

EFFET DE *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS* SUR LA MORPHOGENESE ET SUR LA PHYSIOLOGIE DES ARBRES DE *CITRUS* 'MALTAISE DOUCE' GREFFEES SUR BIGARADIER

S. Kallel et M.M. B'Chir

Laboratoire de Nématologie, Institut National Agronomique de Tunisie, 43, Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis - Mabrajène, Tunisie

Résumé. L'étiologie et l'effet du nématode des *Citrus*, *Tylenchulus semipenetrans*, sur la physiologie a été étudiée sur des jeunes plantations d'oranger élevées en bacs pendant quatre années. Les résultats montrent que les plants de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers installés en bac sur un sol infesté par le nématode des *Citrus* présentent un retard de croissance pendant les premières années. En effet, la hauteur du greffon et le diamètre des troncs des arbres infestés sont significativement plus faibles que ceux des arbres sains. Les plants infestés par le nématode, par comparaison aux plants sains, présentent des difficultés pour la production et l'accumulation de réserves avec une diminution de la biomasse des racines primaires et la surface totale foliaire par arbre la première année ainsi que la biomasse du tronc la deuxième année. Pendant la phase d'entrée en production, le nématode des *Citrus* induit une modification de la morphogenèse du greffon. Quatre années après la plantation, les plants infestés par *T. semipenetrans*, contrairement aux plants sains, présentent un excès de croissance des rameaux orthotropes par rapport à la croissance des rameaux plagiotropes. Le nématode a altéré des paramètres physiologiques des orangers en diminuant la conductance stomatique et la transpiration des feuilles des arbres infestés par rapport aux arbres sains mais il n'y a pas eu d'effet sur la photosynthèse.

Mots-clés: Accumulation d'amidon, *Citrus aurantium*, effet sur la croissance des arbres, nématode des *Citrus*, photosynthèse, stress hydrique.

Summary. Effect of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, on morphogenesis and physiology of 'Maltaise douce' orange grafted on sour orange. The aetiology and effect of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, was studied on young orange trees grown in large containers, in infested and non-infested soil. The citrus nematode affected the growth of young trees of "Maltaise douce" grafted on sour orange during the first years. Scion height and trunk diameter of infested trees were significantly smaller than those of the healthy trees. In soil infested with the citrus nematode, orange trees produced and accumulated less energy reserves, correlated with the reduction of primary root biomass and total leaf surface per tree the first year and trunk biomass the second year. At the beginning of the fruiting period, the citrus nematode modified scion morphogenesis. Four years after planting, trees infested by *T. semipenetrans* produced more orthotropic than plagiotropic scions. The physiology of young trees was also affected by the nematode as it reduced stomatal conductance and leaf transpiration but not scion photosynthesis.

Keywords: Citrus nematode, *Citrus aurantium*, effect on plant growth, photosynthesis, starch accumulation, water stress.

Tylenchulus semipenetrans Cobb est un nématode semi-endoparasite sédentaire inféodé aux racines de bigaradier, *Citrus aurantium*, porte-greffe le plus utilisé en pépinière et en verger dans la région méditerranéenne. Les symptômes sur les arbres en production sont très peu étudiés étant donné la généralisation de l'infestation dans les vergers et la présence de plusieurs maladies sur un même arbre. Les symptômes associés au nématode dans un verger sont liés à une perte de vigueur (Thorne, 1961; Vilardebo et Luc, 1962; Webster, 1972), à la présence des chloroses (Dropkin, 1980), à une défoliation des branches surtout au sommet de la frondaison (Reynolds et O'Bannon, 1958) et au dessèchement des pousses appelé "die back" (Ritter, 1961; Thorne, 1961; Kallel *et al.*, 2004). D'après Vilardebo et Luc (1962), les symptômes aériens ont même quelquefois été confondus avec ceux de la "Tristesia", maladie à virus. Ces symptômes sont en rapport avec la réduction de l'absorption

hydrique et minérale au niveau des racines (Ambrogioni et D'Errico, 1984; Duncan et Cohn, 1990). Cette déficience de l'absorption racinaire est liée au faible développement du système racinaire (Duncan et Cohn, 1990) et à son infestation par des femelles de *Tylenchulus* qui modifie profondément sa région corticale. En effet, elle édifie un site trophique complexe qui produit des substances indispensables au développement du nématode (B'Chir, 1988; Kallel *et al.*, 2005), perturbe le métabolisme des arbres infestés (Duncan et Eissenstat, 1993) et provoque un stress hydrique de la partie aérienne (Kallel et B'Chir, 2005). Le stress provoqué par la présence du nématode a une incidence sur la modification de la morphogenèse des jeunes arbres de citronniers (B'Chir et Kallel, 1992). Il aboutit à une variabilité de la production des arbres en vergers (Kallel *et al.*, 2001; Kallel et B'Chir, 2004a; Monselise et Goldschmidt, 1982) et à une diminution de la productivité entre

20 et 30% (Webster, 1972; Philis, 1989) soit autour de 12,4 tonnes/ha (Timmer et Davis, 1982).

Les conditions de l'environnement, l'arbre et les facteurs biotiques agissent sur les populations du nématode en vergers ce qui explique la fluctuation des populations de *T. semipenetrans* selon une évolution bi-modale avec un pic au printemps et un pic en automne dans les régions à climat méditerranéen (Macaron, 1972; B'Chir et Kallel, 1992; Al-Sayed *et al.*, 1993; Abd-Elgawad *et al.*, 1994). Cette variation de l'infestation est fonction de l'âge des racines (Cohn, 1964), de leur abondance (Duncan et Noling, 1987), de leurs réserves en amidon (Duncan et Eissenstat, 1993; Duncan *et al.*, 1993) et des conditions abiotiques principalement la température (Davis, 1984) et l'humidité du sol (Duncan et El Morshedy, 1996).

Le présent travail a pour objectif d'étudier l'étiologie du nématode des *Citrus* sur les arbres d'oranger en bac en phase de croissance et son action sur la physiologie des ces arbres en comparant des arbres infestés à des arbres indemnes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'essai est mené depuis Mai 1999 en bac cimenté de 3 × 1 × 1 m, sur des arbres d'oranger 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers de même vigueur, âgés d'un an et provenant d'une pépinière indemne de nématodes (Groupeement Interprofessionnel de Fruits, Gobba). Deux rangées de six bacs ont été à moitié remplis par un sol constitué d'un mélange de sable de carrière et de fumier de mouton (2 : 1) puis complété par un sol provenant de bacs cultivés en citronnier greffé sur bigaradier. La moitié des bacs est complétée par un sol provenant des bacs cultivés, pendant 10 ans (entre 1989 et 1999), en citronnier greffé sur bigaradier infesté par une population de *T. semipenetrans* (un millier d'œufs et de larves L₂) provenant des racines de bigaradier greffés par un oranger 'Maltaise demi-sanguine' de la région agrumicole du Cap Bon (Tunisie) et l'autre moitié reçoit un même sol témoin indemne de nématode. L'infestation originale des citronniers a été effectuée par une suspension de larves et d'œufs issues des racines d'arbres provenant de vergers d'apparence saine ne présentant pas de symptômes de gommose, de pourridié (*Armillaria*) et de virose pendant toute la période de l'essai. Pendant toute la période de culture, les plants de citronniers greffés sur bigaradier utilisés pour un essai qui a fait l'objet d'une publication par B'Chir et Kallel (1992) et dont le sol a servi à ce travail n'ont pas présentés eux aussi des symptômes de gommose, de pourridié et de virose, etc. A l'intérieur de chaque bac ainsi rempli quatre arbres sont plantés. Ces deux rangées de bacs sont équipées d'un système d'irrigation localisé et reçoivent la même quantité d'eau.

Effet sur la morphogenèse des arbres

L'évaluation des populations printanière et automnale du nématode est effectuée régulièrement pour chaque

arbre. L'échantillonnage consiste à prélever les jeunes racines entre 0-30 cm de profondeur, selon la technique décrite par Duncan (1986). L'extraction des nématodes de racines est réalisée selon la méthode de la double centrifugation (Macaron, 1972). Chaque échantillon de racines est soigneusement lavé à l'eau puis coupé en petits morceaux et pesé, 20 gr de racines sont placées dans le bol d'un mixer contenant 200 ml d'eau et broyées à vitesse réduite pendant 15 secondes. Ce broyage permet d'extraire les femelles. Le contenu du mixer est versé dans deux tamis superposés, le premier est de 2 mm de mailles permettant de retenir les racines qui vont subir un deuxième broyage, le second sous-jacent de 40 µm de mailles. Le broyat retenu par le second tamis est récupéré à l'aide d'un jet brisé dans un verre à pied. Les racines retenues par le tamis de 2 mm de mailles sont récupérées dans le bol du mixer et vont subir un deuxième broyage à une vitesse élevée, pendant une minute, permettant ainsi d'extraire les larves et les œufs à partir des racines. Le contenu du mixer est versé ensuite à travers deux tamis superposés identiques aux précédents, le broyat retenu par le tamis de 2 mm est jeté et le broyat récupéré par le tamis de 40 µm de mailles est ajouté au premier extrait dans le verre à pied. On ajoute une petite quantité de kaolin, la suspension est homogénéisée et répartie dans les godets de la centrifugation. La première centrifugation se fait pendant 7 minutes à 3000 g environ, le surnageant obtenu est éliminé, puis remplacé dans le même godet par une solution de saccharose de densité 1,18. Le culot de la première centrifugation est remis en suspension dans la solution sucrée avec un vibromixer ou un agitateur propre avant de subir la seconde centrifugation pendant une minute à la vitesse de 1800 g. Les nématodes que se trouvent dans le surnageant sont récupérés dans un verre à pied contenant de l'eau afin de diluer la solution sucrée et prévenir l'éclatement des nématodes. La suspension clarifiée passe à travers un tamis de 5 µm de mailles et les nématodes retenus sont récupérés dans un récipient étiqueté. Le dénombrement, des nématodes sous formes d'œufs, de larves et d'adultes, est réalisé sous loupe binoculaire.

