléotides. Il peut être détecté par TAS-ELISA, RT-PCR et par les plantes indicatrices (*Chenopodium quinoa*) [33,34].

On connaît actuellement 6 types de Psoroses affectant les agrumes [35], Les formes les plus graves sont les Psoroses A et B encore appelées « Scaly Bark » ou « Scaly Bark Gum » en Californie et « Gummosis » en Floride. Les Psoroses A et B, sont respectivement *Citriovirus psorosis var. vulgare* Faw et *Citriovirus psorosis var. anulatum* Faw. Les autres psoroses sont la gommose alvéolaire ou « Concave gum disease » et la gommose en poches ou « Blind pocket » ; La gommose alvéolaire et la gommose en poches sont respectivement dues à *Citriovirus psorosis var. concavum* et *Citriovirus psorosis var. alvatum*. Enfin, signalons la psorose à frisolée ou « Crinkly leaf » et la panachure infectieuse ou « Infections variegation » sont souvent associées [31].

La maladie se traduit par un écaillage spectaculaire de l'écorce du tronc et des branches des orangers, mandariniers, clémentiniers, tangelos et pomelos. La psorose B est la forme sévère avec laquelle l'écorce se détache par grands lambeaux verticaux. La psorose A est une forme moins sévère qui consiste en des éclaircissements en tirets : elle n'affecte que les jeunes feuilles, alors que dans le cas de la psorose B, des symptômes permanents de type « ringspot » se manifestent sur les feuilles adultes [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. Le greffon doit être prélevé sur un sujet sain, ayant au moins vingt ans, ce qui laisse le temps à la psorose de se manifester [31].

### II.1.3. L'Exocortis

La maladie de l'Exocortis est causée par le viroïde *Citrus exocortis viroïd* (CEVd), Cet agent pathogène se différencie des virus par sa très faible masse moléculaire. C'est une molécule d'ARN de faible poids moléculaire d'environ 371 nucléotides (10 fois plus petite que le plus petit virus à acide ribonucléique). Ce viroïde est caractérisé par son fort pouvoir infectieux, sa haute résistance à la chaleur, sa transmission par les outils de taille, par l'intermédiaire de la sève en plus de sa transmission classique par les greffons lors des greffages en pépinière et par les symptômes caractéristiques qu'il provoque. Elle ne se manifeste en orangerie que sur les arbres greffés sur *Poncirus trifoliata* et les citranges. Le virus peut être hébergé dans les plants greffés sur bigaradier [30, 36].

Les symptômes en orangerie sont facilement reconnaissables. Ils se manifestent 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 [36].

### II.1.4. La Xyloporose (cachexie)

La cachexie xyloporose est observée dans la plupart des régions agrumicoles du monde ; elle est également présente dans le bassin méditerranéen et même en Afrique du Nord, mais sans importance économique malgré sa progression constante. La cachexie xyloporose est une maladie à viroïde causée par *Citrus cachexia viroid* (CCaVd), c'est un ARN de faible poids moléculaire avec environ 300 nucléotides, nommé et décrit pour la première fois par Childs en 1950 [37].

La maladie entraîne un affaiblissement de l'arbre sur lequel une forme de dégénérescence est observée ; la frondaison prend un aspect rabougri, clairsemé, ses feuilles sont chétives et localisées surtout vers les extrémités des rameaux, les feuilles jaunissent et tombent progressivement. Il y a Présence de petites dépressions étroites et longitudinales dans le bois au niveau de la ligne du

greffage. Les arbres fortement atteints périssent plus ou moins rapidement en enlevant l'écorce au niveau du greffon et du porte-greffe [38]. Cette maladie se dissémine principalement par l'homme durant l'échange du matériel végétal pour le greffage, et par transmission mécanique pendant la taille. Il n'y a pas de transmission par la graine [39].

#### II.1.5. Le Stubborn

Le stubborn est une grave maladie des agrumes, qui en conditions chaudes et sèches peut fortement réduire la qualité et la quantité de la production. L'agent causal *Spiroplasma citri*, est un procaryote vasculaire de type mollicute limité au phloème, cultivable sur milieu de culture. Il est transmissible par greffage et par deux espèces de Cicadelles, *Circulifer tenellus* et *Neoliturus haematoceps* [40, 41, 42, 43, 44].

Les arbres atteints sont plus ou moins rabougris. Les feuilles sont plus courtes et plus larges, bombées, anormalement dressées, parfois marbrées ou chlorotiques. En conditions très chaudes, les feuilles de certaines pousses peuvent avoir leurs extrémités déformées, pointues ou jaunes et en forme de cœur. Les pousses peuvent être anormalement groupées et le développement de bourgeons axillaires peut entraîner l'apparition de balais de sorcières. La production de fruits tend à être supprimée sur les plantes touchées. Les fruits peuvent être petits, dissymétriques ou en forme de cupule (c'est à dire avec un zeste épais à la base et fin à l'extrémité), ils peuvent présenter des inversions de couleur (l'extrémité pédonculaire se décolore alors que l'extrémité du côté du stylet reste verte) [40, 41, 42, 43, 44].

## II.2. Les maladies bactériennes

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

Les synonymes de la maladie du "dragon jaune" ou Huanglongbin (HLB) sont les suivants: verdissement des agrumes, tige jaune, marbrure des feuilles et dégénérescence des tubes criblés du phloème. La bactérie du HLB infecte presque tous les hybrides, cultivars et espèces d'agrumes ainsi que certaines

espèces proches des agrumes. La bactérie du HLB est transmise par deux psylles: *Trioza erytreae* et *Diaphorina citri* [45]

Cette maladie est due à une bactérie située exclusivement dans les tubes criblés du phloème des plantes atteintes, *Candidatus Liberibacter*. 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 [45].

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, le goût du fruit devient amer [45].

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

La chlorose variéguée des agrumes ou en anglais «*Citrus Variegated Chlorosis*» (CVC) affecte toutes les variétés commerciales d'oranges issues de différents porte-greffes; elle est causée par *Xylella fastidiosa*, une bactérie fastidieuse Gram-négative confinée au xylème, en forme de bâtonnet avec des parois cellulaires ondulées caractéristiques. Elle n'est pas flagellée, ne forme pas de spores et mesure 0,1 à 0,5 µm x 1 à 5 µm. Cette bactérie ne prolifère que dans les vaisseaux du xylème des racines, tiges et feuilles. Les vaisseaux sont finalement bloqués par des agrégats bactériens et par des gommages produits par la plante [46, 47, 48].

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. Puis, la maladie se répand, 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 teneur en sucre du fruit infecté est supérieure à celle du fruit non contaminé et il parvient plus vite à maturité. La bactérie est transmissible par plusieurs espèces d'insectes piqueurs- suceurs ; les plus importants sont *Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai*, et *Oncometopia fascialis* [49, 50].

### II.2.3. Le chancre des agrumes

Le chancre bactérien est une maladie très grave sur les agrumes dans le monde entier, cinq formes de la maladie ont été décrites jusqu'à présent, les chancres "A", "B", "C", "D", et "E". L'agent causal de la maladie est la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), il se classe actuellement sous trois pathovars, *citri* (la souche "A"), *aurantifolii* (les souches B/C/D"), et *citrumelo* (la souche "E") [51, 52, 53, 54].

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 taille de la lésion dépend de l'âge du tissu végétal lorsque la lésion commence et de la sensibilité du cultivar. La prévalence de lésions chancreuses entraîne l'abscission de la feuille, la chute du fruit et le dépérissement du rameau [51, 52, 53, 54].

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 l'absence de mesures de lutte adéquates [55, 56].

### 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 gommose parasitaire, le mal secco et le pourridié. 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 à leur début. Plus la maladie est avancée, moins la lutte est aisée. [50, 57].

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

Les agents pathogènes de cette maladie sont des champignons d'origines telluriques ; *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*. C'est une affection qui touche les tout 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 « tache d'huile » en présence des conditions optimales ; température entre 10 et 30°C, humidité élevée et un faible taux de lumière [58].

#### 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 ; mildiou des Agrumes, gommose parasitaire, chancre du collet et pourriture du collet en France, mal di gomma (Italie), gommosis deltronco (Argentine) et gummosis dans les pays anglophones [59].

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*[60].

La distribution et la virulence des différentes espèces de *Phytophthora*, aussi bien dans l'espace que dans le temps, sont fonctions de la température et de l'humidité :

- *Phytophthora citrophthora* (Sm.) Leonian, la température optimal (in Vitro) est de 25°C, la croissance est rapide entre 15 et 30°C ;
- *Phytophthora parasitica* Dastur, l'optimum est de 32°C. (in vitro). Quand la température devient inférieure à 15°C, la croissance du champignon est arrêtée [60].

La présence de cils chez les zoospores leur procure une vie strictement aquatique. Les eaux d'irrigation et de pluie leur servent de véhicules et causent de nouvelles infestations [60].

Le champignon pénètre à la faveur d'un point de moindre résistance, telles que les blessures, les cicatrices mal fermées et les craquelures de l'écorce, il se loge entre l'écorce et le liber, et ne tarde pas à encercler tout le tronc [60].

Selon (Wyss ; Graham et Timmer) [58, 61] dans le cas des attaques avancées, le champignon infect 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 gommés ayant une odeur acide qui obstrue les vaisseaux de la plante, engendrant un arrêt de la circulation de la sève. 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 : l'écorce et le bois sous-jacent sont tués.

La lutte préventive consiste essentiellement à utiliser des porte-greffes résistants à *Phytophthora* comme le bigaradier, le mandarinier cléopâtre, poncirus trifoliata, les citranges et les citrumelos. Il est conseillé de pratiquer le greffage haut, pour protéger le greffon des contaminations. Il faut surtout éviter la plantation des agrumes dans les bas-fonds sans étudier le drainage à faire dans les sols lourds. L'Irrigation en goutte à goutte ou en système de double cuvette permet d'éviter le contact de l'eau avec le pied de l'arbre. La lutte curative peut donner des résultats uniquement dans le cas d'une affection partielle du tronc. Si l'attaque est bien avancée, il est préférable d'arracher l'arbre [62].

### 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 [63]:

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 [63].

### 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, dans les plantations [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. 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 sûr ne peut être établi que sur le système racinaire [31].

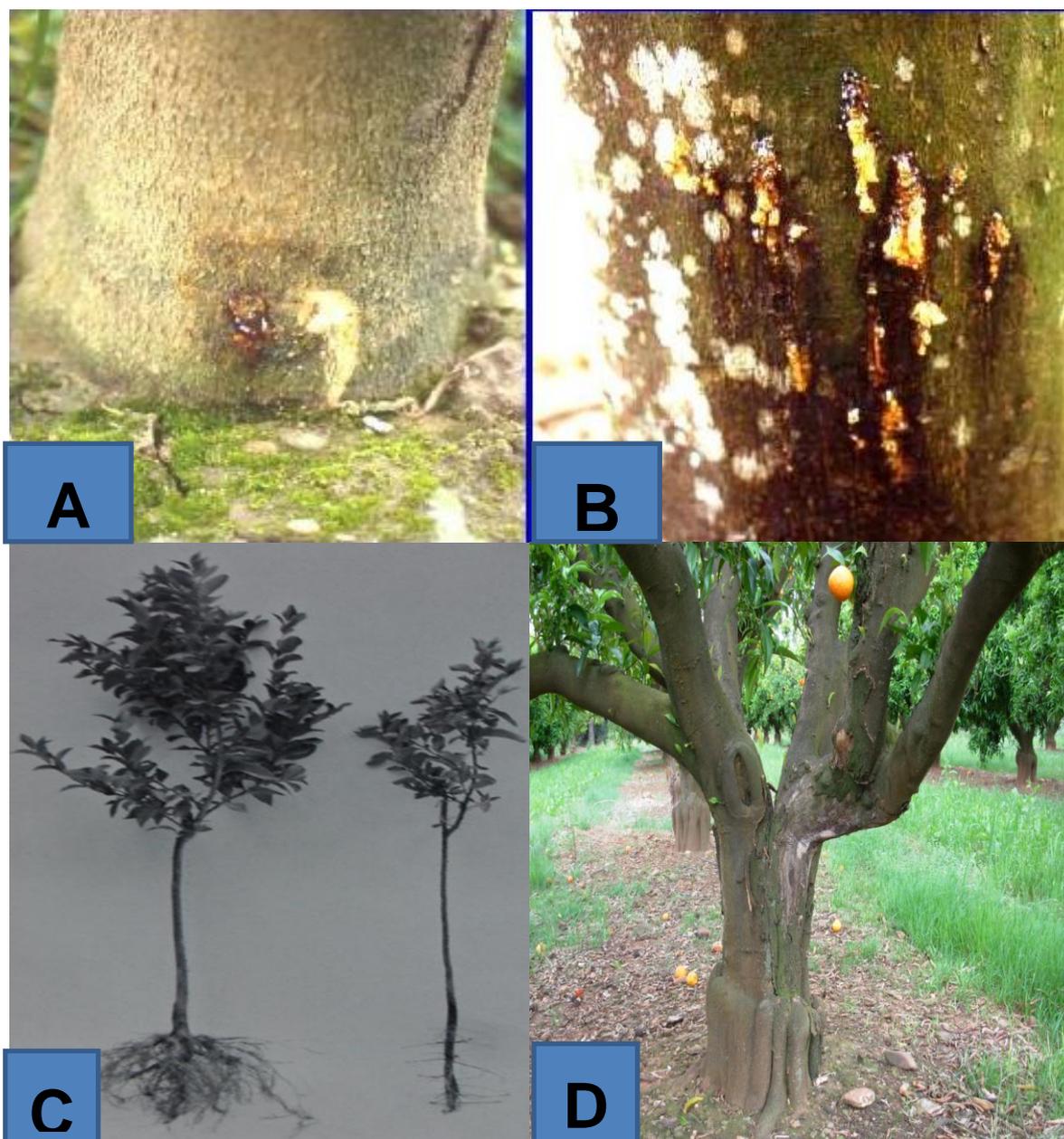


Figure 1.2 : symptômes de la gommose à *Phytophthora* [60]; A : Début d'exsudation de gomme; B : la gommose dans un stade avancé ; C : Symptômes de la pourriture fibreuse de racines causée par *Phytophthora* spp ; D : pourriture brune due à *Phytophthora*.

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

Cette pourriture est due à *Armillaria mellea* (vahl), elle est signalé 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. Sur la surface de la racine se forment des rhizomorphes violacés qui stimulent de petites racelles; ils sont constitués par des vaisseaux de filaments mycéliens dont la couche externe durcit et forme une carapace [64].

#### II.3.4.2. La pourriture à sclerotinia

Deux espèces sont particulièrement pathogènes sur les racines de *Citrus* : *Sclerotinia sclerotiorum* et *Sclerotinia gummosis* qui attaquent le tronc, les rameaux des arbres dont ils déterminent le flétrissement. Ces champignons causent également la pourriture des racines et des fruits (pourriture cotonneuse des fruits) [65].

#### II.3.4.3. La pourriture à clitocybe

L'agent de cette pourriture est *Clitocybe tabescens*, de position systématique très voisine de celle de l'Armillaire. Ce Champignon n'est pas spécifique des *Citrus*; de nombreux arbres fruitiers et forestiers sont sujets à ses attaques. C'est seulement en Floride qu'il a été observé sur les *Citrus* et, plus particulièrement, sur le porte-greffe (*Rough lemon*) et l'oranger. Il semble que le bigaradier résiste à cette maladie. La distinction entre les clitocybes et l'armillaire n'est pas toujours aisée. On se base généralement sur la présence d'un anneau chez la forme parfaite de l'armillaire, alors que celle du Clitocybe n'est pas annelée [66]

#### II.3.4.4. La Pourriture sèche

La pourriture sèche a été observée en californie, à cuba, en australie, en italie, au sud de la russie et en zenbabwe. Cette maladie a été signalée comme une nouvelle maladie très grave des agrumes en grèce [66],

Les premiers symptômes détectés par les agrumiculteurs, montrent que les feuilles se fanent subitement et sèchent en place comme dans le cas de quick decline ou que quelques feuilles tombent, en donnant une apparence ouverte 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 [60].

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) [65].

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 craquelle. 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 principale de ce problème. Les agents de la gommose à *Phytophthora* n'envahissent pas le bois sous les couches du cambium [60].

Parfois la partie affectée émette une odeur bizarre. L'apparence de la végétation de l'arbre dépend du nombre des racines affectées et l'ampleur à laquelle le bois du collet est impliqué. Tous les portes greffes communs sont susceptibles, y compris les trifoliés et le Citrange Troyer qui sont résistants à la gommose de la pourriture brune [60].

Bien que tous les facteurs et la séquence de développement de la maladie ne puissent pas être évidents, l'altération des racines ou des tissus du collet par un ou plusieurs agents ouvrent apparemment le chemin d'initiation de la maladie. L'entrée peut être provoquée par l'asphyxie des racines fibreuses par l'excès

d'irrigation; l'infection ou l'altération de l'écorce des racines et le collet par les champignons de la gommose, les engrais organiques ou inorganiques, les herbicides et les travaux de sol. La blessure initiale de l'arbre peut se produire peu après la plantation ou à toute période la vie de la plante, et plusieurs années peuvent passer avant que le trouble cause des symptômes apparents sur la partie aérienne de l'arbre. La pourriture sèche racinaire peut commencer à partir d'une racine fibreuse pourri, ou grande racine, et progresse jusqu'à la plus grande racine et finalement dans le collet de l'arbre. La contamination et la pourriture peuvent passer du collet aux plus grandes racines [60].

Les isollements à partir du bois affecté donnent généralement une ou plusieurs espèces de *Fusarium* et des bactéries et occasionnellement des parasites secondaires des agrumes trouvés dans le sol. Dans les coupes microscopiques du bois, *Fusarium sp.*, est vu progresser à travers les cellules vivantes de rayons médullaires et dans les vaisseaux conducteurs de la sève brute. Heureusement, dans la plupart des cas de dommage des racines fibreuses, *Fusarium spp*, les bactéries, et les autres parasites secondaires sont insuffisamment actifs dans le bois [60].

#### II.3.4.5. La pourriture cotonneuse des racines

Cette pourriture porte le nom de (Texas root-rot) au Texas où elle a été observée pour la première fois. Elle est due à *Phymatotrichum omnivoruni* (Shear), encore appelée *Ozonium omnivorum* Shear et *Ozonium auricomum* Lk [67]. Elle présente une vaste répartition géographique, rencontré au Texas, en Arizona, Oklahoma, Sud de la Californie, Mexique, aux îles Hawaï où elle a été signalé pour la première fois par Chung (1923). Le parasite est remarquable par sa polyphagie qui ne cesse de s'étendre sur de nouvelles plantes. Aussi peut-on dire que presque toutes les espèces dicotylédones sont attaquées. Les monocotylédones renferment des substances inhibitrices, et seul le maïs est atteint par cette affection [68].

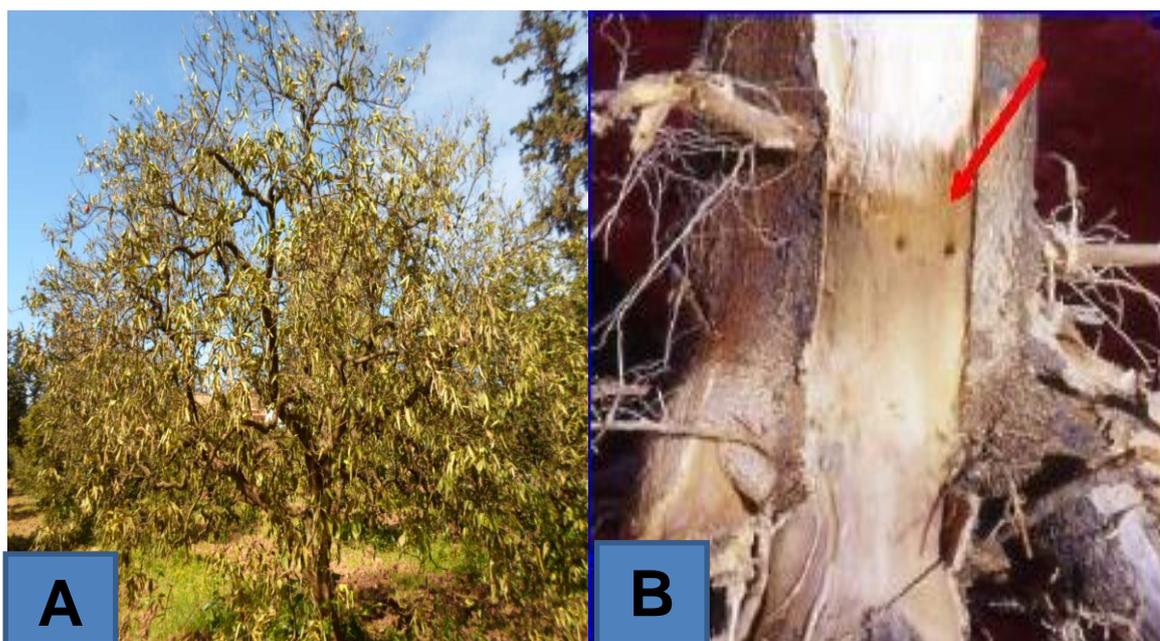


Figure 1.3 : symptômes de la pourriture sèche racinaire [60] ; A : flétrissement puis le dépérissement brutale ; B : brunissement de la partie basale du tronc.

#### II.3.4.6. La Pourriture à *rosellinia*.

Deux espèces pathogènes du genre *Rosellinia* sont responsables de cette pourriture *Rosellinia pepo* Pat et *Rosellinia bunodes* Sacc [65]

Elles se rencontrent en Guadeloupe, Dominique, Martinique, Saint-Lucien, Saint-Vincent, Grenade. La majorité des plantes fruitières cultivées sont susceptibles d'être parasitées, particulièrement les *Citrus* [68].

La forme conidienne de ces champignons se rapporte au genre *Dematophora* (*Rosellinia pepo*) Pat. A la surface de la racine, se forment des trames plus ou moins condensées de mycéliums gris devenant noir en vieillissant ; d'abord superficiel, il pénètre ensuite à l'intérieur de l'écorce dans la région cambiale en suivant le trajet des rayons médullaires, possède une forme imparfaite conidienne qui apparaît, d'ailleurs, avant les périthèces (*Rosellinia bunodes*) Sacc. Le mycélium envahit la racine qui devient verdâtre à cause des dégâts mycéliens. Ce mycélium forme d'abord des plages, puis ne tarde pas à combler les vides, en formant des manchons sous forme de rhizomorphes dont la pénétration profonde jusqu'au cambium [68]

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

*Diplodia natalensis* Pole-evans et *Dothiorella* (*Botryosphaeria ribis*) sont des *Botryosphaeriaceae* qui peuvent provoquer des pourritures de bois, de l'écorce et de fruit en Ghana, Cuba et USA [60].

#### II.3.5.1. La gommose à *Diplodia*

Dans le cas des attaques légers, la gommose à *Diplodia* apparaît sur une partie de l'arbre et se traduit par des petits morceaux d'écorce mortes accompagnées parfois d'une excrétion de gomme. Les plaies, une fois cicatrisées, sont définitivement guéries. Dans les cas sévères, les grandes parties d'écorce sont tuées et le bois sous-jacent noirci et meurt par invasion du champignon à partir des parties de l'écorce attaquées [60].

Chez les arbres affaiblis par le froid ou d'autres causes, le champignon peut causer une "pourriture du cœur" ou la "pourriture du bois". La pourriture est accentuée par d'autres champignons. Généralement, le champignon gagne l'entrée des blessures. Un champignon *Dothiorella* (*Botryosphaeria ribis* Dug) induit une semblable gommose, surtout sur citron [60].

Un type de gommose sur citrons en Floride a été associé à l'effet de la combinaison de *Diplodia* et *Phomopsis* de même que, en Californie, une gommose sévère est associée aux mêmes champignons. L'association de ces deux champignons peut induire une affection beaucoup plus sévère que celle produite quand l'un ou l'autre agit seul. Les couches externes d'écorce sont tuées, une gomme copieuse est induite, l'écorce intérieur est renouvelé sur la plupart des parties, en laissant des poches mortes et la production d'un écaillage et d'une craquelure d'écorce, avec détérioration lente de l'arbre. Les périodes de déclin et de guérison partielle semblent suivre l'un de l'autre. Les extrêmes de froid et de chaleur, les blessures et le développement affaibli par plusieurs causes peuvent favoriser cette maladie [60].

### II.3.5.2. La pourriture à *Diplodia*

La pourriture à *Diplodia* sur oranger et pamplemoussier s'est produite surtout en Floride, et sur le citron en stockage au Californie.

Une légère décoloration et une forte flexibilité de la fin de la tige sont bientôt suivies par une décoloration translucide brune semblable à la pourriture de la fin de la tige due à *Phomopsis* et *Dothiorella*. Sur citron, en Californie, la couleur peut changer du jaune miel au marron sombre avec l'intérieur habituellement plus sombre que celui de la pourriture de la fin de la tige due à *Phomopsis*. Cette pourriture est favorisée par des conditions de gel, des températures anormalement hautes, les brindilles mortes et de l'abondance d'insectes d'écaillage [60].

### II.3.5.3. La gommose à *Dothiorella*

La gommose à *Dothiorella* associée à *Btryosphaeria ribis* se produit le plus souvent sur limon. Il forme habituellement des poches de gomme sur le tronc et les grosses branches duquel la gomme s'exsude. Les tissus de l'intérieur de l'écorce sont souvent désagrégés, en laissant des cavités étirées et des stries à l'intérieur de l'écorce à côté du cambium. Le bois au-dessous est souvent décoloré pour une courte distance. La lésion a tendance à être soi-même-limitée [60].

### II.3.6. L'Anthracnose

Cette maladie est causée par *Colletotrichum gloeosporioides* Peuz. 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. C'est ainsi que les jeunes rameaux et les extrémités des branches se dessèchent provoquant la chute des feuilles. La lutte à base de fongicide est difficile. Il est conseillé de maintenir les arbres dans d'excellentes conditions de végétation. Après l'apparition de la maladie, il est conseillé d'éliminer par la taille et d'incinérer les rameaux et les branchettes touchés [62].

