

## EFFET DE *TYLENCHULUS SEMIPENETRANS* SUR LA BALANCE ENERGETIQUE DE *CITRUS* 'MALTAISE DOUCE' GREFFES SUR BIGARADIER

F. Hadj Nasser<sup>1,2</sup>, S. Kallel<sup>3,\*</sup> et N. Raouani<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, BP 47, 4042 Chott Mariem (Sousse), Tunisie

<sup>3</sup>Institut National Agronomique de Tunisie, 43, Avenue Charles Nicole, 1082 Tunis –Mabrajène, Tunisie

**Résumé.** Le “*slow decline*”, le “*Die-back*” et la diminution du rendement des *Citrus* souvent liés aux infestations par *Tylenchulus semipenetrans* peuvent être une conséquence des modifications physiologiques et une altération du bilan énergétique des arbres. La relation sur le bilan énergétique entre *T. semipenetrans* et l’hôte *Citrus* a été étudiée sur des arbres de ‘Maltaise douce’ greffées sur bigaradiers, âgés de sept ans et plantés en bacs. L’effet du nématode sur les arbres a été évalué, sur le plan qualitatif par la coloration spécifique des granules d’amidon des pousses printanières, et sur le plan quantitatif par l’évaluation de la matière sèche, l’amidon et les sucres réducteurs totaux contenus dans les feuilles, les tiges et les racines des arbres indemnes et infestés par le nématode durant les différents stades phénologiques. Au début du cycle végétatif du végétal, les arbres indemnes paraissent présenter un bilan énergétique meilleur que les arbres infestés. A ce stade, les tiges des arbres infestés par le nématode renferment une quantité plus faible en amidon dans la moelle que les tiges des arbres indemnes. En revanche, pendant le printemps, le bilan énergétique des arbres infestés est meilleur que celui des arbres indemnes avec la modification de la morphogénèse.

**Mots-clés:** Amidon, *Citrus aurantium*, matière sèche, sucres réducteurs.

**Summary.** Effect of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, on energetic equilibrium of ‘Maltaise douce’ orange grafted on sour orange. “Slow decline”, “Die-back” and *Citrus* yield loss, often related to *Tylenchulus semipenetrans* infestations, can be the result of physiological modifications and a change in the energy balance of trees. The energy relationships between *T. semipenetrans* and citrus was studied on seven-year-old ‘Maltaise douce’ trees grafted on sour orange and planted in containers. The qualitative effect of the nematodes on the trees was measured by specific staining of starch granules in spring shoots, while the quantitative effects were assessed during the various vegetative stages by the effects on dry matter, starch and reduced sugars in leaves, stems and roots of trees. At the start of the plant vegetative cycle, healthy trees showed a better energetic balance than those infested by nematodes. At this vegetative stage, stems of trees infected by nematodes contained less starch than those of healthy plants. During the spring, the energetic balance of infected trees was better than that of healthy ones with reference to morphogenetic modification.

**Keywords:** *Citrus aurantium*, dry matter, starch, sugar.

Chez les agrumes, en général, la concentration la plus élevée en hydrates de carbone de réserve est située dans les racines (Goldschmidt et Golomb, 1982). L’amidon est l’hydrate de carbone de réserve majeur dans tous les organes d’arbre de *Citrus*, (Goldschmidt et Golomb, 1982). La dépendance en hydrates de carbone de réserve pendant le cycle annuel est plus importante pendant la vague de croissance printanière et pendant le grossissement des fruits.

D’après Goldschmid (1997), l’amidon et les sucres solubles diminuent et restent à un niveau très bas pendant l’été et l’automne puisqu’il ya une faible demande pour la croissance des fruits. Les sucres solubles augmentent par conversion partielle de l’amidon pendant l’hiver dans les région froide (Jones et Steinacker, 1951; Toritaka *et al.*, 1974). L’évolution saisonnière des niveaux d’hydrate de carbone dans les feuilles conduite par Dugger et Palmer (1969) montre que la fraction so-

luble des sucres, qui atteint un pic pendant l’hiver, est inversement corrélé à celle de l’amidon qui est minimale pendant cette période. Le niveau de l’amidon augmente dans les feuilles âgées à la fin de l’hiver, période concomitante à la période de la croissance printanière (Jones et Steinacker, 1951; Sharples et Burkhart, 1954). L’accumulation de l’amidon prend place pendant l’automne et l’hiver et paraît fortement liée à la demande des fruits (Shimizu *et al.*, 1978). Les arbres d’agrumes effectuent trois vagues de pousses végétatives printanière, estivale et automnale intercalées par deux vagues de croissance racinaire printanière (mars-mai) et automno-hivernale (octobre-décembre), la floraison s’effectue sur les pousses printanières à partir de rameaux d’un an et la production d’oranges ‘Maltaise douce’ en hiver (janvier-février). Les racines néoformées mettent trois mois environ pour évoluer en racines nourricières (El-Othmani *et al.*, 1998). Le retard de la croissance racinaire par rapport aux pousses est interprété comme une compétition pour les photosynthates, avec une priorité pour la partie aérienne (Bevington et Castle, 1985).

*Tylenchulus semipenetrans* Cobb est un nématode se-

\* Auteur correspondant, e-mail: kallel@lycos.com

mi-endoparasite sédentaire inféodé aux racines des *Citrus*. Le bigaradier, *Citrus aurantium* L. porte-greffe le plus utilisé en pépinière et en verger en Tunisie et dans la région méditerranéenne, est sensible à ce nématode.

Les symptômes associés à ce nématode dans un verger sont peu étudiés étant donné la généralisation de l'infestation dans les parcelles et la présence de diverses maladies sur un même arbre. Les symptômes sont liés à un dépérissement des arbres avec une défoliation des branches, surtout au sommet de la frondaison (Reynolds et O'Bannon, 1958), et un dessèchement (mortalité) des pousses appelé "die back" (Ritter, 1961; Thorne, 1961; Kallel *et al.*, 2004). Le dépérissement des agrumes et les symptômes de die-back sont observés dans les vergers infestés par *T. semipenetrans*, dans différentes parties du monde telles que les USA (O'Bannon et Reynolds, 1967), Afrique (Aggrey *et al.*, 1988), Inde (Sundaram et Vadivelu, 1995) et la région méditerranéenne (Philis, 1993; Kallel et Abdelwahed-Ghariani, 2004).

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). La présence du nématode induit un stress hydrique (Kallel et B'Chir, 2005), et une modification de la morphogenèse des arbres en phase de croissance (B'Chir et Kallel, 1992; Kallel et B'Chir, 2006). Dans les vergers, la densité de nématode sur racine de *Citrus* augmente la variabilité de la production des arbres (Kallel *et al.*, 2001). L'établissement des femelles dans la racine modifie profondément sa région corticale, en construisant un réseau trophique qui permet de véhiculer des substances indispensables au développement du nématode (B'Chir, 1988; Kallel *et al.*, 2005).

Plusieurs auteurs ont montré que l'effet de l'arbre sur ce nématode est lié au métabolisme des sucres. En effet, l'augmentation de l'amidon dans les cellules trophiques modifiées par le nématode, en comparaison avec les cellules corticales indemnes, montre que ce nématode construit un réseau trophique cortical permettant de confluer les substances énergétiques jusqu'à la région antérieure de la femelle. L'amidon provenant de la partie aérienne de l'arbre est transloquée via les trachéides du xylème vers les racines et donc vers les nématodes (Kallel *et al.*, 2005; Kallel et B'Chir, 2006).