La floraison des arbres a été évaluée au printemps en dénombrant les fleurs émises par arbre. L'estimation de la croissance, des rameaux orthotropes ou plagiotropes par arbre (48 arbres au début de l'essai et 24 arbres à la fin de l'essai), est évaluée après chaque flux de croissance végétative (printemps, été et automne). Un rameau orthotrope présente une direction de croissance verticale ou proche de la verticale, un rameau plagiotrope a par contre une direction de croissance proche de l'horizontale. La longueur de l'ensemble des rameaux orthotropes et plagiotropes produits par l'arbre pendant la saison est mesurée. La croissance quantitative totale moyenne en centimètres est calculée par la formule suivante:

$$\text{Croissance totale} = (\text{Longueur} \times \text{nombre des rameaux orthotropes}) + (\text{Longueur} \times \text{nombre des rameaux plagiotropes})$$

et sur le plan qualitatif selon la formule:

Croissance relative (O/P) = (Longueur × nombre des rameaux orthotropes) / (Longueur × nombre des rameaux plagiotropes).

La production en fruits par arbre est évaluée à la récolte entre les mois de décembre et janvier de chaque année. La vigueur de l'arbre est évaluée par la longueur du greffon et par le diamètre du tronc mesuré par un pied à coulisse à différentes périodes de flux de croissances végétatives (avril, juillet, août, octobre et février). À ces mêmes périodes, les diamètres du porte-greffe et du greffon sont évalués respectivement à 10 cm du sol et à 2 cm de la ligne de greffe.

Une année après l'installation de l'essai et pendant deux années successives, douze arbres (un arbre par bac) ont été soigneusement prélevés au printemps et après le flux printanier. La biomasse des différents organes de l'arbre (gramme de matière fraîche) et l'indice de surface foliaire ont été évalués. L'indice de surface foliaire (ISF) est calculé selon la formule:

ISF = nombre de feuille × surface moyenne d'une feuille

La surface foliaire moyenne d'une feuille est calculée selon la formule:

Surface moyenne de la feuille = p/4 × longueur de la feuille × largeur de la feuille

Au printemps 2003, 300 feuilles ont été prélevées sur les pousses printanières des arbres aussi bien indemnes qu'infestés pour évaluer la surface foliaire par un planimètre Laser Area Meter CI-203 (CID, Inc.).

Effet sur le bilan hydrique des feuilles

Au printemps 2003, pendant deux journées (11/06/2003 et 13/06/2003), des mesures indirectes de photosynthèse, de transpiration et de conductance stomatique ont été effectuées par un système ouvert portable (Photosynthesis System CID, Inc. CI-301PS), entre 9 heures et 11 heures du matin, sur les feuilles printanières de 4 arbres sains et infestés par le nématode des *Citrus*. Les observations sont une moyenne de 3 feuilles/arbre. Les feuilles de chaque arbre, introduites dans une chambre de 6,25 cm², reçoivent un flux d'air de 1 litre par minute et sont orientées vers les radiations solaires. Les mesures sont effectuées puis exprimées par la radiation active pour la photosynthèse (PAR) en $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{s}$, le volume de CO₂ en ppm, la température de l'air en °C, la température de la feuille en °C, l'humidité de l'air en % et le volume de CO₂ à l'entrée et à la sortie en ppm. La photosynthèse nette (Pn), la transpiration (E) en millimole/m²/s et la conductance stomatique (C) en millimole/m²/s ont été calculées selon les formules indiquées par le fabriquant.

Effet sur la capacité photosynthétique des feuilles

Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne ont été également faites *in situ*, sur des feuilles printanières matures et saines, à l'aide d'un système rotatif : Fluorescence Induction Monitor (Fi_m 1500, Analytical Development Company Limited, ADC). L'analyse des mesures a porté sur la fluorescence initiale (F0), correspond à la valeur minimale de la fluorescence, lorsque tous les accepteurs d'électrons sont oxydés, la fluorescence maximale (Fm) correspond à la valeur maximale de la fluorescence obtenue pour la même mesure d'intensité lumineuse et reflète la réduction des accepteurs primaires d'électrons, du photosynthèse II (PS II) et n'est accessible que dans le cas où l'intensité lumineuse est entièrement saturante, la fluorescence variable (Fv) obtenue par la différence F0 et Fm (Fv = Fm - F0) et sur le rapport Fv/Fm correspond au rendement quantique maximal de la photochimie du PS II.

La période d'adaptation à l'obscurité, le temps d'exposition et le niveau de la lumière saturante ont été déterminés avant d'effectuer les mesures. Une série de mesures du rapport Fv/Fm a été réalisée après des durées d'obscurité variables de 5 minutes d'intervalles. Cette période d'adaptation à l'obscurité a été évaluée à 30 mn. Le niveau de la lumière saturante évalué à 90% pendant 5 secondes a été déterminé en suivant le même protocole mais en faisant varier l'intensité lumineuse et le temps d'exposition.

Effet sur les réserves en amidon des pousses printanières

Le bilan énergétique des arbres infestés et indemnes a été évalué sur des coupes histologiques effectuées sur les pousses printanières après coloration spécifique de l'amidon au liquide de Lugol (I₂KI). Les pousses printanières ayant subi une phase de croissance entre la fin février et début avril, ont été prélevées à partir du début de mois de juin jusqu'au mois de décembre. L'échantillonnage consiste en un prélèvement mensuel de 2 à 3 pousses printanières par arbre au hasard. Les échantillons prélevés des 12 arbres de chaque traitement sont conservés à 4 °C. Les pousses sont débarrassées de leurs feuilles et sont coupées longitudinalement à la main au moyen d'une lame de rasoir à la base de la pousse entre le 2^{ème} et le 3^{ème} nœud. Les coupes longitudinales sont colorées au liquide de Lugol pendant 6 heures puis transférées dans de l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de colorants, placées entre lames et lamelles puis observées au microscope OLYMPUS CX40.

Analyse statistique

L'analyse des données a été effectuée par le logiciel STATISTICA®. Les comparaisons des moyennes relatives aux arbres sains et infestés par le nématode des *Citrus* ont été analysées par le biais du test de Student à la probabilité seuil de P = 0,05.

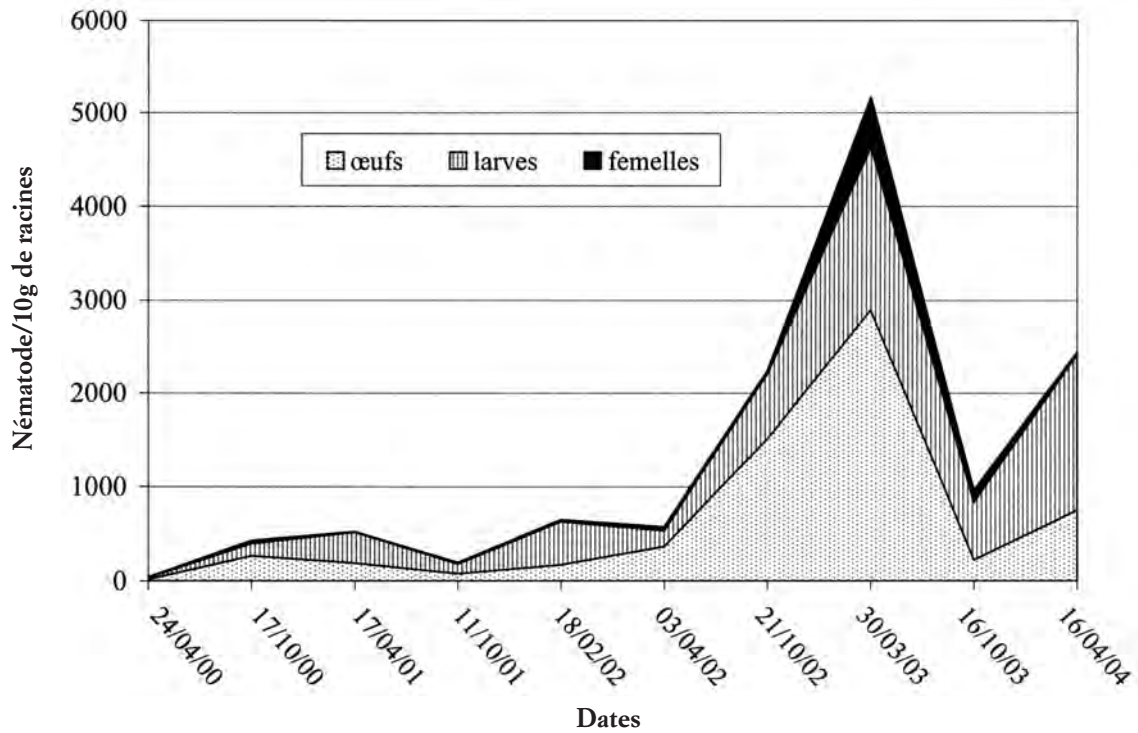


Fig. 1. Evolution de la densité du nématode *Tylenchulus semipenetrans* sur les racines des plants d'oranger 'Maltaise douce' en bacs.