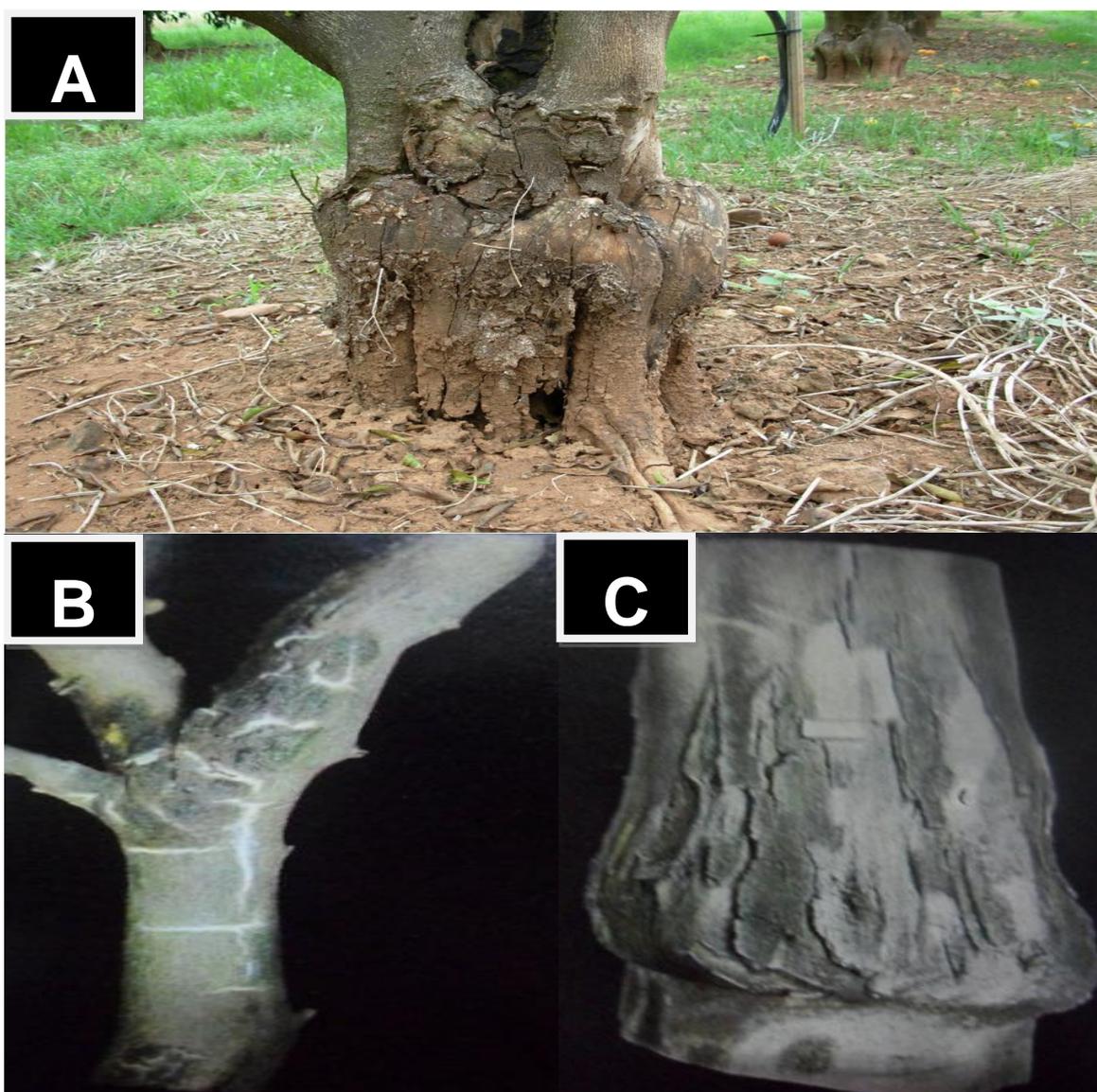


Figure 1.4 : Symptômes de la pourriture à *Botryosphaeriaceae* [60]; A : Pourriture du cœur provoquée par *Diplodia* ; B : Fissure et craquelure sur branche due à *Dothiorella*; C : Ecaillage de l'écorce due à *Diplodia natalensis*

### 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 bigaradier, cédratier, bergamotier. La plus part des cultivars d'oranger, de mandarinier, de clémentinier et de pamplemoussier ne sont qu'occasionnellement affectés [70]. Ce champignon

est présent dans le bassin méditerranéen (Grèce, Italie, Albanie, Algérie, Palestine, Liban, Syrie, Turquie, Tunisie, Chypre) et aussi en Russie (région du Caucase), en Georgie, en Irak et au Yémen. [71]

C'est une maladie cryptogamique qui touche les tissus conducteurs et entrave la circulation de la sève. La maladie pénètre dans la plante au niveau des blessures (probablement pas par les stomates) [72]. L'infection se fait par des conidies produites notamment par des pycnides au niveau des brindilles flétries. Ces conidies sont véhiculées par l'eau. L'infection aurait lieu à des températures comprises entre 14 et 28°C. 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, en Sicile les infections se déclarent généralement entre septembre et avril. Le champignon peut survivre au sol dans les bois de taille pendant plus de 4 mois [73].

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. Les feuilles desséchées tombent ensuite. Les brindilles et branches infestées présentent des zones grise plomb à gris cendré. Sur ces zones apparaissent des petits points noirs (les pycnides). Une coupe au niveau des zones infestées montre un bois rose saumon ou orange rouge et une production de gomme au niveau du xylème. Les brindilles et petits rameaux atteints meurent. Cette maladie s'étend ensuite vers le bas et atteint les grosses branches. Mal secco entraîne aussi un développement de bourgeons à la base des zones infectées et le développement de rejets sur le porte-greffe. Au départ, seule une partie de l'arbre est touchée au niveau des extrémités puis peu à peu la maladie s'étend vers le bas et atteint les grosses branches. Le dépérissement de l'arbre survient en un ou deux ans. Il existe deux autres formes de la maladie : le « mal fulminant » qui entraîne une mort rapide de l'arbre, après infection du système racinaire et le « mal nero » qui est une infection chronique du bois [73].

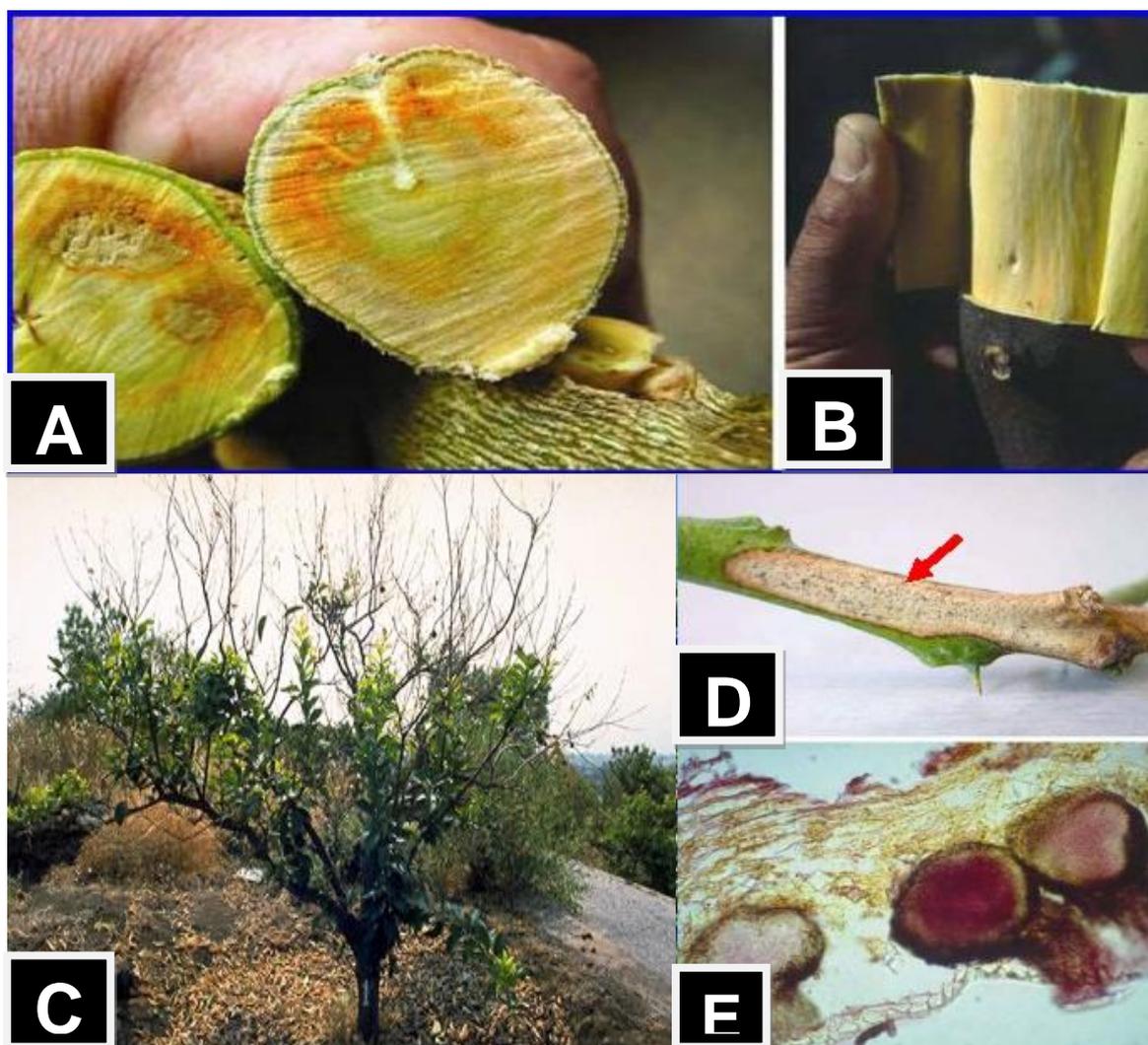


Figure 1.5 : Symptômes du Mal secco [75] ; [A] Décoloration orange-rougeâtre sur branche de mandarinier ; [B] Le rougissement typique du bois ; [C] Défoliation des extrémités des rameaux ; [D] Le dessèchement typique des extrémités des rameaux ; [E] Coupe tangentielle montrant les pycnides de *Phoma tracheiphila*.

#### II.4. Dépérissement d'origine inconnu

##### II.4.1. 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, avec un rythme annuel de pertes de 4 -7% dans les vergers atteints. En Floride les pertes sont estimées à 500 000 arbres par année [74]. Le blight affecte surtout le pamplemoussier (*Citrus paradisi*) et l'oranger (*C. sinensis*), son incidence est moindre sur citronnier (*C. limon*) et sur mandarinier (*C.*

*reticulata*). Les agrumes greffés sur *Citrus jambhiri*, *C. nobilis* et *Poncirus trifoliata* sont très sensibles. Les agrumes greffés sur *Citrus macrophylla*, *C. volkameriana* et *Citroncirus x webberi* sont sensibles eux aussi, mais ceux greffés sur *Citrus aurantium* et *C. reshni* sont tolérants et ceux greffés sur *C. sinensis* très résistants [74].

La cause du blight n'est pas encore connue. La maladie n'a pas été transmise par écussonnage ou greffe de parties aériennes, et les plantes obtenues à partir de racines ou de bourgeons de plantes atteintes sont saines [77]. L'agent pathogène semble donc ne pas être un virus, un phytoplasme ou un agent semblable à un virus. Nickel [78], cependant, la présence de l'ARN bicaténaires dans les plantes malades, a suggéré une étiologie virale. La maladie a été reproduite en plaçant des arbres adultes sains à côté d'arbres malades et en greffant ensemble leurs racines [79]. 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. [74].

Le citrus blight entraîne un déclin général du feuillage avec flétrissement, défoliation, dépérissement des rameaux et faiblesse des nouvelles pousses. Seul un secteur de l'arbre peut être atteint [76]. Les symptômes du citrus blight peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies à l'exemple du greening et la tristezza. La situation est encore compliquée par le fait que le citrus blight se rencontre en même temps que d'autres facteurs provoquant un déclin [80].

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET METHODES

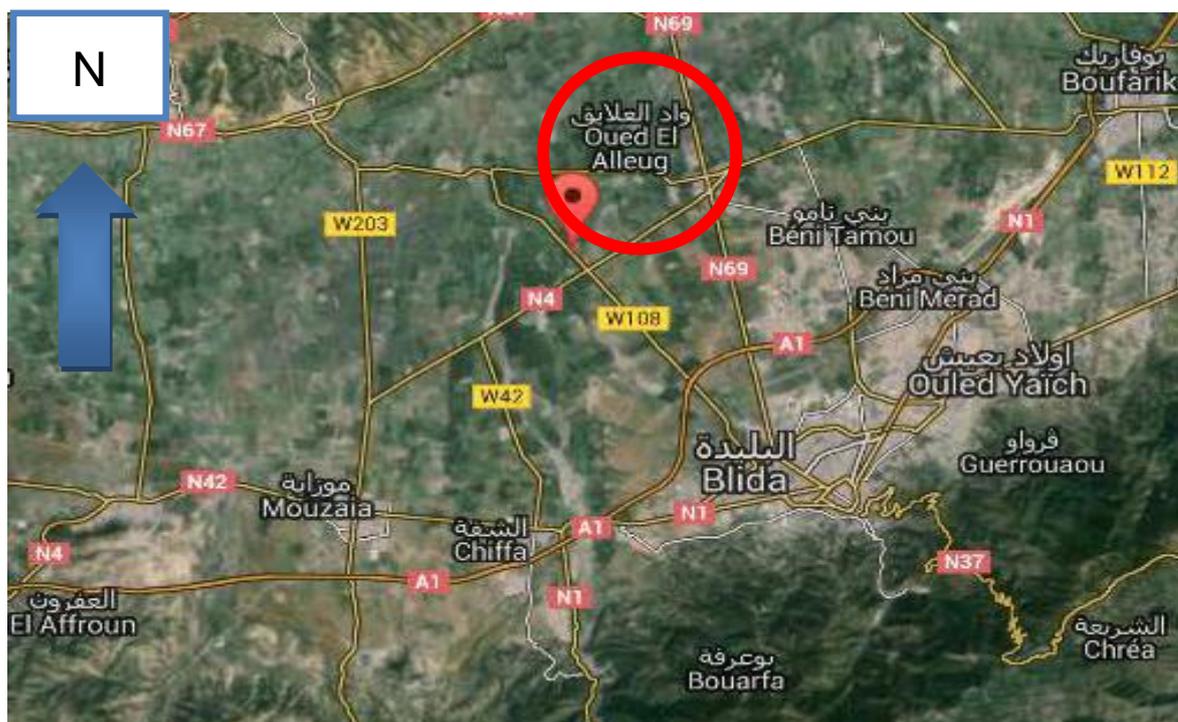
#### **I. La région d'étude**

La commune d'Oued El Alleug est le premier producteur national d'agrumes, avec une récolte estimée à 500.000 qx pour la dernière campagne agricole 2014-2015. Plus de 6840 agriculteurs activent au niveau du verger agrumicole de cette localité, s'étendant sur une surface de 2878 ha, répartie entre 161 exploitations agricoles collectives, 94 exploitations individuelles, et deux (2) fermes pilotes [3].

##### **I.1. Localisation**

L'exploitation où nous avons réalisé notre étude se situe dans la commune d'Oued El Alleug, connue par sa vocation agrumicole depuis l'époque coloniale, elle se situe au centre de la Mitidja à 11 km au nord de la ville de Blida. Elle est limitée au nord par Kolea (wilaya de Tipasa), à l'est par Boufarik (wilaya de Blida), à l'ouest Mouzaia et du côté sud par Beni Tamou et le village de Maramane (wilaya de Blida). Notre enquête épidémiologique a été effectuée au niveau du domaine Zamouri du village de cinq palmiers (Figure 2.1).

Le domaine Zamouri est une exploitation agricole collective spécialisée dans la production d'agrumes, elle se situe à environ 5 Km de la ville d'Oued El Alleug en empruntant la route allant vers Mouzaia. Les vergers sont entourés par des arbres de cyprès à titre de brise de vent. La ferme est limitée de l'Est par la route allant vers Maramane au Sud par des habitats, à l'Ouest par des vergers d'agrumes et au Nord par la route nationale N°04.



www.google earth.com (janvier 2015)

Figure 2.1: Localisation géographique de la zone d'étude

## 1.2. Caractéristiques des vergers étudiés

Notre suivi épidémiologique a été effectué durant la campagne agricole (2014-2015), au niveau de deux sites, comportant 10 vergers.

Le domaine Zamouri est subdivisé en deux EAC ; EAC n° 04 occupe une superficie de 10 ha plantée de la variété Thomson, répartis en six principaux vergers, dont les surfaces varient de 1 à 1.5 ha. Alors que la deuxième EAC qui s'étale sur une superficie de 8.5 ha est spécialisée dans la production de la clémentine, dont les surfaces varient de 2 à 2.5 ha répartis en quatre vergers.

Les vergers de ce domaine datent de l'époque coloniale soit un âge de plus de soixante ans. Le nombre d'arbres total, confondus entre les arbres arrachés et ceux remplacés (jeunes arbres) est de 5 544 arbres, avec une densité de plantation de 5x5 m. Le porte greffe utilisé est le Bigaradier.

### 1.3. Conduite culturale

D'après les observations et le questionnaire effectuées lors des visites de notre site d'étude, nous avons constaté que les opérations culturales se limitent au labour léger pendant le mois de mars et début du mois d'avril et plusieurs passages de discage croisé pendant les périodes printanières et estivales pour éliminer les mauvaises herbes et après chaque irrigation pour minimiser l'évapotranspiration.

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 à 4.5 quintaux par hectare d'urée 46% en deux tranches ; la première en mars (3 quintaux par hectare) et la deuxième en mois de juin (1.5 quintaux par hectare). L'irrigation est assurée à partir de mois de juin jusqu'à le début de mois d'octobre à raison de 6 irrigations par le système de rigole. La taille est effectuée dès la fin de la récolte qui commence à partir du mois de novembre et se termine le mois février.

Les traitements phytosanitaires sont surtout préventifs, et sont réalisés d'une façon systématique (tableau 2.1). Ces traitements sont appliqués contre un certain nombre de ravageurs et parasites qui peuvent causer des pertes considérables sur le plan économique.

Tableau 2.1 : Produits utilisés pendant la campagne 2014/2015.

Spécialité commerciale	Matière active	Ravageurs et maladies	Dose	Propriétés	Epoque de traitement
<b><u>ELGAZELLE</u></b>	ACETAMEPRIDE	Pucerons	200g/ha	contact et ingestion	<b><u>15-03-2015</u></b> <b><u>20-04-2015</u></b>
Aliete flash	FOSETYL-AL	Gombose parasitaire	0.25 kg/hl	systemique	<b><u>05/04/2015</u></b>
Dursban 4 + huile blanche	CHLORPYRIPHOS ETHYL	Cochenille	1.5l/ha	ingestion et contact	<b><u>15-06-2015</u></b>
Decis expert	<b><u>DELTA</u></b> <b><u>METHRIN</u></b> <b><u>E</u></b>	Cératite	15.5ml/hl	contact et ingestion	<b><u>20-08-2015</u></b>

## I.4. CARACTÉRISTIQUES DES SOLS DES VERGERS ÉTUDIÉS

Les analyses de sol ont été effectuées par le laboratoire de FERTIAL (Appendice CDEF) [81] et les résultats ont été interprétés par le système Sidra (système intégré d'analyse et de recommandation de fertilisation). Les terrains de cette exploitation sont des sols non salins de texture argileuse avec un pourcentage d'argile qui varie de 48% à 52%, limon entre 16 et 24% et les fractions de sable entre 24% et 36%. Ce sol est caractérisé par un pH alcalin allant de 8.17 à 8.45. Les contraintes constatées sont : un faible taux de fertilité chimique concernant les éléments majeurs (P.K) et une faible teneur en carbonates (Figure 2.2)

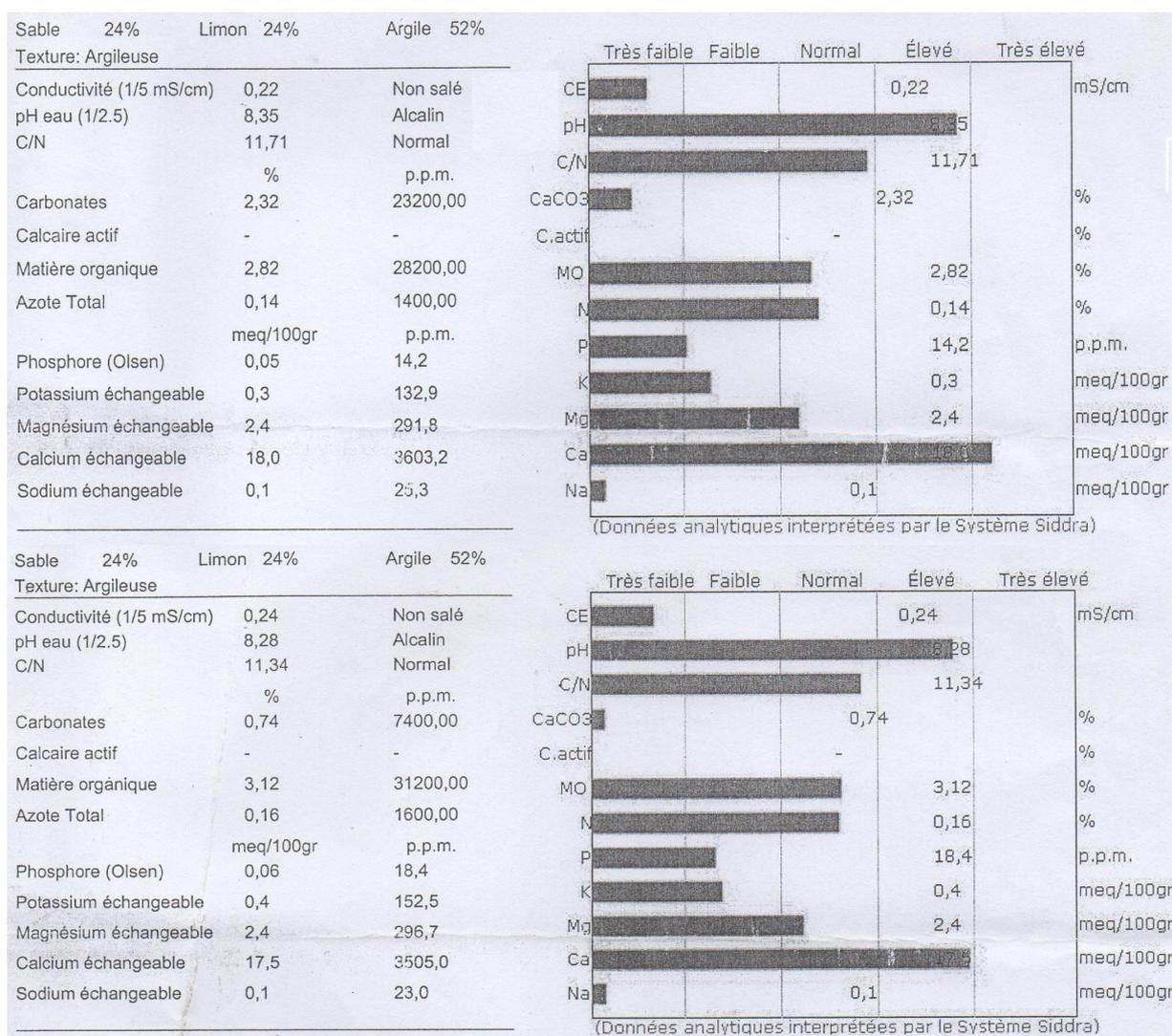


Figure 2.2 : Caractéristique physico-chimique du sol des vergers de Thomson [81].

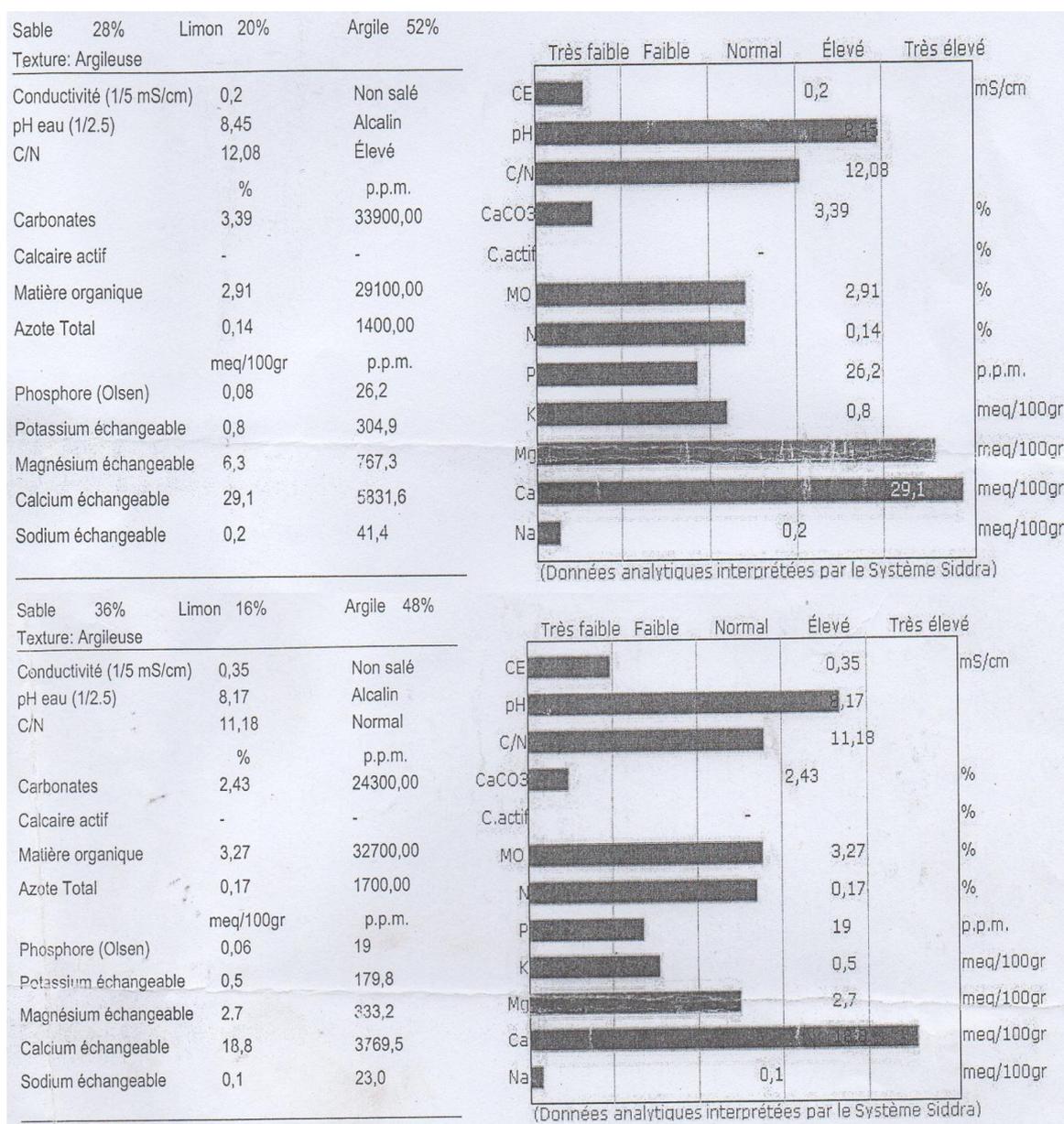


Figure 2.3 : Caractéristique physico-chimique du sol des vergers de Clémentinier [81].