La richesse en granules d'amidon dans les cellules trophiques renforce l'hypothèse du rôle nourricier important des sucres. De plus, Cohn (1965) a montré l'implication de l'homogénat d'enzymes obtenus du nématode par la digestion de l'amidon en sucres réducteurs. Ceci expliquerait le rôle de la modification de l'équilibre énergétique des arbres d'agrumes sur la biologie du nématode (Duncan et Eissenstat, 1993; Duncan *et al.*, 1993).

La phénologie de l'arbre et les facteurs abiotiques affectent la densité de nématode sur les racines. La variation annuelle de l'infestation dépend de l'âge des racines (Cohn, 1964), de leur abondance (Duncan et Noling, 1987), des réserves en amidon dans les racines (Duncan *et al.*, 1993) et des conditions abiotiques, es-

sentiellement la température dans la région méditerranéenne (Kallel et B'Chir, 2004; Kallel et Abdelwahed-Ghariani, 2004) et l'humidité du sol (Duncan et El-Morshedy, 1996).

L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de *T. semipenetrans* sur la balance énergétique des *Citrus*.

## MATERIELS ET METHODES

### Conduite des arbres.

L'essai est mené depuis mai 1999 en bacs cimentés de 3×1×1 m, sur des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradier de même vigueur (70-75 cm de hauteur et 0,95-1,10 cm de diamètre du tronc), âgés d'un an et provenant d'une pépinière indemne de nématodes (Groupe Interprofessionnel de Fruits, Gobba). Six bacs organisés en deux rangées ont été à moitié remplis par un sol constitué d'un mélange de sable de carrière et de fumier de mouton (2 : 1) puis complétés par un sol provenant de bacs où des citronniers greffés sur bigaradier ont été cultivés. Afin de reproduire les conditions de terrains des sols infestés par le nématode et d'entamer l'essai par une infestation massive, la moitié de ces bacs a reçu un sol provenant de bacs où, pendant 10 ans (entre 1989 et 1999), des citronniers greffés sur bigaradiers infestés de *T. semipenetrans* ont poussé; les nématodes provenaient de racines d'arbres de maltaise demi-sanguine greffés sur bigaradier, naturellement infestées par des nématodes collectés de la région agrumicole du Cap Bon. La seconde moitié des bacs a reçu un sol témoin indemne de nématode. A l'intérieur de chaque bac ainsi rempli, deux arbres sont plantés. Les deux rangées de bacs sont équipées d'un système d'irrigation localisée et reçoivent la même quantité d'eau.

Depuis l'installation de l'essai, les arbres n'ont jamais été taillés, leur morphogenèse a été suivie pendant plusieurs années (Kallel et B'Chir, 2006) et la production en fruits, par arbre, a été évaluée chaque année en hiver (février), jusqu'à novembre 2006.

### Prélèvement des organes à étudier.

L'expérimentation concernant l'effet du nématode sur les réserves énergétiques a été effectuée pendant une année, entre deux repos végétatifs, sur les 24 arbres. Le prélèvement des pousses printanières et des radicelles sur chaque arbre a été initié, à partir du 21 novembre 2005, et l'échantillonnage effectué suivant les stades phénologiques des arbres, après chaque flux de sève, ce qui s'exprimait par une vague de croissance (Kallel et B'Chir, 2006). Les pousses entières ont été prélevées au hasard sur l'arbre à la floraison (22 février), après les vagues de croissance printanière (4 mai), estivale (3 août, 5 septembre), automnale (16 octobre) et à l'entrée du repos végétatif (21 novembre). L'échantillonnage des pousses printanières consiste à prélever au niveau de la cime de chaque arbre huit jeunes pousses. Les jeunes radicelles (entre 0-30 cm de profondeur) sont prélevées, à la même

date que les pousses, selon la technique décrite par Duncan (1986) et divisées en deux portions. Une portion de 10 grammes environ est destinée au dosage de l'amidon et des sucres réducteurs et 10 grammes de racines ont servi à l'extraction des nématodes, pour déterminer leur densité de population par gramme de matière fraîche.

*Extraction des nématodes.* La technique de la double centrifugation est utilisée pour extraire des racines les nématodes à différents stades de développement (œufs, juvéniles et adultes) (Macaron, 1972).

*Dosage des hydrates de carbone.* L'évaluation des réserves en hydrates de carbone par arbre a été effectuée sur les racines, des pousses printanières (feuilles et tiges) des arbres respectivement infestés par *T. semipenetrans* et indemnes.

### Technique utilisée

*Sur organes entiers.* Ce travail a été mené pour déterminer quels sont les organes et à quel stade phénologique du cycle végétatif de l'arbre ils sont affectés par le parasite. La teneur d'amidon et celle des sucres réducteurs ont été évaluées respectivement sur la matière sèche et la matière fraîche. La détermination de la teneur en matière sèche a été évaluée à chaque date d'échantillonnage et pour chaque type d'organe, sur les arbres indemnes et infestés, en plaçant 5 g de feuilles, tiges et racines dans une étuve à 70 °C, pendant 3 jours jusqu'à poids constant. Ce poids a été alors enregistré.

*Sur tissus (cortex et moelle).* Cette expérience a été effectuée pour déterminer la partie de la tige altérée par le parasite. Le cortex, lieu de transfert et la moelle, lieu de stockage des hydrates de carbones. La détermination de la répartition des sucres réducteurs et de l'amidon dans les deux tissus des pousses, permet de préciser ces modifications physiologiques, dans le cas où une différence significative est mesurée entre les arbres infestés et indemnes. Les mesures ont été également effectuées après séparation de la partie corticale et la moelle de la tige, afin de déterminer l'importance relative des réserves énergétiques. A cet effet, les tiges découpées en morceaux de 1 cm de longueur environ sont laissées dans de l'eau pendant 15 minutes, puis, à l'aide d'un scalpel, la partie corticale est séparée de la moelle des tiges. La méthodologie appliquée pour évaluer les hydrates de carbone dans les différentes parties des tiges est identique à celle adoptée sur l'organe entier.

### Mesure des sucres

*Amidon.* La teneur en amidon est déterminée selon la méthode de Hellali (1978) et citée par Hamada (1995). Elle est basée sur la coloration bleue obtenue suite à l'action de l'iode sur l'amidon. Les tiges, les feuilles et les racines sont découpées et séchées à l'étuve à 70 °C jusqu'à poids constant puis broyées par un micro broyeur "Cullatti" à tamis dont les mailles font 3 mm de diamètre. Le

broyat (300 mg) des différents organes du végétal est mis dans 20 ml d'alcool éthylique à 70% pour l'extraction de l'amidon. Après 48 heures, le surnageant est éliminé et le culot est récupéré et séché à une température de 60 °C jusqu'à poids constant. L'extrait sec est ensuite pesé puis hydrolysé par l'acide perchlorique à 70% à raison de 5,7 ml pour 300 mg d'extrait sec (le volume de l'acide perchlorique est recalculé en fonction du poids de l'extrait sec obtenu). Le volume de cette préparation est ajusté à 250 ml par de l'eau distillée. Après 48 heures, 7 ml de chaque solution sont mélangés dans un tube à essai avec 0,5 ml d'une solution aqueuse d'iode préparée à raison de 0,1% de KI et 0,02% de KIO<sub>3</sub>. Après 5 heures, la lecture de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre (Bauch & Lamber) à la longueur d'onde de 675 nm. L'étalonnage du spectrophotomètre est effectué avant chaque mesure. Pour la gamme d'étalonnage, plusieurs quantités d'amidon soluble pur comprises entre 1 et 25 mg sont hydrolysées par 20 ml d'acide perchlorique à 70%. La préparation est ensuite ramenée à 250 ml par de l'eau distillée. Après 48 heures d'hydrolyse, 7 ml de chaque solution sont ajoutés avec 0,5 ml de la solution d'iode. La lecture de l'absorbance au spectrophotomètre est effectuée 5 heures après le début de la réaction à la longueur d'onde  $\lambda = 675$  nm.