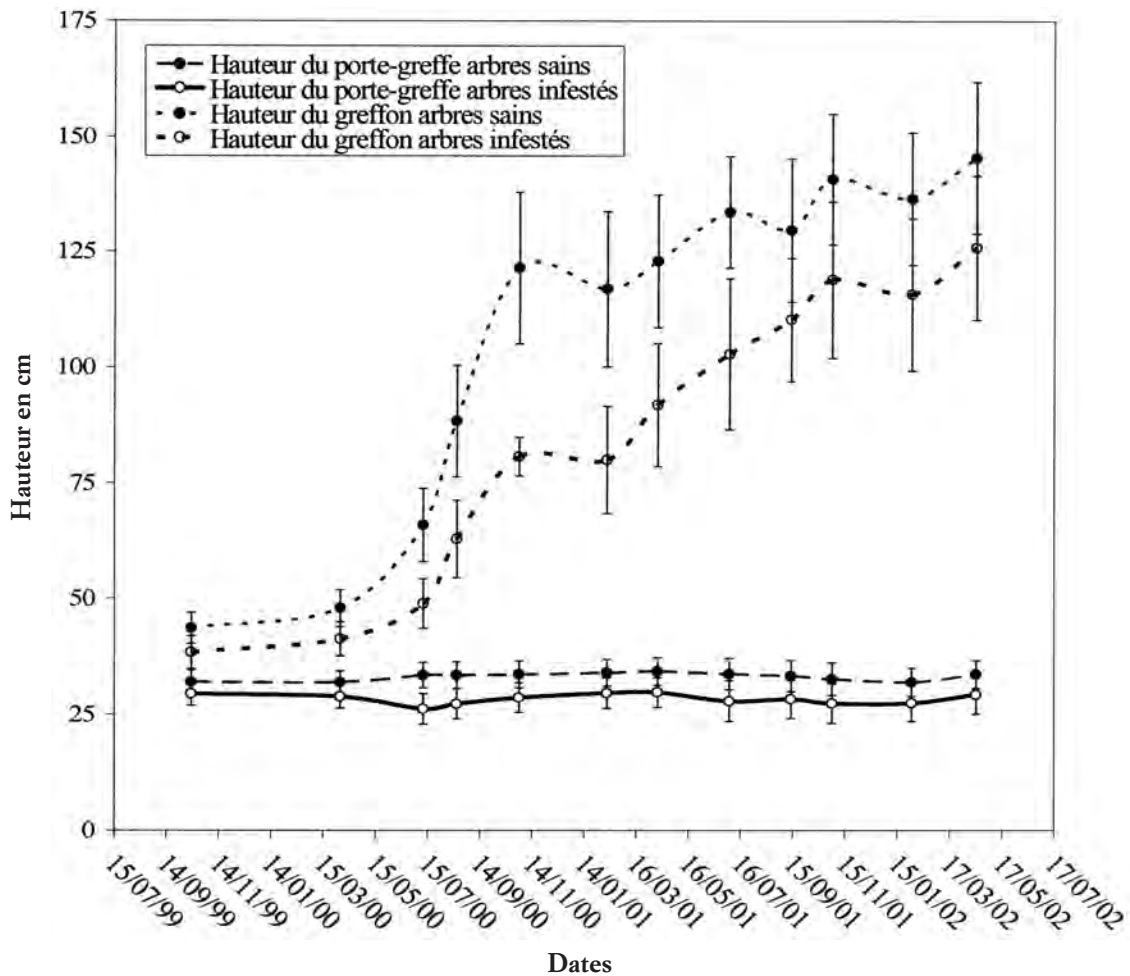


Fig. 2. Evolution de la hauteur du porte-greffe et du greffon des arbres de Maltaise douce en bacs infestés ou no par *T. semipenetrans*. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à $P = 0,05$.

RÉSULTATS

Effet du nématode sur la morphogenèse des arbres

La population du nématode est relativement faible pendant les trois premières années de l'essai puis la densité de *T. semipenetrans* s'est multipliée par 16 à la dernière année de mesure (Fig. 1). Cette élévation importante de la population du nématode correspond à la fin de la phase végétative et le début de la période d'entrée en production.

Après une année de la plantation, les arbres ressentent l'effet du nématode des *Citrus*. Les arbres infestés présentent une croissance verticale du greffon plus faible que celles des arbres cultivés sur sol indemne de ce nématode. Cette différence d'allongement entre les arbres infestés et indemnes s'estompe après deux années de culture en bac (Fig. 2).

Six mois après la plantation, le diamètre du tronc des arbres infestés est plus faible que celui des arbres installés sur sol indemne. Cet écart s'estompe après deux ans de la plantation en bac de la même manière que la hauteur des arbres (Fig. 3).

Le nématode agit sur le porte-greffe bigaradier par

l'altération du système racinaire et l'accumulation des réserves énergétiques dans le tronc au cours des deux premières années. A la deuxième année, la biomasse des troncs des arbres infestés est significativement plus faible que celle des arbres témoins (Fig. 4). En effet, le poids sec des troncs indemnes est de 174 grammes alors que celui des plants infestés n'est que de 93 grammes en moyenne. L'infestation des racines par le nématode n'a pas d'effet sur le système racinaire secondaire constitué par les racines nourricières pendant les années qui ont suivi la plantation (Fig. 4). Le poids du système racinaire primaire, par contre, est significativement plus faible pour les arbres infestés que pour les arbres sains dès la première année d'installation (Fig. 4). En plus, le système racinaire des plants indemnes est beaucoup plus superficiel que les plants infestés (Fig. 5).

Pendant les deux années qui ont suivi la plantation aucun effet du nématode sur la biomasse du greffon n'est observé (les données ne sont pas reportées dans l'article).

Le potentiel photosynthétique mesuré par la surface foliaire totale est significativement plus faible à la première année de culture chez les arbres infestés par rap-

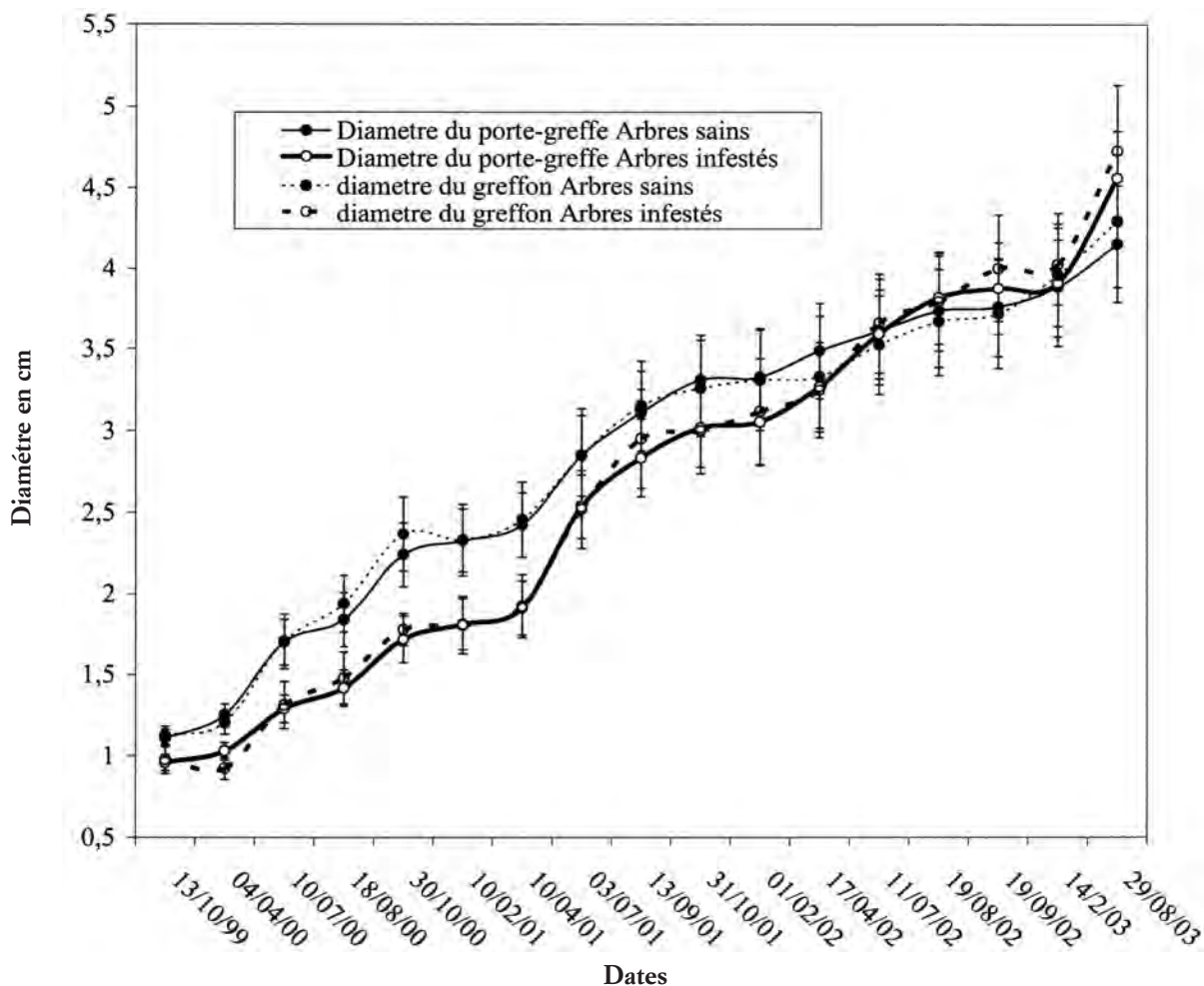


Fig. 3. Evolution du diamètre du porte-greffe et du greffon des arbres de Maltaise douce en bacs infestés ou non par *T. semipenetrans*. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à $P = 0,05$.

port aux arbres témoin indemnes. En effet le nombre de feuilles printanières produites par les arbres sains est en moyenne de 227 alors que ce chiffre est réduit de moitié (118) pour les arbres infestés par le nématode des *Citrus*. Ce rapport s'est poursuivi à la deuxième année de culture mais n'est plus significatif à cause de la grande variabilité entre les arbres (Fig. 6).