## **II. Etude épidémiologique de dépérissements**

Dans notre enquête épidémiologique sur le 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. Parmi elles l'âge des arbres, porte greffe, les modes de conduites et les caractéristiques pédoclimatiques.

### **II.1. Diagnostic symptomatologique**

Le diagnostic symptomatologique a pour objectif de retracer l'historique d'apparition de ces cas de dépérissement et d'établir des observations sur l'apparition et le développement des symptômes. A cet effet nous avons établi un questionnaire résumant les éléments de réponses pouvant nous aider directement ou indirectement dans la compréhension des situations de dépérissement étudiées

Durant la période 2014-2015, nous avons effectué plusieurs visites dans les vergers pour recueillir le maximum d'informations relatives à l'objet de notre étude. Ce diagnostic consiste à décrire les symptômes apparentés et localiser les sujets affectés par l'un de type de dépérissement.

Au niveau de chaque verger, nous avons évalué les dégâts causés par le dépérissement et exprimé le taux de sujets présentant cette affection par rapport au nombre total d'arbres. L'arbre est considéré comme dépéris s'il présente soit un dépérissement total ou partiel. Les sujets arrachés suite à leur dépérissement sont comptabilisés dans l'estimation du taux d'infection.

Sur la base de ces observations ponctuelles, et les prospections effectuées, nous avons classé les symptômes en cinq classes selon la gravité des symptômes du dépérissement. Nous avons établi une échelle d'évaluation, par le quel nous avons estimé le taux de dépérissement, la gravité, et l'incidence de la maladie dans chaque verger (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Echelle d'évaluation des symptômes du dépérissement [80, 82, 83]

Classe	Etat de l'arbre et symptômes
«0»	<input type="checkbox"/> Sain
«1»	<input type="checkbox"/> 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»	<input type="checkbox"/> 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 occupant une portion du tronc ou localisé sur une branche charpentière <input type="checkbox"/> Rabougrissement <input type="checkbox"/> Brunissement de grandes racines
«3»	<input type="checkbox"/> 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 variable en coloration (brune, rouge, noire) <input type="checkbox"/> Dépérissement foudroyant (la mort subite) <input type="checkbox"/> Dessèchement et Pourriture de racines.
«4»	<input type="checkbox"/> Arbre mort*, coupé, arraché ou remplacé * . Dépérissement irréversible

## II.2. Paramètres épidémiologiques des dépérissements

Pour l'évaluation des effets des dépérissements engendrés par les arbres nous avons utilisé trois paramètres de calculs: Taux d'infection de la maladie, indice de gravité et indice de McKinney (Incidence de la maladie) [84].

### II.2.1. 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 [80, 82, 83]. 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 au niveau des vergers étudiés

### II.2.2. GRAVITE DE LA MALADIE

Pour estimer la valeur moyenne de la classe du dépérissement, la formule suivante a été utilisée [80, 82, 83] :

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

- $G$  : 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

### II.2.3. 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 [80, 82, 83] :

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

- $IMc \%$  : 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

### **III. Étude étiologique**

#### **III.1. Prélèvement des échantillons**

Nous avons réalisé un échantillonnage ciblé pour rechercher d'éventuels agents fongiques susceptibles de provoquer des états de dépérissement.

Nos échantillons ont été obtenus à partir du tronc et des branches des arbres dépéris. Les prélèvements ont été effectués dans des conditions aussi stériles que possible, les outils utilisés (sécateurs, scies) ont été désinfectés par l'eau javellisée. 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.

#### **III.2. Recherche des fructifications des agents causals**

La présence des fructifications permis une identification plus précise, des branches et du 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 ont été réalisé dans des montages lame et lamelle et observé sous un microscope optique [85].

#### **III.3. Diagnostic au laboratoire**

##### **III.3.1. MILIEUX DE CULTURE**

Le principal milieu de culture utilisé durant le travail au laboratoire, c'est le milieu PDA (potatos dextrose agar). Différents auteurs utilisent divers milieux pour un isolement spécifique, mais pour un recensement global, le milieu le plus utilisé est le PDA. 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. Pour provoquer la sporulation des *Botryosphaeriaceae* on a utilisé un milieu à base d'avoine Oatmeal agar (OA) [86].

### **III.3.2. 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, P; Rouxe, F [87] 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 boites de Pétri contenant le milieu PDA [87].

### **III.3.3. PURIFICATION**

Nous avons réalisé des observations microscopiques sur les cultures développées afin de localiser celles qui nous semblent intéressantes. Les cultures d'agents saprophytes ou de contamination (*Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, ...) sont à éviter.

La purification consiste à découper des petits fragments de disque mycélien de 5 mm d'agar et les repiquer sur de nouvelles boites de Pétri contenant le même milieu. Ces opérations de repiquages sont répétées autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention de cultures homogènes et unies, tout en la vérifiant par des observations microscopiques [87].

### **III.3.4. IDENTIFICATION**

L'identification des agents fongiques isolés a été réalisée selon les caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques, en utilisant les critères de la clé de BARNETT [88] et le manuel de FUSKEY [89] basée sur le système SACCARDO. Ce système s'illustre par une méthode de classification appliquée surtout aux champignons imparfaits. Les éléments de base de ce

système sont la morphologie des structures de sporulation connues naturellement, telles que la morphologie et la couleur des conidies [88].

### **III.3.5. CARACTÈRES MACROMORPHOLOGIQUES**

Les cultures purifiées ont été laissées en incubation de 15 à 20 jours, après leur purification pour obtenir une croissance optimale. Dès que le développement est apparent; des observations quotidiennes sont effectuées pour détecter d'éventuels caractères cultureux spécifiques aux agents fongiques

La caractérisation se base sur : la couleur, l'aspect, la forme des colonies, leurs vitesse de croissance et d'éventuels pigmentations. Les clés de détermination utilisée pour les Botryosphariacées sont celles décrites par Phillips (2013) [90].

### **III.3.6. CARACTÈRES MICRO MORPHOLOGIQUES**

A partir des cultures pures nous avons réalisé des observations entre lame et lamelle pour des observations microscopiques aux grossissements successifs (10x10) puis (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 manuel FUSKEY [89] et la clé de détermination de BARNETT [81] et Phillips [90].

### **III.3.7. CARACTÈRES MICROMORPHOMETRIQUES**

En raison de la diversité des isolats, des observations complémentaires sur les dimensions morphométriques ont été réalisées. Nous avons utilisé la technique de mensuration biométrique, les mesures ont été procédées par microscope photonique.

### **III.3.8. INDUCTION DE LA SPORULATION**

La sporulation chez les *Botryosphaariacées* et le genre *Eutypa* a été induite par la culture des isolats purs sur un milieu à base d'avoine OATMEAL agar (OA) et sur des aiguilles de pin et de peuplier doublement autoclavé fixés dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 2%. Les boîtes sont incubées à 25C° avec une photopériode de 12 h pendant 14 jours sous les rayons ultra-violets. Cette technique a été employée avec succès par plusieurs chercheurs ; Phillips *et al.*, 2013 [90], Santos et Phillips (2009) [91] 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, avant d'appliquer une goutte d'acide lactique à 100% est observée par microscope optique.

### **III.3.9. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE**

En raison de la dominance de la flore fusarienne, dans les études précédentes ayant traitées cette problématique de dépérissement [9, 10, 11, 12], nous avons jugé utile de confirmer l'identité de ces agents fongiques par une caractérisation moléculaire. Cette caractérisation a été réalisée sur des souches issu d bois d'écorce, du tronc et des rameaux.

#### **III.3.9.1. EXTRACTION D'ADN**

L'ADN des isolats a été extrait selon un protocole optimisé et inspiré de celui de Liu *et al.*, (2000) [92]. Le mycélium fongique a été broyé dans des tubes contenant 500 µl ml d'une solution de lyse (Appendice B). 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.

### **III.3.9.2. AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR**

Pour l'identification des différentes espèces des *Fusarium*, nous avons utilisé les régions codantes 5.8S, 18S et 28S en plus des séquences des régions intercalaires ITS (Internal transcribed spacers) pour amplifier la région ribo-autosomique d'ADN nucléaire (Appendice P). Les réactions d'amplification ont été réalisées selon les conditions décrites par Guizhen et *al.*, (2002) [93]. L'amplification a été réalisée 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 d'eau µl ultra pure (Appendice B). L'amplification a comporté trois ; 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.

### **III.3.9.3. 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 de la base des données internationale NCBI en utilisant l'option BLASTn. Les séquences ayant le maximum d'homologie ont été choisies.

## **IV. Test de pathogénicité**

### **IV.1. Préparation de matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé pour la vérification du pouvoir pathogène des agents fongiques isolés et identifiés, sont des plantules de la variété Thomson navel greffées sur citrange troyer. En plus des portes greffe de bigaradier. Les plantules issues des arbres de parc à bois contrôlé, provenant de l'ITAFV (Institut technique d'Arboriculture fruitière et vigne) ont été plantées dans un milieu contenant du sable, terreau et de la terre végétale [94].

### **IV.2. Matériel fongique**

Toutes les souches qui ont été isolées à partir de plusieurs échantillons, ont été identifiées et purifiées afin de préparer une culture pure. Après deux semaines d'incubation sous l'ultra-violet et l'obscurité pour induire la sporulation, 10ml de l'eau distillée stérile ont été versés sur la culture fongique, dont la surface a été raclée; la suspension de spores ainsi récupérée a été versée dans des bouteilles stériles. La suspension de spores qui servira d'inoculum a été ajustée à  $10^6$  spores/ml à l'aide de la cellule Malassez.

En raison de l'absence des fructifications des cultures fongiques de quelques isolats durant leurs incubations, Les différents inocula ont été préparées avec des cultures mycéliennes cultivées séparément dans des boîtes Pétri contenant le milieu PDA [94].

### IV.3. Réalisation de test de pathogénicité

Pour la réalisation de test pathogénicité, nous avons utilisé 21 plantules de Bigaradier et 21 plantules de Thomson greffé sur Citrange troyer. Ces plantules ont été inoculées avec un isolat de chaque espèce purifiée (3 plantules par espèce fongique). Nous avons injectée 0,1 ml de chaque suspension fongique dans 2 plaies superficielles à différentes positions pour les 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 le para film. Trois plantules ont été utilisées comme témoins négatifs. Les témoins ont été inoculés avec de l'eau distillée stérile. Ces plantules ont été observées systématiquement pendant 6 mois afin de surveiller le développement des symptômes [95].

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 réalisés, qui vise à rechercher des nécroses et des symptômes de dépérissement au niveau du matériel végétal inoculé.

Les agents qui ont induit des symptômes sur les plantules, ont été identifiés à travers la mise en culture sur milieu PDA des fragments de tige présentant des nécroses. Après 5 jours d'incubation, un ré-isolement mycélien a été effectué et identifié sur la base des caractères morphologiques et culturaux.

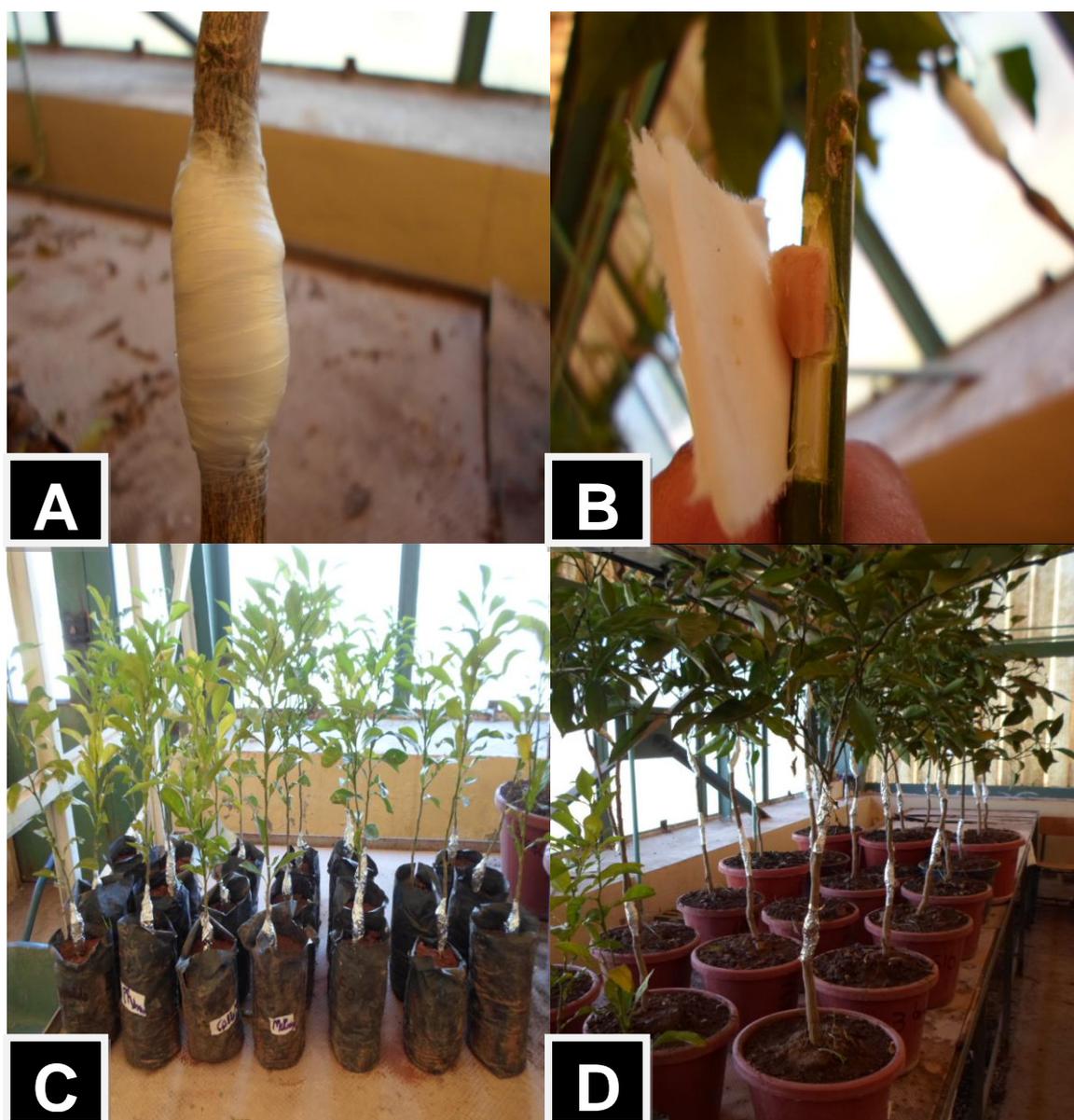


Figure 2.4 : Test de pathogénicité; A : Plantule inoculée et couverte par un coton stérile et le para film ; B : Installation de l'inoculum sur le site d'infection ; C : Plantules de Bigaradier inoculées; D : Plantules de Thomson greffées sur Citrange troyer inoculées.



## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### I. Résultats épidémiologiques

##### I.1. Descriptif symptomatologique

Les premiers cas de dépérissement observés dans la région ont commencé leur apparition sous forme sporadique, depuis une vingtaine d'année. Ces dernières années et surtout cette année (2015), le rythme d'apparition d'arbres dépéris a évolué pour devenir inquiétant de plus en plus.

##### I.1.1. Description des symptômes externes

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 cas :

La première situation, l'arbre passe d'un état sain sans aucun symptôme à une situation de dépérissement total au bout de quelques jours (Fig 3.1).



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

La deuxième situation où le dépérissement évolue partiellement et lentement, durant quelques années, dans ce cas, Les premiers symptômes annonciateurs de dépérissement, sont le jaunissement léger ou généralisé, la réduction intense de la végétation et des fruits (Fig 3.2 A et B) et l'orientation des feuilles vers le haut (Fig 3.2 C). Ce symptôme devient alarmant, après le dépérissement des extrémités des rameaux (Fig 3.2 D), qui souvent suivi d'un dépérissement unilatéral des branches porteurs de l'arbre (Fig 3.2 E).

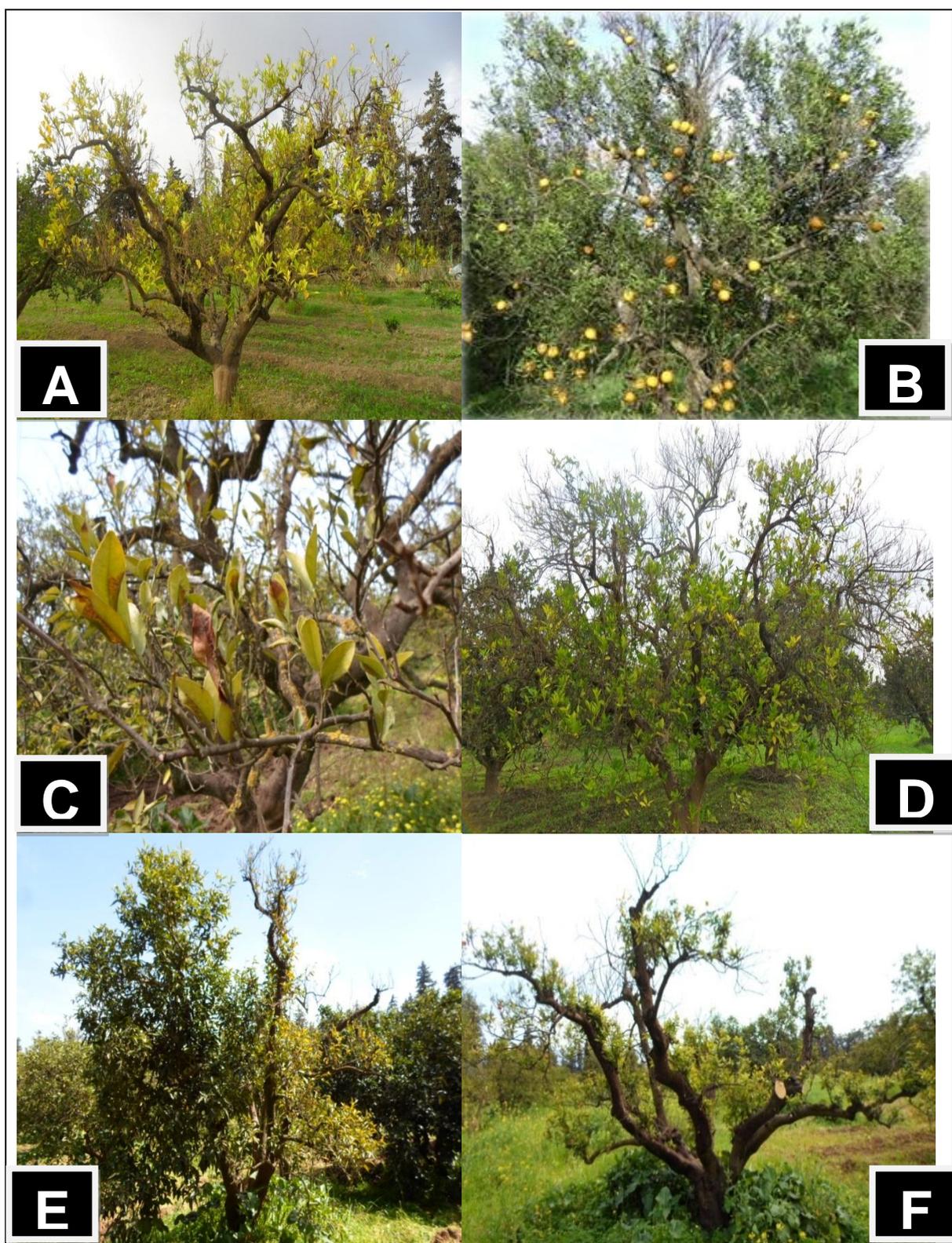


Figure 3.2 : Symptomes de dépérissement progressif ; A : Jaunissement généralisées et réduction intense de feuillage ; B : Réduction intense de fruits en nombre et en calibre; C : Nécrose et orientation des feuilles vers le haut ; D : Dépérissement des extrémités des rameaux ; E : Dépérissement unilatéral;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

Au niveau du tronc, le décollement des écailllements de l'écorce (Fig 3.3 A) accompagnées parfois d'une sécrétion de gomme (Fig 3.3 B) où apparaitre par la suite des craquelures, des fissures (Fig 3.3 C) et des chancre allongés, des nécrose, rougissement et brunissement et (Fig 3.3 D), pourriture du bois qui se transforme parfois en une pourriture du cœur (Fig 3.4 C). Sur ces arbres il y a souvent présence des formes de fructifications sur le tronc et les branches charpentières (carpophores, pycnides et périthèces) (Fig 3.3 E)

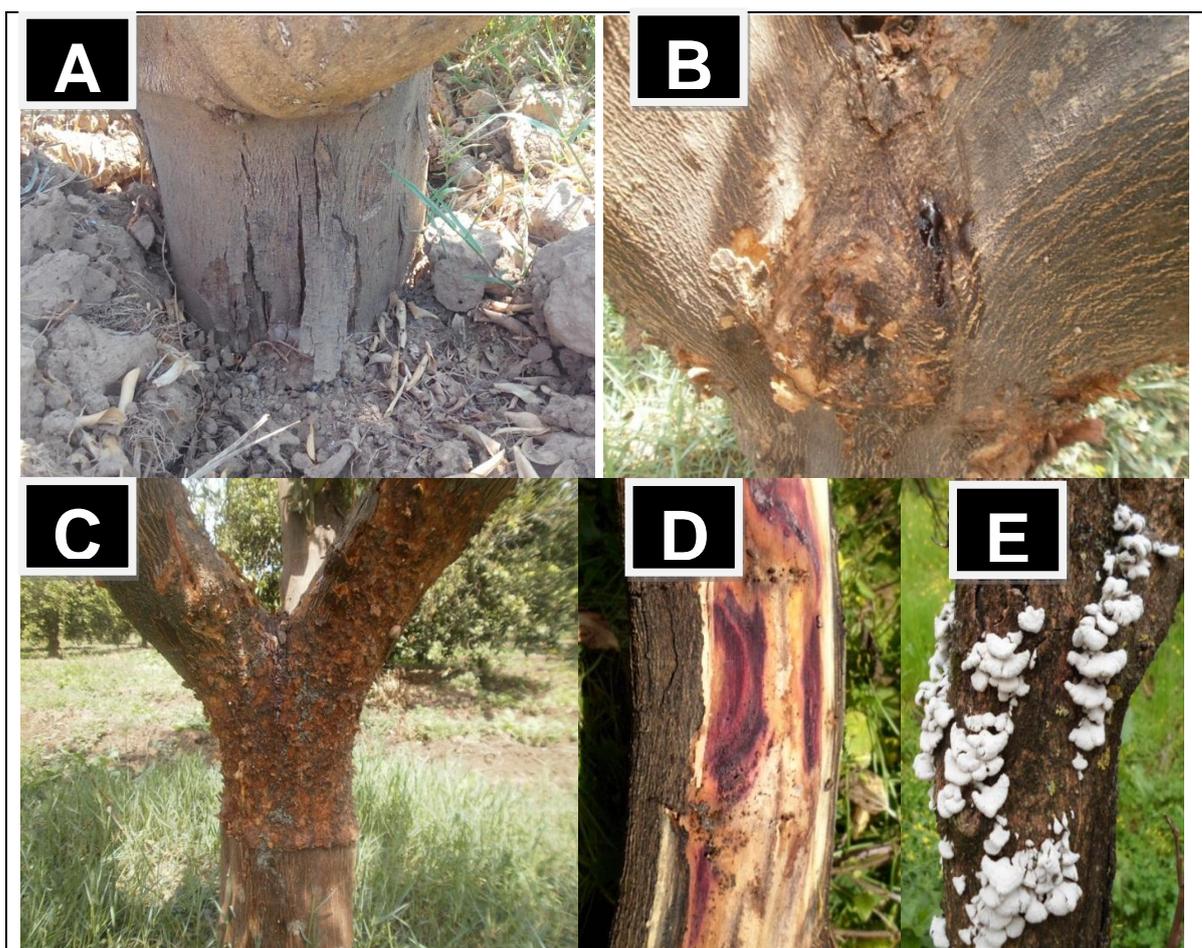


Figure 3.3 : Symptomes sur tronc et branches charpentières ; A : Ecaillage et craquelure sur la partie porte greffe ; B : Exsudation de gomme ; C : Craquelure sur la partie greffon ; D : Coloration rouge foncé sur branche. E : Fructification macroscopique sur branches (personnel)

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) et parfois, il y a la présence de feutrage blanc sur les racines (Fig 3.4).