*Sucres réducteurs.* Le matériel végétal (300 mg de matière fraîche) est solubilisé dans 5 ml du méthanol à 80% et chauffé au bain-marie à 70 °C pendant 30 minutes. La teneur des sucres solubles est déterminée par la méthode phénol acide sulfurique (Robyt et White, 1987). Un millilitre de l'extrait est prélevé et on y ajoute 1 ml de d'une solution aqueuse de phénol 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation et refroidissement l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 640 nm. Les valeurs doses contenues dans les échantillons sont reportées sur la courbe-étalon établie par des solutions de glucose allant de 0,05 à 0,3 mg/ml.

### Localisation des sucres

L'aspect qualitatif des réserves énergétiques 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 (I<sub>2</sub>KI). Les coupes transversales ont été effectuées à main levée, à l'aide d'une lame de rasoir. Les pousses sont débarrassées de leurs feuilles et sont coupées à la base de la pousse entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> nœud. Les coupes sont placées, pendant 2 minutes, dans un verre de montre contenant une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 1,9%. Les coupes sont ensuite transférées successivement dans un bain d'eau distillée puis un bain formé par un mélange d'eau et quelques gouttes d'acide acétique. Enfin, les coupes sont colorées au liquide de Lugol pendant 15 minutes puis transférées dans de l'eau distillée afin d'éliminer l'excès du colorant; elles sont ensuite montées dans une goutte de gly-

cérine entre lames et lamelles puis observées au microscope Olympus CX40.

### Analyse statistique

Les données chiffrées, effectuées au cours de cet essai, sont analysées par le logiciel SPSS10.0. Le traitement statistique consiste à comparer les douze arbres infestés aux douze arbres indemnes de nématode, par le test t de Student ( $P = 0,05$ ) et à comparer les différents stades phénologiques de l'arbre par une analyse de la variance (ANOVA) puis une comparaison multiple des moyennes par le test de Student Newman et Keuls, à même probabilité.

## RÉSULTATS

### La production des arbres

Depuis le début de l'essai, la différence de production en fruits n'est pas significative entre les arbres infestés et les arbres indemnes (Fig. 1). L'exportation en matière fraîche en fruits est similaire entre les deux types d'arbres.

### La densité de population du nématode

Pendant la période de l'essai, la densité de population du nématode dans les racines évolue progressivement (Fig. 2). Le nombre maximal de femelles par gramme de racine est enregistré en hiver (20 février), soit 38 femelles par gramme, puis diminue progressivement pendant le reste de l'année. Le nombre d'œufs et de juvéniles par racine suit, d'une manière similaire, celui des femelles. En hiver, le nombre moyen d'œufs par gramme de racines est de 180 et celle des juvéniles est de 84.

### La matière sèche

La matière sèche des pousses (tige et feuille) par unité de poids frais initiées au printemps diminue progressivement au cours de l'année végétative et atteint un minimum en septembre, puis augmente pour atteindre un maximum pendant l'hiver. La matière sèche est significativement plus importante pendant le mois d'août après la période de croissance des gourmands. La matière sèche évolue au cours du cycle végétatif de l'arbre, avec une diminution très importante pendant la période estivale (Fig. 3). Les racines présentent une proportion de matière sèche plus faible que celle des pousses printanières. Concernant le bilan photosynthétique, qui est exprimé par la matière sèche foliaire de l'arbre, aucune différence significative n'est obtenue entre les arbres indemnes et infestés quelque soit le stade phénologique (Fig. 3). L'accumulation de la matière sèche dans les pousses printanières des arbres témoins est également similaire à celle des arbres infestés par le nématode (Fig. 3). Pendant l'année, le pourcentage de la matière sèche dans les racines témoins, comparé à celui dans les racines infestées, a montré une différence significative seulement pendant la période printanière (4 mai) et la période estivale (3 août). Pendant la période printanière, le taux de matière sèche dans les racines témoins est significativement plus faible que celui des racines infestées par le nématode. Alors que pendant la période estivale, la matière sèche dans les racines témoins est statistiquement plus élevée que dans les racines infestées (Fig. 3). Il apparaît une accumulation d'eau en mai et en septembre, dans la partie aérienne, et en août dans les racines, ce qui atteste d'une activité métabolique intense dans ces organes végétatifs, avec un décalage entre la partie aérienne et la partie souterraine.

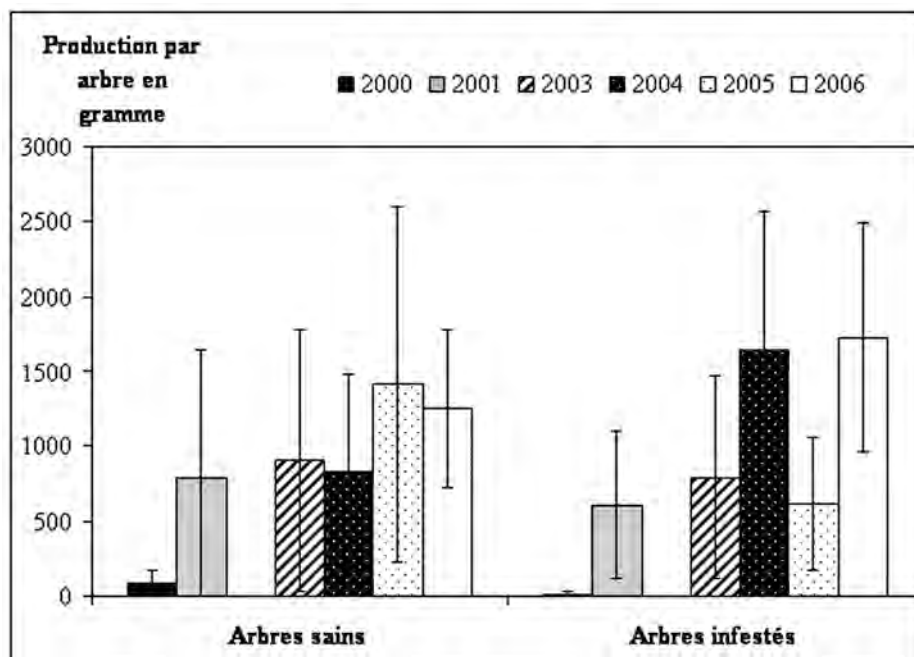


Fig. 1. Effet de l'infestation par *Tylenchulus semipenetrans* sur la production des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers pendant six années successives en bacs. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à  $P = 0,05$ .