La croissance printanière constituée par des rameaux orthotropes et plagiotropes augmente entre la première

et la quatrième année de culture (Fig. 7). Par contre la croissance estivale et automnale dominée par des rameaux orthotropes (gourmands) reste stationnaire (Fig. 8). Pendant les trois premières années, l'évolution de la croissance des arbres indemnes et infestés par le nématode est identique. A la quatrième année, la croissance orthotrope printanière est significativement plus importante chez les arbres infestés que chez les arbres indemnes avec un nombre de rameaux plagiotropes significative-

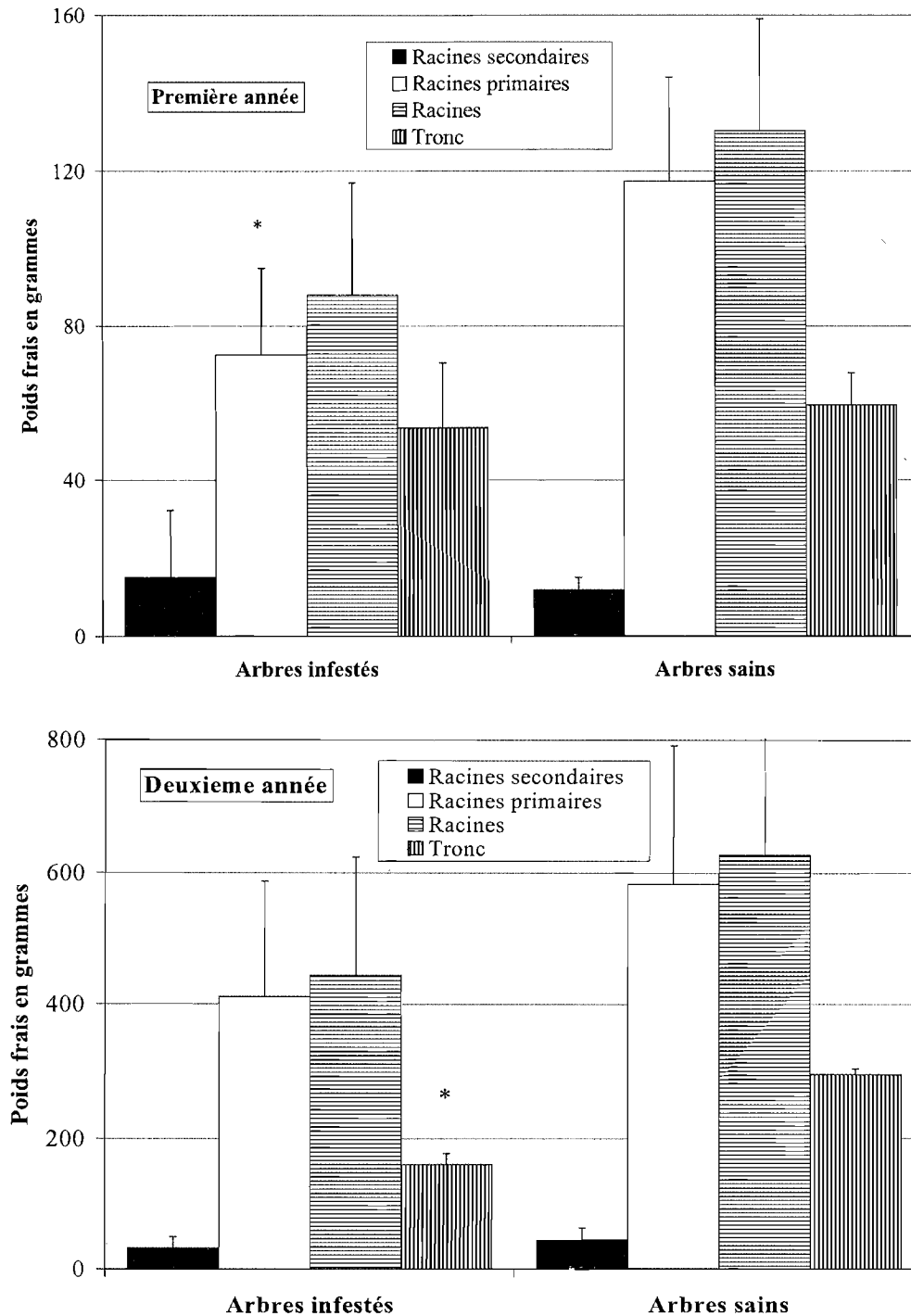


Fig. 4. Effet de *T. semipenetrans* sur la biomasse du porte-greffe bigaradier greffé pendant les deux premières années de culture en bacs. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à $P = 0,05$. Les moyennes précédant (*) sont significativement différentes selon le test t de Student à la probabilité $P = 0,05$ lorsqu'on compare les arbres sains avec les arbres infestés.

ment plus important pour les arbres sains (Fig. 7).

Cette modification de la morphogénèse des arbres infestés est mesurée par le rapport de la croissance orthotrope à bois et plagiotrope fructifère (Fig. 9). Cette altération de la morphogénèse débute à la quatrième année à partir de la plantation, coïncidant avec la période où les jeunes arbres entrent en phase de production (Fig. 9).

La surface foliaire est similaire pendant les deux premières années de plantation. La modification de la morphogénèse des arbres infestés a permis la production de

rameaux orthotropes surnuméraires présentant des feuilles dont la surface est significativement plus grande que les feuilles issues des arbres témoins (Fig. 10).

Les feuilles provenant des arbres infestés sont de longueur significativement plus importante que les arbres indemnes (Tableau I).

Il est évident que les arbres infestés consacrant toutes leurs énergies pour la croissance végétative produisent beaucoup moins de sites florigènes et de fleurs. En effet, les arbres sains produisent en moyenne 4 fois plus de

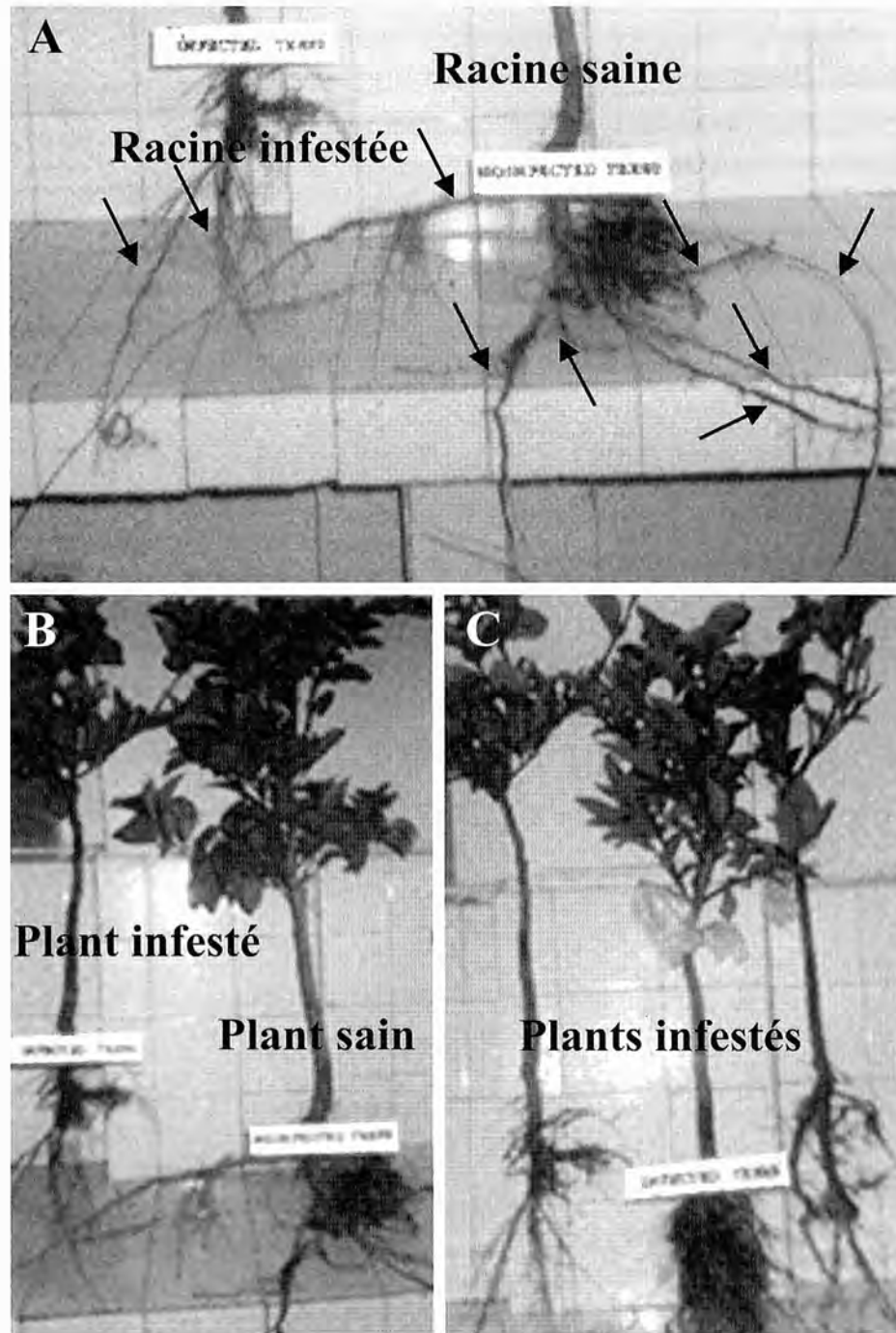


Fig. 5. Qualité de l'enracinement des plants de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers indemnes et infestés par le nématode des *Citrus*. Les flèches marquent l'emplacement des racines primaires (A). Aspect des plants infestés et sains (B). La variabilité d'enracinement entre les différents plants infestés (C).