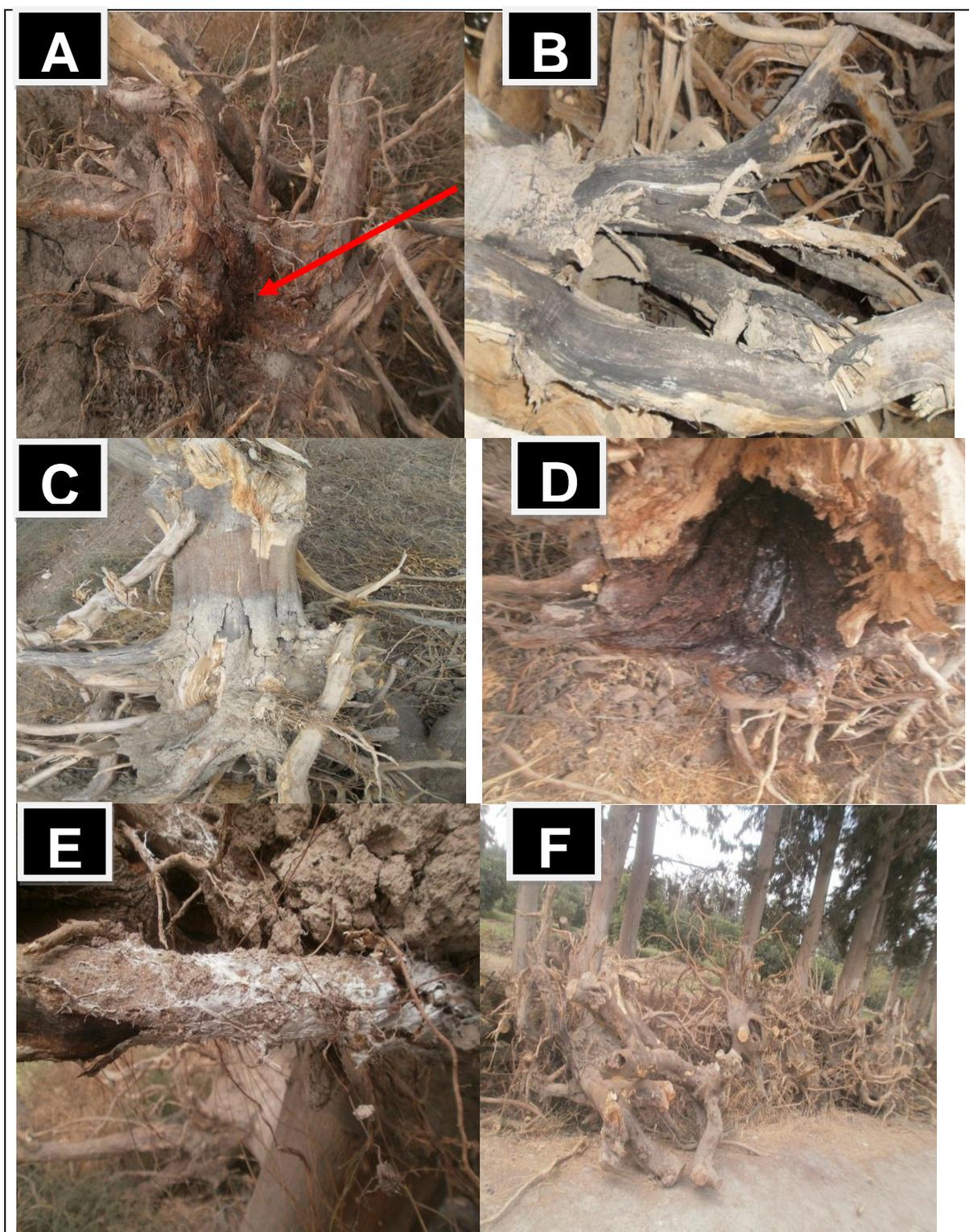


Figure 3.4: Symptômes sur les parties souterraines ; A : Brunissement des racines et destruction totale du pivot; B : Noircissement des racines; C : Pourriture sèche de la partie sous terrain; D : Destruction des vaisseaux conducteur au niveau du collet (pourriture du cœur); E : Pourriture cotonneuse sur racine; F : Arbres arrachés à cause de dépérissement.

Nous avons noté la même situation pour les plants remplacés (jeune plantation) soit, le dessèchement foudroyant (Fig 3.5 A) ou bien le Jaunissement léger ou généralisé (Fig 3.5 B et C), puis le dépérissement progressif des plantules remplacées. Le système racinaire est généralement mal développé et parfois accompagné des pourritures au niveau du collet (Fig 3.5 D).

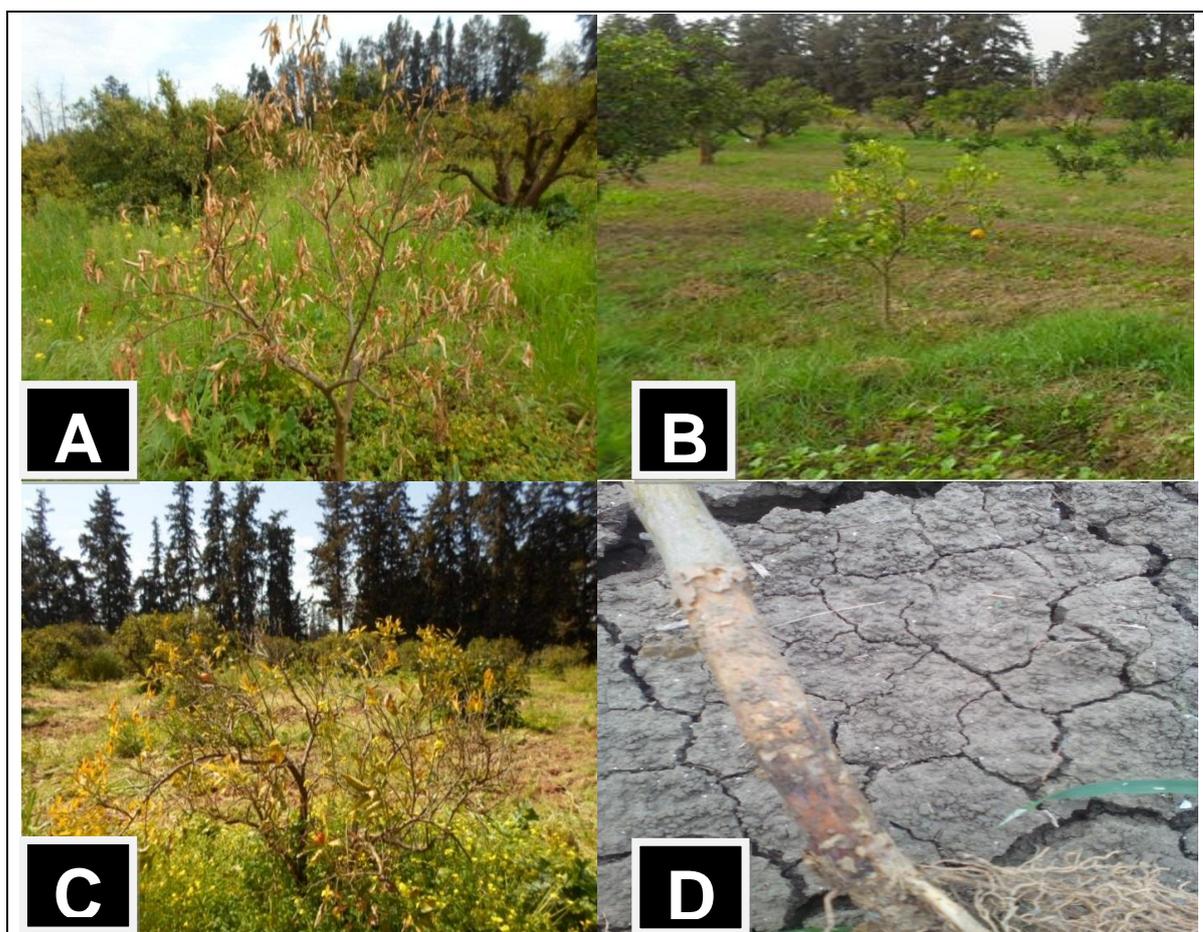


Figure 3.5 : Symptômes de dépérissement sur jeunes plantation ; A : Dépérissement brutal d'un jeune plant; B : Jaunissement léger d'un plant remplacé ; C : jaunissement généralisé d'un jeune plant ; D : Pourriture de collet sur jeune plant.

Par rapport aux variations, 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.1.2. 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 de bois. Au total, il y'a sept nécroses principales sur les troncs et les branches charpentières qui se différencient selon leurs : couleur, position et texture (molle, dure, ou une association).

- Nécroses type 1 : Nécrose brune claire en position centrale, avec une consistance dure, entourée par le bois sain (Fig 3.6 A et B).
- Nécrose type 2 : Une nécrose brune foncé et molle en position centrale entourée par le bois sain (Fig 3.6 C).
- Nécrose type 6 : Association des nécroses (complexe) brune, clair et molle en position sectorielle et centrale (Fig 3.6 D).
- Nécrose type 5 : Nécrose brune clair et dure en position centrale et sectorielle est composée d'une zone dure entourée avec du bois sain (Fig 3.6 E et F).
- Nécrose type 3 : Nécrose brune claire et dure en position sectorielle (Fig 3.7 A)
- Nécrose type 4 : Nécrose brune foncé et molle en position sectorielle (Fig 3.7 B)
- Nécrose type 7 : Point noir centrale entouré d'une liséré (Fig 3.7 D)

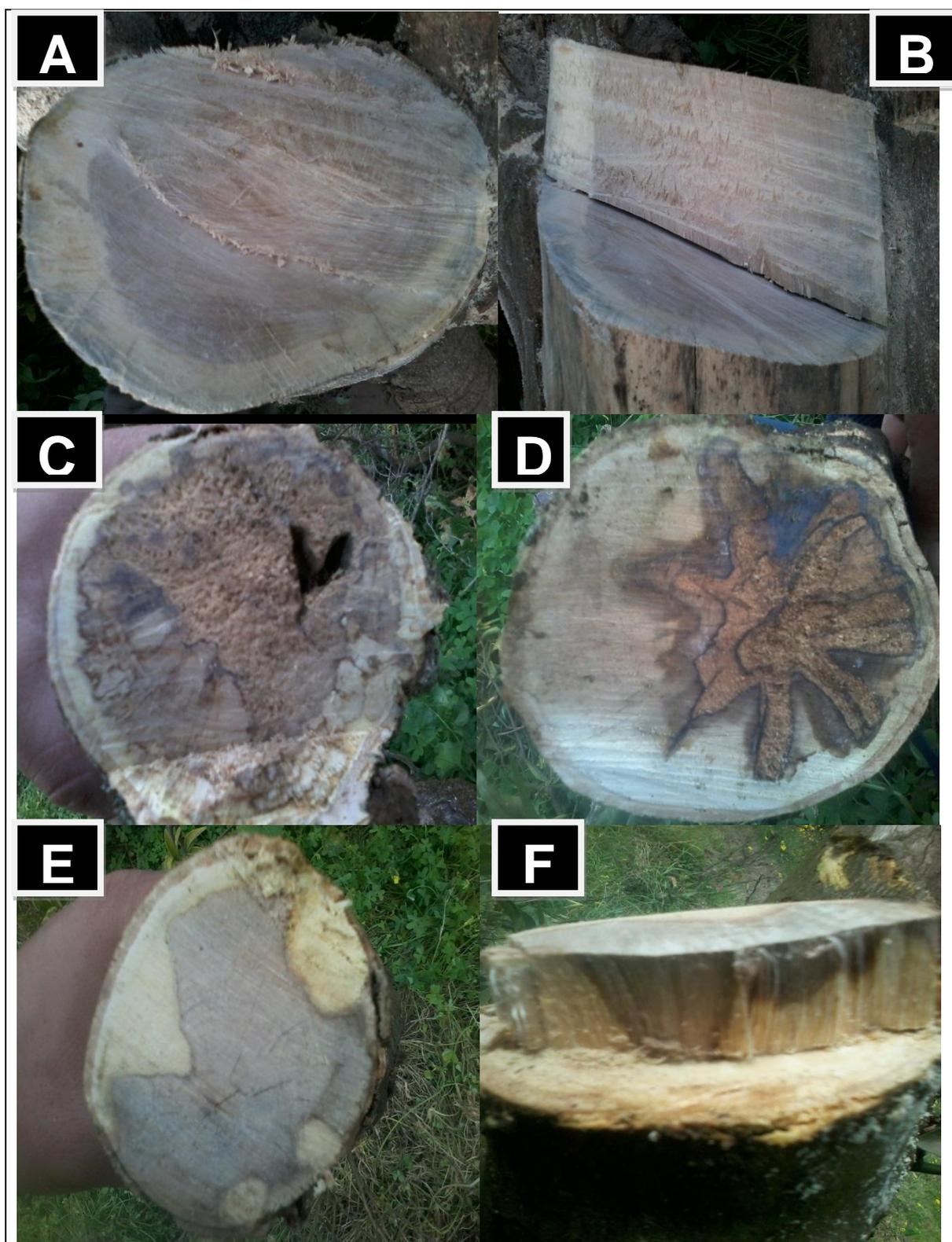


Figure 3.6 : Différentes nécroses sur tronc et branches charpentière ; A et B : Nécrose brune claire et dure en position centrale ; C : Une nécrose brune foncé et molle en position centrale ; D : Association des nécroses (complexe) brune, clair, molle en position

sectorielle et centrale; E et F : Nécrose brune claire et dure en position centrale et sectorielle.

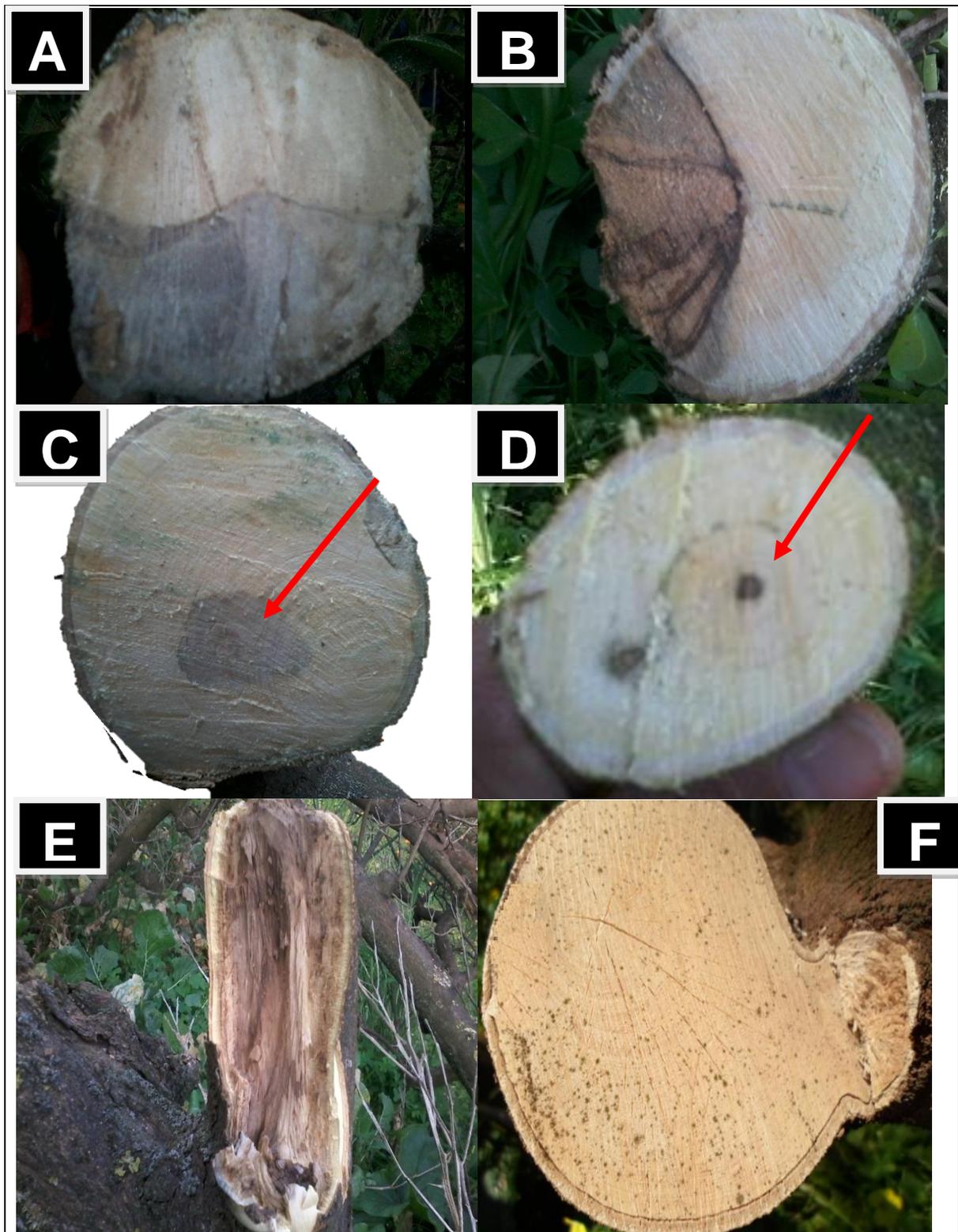


Figure 3.7 : Différentes necroses sur tronc et branches charpentière ; A : Nécrose brune claire et dure en position sectorielle ; B : Nécrose brune foncé et molle en position sectorielle ; C : Nécrose brune claire en position centrale ; D : Point noir entouré d'une

liséré ; E : coupe longitudinale d'un nécrose brune et dure en position centrale ; F : Points gris sur bois sain.

### 1.2. Distribution des cas de dépérissement

Nous avons constaté que la distribution des symptômes diffère d'un verger à l'autre, selon l'état physiologique de l'arbre et le mode de conduite du verger.

La distribution des cas de dépérissement dans les vergers de clémentinier et de Thomson est nettement concentrée au centre et dans le côté orienté vers le nord des vergers, cette distribution est en fonction de l'orientation des rangés et l'inclinaison des terrains. C'est le cas des vergers 1,2, 3, 6, 7, 8, 9 où les arbres dépéris sont très concentrés sur la moitié nord et distribués d'une façon généralisée sur la moitié sud (Appendices G.H.K.L.M.O).

Nous avons remarqué que les vergers 4, 5 et 10 sont les seuls qui ont présenté une distribution généralisée sur toute la surface du verger (Appendices I.J.N). Il est à noter que les vergers sont orientés vers le nord et la source d'irrigation se trouve dans le côté sud des vergers.

### 1.3. Taux de dépérissement

Sur les dix vergers étudiés ; nous avons une totalité de 5 544 arbres, sur une superficie de 18.5 ha. L'estimation globale de la situation de dépérissement dans les dix vergers étudiés, nous a permis d'enregistrer une moyenne générale du taux d'infection de 42%, ce qui correspond à 2 326 arbres dépéris dont 13.17% (730 arbres) représente la classe 1, 8.68 % (481 arbres ) de la classe 2, 1.93% (107 arbres) de la classe 3 et 18.18% de la classe 4 soit 1008 arbres arrachés, nous avons enregistré aussi une valeur moyenne de la classe du dépérissement de 2,60 et une incidence moyenne de 27.26%. Ces valeurs très inquiétantes montrent clairement que le dépérissement dans tous les vergers prospectés est en augmentation rapide, et celle-ci est proportionnelle avec sa gravité et son incidence (Fig 3.8).

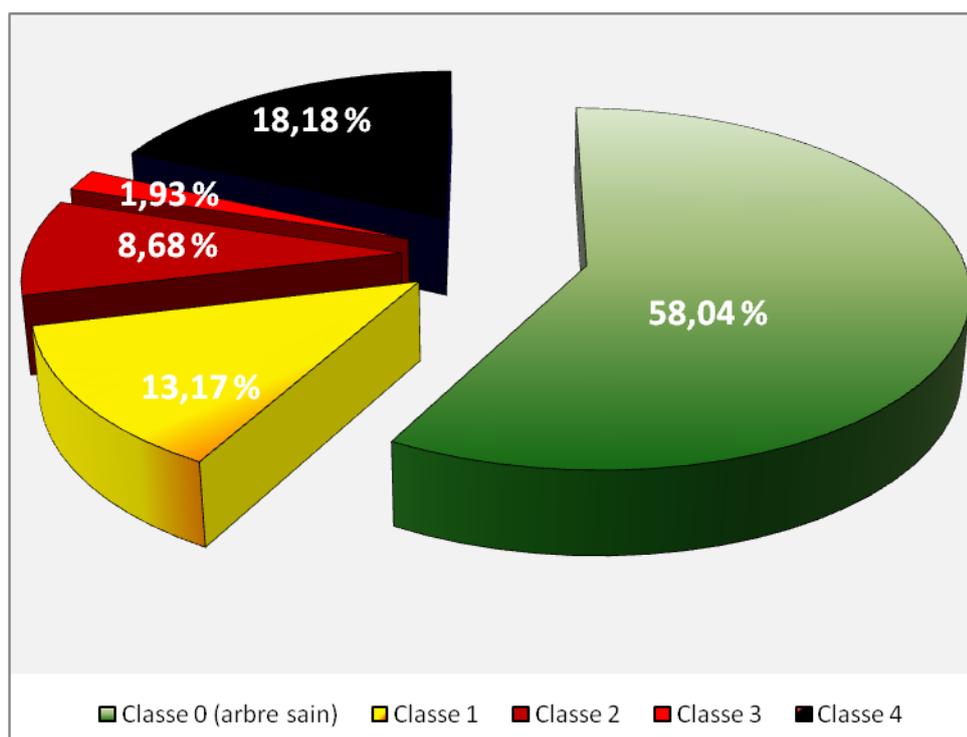


Figure 3.8: Situation des dix vergers étudiés selon les différentes classes de dépérissement et leurs proportions

Tableau 3.1 : Taux d'infection, de gravité et l'incidence de dépérissement dans l'ensemble des vergers.

N° vergers	Taux d'infection %	Gravité (classe moyenne)	Incidence % (Indice de McKinney)
V 01	79,05	2,76	54,56
V02	31,84	2,80	22,33
V03	52,39	2,39	72,97
V04	35,43	2,93	20,75
V05	25,87	2,65	17,14
V06	39,15	2,87	28,08
Moyenne 1	38,53	2,74	35,97
V07	42,00	2,45	25,75
V08	31,11	2,39	18,57
V09	50,31	2,29	28,76
V10	60,03	2,78	41,65
Moyenne 2	45,21	2,48	28,69
Taux d'infection moyenne	41,96	2,60	27,26

Moyenne 1 : Taux d'infection des vergers de thomson

### Moyenne 2 : Taux d'infection des vergers de clémentinier

Le taux d'infection des vergers de la variété Thomson est de 38.53 % par rapport au nombre total d'arbres de ces vergers. Il a été remarqué la nette dominance de dépérissement de classe 4 (18.47%) pour l'ensemble des vergers. Le reste de taux est réparti sur les autres types de dépérissement avec des pourcentages allant de 2,55 % pour la classe 3 à 11,55 % pour la classe 1 (Fig 3.9).

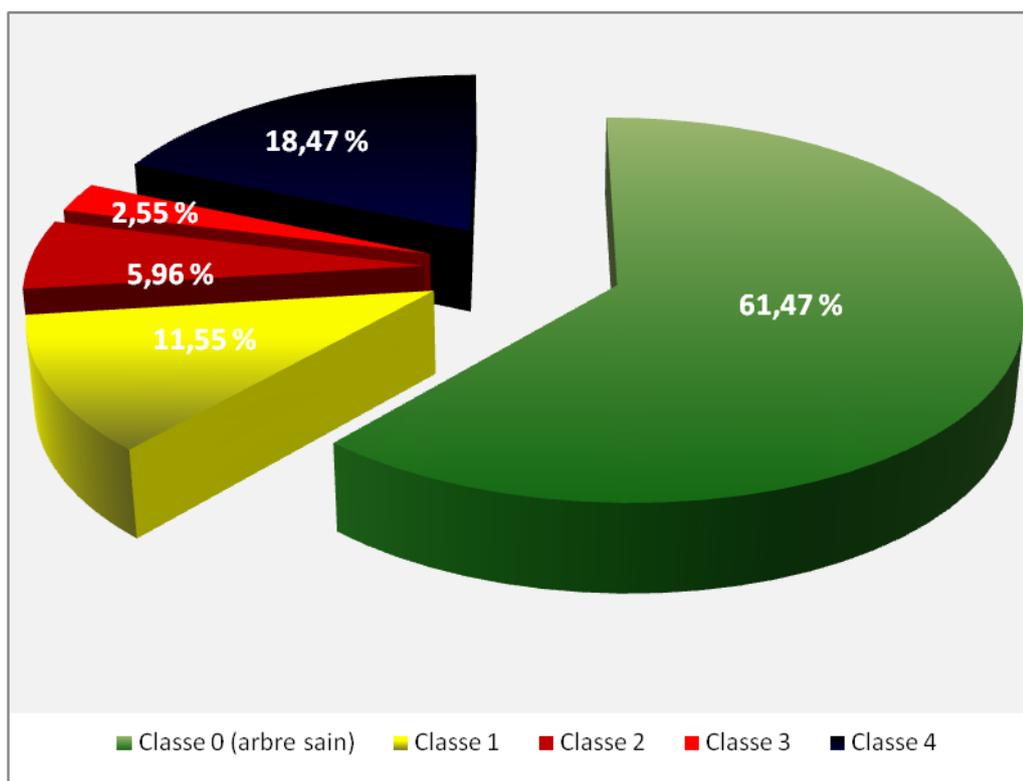


Figure 3.9 : Situation des vergers Thomson selon les différentes classes de dépérissement et leurs proportions

Concernant les vergers de Clémentinier, le taux d'infection est de 45.21% par rapport au nombre total d'arbres de ces parcelles. Il a été noté la dominance de dépérissement des classes 4 et 1 avec des pourcentages de 17.91% et 14.71%. Les autres classes de dépérissement ont été notées avec des pourcentages qui varient de 1.34% pour la classe 3 à 11.26 % pour la classe 2 (Fig 3.10).