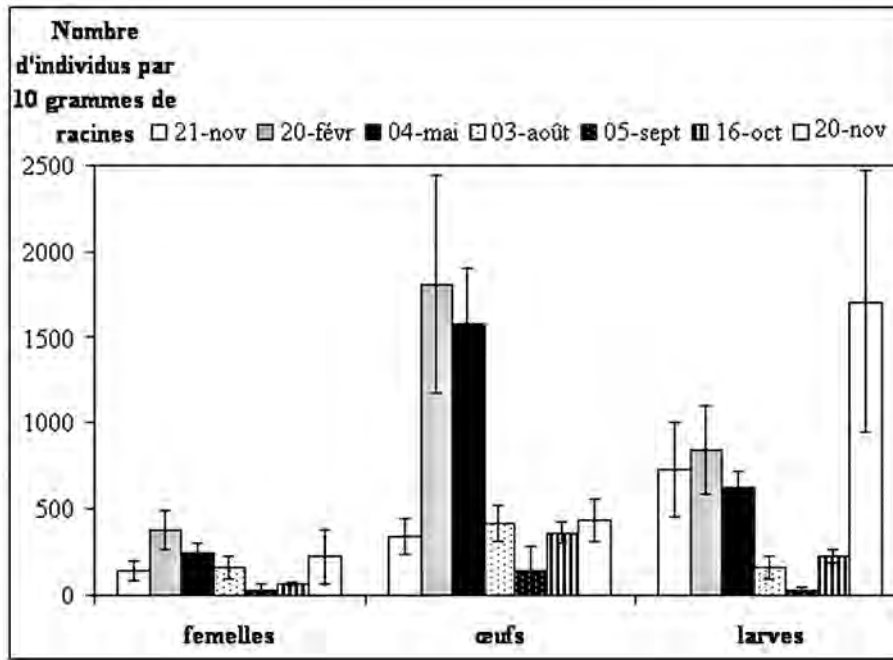


Fig. 2. Evolution de la densité de population de *T. semipenetrans* sur les racines des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivés en bacs pendant la période de l'essai. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à P = 0,05.

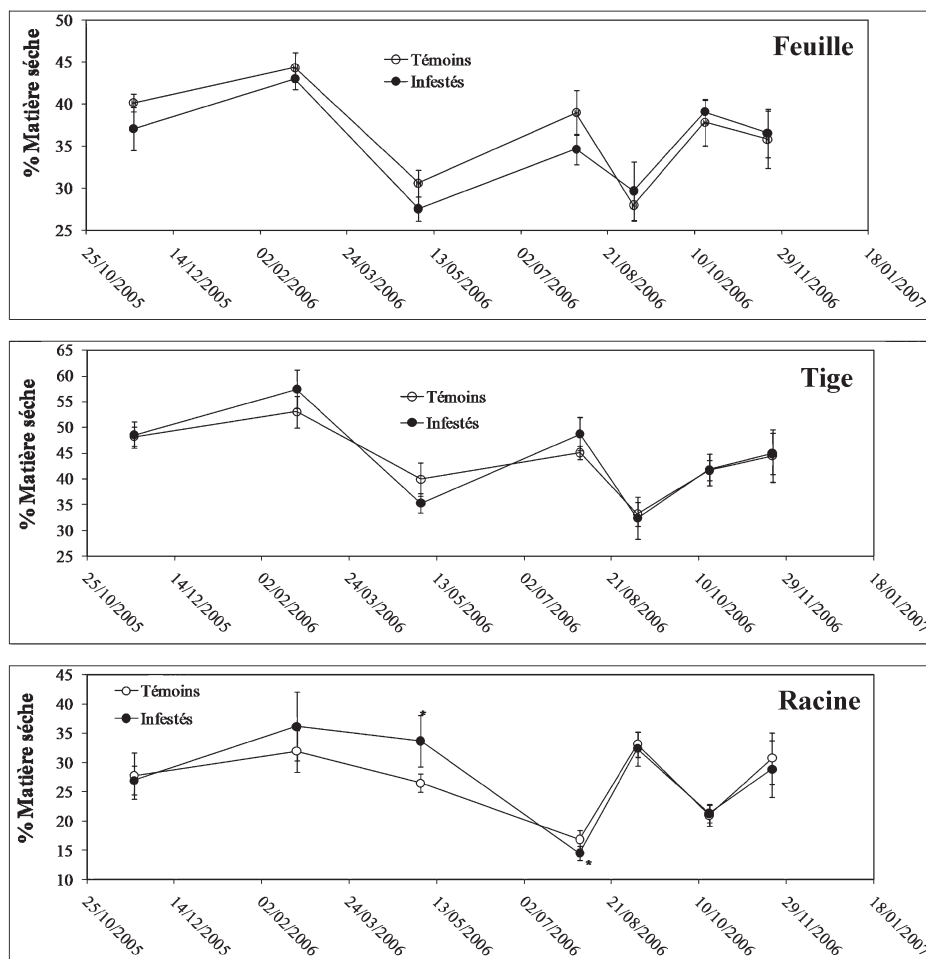
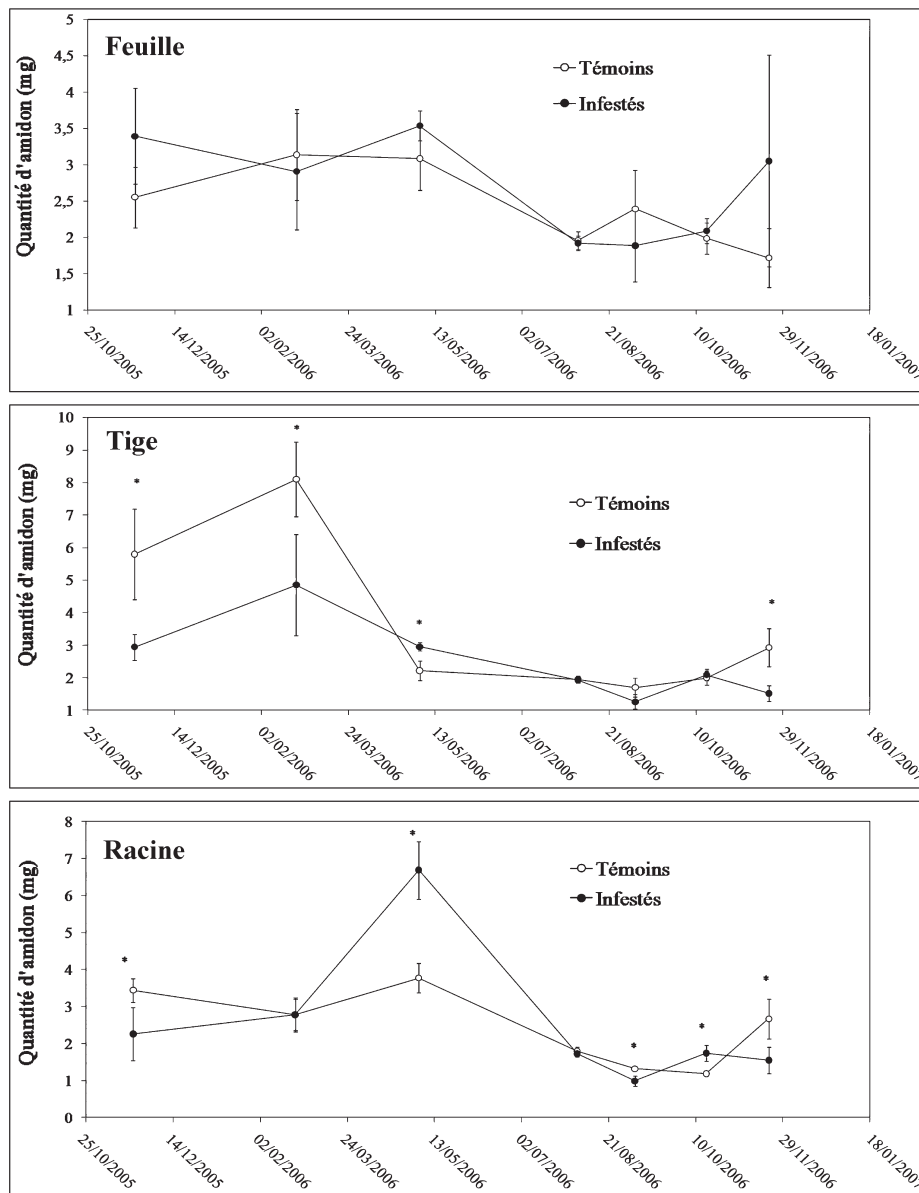


Fig. 3. Evolution annuelle de la matière sèche des feuilles, des tiges des pousses printanières et des racines des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivés en bacs indemnes et infestés par *T. semipenetrans*. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à P = 0,05. Les moyennes des deux types d'arbres associées à (\*) sont significativement différentes selon le test t de Student à P = 0,05.