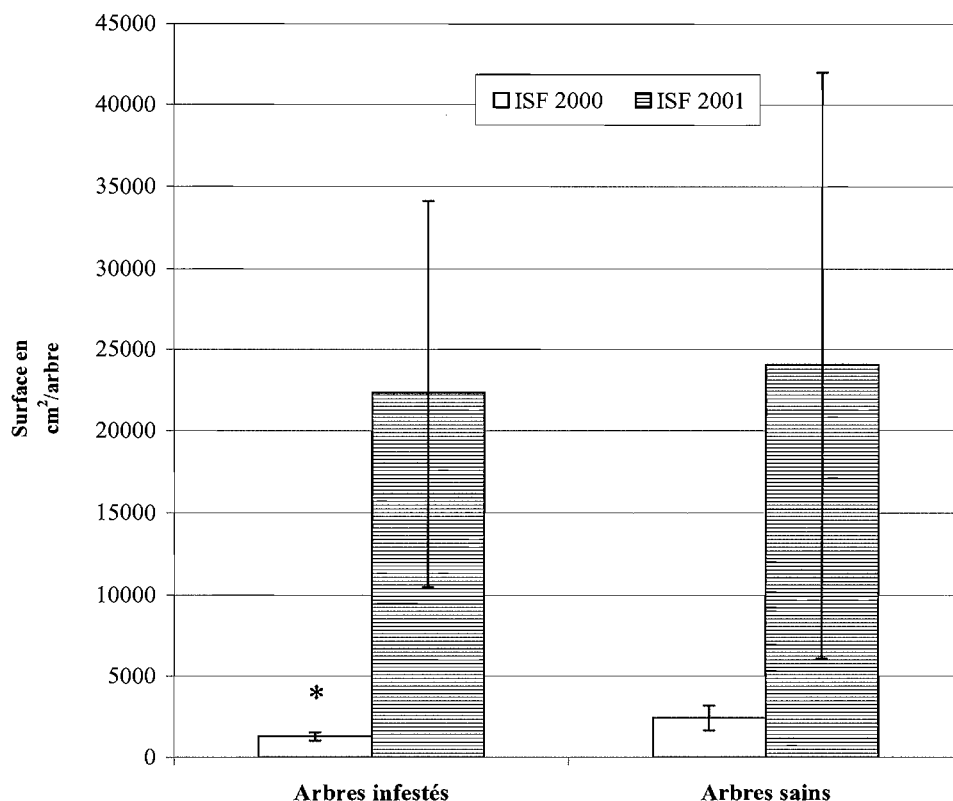


Fig. 6. Effet du nématode des *Citrus* à l'installation de la culture en bacs sur la surface foliaire (ISF) totale des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à $P = 0,05$. Les moyennes précédant (*) sont significativement différentes selon le test t de Student à la probabilité $P = 0,05$ lorsqu'on compare les arbres sains avec les arbres infestés.

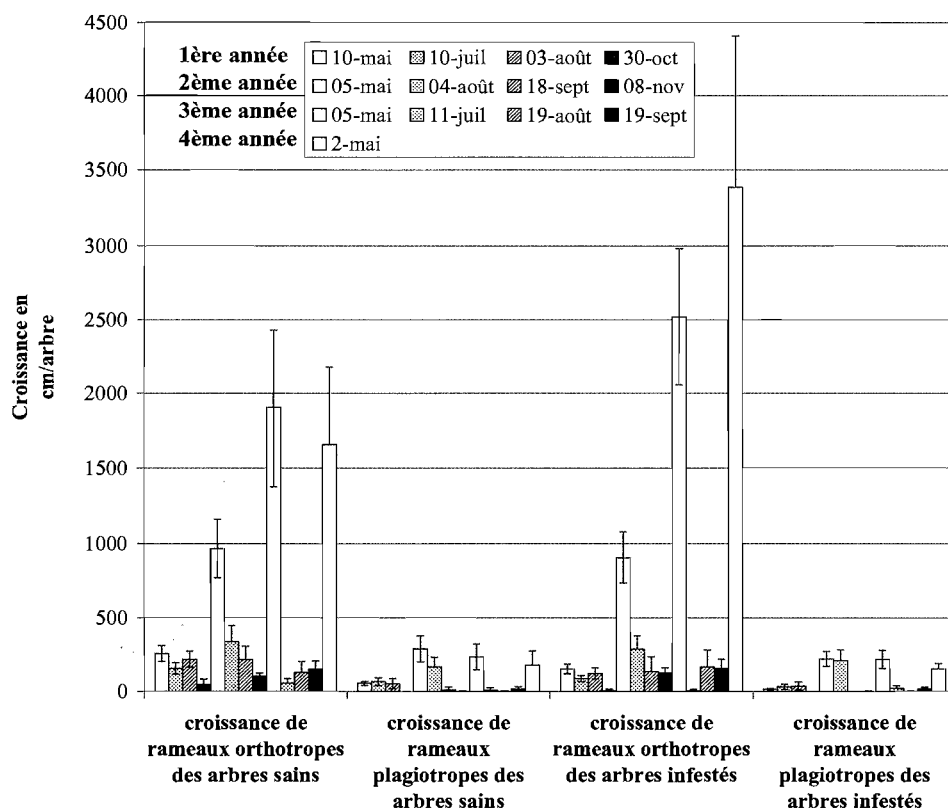


Fig. 7. Evolution de la croissance orthotrope et plagiotrope des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers infestés par le nématode des *Citrus* et des arbres indemnes en bacs. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à $P = 0,05$.

Tableau I. Caractéristiques des feuilles printanières des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers en bacs infestés ou no par *Tylenchulus semipenetrans*.

Traitement	Longueur en cm	Largeur en cm	Rapport
Arbres infestés	7,5 a	2,7 a	3 a
Arbres sains	6,4 b	2,6 a	2,6 b

Les moyennes précédant les lettres a, b sont significativement différentes selon le test t de Student à la probabilité P = 0,05.

fleurs que les arbres infestés par *T. semipenetrans* en 2003 marquant l'année d'entrée en production des arbres (Fig. 11). En 2004, cet écart entre les arbres infestés et témoins s'estompe en rapport avec l'alternance de la production des arbres et la concurrence entre les activités végétative et florifère.

Néanmoins, cette floraison est suivie par une chute importante de jeunes fruits pendant l'été, il en résulte une production en fruits faibles d'où une productivité en fruits des arbres sains et infestés identique (les données ne sont pas reportées dans l'article). Le poids moyen des fruits est de 135 grammes (amplitude 65 - 232). A ce stade de développement des arbres, le calibre moyen des fruits pour les deux types d'arbres est de 6,3 cm. A la deuxième année, les arbres infestés produisent seulement 6,9% de fruits de calibre moyen (3 à 6 cm) les plus rémunérateurs, alors que les arbres indemnes en produisent 49,1% (Fig. 12).

Effet du nématode sur la capacité photosynthétique des feuilles

Pendant la période d'activité intense des agrumes, l'activité photosynthétique des feuilles, mesurées par deux techniques différentes, est identique pour les arbres infestés et indemnes (les données ne sont pas re-

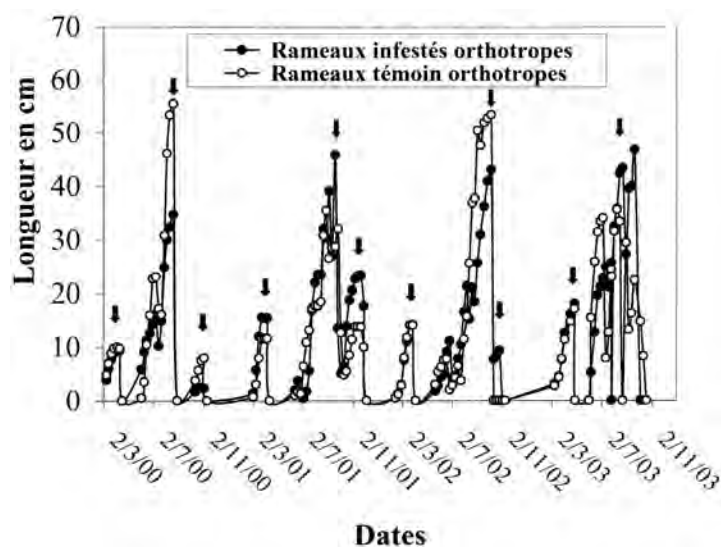


Fig. 8. Evolution de la longueur des rameaux orthotropes des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers infestés par *T. semipenetrans* et des arbres témoins. Les flèches montrent les pics de croissances végétatives.

portées dans l'article). En effet, la fluorescence initiale (F_0), la fluorescence maximale (F_m), la fluorescence variable (F_v) obtenue par la différence F_0 et F_m ($F_v = F_m - F_0$) et le rapport F_v/F_m qui correspond au rendement quantique maximal de la photochimie du photosystème II restent similaire entre les deux types d'arbres.

Effet du nématodes sur le bilan hydrique des feuilles

Par contre, la conductance stomatique des feuilles calculées pendant deux journées est statistiquement plus élevée sur les arbres infestés que sur les arbres témoins. Cette résistance stomatique résultant de la fermeture des stomates a pour conséquence, du moins sur les feuilles exposées aux radiations lumineuses, de diminuer les échanges gazeux avec l'atmosphère et la transpiration des arbres infestés (Tableau II).

Tableau II. Evolution *in situ* de la radiation photosynthétique active (PAR), de la photosynthèse, de la transpiration foliaire et de la conductance stomatique des feuilles indemnes et des feuilles des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers infestés par *T. semipenetrans*.

Traitement	PAR ($\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{s}$)	Photosynthèse (Millimole/ m^2/s)	Transpiration (Millimole/ m^2/s)	Conductance (Millimole/ m^2/s)
11 Juin 2003				
Arbres infestés	1063,125 a	19,538 a	9,903 a	194,867 a
Arbres sains	1266,867 a	22,316 a	12,931 b	330,967 b
13 Juin 2003				
Arbres infestés	1093,042 a	25,508 a	8,926 a	205,442 a
Arbres sains	957,758 a	28,954 a	9,767 b	300,583 b

Les moyennes par journée précédant les lettres a, b sont significativement différentes selon le test t de Student à la probabilité P = 0,05.