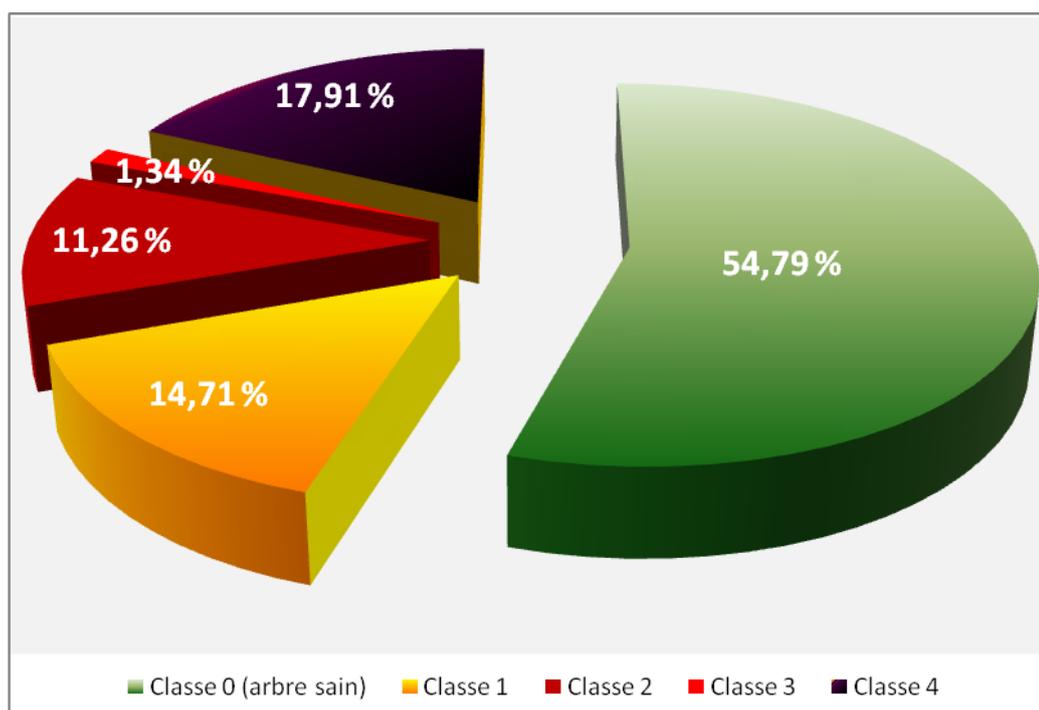


Figure 3.10 : situation des vergers de Clémentinier selon les différentes classes de dépérissement de et leurs proportions.

Tableau 3.2: Taux de dépérissement pour les deux catégories de vergers.

Vergers	Nombre d'arbres	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	total
V1	148	20,95	26,35	7,43	4,05	41,22	79,05
V2	515	68	6,41	6,21	6,41	12,82	31,85
V3	418	47,61	24,64	4,07	2,15	21,53	52,39
V4	460	64,57	6,74	8,26	1,09	19,35	35,44
V5	576	74,13	8,85	3,65	1,04	12,33	25,87
V6	585	60,85	9,4	7,18	1,71	20,85	39,14
<b>Moy 1</b>	<b>2702</b>	<b>61,47</b>	<b>11,55</b>	<b>5,96</b>	<b>2,55</b>	<b>18,47</b>	<b>38,53</b>
V7	862	58	12,76	12,30	2,09	14,85	42
V8	704	68,89	10,94	7,67	1,99	10,51	31,11
V9	638	49,69	19,44	13,64	0,63	16,61	50,32
V10	638	39,97	16,77	11,44	0,31	31,5	60,02
<b>Moy 2</b>	<b>2842</b>	<b>54,79</b>	<b>14,71</b>	<b>11,26</b>	<b>1,34</b>	<b>17,91</b>	<b>45,21</b>
<b>Total</b>	<b>5544</b>	<b>58,04</b>	<b>13,17</b>	<b>8,68</b>	<b>1,93</b>	<b>18,18</b>	<b>41,96</b>

Moy 1 : Taux d'infection des vergers de thomson

Moy 2 : Taux d'infection des vergers de clémentinier

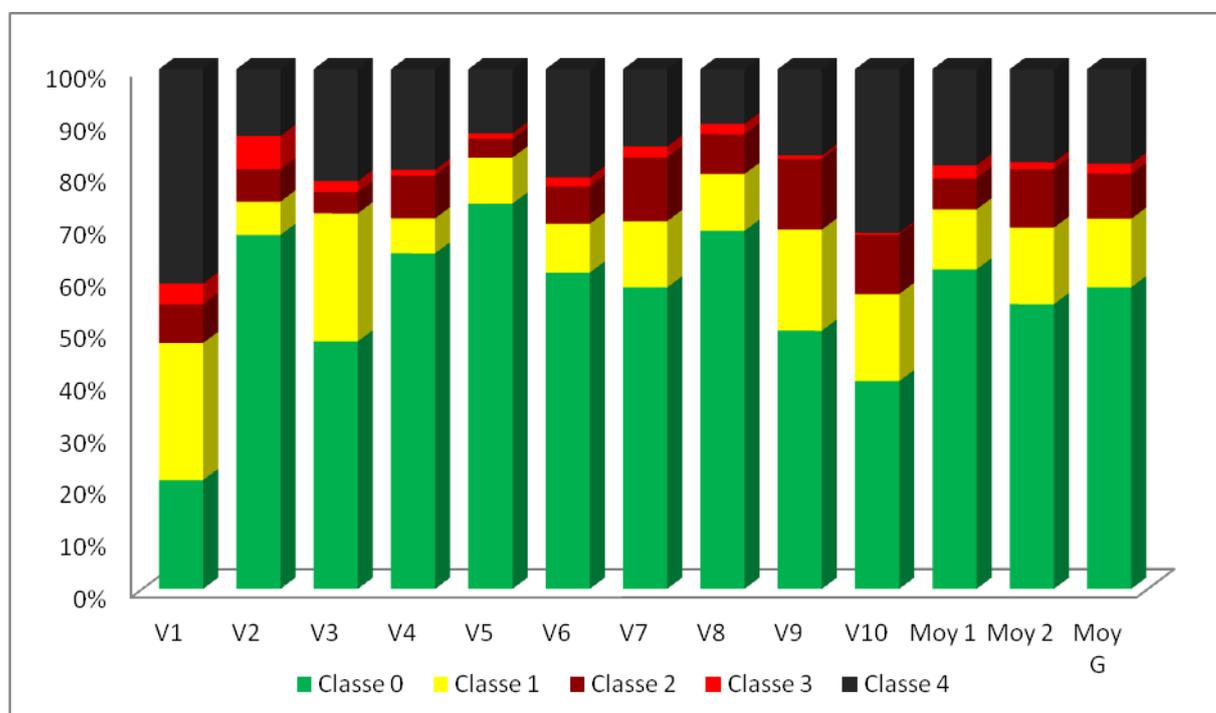
Pour l'ensemble des vergers étudiés le taux de dépérissement de la classe 1 est de 13.17% avec des pourcentages allant de 6.41% pour le verger 2 à 26.35% pour le verger 1 (tableau 3.3).

Concernant le dépérissement classe 2 ; il est présent dans tous les vergers avec un taux total de 8.68% et varie de 3.65% pour le verger 5 à 13.64% pour le verger 9.

Le dépérissement classe 3 est présent dans tous les vergers avec un faible taux qui est de l'ordre de 1.93% et varie de 0.31% pour le verger 10 à 6.41% pour verger 2.

Le taux cumulé d'arbres arrachés (classe 4) est de 18.18% et varie de 10.51% pour le verger 8 à 41.22% pour le verger 1.

En ce qui concerne le taux de dépérissement on a remarqué que le verger 1 (variété Thomson) se présente comme le plus affectés avec un taux de 79.05% et le verger 05 de clémentinier le moins affectés avec un taux de 25.87% (Figure 3.11).



**Moy 1** : moyenne de V1 à V6. **Moy 2** : moyenne de V7 à V 10. **Moy G** : moyenne générale. Figure 3.11: Taux globale de dépérissement selon différentes classes symptomatologiques.

Tableau 3.3 : Taux de dépérissement dans l'ensemble des vergers étudiés

Vergers	Nombre d'arbre	Classe de dépérissement					Total
		classe 0 (Arbre sain)	classe 1	Classe 2	classe 3	Classe 4 (Arbres arrachés)	
V1	148	31*	39	11	6	61	79
		20,95**	26,35	7,43	4,05	41,22	
V2	515	351	33	32	33	66	32
		68	6,41	6,21	6,41	12,82	
V3	418	199	103	17	9	90	52
		47,61	24,64	4,07	2,15	21,53	
V4	460	297	31	38	5	89	35
		64,57	6,74	8,26	1,09	19,35	
V5	576	427	51	21	6	71	26
		74,13	8,85	3,65	1,04	12,33	
V6	585	356	55	42	10	122	39
		60,85	9,40	7,18	1,71	20,85	
V7	862	500	110	106	18	128	42
		58,00	12,76	12,30	2,09	14,85	
V8	704	485	77	54	14	74	31
		68,89	10,94	7,67	1,99	10,51	
V9	638	317	124	87	4	106	50
		49,69	19,44	13,64	0,63	16,61	
V10	638	255	107	73	2	201	60
		39,97	16,77	11,44	0,31	31,50	
Total	5544	3218	730	481	107	1008	42
		58,04	13,17	8,68	1,93	18,18	

\* Nombre d'arbres

\*\* Pourcentage correspondant

#### I.4. Discussion

Ces dernières années la zone de la Mitidja a connu une forte attaque de dépérissement des agrumes qui touche l'ensemble des vergers agrumicoles. Plusieurs cas similaires ont été signalés à travers le monde. Les études réalisées dans les différentes zones agrumicoles; même si l'implication de certaines maladies a été nettement identifiée, telles que la Tristeza et le mal secco, beaucoup de situations n'ont pas trouvé de réponse précise. Le cas du Citrus Blight en Floride (USA) à nos jours aucune réponse n'a été apportée à ce sujet d'une manière claire et précise.

En Algérie, les études initiées depuis 2006 [9, 10, 11, 12] dans la région de Mitidja sur ces cas de dépérissement ont mis en évidence l'implication d'une flore fongique d'origine tellurique isolées à partir des racines et du sol.

Au cours de la réalisation de notre descriptif symptomatologique, dans le but de diagnostiquer ce problème de dépérissement, nous avons observé plusieurs types de nécrose sur le tronc, les branches et les rameaux, de ce fait, nous avons orienté notre travail vers l'isolement et l'identification de la flore fongique associés aux maladies de bois des agrumes susceptibles d'être parmi les causes principales de ce dépérissement.

La surveillance des cas de dépérissement, a permis de constater la présence de plusieurs foyers de dépérissement évolutifs regroupant trois types de dépérissement : dessèchement des extrémités des rameaux (classe 1); dépérissement unilatéral où partiel touchant une partie de l'arbre (classe 2) et dépérissement total de l'arbre (classe 3). Il a été noté aussi la présence des trois catégories symptomatologiques (classe 1, classe 2, classe 3) dans la totalité des vergers étudiés. Nous avons enregistré un taux global d'infection de 41.96 % représentant un indice de gravité de 2,60 sur une échelle de quatre degrés, ayant comme conséquence une incidence de 27,26%.

La distribution des arbres atteints est variable selon les vergers, d'une manière générale, nous avons observé le regroupement des arbres dépéris au centre et nord du verger et la propagation vers les périphériques, parfois sous

forme de plages éparpillées et dans certain vergers une répartition dans tous les sens. Cette différence dans la répartition 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.

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. D'un autre côté, 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 (Fig 3.12)



Figure 3.12 : Problème lié au conduite culturale adoptée ; A : Stagnation de l'eau entre les lignes de plantation ; B : Destruction des racines après les opérations de discage.

Les analyses de sol effectuées et interprétées par le système SIDDRA [81] (Fig 2.2 et 2.3), montrent qu'il s'agit d'un sol lourd avec un drainage interne très mauvais et une capacité de rétention de l'eau et des engrais très élevée, donc il y a risque de rétrogradation du phosphore et de potassium et encore d'asphyxie

racinaire dans les cas extrêmes. Le taux de fertilité chimique concernant les éléments majeurs (P.K) est faible ainsi que la teneur en carbonates. En générale le sol est de fertilité élève et ne présente pas de problème de salinité. Le pH de sol est alcalin et peut produire des problèmes d'assimilation de micro-éléments. Le rapport C/N indique que la matière organique est suffisamment décomposée [81].

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 ni destruction physique ni asphyxie, à terme, un séjour long d'eau dans le verger crée une ambiance favorable au développement des maladies [96].

Le comportement épidémiologique du dépérissement au niveau de ces vergers 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 culturales dans la dissémination de la maladie.

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 son aucun symptôme à une situation de dépérissement total au bout de quelques jours et un dépérissement progressif où le dépérissement évolue partiellement et lentement.

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 différente origines (virale, bactériennes, mycoplasmiques, fongiques) et d'autre part la complexité dans le développement et l'expression des symptômes. Mais l'absence de symptômes typiques des maladies virales et bactériennes dans nos vergers confirmée par les résultats d'analyse effectuée par

les services officiels de la protection phytosanitaire de l'INPV, nous a permis de s'orienter beaucoup plus aux symptômes exprimés par les maladies fongiques.

Le symptôme de dépérissement unilatéral est considéré comme symptôme typique des trachéomycose d'origine tellurique. Vu que les vergers d'étude se situent dans la plaine de Mitidja caractérisée par un taux d'humidité extrêmement important durant les périodes hivernales et printanières où les conditions de développement des agents pathogènes sont très favorables. Sur la base des résultats épidémiologiques obtenus, nos soupçons s'orientent vers l'implication de certaines maladies fongiques d'origine tellurique.

La pourriture des racines, peut être causée chez les *Citrus* par de nombreux champignons qui s'installent de préférence sur les arbres affaiblis. Les agents de pourriture affectionnent particulièrement les sols humides, acides et riches en azote. Les engrais phosphatés calciques et potassiques leur sont défavorables et augmentent la résistance de l'hôte. Le fumier de ferme est favorable au parasite. La maladie apparaît généralement dans des foyers localisés et s'étend, de plus en plus, dans les plantations. 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. 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 sûr ne peut être établi que sur le système racinaire [31].

## II. Etude étiologique

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

Pour la caractérisation et l'identification de nos isolats, nous nous sommes basés sur les caractères macroscopiques observés sur milieux PDA et milieu spécifique et les caractères microscopiques observés sous microscope optique. Ces caractères ont permis l'utilisation des critères de classification cités dans la clé de Barnett et Hunter [89].

Les isolements effectués à partir des buchettes découpées de différentes zones nécrosées du bois des branches et des troncs des arbres dépéris ont montré la présence de plusieurs types de colonies fongiques (Fig 3.13 A.B) d'aspects aérien, sub- aérien et cotonneux et de couleurs variables (gris clair, gris noirâtre, noir, blanc à violet clair, brunâtre, rouge et rose). Ces observations ont permis l'identification d'une flore fongique assez diversifiée (*Botryosphaeriaceés*, *Fusarium*, *Phoma*, *Eutypa*, *Alternaria* et *Colletotrcum*). En plus d'une flore saprophyte abondante (*Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* et les bactéries), nous avons remarqué la dominance de certains genres de champignons par rapport aux autres.

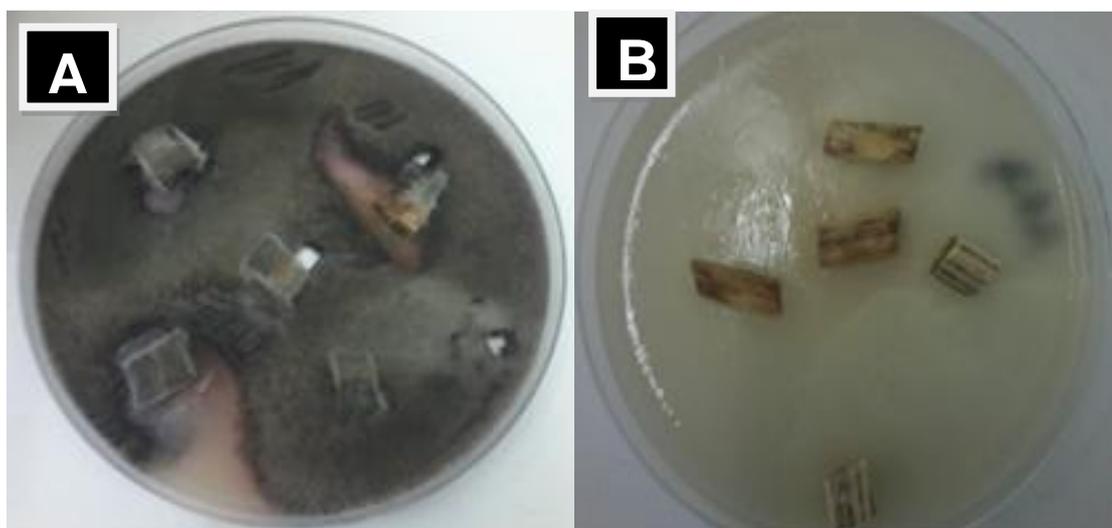


Figure 3.13: Isolement à partir des fragments de bois ; A : Développement des champignons à partir des buchettes ; B : Buchettes stériles

### II.1.1. Famille des *Botryosphaeriaceae*

- **Caractères culturels** : sur milieu PDA, les *Botryosphaeriaceae* présentent des colonies régulières d'un aspect cotonneux (Fig 3.14 A.B.C), le mycélium est blanc au départ (Fig 3.14 D) puis vire vers le gris clair pour devenir foncée à noir, c'est un mycélium aérien, il devient très dense avec présence de cordon (Fig 3.14 E.F).
- **Caractères micro morphologique** : le mycélium de ce champignon est coloré d'un brun très foncé à noire, il est cloisonnée et ramifier, des chlamydospores apparaissent avec le vieillissement de la culture. Notons l'absence de structures conidiogènes (Fig 3.15 A.B).

La sporulation chez les *Botryosphaeriaceae*, a été induite par deux méthodes :

- L'incubation des cultures des *Botryosphaeriaceae* à 25C° sous les rayons ultra-violets avec une photopériode de 12 h pendant 14 jours (Fig 3.14 F).
- la culture des isolats sur les aiguilles de pin et les brindilles de peuplier. La plupart des isolats ont formé des stromas conidifères contenant des conidies au bout de 14 jours d'incubation (Fig 3.14 G) et (Fig 3.15 E).

Sur les aiguilles de pin, les stromas sont souvent solitaires et parfois groupés. Ils sont globuleux, de couleur gris au départ et à maturité devient plus foncés (Fig 3.14 : G). Les conidies sont oblongues, hyalines et aseptés au départ (Fig 3.15 F) puis à maturité deviennent brun foncé et septes avec apparition de stries longitudinales irrégulières (Fig 3.15 D).

les formes sexuées des *Botryosphaeriaceae* ont été prélevées à partir de l'écorce des rameaux, branches et troncs des arbres dépéris,

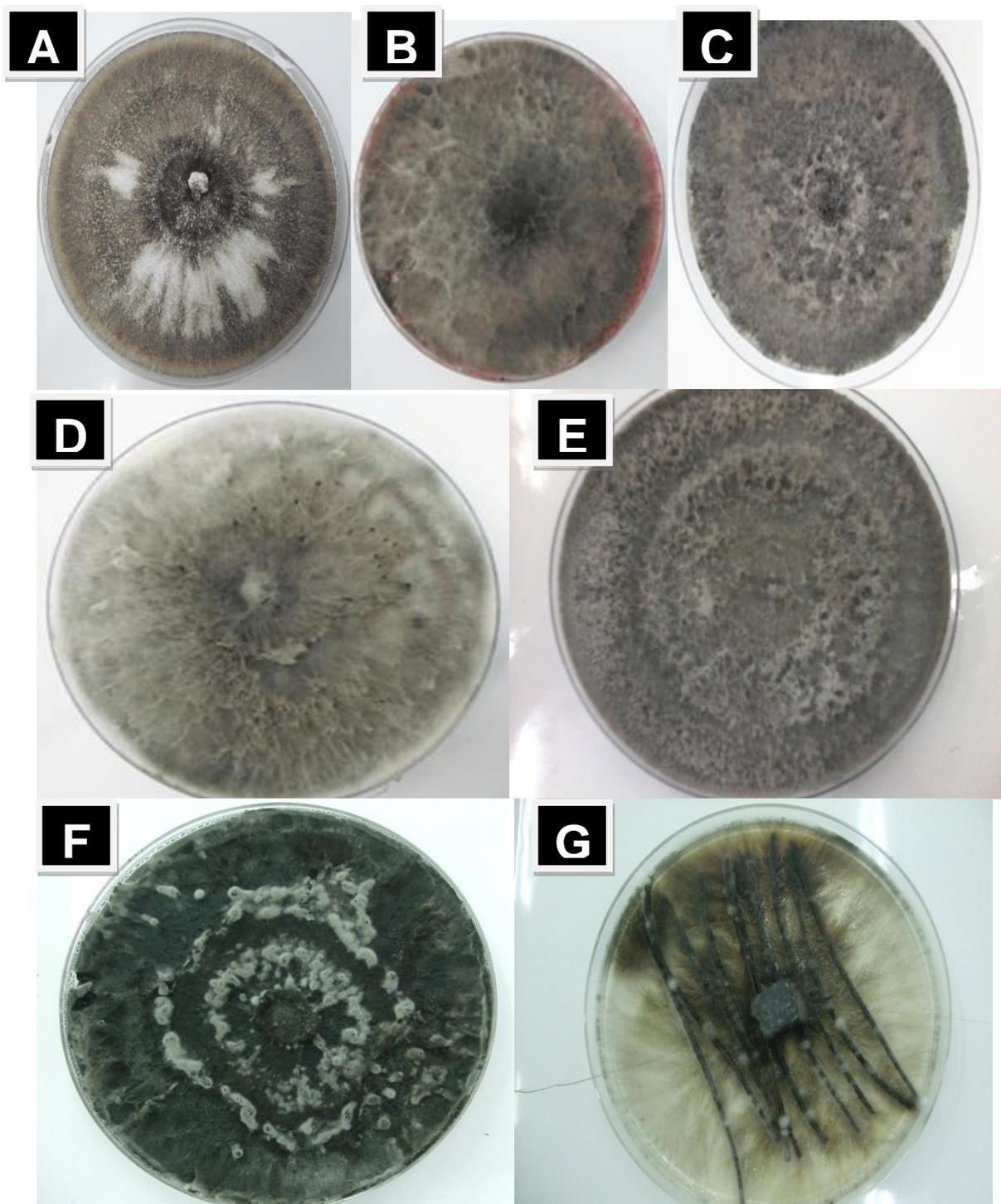


Figure 3.14 : Aspect macroscopique des isolats de *Botryosphaeriaceae* ; A : Isolat de couleur brune avec des plages blanches et d'aspect ras ; B : Isolat brune d'aspect cotonneux avec présence de pigmentation rouge ; C : Jeune isolat de couleur gris et d'aspect subaérien ; D : Jeune isolat de couleur gris et d'aspect cotonneux ; E : Apparition de cordon sur veille isolat ; F : Sporulation sur milieu de culture ; G : Sporulation sur aiguilles de pin.

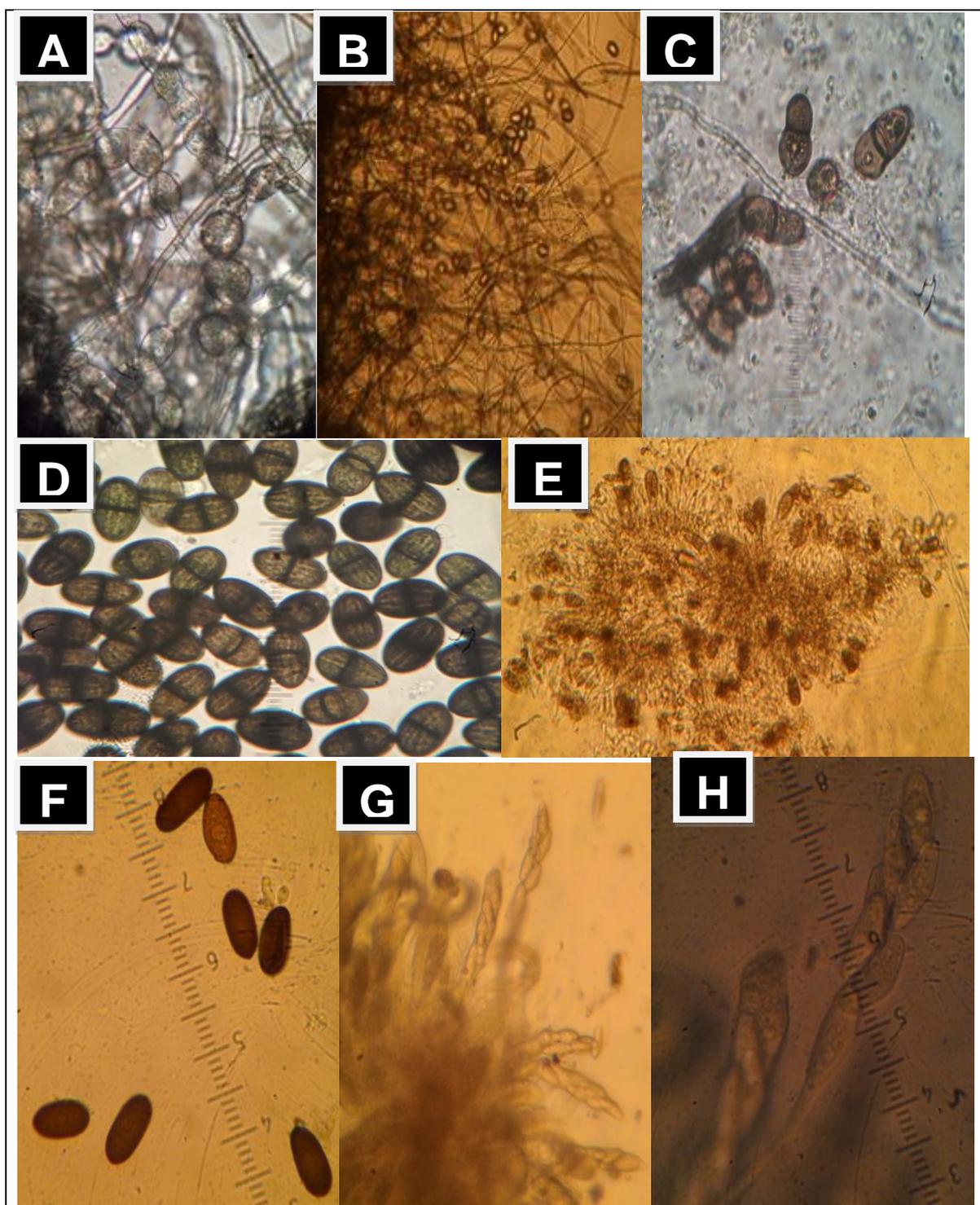


Figure 3.15 : Caractère microscopique des isolats de botryosphaeriaceée ; A : Mycélium septé ramifié et chlamydospores (Gx10) ; B : Mycélium dense avec présence de conidies (Gx10) ; C : conidies mature septés (Gx40). D : Conidies mature septés présentant des stries longitudinales (Gx40) ; E : Cellules conidiogènes libèrent des conidies (Gx10) ; F : Conidies mature non septés (Gx40) ; G : Asques contenant huit ascospores (Gx10). H : Asque contenant des ascospores (Gx40).