**Fig. 4.** Evolution annuelle de l'amidon des feuilles, des tiges des pousses printanières et des racines des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivés en bacs indemnes et infestés par *T. semipenetrans*. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à  $P = 0,05$ . Les moyennes des deux types d'arbres associées à (\*) sont significativement différentes selon le test t de Student à  $P = 0,05$ .

### Le dosage des réserves en hydrate de carbone

*L'amidon sur organes entiers.* Durant la période située entre la fin d'automne (21 novembre) et la fin du printemps (4 mai), le taux d'amidon est relativement élevé dans les feuilles par rapport au reste du cycle végétatif. En effet, pendant cette période, la quantité d'amidon varie entre 2 et 3,13 mg, alors qu'elle ne dépasse pas 1,9 mg pendant le reste de l'année. Cependant, la quantité d'amidon dans les feuilles des arbres témoins n'est pas significativement différente de celle des arbres infestés par *T. semipenetrans* (Fig. 4). Pendant le cycle végétatif, la quantité d'amidon dans les tiges témoins est significativement élevée à la fin de l'automne et pendant l'hiver, période de vie ralentie du végétal (Fig. 4); elle varie entre 5,7 et 8,1 mg. Cette quantité diminue fortement pendant le cycle végétatif de l'arbre et varie entre 2,2

mg au mois de mai et 1,7 mg au mois d'octobre. A la fin de l'automne (21 novembre) et en hiver (22 février), les tiges témoins présentent une quantité d'amidon significativement plus importante que celles des arbres infestés par le nématode des *Citrus*. Alors qu'au printemps (4 mai), les tiges infestées renferment une quantité significativement plus importante que celle du témoin.

La quantité d'amidon dans les racines de bigaradier évolue d'une manière importante au cours d'un cycle végétatif (Fig. 4). Cette quantité dans les racines diminue d'une manière beaucoup moins importante que celle contenue dans les tiges des pousses printanières. A partir du 21 novembre au 22 février, qui correspond à une période de vie ralentie de l'arbre, la quantité d'amidon est maximale puis diminue au printemps (4 mai), avec la production des pousses printanières. Pendant

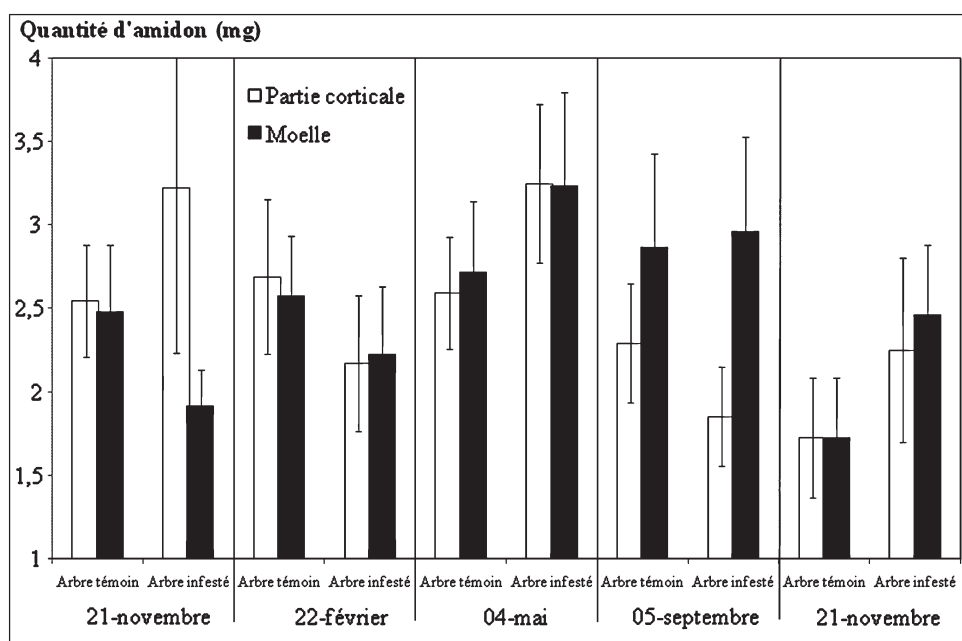
cette période (4 mai), la quantité d'amidon est significativement plus importante dans les racines des arbres infestés que dans celle contenue dans les arbres témoins. Par contre, lorsque le taux d'amidon commence à augmenter dans les racines témoins, marquant le retour vers la phase de vie ralentie, il reste significativement plus élevé dans les racines infestées hébergeant des femelles de *T. semipenetrans* au début de l'automne (16 octobre). Ce taux est statistiquement plus élevé dans les racines témoins que dans les racines infestées par le nématode, à la fin de l'automne (21 novembre).

*La répartition de l'amidon dans les tissus (cortex et moelle).* Pendant les périodes où la quantité d'hydrate de carbone dans les pousses printanières montre une différence significative entre les arbres témoins et infestés, la répartition des réserves en amidon dans les différentes parties de la tige a été évaluée. La partie corticale de la tige présente une quantité d'amidon variant très peu entre les saisons et entre les deux types d'arbres. Par contre, la moelle des tiges des arbres indemnes renferme une quantité d'amidon significativement plus importante que celle des arbres infestés pendant le début et la fin de la période d'échantillonnage. La moelle paraît plus riche en amidon par rapport à la partie corticale de la tige des arbres témoins à la fin du cycle végétatif. Par contre, pour les arbres infestés, la proportion en amidon entre le cortex et la moelle des tiges est variable avec une légère augmentation dans la région corticale à la fin de l'automne (Fig. 5).

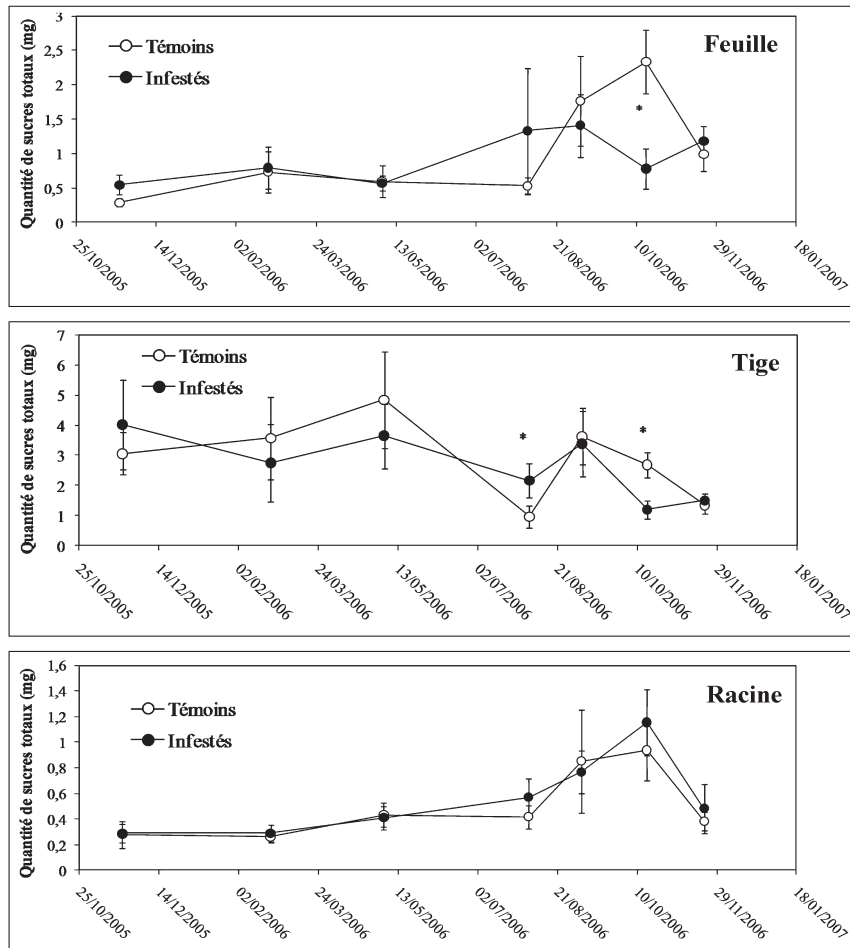
*Les sucres totaux sur organes entiers.* La quantité des sucres totaux augmente au cours du cycle cultural, à l'inverse de l'amidon qui est la substance de réserve dans les