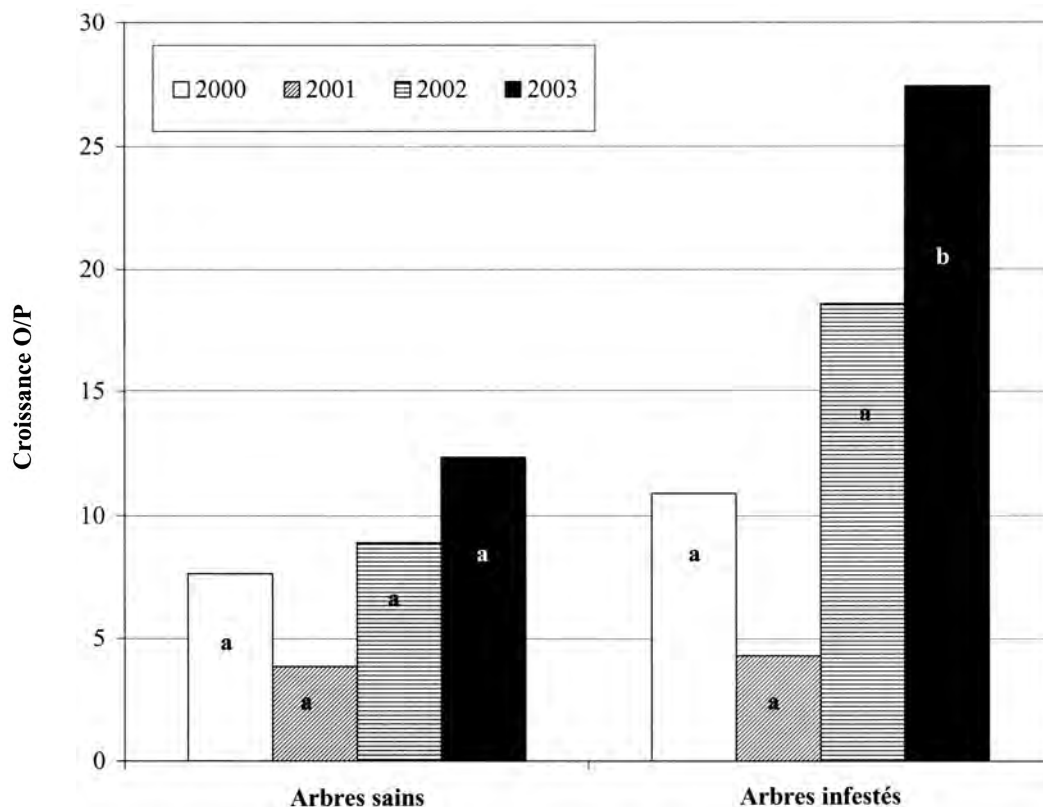


Fig. 9. Evolution de la croissance orthotrope sur plagiotrope des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers infestés par le nématode des *Citrus* et des arbres indemnes en bacs. Les moyennes précédant les lettres a, b sont significativement différentes selon le test t de Student à la probabilité $P = 0,05$ lorsqu'on compare les arbres sains avec les arbres infestés.

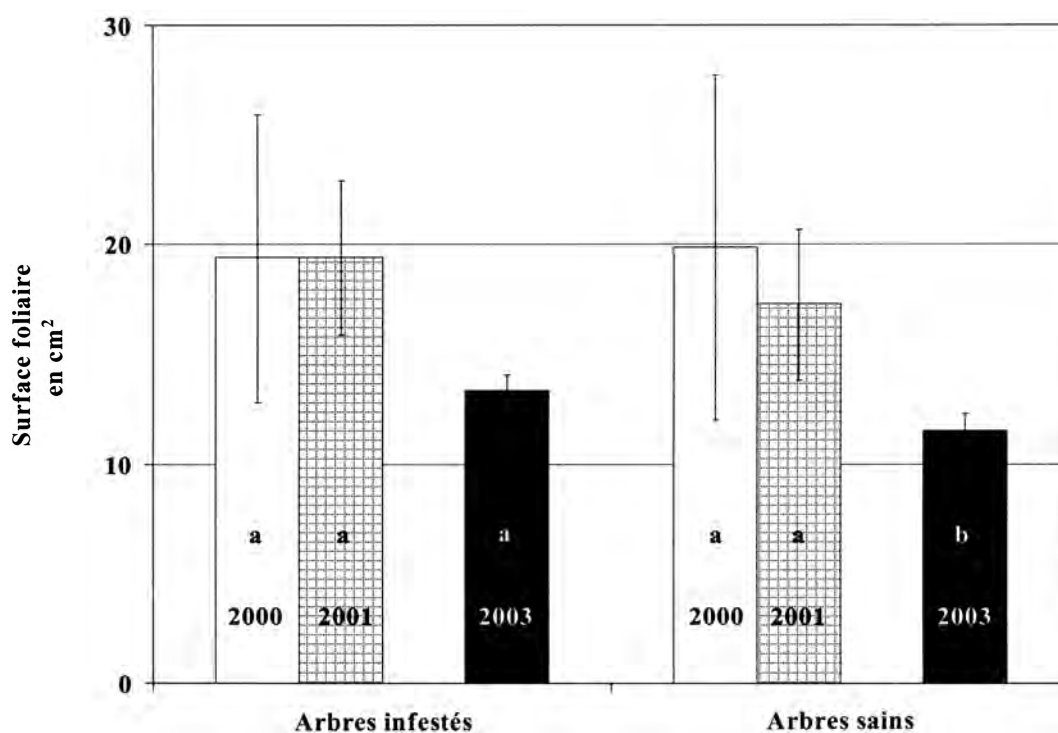


Fig. 10. Effet du nématode sur la surface foliaire des pousses printanières des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers infestés par le nématode des *Citrus* et des arbres indemnes en bacs. Les moyennes précédant les lettres a, b sont significativement différentes selon le test t de Student à la probabilité $P = 0,05$ et les barres correspondent aux intervalles de confiance à $P = 0,05$ lorsqu'on compare les arbres sains avec les arbres infestés.

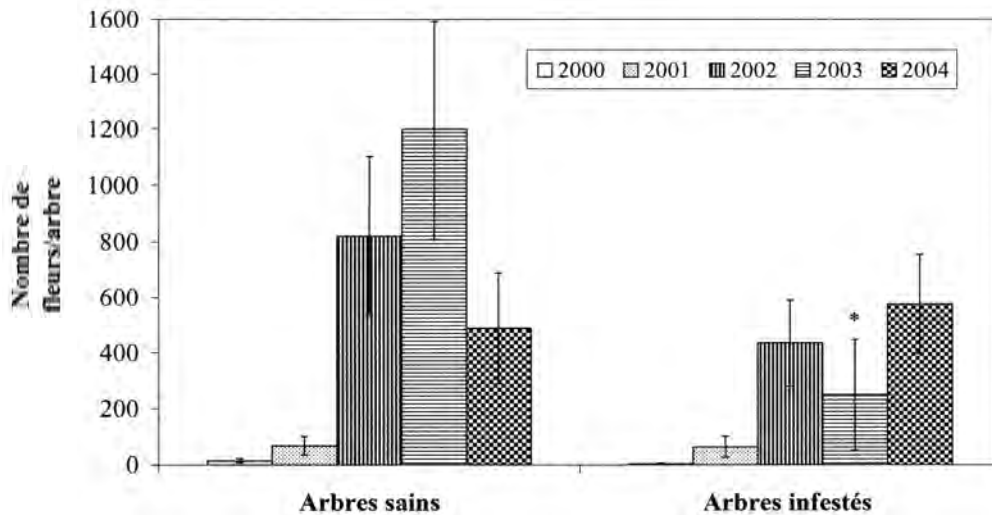


Fig. 11. Effet de l'infestation par *T. semipenetrans* sur la floraison des plants de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers. Les barres correspondent aux intervalles de confiances à $P = 0,05$. Les moyennes précédant (*) sont significativement différentes selon le test *t* de Student à la probabilité $P = 0,05$ lorsqu'on compare les arbres sains avec les arbres infestés.

Relation entre l'infestation des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers et les réserves en amidon des pousses printanières

L'évolution des réserves énergétiques sous forme d'amidon, dans les différents tissus de la pousse printanière a été déterminée entre le mois de mai et de décembre. Plus de 24 coupes histologiques de tiges par mois provenant d'arbres de 'Maltaise douce' infestés par le nématode des *Citrus* et d'arbres sains ont été examinées. Les réserves sous forme de grains d'amidon ont été observées dans la moelle des pousses et dans les trachéides du xylème qui jouent un rôle important dans la translocation des substances des racines vers la partie aérienne et vers la moelle de la tige, réservoir d'amidon.

A la fin du mois de mai, les rameaux printaniers à bois (Fig. 8) sont entièrement formés et les feuilles synthétisent des sucres réducteurs qui sont transloqués via le phloème vers les racines et les autres organes de l'arbre (Fig. 13 A, B).

Pendant la mi-juillet, la coloration foncée des vaisseaux conducteurs marque l'activité intense de transfert des carbohydrates des tiges vers les autres parties de la plante. Le transfert de l'amidon via le xylème des racines vers le système aérien paraît plus intense qu'à la fin du printemps (mai). A cette période, la tige n'emmagasine pas de réserves d'amidon et la moelle reste claire (Fig. 13 C, D).

A la mi-septembre, lorsque les pousses estivales constituées de gourmands ont fini de croître (Fig. 8), les tiges vont accumuler de plus en plus de granules d'amidon pour préparer l'arbre à la période hivernale, ce qui pourrait expliquer les nombreux granules d'amidon à l'intérieur de la moelle de la pousse printanière (Fig. 13 E, F). Ces granules d'amidon sont plus abondants dans les pousses des arbres témoins que dans celles des arbres infestés par *T. semipenetrans* (Fig. 13 E, F).

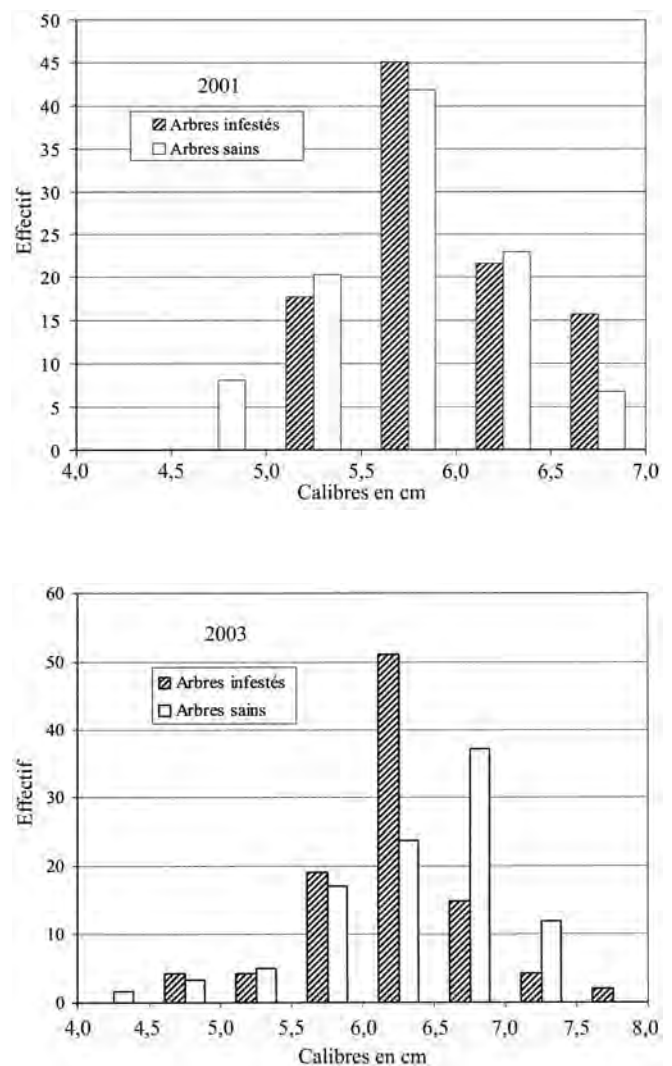


Fig. 12. Effet de l'infestation par *T. semipenetrans* sur la variation du calibre des arbres de 'maltaise douce' greffés sur bigaradiers en bacs pendant deux années.