L'observation des rameaux et de l'écorce des branches et des troncs des arbres dépéris a permis, de constater la présence de plusieurs formes de fructification asexuées (pycnides) de couleur gris foncé (Fig 3.16 A.B.C.E) qui sont souvent groupés (Fig 3.16 F.G.H) et parfois solitaires (Fig 3.16 I) et des formes sexuées (périthèces) globuleux de couleur gris foncé (Fig 3.16 D).

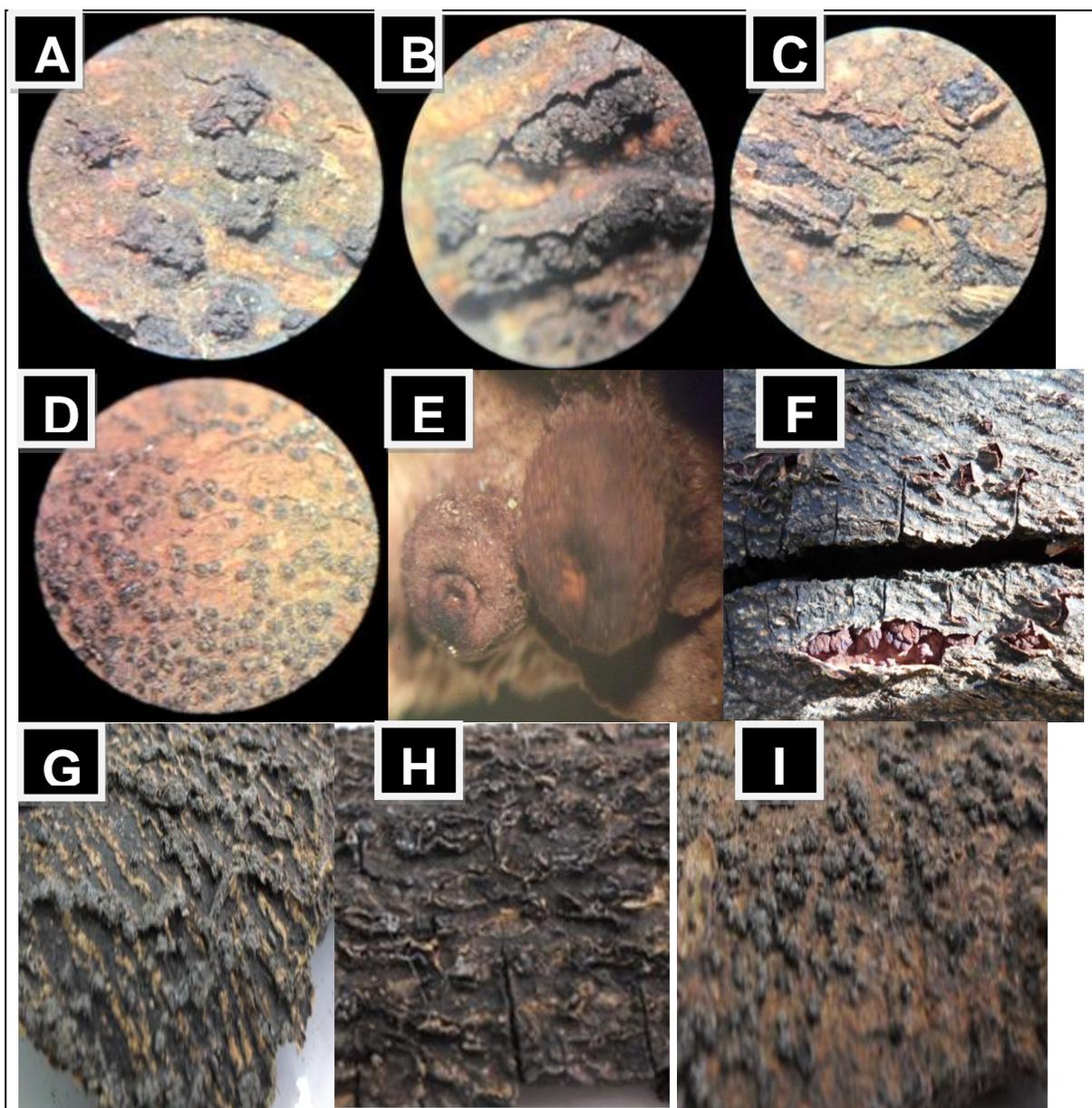


Figure 3.16: Les différentes fructifications sur écorce ; A.B.C.E : Formes de fructification asexuée (pycnide) sous loupe (Gx8) ; D : Forme de fructification sexuée (périthèces) (Gx8).F.G.H.I : Mode de regroupement des pycnides sur écorce.

## II.1.2. La flore fusarienne

### II.1.2.1. Caractérisation morphologique

Pour la détermination des différentes espèces du genre *Fusarium*, en plus des critères cités précédemment, nous avons basé sur les caractères micromorphologiques tel que cités dans la clé de détermination de FUSKEY [90] ; comme les dimensions micromorphométriques, la morphologie générale des conidies, la formes des extrémités des macro conidies et la forme des micro conidies, le nombre de cloison, la longueur et la forme des fialides.

#### II.1.2.1.1. *Fusarium solani*

##### ➤ **Les caractères macroscopiques**

- **Couleur** : blanc, brunâtre, peut produire des pigments violet, brun, orange et rouge (Fig 3.17 A).
- **Aspect** : aérien, sub- aérien (Fig 3.17 A).
- **Forme** : régulière ou irrégulière.

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

-Mycélium cloisonné, épais et fin (Fig 3.17 B).

-Présence des macro et des microconidies (Fig 3.17 C)

-Présence des chlamydospores

##### • **Les macro conidies**

-**Morphologie générale**: Relativement large, droit, solide et robuste, habituellement avec un encoché ou une fin arrondie.

-**Nombre de cloison**: est de 1 à 5.

##### • **Micro conidies :**

-**Forme** : Ovale, ellipsoïde et fusiforme avec 0 et 1 ou 2 cloisons.

-**Présentation du mycélium aérienne**: Fausse têtes.

##### ➤ **Résultat de la mensuration**

<b>-Macro conidie :</b>	<b>-Micro conidie :</b>
Langueur = 48 à 81.6 $\mu$ m	Langueur = 14.4 à 48 $\mu$ m
Largeur= 9.6 à 14.4 $\mu$ m	Largeur= 4.8 à 12 $\mu$ m

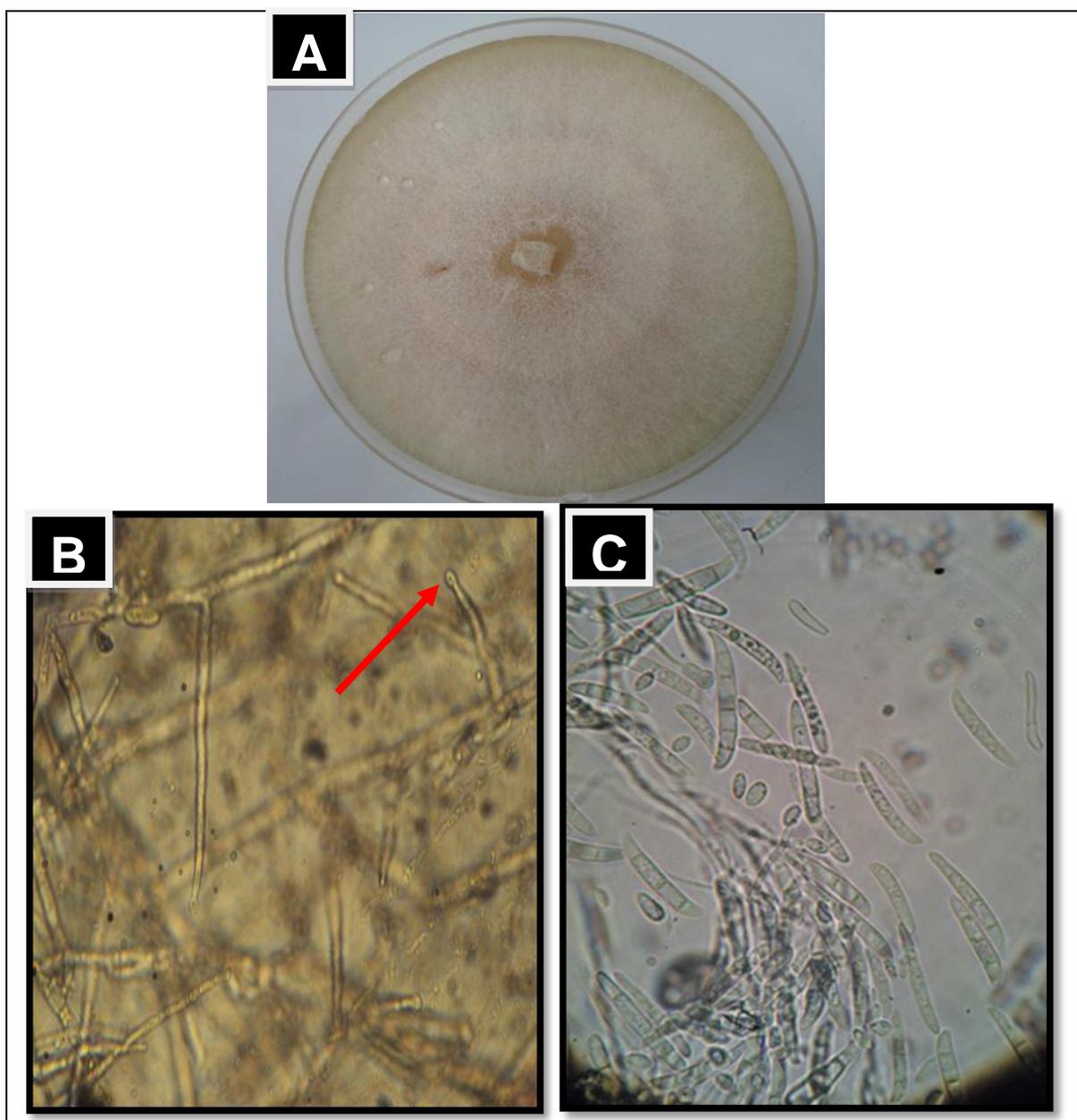


Figure 3.17 : Vue microscopique et macroscopique de *Fusarium solani* ; A : Vue macroscopique de *Fusarium solani*; B : Les monophialides (G : 40×10) ; C : Micro conidies et macroconidies de *Fusarium solani*.

### II.1.2.1.2. Fusarium oxysporum

#### ➤ Les caractères macroscopiques :

- **Couleur** : blanc à violet clair, rose, rouge violacé, peut produire des pigmentations violet clair ou foncé, rouge violacé (Fig 3.18 A.B).
- **Aspect** : aérien, sub-aérien, cotonneux (Fig 3.18 A.B).
- **Forme** : régulière

#### ➤ Les caractères microscopiques:

- Mycélium cloisonné fin et parfois épais.
- Présence des macro et des microconidies (Fig 3.18 C).
- Présence de chlamydozoospores.

#### • Les macro conidies :

- Morphologie générale** : Court à la longueur moyenne, droit à courbé légèrement, relativement fin et mince muré, avec une extrémité effilé a courbé, et quelque fois avec un crochet léger.
- Nombre de cloison**: habituellement 3 cloisons (Fig 3.18 C).

#### • Micro conidies

- Forme** : Ovale, elliptique et habituellement sans cloison.
- Présentation du mycélium aérienne**: Fausse têtes.

#### ➤ Résultat de la mensuration :

##### -Macro conidie

Langueur = 43.2 à 91.2  $\mu$  m

Largeur= 4.8 à 9.6  $\mu$  m

##### -Micro conidie

Langueur = 9.6 à 33.6  $\mu$  m

Largeur= 4.8 à 9.6  $\mu$  m

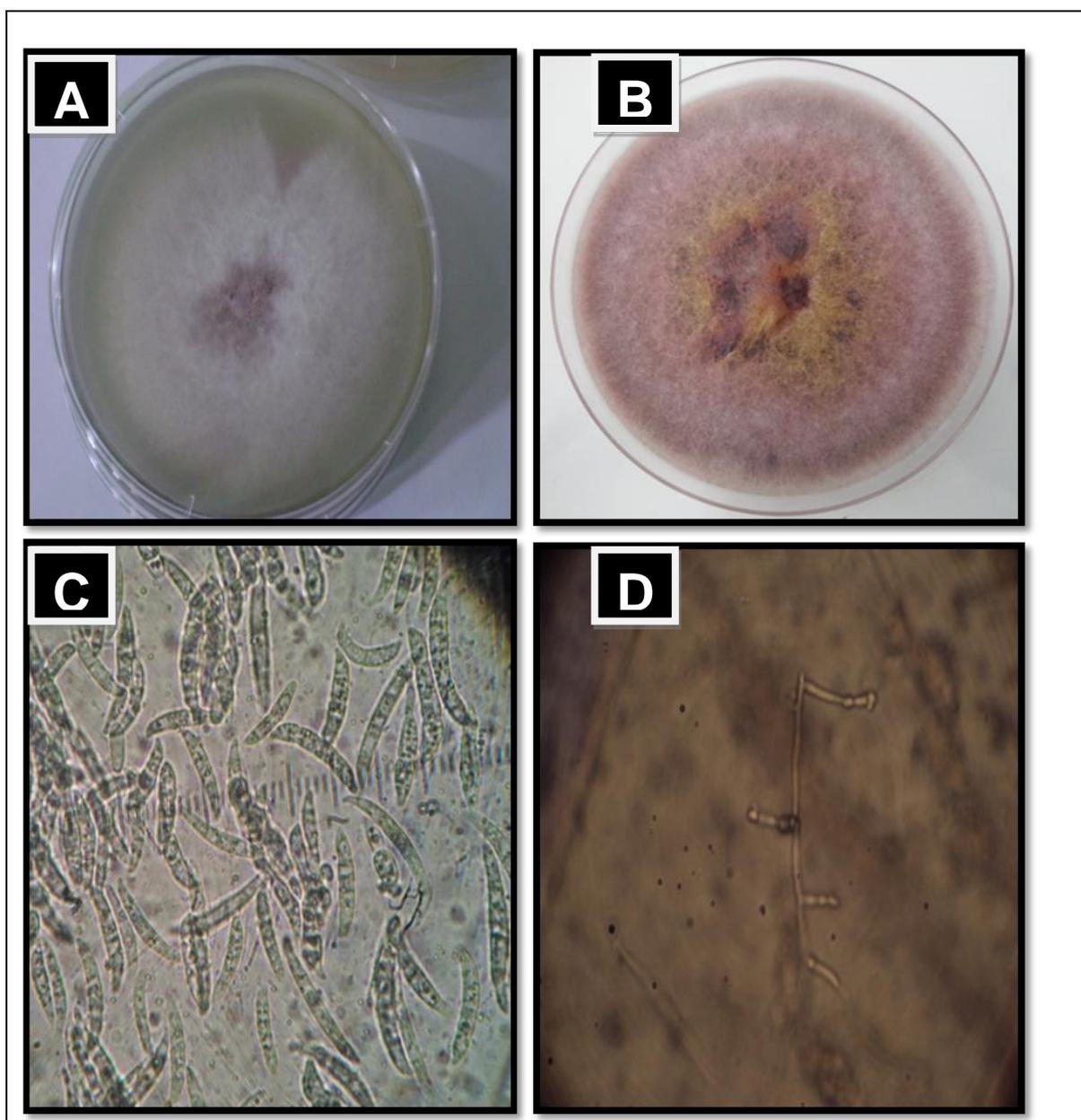


Figure 3.18: Vue microscopique et macroscopique de *Fusarium oxysporum*; A et B : Vue macroscopique de *Fusarium oxysporum*.C : Micro conidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* G :40\*10; D : Les monophialides (G : 40x10) ;

### II.1.2.2. Caractérisation moléculaire de la flore fusarienne

Pour confirmer l'identité des isolats de la flore fusarienne obtenus et identifiés par les caractères macroscopique et microscopique, une caractérisation moléculaire a été réalisée, les séquences d'ADN obtenues ont été aligné et comparées avec les espèces des champignons contenues dans la banque de gène (Gen Bank), la recherche effectuée a montré la présence de plusieurs espèces *Fusarium* qui correspondent aux séquences ITS des isolats contenues dans la banque de gène (Tableau 3.4).

L'analyse de gène d'élongation factor 1-alpha comprend des séquences d'un isolat de *Fusarium oxysporum f. cubense* issus de notre étude similaires aux séquences de référence extraites de GenBank. (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Présentation des espèces identifiées et les souches de référence du **GenBank**.

Souches identifiées	Référence des souches du GenBank
<i>Fusarium solani</i>	UASWS1385
<i>Fusarium solani</i>	UOM AE
<i>Fusarium solani</i>	SX1
<i>Fusarium solani</i>	MZ02
<i>Fusarium oxysporum</i>	Z9
<i>Fusarium oxysporum f. cubense</i>	XJ 37
<i>Fusarium equiseti</i>	dx-7
<i>Fusarium sp.</i>	Ai120
<i>Fusarium sp.</i>	ZH80

### II.1.3. *Phoma* sp

**Caractères cultureux** : Sur milieu PDA, ce champignon présente des colonies régulières d'une couleur rouge. Les hyphes fongiques sont initialement blancs et pelucheux (duveteux, flou). La pigmentation de la culture se développe avec le temps principalement rouge mais peut varier de l'orange à marron très foncé (Fig 3.19 A).

En culture, les conidies asexuées se développent sur la fin de court tiges (mono ou polyphialies) (Fig 3.19 C). Des phialoconidies sont produites par des phialides sur les hyphes libres : conidies hyaline, unicellulaire, uni nucléée et quelque fois bi-trinuclée, droit ou courbé avec apices arrondi (Fig 3.19 D).

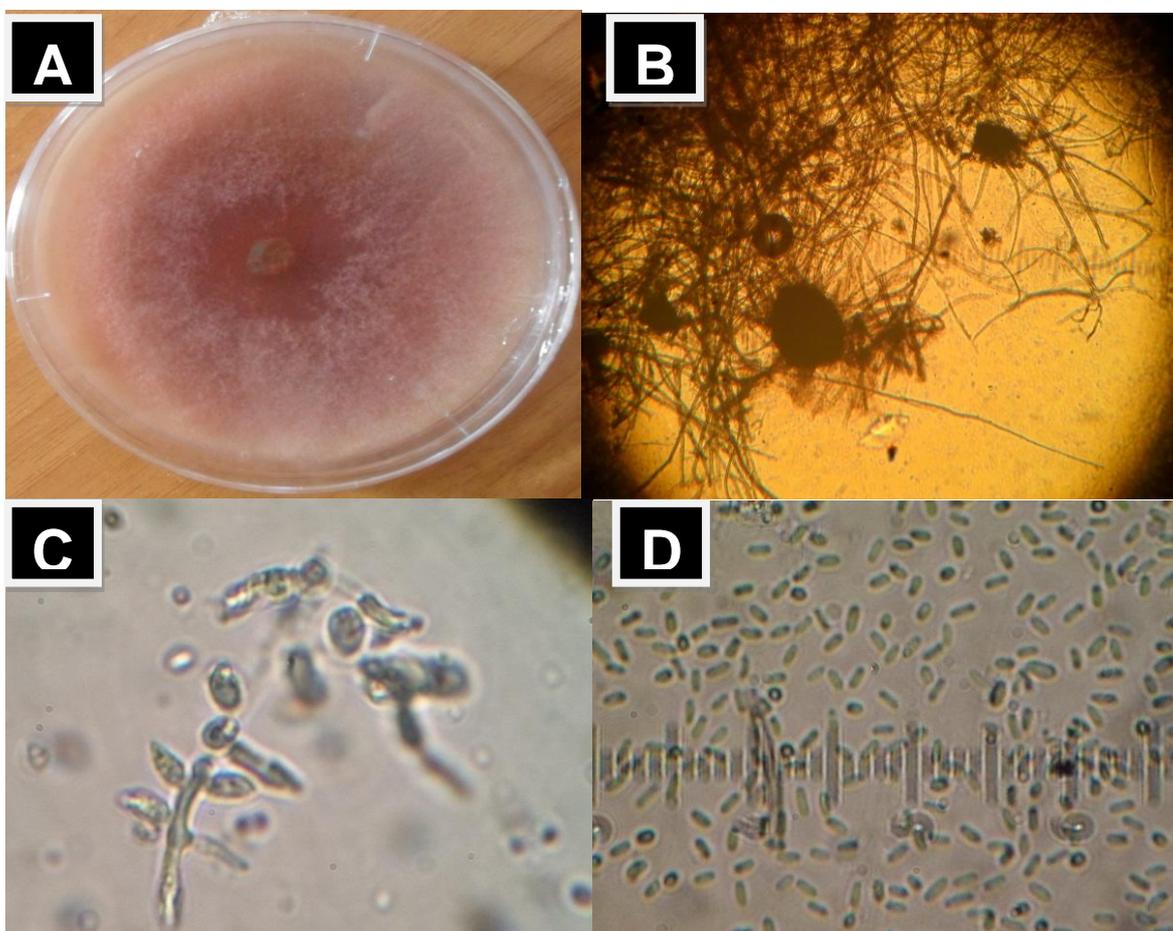


Figure 3.19 : vue microscopique et macroscopique du genre *phoma* ; A : Mycelium ; B : Pycnides ; C : Phialides ; D : Phialoconidies

#### II.1.4. *Eutypa* sp

Sur milieu PDA, ce champignon présente des colonies régulières vigoureuses d'une couleur blanchâtre d'apparence échevelée par suite de l'abondante production de filament mycélien aérien, réunis en petites cordons (Fig 3.20 A). Le mycélium devient dense en vieillissant, il forme des fructifications asexuées (pycnides). Les pycnides sont globuleuses, contient des multitudes de spores ou stylo spores (Fig 3.20 B.C).

La sporulation chez *Eutypa*, a été induite par l'incubation des cultures d'*Eutypa* à 25C° sous les rayons ultra-violets avec une photopériode de 12 h pendant 14 jours. La plupart des isolats ont formé des stromas conidifères contenant des conidies au bout de 14 jours d'incubation.

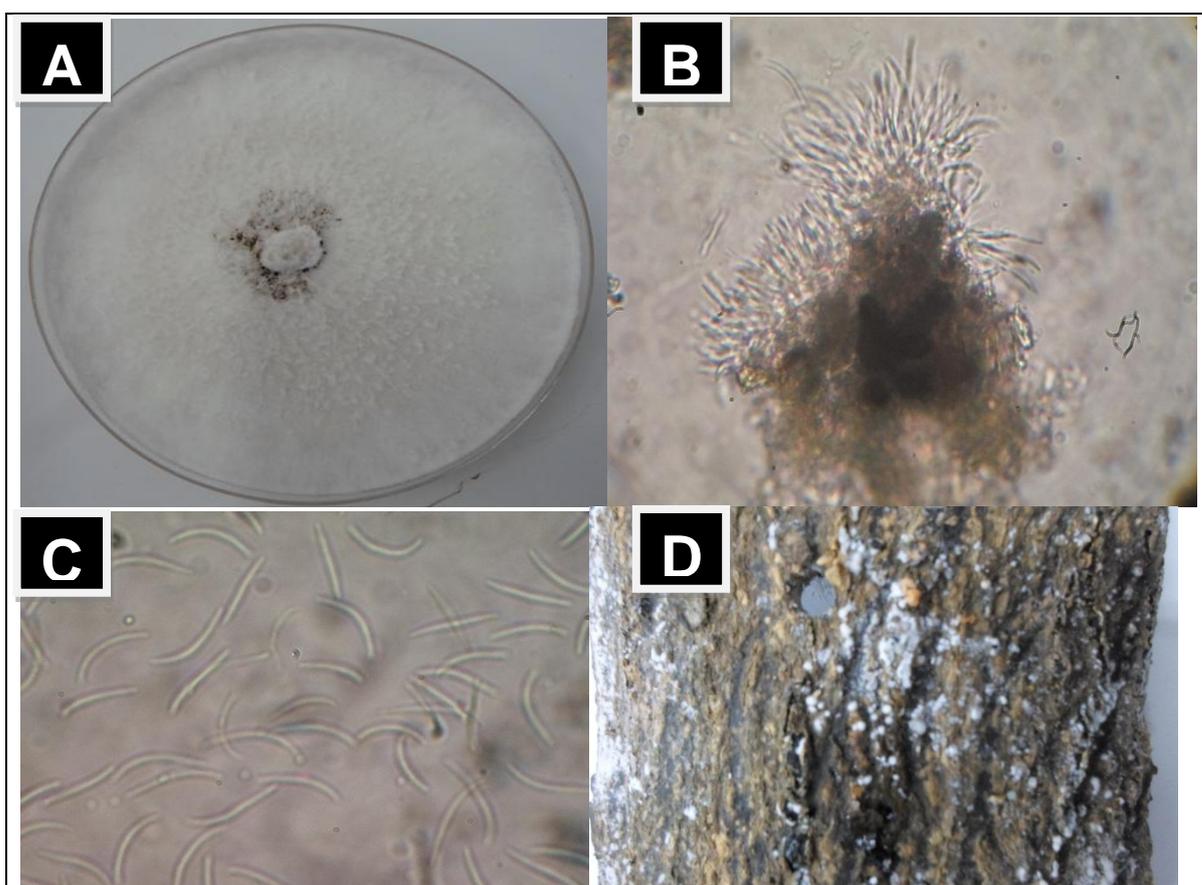


Figure 3.20 : Caractère macroscopique et microscopique d'*Eutypa* ; A : Caractère macroscopique sur PDA ; B : Cellules conidiogènes libèrent des conidies (stylospores) ; C : Stylospores ; D : Fructification sur écorce d'agrumes.