arbres indemnes. La quantité des sucres totaux dans les feuilles des arbres témoins est significativement plus importante durant le mois d'octobre que celle des arbres infestés (Fig. 6). Aux différentes périodes d'échantillonnage, le taux de sucres totaux dans les tiges présente une grande variabilité, matérialisant ainsi le rôle de transfert des substances dans les deux sens entre les feuilles, lieu de production de sucres, et les racines consommatrices et lieu de stockage. La teneur en sucres totaux des pousses initiées au printemps paraît stable au cours du cycle végétatif, sauf au mois d'août, puis diminue pendant la période de vie ralentie de l'arbre. La quantité des sucres totaux dans les tiges infestées est significativement supérieure à celle des tiges indemnes au mois d'août. À l'inverse au mois d'octobre, le taux de sucres des tiges des arbres infestés est statistiquement inférieur à celui des tiges témoins (Fig. 6). L'évolution annuelle de la quantité de sucres totaux dans les racines des arbres est similaire à celle des feuilles. Cette quantité est importante durant les mois de septembre et d'octobre; seulement, la quantité contenue dans les racines ne dépasse pas 1 gramme. Néanmoins, aucune différence significative n'est décelée entre le taux de sucres totaux dans les racines témoins et infestées par *T. semipenetrans* au cours de différentes dates d'échantillonnages (Fig. 6).

*La répartition des sucres totaux dans les tissus (cortex et moelle).* La répartition des réserves en sucres totaux dans les pousses printanières pendant la période montrant une différence significative entre les arbres témoins et infestés n'est pas équitable entre le cortex et la moelle de la tige. En effet, pendant la période estivale, ces réserves sont plus abondantes dans le cortex de la tige. En effet, la partie corticale constitue le lieu de transfert des

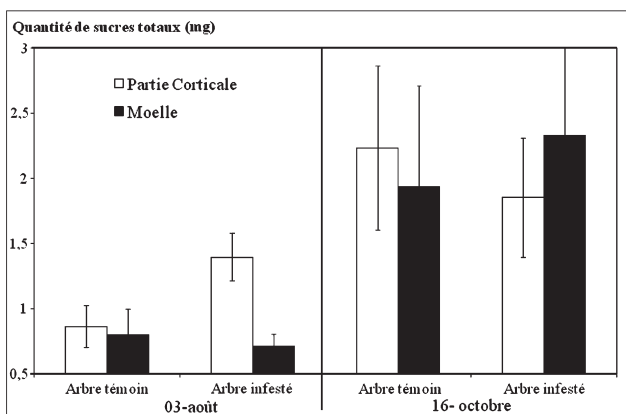


**Fig. 5.** Evolution de la quantité d'amidon dans la région corticale et la moelle des tiges des pousses printanières des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivées en bacs indemnes et infestés par *T. semipenetrans*.



**Fig. 6.** Evolution annuelle des sucres réducteurs totaux des feuilles, des tiges des pousses printanières et des racines des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivés en bacs indemnes et infestés par *T. semipenetrans*. Les barres correspondent aux intervalles de confiance à  $P = 0,05$ . Les moyennes des deux types d'arbres associées à (\*) sont significativement différentes selon le test de Student à  $P = 0,05$ .

substances solubles entre les feuilles et les autres organes de l'arbre. Dans les tiges des arbres infestés, la moelle renferme une proportion de sucres totaux anormalement élevée pendant le mois d'octobre (Fig. 7).



**Fig. 7.** Evolution de la quantité des sucres totaux dans la région corticale et la moelle des tiges des pousses printanières des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivés en bacs indemnes et infestés par *T. semipenetrans*.

### Localisation des sucres

La comparaison sur le plan qualitatif des réserves d'amidon entre les arbres témoins et infestés par le nématode des *Citrus* a été effectuée après chaque flux de sève. Des coupes transversales des tiges provenant des arbres de 'Maltaise douce' greffés sur bigaradier infestés par *T. semipenetrans* et d'arbres témoins ont été effectuées. Les réserves sous forme de grains d'amidon ont été observées dans la moelle, les trachéides du xylème, le phloème et dans la partie corticale. A la fin du cycle végétatif (novembre 2005), la moelle et la partie corticale des tiges indemnes paraît renfermer plus de grains d'amidon que les tiges infestées. En revanche, le xylème des tiges infestées est plus riche en amidon (Fig. 8 A et A'). Pendant la période d'initiation florale (février 2006), la coloration foncée des différentes parties de tiges indemnes (cortex, phloème et xylème) reflète leur richesse en granules d'amidon surtout au niveau de la partie périphérique de la moelle. Les tiges infestées renferment des granules moins abondantes que les tiges des arbres indemnes. A cette période, la tige emmagasine peu d'amidon dans la moelle (Fig. 8 B et B'). Après la première vague de croissance printanière, les tiges des arbres in-