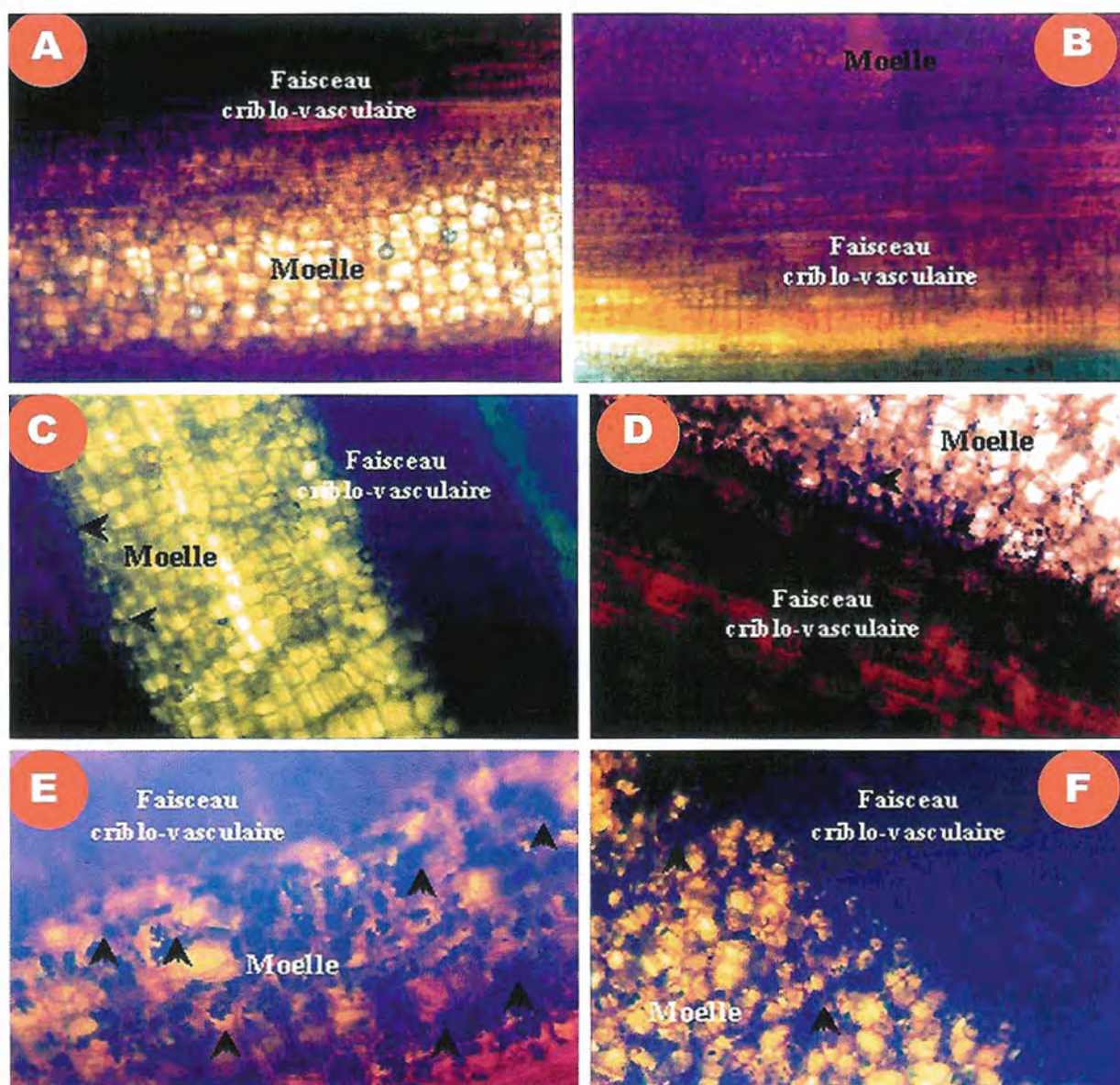


Fig. 13. Comparaison des réserves énergétiques en amidon des pousses printanières des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers infestés par le nématode des *Citrus* sur des coupes longitudinales des pousses témoins (A) et infestées (B) pendant la fin de la croissance printanière (mai) ($\times 100$), sur des coupes longitudinales des pousses témoins (C) et infestées (D) pendant la phase de croissance estivale (mi-juillet) ($\times 200$) et sur des coupes longitudinales des pousses témoins (E) et infestées (F) à la fin de croissance estivale (mi-septembre) ($\times 200$). Les flèches noires montrent les granules d'amidon colorées par le liquide de Lugol (I_2KI).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Tylenchulus semipenetrans est particulièrement adapté au parasitisme sur les *Citrus*. Il entretient la densité de ses populations sur les racines de l'hôte grâce à l'édification de sites trophiques complexes au niveau des racines (B'Chir, 1988; Kallel *et al.*, 2005) et à la modification de la morphogenèse des arbres de citronniers infestés (B'Chir et Kallel, 1992). Les attaques du nématode n'affectent pas la chlorophylle mais modifient la conductance stomatique et la transpiration (Wilcox-Lee et Loria, 1986, 1987).

Sur les arbres en phase de croissance, le nématode des *Citrus* a pour effet de retarder le départ de végétation à la plantation avec un mauvais enracinement des

arbres infestés lié à l'altération du système racinaire principal. Ceci se répercute par une diminution de la vigueur et de l'accumulation de réserves dans le tronc et sur la partie aérienne de l'arbre. Cette déficience dans l'accumulation des réserves est liée à la diminution de l'appareil photosynthétique mesurée par la surface foliaire totale en plus des pertes énergétiques liées à l'installation du nématode dans le système racinaire. Dans nos conditions, le nématode des *Citrus* diminue de 33% la hauteur des arbres, de 22,5% le diamètre du tronc, de 38% la biomasse des racines primaires et de 46% du poids frais des troncs des arbres de 'Maltaise douce' greffée sur bigaradier. Ces résultats sont en concordance avec les dégâts de *T. semipenetrans* étudiés par différents auteurs sur jeunes plantations en conditions

contrôlées en comparant des plants infestés artificiellement par ce nématode à des plants indemnes ou après fumigation du sol (Baines, 1950; Baines et Clarke, 1952; Baines et Martin, 1953; Baines *et al.*, 1956; Baines *et al.*, 1959; Baines *et al.*, 1962). Les symptômes associés au nématode sont liés à une perte de vigueur (Thorne, 1961; Vilardebo et Luc, 1962; Webster, 1972) avec une diminution du volume racinaire atteignant plus de 40% (plus de 50% pour le poids frais des organes, 35% pour le diamètre du tronc et 43% pour la hauteur des arbres) (Baines et Clarke, 1952). Les plants de *Citrus* gravement infestés par ce nématode présentent une croissance de 40 à 50% plus faible que celle des plants témoins non infestés (Baines *et al.*, 1959).

Les travaux en pots, ne dépassant pas une à deux années d'étude et montrant l'incidence du nématode des *Citrus*, sur la phase végétative des *Citrus*, n'ont pas permis de montrer l'effet du nématode sur le passage des *Citrus* à la phase productive. Au cours de la phase d'entrée en production, l'infestation du nématode a pour effet la modification de la morphogénèse des arbres favorisant la formation des rameaux à bois aux dépens des rameaux fructifères, ce qui explique la diminution de la floraison. Ces résultats confirment ceux obtenus par B'Chir et Kallel (1992) sur le citronnier. Il est connu que les arbres sous stress répondent par une production excessive de fleurs pour la survie de l'espèce, les arbres infestés par le nématode des *Citrus* réagissent d'une manière inverse. Une baisse de la production des cytokinines liée à la diminution de la croissance racinaire pourrait expliquer ce résultat.

La relation entre le parasite et l'hôte dépend principalement des substances énergétiques élaborées par l'arbre sous forme d'amidon (Duncan et Eissenstat, 1993; Duncan *et al.*, 1993). La richesse des cellules trophiques en granules d'amidon (Kallel *et al.*, 2005) et la présence des enzymes obtenues des homogénats de nématodes par Cohn (1965) dans la digestion de l'amidon renforcent l'hypothèse du rôle nourricier des sucres et le rôle du nématode dans l'altération du bilan énergétique des arbres d'agrumes (Duncan et Eissenstat, 1993; Duncan *et al.*, 1993).

L'arbre a besoin de ces substances pour entretenir sa croissance et sa production en fruit. Les populations du nématode agissent comme compétiteur en utilisant ces mêmes réserves pour assurer leur développement et accumuler des réserves sous forme de vitellus dans les œufs pour assurer la longévité et le développement de leur descendance (Cooper et Van Gundy, 1971).

Pendant une année végétative, plusieurs flux énergétiques coexistent dans l'arbre. Un flux énergétique de haut en bas entre le printemps et l'été sous forme de sucres réducteurs permet d'entretenir la croissance racinaire et l'accumulation des carbohydrates dans les fruits, et un autre flux de sens inverse d'abord au printemps puis entre l'automne et l'hiver.