### II.1.5. *Alternaria sp*

#### ➤ Caractères macroscopiques

Présente des colonies, arrondies ; régulières d'un aspect cotonneux d'une couleur verdâtre à noirâtre (Fig 3.21A).

#### ➤ Caractères microscopiques

- **Conidies** : solitaires ou groupées ovoïdes, cylindriques ou piriformes ; arrondies à la base , verruqueuses atténuées à leur sommet, elles sont mûri formes (Fig 3.21 B).
- **Conidiospores** : sont solitaires ou fascicules, portant une chaîne simple ou ramifiée de conidies.
- **Mycélium** : sombre, ramifié, cloisonné (Fig 3.21 B).

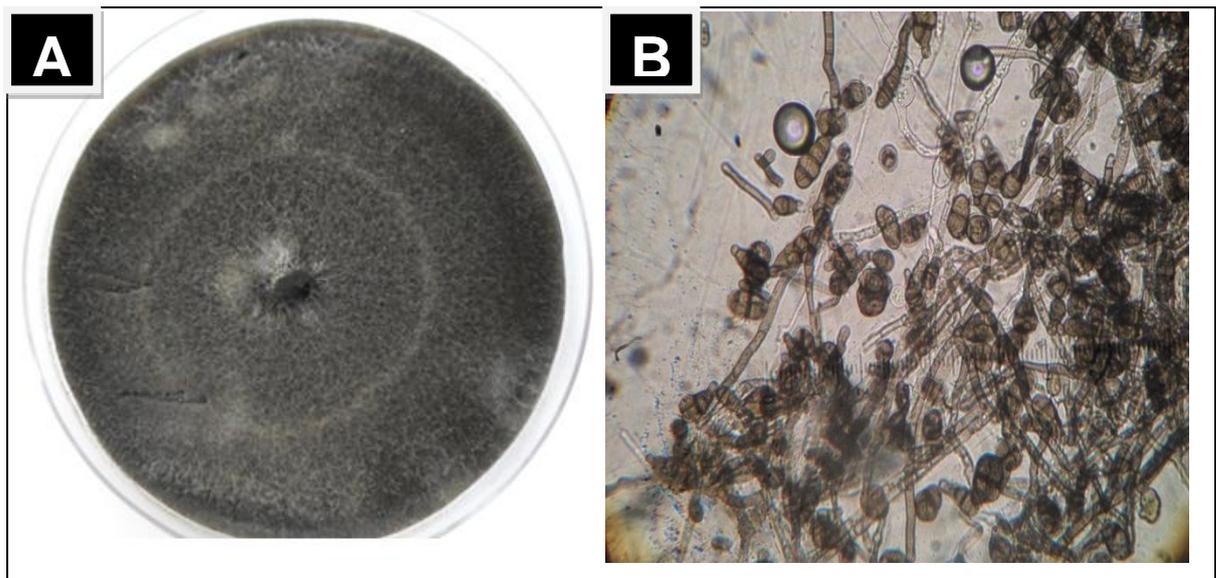


Figure 3.21: Vue microscopique et macroscopique d'*Alternaria sp* ; A : Vue macroscopique d'*Alternaria* sur PDA ; B : Mycélium cloisonné et conidies d'*Alternaria sp* (G : 40x10)

### II.1.6. *Colletotrichum sp*

- Caractéristiques macroscopiques :
  - La couleur : gris noirâtre avec des acervules et de la cire de couleur noire et orange (Fig 3.22 A)
  - L'aspect : cotonneux
  - La forme : Présente des colonies arrondies, régulières.
- Caractères microscopiques :
  - Conidies : cylindrique ellipsoïdes (Fig 3.22 C).
  - Conidiophores : simples, allongés, courts.

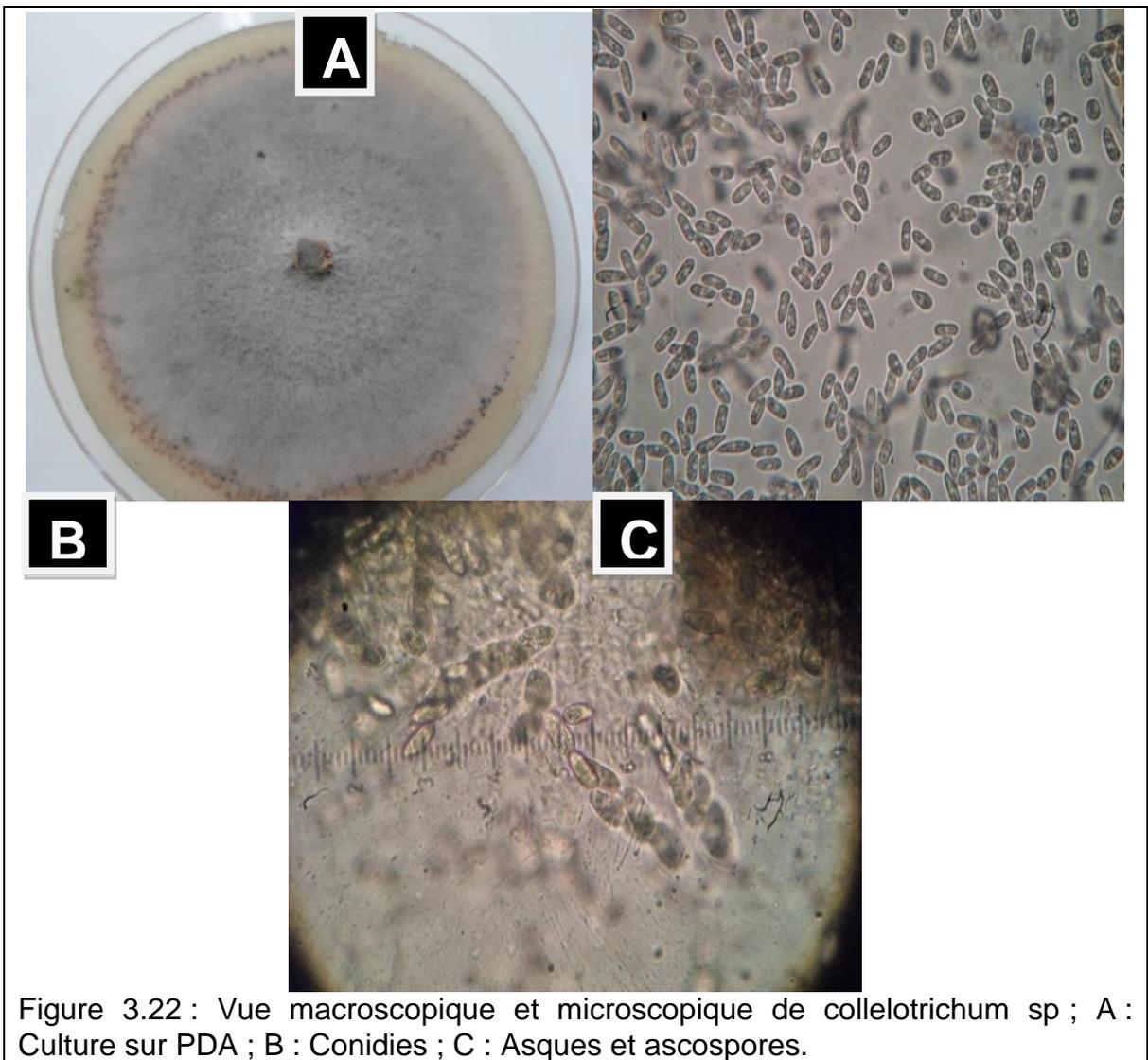


Figure 3.22 : Vue macroscopique et microscopique de *colletotrichum sp* ; A : Culture sur PDA ; B : Conidies ; C : Asques et ascospores.

## II.2. Fréquences d'isolement des champignons

Les fréquences d'isolements indiquent que la quantité et la qualité des isolats sont plus importantes chez les arbres dépéris de la variété Thomson avec une fréquence de 63.33% et 36.67% pour les vergers de clémentinier.

Les différents isolements réalisés que ce soit à partir d'écorce ou de bois ont fait ressortir une nette dominance de la flore de la famille des *Botryosphaeriaceae*, sur un total de 90 isolats, nous avons 44 isolats de *Botryosphaeriaceae*, soit 48.89% de nos isolats (Tableau 3.5).

En deuxième place, nous avons le genre *Fusarium* et *Phoma* qui ont été isolés dans les deux catégories de vergers avec un total de 15.56% (Fig 3.23).

Les autres genres des agents fongiques ont été retrouvés avec des fréquences plus faibles, le genre *Eutypa* 8.89% puis *Alternaria* 6.67% et le genre *colletotricum* 4.44 % (Fig 3.23).

Tableau 3.5 : Fréquences d'isolement des champignons pour chaque culture

Agents fongiques	Thomson	Clémentinier	Total
Botryosphaeriaceae	28* 31.11**	16 17.78	44 48.89
Fusarium	6 6.67	8 8.89	14 15.56
Phoma	10 11.11	4 4.44	14 15.56
Eutypa	5 5.56	3 3.33	8 8.89
Alternaria	6 6.67	0 0	6 6.67
Colletotricum	2 2.22	2 2.22	4 4.44
Total	57 63.33	33 36.67	90 100

\*= nombre d'isolats  
(%)

\*\*= fréquence d'isolement

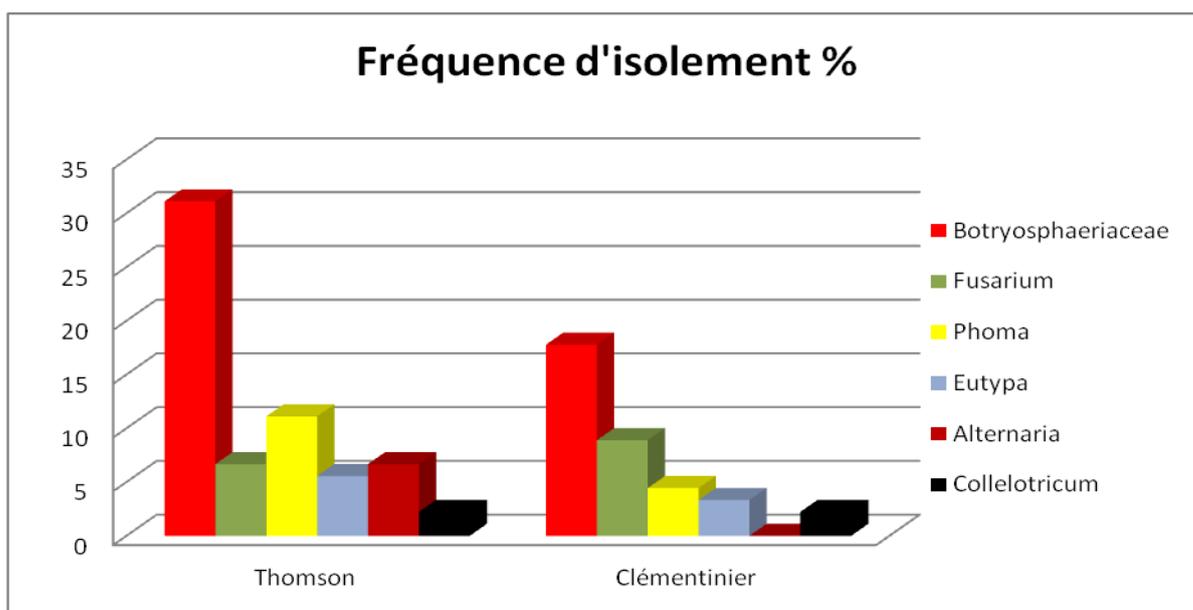


Figure 3.23 : Fréquences des isolats fongiques.

### II.3. Localisation des champignons dans les différentes nécroses

La famille des *Botryosphaeriaceae* ont été isolées à partir de toutes les nécroses, qu'elles soient sectorielles ou centrales et claire ou brune (tableau 3.6). Le tableau 3.5 révéla que cette famille est la plus isolée à partir du tronc (24 fois), et des branches (18 fois) avec une fréquence de 48,89 %.

*Le genre Fusarium a été isolé plus particulièrement de la nécrose claire en position sectorielle et centrale, de différentes parties de l'arbre. Par contre, il est absent dans les nécroses brunes foncées centrales du tronc sa fréquence est de 15,56% (tableau 3.6).*

*Le genre Phoma a été surtout présent sur la nécrose brune claire centrale et la nécrose sectorielle sur le tronc et les branches. D'autre part, il est absent dans les nécroses brunes foncées et marron centrales du tronc, sa fréquence est de 15,56%.*

*Le genre Eutypa n'a été isolé qu'à partir de la nécrose complexe des branches et la nécrose centrale marron du tronc seulement, avec une fréquence de 8,89%. Le genre Alternaria a été isolé à partir de la nécrose centrale au niveau de tronc et des branches, soit une fréquence de 6,67% (tableau 3.6).*

Tableau 3.6: Nombre d'isolat fongique selon le type de nécrose

Forme	Complexe		Centrale				Sectorielle	
	Brune	Brune	Brune foncé	Marron	Brune clair	Brune clair	Brune clair	Brune foncé
couleur								
Texture	Dure et molle	Dure et molle	dure	dure	molle	molle	molle	dure
Origine	branche	branche	tronc	tronc	tronc	branche	branche	tronc
Botryosphaeriace	0	2	8	1	9	7	9	8
Fusarium	0	0	0	3	4	2	1	4
Phoma	0	0	0	0	5	2	0	7
Eutypa	0	3	0	5	0	0	0	0
Alternaria	0	0	0	0	4	2	0	0
trichoderma	0	0	0	2	0	2	0	0
Total	0	5	8	11	17	13	10	12

### III. Test de pathogénicité

Les premiers symptômes ont fait leur apparition après un mois d'incubation, les plantules de Thomson gréffé sur Citrange troyer inoculés par les isolats de botryosphaeriace (souche 2), ont montré des lésions à partir du point d'inoculation. Ces isolats ont induit des nécroses internes et 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 3.24 ABCD).

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 botryosphaeriace (souche 2) alors que les autres isolats n'ont causé aucun symptôme. Les plantules du témoin n'ont montré aucun symptômes (Fig 3.24 FGHI).

Sur les plantules de porte greffe (Bigaradier), nous avons noté le dessèchement brutale de deux plantules sur trois inoculées par le genre fusarium (f.oxysporum), la troisième plantule a montré un jaunissement généralisé (Fig 3.24 E).

Après six mois d'iniculation, nous avons noté les symptômes finales de notre test de pathogénicité (tableau 3.7).

Les espèces utilisées dans ce test de pathogénicité ont été ré-isolés à partir des marges de lésions nécrotiques et leur identification a été confirmée sur la base des caractères morphologiques et culturales .

Tableau 3.7 : Résultats symptomatologiques du test de pathogénicité

Plant	Champignons	Observation
Thomson /citrange troyer	<i>Botryosphaeriaceae</i> souche 1	-Déssechement de feuillage et des brindilles. -Dégarnissement des extrémités des rameaux -nécrose sur le bois de la partie greffon
	<i>Botryosphaeriaceae</i> souche 2	-déssechement de feuillage, des brindilles et des extrémités des rameaux. -dégarnissement (défoliation) des brindilles et des extrémités des rameaux. -exsudation de gomme sur la partie greffon. - nécroses très développées sur la partie greffon et porte greffe.
	<i>Fusarium osysporum</i>	-Déssechement de feuillage et des brindilles. -Dégarnissement (défoliation) des extrémités des rameaux. Nécrose sur le bois de la partie greffon.
	<i>Eutypa</i>	Aucun symptôme a été observé sauf une décoloration de point d'inoculation.
	<i>collelotrichum</i>	Dégarnissement (défoliation) des brindilles et des rameaux. -dessèchement de quelques brindilles. -Nécrose limitée au point d'inoculation.
	<i>Phoma</i>	➤ - Aucun symptôme a été observé sauf une décoloration de point d'inoculation.
	Témoin	Sauf une légère décoloration de point d'inoculation, aucun symptôme a été noté sur la végétation
Bigaradier	<i>Fusarium osysporum</i>	-déssechement brutales de deux plants et jaunissement généralisé du troisième plant.
	<i>Fusarium solani</i>	-déssechement brutales d'un plant et jaunissement des feuilles des deux autres
	<i>Phoma</i>	Déssechement de quelques feuilles Herperplasie de nouvelle feuillage.
	<i>Botryosphaeriaceae</i>	Aucun symptôme
	Mélange	Déssechement brutal d'un plant. Déssechement du feuillage des deux autres puis la défoliation très rapide des deux plants.
	<i>Alternaria</i>	Aucun symptômes
	Témoin	aucun symptômes a été noté sur la végétation

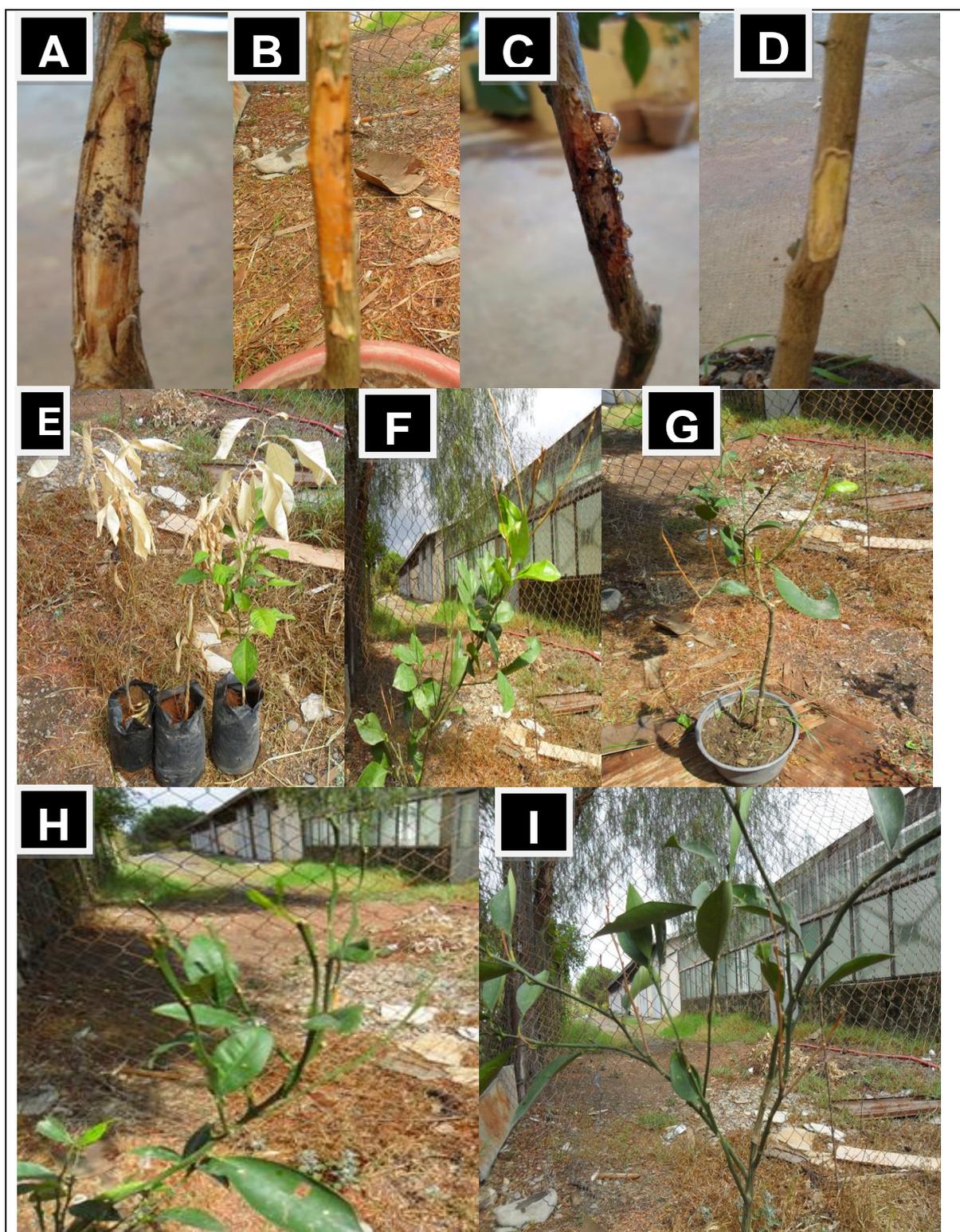


Figure 3.24 : Symptômes de test de pathogénicité. A et B : Nécrose sur tige ; C : Gomme sur tige ; D : Absence de nécrose sur le témoin ; E : Dessèchement des plantules de bigaradier ; F : Dessèchement des extrémités des rameaux ; G : Dégarnissement et dessèchement des extrémités des rameaux ; H : Dégarnissement des rameaux ; I : Dessèchement des brindilles

#### IV. Discussion

La discussion de nos résultats se base essentiellement sur les conclusions obtenues à partir de notre diagnostic symptomatologique réalisé sur terrain, sur les isollements effectués au niveau du laboratoire et les résultats de test de pathogénicité.

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 *Botryosphaeriaceae* (48.89%) suivi par les *Fusarium* et *Phoma* avec une fréquence de 15.56%. Les autres espèces des agents fongiques ont été retrouvés avec des fréquences plus faibles, *Eutypa* 8.89% puis *Alternaria* 6.67% et *Colleotrichum* 4.44 %. Notre étude démontre encore une fois la grande diversité de la flore fongique impliquée dans le processus de dépérissement.

Les espèces des *Botryosphaeriaceae* (*Botryosphaeriales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) sont des espèces cosmopolites qui s'attaquent à une large gamme d'hôte [97]. Elles sont associées aux différents symptômes : chancre de la tige, pourriture de fruit, dépérissement et la gommose [98] et elles sont connues comme endophytes [99]. 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 [100]. Deux espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* sont associés au dépérissement des agrumes en Floride : *Diplodia natalensis* Pole-evans et *Dothiorella* (*Btryospaeria ribis*). La même espèce *Diplodia natalensis* provoque la gommeuse des agrumes en GHANA et à CUBA. Sur les plantes d'orangers, *Diplodia natalensis* peut provoquer le dépérissement total de l'arbre [101].

Dans le cas des attaques légères, la gommose à *Diplodia* apparaît sur une partie de l'arbre et se traduit par des petits morceaux d'écorce mort accompagnées parfois d'une excrétion de gomme. Dans les cas sévères, les grandes parties d'écorce sont tuées et le bois sous-jacent noirci et meurt par invasion du champignon à partir des parties de l'écorce attaquées. Chez les

arbres affaiblis par le froid ou d'autres causes, le champignon peut causer une "pourriture du cœur" ou la "pourriture du bois". La pourriture est accentuée par d'autres champignons de pourriture de bois. Ces symptômes présentent une similitude parfaite avec celle de notre diagnostic symptomatologique. Ce qui nous a amené à soupçonner l'implication ou l'association de cet agent pathogène avec le dépérissement observés.

Les résultats du diagnostic symptomatologique montrent une similitude relative des symptômes observés sur terrain avec celle de la pourriture sèche des racines. Les premiers symptômes détectés de la pourriture sèche, montrent que les feuilles se fanent subitement et sèchent en place ou que quelques feuilles sont tombées, en donnant une apparence ouverte à l'arbre avec plus de brindilles mortes. 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 une ou plusieurs espèces de *Fusarium*, de bactéries et occasionnellement des parasites secondaires des agrumes trouvés dans le sol. Eventuellement autres champignons destructifs du bois entrent et détruisent le bois. Dans les coupes microscopiques du bois, *Fusarium spp.*, est vu progresser à travers les cellules vivantes des vaisseaux conducteur [60].

Après amplification et séquençage des ADN, en utilisant les amorces universelles (ITS1, ITS2) et le gène d'élongation factor 1-alpha, les résultats montrent sans aucune ambiguïté une nette dominance des espèces de *Fusarium solani*, synonyme de leur implication directe dans la causalité des dépérissements dans les vergers d'agrumes étudiés. 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, 60, 106].

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. L'examen des arbres infectés, en général, révèle une carie sèche des racines

fibreuses, les grandes racines et le tronc sous la surface du sol [65]. 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 altération par les travaux de sol [60].