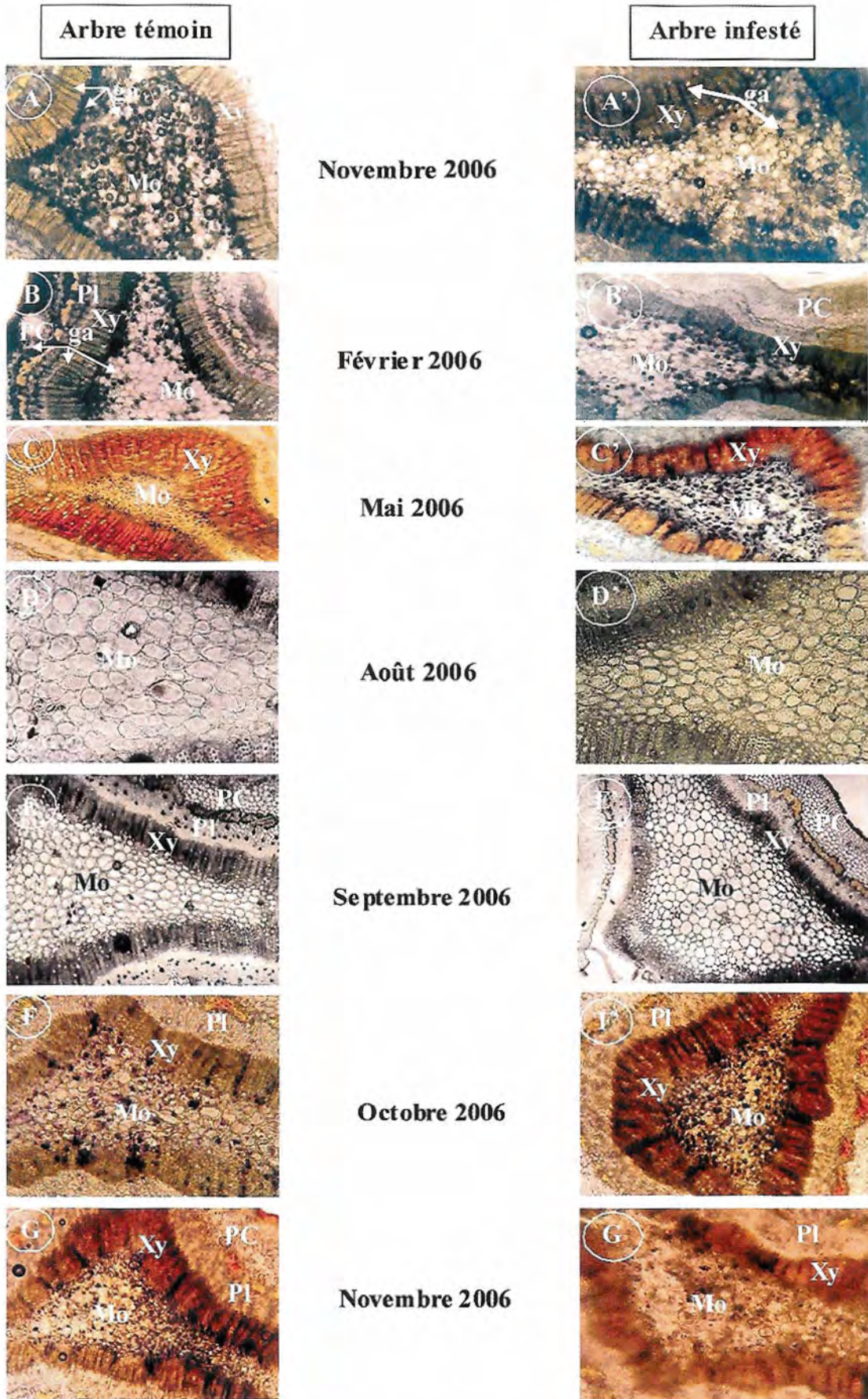


Fig. 8. Aspect des coupes transversales des tiges des pousses printanières colorées au liquide de Lugol après chaque vague de croissance pendant un cycle végétatif des arbres 'Maltaise douce' greffés sur bigaradiers cultivés en bacs indemnes et infestés par *T. semipenetrans* (100x). Grain d'amidon (ga), la moelle (Mo), le la partie corticale (Pc), phloème (Pl), Xylème (Xy).



festés sont plus riches en amidon dans la moelle, le xylème, le phloème et la partie corticale que les tiges des arbres indemnes (Fig. 8 C et C'). Pendant la période estivale, après la vague des pousses vigoureuses (gourmands), les deux tiges infestées et indemnes présentent une faible quantité de grains d'amidon (Fig. 8 D et D'). A la fin de la troisième et dernière vague de croissance (septembre 2006), les arbres indemnes et infestés sont pauvres en granules d'amidon (Fig. 8 E et E'). En revanche, au mois d'octobre, les tiges des arbres infestés sont plus riches en amidon dans la moelle, le xylème, le phloème et la partie corticale que les tiges indemnes (Fig. 8 F et F'). En novembre 2006, marquant le retour au repos végétatif, les tiges indemnes sont plus riches en amidon dans la moelle, le xylème, le phloème et la partie corticale que les tiges infestées (Fig. 8 G et G').

## DISCUSSION

L'action du nématode sur les arbres n'implique pas directement une diminution de la productivité. La perte de rendement en fruits paraît liée à la modification de la morphogenèse (B'Chir et Kallel, 1992; Kallel et B'Chir, 2006) et la déficience énergétique des arbres. En verger, les populations de *T. semipenetrans* sont en équilibre avec l'arbre et les conditions du milieu. Les pics de densité des femelles et des larves du nématode sur les racines de *Citrus* suit l'émission de jeunes racines nourricières (Hamid *et al.*, 1988). La variation de la densité de population sur racine est saisonnière (B'Chir et Kallel, 1992; Abd-Elgawad *et al.*, 1994) en fonction de la disponibilité en racines nourricières, ce qui explique la fluctuation saisonnière bimodale, avec un pic au printemps et un pic en automne. La variation de la densité de population du nématode est également pluriannuelle en fonction du bilan énergétique des arbres et les infestations antérieures (Kallel *et al.*, 2001). Il est évident que dans les conditions de cette expérimentation conduite en bacs, permettant de comparer les arbres infestés par le nématode des *Citrus* à des arbres sains, la variation de la densité de nématode sur les racines ne suit la même allure bimodale que celle des arbres en verger. En bac, l'élévation importante et rapide de la température du sol, la diminution de l'humidité et la situation des arbres qui sont rapidement sous stress hydrique (Kallel et B'Chir, 2005) pourraient expliquer la diminution de la densité de population sur les racines pendant la période estivale.

Bien que la matière sèche dans les pousses (tige et feuille) initiées au printemps soit similaire entre les arbres infestés par le nématode et les arbres sains pendant toute l'année, la matière sèche dans les racines est différente entre les deux types d'arbres. Cette perte de matière sèche liée à un déficit en amidon dans la partie aérienne et restant confinée dans les racines infestées par *T. semipenetrans* pendant la période printanière est en rapport avec l'installation d'un grand nombre de juvéniles du nématode (Duncan *et al.*, 1993).

Les femelles de ce nématode s'installent et initient des cellules trophiques dans le cortex amylière de la racine. Les cellules modifiées par le nématode sont plus riches en sucres et en amidon. Cette particularité montre tout d'abord le rôle important des sucres dans le métabolisme du nématode comme il a été observé par plusieurs chercheurs (Cohn, 1965; Hamid, 1985; Kallel *et al.*, 2005). La richesse en amidon des cellules initiées n'est possible que dans le cas où un réseau trophique se met en place, drainant les substances élaborées entre les cellules modifiées par le nématode, les organes de stockage des racines et les lieux de transfert de la matière (les vaisseaux conducteurs). Les substances énergétiques sont transloquées des feuilles et tiges vers les racines, via la voie descendante (phloème) pour la matière élaborée, tels que les sucres réducteurs, alors que l'amidon, l'eau et des sels minéraux sont véhiculés via les trachéides du xylème, permettant la translocation ascendante des racines vers la partie aérienne de l'arbre. En plus de ces voies naturelles de la plante, un réseau trophique est induit dans les racines infestées par le nématode. Ce réseau, formé par les cellules trophiques, les organelles intracellulaire d'échanges dans le cytoplasme des cellules corticales et les tubules intercellulaires d'échanges entre les cellules du cortex radulaire a été observé en microscopie photonique, confocale et électronique à transmission (B'Chir, 1988; Kallel *et al.*, 2005). Le réseau trophique permet d'alimenter ainsi la femelle de *T. semipenetrans*, étant donné que celle-ci peut se maintenir sur la racine des agrumes pendant une année entière (Kallel et B'Chir, 2004).