La diminution du flux descendant pendant l'été a une action sur la densité de population des femelles sur les

racines (Kallel et Abdelwahed-Ghariani, 2004) et la longévité des larves lié aux réserves des œufs pondus par les femelles (Kallel et B'Chir, 2004b). La compétition entre le nématode et le système racinaire pour l'énergie expliquerait le faible développement du système racinaire des arbres infestés. Le flux énergétique ascendant survient pendant le printemps et le début de l'été lié à la demande croissante en carbohydrate pour le développement des fruits et à partir de l'automne pour l'accumulation des réserves sous forme d'amidon dans la moelle permettant à l'arbre d'entamer une nouvelle saison culturale et entretenir sa croissance végétative et la production de fleurs. Les dépérissement des *Citrus* et des symptômes de dieback ont été observés dans plusieurs régions du monde tel que les Etats-Unis d'Amérique (O'Bannon et Reynolds, 1967), l'Afrique (Aggrey *et al.*, 1988), l'Inde (Sundaram et Vadivelu, 1995) et dans la région méditerranéenne (Philis, 1993 ; Kallel *et al.*, 2004). Ce dépérissement des agrumes a été observé en verger sur des arbres infestés par *Tylenchulus semipenetrans*. La diminution des réserves dans les tiges pourrait expliquer les symptômes de défoliation et de dessèchement des pousses appelées "dieback" chaque fois que les racines supportent une densité de population du nématode élevée.

LITTÉRATURE CITÉE

- Abd-Elgawad M.N., Youssef M.M. et Shamseldeen M.M., 1994. Observations on the population fluctuations of the *Citrus* nematode on Calamander orange in Egypt. *Pakistan Journal of Nematology*, 12: 87-94.
- Aggrey G.S., Kenne A. et Balcha A., 1988. Nematode fauna in two declining *Citrus* orchards in Ethiopia. *FAO Plant Protection Bulletin*, 36: 35-41.
- Al-Sayed A.A., Abdel-Hameed S.H. et El-Nagar H.I., 1993. Population dynamics of *Tylenchulus semipenetrans* in relation to *Citrus* and soil temperature. *Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo*, 44: 183-190.
- Ambrogioni L. et D'Errico F.P., 1984. I nematodi parassiti degli agrumi e loro controllo. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, 105: 64 p.
- Baines R.C., 1950. Nematode on *Citrus*. Soil fumigation and resistant *Citrus* varieties promising as control. *California Agriculture*, 4: 7.
- Baines R.C. et Clarke O.T., 1952. *Citrus*-root nematode. Effects on young lemon and orange trees studied in inoculation tests under controlled conditions. *California Agriculture*, 6: 9-13.
- Baines R.C. et Martin J.P., 1953. Effect of soil fumigation on growth and yield of valencia orange trees. *Phytopathology*, 43: 465 (Abstract).
- Baines R.C., Foute F.J. et Martin J.P., 1956. Fumigate soil before replanting to control *Citrus* nematode. *California Citrograph*, 41: 448-451.
- Baines R.C., Van Gundy S.D. et Sher S.A., 1959. *Citrus* and avocado nematodes. *California Agriculture*, 13: 17-18.
- Baines R.C., Martin J.P., De Wolfe T.A., Boswell S.B. et Garber M.J., 1962. Effect of high doses of D-D on soil organ-

- isms and the growth and yield of lemon trees. *Phytopathology*, 52: 723 (Abstract).
- B'Chir M.M., 1988. Organisation ultra-structurale du site trophique induit par *Tylenchulus semipenetrans* dans les racines de *Citrus*. *Revue de Nématologie*, 11: 213-222.
- B'Chir M.M. et Kallel S., 1992. Effects of *Tylenchulus semipenetrans* on the morphogenesis of juvenile *Citrus* trees. Proceeding of the 7th Congress of the International Society of Citriculture, Catania, Italy, pp. 62-76.
- Cohn E., 1964. Penetration of the *Citrus* nematode in relation to root development. *Nematologica*, 10: 594-600.
- Cohn E., 1965. On the feeding and histopathology of the *Citrus* nematode. *Nematologica*, 11: 47-54.
- Cooper A.F. Jr et Van Gundy S.D., 1971. Senescence, Quiescence, and Cryptobiosis. Pp. 297-318 In: Plant parasitic nematodes volume II (Zuckerman B.M., Mai W.F. et Rohde R.A, eds). Academic Press, New York, U.S.A.
- Davis R.M., 1984. Distribution of *Tylenchulus semipenetrans* in a Texas Grapefruit orchard. *Journal of Nematology*, 16: 313-317.
- Dropkin V.H., 1980. *Introduction to plant nematology*. Wiley Interscience Publication, New York, U.S.A., 293 pp.
- Duncan L.W., 1986. The spatial distribution of *Citrus* feeder roots and of *Citrus* nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. *Revue de Nématologie*, 9: 233-240.
- Duncan L.W. et Cohn E., 1990. Nematode parasites of *Citrus*. Pp. 321-346 In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (Luc M., Sikora A. et Bridge J., eds). CAB International, Wallingford, UK.
- Duncan L.W. et Eissenstat D.M., 1993. Responses of *Tylenchulus semipenetrans* to *Citrus* fruit removal: implications for carbohydrate competition. *Journal of Nematology*, 25: 7-14.
- Duncan L.W. et El-Morshedy M.M., 1996. Population changes of *Tylenchulus semipenetrans* under localized versus uniform drought in the *Citrus* root zone. *Journal of Nematology*, 28: 360-368.
- Duncan L.W. et Noling J.W., 1987. The relationship between development of the *Citrus* root system and infestation by *Tylenchulus semipenetrans*. *Revue de Nématologie*, 10: 61-66.
- Duncan L.W., Graham J.H. et Timmer L.W., 1993. Seasonal patterns associated with *Tylenchulus semipenetrans* and *Phytophthora parasitica* in the *Citrus* rhizosphere. *Phytopathology*, 83: 573-581.
- Kallel S. et Abdelwahed-Ghariani A., 2004. Relation entre la défoliation des agrumes en vergers du Cap Bon et les dégâts associés au nématode des *Citrus*, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *Revue de l'INAT*, 19: 43-57.
- Kallel S. et B'Chir M.M., 2004a. Variabilité de l'effet de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb (Tylenchida: Tylenchulidae) sur la productivité des *Citrus* en verger: analyse factorielle. *Revue de l'INAT*, 19: 83-96.
- Kallel S. et B'Chir M.M., 2004b. Variation saisonnière et effet de la température sur l'inoculum potentiel du sol de *Tylenchulus semipenetrans*. *Nematologia Mediterranea* 32: 31-41.
- Kallel S. et B'Chir M.M., 2005. Détection par radiométrie d'un stress pathologique provoqué par *Tylenchulus semipenetrans* Cobb sur Citronnier greffé sur bigaradier. *Cahiers Agricultures* 14: 241-248.
- Kallel S., Jaziri A. et B'Chir M.M., 2001. Relation entre l'infestation de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, la morphogenèse et la productivité de *Citrus sinensis* (maltaises) greffées sur *C. aurantium* Osbeck (bigaradier). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31: 105-110.
- Kallel S., Abdelwahed A., Ammar M. and B'Chir M. M., 2004. Relationship between *Citrus* decline in orchard, population density of *Tylenchulus semipenetrans* and some soil abiotic factors. *International Journal of Nematology* 14: 124-133.
- Kallel S., Louhichi A., B'Chir M.M. et Van Oostveldt P., 2005. Structure du site trophique induit par *Tylenchulus semipenetrans* sur bigaradier observé en microscopie photonique, confocale et électronique à transmission. *Nematologia Mediterranea* 33: 171-178.
- Macaron J., 1972. Contribution à l'étude du nématode phytophage *Tylenchulus semipenetrans* Cobb 1913 (Nematoda-Tylenchida). Ph.D. thèse, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France 190 pp.
- Monselise S.P. et Goldschmidt E.E., 1982. Alternate bearing in fruit trees. *Horticultural Reviews*, 4: 128-172.
- O'Bannon J.H. et Reynolds H.W., 1967. The effects of chemical treatment on *Tylenchulus semipenetrans* and *Citrus* tree response during 8 years. *Nematologica*, 13: 131-136.
- Philis I., 1989. Yield loss assessment caused by the *Citrus* nematode *Tylenchulus semipenetrans* on Valencia oranges in Cyprus. *Nematologia Mediterranea*, 17: 5-6.
- Philis I., 1993. Use of nematicides through sprinkler irrigation to control the *Citrus* nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, in established lemon trees. *Miscellaneous Reports - Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resources (Nicosia)*, 59: 1.
- Reynolds H.W. et O'Bannon J.H., 1958. The *Citrus* nematode and its control on living *Citrus* in Arizona. *Plant Disease Reporter*, 42: 1288-1292.
- Ritter M., 1961. Contribution à l'étude des nématodes phytoparasites de la Tunisie. *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie*, 32: 53-57.
- Sundaram R. et Vadivelu S., 1995. Intensity of nematode infestation in mandarin orange crop in Nilgiris hill region. *Indian Journal of Nematology*, 25: 161-163.
- Thorne G., 1961. *Principles of Nematology*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, U.S.A., 553 pp.
- Timmer L.W. et Davis R.M., 1982. Estimate of yield loss from the *Citrus* nematode in Texas grapefruit. *Journal of Nematology*, 14: 582-585.
- Vilardebo A. et Luc M., 1962. Le slow decline des *Citrus* dû au nématode *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *Fruits*, 16: 445-454.
- Webster J.M., 1972. *Economic Nematology*. Academic Press, New York, U.S.A., 563 pp.
- Wilcox-Lee D.A. et Loria R., 1986. Water relations, growth, and yield in two snap bean cultivars infected with root-knot nematode, *Meloidogyne hapla* (Chitwood). *Journal American Society Horticultural Science*, 111: 34-38.
- Wilcox-Lee D.A. et Loria R., 1987. Effects of soil moisture and root-knot nematode, *Meloidogyne hapla* (Chitwood), on water relations, growth, and yield in snap bean. *Journal American Society Horticultural Science*, 112: 629-633.