En ce qui concerne le mal secco, Cette maladie est causée par *Deuterophoma tracheiphila*, les symptômes typiques de cette maladie apparaissent sur un secteur de l'arbre, sur les feuilles au printemps : chloroses des pousses et des feuilles puis un dépérissement des brindilles et des branches. Sur les rameaux, Les brindilles meurent et aussi les petits rameaux. Cette maladie s'étale ensuite vers le bas et atteint les grosses branches. Ces symptômes montrent une similitude avec celle de notre descriptif symptomatologique, ce qui nous mène à soupçonner l'implication de cet agent pathogène dans ces cas de dépérissement.

Le genre *Eutypa* est un ascomycète de la famille *Diatrypacée* [100], c'est un champignon polyphage pouvant s'attaquer à plus de 80 plants appartient à 17 familles botaniques dispersées dans le monde [103]. *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 [102]. 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 [105]. *Eutypa* n'est pas connu comme parasite des agrumes, malgré sa polyphagie.

L'antracnose est causée par *Colletotrichum gloeosporioides* Peuz. Les spores du champignon se présentent généralement sur les feuilles et les rameaux desséchés, sous forme de petites taches foncées. Petri avait attribué le mal secco à l'action d'un Champignon : *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig, qui, en 1925, avait été isolé sur des rameaux atteints de Mal secco, par Peyronel qui ait signalé le caractère saprophytique de ce Champignon. *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig s'était donc révélé incapable, à lui seul, pour justifier l'extension de la maladie de mal secco. Ce champignon est limité aux dessèchements et dégarnissements des extrémités des rameaux et il ne peut pas provoquer des dépérissements sévères [31]. Les résultats du test pathogénicité révèlent que les

symptômes provoqués par *Colletotrichum* sont limités au dégarnissement et dans le cas sévère le dessèchement de quelques brindilles. Ces symptômes ne sont pas suffisants pour considérer ce champignon comme responsable direct de dépérissement.

Les études de pathogénicité ont montré que les espèces de la famille des *botryspheariacées* ont provoqué 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 sur la partie greffon en plus des lésions nécrotiques observées sur les tiges de porte-greffe et de greffon. La souche 2 des *botryspheariacées* s'est montrée plus rapide dans le développement avec une précocité dans l'apparition des symptômes.

La dominance des espèces des *botryspheariacées* dans les isolements fongiques réalisée et les résultats de test de pathogénicité, nous a laissé penser à l'implication obligatoire de ce champignon dans la causalité du dépérissement (tableau 6.4 et 6.6). Néanmoins leur responsabilité pathogénique directe fait objet de discussion. Il en ressort qu'elles sont considérées au titre d'agents causaux principaux, mais aussi saprophytes opportunistes et parfois comme des pathogènes secondaires aggravant les dépérissements [95].

Sur les portes greffes de Bigaradier, les espèces du genre *Fusarium* ont provoqué le dessèchement brutal et le jaunissement des plantules inoculées. Selon Nemeč et al [106] *Fusarium* synthétise des toxines qui peuvent réagir avec d'autres espèces que ce soit des saprophytes ou des parasites obligatoires pour engendrer des dégâts. Ces symptômes présentent une grande ressemblance avec ceux observés sur terrain (dépérissement brutal et jaunissement léger et généralisé). Les résultats obtenus par le test de pathogénicité, montrent une similitude symptomatologique parfaite avec celle de la pourriture sèche des agrumes, de ce fait cette maladie est fortement impliquée comme cause directe de ce dépérissement.

D'autre part, un mélange de toutes les souches isolées a provoqué la défoliation et le dessèchement de toutes les plantules inoculées. L'association de

ces champignons a induit une affection beaucoup plus sévère que celle produite quand l'un ou l'autre agit seul. En bibliographie, il y a des cas similaires tel que la gommose sur citrons en Floride et en Californie qui a été associée à un effet de la combinaison de *Diplodia* et *Phomopsis* [60].

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montre clairement la grande diversité de la flore fongique impliquée dans le processus de dépérissement. En comparant les fréquences d'isolement des différentes espèces, nous constatons, la dominance des espèces de *Botryosphaeriaceae*, *Fusarium* et *Phoma*. Ainsi la présence des espèces d'*Eutypa*, *Alternaria* et *Colletotrichum* avec des fréquences plus faibles. Nous avons démontré aussi le potentiel pathogénique des espèces des *Botryosphaeriaceae* et des *Fusarium* sur des plants greffés (Thomson/Citrange Troyer) et de *Fusarium* et le mélange de toutes les souches isolées sur des porte-greffes de Bigaradier. A cet effet, nous pouvons affirmer l'implication directe des espèces de *Fusarium* comme cause de dépérissement et la contribution des espèces des *Botryosphaeriaceae* autant que pathogènes secondaires aggravant la situation, surtout avec la présence des espèces d'*Eutypa*, d'*Alternaria* et des acervules de *Colletotrichum*, qui sont souvent associés aux pycnides de *Phoma*. Dans une telle situation, les caractéristiques du sol (terrain lourd) et les travaux culturels inadéquats (taille et discage) sont considérés comme des facteurs essentiels d'initiation et l'évolution des situations de dépérissement.

Pour parer à ce genre de problèmes, il est impératif de sensibiliser les agrumiculteurs et d'établir un programme de lutte prophylactique. Dans ce contexte les techniques culturales, notamment le travail de sol et l'irrigation doivent être améliorés en utilisant des techniques plus modernes 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.

## 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.

Nous avons ciblé dans notre étude 10 vergers d'agrumes situés à Oued El Alleug, cumulant plus de 5 544 arbres, sur une superficie de 18.5 ha. La surveillance des cas de dépérissement, a permis de constater la présence de plusieurs foyers de évolutif regroupent trois classes. Notre travail sur terrain, nous a permis d'enregistrer une moyenne générale du taux d'infection de 42% dont 13.17% représente la classe 1, 8.68 % de la classe 2, 1.93% de la classe 3 et 18.18% de la classe 4, nous avons enregistré aussi une valeur moyenne de la classe du dépérissement de 2,60 et une incidence moyenne de 27.26%. 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.

Nous avons noté que les situations de dépérissement apparaissent et évoluent selon deux cas : un dépérissement foudroyant où l'arbre passe d'un état sain son aucun symptôme à une situation de dépérissement total au bout de quelques jours et un dépérissement progressif qui s'annoncent par un jaunissement et une orientation des feuilles vers le haut, dessèchement et chute rapide de feuillage suivi par une réduction intense de la végétation, accompagné par une réduction des fruits en nombre et en calibre. Le tronc présent des craquelures et des fissures, noircissement et brunissements. Au niveau des racines, nous avons observé des brunissements, noircissements et pourritures humide, au début, qui plus tard se dessèche. Cette situation se termine par un dépérissement partiel ou total d'arbre.

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 de *Botryosphaeriaceae* (48.89%) suivi par *Fusarium* et *Phoma* avec une fréquence de 15.56%. Les autres agents fongiques ont été retrouvés avec des fréquences plus faibles, *Eutypa* 8.89% puis *Alternaria* 6.67% et *Colletotrichum* 4.44 %. Nous avons démontré aussi le potentiel pathogénique des espèces des *Botryosphaeriaceae* et des *Fusarium* sur des plants greffés (Thomson/Citrange Troyer) et de *Fusarium* et le mélange de toutes les souches isolées sur des porte-greffes de Bigaradier.

A cet effet, les résultats d'isolement et de pathogénicité confirment l'implication direct des espèces de *Fusarium* comme cause de dépérissement et la contribution des espèces des *Botryosphaeriaceae* autant que pathogènes secondaires aggravant la situation, surtout avec la présence des espèces d'*Eutypa*, d'*Alternaria* et des acervules de *Colletotrichum*, qui sont souvent associés aux pycnides de *Phoma*. 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 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.

Actuellement, il est impératif d'orienter les travaux sur l'aspect étiologique et épidémiologique en élargissant la zone d'étude pour reconnaître l'origine de cette affection et cerner l'ensemble des causes combinées entre problèmes physiologiques et affections parasitaires.

## Appendices

### Appendice A

#### Bilan de la production agrumicole 2013/2014

WILAYA	TOTAL			
	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
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
TOTAL ALGERIE	66 017	59 151	12 710 030	214,9

## **Appendice 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.

## Appendice C

### Bulletin d'analyse de sol des vergers étudiés



**siddra**  
Système Intégré d'analyse et de  
Recommandation de Fertilisation

Référence N°: 2755    13/06/2015  
Buletin edité le:    22/07/2015



**Données du consultant**  
sofiane TSOURI  
EAC3, Domaine Zamouri ex domaine 13 09210 Oued el Alleug (Blida)



**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: Goutte-à-goutte (g. à g.)
Localité: Oued el Alleug	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
	%	p.p.m.
Carbonates	3,39	33900,00
Calcaire actif	-	-
Matière organique	2,91	29100,00
Azote Total	0,14	1400,00
	meq/100gr	p.p.m.
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

	Très faible	Faible	Normal	Élevé	Très élevé	
CE				0,2		mS/cm
pH				8,45		
C/N				12,08		
CaCO3				3,39		%
C,actif						%
MO				2,91		%
N				0,14		%
P				26,2		p.p.m.
K				0,8		meq/100gr
Mg				767,3		meq/100gr
Ca				29,1		meq/100gr
Na				0,2		meq/100gr

(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 est élevé ce qui indique que la matière organique est peu décomposée, processus qu'il faut favoriser en incorporant de l'azote au sol. Ce 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**

<b>Fertilisation de fond</b>	<b>Kg/Ha</b>	
N.P.Ks 04-20-25	150	
T.S.P. 46% P2O5	0	
sulfate de potassium 0-0-50	0	
<b>Fertilisation d'entretien</b>		
SULFAZOT	132	L'engrais de couverture doit être réparti sur 3 applications

**Observations**

Le porte greffe adapté a 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

## Appendice D

### Bulletin d'analyse de sol des vergers étudiés



**siddra**  
Système Intégré d'analyse et de  
Recommandation de Fertilisation

Référence N°: 2756    13/06/2015  
Buletin édité le:    22/07/2015



Les Fertilisants d'Algérie

**Données du consultant**

sofiane TSOURI  
EAC3\_Domaine Zamouri ex domaine 13 09210 Oued el Alleug (Blida)

**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: Goutte-à-goutte (g. à g.)
Localité: <b>Oued el Alleug</b>	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%		Très faible	Faible	Normal	Élevé	Très élevé	
Texture: Argileuse										
Conductivité (1/5 mS/cm)	0,22		Non salé	CE				0,22		mS/cm
pH eau (1/2.5)	8,35		Alcalin	pH				8,35		
C/N	11,71		Normal	C/N				11,71		
Carbonates	%		p.p.m.	CaCO3				2,32		%
Calcaire actif	2,32		23200,00	C,actif						%
Matière organique	-		-	MO				2,82		%
Azote Total	2,82		28200,00	N				0,14		%
	0,14		1400,00	P				14,2		p.p.m.
Phosphore (Olsen)	meq/100gr		p.p.m.	K				0,3		meq/100gr
Potassium échangeable	0,05		14,2	Mg				2,4		meq/100gr
Magnésium échangeable	0,3		132,9	Ca				18,6		meq/100gr
Calcium échangeable	2,4		291,9	Na				0,1		meq/100gr
Sodium échangeable	18,0		3603,2							
	0,1		25,3							

(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. 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



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

## Appendice E

### Bulletin d'analyse de sol des vergers étudiés



**siddra**  
Système Intégré d'analyse et de  
Recommandation de Fertilisation

Référence N°: 2757    13/06/2015  
Buletin édité le:    22/07/2015



**Données du consultant**  
sofiane TSOURI  
EAC3, Domaine Zamouri ex domaine 13 09210 Oued el Alleug (Blida)

**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: Goutte-à-goutte (g. à g.)
Localité: Oued el Alleug	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-16067	Code-barres 
--	---------------------------	---

Sable 24%	Limon 24%	Argile 52%	
Texture: Argileuse			
Conductivité (1/5 mS/cm)	0,24	Non salé	CE 0,24 mS/cm
pH eau (1/2.5)	8,28	Alcalin	pH 8,28
C/N	11,34	Normal	C/N 11,34
	%	p.p.m.	
Carbonates	0,74	7400,00	CaCO <sub>3</sub> 0,74 %
Calcaire actif	-	-	C.actif %
Matière organique	3,12	31200,00	MO 3,12 %
Azote Total	0,16	1600,00	N 0,16 %
	meq/100gr	p.p.m.	
Phosphore (Olsen)	0,06	18,4	P 0,06 p.p.m.
Potassium échangeable	0,4	152,5	K 0,4 meq/100gr
Magnésium échangeable	2,4	296,7	Mg 2,4 meq/100gr
Calcium échangeable	17,5	3505,0	Ca 17,5 meq/100gr
Sodium échangeable	0,1	23,0	Na 0,1 meq/100gr

**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**

<b>Fertilisation de fond</b>	<b>Kg/Ha</b>	
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*

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

## Appendice F

### Bulletin d'analyse de sol des vergers étudiés



**sidra**  
Système Intégré d'analyse et de  
Recommandation de Fertilisation

Référence N°: 2754    13/06/2015  
Bulletin édité le:    22/07/2015

**Données du consultant**  
sofiâne TSOURI  
EAC3, Domaine Zamouri ex domaine 13 09210 Oued el Alleug (Blida)



**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: Goutte-à-goutte (g. à g.)
Localité: Oued el Alleug	Surface: 1 Ha
C.P.: 09210 (Blida)	Identification: 1

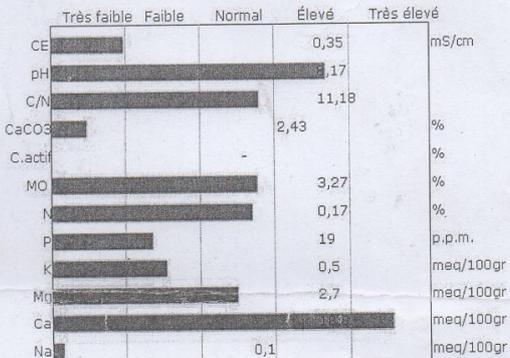
**Résultats de l'analyse du sol**

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	233,2
Calcium échangeable	18,8	3769,5
Sodium échangeable	0,1	23,0

	Très faible	Faible	Normal	Élevé	Très élevé
--	-------------	--------	--------	-------	------------



(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. 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

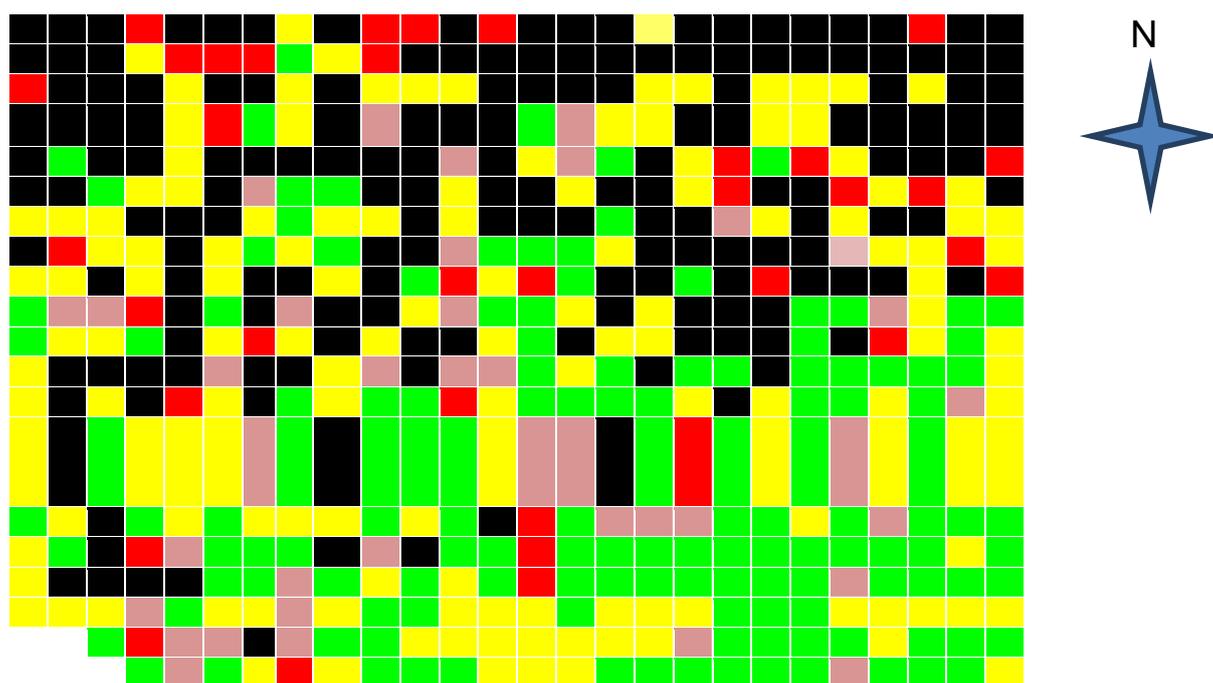
Signé : Conseiller Agronomique.

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



	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		

Appendice G Localisation de différentes classes symptomatologiques dans le

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO), principaux faits nouveaux et perspectives à court terme concernant les marchés (soixante-dixième session), CCP 14/2, 20p, Rome, 7-9 octobre 2014.
2. Ministère de l'agriculture et du développement rural, Données statistiques ; Alger, 2015. 15p.
3. Données statistiques du service de la direction des services agricoles (DSA) ; Blida. 3p.
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. 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.
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. Blog des Agrumes: Exigences de la culture  
<http://blogdesagrumes.blogspot.com/2012/05/exigences-de-la-culture.htm>.
17. Secrétariat de CNUCED d'après les données statistiques de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, 2014. 7p.
18. Euro-Méditerranée ; Agrumes : la production du pourtour méditerranéen baisserait de 7% en 2014-2015. <http://euro-mediterranee.blogspot.com/2014/11/agrumes-la-production-du-pourtour.html>.
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. 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)
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<sup>th</sup> ICTV report of the international committee 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, supplément 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. Childs, J.F.L., "The cachexia disease of Orlando tangelo", *Plant Disease*,(1950), 34:295-298.
38. ROISTACHER.C.N .And al.1973. In WALTER REUTHER. E. CLAIR CALAVAN and GLENN E. CARMAN.1978. the citrus industry. Vol 4. chap n°2. 67-173pp.
39. Tahiri, A., 2007. Maladies virales des agrumes. Département de protection des plantes ENA-Meknès pp : 1- 33.
40. 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.
41. Saglio, P., L'Hospital, M., Lafléche, D., Dupont, G., Bové, J.M., Tully, J.G., Freundt, E.A., "Spiroplasma citri gen. and sp. n. a Mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of citrus", *International Journal of Systematic Bacteriology*, (1973), 23,191-204.

42. Bové, J.M., "Spiroplasma citri. Identification", In: Bové, J.M. & Vogel, R., (eds), "Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of color slides". Paris, I.R.F.A, SETCO-FRUITS, (1980).
43. Calavan, E.C., "Stubborn", In: Bové, J.M. & Vogel, R., (eds), "Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of color slides". Paris, I.R.F.A, SETCO-FRUITS, (1980).
44. Lin, C.P. & Chen, T.A., Production of monoclonal antibodies against Spiroplasma citri. *Phytopathology*, (1985), 75(7): 848-851.
45. Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO), Problèmes phytosanitaire du secteur des agrumes et politiques de lutte (Troisième section), CCP : CIO3/3.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. EPPO., "European and Mediterranean Plant Protection Organization", (2010). [www.eppo.org](http://www.eppo.org).
51. 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.
52. 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
53. 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

54. 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
55. 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
56. 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
57. Roistacher, C.N., "EcoPort slide shows", (2010). [www.ecoport.org](http://www.ecoport.org)
58. 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
59. Rieuf, p.1951. Le mildiou des agrumes, gommose parasitaire des arbres, pourriture brune des fruits, Terres Marocaines, T.XXV, Fax.260, P222-223.
60. Klotz, L. 1973. Color Handbook of Citrus Diseases. University of California. Division Riverside, California. 122 pp.
61. Wyss, Dunant, 1949. La gommose ou les gommoses des Aurantiacées. Rev. Franc : de l'oranger, p 165.
62. Anonyme, 1976 La protection phytosanitaire des agrumes en Algérie. Ed. Cibageigy. Alger ,159p.
63. 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)
64. Roger, L.1951. Phytopathologie des pays chauds, 225 P ; Edit. Le chevalier, Paris.
65. Fawcett, H.S., 1936. Citrus diseases and their control; 2ème édition Edit. Me Grawhill Book company. I.N.C. New- York and London. 656p.
66. KLOTZ, L. J., T. A. DeWolfe and M.P Miller., 1967. Dry root rot may be confused with brown rot gummosis. Calif citrograph 52: 222-25.
67. Chung, H.L.1923. The Sweet Potato in Hawaii .Hawaii Agric .Exp.Stut .Bull.T.L.20 P.

68. Mouton, A., 1953. *Phymatotriclun omvorum* (shean). Dng. Rev. de mycolo. T. XVIII suppl.col. N°2, p 69-87 (Nowell, 1917).
69. GENTILE, A.; TRIBULATO, E.; DENG, Z.N.; VARDI, A.1992. Selection of "Femminello"lemon plants withtolerance to the toxin of *Phomatraceiphilavia* cell culture. *VIII International Citrus Congress, Acireale, Italy, March 8-13, 1992* (Abstract).
70. CMI.1978. *Distribution Maps of Plant Diseases* No. 155 (edition 3). CAB International, Wallingford, Royaume-Uni
71. 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.
72. 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.
73. EPPO/OEPP., "Deuterophoma tracheiphila", Data Sheets on Quarantine Pests, CABI and EPPO for the EU, (2007), under Contract 90/399003, 5p.
74. 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.
75. 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.
76. OEPP/CABI., vitrus blight disease. In organisme de quarentaine pour l'europe 2 éme edition cab international. Wallingford, royaume-uni.71p.
77. Nickel, O., 1987. Double-stranded RNA isolated from "decelinio\* affected pera sweet orange. *Fitopatologia Brasileira* 12, p 398-399.
78. Wutscher, H. K., Smith, P.F., 1988. Failure to propagate citrus blight in reconstituted trees. *Prooeeding of thé Florida Staea Horticultural Society* 101. pp:62.
79. Tucker, D.P.H.; Lee, R.F.; Timmer, L.W.; Albrigo, L.G.; Brlansky, R.H. 1984. Experimental transmission of citrus blight. *Plant Disease* 68, 979-980p.
80. Ippolito, A., "Dannosità delle malattie", lecture presentation, Universita' degli Studi di Bari, (2010), 18p

81. [FERTIAL spa, Société des fertilisants d'Algérie, laboratoire agronomique, bulletin N ° 2755, 2015. www.fertial-dz.com.](http://www.fertial-dz.com)
82. 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
83. Gottwald, T.R., Bergamin-Filho, A., "Quantitative epidemiology tools: Their application and interpretation for citrus diseases", International Organization of Citrus Virologists, IOCV, (2010), 93p
84. Ippolito, A., Maurantonio, V., D'Anna, R., "Role of infected seeds of citrus rootstocks in the spread of mal secco disease", International Society of Citriculture, (1992), 2: 877-878. (Ippolito, 1992 et 2007; Pollastro, 2000 et 2007).
85. von Arx JA, Müller E. 1954. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. Beiträge zur Cryptogamenflora der Schweiz II(I):1-434.
86. Crous et al. 2009. Plant-pathogenic fungi. Cramer, Berlin
87. Davet, P; Rouxe, F., "Détection et isolement des champignons du sol", INRA, Paris, (1997), 177p
88. Barnett, H ET Barry Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi, third edition. Burgess publishing company. 239p.
89. Seifert, K., 1996. Fusarium interactive key (Fuskey). Agriculture and agro-food Canada, N°A 24.65p.
90. Alan J.L. Phillips, Bernard Slippers, Johannes Z. Groenewald and Pedro W. Crous., 2013. Plant pathogenic and endophytic *Botryosphaeriales* known from culture. Studies in Mycology 76.
91. 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.
92. Liu D., Colose S., Baird R. and Pederson J. (2000). Rapid mini preparation of fungal DNA for PCR. *Jornal of Clinical Microbiology* 38:471.15.
93. Guzhen L. and Mitchell T.G (2000). Rapid identification of pathogenic fungi directly from culture by using multiplex PCR. *Jornal of Clinical Microbiology*, p. 2860-2865.
94. Alan J.L. Phillips, Bernard Slippers, Johannes Z. Groenewald and Pedro W. Crous., 2013. Plant pathogenic and endophytic *Botryosphaeriales* known from culture. Studies in Mycology 76.

95. Trouillas, F. P., and Gubler, W. D. 2010. Pathogenicity of *Diatrypaceae* species in grapevines in California. *Plant Dis.* 94:867-872
96. PRALORAN J.C. 1971. les agrumes. ed.G.P. Maisonneuve et Larose, Paris, 565p.
97. von Arx JA, Müller E. 1954. Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. Beiträge zur Cryptogamenflora der Schweiz II(I):1–434.
98. Arx JA von . 1987. Plant-pathogenic fungi. Cramer, Berlin:
99. Slippers B, Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90 – 106
100. Taylor A, Hardy GESTJ, Wood P, Burgess T. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australas Plant Pathol* 34:187–195.
101. Bunting, R. H. & Dade, H. A. (1925) *Gold Coast plant diseases*. Gold Coast Government Publication.
102. Dubos B., 1996. Eutypiose de la vigne. *Eutypa lata* (pers : fr) Tur : CR. Acad. Agric. France. 92 (1) 21-30.
103. Boley A., 1986 comment protéger la vigne et les arbres fruitiers des attaques d'eutypiose. *Revue suisse de viticulture, d'arboriculture et d'horticulture*. Vol 18. 7-13.
104. Bolay A et Siegfried W., 1986. L'eutypiose. *Revue suisse de viticulture*. Fiche 31-5.
105. Dubos B., 1999. Les maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. *Edition Ferret*, 200.
106. Nemeč, S; Jabaji-Hare, S; Charest, P.M, 1991. ELISA and immunocytochemical detection of *Fusarium solani*-produced naphthazarin toxins in citrus trees in Florida. *Phytopathology* 81p, 1497-1503.