Duncan *et al.* (1993) ont montré que l'arbre en verger a un effet sur le nématode des *Citrus*. A l'inverse, cette étude a montré que ce nématode a un effet sur la quantité d'amidon des racines contrairement aux sucres solubles, dont la quantité reste similaire dans les racines saines et infestées par le nématode. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Hamid *et al.* (1985).

*Tylenchulus semipenetrans* est donc un parasite insidieux, il modifie la morphogenèse des arbres infestés (B'Chir et Kallel, 1992; Kallel et B'Chir, 2006). Les arbres infestés, comparés aux témoins, produisent un nombre de rameaux orthotropes plus importants, ce qui améliore le bilan énergétique en sucres des arbres et permet un nombre important de juvéniles de devenir des femelles pondant des œufs. Cette orthotropie explique la quantité importante d'amidon dans les tiges et les racines au printemps (mai). La variation de la quantité d'hydrates carbone synthétisés et stockés sous forme d'amidon par l'arbre affecte fortement la densité de population du nématode dans les racines (Duncan et Eisenstat, 1993; Duncan *et al.*, 1993). A l'inverse, la consommation de l'amidon par le nématode influence la phénologie de l'arbre (Kallel et B'Chir, 2006), ce qui permet de mettre ce nématode au rang de parasite.

Pendant la période hivernale, l'arbre accumule de l'amidon dans la moelle des pousses printanières pour préparer un deuxième cycle végétatif pendant la période

de printanière. Pendant celle-ci, l'arbre a besoin d'énergie pour la croissance des nouvelles racines, la croissance végétative aérienne et la floraison. La présence des femelles consommatrices d'amidon pendant la période automne-hiver ampute la translocation des réserves énergétiques par la voie du xylème et leur stockage dans les pousses printanières. En effet, l'entretien de la densité des populations du nématode pendant l'hiver, la mise en place de nouveaux sites trophiques induits par les juvéniles issues de la vague d'éclosion printanières du nématode et l'inefficacité des racines nouvellement émises, créent un déséquilibre entre la partie aérienne et souterraine, ce qui permet d'expliquer la diminution des nouvelles pousses printanières et leur dessèchement (O'Bannon et Reynolds, 1967; Kallel et Abdelwahed-Ghariani, 2004; Kallel *et al.*, 2004).

La diminution des réserves énergétiques dans les tiges pourrait expliquer les symptômes de défoliation et de dessèchement (mortalité) des pousses appelées "die-back" chaque fois que les racines supportent une densité de population du nématode élevée.

La diminution de la densité de population de nématode sur les racines au début du mois de septembre ne paraît être liée ni à la matière sèche, ni à la quantité d'amidon et les sucres totaux, mais plutôt aux conditions de température élevée marquées par les coups de sirocco dans la région méditerranéenne (Kallel et Abdelwahed-Ghariani, 2004; Kallel et B'Chir 2004).

En définitif, *T. semipenetrans* induit des modifications morphologiques et physiologiques profondes des arbres de *Citrus* qui seraient liées à un déséquilibre général du métabolisme. Ces modifications entraînent une mauvaise translocation des réserves en amidon et en sucres réducteurs aboutissant à un déficit énergétique et déplaçant l'équilibre vers une meilleure disponibilité des réserves pour le parasite.

## 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., Kenno A. et Batcha A., 1988. Nematode fauna in two declining *Citrus* orchards in Ethiopia. *FAO Plant Protection Bulletin*, 36: 35-41.
- Ambrogioni L. et D'Errico F.P., 1984. I nematodi parassiti degli agrumi e loro controllo. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, 105: 64 p.
- 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. *Proceedings International Bulletin. OILB/SROP* 16 (7): 62-76.
- Bevington K.B. et Castle W.S., 1985. Annual root growth pattern of young citrus trees in relation to shoot growth, soil temperature and soil water content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110: 840-845.
- 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.
- 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. 321-46. *In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (Luc M., Sikora R.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.
- Dugger W.M. et Palmer R.L., 1969. Seasonal changes in lemon leaf carbohydrates. Proceedings of the First International Citrus Symposium (16-26 March 1968: Riverside, California), University of California, Riverside, California, USA, 1: 339-343.
- El-Otmani M., Ammati M., Bouamoud A. et Ait Bella Z., 1998. Dynamique de croissance des racines des arbres de l'oranger 'Valencia late': relation avec l'exposition et la dynamique des populations des nématodes dans le sol. *Nouveaux Acquis de la recherche en Agrumiculture*, Institut Agronomique & vétérinaire Hassan II, Agadir, Maroc, 292-299.
- Goldschmidt E.E., 1997. Basic and practical aspects of citrus trees' carbohydrate economy. Pp. 63-72. *In: Citrus Flowering and Fruiting Short Course* (Futch S.H. et Kender W.J., eds). Citrus Research and Education Center, IFAS, University of Florida, Lake Alfred, USA.
- Goldschmidt E.E. et Golomb A., 1982. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107: 206-208.
- Hamada M.B., 1995. Possibilité de retarder la maturation des orangers maltaises (*Citrus sinensis* Osbek.) cv. demi-sanguine par pulvérisation foliaire de GA<sub>3</sub> et d'urée permettant l'échelonnement de leur récolte. *Mémoire de 3<sup>ème</sup> cycle de spécialisation Horticulture-Arbiculture*. INAT, Tunisie, 152 p.
- Hamid G.A., Van Gundy S.D. et Lovett C.J., 1985. Citrus nematode alter carbohydrate partitioning in the "Washington" Navel orange. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 110: 642-646.
- Hamid G.A., Van Gundy S.D. et Lovett C.J., 1988. Phenologies of the citrus nematode and citrus roots treated with oxamyl. *Proceeding 6<sup>th</sup> International Citrus Congress* Midd-

- le-East* (6-11 March 1988, Tel Aviv, Israel): Margraf, 2: 993-1004.
- Jones W.W. et Steinacker M.L., 1951. Seasonal changes in concentration of sugars and starch in leaves and twigs of citrus trees. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 58: 1-4.
- 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., 2004. 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. et B'Chir M.M., 2006. Effet de *Tylenchulus semipenetrans* sur la morphogenèse et sur la physiologie des arbres de Citrus 'maltaise douce' greffées sur bigaradier. *Nematologia Mediterranea*, 34: 115-126.
- Kallel S., Abdelwahed A., Ammar M. et 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.
- 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.
- 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.
- O'Bannon J. H. et Reynolds W.R., 1967. The effects of chemical treatment on *Tylenchulus semipenetrans* and Citrus tree response during 8 years. *Nematologica*, 13: 131-136.
- Philis I., 1993. Control of the Citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, in established grapefruit orchards of Cyprus. *Nematologia Mediterranea*, 21: 63-66.
- 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.
- Robyt J.F. et White B.J., 1987. *Biochemical technique, theory and practice*. Brooks/Cole Publishing Company, Monterey, USA, 407 pp.
- Sharples G.C. et Burkhart L., 1954. Seasonal changes in carbohydrates in Marsh grapefruit in Arizona. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 63: 74-80.
- Shimizu T., Torikata H. et Toni S., 1978. Studies on the effect of crop load on the composition of Satsuma mandarin trees. V. Analysis of production processes of bearing and non-bearing trees based on the carbohydrate economy. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 46: 465-478.
- 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.
- Torikata H., Hara M., Torii S. et Sakibara K., 1974. Studies on the effect of crop load on the composition of Satsuma mandarin trees. I. Diurnal and seasonal fluctuation in osmotic concentration, solute ratio, soluble solids and moisture content in leaves and stems. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 43: 15-23.
- Thorne G., 1961. *Principles of Nematology*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, U.S.A., 553 pp.